基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001036

双下肢远端缺血后适应减轻 SD 大鼠脑缺血再灌注损伤及相关 VEGF、MMP-9 表达的影响

蒲　举[1]，姚声涛[2]

（1. 南充市中心医院神经内科，南充　637000；2. 遵义医学院附属医院脑血管病科，遵义　563003）

【摘　要】**目的**：通过建立大鼠大脑中动脉闭塞模型，探讨肢体远端缺血后适应（limb remote ischemic postconditioning，RIP）对脑缺血再灌注损伤（ischemic/reperfusion，I/R）的影响。**方法**：将 98 只 SD 雄性大鼠随机分组，分为 3 大组：假手术组（n=14），对照组（缺血再灌注模型组，n=42），RIP 组（缺血再灌注+肢体远端缺血后适应组，n=42），对照组和 RIP 组根据缺血再灌注之后不同时间再次分为 12、24、72 h 组，每组各 14 只。Longa 评分法对其进行评分，HE 染色、磁共振弥散加权像计算梗死体积百分比。测定缺血半暗带周围血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）、基质金属蛋白酶-9（matrix metalloproteinase-9，MMP-9）表达变化。**结果**：RIP 组大鼠 24 h 后 Longa 评分较对照组有统计学意义（P=0.000）、RIP 组大鼠 HE 染色脑梗死百分比在 12、24、72 h 均较对照组减少，差异有统计学意义（P=0.000）。免疫组织化学显示 RIP 组 12、24、72 h 在缺血半暗带周围 VEGF 表达均较对照组高，MMP-9 表达均低于对照组，差异均有统计学意义（P=0.000）。**结论**：RIP 减少缺血再灌注后 24 h 神经功能评分，减少梗死体积，具有减轻脑缺血再灌注损伤作用；远端缺血后适应明显增加缺血半暗带 VEGF 的表达，减少 MMP-9 的表达，表明 RIP 的神经保护作用与脑梗死后 VEGF、MMP-9 表达密切相关。

【关键词】远端缺血后适应；再灌注损伤；神经功能评分；血管内皮生长因子；基质金属蛋白酶-9

【中图分类号】R743　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2014-11-25

Effect of limb remote ischemic post-conditioning on cerebral ischemia-reperfusion injury and expression of VEGF and MMP-9 in SD rats

Pu Ju[1]，*Yao Shengtao*[2]

（*1. Department of Neurology，Nanchong Central Hospital；*

2. Department of Cerebral Vascular Diseases，the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College）

【Abstract】***Objective***：To explore the neuro-protective effect of limb remote ischemic post-conditioning（RIP）on middle cerebral artery occlusion（MCAO）after RIP. ***Methods***：Totally 98 healthy adult male SD rats were randomly divided into three groups：sham group（n=14），control group（n=14）and limb remote ischemic post-conditioning group（RIP group，n=14）. After ischemia and reperfusion，control group and RIP group were further divided into three subgroups：12，24，72 h groups. The neuro-protective effects of limb remote ischemic post-conditioning was assessed using Longa way of neurological deficit scores at 12，24，72 h. The percent of cerebral infarction volume at each point were also determined in time by HE staining and magnetic resonance imaging. Vascular endothelial growth factor（VEGF）and matrix metalloproteinase-9（MMP-9）expression in ischemic penumbra was detected by immunohistochemistry staining. ***Results***：The neurological function scores were decreased in 24 h group than in control group（P=0.000）. The volume of cerebral infarction in RIP groups reduced at 12，24，72 h after ischemic compared with that in control group. VEGF expression was significantly increased but MMP-9 expression was significantly decreased in RIP group than in control group（P=0.0000；P=0.000）. ***Conclusion***：RIP reduces neurological deficit scores at 24 h，decreases percent of infarction volume from 12 h to 72 h after ischemia，thus alleviates cerebral ischemia reperfusion injury. Significantly lower expressions of MMP-9 and higher expressions of VEGF after MCAO are observed in ischemic penumbra in RIP group，suggesting that decreased MMP-9 and increased VEGF expressions are tightly associated with the neuro-protective effect of RIP.

【Key words】ischemic post-conditioning；ischemia/reperfusion injury；neurological function scores；vascular endothelial growth factor；matrix metalloproteinase-9

作者介绍：蒲　举，Email：610797973@qq.com，

研究方向：脑血管疾病方向。

通信作者：姚声涛，Email：zymcyst@163.com。

基金项目：贵州省遵义市科委资助项目（遵义市科合社字（2010）017 号）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20161027.1008.016.html（2016-10-27）

Zhao等[1]在2003年发现缺血后适应，即心肌缺血后给予反复多次非致死性血管闭塞，诱导机体产生内源性保护作用，对心肌缺血具有减轻缺血再灌注损伤作用。经过十多年的发展，在不同缺血器官根据诱导内源性保护机制方法不同衍生出药物后适应、远端缺血预适应、远端缺血后适应等概念，其中远端缺血后适应是在不损伤原有缺血器官情况下，给其他相对耐缺血器官以缺血后适应，从而对远端器官产生保护作用[2]，由于肢体远端缺血后适应（limb remote ischemic postconditioning，RIP）不损伤原有缺血器官，更大可能应用于临床，成为研究的热点。但针对RIP不同时间点的保护研究较少，以及是否影响缺血脑组织尤其是缺血半暗带新生微血管的生成、减少脑水肿、减少血脑屏障破坏来保护脑组织尚不清楚。本实验的研究目的是模拟脑缺血再灌注损伤，给予RIP，对再灌注后不同时间点进行神经功能评分及计算脑梗死体积百分比，了解不同时间段RIP对缺血再灌注之后脑的影响，以及测定大鼠大脑血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）、基质金属蛋白酶-9（matrix metalloproteinase-9，MMP-9）的表达变化，了解RIP是否与新生微血管生成和破坏密切相关的VEGF、MMP-9的表达有关。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级sprague dawley（SD）雄性大鼠98只（250~300 g），由第三军医大学实验动物中心提供，许可证号：SCXK（渝）2012-0005。恒温（25 ℃）饲养，术前禁食（12 h）不禁饮。

1.2 试剂与仪器

10%水合氯醛（遵义医学院附属制剂室），鱼线（湖北钓鱼王公司），手术显微镜（江西凤凰光学集团有限公司），磁共振（GE HDXT）3.0T（美国通用电气公司），精密电子天秤（北京赛多利斯仪器系统有限公司），多聚甲醛（天津市科密欧化学试剂有限公司），徕卡切片机（LAICA RM2235），Image-Pro Plus 6.0图像分析系统，PH计（雷磁公司），VEGF多克隆抗体（美国abcam公司ab46154），MMP-9多克隆抗体（武汉博士德生物工程有限公司BA2202）。

1.3 方法

1.3.1 动物分组 采用数字表随机分组，将98只SD雄性大鼠分为假手术组（n=14，只分离血管）；对照组（缺血再灌注组，n=42）和RIP组（缺血再灌注+双下肢远端缺血后适应组，n=42），对照组和RIP组根据脑缺血再灌注之后的不同时间又分12、24 h和72 h组，每组各14只。

1.3.2 建立大脑中动脉闭塞（middle cerebral artery occlusion，MCAO）模型 本实验采用线栓法制作大鼠大脑中动脉闭塞模型。

1.3.3 远端缺血后适应方法 待MCAO模型建立2 h后，提前10 min再次水合氯醛麻醉大鼠，切开双下肢根部皮肤约1 cm，分离股动脉，待模型成功后2 h拔线，立即予以动脉夹夹闭两侧股动脉10 min，放开10 min，重复3个循环[3]。

1.3.4 神经功能评分 Longa评分法[4]，将神经功能检查分5个等级：0分：正常，无神经功能损伤；1分：左前肢屈曲；2分：大鼠爬行时，向左侧偏斜，但不倾倒；3分：爬行时，大鼠向左侧倾倒；4分：有意识障碍。待大鼠麻醉清醒后排除评分为0分和4分的大鼠。

1.3.5 磁共振扫描 大鼠分别在脑缺血后12、24、72 h行冠状位磁共振弥散加权像检查。用图像分析系统计算脑梗死百分比，计算方法和HE染色计算梗死百分比方法相同。见图1。

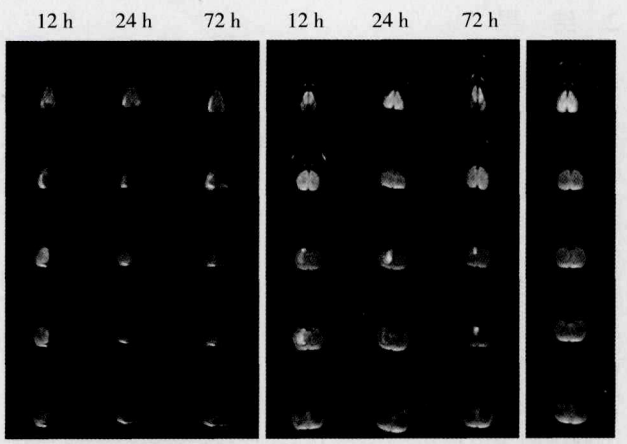


图1 大脑弥散加权像

Fig.1 DWI of the brain

1.3.6 HE染色测定脑梗死百分比 石蜡包埋、切片之后，HE染色，数码照相机采集图像，最后经图像分析系统计算脑梗死百分比。脑梗死百分比=[无梗死侧大脑半球面积-（梗死侧大脑半球面积-梗死面积）/无梗死侧半球面积]×100%[5]。见图2。

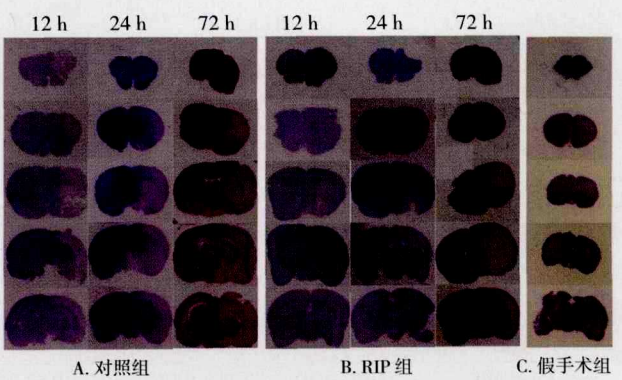


图2 大脑HE染色

Fig.2 HE staining of the brain

1.3.7 免疫组织化学 将选好的玻片放入 60 ℃温箱中烘干 1 h；将玻片依次放入二甲苯中脱蜡，梯度酒精、蒸馏水中水化、煮沸抗原修复、封闭抗原等处理；然后加入多克隆兔抗 VEGF(1:100)、MMP-9(1:50)，4 ℃冰箱过夜；采用 SABC 法进行免疫组化染色，DAB 显色；苏木素复染；从低到高浓度的梯度酒精脱水，二甲苯透明；中性树胶封片。免疫组织化学采用阳性细胞计数法：在相同组别取 2 张切片，高倍镜下(400×)的缺血半暗带部位随机观察 5 个不重叠视野，计数阳性细胞数均值。

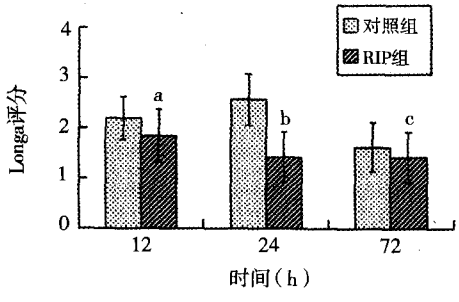
1.4 统计学处理

所有数据都用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用SPSS 17.0 软件进行数据分析，Longa 评分及梗死百分比指标为计量资料，两因素间的交互作用采用析因分析，免疫组化阳性细胞计数比较采用单因素方差分析，如差异有统计学意义，则进行两两比较(SNK-q 法)。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 Longa 评分

析因分析结果显示，RIP 对不同分组 Longa 评分具有统计学意义(F=27.328，P=0.000)，不同时间组之间 Longa 评分也具有统计学意义(F=8.682，P=0.000)，分组与时间差异具有统计学意义(F=6.974，P=0.002)，提示分组与不同时间点存在交互作用；其中对照组与 RIP 组对 Longa 评分有影响，对照组和 RIP 组在 12 h(F=3.820，P=0.060)、72 h(F=1.260，P=0.270)2 个时间点 Longa 评分无统计学差异，在缺血再灌注后 24 h，RIP 组与对照组 Longa 评分有统计学差异(F=34.670，P=0.000)，且 RIP 组在 24 h 后 Longa 评分较对照组 24 h 降低(图 3，表 1)。



a：与 12 h 对照组相比，P>0.05；b：与 24 h 对照组相比，P<0.05；c：与 72 h 对照组相比，P>0.05

图 3 Longa 评分（n=14，$\bar{x} \pm s$）

Fig.3 Longa scores（n=14，$\bar{x} \pm s$）

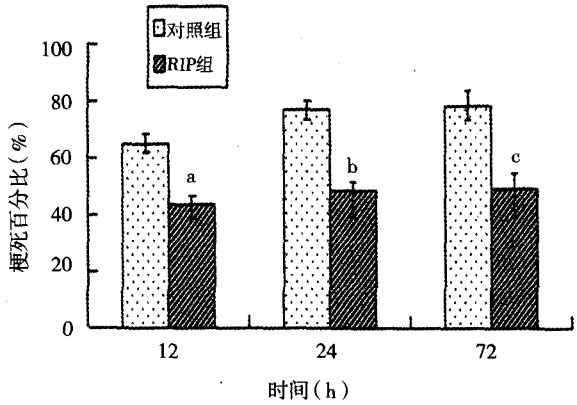
表 1 神经功能评分结果（n=14）

Tab.1 Result of factorial design of neurological dificit scores（n=14）

组别	12 h	24 h	72 h
Control组	2.17 ± 0.41	2.33 ± 0.52	1.67 ± 0.52
RIP组	1.67 ± 0.52	1.49 ± 0.61	1.49 ± 0.63

2.2 梗死百分比

假手术组梗死体积百分比均为 0，故排除手术对实验的影响。析因分析提示 RIP 对不同分组梗死百分比具有统计学意义(F=338.773，P=0.000)，不同时间组之间梗死百分比也具有统计学意义(F=18.135，P=0.000)，不同分组与不同时间之间不存在交互作用(F=2.887，P=0.062)；其中不同组别即对照组与 RIP 组对梗死百分比有影响；采用 SPSS 17.0 分析比较对照组、RIP 组，在 12、24、72 h 3 个时间点 RIP 组与对照组梗死体积百分比有统计学差异(P<0.01)，且 RIP 组梗死体积百分比比对照组梗死体积百分比小，说明远端缺血后适应在大鼠脑缺血再灌注后 12、24、72 h 可以减少缺血再灌注损伤，减少梗死体积(图 4，表 2)。



a：与 12 h 对照组相比，P<0.01；b：与 24 h 对照组相比，P<0.01；c：与 72 h 对照组相比，P<0.01

图 4 梗死百分比（n=14，$\bar{x} \pm s$，%）

Fig.4 Percentage of infarction volume（n=14，$\bar{x} \pm s$，%）

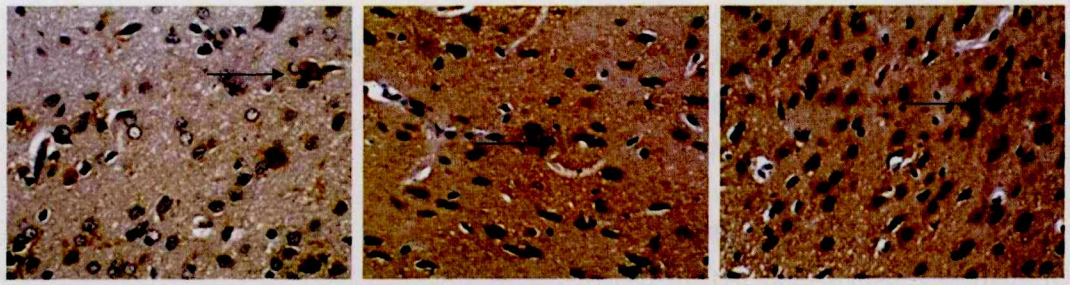
表 2 梗死体积百分比结果（n=14）

Tab.2 Result of factorial design of the percentage of infarction volume（n=14）

组别	12 h	24 h	72 h
Control组	64.62 ± 5.13	76.58 ± 3.06	78.18 ± 7.46
RIP组	43.05 ± 5.74	47.92 ± 5.38	49.07 ± 7.82

2.3 免疫组织化学

VEGF 在大鼠大脑皮质、海马、梗死周围区的神经细胞、胶质细胞及血管内皮细胞内均有表达，MMP-9 在胶质细胞、内皮细胞、嗜中粒细胞、缺血神经元中表达。在缺血半暗带区，假手术组 VEGF、MMP-9 表达较对照组、RIP 组有统计学差异(P<0.01)，故排除手术对 VEGF、MMP-9 的影响；RIP 组各个时间点 VEGF 表达均较对照组相应各时间点明显增加，差异具有统计学意义(P<0.05)。RIP 组各个时间点 MMP-9表达较对照组相应各时间点明显减少，具有统计学差异(P<0.05)(表 3，图 5，图 6)。

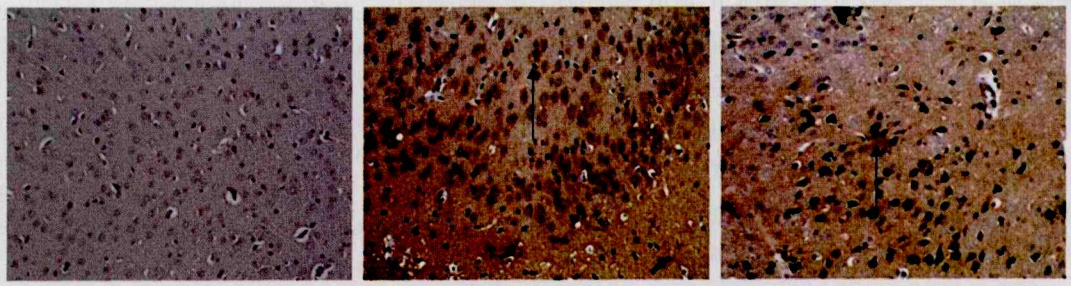


A. 假手术组　　B. 对照组（24 h）　　C. RIP 组（24 h）

箭头所指是阳性细胞

图 5　VEGF 表达（400×）

Fig.5　Expression of VEGF（400×）



A. 假手术组　　B. 对照组（24 h）　　C. RIP 组（24 h）

箭头所指是阳性细胞

图 6　MMP-9 表达（200×）

Fig.6　Expression of MMP-9（200×）

表 3　各组大鼠缺血半暗带 VEGF、MMP-9 阳性细胞计数（n=14，$\bar{x} \pm s$）

Tab.3　Groups of ischemic penumbra count with VEGF，MMP-9 protein positive cells（n=14，$\bar{x} \pm s$）

分组	VEGF	MMP-9
假手术组	3.29 ± 1.07^{bcd}	2.86 ± 0.66^{bcd}
12 h 对照组	13.79 ± 2.02^{acd}	38.91 ± 2.46^{acd}
12 h RIP 组	32.86 ± 1.60^{abcd}	18.80 ± 2.32^{abcd}
24 h 对照组	19.71 ± 1.80^{abd}	55.39 ± 2.33^{abd}
24 h RIP 组	48.29 ± 4.65^{abcd}	23.40 ± 4.37^{abcd}
72 h 对照组	17.68 ± 1.67^{abc}	49.96 ± 3.06^{abc}
72 h RIP 组	36.35 ± 2.77^{abcd}	21.36 ± 2.91^{abcd}
F 值	353.120	633.010
P 值	0.000	0.000

注：a，与假手术组比较，P<0.01；b：与 12 h 对照组比较，P<0.01；c：与 24 h 对照组比较，P<0.05；d：与 72 h 对照组比较，P<0.05

3　讨　论

远端肢体缺血后适应减轻脑缺血再灌注损伤，具有明显的神经保护作用。远端肢体缺血适应的心脏保护作用已被一系列基础研究所证实[6]，而脑保护的研究为数尚少，本实验从神经功能评分及影像学角度评估了远端缺血后适应在缺血再灌注后 12、24、72 h 是否减轻再灌注损伤，发现 RIP 能有效地在 12、24、72 h 减少梗死体积百分比，明显减少 24 h 神经功能评分，运动功能障碍明显改善。对照组与 RIP 组在 12 h 及 72 h 神经功能评分未见明显差异，分析与 Longa 评分侧重于对运动功能的评分，缺少对感觉、反射的评分，故 Longa 评分不能完全反应脑神经功能的变化，从而和梗死体积百分比的结果有出入。

远端肢体缺血适应脑保护作用的机制尚不十分明确。实验研究显示，远端缺血后适应的保护机制可能涉及传入神经通路[7-8]、氧化-内质网应激信号通路[9]、改变脑血流保护脑组织[10]、诱导自噬-溶酶体途径[11]、减少炎性反应[12]等。本研究通过检测 SD 大鼠脑组织缺血再灌注后脑组织 VEGF 和 MMP-9 水平的变化，对远端缺血后适应脑保护作用的机制进行了初步探讨。VEGF 是现在公认最重要也是最有效的一种高度特异性促血管内皮生长的细胞因子，直接参与缺血缺氧组织或器官的血管生成。研究发

现 VEGF 增加了新生脑血管形成、减少脑水肿[13-14]。近年来研究认为基质金属蛋白酶，尤其是 MMP-9为 IV 型胶原酶，可降解细胞外基质，在血脑屏障的开放机制方面具有更重要的意义[15-16]。本实验研究表明，在缺血半暗带区，给予 RIP 可增加 VEGF、减少 MMP-9 表达水平，表明 RIP 的神经保护作用与脑梗死后 VEGF、MMP-9 表达密切相关，结合相关VEGF、MMP-9 的相关研究，提示其远端缺血后适应脑保护作用是通过破坏血管内皮细胞的作用减少、减少脑水肿、减少血脑屏障发挥脑保护作用。

远端缺血后适应脑保护作用研究有重要的临床意义，目前已有研究证实远端肢体缺血后适应对于心肌梗死入院前、入院后病人可减轻再灌注损伤、缩小梗死面积[17]，且可以使用充气式止血带等来实现下肢的远端肢体缺血后适应，实现简便、无创、安全的干预措施；由于诱导远端缺血后适应是发生在缺血后再灌注的起始阶段，加上近年来心脑血管病经皮血管内介入治疗技术的开展，均为远端缺血后适应在介入手术中提供了较大的可能性，已有相关研究证实缺血后适应、远端缺血后适应在心脏介入手术中具有保护心肌作用[18]，而远端缺血后适应对急性脑卒中及介入中的应用需要进一步研究。

本研究证实远端缺血后适应具有改善大鼠脑组织缺血再灌注损伤作用，这可能与破坏血管内皮细胞的作用、减少脑水肿、减少血脑屏障的破坏有关。由于本研究未从可能影响 VEGF、MMP-9 信号通路的角度阐述 RIP 可能影响的信号传导途径，以及从电镜等角度说明远端缺血后适应对内皮细胞、血脑屏障破坏的影响，可在进一步研究中给予完善。

参 考 文 献

[1] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(2): H579-H588.

[2] McClanahan TB, Nao B, Wolke LJ, et al. Brief renal occlusion and reperfusion reduces myocardial infarct size in rabbits[J]. FASEB J, 1993, 33(2): 556-564.

[3] Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces in- farct size after focal ischemia in rats[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(9): 1114-1121.

[4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[5] Li SY, Yang D, Fu ZJ, et al. Lutein enhances survival and reduces neuronal damage in amouse model of ischemic stroke[J]. Neurobiology of Disease, 2012, 45(1): 624-632.

[6] Basalay M, Barsukevich V, Mastitskaya S, et al. Remote ischaemic pre-and delayed postconditioning-similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms[J]. Exp Physiol, 2012, 97(8): 908-917.

[7] Malhotra S, Naggar I, Stewart M, et al. Neurogenic pathway mediated remote preconditioning protects the brain from transient focal ischemic injury[J]. Brain Res, 2011, 1386: 184-190.

[8] Anrather J, Hallenbeck JM. Biological networks in ischemic tolerance-rethinking the approach to clinical conditioning[J]. Transl Stroke Res, 2013, 4(1): 114-129.

[9] Liu X, Zhao S, Liu F, et al. Remote ischemic postconditioning alleviates cerebral ischemic injury by attenuating endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis[J]. Transl Stroke Res, 2014, 5(6): 692-700.

[10] 吴怀国，侯庆兵，王书培，等. 远程肢体缺血后适应对脑血流的影响[J]. 中华脑血管病杂志，2013，7(6)：305-308.

[11] 苏静缘，李晓明，齐广伟，等. 远隔缺血后处理对脑缺血再灌注损伤后自噬的影响[J]. 中风与神经疾病杂志，2013，30(9)：772-776.

[12] Liu Q, Zhou S, Wang Y, et al. A feasible strategy for focal cerebral ischemia-reperfusion injury: remote ischemic postconditioning[J]. Neural Regen Res, 2014, 9(15): 1460-1463.

[13] Jang H, Oh MY, Kim YJ, et al. Hydrogen sulfide treatment induce-sangiogenesis after cerebralischemia[J]. J Neurosci Res, 2014, 92(11): 1520-1528.

[14] Ma Y, Liu W, Wang Y, et al. VEGF protects rat cortical neurons from mechanical trauma injury induced apoptosis via the MEK/ERK pathway[J]. Brain Res Bull, 2011, 86(5-6): 441-446.

[15] Vandooren J, Van Damme J, Opdenakker G. On the structure and functions of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 in neuroinflammation[J]. Prog Brain Res, 2014, 214: 193-206.

[16] Jin X, Liu J, Liu KJ, et al. Normobaric hyperoxia combined with minocycline provides greater neuroprotection than either alone in transient focal cerebral ischemia[J]. Exp Neurol, 2013, 240(1): 9-16.

[17] Prunier F, Angoulvant D, Saint Etienne C, et al. The RIPOST-MI study, assessing remote ischemic perconditioning alone or in combination with local ischemic postconditioning in ST-segment elevation myocardial infarction[J]. Basic Research in Cardiology, 2014, 109 (2): 400.

[18] Wang N, Wang GS, Yu HY, et al. Myocardial protection of remote ischemic postconditioning during primary percutaneous coronary intervention in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction[J]. Journal of Peking University (Health Sciences), 2014, 46(6): 838-843.

（责任编辑：冉明会）