

缺血后处理通过 PI3K 信号通路抑制 脑缺血再灌注损伤

宫利 王志 肖松华 刘运林 周海红 邢诒刚

【摘要】 目的 研究缺血后处理(IP)对脑缺血再灌注损伤的影响及其机制。方法 采用开颅机械闭塞法建立 SD 大鼠局灶性脑缺血模型,通过开放/夹闭双侧颈总动脉实现 IP。24 只大鼠按照随机数字表法分为 IP 组、非 IP 组、LY294002+IP 组、DMSO+IP 组,每组 6 只,再灌注 48 h 后测脑梗死面积;其中 LY294002、DMSO 于建模前 1 h 侧脑室注入。结果 各组左侧大脑皮层均可见清晰梗死灶,符合血管分布范围。其中 IP 组脑梗死面积(34.02%±7.17%)明显小于非 IP 组(57.05%±10.05%),差异有统计学意义 ($P<0.05$);LY294002+IP 组脑梗死面积 (73.41%±2.06%) 明显大于 DMSO+IP 组(35.76%±1.51%),差异有统计学意义 ($P<0.05$);DMSO+IP 组与 IP 组脑梗死面积差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 IP 可减轻局灶性脑缺血大鼠的脑缺血再灌注损伤,PI3K 信号通路参与其作用机制。

【关键词】 缺血后处理; 局灶性脑缺血; 神经保护; PI3K 信号通路

【中图分类号】 R743.32 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)04-0344-03

Ischemic postconditioning alleviates rat cerebral ischemia-reperfusion injury through the phosphoinositide 3-kinase signaling pathway

GONG Li*, WANG Zhi, XIAO Song-hua, LIU Yun-lin, ZHOU Hai-hong, XING Dai-gang. *Department of Neurology, Yuhangding Hospital of Yantai city, Yantai 264000, China

Corresponding author: WANG Zhi, Email: wuzz1898@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the neuroprotective effect of ischemic postconditioning (IP) against cerebral ischemia-reperfusion injury and the role of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signaling pathway in the neuroprotection. **Methods** Focal cerebral ischemia was induced in 24 SD rats by permanent distal middle cerebral artery occlusion and transient bilateral common carotid artery occlusion. The rats were then randomized into 4 groups for treatment with IP, LY294002+IP, DMSO+IP, or without IP. In LY294002+IP and DMSO+IP groups, LY294002 or DMSO was injected into the ventricular space on the ischemic side 1 h before ischemia. The cerebral infarct sizes were measured in all the 4 groups at 48 h after the reperfusion. **Results** Cerebral infarcts were observed in all the groups on the ischemic side, all locating in the left neocortex and the middle cerebral artery territory. At 48 h after reperfusion, the infarct size was significantly smaller in rats with IP (34.02%±7.17%) than in those without IP (57.05%±10.05%) ($P<0.05$), and significantly larger in LY294002+IP group (73.41%±2.06%) than in DMSO+IP group (35.76%±1.51%) ($P<0.05$). No significant difference was found in the infarct size between DMSO+IP group and IP group ($P>0.05$). **Conclusion** IP ameliorates cerebral reperfusion injury in rats, and the mechanism of this neuroprotective effect involves the preservation of PI3K activity.

【Key words】 Ischemic postconditioning; Focal cerebral ischemia; Neuroprotection; Phosphoinositide 3-kinase signaling pathway

缺血后处理(ischemic postconditioning, IP)是一

种改良的再灌注模式,它是指在缺血后、永久性再灌注前对缺血组织进行反复多次的间断性灌注^[1]。目前,在心肌缺血再灌注中 IP 的保护作用已被证实^[1,2],其机制正在被广泛研究^[3-6],但在脑缺血再灌注领域对 IP 的研究尚少。本实验拟用局灶性脑缺血的大鼠模型研究 IP 对脑缺血再灌注损伤的影响,并初步探讨磷脂酰肌醇 (-3) 激酶 (phosphoinositide 3-kinase,

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.04.005

基金项目:广东省医学科研基金(A2008179)

作者单位:264000 烟台,毓璜顶医院神经内科(宫利);510120 广州,中山医科大学附属第二医院神经内科(肖松华、周海红、邢诒刚),麻醉科(王志);271000 山东省泰安市中心医院神经内科(刘运林)

通信作者:王志,Email: wuzz1898@sina.com

PI3K)信号通路是否参与 IP 的作用机制。

材料和方法

一、实验动物及分组

健康雄性 SD 大鼠, 体质量 270~350 g, 由中山大学北校区动物中心提供。24 只大鼠按照随机数字表法分为 IP 组、非 IP 组、LY294002(PI3K 特异性阻断剂)+IP 组、DMSO(LY294002 的溶剂)+IP 组, 每组各 6 只。

二、实验模型制备及处理

1. 局灶性脑缺血模型制备: 根据文献[7], 用开颅机械闭塞法建立大鼠局灶性脑缺血模型。大鼠麻醉后颈部正中切口分离双侧颈总动脉(bilateral common carotid arteries, bCCAs)并栓线, 右侧卧位开颅显微镜下分离左侧大脑中动脉 (middle cerebral artery, MCA), 利用动脉夹暂时性夹闭 bCCAs, 2 min 后以双极电凝永久性阻断左侧 MCA 形成缺血灶。

2. IP: 阻断 bCCAs 17 min 后通过开放 bCCAs 15 s, 夹闭 15 s, 如此循环 3 次完成 IP。IP 组在完成 IP 后开放 bCCAs 灌注 48 h, 非 IP 组则在阻断 bCCAs 17 min 后直接开放 bCCAs 灌注 48 h。

3. LY294002、DMSO 侧脑室内注射: LY294002 是 PI3K 的特异性阻断剂, 浓度为 10 mmol/L, 其溶剂为 DMSO。在大鼠前囟后 0.9 mm、中线左侧 1.2 mm 处进行穿刺, 深度约 3.5 mm。建模前 1 h 向侧脑室内缓慢注入 LY294002 或 DMSO 10 μ L。

整个术程均用肛表监测中心体温并维持在 37 $^{\circ}$ C 左右。

三、脑梗死面积测定

再灌注 48 h 后将大鼠以 100 g/L 水合氯醛腹腔注射麻醉(0.3 mL/100 g), 经心脏灌注生理盐水后断头取脑。在距额极 2 mm 处按每片 2 mm 厚度进行冠状切片, 2% 的 2, 3, 5- 氯化三苯四唑(TTC)染色 30 min 后(37 $^{\circ}$ C)拍照输入计算机, 用 ImageJ 软件测量脑切片相应部位面积, 计算公式: $S = [(\text{对侧大脑皮质的面积} - (\text{同侧大脑皮质的面积} - \text{脑梗死的面积})) / \text{对侧大脑皮质的面积} \times 100\%]$ [2]。

四、统计学分析

用 SPSS12.0 统计软件进行分析处理, 各数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示。采用单因素方差分析的方法分析 IP 对脑梗死面积的影响, 组间比较采用 SNK 检验。 $P \leq 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

结 果

一、大体观

各组全脑均可见不同程度以左颞侧为主的脑组织苍白肿胀, 与周围组织分界清晰, 未见明显出血、渗漏(图 1)。冠状切面可见左侧大脑皮层梗死灶色苍白, 边界清晰, 符合血管分布范围, 无明显软化空洞及出血点(图 2)。

二、脑梗死面积检测结果

IP 组脑梗死面积明显小于非 IP 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); IP 组脑梗死面积与 DMSO+IP 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); LY294002+IP 组脑梗死面积明显大于 IP 组及 DMSO+IP 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。(表 1)

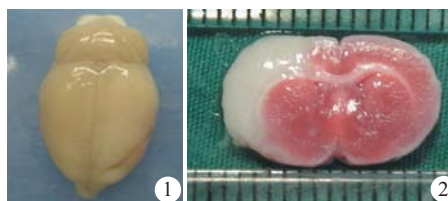


图 1 大鼠局灶性脑缺血模型脑组织大体观 图 2 大鼠局灶性脑缺血模型脑组织冠状切面

Fig.1 Gross observation of the rats with cerebral ischemia Fig.2 Coronal brain section of a rat 2 days after cerebral ischemia with 2% TTC staining

表 1 脑梗死面积检测结果($\bar{x} \pm s$, %)

Tab.1 Cerebral infarct sizes in the 4 groups of rats 2 days after cerebral ischemia (Mean \pm SD, %)

组别	例数	脑梗死面积(%)
IP组	6	34.02 \pm 7.17
非 IP 组	6	57.05 \pm 10.05 ^a
LY294002+IP组	6	73.41 \pm 2.06 ^{ab}
DMSO+IP组	6	35.76 \pm 1.51 ^c
F值		55.135
P值		0.000

与 IP 组相比较, ^a $P < 0.05$; 与非 IP 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 LY294002+IP 组比较, ^c $P < 0.05$

讨 论

脑缺血预处理对脑功能有明显的保护作用, 但在临床中脑缺血的发生是不可预知的, 因而其应用受到限制。而 IP 则是针对已缺血组织的一种更有效的再灌注方法, 旨在最大程度地减轻再灌注损伤, 挽救缺血组织, 其可控性优于缺血预处理, 因此具有更大的临床价值。

近年来国内外学者对由 MCA 闭塞所致的大鼠局灶性脑缺血模型进行了大量研究。开颅机械闭塞法于直视下阻断 MCA, 是目前公认的较为可靠、经典的建模方法。本实验利用双极电凝实现机械闭塞,

阻断效果确切,且仅在局部形成循环电流,对脑组织影响小,大鼠存活时间长,利于进行脑缺血后长期神经功能缺损康复的研究^[8,9]。该模型可通过开放/夹闭 bCCAs 完成 IP,调控缺血半暗带区血流,为进行 IP 研究提供了条件。更为重要的是,本实验模型更贴近临床上脑梗死区域血供不完全的实际情况,因而具有较大的实用价值^[10]。

本实验结果中 IP 组脑梗死面积显著小于非 IP 组,证明了 IP 的脑保护作用。缺血持续时间、缺血后处理构成已证明是影响 IP 保护效果的重要因素^[11]。本实验夹闭 bCCAs 时间和缺血后处理构成均不同于 Steinberg 实验,但亦证实此条件下 IP 具有脑保护作用,这为寻找 IP 保护效率的高峰期提供了资料,有利于临床治疗时间窗的选择。

PI3K 信号通路是一条通过抑制细胞凋亡而促使细胞生存的信号通路,已有实验证实它在缺血再灌注损伤及心肌缺血后处理中具有重要作用^[12-14]。但其在 IP 中的作用目前尚不清楚。本实验中,加入 PI3K 特异性阻断剂 LY294002 后,IP 减小脑梗死面积的作用明显削弱,且 DMSO+IP 组与 IP 组相比无显著差异,从而排除了 DMSO 对脑梗死面积的影响。已有文献证实,LY294002 本身对脑梗死面积无明显影响^[15]。据此推测 PI3K 信号通路参与了 IP 减轻脑缺血再灌注损伤的机制。

综上所述,本实验通过脑梗死面积的变化证明 IP 具有减轻脑缺血再灌注损伤的作用,且 PI3K 信号通路参与其作用机制。IP 的可控性使其在临床治疗方面具有较大潜力,而其作用机制的研究将为其实际应用于临床治疗提供可靠的作用靶点,从而为局灶性脑缺血带来崭新、有效的治疗手段。

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): H579-588.
- [2] Zhao H, Yenari MA, Cheng D, et al. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity[J]. *J Neurochem*, 2003, 85(4): 1026-1036.
- [3] Kin H, Zatta A J, Lofye MT, et al. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine[J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 67(1): 124-133.
- [4] Yang XM, Proctor JB, Cui L, et al. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 44(5): 1103-1110.
- [5] Argaud L, Gateau-Roesch O, Raissy O, et al. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition[J]. *Circulation*, 2005, 111(2): 194-197.
- [6] Serviddio G, Di Venosa N, Federici A, et al. Brief hypoxia before normoxic reperfusion (postconditioning) protects the heart against ischemia-reperfusion injury by preventing mitochondria peroxyde production and glutathione depletion[J]. *Faseb J*, 2005, 19(3): 354-361.
- [7] Yanamoto H, Nagata I, Hashimoto N, et al. Three-vessel occlusion using a micro-clip for the proximal left middle cerebral artery produces a reliable neocortical infarct in rats [J]. *Brain Res Brain Res Protoc*, 1998, 3(2): 209-220.
- [8] Wang LC, Futrell N, Wang DZ, et al. A reproducible model of middle cerebral infarcts, compatible with long-term survival, in aged rats[J]. *Stroke*, 1995, 26(11): 2087-2090.
- [9] 邢宏义,梅元武,孙圣刚.可重复性小鼠局灶性脑缺血/再灌注模型的探讨[J]. *中华神经医学杂志*, 2006, 5(12): 1209-1212.
- [10] 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.
- [11] Staat P, Rioufol G, Piot C, et al. Postconditioning the human heart [J]. *Circulation*, 2005, 112(14): 2143-2148.
- [12] Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, et al. Akt promotes survival of cardiomyocytes *in vitro* and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart[J]. *Circulation*, 2000, 101(6): 660-667.
- [13] Chiari PC, Bienengraeber MW, Pagel PS, et al. Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits[J]. *Anesthesiology*, 2005, 102(1): 102-109.
- [14] Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, et al. Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway[J]. *Circ Res*, 2004, 95(3): 230-232.
- [15] Limbourg FP, Huang Z, Plumier JC, et al. Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(11): 1729-1738.

(收稿日期:2008-11-24)

(本文编辑:卢丽玉)