论著

文章编号:1000-5404(2011)18-1956-04

缺血再灌注期实施亚低温与再建血运治疗时间窗的影响

梁 成[1],晏 红[2],施鑫鹤[3],葛朝明[1],蔡洪斌[1],刘志艳[1] (730030 兰州,兰州大学第二医院:神经内科[1],病理科[2],检验科[3])

[摘要] **目的** 观察缺血灌注期间实施亚低温对再建血运(再灌注)治疗时间窗的影响并探讨其机制。**方法** 将120只雄性大鼠随机分为假手术组($n=10$);大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion,MCAO)24 h组($n=10$);常温再灌注组:按缺血再灌注时间点分为MCAO 2、3、4、5、6 h,再灌注24 h,每个时相点10只;亚低温再灌注组:时相点同常温再灌注组,每个时相点10只。MCAO 24 h组大脑中动脉闭塞24 h后直接处死,其余组动物均于再灌注24 h后处死。用TTC染色观察梗死体积,对大鼠模型进行Longa评分,用干-湿质量法测定脑含水量,采用免疫组化法检测大鼠模型的AIF、Cyt C、HSP70、MMP-9、LN的表达。**结果** 与脑梗死的近期结局MCAO 24 h组的梗死体积、Longa评分及AIF、Cyt C、HSP70、脑含水量及MMP-9、LN的表达比较:常温再灌注组MCAO 2~4 h再灌注24 h有统计学差异($P<0.01$),MCAO 5~6 h再灌注24 h没有统计学差异($P>0.05$);亚低温再灌注组MCAO 2~5 h再灌注24 h各组有统计学差异($P<0.01$),MCAO 6 h再灌注24 h没有统计学差异($P>0.05$)。亚低温再灌注组各时相点的梗死体积、Longa评分、脑含水量及MMP-9、AIF、Cyt C的表达均显著低于相应常温组,HSP70和LN的表达显著高于常温组($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** 再灌注期间实施亚低温可延长再建血运治疗时间窗,其机制可能与其能抑制半暗带细胞的凋亡和抑制MMP-9的表达从而减轻脑微循环破坏,使微循环承受再灌注能力上升有关。

[关键词] 凋亡诱导因子;细胞色素C;热休克蛋白;基质金属蛋白酶-9;层黏连蛋白;再建血运时间窗

[中图法分类号] R654.1;R454.5 [文献标志码] A

Effect of sub-hypothermia during ischemia reperfusion on time window for restoration of blood flow in rats

Liang Cheng[1], Yan Hong[2], Shi Xinhe[3], Ge Zhaoming[1], Cai Hongbing[1], Liu Zhiyan[1] ([1]Department of Neurology, [2]Department of Pathology, [3]Department of Laboratory Medicine, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730030, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of sub-hypothermia during ischemia reperfusion on time window for restoration of blood flow and its mechanism. **Methods** One hundred and twenty male rats were randomly divided into sham-operation group ($n=10$), 24 h middle cerebral artery occlusion (MCAO) group ($n=10$), normal temperature (NT) group ($n=50$), and sub-hypothermia reperfusion group ($n=50$). Twenty-four hours after reperfusion, the animals were killed. Cerebral infarction volume was observed with TTC staining. A Rat model was established and scored with the Longa scoring system. Water content in brain was measured with the dry-wet weight method. Expressions of AIF, Cyt C, HSP70, MMP-9, and LN were detected by immunohistochemistry. **Results** The cerebral infarction volume, Longa score, expression levels of AIF, Cyt C, HSP70, MMP-9, and LN, water content in brain were significantly different in 24 h MCAO group from those in 2-4 h MCAO group and in different sub-hypothermia reperfusion groups ($P<0.01$), but no significant difference was found between 5-6 h MCAO group and 24 h MCAO group, and in 6 h sub-hypothermia reperfusion group after 24 h reperfusion ($P>0.05$). The cerebral infarction volume, Longa score, and expression levels of MMP-9, AIF, and Cyt C were significantly lower while those of HSP70 and LN were significantly higher in sub-hypothermia reperfusion group than in normal temperature group ($P<0.05$). **Conclusion** Sub-hypothermia during reperfusion can prolong the time window for restoration of blood flow by inhibiting cellular apoptosis and MMP-9 expression, which can alleviate injury of microcirculation and increase the tolerance to reperfusion.

[**Key words**] apoptosis-inducing factor; cytochrome C; heat shock protein; matrix metalloproteinase 9; laminin; time window for restoration of blood flow (reperfusion)

Corresponding author: Liang Cheng, E-mail: hongyan200107@126.com

[通信作者] 梁 成,E-mail:hongyan200107@126.com

再建血运(再灌注,如溶栓)治疗是目前被公认和各国FDA批准的急性缺血性脑卒中的唯一治疗手段,但3 h治疗时间窗的限制使多数患者不能获益。亚低温(28~35 ℃)具有确切的神经保护作用[1-4]。本研究分析再灌注期实施亚低温能否延长再建血运(再灌注)治疗时间窗并观察凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)、热休克蛋白70 (heat shock protein 70, HSP70)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、层黏连蛋白(aminin, LN)的表达,探讨再灌注期实施亚低温作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及主要试剂

健康雄性Wistar大鼠120只,3月龄,体质量260~300 g,按随机数字表法分为假手术组($n=10$);大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)24 h组($n=10$);常温再灌注组:按缺血再灌注时间点分为MCAO 2、3、4、5、6 h,再灌注24 h,每个时相点10只;亚低温再灌注组:时相点同常温再灌注组,每个时相点10只。MCAO 24 h组大脑中动脉闭塞24 h后直接处死,其余组动物均于再灌注24 h后处死。用Koizumi改良线拴法制备大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型。免疫组化试剂购自美国Santa Cruz公司。氯化三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazoliumchloride, TTC)染色剂购自Sigma公司。

1.2 亚低温方法

亚低温在大脑中动脉再通后即刻实施并持续5 h。实施亚低温时将大鼠放入冰屋内,调整冰屋内冰袋数量,使大鼠肛温维持在(31±1)℃,5 h后,将大鼠移至室内环境复温。

1.3 梗死体积测量

在电脑上运用Image J 1.34图像分析软件,请其他不知情人员分别手工标出梗死灶边框,测出梗死面积及缺血侧半球面积。梗死体积(mm^3)=梗死面积(mm^2)×厚度(m)。校正梗死体积(mm^3)=左半球体积(mm^3)-[右半球体积(mm^3)-直接测量出的梗死体积(mm^3)]。为了减少大鼠个体差异造成的影响,采用梗死体积占半球体积百分值(V)表示,V=校正梗死体积/缺血半球体积×100%。

1.4 Longa评分

对大鼠模型进行Longa评分。用干-湿质量法测定脑含水量:在规定的时间点将大鼠深麻醉处死,快速断头取脑,将大脑半球分开,立即分别测湿质量,置110 ℃电烤箱24 h,再迅速测干质量。

脑含水量=(湿质量-干质量)/湿质量×100%

1.5 免疫组化法检测

大鼠石蜡包埋切片,常规脱蜡脱水。采用S-P法严格按照说明书操作。

1.6 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 17.0统计软件行t检验。

2 结果

与脑梗死的近期结局MCAO 24 h组的梗死体积、Longa评分、AIF、Cyt C、HSP70、脑含水量及MMP-9、LN比较:常温再灌注组MCAO 2~4 h再灌注24 h有统计学差异($P<0.01$),MCAO 5~6 h再灌注24 h没有统计学差异($P>0.05$);亚低温再灌注组MCAO 2~5 h再灌注24 h有统计学差异($P<0.01$),MCAO 6 h再灌注24 h没有统计学差异($P>0.05$)。亚低温再灌注组各时相点的梗死体积、Longa评分、脑含水量及AIF、Cyt C、MMP-9的表达均显著低于相应常温再灌注组,HSP70、LN的表达显著高于常温再灌注组($P<0.05$,$P<0.01$)。见表1、2。

表1 各组脑梗死所占体积的百分比、Longa评分和缺血侧脑含水量的比较($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	梗死体积(%)	Longa评分	脑含水量(%)
MCAO 24 h	81.13±6.53	3.75±0.46	82.50±0.09
常温再灌注组			
MCAO 2 h	23.42±4.26[a]	1.63±0.92[a]	80.75±0.71[a]
MCAO 3 h	26.64±5.80[a]	2.00±0.76[a]	81.50±0.08[a]
MCAO 4 h	35.23±1.91[a]	2.25±0.71[a]	81.70±0.16[a]
MCAO 5 h	78.90±5.31	3.00±0.76	82.00±0.17
MCAO 6 h	80.08±4.90	3.37±0.74	82.30±0.12
亚低温再灌注组			
MCAO 2 h	11.03±1.63[ab]	1.00±1.07[ac]	78.27±0.10[ab]
MCAO 3 h	16.07±1.77[ab]	1.25±0.89[a]	78.50±0.24[ab]
MCAO 4 h	18.09±2.32[ab]	1.50±0.76[a]	78.90±0.10[ab]
MCAO 5 h	49.68±3.80[ab]	1.63±0.92[a]	80.40±0.41[ab]
MCAO 6 h	77.12±4.18[c]	3.50±0.53[b]	80.70±0.11[b]

a:$P<0.01$,与MCAO 24 h组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与常温再灌注组比较

表2 各组细胞色素C、AIF、HSP70、MMP-9、LN阳性细胞表达($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	AIF	Cyt C	HSP70	MMP-9	LN
假手术组	0.67±0.82	0.33±0.51	3.50±1.87	2.00±1.42	20.83±2.04
MCAO 24 h	45.00±4.57[d]	9.00±1.40[d]	46.88±14.15[d]	81.17±4.29	5.12±1.17
常温再灌注组					
MCAO 2 h	13.00±1.41[ad]	3.00±0.89[ad]	80.00±13.02[ad]	36.00±2.00[a]	10.17±1.33[a]
MCAO 3 h	19.00±1.56[ad]	3.67±1.03[ad]	73.00±11.50[ad]	42.00±1.43[a]	9.00±1.42[a]
MCAO 4 h	24.00±2.14[ad]	5.00±1.42[ad]	75.00±13.02[ad]	57.01±2.11[a]	8.17±0.75[a]
MCAO 5 h	40.17±1.72[d]	7.83±1.32[d]	45.83±16.22[d]	77.67±2.94	6.33±1.03
MCAO 6 h	43.83±4.58[d]	8.00±1.41[d]	46.33±13.88[d]	79.50±1.76	5.16±1.72
亚低温再灌注组					
MCAO 2 h	11.00±1.41[abd]	1.83±0.75[abd]	100.00±14.13[abd]	21.34±1.75[ab]	15.00±1.41[ab]
MCAO 3 h	12.00±1.37[abd]	2.33±0.52[abd]	91.67±13.29[abd]	28.05±3.16[ab]	12.33±1.03[ab]
MCAO 4 h	15.00±1.32[abd]	3.00±0.89[abd]	81.50±13.32[abd]	36.83±2.28[ab]	10.50±1.05[ab]
MCAO 5 h	32.00±2.28[abd]	4.67±1.03[abd]	60.00±14.14[abd]	63.50±2.82[ab]	7.17±0.75[ab]
MCAO 6 h	41.00±2.28[cd]	7.67±1.75[cd]	47.90±13.14[cd]	77.83±0.40[c]	6.17±0.77[c]

a:$P<0.01$,与MCAO 24 h组比较;b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与常温再灌注组比较;d:$P<0.01$,与假手术组比较

3 讨论

通过再建血运以抢救缺血半暗带是目前治疗急性缺血性脑卒中最为有效的方法,但治疗措施必须在一个限定时间内(即治疗时间窗)进行,否则延迟的再灌注不仅无效反而会加重脑损伤[5],甚至出现出血转化、脑水肿等情况。现有研究表明血管再通治疗时间窗十分狭窄,比如国际公认的静脉溶栓干预的时间窗仅为3 h[6],但由于严格的适应证和医疗条件的限制,多数患者无法在时间窗内进行溶栓,即使在欧美发达国家,也只有不到5%的脑卒中患者能够得到治疗。在我国此类情况更为严重突出。为此,探讨如何扩展血管再通治疗时间窗,已成为神经病学研究的重点。现有研究表明有数种方法可以延长脑梗死治疗的时间窗,但距离临床实际都有一定的距离[7-11];同时以往的研究多侧重亚低温持续时间的研究及开始时间的研究[12]。对于亚低温对脑缺血再灌注疗效的研究尚缺乏相关的报道。因急性期脑梗死患者就诊时不可能提前给予亚低温治疗,只可能在入院后进行。本研究在亚低温开始的时间点上选择了再灌注期进行亚低温干预,旨在观察再灌注期实施亚低温能否延长血管再通时间窗。首先通过再灌注时间点不同的常温组与脑梗死近期(24 h)结局即MCAO 24 h组的梗死体积、Longa评分,摸索出本试验常温下的有效再建血运(再灌注)治疗时间窗;然后通过比较血运再通时间点不同的亚低温组与MCAO 24 h组的上述指标,摸索出本试验在亚低温条件下的有效再建血运(再灌注)治疗时间窗,最后得出再灌注期亚低温是否能够延长再建血运(再灌注)治疗时间窗。本研究提示:本组大鼠常温下大脑中动脉的再建血运(再灌注)治疗的有效时间窗为血管闭塞后4 h。但在亚低温干预下再建血运(再灌注)治疗的有效时间窗为血管闭塞后5 h,在此期间进行的再灌注组由于进行了亚低温的干预,仍然是有效的血液复灌,仍然可以较明显地减轻脑梗死的体积、抢救半暗带的神经细胞并改善预后。

本研究显示,亚低温各时相点的梗死体积、Longa评分、脑含水量、MMP-9及AIF、Cyt C的表达均显著低于相应常温组,HSP70和LN的表达显著高于常温组($P<0.05$,$P<0.01$)。提示闭塞血管再建血运(再灌注)+亚低温的组合治疗效果要明显好于单纯血管的再灌注,再灌注期亚低温具有脑保护作用。再灌注期实施亚低温具有脑保护的作用[13-14]这一结论可能是再灌注期亚低温能扩展有效缺血再灌注时间窗的基础。

本研究首先通过AIF、Cyt C、HSP70等指标从细胞凋亡角度探讨了再灌注期的亚低温延长再灌注时间窗及其脑保护的机制。研究显示亚低温可以减少脑梗死的细胞凋亡[15-17],脑缺血中有细胞凋亡的参与[18]。脑缺血过程激活胱天蛋白酶途径即caspase依赖凋亡途径和caspase依赖凋亡途径。同时,急性缺血性脑损伤可出现HSP70的表达,它可以抑制凋亡具有脑保护作用。本研究结果显示,再灌注期实施亚低温可以有效抑制AIF介导的非caspase依赖的凋亡途径和Cyt C诱导的caspase依赖的凋亡途径。它可能通过保护线粒体的完整性[19],抑制Cyt C的释放及向细胞质的易位以减少凋亡,同时再灌注期亚低温抑制缺血/再灌注损伤及抑制AIF的协同作用(促进凋亡)也可能是其机制之一。HSP70是1个能够抑制上述2种凋亡途径的蛋白。本研究表明,再灌注期亚低温各亚组HSP70显著高于相应常温组各亚组。应激的存在是HSP70产生的前提,再灌注期亚低温作为应激的另一种形式,它也可导致HSP70的升高,这也可能是亚低温具有神经保护作用的机制之一。

本研究还通过MMP-9、LN等指标从脑血管通透性及微循环的角度进行了探讨。脑对微循环的依赖性很强。脑组织几乎没有能量储备,必须依赖微循环连续灌注以供应氧和葡萄糖从而维持其正常生理功能;同时微循环还直接参与组织细胞的信息的传递。临床上再建血运(再灌注)过程中脑水肿及出血转化的发生,以及rt-PA的潜在中枢神经系统毒性作用(导致脑水肿、增加脑梗死出血转化的发生率和严重程度)都与大脑脆弱的微循环被破坏有关。只有微循环的完整有效,再灌注才有意义。所以,微循环障碍发生的迟早是制约再灌注时间窗长短的一个重要因素。

MMP-9表达水平的升高导致的对神经血管的基质成分尤其是微循环的血管基底膜进行降解进而破坏血脑屏障是发生再灌注损伤的重要机制之一[20-21]。作为MMP-9的作用底物,LN是血脑屏障基底膜的重要组成成分,它在维持血脑屏障的功能中的作用非常重要[22-23],在大脑微循环结构中扮演着重要的角色。本研究结果也证明了再灌注过程中MMP-9可降解血脑屏障的毛细血管基底膜的一些基质,如LN等,导致血管的完整性受到破坏,血脑屏障的功能损害。

本研究显示,再灌注期亚低温组的脑含水量、

MMP-9低于常温组($P<0.01$),而LN显著高于相应常温组。说明再灌注期亚低温可以改善血管通透性及微循环。其机制可能是亚低温抑制缺血/再灌注时白细胞介导的炎症反应和抑制脑缺血/再灌注后脑组织的Ca^{2+}内流。实施再灌注期亚低温后再建血运时间窗较常温组延长了1 h。这可能与再灌注期亚低温对MMP-9的有效抑制使脑微循环遭受的破坏下降,从而使微循环承受再灌注能力上升有关。

总之,再灌注期实施亚低温可延长再建血运(再灌注)治疗时间窗,这可能与其能抑制半暗带细胞的凋亡从而发挥脑保护作用及其抑制MMP-9的表达从而改善微循环进而发挥脑保护作用有关。

参考文献:

[1] Pagowska-Klimek I, Krajewski W. The use of hypothermia in intensive therapy Anestezjol Intens Ter, 2010, 42(3): 167-173.

[2] Kim J Y, Kim N, Yenari M A, *et al*. Mild Hypothermia Suppresses Calcium-Sensing Receptor (CaSR) Induction Following Forebrain Ischemia While Increasing GABA-B Receptor 1 (GABA-B-R1) Expression[J]. Transl Stroke Res, 2011, 2(2): 195-201,

[3] Clark D L, Penner M, Wowk S, *et al*. Treatments (12 and 48 h) with systemic and brain-selective hypothermia techniques after permanent focal cerebral ischemia in rat[J]. Exp Neurol, 2009, 220(2): 391-399.

[4] Dietrich W D, Atkins C M, Bramlett H M. Protection in animal models of brain and spinal cord injury with mild to moderate hypothermia.[J] Neurotrauma, 2009, 26(3): 301-312.

[5] Rose M E, Huerbin M B, Melick J, *et al*. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury [J]. Brain Res, 2002, 943(1): 15-22.

[6] Adams H P Jr, Adams, R J, Brott T, *et al*. Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke: A scientific statement from the Stroke Council of the American Stroke Association [J]. Stroke, 2003, 34(4): 1056-1083.

[7] Okubo S, Igarashi H, Kanamatsu T, *et al*. FK-506 extended the therapeutic time window for thrombolysis without increasing the risk of hemorrhagic transformation in an embolic rat stroke model[J]. Brain Res, 2007, 1143: 221-227.

[8] Martin-Schild S, Barreto A D, Hallevi H, *et al*. Feasibility of caffeinol and hypothermia for acute ischemic stroke[J]. Stroke, 2008, 39(2): 532.

[9] Straub S, Junghans U, Jovanovic V, *et al*. Systemic thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator and tirofiban in acute middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke, 2004, 35(3): 705-709.

[10] Seitz R J, Meisel S, Moll M, *et al*. The effect of combined thrombolysis with rtPA and tirofiban on ischemic brain lesions[J]. Neurology, 2004, 62(11): 2110-2112.

[11] Zhao W H, Ji X M, Ling F, *et al*. Local mild hypothermia induced by intra-arterial cold saline infusion prolongs the time window of onset of reperfusion injury after transient focal ischemia in rats[J]. Neurol Res, 2009, 31(1): 43-51.

[12] Tang X N, Liu L, Yenari M A. Combination therapy with hypothermia for treatment of cerebral ischemia[J]. J Neurotrauma, 2009, 26(3): 325-331.

[13] Dietrich W D, Atkins C M, Bramlett H M. Protection in animal models of brain and spinal cord injury with mild to moderate hypothermia[J]. J Neurotrauma, 2009, 26(3): 301-312.

[14] 吉玲, 程秀永, 朱长连, 等. 全身亚低温治疗对缺血缺氧性脑病新生儿生命体征的影响[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2007, 42(37): 470-472.

[15] Li H, Wang D. Mild hypothermia improves ischemic brain function via attenuating neuronal apoptosis[J]. Brain Res, 2011, 1368: 59-64.

[16] Zhang H, Xu G, Zhang J, Murong S, *et al*. Mild hypothermia reduces ischemic neuron death via altering the expression of p53 and bcl-2[J]. Neurol Res, 2010, 32(4): 384-389.

[17] Chip S, Zelmer A, Ogunshola O O, *et al*. The RNA-binding protein RBM3 is involved in hypothermia induced neuroprotection[J]. Neurobiol Dis, 2011, 43(2): 388-396.

[18] Ferrer I, Planas A M. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2003, 62(4): 329-339.

[19] Yenari M A, Iwayama S, Cheng D, *et al*. Mild hypothermia attenuates cytochrome c release but does not alter Bcl-2 expression or caspase activation after experimental stroke[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(1): 29-38.

[20] Tai S H, Chen H Y, Lee E J, *et al*. Melatonin inhibits postischemic matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activation via dual modulation of plasminogen/plasmin system and endogenous MMP inhibitor in mice subjected to transient focal cerebral ischemia[J]. J Pineal Res, 2010, 49(4): 332-341.

[21] Michalski D, Pelz J, Weise C, *et al*. Early outcome and blood-brain barrier integrity after co-administered thrombolysis and hyperbaric oxygenation in experimental stroke[J]. Exp Transl Stroke Med, 2011, 3(1): 5.

[22] 郭宗铎, 孙晓川, 何朝晖, 等. 蛛网膜下腔出血后早期海马MMP-9的表达与海马神经元凋亡的相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(1): 71-74.

[23] Yang Y, Rosenberg GA. MMP-Mediated Disruption of Claudin-5 in the Blood-Brain Barrier of Rat Brain After Cerebral Ischemia[J]. Methods Mol Biol, 2011, 762: 333-345.

(**收稿**:2011-04-16;**修回**:2011-05-26)

(编辑 王小宴)