

· 基础研究 ·

亚低温对大鼠局灶性脑缺血后神经细胞凋亡及 Bcl-X_L、Bcl-X_s、HSP70 mRNA 表达的影响

王强 孙毅明 李铁山 朱其秀 李江

【摘要】目的 观察亚低温对大鼠局灶性脑缺血后神经细胞凋亡及 Bcl-X_L、Bcl-X_s 和 HSP70 mRNA 表达的影响。方法 成年健康 Wistar 大鼠 140 只,随机分为假手术组、缺血再灌注组(H₀组)、缺血后即刻亚低温组(H₁组)和缺血再灌注后亚低温组(H₂组),应用线栓法建立大脑中动脉闭塞(MCAO)再灌注模型。利用冰袋行亚低温治疗,使大鼠体温下降。采用原位末端标记法检测脑组织细胞凋亡表达的变化,采用原位杂交方法检测脑组织 Bcl-X_L、Bcl-X_s 和 HSP70 mRNA 表达的变化。结果 亚低温治疗组(H₁及 H₂组)凋亡阳性细胞出现高峰时间延迟,且数量明显减少,Bcl-X_L与 Bcl-X_s之比显著高于 H₀组;H₁组各时间点 HSP70 的表达明显高于 H₂组。结论 亚低温具有脑保护作用,脑缺血后即刻亚低温的作用优于脑缺血再灌注后亚低温治疗。

【关键词】亚低温; 脑缺血再灌注; Bcl-X_L; Bcl-X_s; 热休克蛋白 70

Effects of mild hypothermia on the apoptosis of neurocyte and the expression of Bcl-X_L, Bcl-X_s and HSP70 mRNA after focal cerebral ischemia in rats WANG Qiang*, SUN Yi-ming, LI Tie-shan, ZHU Qi-xiu, LI Jiang. * Department of Rehabilitation Medicine, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, China

【Abstract】Objective To observe the effects of mild hypothermia on the apoptosis of neurocyte and the expression of Bcl-X_L, Bcl-X_s and HSP70 mRNA after focal cerebral ischemia in rats. Methods One hundred and forty adult rats were randomly divided into 4 groups: a sham-operated group (SO group), a cerebral ischemia-reperfusion group (CIR group), a cerebral ischemia plus hypothermia group (CIH group) and a cerebral ischemia-reperfusion plus hypothermia group (CIRH group). Following establishment of a permanent middle cerebral artery occlusion (MCAO) model in rats by using Zea-Longas method, the changes of apoptosis of neurocyte were measured with TUNEL assay, and the changes of the expression of Bcl-X_L, Bcl-X_s, HSP70 mRNA were determined by using the in situ hybridization. Results Compared with those in CIR group, the peaks of positive apoptosis in the CIH and CIRH groups were postponed, the amount of apoptosis was decreased obviously, and the ratio of Bcl-X_L/Bcl-X_s was higher, the expression of HSP70 mRNA in CIH group was significantly higher than that in CIRH group at different time points. Conclusion Mild Hypothermia has cerebral protective effects, and the therapeutic effects might be better in CIH group than in CIRH group.

【Key words】Mild Hypothermia; Ischemia, reperfusion; Bcl-X_L; Bcl-X_s; HSP70

目前,缺血性脑血管病的治疗除溶栓疗法外尚无特异性方法。脑保护剂虽然应用多年,但至今仍没有一种药物能通过 III 期临床的研究^[1]。其原因可能有两点:一是按动物实验所用的药物剂量用于人体时,可能产生难以承受的副作用;二是缺血性脑血管病的发病机制非常复杂,一种药物只能治疗其中某一病理环节,而不能干预所有环节。亚低温作为一种非药物性脑保护疗法,与药物治疗比较具有一定的优越性,它可以干预脑缺血的多个病理环节,对脑缺血及再灌注损伤起到保护作用^[2,3]。本研究通过观察亚低温作用对脑缺血后细胞凋亡及 Bcl-X_L、Bcl-X_s 和热休克蛋白 70 (heat shock protein, HSP70) 表达的影响,旨在为临床

应用提供可靠的实验依据。

材料与方法

一、动物造模和分组

成年健康雌性 Wistar 大鼠 140 只,体重 220 ~ 230 g,由青岛市药检所动物养殖中心提供。大鼠随机分为假手术组、缺血再灌注组(H₀组)、缺血后即刻亚低温组(H₁组)和缺血再灌注后亚低温组(H₂组),每组各 35 只。H₀组、H₁组和 H₂组大鼠均采用 Koizumi 等^[4]介绍的线栓法经左侧颈外-颈内动脉插线建立左侧大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)再灌注模型。栓线采用 4-0 尼龙单线,以 10% 水合氯醛(300 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉,仰卧固定,分离并暴露左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)和颈外动脉(external carotid artery, ECA),结扎并切断 ECA 及其

基金项目:青岛市科技局资助课题(No. 1998-44)

作者单位:266003 青岛,青岛大学医学院附属医院康复医学科(王强、李铁山、朱其秀、李江);中山医科大学附属中山医院神经外科(孙毅明)

分支,沿根部结扎 ICA 颅外分支翼腭动脉。由 ECA 残端插入一根顶端粘有硅胶的尼龙单线(顶端直径 0.28~0.30 mm),沿 ECA、CCA 分叉部和 ICA 轻轻推进,至 ICA 颅内分叉处时可阻断流入 MCA 的血流,进线长度 18~20 mm。缺血时间为 2 h,随后抽出插线使血流恢复实现再灌注。假手术组除不插线外,余步骤同上。各组再根据缺血后再灌注时间分为 2 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 和 7 d 组,每亚组各 5 只。造模成功标志:动物苏醒后出现同侧 Horner 征、对侧以前肢为重的偏瘫,爬行时向对侧划圈。

二、亚低温治疗方案

采用 10% 水合氯醛使大鼠持续睡眠,MCAO 手术过程中及术后以数字温度计测量肛温,至大鼠麻醉苏醒(约 MCAO 后 2 h)。

1. 假手术组:室温下不做任何处理。

2. H_0 组:MCAO 术后即刻用 100 W 白炽灯加热的方法使大鼠肛温维持在 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。

3. H_1 组:MCAO 术后,立即将大鼠放入 8°C 冷室内,待肛温降至 33°C 时(10 min 内)将大鼠移至温度为 25°C 冷室内,维持 5 h,调整冷室内冰袋数量,使大鼠肛温维持于 $(31 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。5 h 后将大鼠移至室内环境复温。

4. H_2 组:大鼠 MCAO 再灌注 2 h 后进行亚低温治疗,方法同 H_1 组。

三、脑标本的采集和处理

动物于缺血再灌注后各时间点用 10% 水合氯醛经腹腔深度麻醉,然后经心脏灌注 37°C 肝素生理盐水 250 ml,直至回流液清亮,再缓慢灌注 4% 多聚甲醛,大鼠开始出现全身肌肉抽动、四肢僵直表明灌注成功。迅速开颅取脑,取前囟以后 2~6 mm 范围内的脑组织,4% 多聚甲醛固定 12 h,酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡,包埋,连续切取 $7\ \mu\text{m}$ 冠状脑片,贴于多聚赖氨酸处理过的清洁载玻片上备用。

四、细胞凋亡检测

应用武汉产 TUNEL 凋亡细胞检测试剂盒,按照试剂盒说明操作,DAB 显色,细胞核中出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。

五、原位杂交检测

应用武汉产 Bcl- X_L 、Bcl- X_s 和 HSP70 mRNA 原位杂交检测试剂盒,按照试剂盒说明操作,DAB 显色,细胞浆中出现棕黄色颗粒者为阳性细胞,取部分切片不加探针,以 0.1 mol/L PBS 代替,未出现阳性结果。

六、统计学分析

采用 t 检验进行统计学分析。

结 果

一、脑缺血再灌注后细胞凋亡的变化

假手术组:纹状体与皮质区有少量凋亡阳性细胞表达。

H_0 组:缺血再灌注后 2 h,凋亡阳性细胞增多,主要位于缺血周围区,且明显比缺血中心区多;24 h 阳性细胞表达达峰值。

H_1 组:缺血再灌注后 2 h,缺血周围区凋亡阳性细胞增多,48 h 阳性细胞表达达峰值,以后逐渐减少;与 H_0 组相比, H_1 组凋亡细胞出现时间延迟,且数量明显减少,2 组相应时间点凋亡阳性细胞数量比较,差异均有统计学意义($t = 5.42 \sim 28.33, P < 0.01$)。

H_2 组:与 H_0 组缺血再灌注后相应时间点比较,凋亡阳性细胞明显减少,差异均有统计学意义($t = 4.46 \sim 25.44, P < 0.01$);与 H_1 组缺血再灌注后 12~48 h 间相应时间点比较,凋亡阳性细胞明显增多,差异均有统计学意义($t = 5.88 \sim 9.55, P < 0.01$),见图 1。

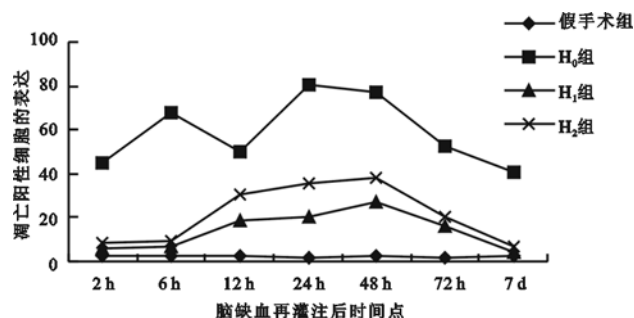


图 1 各组大鼠脑缺血再灌注后缺血周围区凋亡阳性细胞表达的变化趋势

二、脑缺血再灌注后 Bcl- X_L 及 Bcl- X_s mRNA 的表达

H_0 组:Bcl- X_L 于缺血再灌注 2 h 后开始减少,缺血周围区阳性细胞较缺血中心区多;24 h 下降明显,缺血皮质区 Bcl- X_L 显著下降,基底核区仍有表达,说明 Bcl- X_L 表达的持续时间与解剖部位有关。Bcl- X_s 在脑缺血前有少量表达,缺血再灌注后 24 h 开始增多,至 72 h 达峰值。Bcl- X_L 与 Bcl- X_s 之比随缺血再灌注时间的延长而逐渐下降,各个时间点比值均 < 1 。

H_1 组:Bcl- X_L 于缺血再灌注后 2 h 开始增加,24 h 达峰值,48 h 开始下降,至第 7 天仍有表达。与 H_0 组比较,Bcl- X_L 表达量下降的时间后延,至缺血再灌注后 7 d 仍有表达。Bcl- X_s 于缺血再灌注后 24 h 开始增多,72 h 达峰值。 H_1 组各时间点 Bcl- X_L 与 Bcl- X_s 之比均大于 1.80,与 H_0 组各相应时间点比较,差异均有统计学意义($t = 6.7 \sim 13.18, P < 0.01$)。

H_2 组:与 H_1 组比较, H_2 组脑缺血后各时间点 Bcl- X_L 表达较少,而 Bcl- X_s 表达较多。 H_2 组 Bcl- X_L 与 Bcl- X_s 之比明显低于 H_1 组,各时间点比较差异均有统计学意义($t = 2.69 \sim 6.81, P < 0.05$)。 H_2 组各时间点 Bcl- X_L 与 Bcl- X_s 之比均大于 1.4,与 H_0 组各相

应时间点比较,差异均有统计学意义($t = 5.46 \sim 12.66, P < 0.01$)。见图 2。

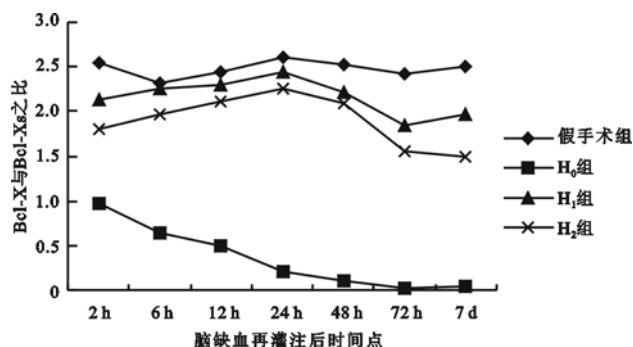


图 2 各组脑缺血再灌注后缺血周围区 Bcl-X_L 与 Bcl-X_s 之比的变化趋势

三、脑缺血再灌注后 HSP 基因的表达

H₀ 组:在严重缺血中心区,HSP70 阳性表达少,主要位于毛细血管内皮细胞及严重缺血周围区(缺血半暗带)。额叶皮质及纹状体于缺血再灌注 2 h 后出现 HSP70 的表达,24 h 表达明显,48 h 开始减少,72 h 降至最低。

H₁ 及 H₂ 组:与 H₀ 组比较,H₁ 及 H₂ 组缺血周围区各时间点 HSP70 阳性表达增加,至缺血再灌注后 7 d 仍有表达。缺血再灌注 2 h 后额叶皮质及纹状体出现 HSP70 的表达,24 h 表达明显,72 h 后额叶皮质仍有表达,各时间点 HSP70 的表达明显高于 H₀ 组($t = 3.29 \sim 26.31, P < 0.01$)。H₁ 组与 H₂ 组比较,HSP70 的表达在缺血再灌注后 6 h、24 h、48 h、72 h 4 个时间点差异有统计学意义($t = 3.61 \sim 14.69, P < 0.01$)。见图 3。

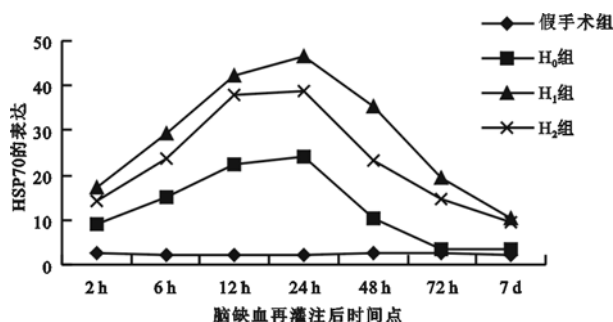


图 3 各组脑缺血再灌注后缺血周围区 HSP70 的变化趋势

讨 论

20 世纪 80 年代中期以来,国外大量实验研究发现:在脑缺血前、缺血早期和缺血期间给予低温治疗,可明显减轻脑缺血的病理损伤,促进脑缺血后神经功能的恢复。江基尧等^[5]报道,30~34℃ 低温对实验性颅脑损伤动物有明显的保护作用,损伤前行 30℃ 低温治疗可显著降低脑外伤动物的死亡率。国外研究发现,脑缺血持续 8 min 后给予低温治疗的脑保护作用

明显,而缺血持续 12 min 后低温的保护作用则不明显,故认为低温治疗的时间窗较窄^[6]。Gorges 等^[7]报道,局灶性可逆性脑缺血后,亚低温治疗开始的时间(时间窗)必须在缺血发生后 30 min 内,且应至少持续作用 3 h 才能发挥良好的脑保护作用。

Bcl-2 基因家族是细胞凋亡过程中一类重要的调节因子,包含两类功能相反的基因,一类是抑制细胞凋亡的基因,如 Bcl-2、Bcl-X_L 和 Bcl-W 等;另一类是促进细胞凋亡的基因,如 Bax、Bak 和 Bcl-X_s 等。这些基因编码的蛋白质具有不同的结构和功能。Bcl-2 家族成员中抑制与促进细胞凋亡的基因表达之比决定了细胞在受到凋亡信号刺激时是否发生凋亡^[8]。Dixon 等^[9]的实验结果进一步确认,短暂性半球缺血后海马 CA₁ 区神经元 Bcl-X_L mRNA 表达水平提高是其促进 Bcl-X_s 转录水平增强的表现。本实验观察到,亚低温能够提高 Bcl-X_L 与 Bcl-X_s 之比,对抗细胞凋亡,且以缺血后即刻亚低温组(H₁)更为明显。其机制可能在于:①亚低温可诱导 Bcl-X_L mRNA 的表达,抑制 Bcl-X_s mRNA 的表达;②通过多种机制减轻脑缺血损伤,促进保护性蛋白的合成;③亚低温可预防再灌注损伤对蛋白质合成环节的抑制,促进起抑制细胞凋亡作用的蛋白合成。

HSP70 与多种损伤和疾病的关系密切,在防止因应激而引起的细胞损害和促进受损细胞的恢复方面起着重要作用。通过药物、基因工程或其他方法来改变 HSP70 的表达,可对疾病的防治起到一定的作用。Hata 等^[10]研究了持续性 MCAO 后局部蛋白质合成、局部脑组织 ATP 含量及 HSP70 mRNA 表达的改变,发现 MCAO 后 1 h,蛋白合成受抑制区明显大于 ATP 耗竭区,且随着缺血时间的延长,ATP 耗竭区逐渐扩大,于缺血 1 d 内与蛋白质合成受抑制区相融合;持续性 MCAO 后,HSP70 的表达主要见于缺血半暗带。亚低温能恢复 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性,促进缺血脑组织对葡萄糖利用,使脑组织 ATP 的含量恢复正常,从而改善脑细胞的能量供应,发挥细胞膜稳定作用。本实验结果显示,2 个亚低温治疗组 HSP70 表达增多,并且于缺血再灌注 72 h 后额叶皮质仍有 HSP70 表达。我们考虑这是由于亚低温作用可降低脑组织氧耗量,从而减轻了脑缺血后蛋白合成的抑制。我们同时发现,缺血后即刻亚低温组(H₁)的脑保护作用比缺血再灌注后亚低温组(H₂)要强。这可能是由于缺血再灌注造成的损伤较单纯缺血要严重。

综上所述,本实验通过对脑缺血后神经细胞凋亡的研究发现,亚低温可干预缺血性脑血管病的多个病理环节,对脑缺血损伤的疗效肯定,副作用较小,缺血后亚低温治疗时间越早,疗效越明显。

参 考 文 献

- 1 Hack W, Kaste M, Bogousslavsky J, et al. European stroke initiative recommendations for stroke management- update 2003. *Cerebrovasc Dis*, 2003, 16:311-337.
- 2 Werner C. Mild and moderate hypothermia as a new therapy concept in treatment of cerebral ischemia and craniocerebral trauma, pathophysiologic principles. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 1997, 32:210-218.
- 3 Mori K, Maeda M, Miyazaki M, et al. Effects of mild (33 degrees) and moderate (29 degrees) hypothermia on cerebral blood flow and metabolism, lactate and extracellular glutamate in experimental head injury. *Neurol Res*, 1998, 20:719-726.
- 4 Kozumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema. A new experimental model of cerebral embolism infarcts in the ischemic area. *Jpn J Stroke*, 1986, 8:1-8.
- 5 江基尧, 朱诚. 国外亚低温与脑损伤的研究进展. *国外医学神经病*

- 学神经外科学分册, 1991, 20:4-6.
- 6 Busto R, Dietrich WD, Globus MVT, et al. Small differences in intracerebral brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1987, 7:729-738.
- 7 Gorges Z, Markarian MD, Joung H, et al. Mild hypothermia: therapeutic window after experimental cerebral ischemia. *Neurosurgery*, 1996, 38:542-550.
- 8 Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, et al. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science*, 1993, 262:1274-1277.
- 9 Dixon EP, Stephenson DT, Clenens JA, et al. Bcl-X short is elevated following severe global ischemia in rat brains. *Brain Res*, 1997, 776:22-29.
- 10 Hata R, Maeda K, Hermann D, et al. Dynamics of regional brain metabolism and gene expression after middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20:306-315.

(修回日期:2005-01-20)

(本文编辑:吴倩)

· 国外见闻 ·

日本 FIT 康复治疗系统简介

王强

日本 FIT (Full-time Integrated Treatment) 康复治疗系统是日本藤田保健卫生大学康复中心于 2000 年开始启用的新的康复治疗系统, 近两年来已经逐渐成熟, 并在日本推广应用^[1]。我于 2003 年 3 月至 2004 年 3 月到该中心研修一年, 对该系统有比较深刻的认识, 在此做一介绍, 期望对我国康复专业的发展有所启迪。

FIT 可译为集中的高频度的康复治疗, 其核心内容是每周训练 7 d, 每日训练的情报共享。日本随着人口老龄化的加剧, 脑卒中患者日趋增多。以往的康复治疗系统训练量小, 物理疗法及作业疗法各 40 min, 训练时间之外在床上的休息时间过长, 容易出现废用综合征。FIT 康复治疗系统正是为了解决这个问题而建立的。FIM 最早由藤田保健卫生大学康复医学科才藤荣一教授创立, 由园田茂教授实施并丰富和发展。

FIM 康复治疗系统的开展需要一定的条件。首先要有足够数量的治疗师, 保证患者每天都能得到治疗。我所学习的康复中心共有床位 160 张, PT 治疗师 18 名, OT 治疗师 14 名, ST 治疗师 4 名。PT 治疗师和 OT 治疗师各分为 A、B、C 3 组, 患者也分为 3 组, 每位患者由同一个组中的 2 位治疗师负责治疗, 一位是主要担当者, 每周给患者做 5 次治疗, 另一位是次要担当者, 每周在主要担当者休息的 2 d 给患者做治疗。所有患者每天均接受一次 PT 治疗和一次 OT 治疗。每次的治疗时间仍为 40 min。有言语障碍或吞咽困难的患者每周接受 ST 治疗师 2~3 次语言或吞咽治疗, 每次治疗时间为 20 min。康复护士也分为 3 组, 在患者住院 1 周内负责召开患者及家属的会议, 解释 FIT 治疗系统。康复护士负责安排患者在治疗时间外的病房生活, 并配合 OT 治疗师对患者进行 ADL 训练。每天早晨上班后, 各组的 OT 治疗师、PT 治疗师及护士集中交班, 对患者前

一天的治疗情况进行交流, 交待需要注意的事项, 如转移或步行时是否需帮助或监护、是否需要戴支具等。康复医师负责组织康复小组会议。康复训练采用运动学习方法及 Bobath 技术, 主要内容为 ADL 及步行训练, 支具应用非常普遍。

FIT 康复治疗系统需要的另一个条件是治疗室和病房一体化。该康复中心病房的对面即为治疗室, 中间为一 6 m 宽的走廊, 在病房可以见到治疗室, 在走廊既可以进行步行训练, 又可进行一些娱乐活动, 这样的设计扩大了患者的活动范围, 使患者在治疗时间外也可训练, 对促进患者的恢复有很大的帮助。

FIT 康复治疗系统的另一个重要特点是资料共享。医院建立了自己的局域网, 每位医师、治疗师均配备一台电脑。医师及治疗师将患者所有的临床资料及评估结果均输入电脑, 查询者只要输入患者的住院号, 即可得到患者的所有资料, 极大地满足了临床及科研需要。康复中心每周讨论一名疑难患者, 全体医师、治疗师以及主管护士参加, 通过多媒体播放患者在训练及病房的情况, 共同制定治疗方案。

与该中心以往的康复治疗比较, FIT 康复治疗系统已取得了明显的治疗效果。患者的住院时间缩短, 达到步行自立的时间缩短, 出院时 FIM 评分较以往治疗增加, FIT 治疗组 FIM 效率 [(出院时 FIM 评分 - 入院时 FIM 评分) / 住院天数] 是以往治疗组的 2 倍左右 [前者为 (0.3 ± 0.14), 后者为 (0.16 ± 0.09)], 且每获得 FIM 1 分所需要的医疗费用减少。因此 FIT 系统是一项值得推广应用的新的康复治疗体系。

参 考 文 献

- 1 才藤荣一, 园田茂, 编集. FIT プログラム. 东京: 医学书院, 2003. 7-13.

(修回日期:2004-12-02)

(本文编辑:松明)