DOI:10.16016/j.1000-5404.201504168

预先电刺激小脑顶核对大鼠局灶脑缺血溶栓时间窗内、窗外溶栓预后的影响

唐维菊[1],董为伟[2],谢 鹏[2],程鹏飞[2],白顺杰[2],任怡斐[2],王 宫[1],陈秀英[1],崔 春[3],庄羽翔[3],黄 文[1]
(400037 重庆,第三军医大学新桥医院:神经内科[1],放射科[3];400016 重庆,重庆医科大学第一附属医院神经内科[2])

[摘要] **目的** 探讨预先电刺激小脑顶核(fastigial nucleus stimulation,FNS)启动中枢神经系统内源性神经保护对大鼠局灶脑缺血溶栓时间窗的影响,探讨 PPARγ 介导炎性机制在 FNS 对溶栓预后影响中的作用。**方法** 将 60 只 SD 大鼠按随机数字表法分成 FNS 组和对照组,每组 30 只。FNS 组预先给予电刺激小脑顶核 1 h,电刺激完成后即刻制备大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion,MCAO)模型;对照组不予电刺激小脑顶核,仅制备 MCAO 模型。分别于栓塞后 1、3、6、9、12、15 h 溶栓;溶栓后 72 h 予以神经功能评分后处死大鼠,断头取脑,梗死边缘半暗带组织行 Western blot 和荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 PPARγ 表达水平,比色法检测髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性。**结果** FNS 组能改善神经功能评分,PPARγ 表达水平随溶栓再灌注时间呈逐渐增高的趋势,表达高峰可能在梗死后 9 h 前后,Western blot 和 RT-PCR 检测结果均提示 3、6、9、15 h FNS 组与其对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$);6、12 h 和 15 h FNS 组脑梗死边缘区 MPO 活性与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** FNS 对脑梗死大鼠有保护作用,并可适当延长大鼠局灶脑缺血溶栓时间窗,该作用可能与 PPARγ 介导的炎性调控作用有关。

[关键词] 小脑核;电刺激;脑缺血;时间窗;血栓溶解治疗;PPARγ;过氧化物酶
[中图法分类号] R454.1; R741.05; R743.33 [文献标志码] A

Effect of pre-condition cerebella fastigial nucleus electrical stimulation within and beyond the time window of thrombolytic on ischemic stroke in rats

Tang Weiju[1], Dong Weiwei[2], Xie Peng[2], Cheng Pengfei[2], Bai Shunjie[2], Ren Yifei[2], Wang Gong[1], Chen Xiuying[1], Cui Chun[3], Zhuang Yuxiang[3], Huang Wen[1] ([1]Department of Neurology, [3]Department of Radiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of neurogenic neuroprotection conferred by cerebellar fastigial nucleus stimulation (FNS) and the role of PPARγ-mediated inflammation in a rat model of cerebral ischemia reperfusion. **Methods** After a continuous 1-hour fastigial nucleus electric stimulation, the male Sprague-Dawley (SD) rats were immediately given middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 1, 3, 6, 9, 12 and 15 h ($n=5$ for each time point) undergoing reperfusion with intravenous recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA), while the control group ($n=30$) received no FNS. After 72 h of reperfusion, the neurological deficits were evaluated. The brain tissue in ischemic penumbra was harvested to determine the myeloperoxidase (MPO) activity by a spectrophotometer, and the expression of PPARγ was measured by Western blotting and RT-PCR. **Results** FNS group had improved neurological deficits compared with the control group. The expression level of PPARγ was increased gradually with reperfusion time, and reached the peak after 9 hours' reperfusion, and its mRNA and protein levels were obviously higher than each control group after 3, 6, 9, 12 and 15 hours' reperfusion ($P<0.05$). The MPO activity was also significantly higher

[基金项目] 重庆自然科学基金重点项目(CSTC2011BA5012);国家自然科学基金面上项目(81171113)
[通信作者] 黄 文,电话:(023)68774265,E-mail:hlu72@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151124.0853.003.html(2015-11-24)

in 6, 12 and 15 h after reperfusion in the FNS group than control group ($P<0.05$). **Conclusion** FNS exerts neuroprotective effects and prolongs the therapeutic time window in rat cerebral ischemia/reperfusion, which might be related to the PPARγ-mediated inflammation in penumbral region.

[**Key words**] cerebral ischemia; fastigial nucleus stimulation; therapeutic time window; thrombolysis; PPARγ; myeloperoxidase

Supported by the Key Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011BA5012) and the General Program of National Natural Science Foundation of China (81171113). Corresponding author: Huang Wen, Tel: 86-23-68774265, E-mail: hlu72@163.com

缺血性脑血管病的高发病率、高死亡率、高致残率和高复发率给患者及家庭、社会带来极大危害[1]。随着我国老龄社会的到来和饮食结构、习惯的改变,该病发病率增高,且发病年龄呈年轻化的趋势,缺血性脑血管病的防治日益严峻。时间窗内(4.5 h)超早期静脉使用重组人组织型纤溶酶原激活剂(recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA)溶栓是目前 FDA 唯一批准且有效的治疗。时间窗外溶栓治疗因继发缺血再灌注损伤导致弊大于利,但从长远功能恢复的角度来看,病损区的功能恢复需要血流再通送去氧及其他营养物质,所以,血管再通是必要的,也就是说时间窗外溶栓(延长时间窗)也是必要的。如果能够对抗缺血再灌注损伤,无疑可以延长溶栓时间窗。已有研究提示,预先电刺激小脑顶核(fastigial nucleus stimulation, FNS)可以通过增加脑血流量、改善能量供应、减少局部炎症性反应等多方面启动中枢神经源性神经保护,从而发挥综合性的神经保护效应改善缺血再灌注损伤的预后[2-3]。但是 FNS 启动的内源性神经保护作用在 rt-PA 溶栓时间窗的研究甚少,rt-PA 狭窄的溶栓时间窗使大多数的患者不能从这一有效的治疗中获益。内源性神经保护如果能拓宽 rt-PA 的溶栓时间窗,将会使更多的患者从该有效的治疗中获益。我们将 FNS 应用于是否能够延长或拓宽溶栓的时间窗,并从过氧化物酶体增殖物激活受体 γ(per-oxisome proliferators activited receptor γ,PPARγ)依赖的炎性调控机制的角度探讨 FNS 影响溶栓预后的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

实验动物为 SPF 级 SD 大鼠 60 只,雄性,体质量(280±50)g,由第三军医大学新桥医院实验动物中心提供。实验动物获得第三军医大学动物伦理委员会批准,许可编号:SYXK(渝)2012-0011。大鼠用随机数字法分成电刺激组(FNS 组)和对照组,每组 30 只。FNS 组预先电刺激小脑顶核 1 h,两组制备大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠模型后,分别于 1、3、6、9、12、15 h 后以尿激酶溶栓处理,每个时相点 5 只大鼠。

1.2 小脑顶核电刺激

大鼠以 10% 水合氯醛按 0.35 mL/kg 腹腔注射麻醉,参照夏一鲁等[4]的实验方法。将大鼠固定在立体定位仪上(小脑电刺激仪由重庆大学理论电工研究所设计制作),剪开头皮,充分暴露颅骨,根据大鼠脑立体定位图谱进行左侧核团定位,小脑顶核(FN):以前囟为零点,正中线向后 11.6 mm,正中线向右旁开 1.2 mm,深 5.6 mm,钻孔,插入双极针电极(100 μm),电流刺激强度为 50 μA 的直角方波脉冲,频率 70 Hz,时程 0.5 ms,连续刺激 1 h。观察出现血压升高,摆尾,立毛现象为电刺激成功。

1.3 大脑中动脉栓塞-溶栓再通大鼠模型

术前禁食 12 h,大鼠以 10% 水合氯醛按 0.35 mL/kg 腹腔注射麻醉,自体血栓及模型的制备参照 Busch 等[5]报道的方法。显露麻醉大鼠左侧股静脉,将 0.6 mL 静脉血吸入装有 75 U 凝血酶的注射器内,混匀,快速推入内径为 0.53 mm 腰麻管内,成型后推入 PBS 缓冲液,将血栓剪切为 2.5 mm 长的小栓子、固缩 4 h,用 PBS 将 12 个质量好的小栓子吸入腰麻管内待用。切开颈部正中皮肤,分离结扎左侧翼腭动脉、颈外动脉颅外分支和颈外动脉远心端。将穿刺针插入并将针尖端置于颈内外动脉分叉处,固定。血栓制成后 4 h,夹闭颈总动脉,用 50 μL PBS 将栓子推入。将栓子推入后,根据实验要求,插入穿刺针、固定,将 0.6 mL 尿激酶溶液(10 mg/kg)沿颈外动脉缓慢推入,时间约为 20 min。手术过程保持室温为 37 ℃。

1.4 神经功能评分

实验大鼠手术后放回笼中饲养,自由饮食,予以青霉素饮水,维持室温 37 ℃。溶栓后 72 h 予以神经功能评估,参照 Zea Longa 5 分制评分标准,待大鼠麻醉清醒后进行评分:0 分,无神经功能缺损症状;1 分,轻度局灶性神经功能缺损(不能完全伸展左侧前肢);2 分,中度局灶神经功能缺损(向左侧转圈);3 分,重度神经功能缺损(向左侧倾斜);4 分,不能自发行走,

意识水平降低。

1.5　标本收集

评分后以过量的水合氯醛麻醉处死,断头取脑,选择病灶侧大脑中动脉供血区的脑皮质,用锡箔纸包裹并标注,迅速置于液氮之中保存,用于检测 PPARγ 蛋白表达及髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)活性。

1.6　比色法检测中性粒细胞浸润情况

比色法检测梗死侧皮质 MPO 的活性。大鼠处死后,取缺血侧脑组织 100 mg 加入质量分数为 0.5% 的溴化十六烷基三甲胺 2 mL,超声粉碎(30 s×3 次),4 ℃下 10 000 r/min 离心 15 min,取上清液 0.1 mL 加入反应液 2.9 mL,保持温度 25 ℃,于分光光度计 460 nm 波长下立即扫描 2 min。根据公式计算光密度值[D(460)]。

1.7　Western blot 检测 PPARγ 蛋白表达

制备 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶,上样,SDS-PAGE 进行蛋白标本的垂直电泳,将硝酸纤维膜及滤纸浸泡在转移缓冲液中,从阴极到阳极依次叠放滤纸、凝胶、硝酸纤维膜、滤纸,将蛋白质电泳转移到硝酸纤维膜上,完成后封闭过夜,在硝酸纤维素膜上先后加入 PPARγ 多克隆抗体(稀释浓度均为 1∶100)进行抗原抗体结合反应,DAB 显色观察结果并照相。用 Bandleader 3.0 软件对 Western blot 条带进行灰度扫描,按下述公式分别计算 3 次实验中某蛋白的相对含量:蛋白相对含量 =(该蛋白条带的灰度值 - 背景的灰度值)/(上样对照条带的灰度值一背景的灰度值),以此比值计算均数与标准差。

1.8　RT-PCR 检测 PPARγ mRNA 表达水平

PPARγ 的引物正义链:5′-TGCGGAAGCCCTTTGGTGAC-3′,反义链:5′-GCAGCAGGTTGTCTTGGATGTC-3′,由重庆市海韵生物技术公司合成。总 RNA 抽提,cDNA 的合成,PCR 扩增。取 5 μL PCR 产物在 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳后,将凝胶在 0.5 μg/mL 溴化乙锭中浸泡 10 min 染色,用 Bio-Rad 凝胶成像分析系统成像并测定 PPARγ 和 β-actin 的光密度值,以 PPARγ 与 β-actin 的光密度比值作为 PPARγ mRNA 的表达水平。

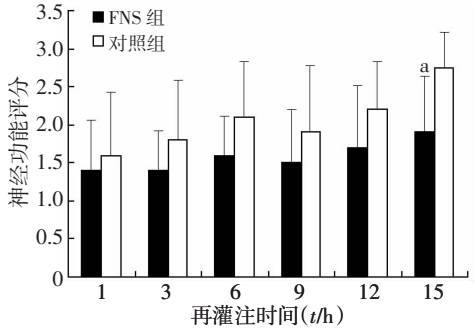
1.9　统计学处理

使用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理分析。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异比较行单因素方差分析,两两比较行 t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,$P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　神经功能评分

两组大鼠评分随再灌注时间呈逐渐增高的趋势,大鼠 MCAO 后 15 h 再灌注后评分结果显示,FNS 组评分与对照组评分比较差异有统计学意义($P < 0.05$),其余各再灌注时间点 FNS 组评分与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),但低于对照组(图 1)。

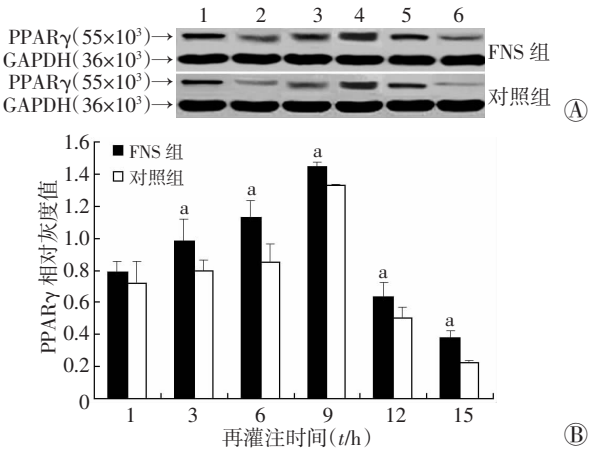


a:$P < 0.05$,与对照组比较

图 1　大鼠大脑中动脉栓塞-溶栓再通后 72 h 神经功能评分

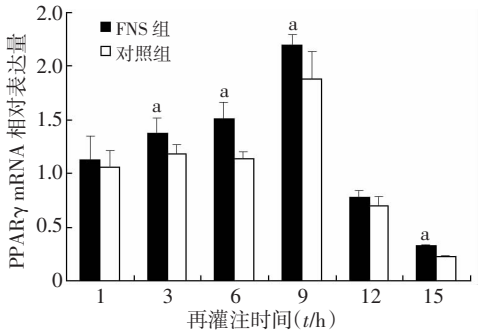
2.2　Western blot 和 RT-PCR 检测 PPARγ 表达水平

Western blot 检测结果显示 3、6、9、12 h 和 15 h FNS 组脑梗死区 PPARγ 表达水平与各自对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);而 1 h 再灌注 FNS 组表达量与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。RT-PCR 检测结果提示 3、6、9、15 h FNS 组脑梗死区 PPARγ 表达水平与各自对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);而 1、12 h FNS 组表达量与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);两组的 PPARγ 表达水平随再灌注时间的延长呈逐渐增高的趋势,表达高峰可能在梗死后 9 h 前后,9 h 再灌注后表达水平明显下降(图 2、3)。



A:Western blot 检测结果　1:1 h;2:3 h;3:6 h;4:9 h;5:12 h;6:15 h;B:半定量分析结果　a:$P < 0.05$,与对照组比较

图 2　Western blot 检测各再灌注时间大鼠脑梗死皮质 PPARγ 蛋白表达水平

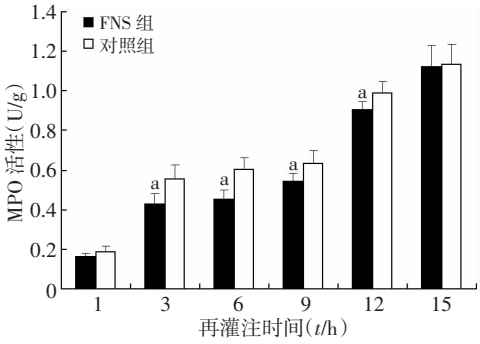


a:$P<0.05$,与对照组比较

图 3 RT-PCR 检测各再灌注时间大鼠脑梗死皮质 PPARγ 表达水平

2.3 中性粒细胞浸润情况

3、6、9 h 和 12 h FNS 组脑梗死边缘区 MPO 活性与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$);而 1、15 h FNS 组与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);两组的表达水平随再灌注时间的延长呈逐渐增高的趋势(图 4)。



a:$P<0.05$,与对照组比较

图 4 比色法检测大鼠脑梗死边缘区中性粒细胞浸润情况

3 讨论

缺血性脑卒中是目前世界位居第三的死亡原因,且幸存者多因遗留功能残障,生活质量受到极大的影响。目前时间窗内溶栓仍是改善预后的主要手段,但其狭窄的时间窗使得较少患者从中获益,原因在于 rt-PA 的使用具有显著的时间依赖性。超时间窗溶栓的主要危害在于缺血后由延迟的再灌注损害所导致脑出血和严重脑水肿风险的显著增加,且随着缺血时间延长,由血流恢复引起的再灌注损伤则愈加严重。但长远来看,病损区血流再通无疑有助于患者后期功能的恢复和重建。因此,寻找延长局灶脑缺血的“溶栓治疗窗”的有效措施越来越引起大家的关注。已有研究提示 FNS 可有效激活多个内源性神经保护机制,且 FNS 目前已成品化,具有使用方便、无不良反应等多种优点[6-8]。将 FNS 应用于拓宽 rt-PA 的研究甚少,内源性神经保护作用在缺血性脑卒中的治疗和预防中可能有十分重要的意义。故本研究就预先电刺激小脑顶核对溶栓时间窗内、窗外溶栓预后的影响及其机制进行探讨,以寻找有效拓宽溶栓时间窗的方法和措施。

神经功能评分结果显示,预先电刺激能够改善溶栓时间窗外溶栓的预后。已有研究表明,炎症反应是缺血性脑损伤重要发病机制之一,在神经细胞的坏死和凋亡中起着关键作用[9]。PPARγ 是 PPAR 家族的一种亚型,在中枢神经细胞和神经胶质细胞均有表达,与中枢神经系统有广泛且重要的联系,参与多种重要炎症调控[10]。研究表明动物脑梗死模型中使用 PPARγ 受体激动剂可激发神经保护,缩小脑梗死体积,而使用 PPARγ 受体拮抗剂使脑梗死面积增大[11-12]。另有研究也证明 PPARγ 有介导脑梗死后的神经保护作用[13-14]。本实验模型用大鼠自体血栓大脑中动脉栓塞模型[5],取缺血边缘区脑组织检测炎性指标,结果显示 FNS 组大脑皮质区 PPARγ 表达水平较对照组增加,并随着缺血再灌注时间的延长,表达量逐渐增多,在 9 h 再灌注前后达高峰,随后表达量减少,但仍高于对照组,一方面提示 PPARγ 介导的炎性调控作用在脑缺血损伤中可能发挥重要作用,另一方面提示 FNS 可通过激发 PPARγ 表达上调来发挥其内源性神经保护作用。MPO 活性可以反映组织中中性粒细胞的浸润程度,活性越高,浸润越严重。检测脑梗死侧脑组织中性粒细胞浸润情况,结果显示 FNS 组与对照组随再灌注时间的延长 MPO 活性增加,但 FNS 组 MPO 活性较对照组低,较长溶栓时间点差异更显著,与神经功能评分趋势相符。

总之,本实验提示预先 FNS 对较长时间溶栓(时间窗外溶栓)的预后有一定的改善作用,但并不显著,这种对预后的改善可能是 FNS 通过激活 PPARγ 抑制过度炎性反应的损伤有关。后续将扩大样本量进一步明确 FNS 对溶栓时间窗的影响,并对其临床应用做进一步探讨。

参考文献:

[1] Feigin V L, Forouzanfar M H, Krishnamurthi R, *et al*. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010[J]. Lancet, 2014, 383(9913): 245-254.

[2] Golanov E V, Liu F, Reis D J. Stimulation of cerebellum protects hippocampal neurons from global ischemia[J]. Neuroreport, 1998, 9(5): 819-824.

[3] Reis D J, Underwood M D, Berger S B, *et al*. Fastigial nucleus stimulation reduces the volume of cerebral infarction produced by occlusion of the middle cerebral artery in rat [M]//Seylaz J, MacKenzie E T. Neurotransmission and Cerebrovascular Function Ⅰ. New York: Elsevier Science, 1989: 401-404.

[4] 夏一鲁, 罗勇, 董为伟, 等. 电刺激小脑顶核对脑卒中大鼠的治疗作用与机制[J]. 中风与神经疾病杂志, 1999, 16(1): 3-5. DOI:10.3969/j.issn.1003-2754.1999.01.001.

[5] Busch E, Kruger K, Hossmann K A. Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat[J]. Brain Res, 1997, 788(1): 16-24.

[6] Golanov E V, Zhou P. Neurogenic neuroprotection[J]. Cell Mol Neurobiol, 2003, 23(4/5): 651-663.

[7] Liu J, Li J, Yang Y, *et al*. Neuronal apoptosis in cerebral ischemia/reperfusion area following electrical stimulation of fastigial nucleus[J]. Neural Regen Res, 2014, 9(7): 727-734. DOI:10.4103/1673-5374.131577

[8] Zhou P, Qian L, Zhou T, *et al*. Mitochondria are involved in the neurogenic neuroprotection conferred by stimulation of cerebellar fastigial nucleus[J]. J Neurochem, 2005, 95(1): 221-229. DOI:10.1111/j.1471-4159.2005.03358.x

[9] Barreto G E, White R E, Xu L, *et al*. Effects of heat shock protein 72 (Hsp72) on evolution of astrocyte activation following stroke in the mouse[J]. Exp Neurol, 2012, 238(2): 284-296. DOI:10.1016/j.expneurol.2012.08.015

[10] LuoY, Yin W, Signore A P, *et al*. Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone[J]. J Neurochem, 2006, 97(2): 435-448.

[11] Okami N, Narasimhan P, Yoshioka H, *et al*. Prevention of JNK phosphorylation as a mechanism for rosiglitazone in neuroprotection after transient cerebral ischemia: activation of dual specificity phosphatase[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2013, 33(1): 106-114. DOI:10.1038/jcbfm.2012.138

[12] Kinouchi T, Kitazato K T, Shimada K, *et al*. Activation of signal transducer and activator of transcription-3 by a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist contributes to neuroprotection in the peri-infarct region after ischemia in oophorectomized rats[J]. Stroke, 2012, 43(2): 478-483. DOI:10.1161/STROKEAHA.111.618926

[13] Sun H, Xiong W, Arrick D M, *et al*. Low-dose alcohol consumption protects against transient focal cerebral ischemia in mice: possible role of PPARγ[J]. PLoS ONE, 2012, 7(7): e41716. DOI:10.1371/journal.pone.0041716

[14] Zhao X, Strong R, Zhang J, *et al*. Neuronal PPARgamma deficiency increases susceptibility to brain damage after cerebral ischemia[J]. J Neurosci, 2009, 29(19): 6186-6195. DOI:10.1523/JNEUROSCI.5857-08.2009

(**收稿**:2015-04-29;**修回**:2015-08-02)

(编辑 王小寒)