

· 基础研究 ·

亚低温对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑保护的实验研究

王伟平¹, 李世英^{1△}, 陶颖媛², 余红³

(河北联合大学附属医院:1. 神经内一科;2. 门诊部, 河北唐山 063000;

3. 河北联合大学基础医学院药理学教研室, 河北唐山 063000)

摘要:目的 研究亚低温对局灶性脑缺血再灌注大鼠的脑保护作用及对大脑海马 CA1 区脑红蛋白(NGB)表达的影响。方法 用线栓法制作大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型, 将 132 只 SD 大鼠随机分为假手术组、常温缺血组和亚低温缺血组, 缺血组分别于缺血 3 h 再灌注 3、6、12、24、48、72 h 和 1 周处死, 假手术组于 24 h 时间点处死, 亚低温缺血组于缺血后 10 min 实施全身亚低温并持续 3 h。处死大鼠前进行神经功能缺损评分, 在再灌注 6、24、72 h 进行脑梗死体积的测定, 免疫组织化学染色观察 NGB 的表达。结果 (1)与常温缺血组比较, 亚低温缺血组神经功能缺损评分低($P < 0.05$), 脑梗死体积小($P < 0.05$)。(2)常温缺血组大脑海马 CA1 区 NGB 表达在再灌注 3 h 开始增加, 24 h 达高峰, 而后逐渐下降, 1 周时接近假手术组水平; 亚低温缺血组 NGB 表达与之相似。除再灌注 1 周外, 两组大脑海马 CA1 区 NGB 表达均高于假手术组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 除再灌注 1 周外, 亚低温缺血组 NGB 表达均高于常温缺血组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 亚低温对局灶性缺血脑组织具有保护作用, 促进海马 CA1 区 NGB 的表达可能是其发挥脑保护作用的机制之一。

关键词:亚低温; 脑缺血; 再灌注; 脑保护; 脑红蛋白

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.28.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)28-2956-03

The experimental study of the protective effect of mild hypothermia after focal cerebral ischemia and reperfusion in rats

Wang Weiping¹, Li Shiyong^{1△}, Tao Yingyuan², Yu Hong³

(1. The First Department of Neurology; 2. Department of Outpatient, Affiliated Hospital of Hebei United University,

Tangshan, Hebei 063000, China; 3. Department of Pharmacology, College of Basic Medicine,

Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: **Objective** To observe the protective effect of mild hypothermia and the effect on the NGB expression of hippocampus CA1 region after focal cerebral ischemia and reperfusion in rats. **Methods** The rats were randomly divided into sham operation group, normothermia ischemia group and mild hypothermia ischemia group. The focal cerebral ischemia models of rats were achieved by modified thread embolism. After ischemia for 3h and reperfusion at middle cerebral artery for 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h and 1w, the rats of normothermia ischemia group and mild hypothermia ischemia group were killed. The rats were killed in sham operation group at 24 h. Mild hypothermia was performed in 10 minutes after ischemia for 3h. Neural functional defect evaluation was conducted before death. The expression of NGB was detected by immunohistochemistry. At 6 h, 24 h and 72 h, the cerebral infarction volume were evaluated. **Results** Compared to normothermia ischemia group, the neurological defect score and the infarction volume in brain were significantly decreased in mild hypothermia ischemia group ($P < 0.05$). The expression of NGB increased at 3h after reperfusion, reached peak at 24 h, and then fell down. Compared with sham operation group, the expression of NGB markedly increased except for 1w in normothermia ischemia group and mild hypothermia ischemia group ($P < 0.05$). Compared with normothermia ischemia group, the expression of NGB markedly increased except for 1w in mild hypothermia ischemia group ($P < 0.05$). **Conclusion** Mild hypothermia could exert protective effect on the ischemic neurons during cerebral ischemia reperfusion. It may be one of the cerebral protective mechanism of mild hypothermia increases the expression of NGB.

Key words: mild hypothermia; brain ischemia; reperfusion; neuroprotection; neuroglobin

脑卒中是威胁人类健康的主要疾病之一, 溶栓治疗由于时间窗太窄, 临床应用受到限制, 且目前尚无循证医学证实有效的脑保护剂。1987 年 Busto 等^[1]首次提出了亚低温(32~33℃)的脑保护作用, 引起医学界的重视。研究发现在脑缺血前、缺血期间和缺血早期给予亚低温治疗, 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。脑红蛋白(neuroglobin, NGB)是一种主要位于脑内神经元的携氧球蛋白, 已有体内外实验表明 NGB 表达增加具有神经保护作用。本研究采用亚低温对局灶性脑缺血再灌注模型大鼠进行干预, 观察干预前、后大鼠神经功能缺损评分、脑梗死体积及缺血侧海马 CA1 区 NGB 的表达, 探讨亚低温对缺血脑组织的可能保护机制。

1 材料与方

1.1 实验动物及分组 健康雄性 SD 大鼠 132 只, 由河北联合大学实验动物中心提供, 鼠龄 2~3 个月, 体质量 250~280 g。随机分成假手术组(12 只)、常温缺血组(60 只)及亚低温缺血组(60 只), 缺血组按缺血 3 h 再灌注 3、6、12、24、48、72 h 和 1 周分 7 个亚组, 每个亚组 6 只; 常温缺血组与亚低温缺血组在再灌注 6、24、72 h 3 个时间点各多 6 只大鼠进行氯化三苯四氮唑(TTC)染色及梗死体积测定; 假手术组于 24 h 时间点随机选取 6 只大鼠行 TTC 染色。

1.2 动物模型的制备 采用改良的 Longa 等^[2]线栓法制备大鼠右侧大脑中动脉局灶性脑缺血再灌注模型。术中及缺血

△ 通讯作者, Tel:(0315)3725963; E-mail:lishiyong19701970@163.com。

表 1 常温缺血组与亚低温缺血组神经功能缺损评分比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	神经功能缺损评分						
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	1 周
常温缺血组	1.83±0.41	2.17±0.75	2.83±0.41	2.67±0.52	2.33±0.52	2.17±0.41	1.67±0.52
亚低温缺血组	1.17±0.41*	1.33±0.52*	1.67±0.52*	1.50±0.55*	1.33±0.82*	1.00±0.63*	0.83±0.41*

*: $P < 0.05$, 与常温缺血组比较。

期用电子温度计监测肛温,采用白炽灯升温、冰袋降温的方法使假手术组及常温缺血组缺血期肛温稳定在 36~37℃。亚低温缺血组按文献[3]方法实施全身亚低温处理,模型成功后立即开始诱导亚低温,即将冰袋置于大鼠的头部、颈部、肩部及躯干两侧,使脑缺血 10 min 时肛温降至 32~33℃,当肛温低于 32℃时,应用 60 W 白炽灯照射大鼠躯干部增温。缺血 3 h 后开始再灌注过程,亚低温维持 3 h 时开始复温,即应用电取暖器照射大鼠身体,使肛温在 10 min 内由 32~33℃升至 36~37℃。成功的模型动物清醒后出现左侧肢体运动障碍、自发向左侧打转、右侧霍纳氏征,随机补充,保证各组大鼠数量不变。假手术组操作过程相同,但栓线插入深度小于 10 mm。

1.3 神经功能缺损评分 参考 Longa 等^[2]评分法,在缺血再灌注各时间点对大鼠进行神经功能评分,具体积分方法为,0 分:无神经缺损症状,提起鼠尾,大鼠向地面伸展两前肢;1 分:左前肢持续屈曲,提尾实验阳性;2 分:左侧推抵抗力减弱,转圈实验阳性;3 分:向左倾倒;4 分:不能行走或意识障碍。

1.4 脑梗死体积测定 假手术组于 24 h 时间点随机选取 6 只大鼠处死,常温缺血组和亚低温缺血组于缺血再灌注 6、24、72 h 各随机选取 6 只大鼠处死,迅速断头取脑,冰冻后按 2 mm 厚度冠状切片,将切片放入 2% TTC 磷酸盐缓冲液中,37℃避光孵育 30 min,正常脑组织染成红色,梗死灶为白色^[4]。采用 Motic Image Advance 3.0 多媒体彩色病理图像分析系统进行处理,计算梗死灶体积占缺血侧大脑半球总体积的百分比。

1.5 取材及切片 常温缺血组和亚低温缺血组分别于相应时间点用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,迅速开胸暴露心脏,经胸升主动脉插管,用生理盐水和 4% 多聚甲醛灌注后断头取脑,分别距脑前门、后各 2.8 mm 处做冠状切面,置入 4% 多聚甲醛中固定 24 h,蒸馏水浸泡 4 h,常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋,连续切取 4 μm 厚冠状脑片作免疫组织化学染色。假手术组于 24 h 时间点处死取材。

1.6 NGB 免疫组织化学染色 一抗 NGB 购自北京博奥森生物技术有限公司,二抗试剂盒购自北京中杉金桥公司,标本切片常规脱蜡、水化,按试剂盒提供的实验步骤进行 NGB 免疫组织化学染色,DAB 显色,光镜下观察,胞浆出现棕色颗粒为阳性着色。选取缺血侧海马 CA1 区 5 个不重复($\times 200$)视野照相,使用 Image-J 软件对照片进行灰度转化和二值化处理,由软件数出每张照片中的阳性细胞数。

1.7 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较用单因素方差分析,两组间比较用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 神经功能缺损评分 假手术组未见神经功能障碍,常温缺血组和亚低温缺血组均有不同程度的神经功能缺损,且亚低温缺血组神经功能缺损评分较常温缺血组低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 脑梗死体积测定 假手术组未见梗死灶,亚低温缺血组

梗死灶体积占缺血侧大脑半球总体积百分比明显小于常温缺血组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 常温缺血组与亚低温缺血组梗死灶体积占缺血侧大脑半球总体积的百分比 (% , $\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	梗死灶体积百分比		
	6 h	24 h	72 h
常温缺血组	18.95±0.51	24.98±0.62	21.37±0.70
亚低温缺血组	12.29±0.48*	15.21±0.32*	13.97±0.59*

*: $P < 0.05$, 与常温缺血组比较。

2.3 大鼠海马 CA1 区 NGB 的表达 假手术组海马 CA1 区 NGB 阳性细胞数为(162.31±4.35)个/视野。常温缺血组再灌注 3 h,缺血侧海马 CA1 区 NGB 阳性细胞数开始增高,再灌注 24 h 达高峰,而后逐渐下降,至再灌注 1 周恢复至假手术组水平。亚低温缺血组缺血侧海马 CA1 区 NGB 阳性细胞数变化趋势与常温缺血组一致。常温缺血组和亚低温缺血组缺血侧海马 CA1 区 NGB 阳性细胞数除再灌注 1 周外,其余各时间点均高于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。除再灌注 1 周外,亚低温缺血组 NGB 表达均高于常温缺血组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 常温缺血组与亚低温缺血组缺血侧海马 CA1 区 NGB 阳性细胞计数的比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

再灌注时间	缺血侧海马 CA1 区 NGB 阳性细胞计数	
	常温缺血组	亚低温缺血组
3 h	167.28±4.58	173.67±6.02*
6 h	175.09±3.82	180.60±4.64*
12 h	185.58±6.08	194.23±6.29*
24 h	212.39±9.87	222.00±7.09*
48 h	198.07±8.58	203.05±9.44*
72 h	176.28±6.84	184.39±6.85*
1 周	162.48±4.35	163.19±4.61

*: $P < 0.05$, 与常温缺血组比较。

3 讨 论

脑缺血再灌注后引起能量衰竭和酸中毒,产生大量的自由基、兴奋性氨基酸,磷脂代谢异常积聚,并引起离子自稳机制破坏,导致细胞内钙超载,诱导凋亡的发生。而缺氧是脑缺血再灌注后损伤的主要因素。如何提升受损神经元的含氧量,促进其功能恢复,减少凋亡,一直是临床难以解决的问题。许多研究已证实亚低温对卒中后神经元有保护作用,能达到保护脑组织结构和功能的作用,但其确切的作用机制目前尚不十分明确^[5-6]。本研究结果显示,于缺血 3 h 后再灌注各时间点,亚低温缺血组大鼠神经功能缺损程度均较常温缺血组明显减轻;在缺血再灌注 6、24、72 h,亚低温缺血组大鼠脑梗死灶体积百分

比均较常温缺血组明显缩小,表明亚低温干预对脑缺血再灌注大鼠具有明显神经保护作用,与蔡斌等^[7]和刘昌云等^[8]的研究结果一致。

NGB 是德国科学家 Burmester 等^[9]研究发现的一种功能上类似于肌红蛋白的携氧球蛋白,它与氧有较高的亲和力,即使在血氧体积分数较低的环境下,NGB 也能成功携带氧跨越血脑脊液屏障,把氧转运到脑组织中,从而满足脑组织对氧的需求^[10]。研究发现只占全脑组织总蛋白含量 0.01% 的 NGB,无论离体或在体模型,其表达的增加都可以保护神经组织免受缺氧损伤,提示 NGB 具有脑保护作用^[11],但其机制并不十分明确,可能的机制主要包括以下几个方面:(1)促进氧向神经元线粒体的扩散或直接介导氧向线粒体的传递,促进三磷酸腺苷的产生,从而维持神经元的功能;(2)具有还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶的功能,该酶在三磷酸腺苷的生成中有重要作用,可增加细胞供能^[12]; (3)清除活性氧自由基和氮自由基^[13]; (4)作为信号转导中的调节子发挥作用。

本研究选取缺血侧海马 CA1 区为观察区域,结果显示,假手术组海马 CA1 区可见一定量 NGB 阳性表达,常温缺血组和亚低温缺血组缺血侧海马 CA1 区 NGB 阳性细胞数在再灌注 3 h 即高于假手术组,于再灌注 24 h 达高峰,较假手术组明显升高,以后逐渐下降,至再灌注 1 周恢复至假手术组水平。说明在缺血再灌注早期,缺血区脑组织 NGB 即合成增加,从而减轻了海马区缺氧性损伤,起到对神经元的保护作用。上述缺血侧海马 CA1 区 NGB 先升高后下降的表达趋势与赵斌^[14]报道的脑缺血再灌注损伤后海马区 NGB 表达规律一致,但 Shang 等^[15]认为脑缺血再灌注损伤后,海马区 NGB 的表达呈逐渐减少的趋势,这可能与采用动物模型和缺血程度的不同有关。

本研究还发现,常温缺血组和亚低温缺血组缺血侧海马 CA1 区阳性细胞数除再灌注 1 周外,其余各时间点均高于假手术组,差异有统计学意义。除再灌注 1 周外,亚低温缺血组缺血侧海马 CA1 区阳性细胞数均高于常温缺血组,差异有统计学意义。提示亚低温干预能促进脑缺血再灌注后 NGB 的表达。因此,亚低温的脑保护作用可能是通过促进 NGB 的表达,从而减少大鼠脑梗死灶体积,减轻神经功能缺损程度。

参考文献:

- [1] Busto R, Dietrich WD, Globus MY, et al. Small differences in intras ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1987, 7(6): 729-738.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [3] 刘志超,李承晏,董红娟,等.亚低温对大鼠急性脑梗死后脑组织内 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、EAA 及血浆 ET 变化的影响[J].

中华物理医学与康复杂志,2003,25(11):662-664.

- [4] 叶心国,余绍祖,李承晏.亚低温在大鼠脑缺血再灌注中的脑保护作用[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28(3): 158-161.
- [5] Zausinger S, Westermaier T, Plesnila N, et al. Neuroprotection in transient focal cerebral ischemia by combination drug therapy and mild hypothermia: comparison with customary therapeutic regimen[J]. *Stroke*, 2003, 34(6): 1526-1532.
- [6] 陶晓峰,刘畅,华正宇.亚低温对大鼠局灶性脑缺血再灌注后 HIF-1 α 及凋亡相关蛋白变化的影响[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2010, 27(10): 902-905.
- [7] 蔡斌,林毅,李智文,等.亚低温对大鼠局灶性脑缺血再灌注后 MMP-9 表达和细胞凋亡的影响[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2008, 25(4): 414-416.
- [8] 刘昌云,陈龙飞,许国英,等.亚低温对局灶性脑缺血-再灌注大鼠脑皮质脑源性神经营养因子表达及神经元凋亡的影响[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2005, 5(6): 398-403.
- [9] Burmester T, Weich B, Reinhardt S, et al. A vertebrate globin expressed in the brain[J]. *Nature*, 2000, 407(6): 520-523.
- [10] Wang X, Liu J, Zhu H, et al. Effects of neuroglobin overexpression on acute brain injury and long-term outcomes after focal cerebral ischemia[J]. *Stroke*, 2008, 39(6): 1869-1874.
- [11] Shao G, Gong KR, Li J, et al. Antihypoxic effects of neuroglobin in hypoxia-preconditioned mice and SH-SY5Y cells[J]. *Neurosignals*, 2009, 17(3): 196-202.
- [12] Liu J, Yu Z, Guo S, et al. Effects of neuroglobin overexpression on mitochondrial function and oxidative stress following hypoxia/reoxygenation in cultured neurons[J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(2): 164-1170.
- [13] Lechaue C, Rezaei H, Celier C, et al. Neuroglobin and prion cellular localization: investigation of a potential interaction[J]. *J Mol Biol*, 2009, 388(5): 968-977.
- [14] 赵斌.大鼠大脑中动脉缺血再灌注损伤后 NGB、p-ERK1/2 表达与变化的研究[D].泰安:泰山医学院, 2009.
- [15] Shang A, Zhou D, Wang L, et al. Increased neuroglobin levels in the cerebral cortex and serum after ischemia-reperfusion insults[J]. *Brain Res*, 2006, 1078(1): 219-226.

(收稿日期:2012-02-09 修回日期:2012-04-23)

(上接第 2955 页)

- [12] 鞠少卿. TNF 基因多态性与 SLE[J]. *国外医学:临床生物化学与检验学分册*, 2002, 23(2): 71-73.
- [13] 董妍君,李卫东,屠呦呦,等.双氢青蒿素对 BXS 狼疮小鼠自身抗体产生、TNF- α 分泌及狼疮性肾炎病理改变的影响[J]. *中国中西医结合临床杂志*, 2003, 23(9): 676-678.

- [14] 陈顺乐. 系统性红斑狼疮[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2004: 80-81.

- [15] 张学宁,沈秀芬,杨红英,等.系统性红斑狼疮患者血清 sIL-2R 和 IL-6 水平的变化[J]. *上海医学检验杂志*, 2001, 16(2): 93-95.

(收稿日期:2012-03-09 修回日期:2012-04-22)