

肢体缺血后处理对脑缺血 - 再灌注过氧化损伤的影响

赵 瑾¹, 赵士弟¹, 黄 磊², 姜丽娜¹, 潘 慧², 祝世功²

[摘要]目的:探讨肢体缺血后处理(LPostC)对脑缺血-再灌注(I/R)过氧化损伤的作用及其机制。方法:32只雄性昆明小鼠随机均分为假手术组(Sham组)、脑I/R模型组(I/R组)、I/R+后处理(PostC)组(PostC组)和I/R+LPostC组;除Sham组外,其余各组均缺血1.5h,术后24h处死实验小鼠。小鼠运动行为变化按Longa标准进行评分;检测脑组织中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果:与I/R组比较,I/R+LPostC和I/R+PostC组脑再灌注损伤程度呈现不同程度减轻,行为学评分降低($P < 0.01$)。与Sham组比较,I/R组MDA水平明显升高,SOD活性明显降低($P < 0.01$);与I/R组比较,I/R+PostC和I/R+LPostC组MDA含量明显降低($P < 0.05$),SOD活性明显升高($P < 0.05$)。结论:LPostC抑制小鼠脑I/R过氧化损伤,改善神经行为;其机制可能与LPostC能够减少脑组织活性氧生成和促进其清除有关。

[关键词] 脑缺血;肢体后处理;神经行为学评分;超氧化物歧化酶;丙二醛

[中国图书资料分类号] R 743.31

[文献标识码] A

The effect of limb ischemic postconditioning on peroxidation of injury induced by cerebral ischemia-reperfusion

ZHAO Jin¹, ZHAO Shi-di¹, HUANG Lei², JIANG Li-na¹, PAN Hui², ZHU Shi-gong²

(1. Department of Pathophysiology, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233030;

2. Department of Physiology and Pathophysiology, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of transient limb ischemic postconditioning (LPostC) on mouse against focal cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury. **Methods:** Thirty two male mice were randomly divided into four groups, 8 in each group: Sham group, I/R group, I/R + PostC group and I/R + LPostC groups. Twenty-four hours after the reperfusion, the neurologic deficit scores were recorded according to Longa standard and the brains were obtained to measure superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content. **Results:** Compared with I/R group, the neurologic deficit scores of I/R + LPostC group and I/R + PostC group were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with Sham group, the content of cerebral tissue MDA was markedly increased and the activity of SOD was decreased significantly in I/R group. Compared with I/R group, in I/R + LPostC group and I/R + PostC group, the activities of SOD in the cerebral tissues were enhanced ($P < 0.05$) and the contents of MDA in the cerebral tissues were decreased ($P < 0.05$). **Conclusions:** LPostC can attenuate focal cerebral ischemic reperfusion induced brain injury, improve neurological behavior and increase the ability of resisting brain injury. The protective mechanism of LPostC may be related to reduce reactive oxygen species production and promote its clearance in brain injury.

[Key words] cerebral ischemia; transient limb ischemic postconditioning; neurologic deficit scores; superoxide dismutase; malondialdehyde

急性缺血性脑血管病严重危害人类健康,尤其以局灶性脑缺血-再灌注(I/R)损伤较为多见。阐明缺血性脑卒中的发生、发展机制,对有效防治缺血性脑卒中具有重大意义。近年来,科学工作者通过对脑缺血自我保护机制的研究发现,调动机体的内源性保护机制可以有效治疗脑缺血疾病。缺血后处理(ischemic postconditioning, PostC)是近年来发现

的一种新现象,其为人们对缺血防治的认识开辟了新的领域,如何启动、激活这种内源性保护的研究具有积极的现实和理论意义^[1-3]。本教研室的前期研究^[4]发现,肢体缺血后处理(limb ischemic postconditioning, LPostC)对远隔器官脑具有对抗I/R损伤的神经保护作用,这种脑保护作用与HSP70有关。但其具体相关机制目前尚未明确。本文按Longa标准进行评分研究脑缺血后进行LPostC小鼠运动行为变化,运用生化技术检测施加LPostC脑组织丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性变化,从自由基的角度探讨LPostC抑制脑I/R损伤相关机制,为防治脑缺血性疾病提供完善的科学依据。

[收稿日期] 2010-07-29

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(KJ2010B122)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院病理生理学教研室,安徽蚌埠233030;

2. 北京大学医学部生理学及病理生理学系,100191

[作者简介] 赵瑾(1970-),女,硕士,讲师。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用健康雄性昆明小鼠 32 只, 8 周龄, 体重 25 ~ 30 g, SPP 级, 由北京大学医学部实验动物中心提供。

1.2 主要试剂和仪器 SOD 测定试剂盒、MDA 测定试剂盒, 均由南京建成生物工程研究所提供。Microphoto-FXA 型全自动照相系统(型号 E-800, 日本 Nikon 公司), PRM2 激光多普勒脑血流仪(Gene&I 公司)。

1.3 方法

1.3.1 分组 将 32 只小鼠随机均分成假手术组(Sham 组)、脑 I/R 模型组(I/R 组)、I/R + PostC 组(PostC 组)及 I/R + LPostC 组。

1.3.2 模型制作 (1) 参照 Longa 等^[5]方法制作小鼠局灶性脑 I/R 损伤模型。Sham 组小鼠只进行上述操作, 不插线栓。I/R 组线栓阻断大脑中动脉血流通过激光多普勒脑血流仪监测, 未完全阻断小鼠弃之不用。(2) PostC 模型制作。在缺血 1.5 h 后再灌注开始时给予 3 个循环的再灌注 - 缺血 5 min (先将尼龙线拔出 2 mm, 再将尼龙线放进 2 mm, 按上述时间循环 3 次)。(3) LPostC 模型制作。参照本室前期方法^[4], 在缺血 1.5 h 后再灌注开始前用 4-0 丝线扎闭股动脉造成肢体缺血, 松开丝线, 再灌注 5 min, 反复循环 3 次。

插线操作超过 15 min、术中出血多、麻醉过深呼吸不规律、术后 3 h 仍不能苏醒的动物不列入统计范围。术中用 100 W 灯泡照射, 保证小鼠肛温 37 ℃。术后予以保温, 环境温度应 ≥ 26 ℃, 安静清洁环境中分开饲养, 避免苏醒迟缓或意识障碍的小鼠被咬伤。

1.4 观测指标

1.4.1 神经行为功能评估 小鼠清醒后进行评分^[5]: 0 分为无神经功能缺失症状; 1 分为提尾时右前肢内收, 不能完全伸直; 2 分为行走时向右侧旋转; 3 分为向右侧倾倒; 4 分为不能自己行走或昏迷。评分采用双盲法, 由未参与实验分组的人员完成。

1.4.2 生化检测 MDA 含量及 SOD 活性 取上述实验各组小鼠脑组织, 匀浆后, 按试剂盒说明书进行操作。

1.5 统计学方法 采用方差分析、 q 检验和秩和检验。

2 结果

2.1 LPostC 对小鼠神经行为功能影响 I/R 后小鼠均明显表现神经行为功能障碍。I/R 组小鼠行为学评分显著高于 Sham 组($P < 0.05$) 表现出明显的神经功能障碍, 行为学评分增加。I/R + PostC 组及 I/R + LPostC 组小鼠行为学评分显著低于 I/R 组($P < 0.01$); I/R + PostC 组和 I/R + LPostC 组差异无统计学意义($P > 0.05$) (见表 1)。

表 1 LPostC 改善脑 I/R 损伤小鼠的行为学表现(n)

| 分组 | n | 0分 | 1分 | 2分 | 3分 | 4分 | H_c | P |
|--------------|-----|----|----|----|----|-----------------|-------|----------|
| Sham | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 [#] | | |
| I/R | 8 | 0 | 0 | 3 | 5 | 0 ^{**} | | |
| I/R + PostC | 8 | 0 | 5 | 3 | 0 | 0 [*] | 25.43 | < 0.01 |
| I/R + LPostC | 8 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 [*] | | |
| 合计 | 32 | 8 | 9 | 10 | 5 | 0 | | |

两两比较秩和检验: 与 Sham 组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 I/R 组比较[#] $P < 0.01$

2.2 PostC 抑制脑 I/R 损伤小鼠的脂质过氧化反应 结果显示, I/R 组 SOD 活性与 Sham 组相比显著降低($P < 0.01$), I/R + LPostC 组和 I/R + PostC 组 SOD 活性与 I/R 组相比则显著升高($P < 0.01$); I/R 组 MDA 含量与 Sham 组相比显著增加($P < 0.01$), I/R + LPostC 组和 I/R + PostC 组 MDA 含量则显著低于 I/R 组($P < 0.01$) (见表 2)。

表 2 脑 I/R 损伤时 MDA 含量、SOD 活性变化及 PostC 的作用($n_i = 8$)

| 分组 | SOD | MDA |
|--------------|------------------------------|---------------------------|
| | (U/mg protein) | (nmol/100 mg prot) |
| Sham | 35.51 ± 3.00 | 3.14 ± 1.43 |
| I/R | 23.35 ± 2.15 ^{**} | 5.44 ± 1.15 ^{**} |
| I/R + PostC | 34.70 ± 1.82 ^{##} | 3.30 ± 1.08 ^{##} |
| I/R + LPostC | 31.29 ± 1.21 ^{**##} | 3.61 ± 1.04 ^{##} |
| F | 49.12 | 6.44 |
| P | < 0.01 | < 0.01 |
| $MS_{组内}$ | 5.02 | 1.40 |

q 检验: 与 Sham 组比较* $P < 0.01$; 与 I/R 组比较^{##} $P < 0.01$

3 讨论

PostC 可在组织缺血事件发生后实施, 临床试验^[7-8]结果提示, PostC 可望成为 I/R 防治的新方法。而采用 LPostC, 对机体相对非重要的器官肢体进行 LPostC, 从而能保护心、脑等重要器官在遭遇严重的 I/R 时所受到的损伤, 可能更有意义深远的临

床价值。

Zhao 等^[9]在大鼠脑 I/R 模型上证实,再灌注前进行 3 轮 R-30 s/I-10 s 的 PostC 明显减轻 I/R 造成的脑损伤。缺血 PostC 可以对脑 I/R 损伤产生保护作用,提高脑组织对缺血缺氧的耐受性,但其产生保护作用机制的研究较少,尚需进一步研究。LPostC 对心肌 I/R 损伤产生对抗作用而保护了心肌组织得到了证实^[7-8,10],对脑组织是否具有神经保护作用尚少见报道,其产生保护作用机制的研究尚停留在对心脏的研究上。心脏和脑均为机体的重要器官,对缺血比较敏感,所以我们大胆推测两者有关保护机制有雷同之处。本研究即在已有对心脏研究机制的基础上,对 LPostC 诱导的脑保护机制进行探讨。

我们的前期研究^[4]表明,脑缺血后进行 LPostC 可明显减轻脑 I/R 损伤。本研究观察到,在小鼠局灶性脑 I/R 模型缺血 1.5 h,再灌注 24 h,I/R 组小鼠神经行为学评分改变明显,PostC 和 LPostC 可明显提高神经学功能,减少 I/R 损伤。根据大量的缺血预适应研究资料可以推测,这种 PostC 可能是调动了机体的内源保护机制,虽然这种内源性保护机制目前尚未阐明,但可以确信内源性保护分子发挥了重要作用。SOD 对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,此酶能清除超氧阴离子保护细胞免受损伤,其活力高低间接反映了机体清除氧自由基的能力。脑组织富含磷脂,I/R 损伤时,机体通过酶系统与非酶系统产生自由基,后者攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用,并因此形成脂质过氧化物,如醛基、羟基、酮基及新的氧自由基等。因而测试 MDA 的含量常常可反映机体内脂质过氧化程度,间接反映细胞损伤程度^[6,11]。Sun 等^[12]证实,心肌细胞缺氧 3 h 后立即进行 I-5 min/R-5 min 的缺氧后处理可减少复氧时氧自由基的生成和细胞内、线粒体内钙离子浓度,从而减轻 I/R 造成的损伤。

本研究结果显示,与 Sham 组相比,I/R 组脑组织 SOD 活性明显降低、MDA 的含量显著增加($P < 0.01$);与单纯 I/R 组相比,LPostC 和 PostC 可以使 I/R 后脑组织 SOD 活性有不同程度的恢复,降低 MDA 的含量($P < 0.01$)。这显示 LPostC 可减轻生物膜的脂质过氧化程度,减少质膜损害,缓解 I/R 造成

的细胞内外环境的改变,稳定细胞及细胞器功能,最终减少凋亡的发生,达到脑保护的目的。

[参 考 文 献]

- [1] Zhang Y, Milatovic D, Aschner M, *et al.* Neuroprotection by tamoxifen in focal cerebral ischemia is not mediated by an agonist action at estrogen receptors but is associated with antioxidant activity [J]. *Exp Neurol* 2007, 204(2): 819-827.
- [2] Cho S, Szeto HH, Kim H, *et al.* A novel cell-permeable antioxidant peptide, SS31, attenuates ischemic brain injury by down-regulating CD36 [J]. *Biol Chem*, 2007, 282(7): 4634-4642.
- [3] Whittemore ER, Loo DT, Cotman CW. Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons [J]. *Neuroreport*, 1994, 5(12): 1485-1488.
- [4] 赵瑾, 李杨, 黄磊, 等. 肢体缺血后适应对小鼠脑缺血再灌注损伤的影响及机制 [J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(6): 1096-1101.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [6] Rastogi L, Godbole MM, Ray M, *et al.* Reduction in oxidative stress and cell death explain hypothyroidism induced neuroprotection subsequent to ischemia/reperfusion insult [J]. *Exp Neurol* 2006, 200(2): 290-300.
- [7] Staat P, Rioufol G, Piot C, *et al.* Postconditioning the human heart [J]. *Circulation* 2005, 112(14): 2143-2148.
- [8] Kerendi F, Kin H, Halkos M, *et al.* Remote postconditioning: brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduce myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors [J]. *Basic Res Cardiol*, 2005, 100(5): 404-412.
- [9] Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26(9): 1114-1121.
- [10] Loukogeorgakis SP, Williams R, Danagiotidou AT, *et al.* Transient limb ischemia induces remote preconditioning and remote postconditioning in humans by a K(ATP) channel-dependent mechanism [J]. *Circulation* 2007, 116(12): 1386-1395.
- [11] Tang SC, Arumugam TV, Cutler RG, *et al.* Neuroprotective actions of a histidine analogue in models of ischemic stroke [J]. *Neurochem* 2007, 101(3): 729-736.
- [12] Sun HY, Wang NP, Kerendi F, *et al.* Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288(4): H1900-H1908.

(本文编辑 刘璐)