

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.16.003
文章编号: 1005-8982(2019)16-0017-05

老年大鼠大脑中动脉永久性缺血与缺血再灌注 对大脑损伤的比较研究

许娜¹, 渠静¹, 王赛楠², 江炜², 奥婷¹, 张君¹, 张芹¹, 肖淑英¹, 张瑞华¹
(首都医科大学附属北京潞河医院 1. 老年医学科, 2. 中美神经研究所, 北京 101149)

摘要: 目的 探讨老年大鼠缺血再灌注对大脑的影响。**方法** 将30只健康雄性老年(18~20月龄)SD大鼠随机分为假手术组(Sham组)、永久性缺血组(I组)及缺血再灌注组(I/R组),除Sham组外,其余两组采用线栓法复制老年大鼠大脑中动脉局灶缺血再灌注损伤模型。术后24h,2,3,5-氯化三苯基四氮唑检测大鼠脑梗死体积,ELISA法检测脑组织高迁移率族蛋白-1(HMGB1)和丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性,Western blotting检测脑组织HMGB1的表达。**结果** 与Sham组比较,I组脑梗死体积增加,SOD活性降低($P < 0.05$),MDA含量和HMGB1相对表达量升高($P < 0.05$)。与I组比较,I/R组大鼠脑梗死体积百分比减少,SOD活性上升($P < 0.05$),MDA含量和HMGB1相对表达量下降($P < 0.05$)。**结论** 与永久性缺血相比,老年大鼠大脑中动脉缺血再灌注可减轻大脑损伤。

关键词: 脑缺血;再灌注;脑损伤

中图分类号: R743.33

文献标识码: A

Comparison of middle cerebral artery permanent ischemia and ischemia reperfusion in aged rats

Na Xu¹, Jing Qu¹, Sai-Nan Wang², Wei Jiang², Ting Ao¹, Jun Zhang¹,
Qin Zhang¹, Shu-ying Xiao¹, Rui-hua Zhang¹

(1. Department of Geriatrics, Beijing Luhe Hospital, Capital Medical University, Beijing 101149, China;
2. Department of Neurology, Beijing Luhe Hospital, Capital Medical University, Beijing 101149, China)

Abstract: Objective To study the effect of ischemia/reperfusion on brain in aged rats. **Methods** Thirty male aged SD rats (18 to 20 months) were randomly divided into 3 groups: sham operation group (Sham group), permanent ischemia group (I group), ischemia/reperfusion group (I/R group). Except the Sham group, the other groups were established by using ligation of middle cerebral artery. Twenty-four hours after the operation, cerebral infarction volume was detected by TTC staining; the activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) were measured by ELISA test; the expression of high mobility group protein 1 (HMGB1) was examined by ELISA test and western blot analysis. **Results** Compared with Sham group, cerebral infarction volume was increased, SOD activity and cerebral blood flow were decreased ($P < 0.05$), the level of MDA and the expression of HMGB1 were up-regulated in I group ($P < 0.05$). Compared with I group, cerebral infarction volume was decreased, SOD activity was increased ($P < 0.05$), the level of MDA and the expression of HMGB1 were down-regulated ($P < 0.05$) in I/R group. The differences were statistically significant. **Conclusions** Compared with middle cerebral artery permanent ischemia, the brain damage could be alleviated after middle cerebral artery ischemia/reperfusion in aged rats.

Keywords: brain ischemia; reperfusion; brain injuries

收稿日期: 2019-02-28

[通信作者] 张瑞华, E-mail: 15910380817@163.com; Tel: 15910380817

缺血性脑卒中是中老年人易患的三大疾病之一,呈高发病率、高致残率和高死亡率的趋势,给社会和家庭带来沉重负担。脑缺血发病后出现缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)的相关问题,既可以改善脑组织的血液供应,恢复神经功能,又可导致损伤^[1]。目前脑 I/R 带来保护或损伤的机制尚不清晰,炎症和氧化反应可能是重要的因素^[2-4]。本研究采用大鼠中脑动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)的方法复制动物模型,观察老年大鼠大脑 I/R 后脑梗死相关指标的改变^[5]。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级雄性老年 SD 大鼠(北京维通利华公司提供)30 只,体重 520 ~ 550 g,术前 1 周适应环境。将大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、永久性缺血组(I 组)和缺血再灌注组(I/R 组),每组 10 只。I/R 组插入线栓 2 h 后拔出, I 组仅插入线栓不拔出, Sham 组在麻醉后仅分离动脉。

1.2 实验试剂及仪器

2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)(北京兰博利德生物技术有限公司),硅胶线栓(北京西农科技有限公司),高迁移率族蛋白-1(high mobility group protein 1, HMGB1)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)ELISA 试剂盒、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司),HMGB1 单克隆抗体(美国 Abcam 公司), β -actin 多克隆抗体(北京冠星宇科技有限公司)。

1.3 动物模型的复制

将老年大鼠置入麻醉机诱导箱内全身麻醉 2 ~ 3 min,置于手术台改用呼吸导管维持麻醉,大鼠全身肌肉松弛,仰卧固定,剃去颈前区毛发,消毒手术区域皮肤,行颈正中切口,钝性分离皮下组织,用自制拉钩分离大鼠右侧乳突肌与胸骨舌肌之间的肌间隙,暴露颈总动脉,钝性分离颈总动脉与周围组织,显微镊挑出颈总动脉穿线备用。钝性分离颈内外动脉后,电凝颈外动脉小分支,于距颈总动脉 3 ~ 4 mm 处结扎颈外动脉并电凝离断,在游离血管残端与颈总动脉间打一活结。动脉夹夹闭颈总动脉及颈内动脉,

在颈外动脉残端剪一小口,将硅胶线栓沿颈内动脉的夹角外切口插入,将颈外动脉残端拉向外上方,使之与颈内动脉走向平行,将线栓沿颈内动脉走向轻柔缓慢推进,当感觉到有阻力时,提示线栓进入大脑中动脉^[5-6]。

1.4 脑血流检测

老年 SD 大鼠经异氟烷诱导并维持麻醉,俯卧位固定,沿头皮正中切开,用双氧水去除骨膜及颅骨表面的脂类,充分暴露颅骨和前囟。在前囟后 2 mm、右侧旁开 5 mm 处,用小型颅骨钻将颅骨磨薄(不能钻透)。用激光多普勒仪(瑞典 PeriFlux5000 系统)监测血流。

1.5 脑梗死体积测量

术后 24 h 麻醉大鼠,快速断头取脑组织,将脑组织切片置于 2% TTC 溶液中染色^[7]。可见梗死灶区呈白色,正常组织呈红色,部分组织由白色向红色过渡。用 Image J 1.42 加以分析(NIH 图像分析软件)。

1.6 脑组织 HMGB1、MDA 含量及 SOD 活性检测

各组大鼠处死后去脑组织,提取蛋白,严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,使用酶联仪于 450 nm 波长处测吸光度值,通过绘制标准曲线求出标本中的 HMGB1、MDA 及 SOD 质量浓度。

1.7 Western blotting 检测脑组织 HMGB1 蛋白的表达

大鼠处死后取脑组织,置于冰上研磨,加入蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂,4℃、12 000 r/min 离心 30 min,取上清。BCA 法测定蛋白浓度。取 10 μ g 蛋白进行凝胶电泳。当电泳完成后,电转至聚偏二氟乙烯膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。加入单克隆抗体 HMGB1 (1 : 10 000 稀释)室温孵育 2 h。TBST 洗涤后,加入二抗室温孵育 1 h。TBST 洗涤,电化学发光试剂显色。 β -actin 作为内参,使用 LabWork 4.0 图像分析软件进行检测。每份样品检测 3 次,取其平均值。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大鼠脑血流比较

3 组大鼠术后 0、2、6、12 及 24 h 的脑血流量比较,

采用重复测量设计的方差分析, 结果如下: ①不同时间点的脑血流量比较, 差异有统计学意义 ($F=18.267, P=0.000$); ② 3 组的脑血流量比较, 差异有统计学意义

($F=103.912, P=0.000$); ③各组脑血流量变化趋势比较, 差异有统计学意义 ($F=19.183, P=0.000$)。见表 1 和图 1。

表 1 3 组大鼠不同时间点脑血流量比较 ($n=10, \text{ml/min}, \bar{x} \pm s$)

组别	0 h	2 h	6 h	12 h	24 h
Sham 组	233.6 ± 2.991	235.5 ± 2.500	230.7 ± 2.371	234.5 ± 1.918	235.7 ± 1.658
I 组	234.1 ± 3.515	111.5 ± 2.255	76.39 ± 3.657	48.75 ± 1.250	65.34 ± 2.178
I/R 组	235.0 ± 2.699	110.8 ± 2.175	123.8 ± 3.018	142.3 ± 2.097	154.3 ± 1.918

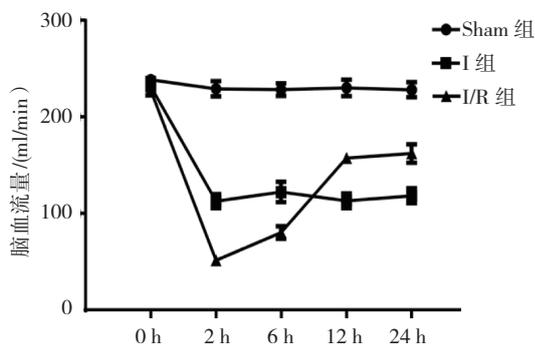


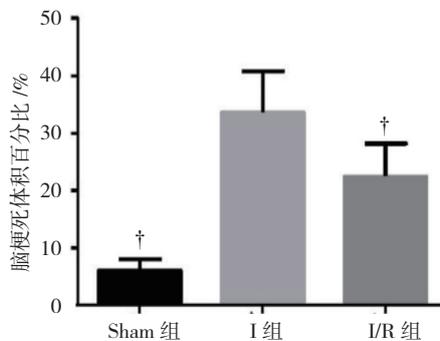
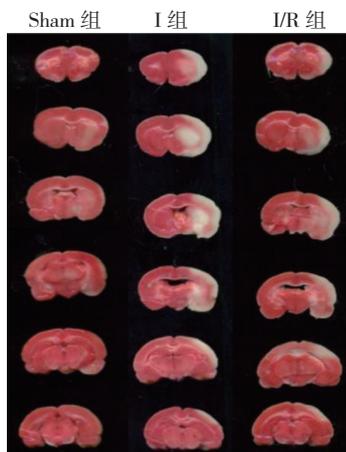
图 1 3 组大鼠脑血流量变化趋势 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

2.2 3 组大鼠脑梗死体积比较

Sham 组、I 组及 I/R 组大鼠脑梗死体积百分比分别为 (6.673 ± 1.690)%、(33.523 ± 6.112)% 和 (20.167 ± 4.733)%, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=38.83, P=0.000$)。与 Sham 组相比, I 组升高 ($P<0.05$); 与 I 组相比, I/R 组降低 ($P<0.05$)。见图 2。

2.3 3 组大鼠脑组织 SOD 活性及 MDA、HMGB1 含量比较

Sham 组、I 组及 I/R 组大鼠脑组织 SOD 活性



† 与 I 组比较, $P<0.05$

图 2 3 组大鼠脑梗死体积比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

分别为 (468.974 ± 34.429)、(310.247 ± 49.118) 和 (388.971 ± 63.496) pg/ml, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=15.410, P=0.000$); 与 Sham 组相比, I 组降低 ($P<0.05$), 与 I 组相比, I/R 组升高 ($P<0.05$)。Sham 组、I 组及 I/R 组大鼠脑组织 MDA 含量分别为 (103.009 ± 44.517)、(228.558 ± 41.504) 和 (163.879 ± 35.709) pg/ml, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=$

$14.780, P=0.000$); 与 Sham 组相比, I 组升高 ($P<0.05$), 与 I 组相比, I/R 组降低 ($P<0.05$)。Sham 组、I 组及 I/R 组大鼠脑组织 HMGB1 含量分别为 (137.388 ± 31.958)、(336.370 ± 57.112) 和 (211.353 ± 38.913) pg/ml, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=33.780, P=0.000$); 与 Sham 组相比, I 组升高 ($P<0.05$), 与 I 组相比, I/R 组降低 ($P<0.05$)。见图 3、4。

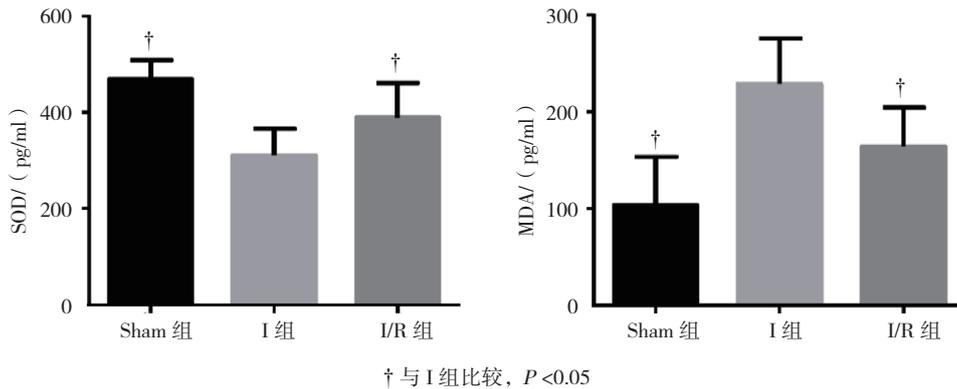


图 3 3 组大鼠脑组织 SOD 活性及 MDA 含量比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

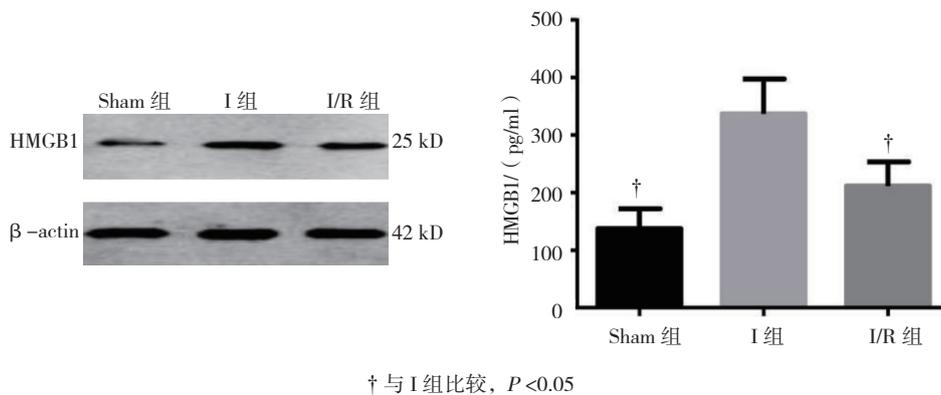


图 4 3 组大鼠脑组织 HMGB1 含量比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

3 讨论

大脑中动脉是缺血性疾病的好发部位, 缺血机制和治疗手段的探索一直是神经科学领域关注的重要问题。在脑缺血机制的研究中, 血管线栓阻塞大脑中动脉模型应用广泛^[8]。本实验采用该方法分别复制老年大鼠永久性局灶性缺血模型和缺血 2 h 后拔出线栓形成的老年大鼠局灶性脑 IR 模型。

脑 IR 相关保护和损伤的机制尚不明确, 其中炎症反应可能是重要因素^[9-12]。炎症反应中期, 机体释放大量的促炎因子, 引发炎症反应, 造成组织水肿甚至损伤; 而炎症反应晚期, 肿瘤坏死因子- α 等细胞因子可促进 HMGB1 的释放, 导致炎症反应, 加重组织损伤^[13-14]。CHEN 等^[15]的研究也相同结果, 脑缺血损伤患者血浆中 HMGB1 表达高于正常人群。但是也有专家认为, IR 相关保护方面的机制研究不足^[2]。因此, 笔者设计本实验, 观察脑 IR 后梗死体积、SOD、MDA 及 HMGB1 等相关指标。SOD 是细胞内主要的抗氧化酶, 能清除氧自由基从而抵抗其对细胞造成的损伤。MDA 是细胞膜脂质氧化后的产物之一, 也是细胞遭受氧化应激损伤的标志物^[16]。本研究观察 IR 过

程中老年大鼠脑组织中 SOD 活性及 MDA 含量, 结果表明再灌注后 SOD 活性升高, MDA 含量降低, 提示再灌注可能通过提高抗氧化酶活性, 降低氧化应激产物, 从而减轻脑缺血后大脑的损伤。

本研究的另一结果是 I 组大鼠脑组织中 HMGB1 的表达高于 Sham 组, I/R 组大鼠脑组织 HMGB1 的表达低于 I 组, 提示 HMGB1 参与永久性缺血和 IR 的炎症反应过程, 并且再灌注可能通过降低 HMGB1 的释放从而减轻脑缺血后对大脑的损伤。

综上所述, 与永久性缺血相比, IR 对脑梗死具有一定的保护作用, 该作用可能通过提高抗氧化酶活性, 降低氧化应激产物, 抑制 HMGB1 的表达等途径得以实现, 但其具体的分子调控机制, 尚需进一步深入研究。

参 考 文 献:

- [1] CHOI J H, PILE-SPPELLMAN J. Reperfusion changes after stroke and practical approaches for neuroprotection[J]. Neuroimaging Clin N Am, 2018, 28(4): 663-682.
- [2] 吴咏梅, 陶茹莹, 孟祥宝, 等. 缺血性脑卒中损伤机制研究进展[J]. 吉林中医药, 2018, 38(3): 368-372.

- [3] KALOGERIS T, BAINES C P, KRENZ M, et al. Ischemia/Reperfusion[M]. *Compr Physiol*, 2016, 7(1): 113-170.
- [4] 董梦珍, 邓云, 刘飞, 等. 脑缺血再灌注损伤机制的研究进展 [J]. *基层医学论坛*, 2018, 22(14): 1981-1982.
- [5] 李振宗, 赵育梅, 袁辉. 大鼠线栓法局灶性脑缺血模型的改良 [J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2018, 23(9): 419-422.
- [6] 林军, 李艳芳, 李冲, 等. 线栓法大鼠 MCAO 模型制作的要点及经验总结 [J]. *医学综述*, 2018, 24(17): 3398-3402.
- [7] 包新杰, 李雪元, 左赋兴, 等. 稳定的大鼠大脑中动脉栓塞脑梗死模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(4): 395-398.
- [8] 王玥琪, 刘星, 杨春壮, 等. 近十年来 MCAO 大鼠模型制备方法优缺点探讨分析 [J]. *牡丹江医学院学报*, 2017, 38(2): 136-138.
- [9] 郎丰山, 黄云霞, 薛云, 等. 脑缺血再灌注损伤病理生理机制研究进展 [J]. *食品与药品*, 2018, 20(4): 312-316.
- [10] RANA A K, SINGH D. Targeting glycogen synthase kinase-3 for oxidative stress and neuroinflammation: opportunities, challenges and future directions for cerebral stroke management[J]. *Neuropharmacology*, 2018, 139(1): 124-136.
- [11] SINNING C, WESTERMANN D, CLEMMENSEN P. Oxidative stress in ischemia and reperfusion: current concepts, novel ideas and future perspectives[J]. *Biomark Med*, 2017, 11(11): 11031-11040.
- [12] 余佳佳, 孔庆霞. 过氧化物酶 1 在脑缺血再灌注损伤中的研究 [J]. *临床神经病学杂志*, 2018, 31(3): 231-233.
- [13] JI X F, SHUO W, YANG L, et al. Impaired beta-adrenergic receptor signalling in post-resuscitation myocardial dysfunction[J]. *Resuscitation*, 2012, 83(5): 640-644.
- [14] 张婧. 脑缺血预处理对炎症相关因子表达的研究 [D]. 张家口: 河北北方学院, 2017: 29-30.
- [15] CHEN M H, LIU T W, XIE L, et al. A simpler cardiac arrest model in rats[J]. *Am J Emerg Med*, 2007, 25(6): 623-630.
- [16] 刘磊, 刘丽华, 马玉奎. 脑缺血再灌注损伤机制研究进展 [J]. *药学研究*, 2016, 35(9): 542-544.

(李科 编辑)