

· 基础研究 ·

缺血后适应与缺血预适应对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响

王芳 罗洪英 段小毛 王俊杰 方会龙

【摘要】目的 探讨缺血后适应与缺血预适应对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响。**方法** 用大脑中动脉线栓法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型。30 只 SD 大鼠分为脑缺血再灌注模型组(模型组)、缺血后适应组及缺血预适应组,每组 10 只。以脑梗死体积、神经功能缺陷评分、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量评价缺血预适应与缺血后适应抗脑缺血再灌注损伤的作用。**结果** 缺血后适应组大鼠实验性局灶性脑缺血的梗死体积减少,神经行为改善($P < 0.05$),但作用弱于缺血预适应组($P < 0.01$)。脑组织匀浆生化指标检测,缺血后适应和预适应可以增强 SOD 活性,降低 MDA 含量,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 缺血后适应可减轻局灶性脑缺血再灌注大鼠脑的病理性损伤,但作用弱于缺血预适应。

【关键词】 脑缺血再灌注; 缺血后适应; 缺血预适应

The effects of ischemic postconditioning and ischemic preconditioning on cerebral ischemia-reperfusion injury

WANG Fang*, LUO Hong-ying, DUAN Xiao-mao, WANG Jun-jie, FANG Hui-long. * Department of Rehabilitation, Changsha Social Work College, Changsha 410004, China

Corresponding author: LUO Hong-ying, Email: wangfang_731@sohu.com

【Abstract】 Objective To study the effects of ischemic postconditioning and ischemic preconditioning on cerebral ischemia-reperfusion injury following middle cerebral artery occlusion in rats. **Methods** A reversible focal cerebral ischemia-reperfusion injury was modeled using middle cerebral artery occlusion. Thirty male Sprague-Dawley rats were randomized into three groups ($n = 10$ in each group): a cerebral ischemia-reperfusion group, an ischemic postconditioning group and an ischemic preconditioning group. The impairment of neurological function was scored and the infarct volume, the activity of superoxide dismutase and malondialdehyde (MDA) content were measured after the operation. **Results** In the ischemic postconditioning and preconditioning groups the neurological function was better and the infarction volume was significantly smaller compared with the model group. In the preconditioning group both infarction volume and neurological function were significantly better than in the postconditioning group. In the brain tissues of the preconditioning and postconditioning groups MDA content was lower, while the activity of superoxide dismutase was significantly higher than in the model group. **Conclusions** Ischemic postconditioning can attenuate pathological injury induced by focal cerebral ischemia and reperfusion. The neuroprotective effect induced by ischemic preconditioning is stronger than that induced by ischemic postconditioning.

【Key words】 Cerebral ischemia; Reperfusion; Ischemic postconditioning; Ischemic preconditioning

缺血后适应与缺血预适应是一种反复短暂缺血后诱发的快速适应性反应,能够对缺血组织及缺血组织再灌注损伤产生保护作用。二者的主要区别在于干预的时机不同,缺血后适应发生在缺血后,再灌注之前;缺血预适应发生在组织缺血之前。Murry 等^[1]首次提出心肌缺血预适应,Zhao 等^[2]首次提出心肌缺血后适应,之后缺血后适应与缺血预适应对脑缺血再灌注损

伤的保护作用也得到证实^[3,4]。然而缺血后适应与缺血预适应对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护程度尚缺乏对照研究。本研究旨在评价这 2 种内源性保护作用对脑缺血再灌注损伤的影响。

材料与方法

一、材料

氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC, 美国 sigma 公司产品);超氧化物歧化酶(super-oxide dismutase, SOD)、丙二醛(malonic dialdehyde, MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所);健康成年雄性 SD 大鼠(由湖南农业大学提供)60 只,体重

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.07.001

基金项目:湖南省教育厅科研课题(08D015)

作者单位:410004 长沙,长沙民政职业技术学院康复医学系(王芳、罗洪英);湘南学院基础医学课部(段小毛、王俊杰、方会龙)

通信作者:罗洪英, Email: wangfang_731@sohu.com

(300 ± 30) g。

二、方法

1. 动物分组:将 30 只大鼠分为模型组、缺血预适应组和缺血后适应组,每组 10 只。模型组将大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 2 h 后再灌注 24 h;预适应组先将大鼠双侧颈总动脉夹闭 2 min,再开通 20 min,反复 3 次,24 h 后大脑中动脉闭塞 2 h,再灌注 24 h;缺血后适应组于大鼠大脑中动脉闭塞 2 h 后进行血管开通 20 s,关闭 20 s,反复 3 次,再灌注 24 h。

2. 脑缺血大鼠模型的建立:按 Longa 等的方法^[5]制作大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型。大鼠称重,腹腔注射 10% 水合氯醛(3.5 ml/kg 体重)麻醉,行颈部正中切口,暴露右颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,结扎颈外动脉分支;在颈外动脉距其始端约 2 mm 处做一小切口,用一端烤成小球形的 3-0 尼龙线小球端经切口处插入颈外动脉,再经颈内动脉至大脑中动脉始端,栓塞大脑中动脉,造成局灶性脑缺血;大鼠脑缺血 2 h 后,拔出尼龙线,恢复脑组织血供。实验过程中维持直肠温度在 37℃ 左右。

3. 神经功能缺损评分:以修改的 Bederson 评分法^[6]作为评分标准。提尾悬空大鼠,手术对侧前肢无屈曲、腕屈及同时腕屈与肘屈分别计为 0,1 与 2 分;大鼠行走路径向手术对侧无偏移、有偏移及偏移呈圆形甚至原地旋转分别计为 0,1 与 2 分;刺激大鼠手术对侧颊须,反应灵敏、不灵敏及没有反应分别计为 0,1 与 2 分;大鼠躯体向手术对侧无扭转、偶尔扭转及频繁扭转分别计为 0,1 与 2 分。总分为 8 分。于再灌注 8,16 及 24 h 各进行 1 次神经功能缺陷评分,24 h 内 3 次评分的平均值作为评价指标。

4. 脑梗死体积测定:大鼠脑缺血 2 h 再灌注 24 h 后,颈椎脱臼处死,迅速取脑,沿冠状切面切成 5 片,每片厚约 2.5 mm,脑片置于 2% 的 TTC 溶液中 20 min,非缺血组织呈玫瑰红色,梗死组织呈苍白色,脑片用

10% 甲醛溶液固定。数码相机拍片,其图像输入计算机,用 NIH image program 图像分析软件测量脑片梗死面积,各大鼠 5 层脑片面积之和乘以层厚即脑梗死体积。

5. SOD 和 MDA 测定:取另外 30 只雄性 SD 大鼠按照上述方法分组及处理,颈椎脱臼处死,迅速取脑,除去嗅球、小脑和低位脑干后,用冰生理盐水冲洗,吸干,脑组织于低温(-70℃)冻存。称重后液氮匀浆,加入适量生理盐水得到 10% 的脑组织匀浆。根据试剂盒说明测定心肌匀浆液中 SOD 的活性和 MDA 的含量。

三、统计学分析

实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 12.0 版统计软件包进行统计分析,均数间两两比较用 q 检验。

结 果

一、3 组脑梗死体积比较

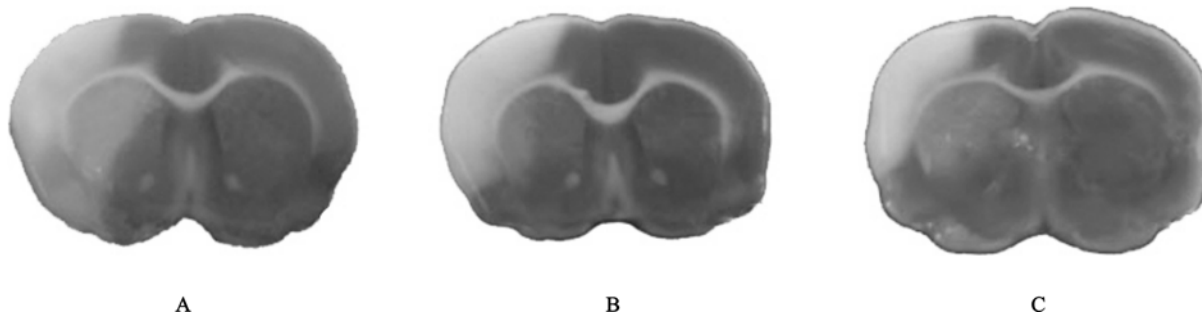
各缺血组大鼠脑组织可见明显梗死灶,其中模型组大鼠脑组织出现大面积梗死,梗死范围涉及皮质、皮质下区、纹状体及海马。缺血后适应组脑梗死体积小于模型组($P < 0.05$),缺血预适应组脑梗死体积小于缺血后适应组($P < 0.05$)。见图 1,表 1。

二、3 组神经功能缺损评分比较

各组大鼠术后出现明显的神经功能缺损症状,大多数表现为不同程度的对侧前肢屈曲,行走路径向手术对侧偏移,刺激手术对侧颊须反应减弱或无反应,少部分有躯体扭转现象。缺血后适应组神经功能缺损评分低于模型组($P < 0.05$);缺血预适应组神经功能缺损评分低于缺血后适应组($P < 0.01$)。见表 1。

三、3 组 SOD 活性和 MDA 含量比较

缺血后适应组与缺血预适应组 SOD 活性高于模型组($P < 0.01$),MDA 含量低于模型对照组($P < 0.01$);缺血后适应组与缺血预适应组 SOD 活性与 MDA 含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。



注:A 为模型组;B 为缺血后适应组;C 为缺血预适应组

图 1 3 组大鼠脑梗死图

表 1 3 组大鼠脑梗死体积和神经功能缺损评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	神经功能缺损 评分(分)	脑梗死体积 (mm ³)
模型组	10	5.7 ± 0.7	251.2 ± 18.2
缺血后适应组	10	4.9 ± 0.6 ^a	232.5 ± 16.2 ^a
缺血预适应组	10	4.2 ± 0.8 ^b	198.8 ± 18.8 ^c

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$;与缺血后适应组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

表 2 3 组大鼠 SOD 活性和 MDA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	SOD 活性 (kU/g)	MDA 含量 (mmol/g)
模型组	10	355.6 ± 38.9	4.08 ± 0.42
缺血后适应组	10	492.2 ± 34.3 ^a	3.36 ± 0.35 ^a
缺血预适应组	10	478.8 ± 39.0 ^a	3.16 ± 0.34 ^a

注:与模型组比较,^a $P < 0.01$

讨 论

缺血预适应是减轻脑缺血再灌注损伤的有效方法,通过在脑梗死前 1 次或多次短暂的缺血事件,可以激发机体内源性保护作用,从而减轻后续严重缺血事件引起的损伤。动物实验和临床研究表明,缺血预适应对缺血脑组织有保护作用,但由于缺血事件的难预见性限制了它的临床应用^[7]。

相对于缺血预适应,Zhao 等^[8]研究发现,在长期缺血之后,再灌注开始之前,给予短暂的、重复的、非致死性的缺血,可以产生有效的脑保护作用,并首次提出脑缺血后适应的概念。由于缺血后适应从理论上分析,医生仅仅需要在脑缺血发生后的再灌注过程初期进行几次简短的开通/再闭操作,就可使脑缺血后再灌注治疗获得最佳疗效,对缩小脑梗死面积,改善生活质量,进而提高脑缺血患者的生存率具有重要意义。因此近几年脑缺血后适应成为研究新热点,其机制与改善微循环、抗凋亡、增加腺苷含量、激活 ATP 敏感性钾通道及清除氧自由基等作用有关^[9]。

相对于 Zhao 等^[8]采用的全脑缺血模型,线栓法制备大鼠可逆性大脑中动脉缺血再灌注模型更符合临床常见的脑卒中类型。但目前以线栓法制备模型研究脑缺血后适应的结果出现争议,甚至新近一篇文献报道认为,缺血后适应对局灶性脑缺血再灌注损伤无保护作用^[10]。由此可见,缺血后适应对脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制很有必要进一步研究确定。本研

究以缺血预适应为阳性对照,观察缺血后适应对局灶性脑缺血大鼠模型的保护作用,实验结果显示,缺血后适应具有一定的减轻脑缺血再灌注损伤及改善神经功能的作用,其效果显著弱于缺血预适应组,但二者抗氧化应激的作用差异无统计学意义。可见,缺血后适应在激活内源性保护作用的程度并不逊于缺血预适应,可能是由于缺血预适应施加于缺血之前,其主要是针对缺血性损伤和再灌注损伤给予的预防保护措施,可增加组织对缺血的耐受性,而缺血后适应则施加于复灌初期,只是作用于再灌注损伤初期。

参 考 文 献

- [1] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986, 74: 1124-1136.
- [2] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285: 579-588.
- [3] 朱榆红, 吉训明, 李春艳, 等. 缺血后适应对大鼠脑缺血/再灌注损伤的影响. *中国病理生理杂志*. 2008, 24: 2151-2155.
- [4] Wang JY, Shen J, Gao Q, et al. Ischemic postconditioning protects against global cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats. *Stroke*. 2008, 39: 983-990.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [6] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 1986, 17: 472-476.
- [7] Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis*, 2009, 204: 334-341.
- [8] Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26: 1114-1121.
- [9] 侯立军, 李燕, 朱榆红, 等. 脑缺血后适应机制和展望. *中华脑血管病杂志*, 2010, 4: 32-36.
- [10] Kim YK, Leem JG, Shin JW, et al. Ischemic postconditioning may not influence early brain injury induced by focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Korean J Anesthesiol*, 2010, 58: 176-183.

(修回日期: 2011-03-24)

(本文编辑: 松 明)

欢迎订阅《中华物理医学与康复杂志》