

·基础研究·

生地预处理在减轻全脑缺血再灌注大鼠 海马神经元损伤中的作用*

韩振翔¹ 魏江磊^{1,4} 祁丽丽² 李妙龄³

摘要 目的:观察比较中药生地预处理与缺血预处理减轻全脑缺血再灌注大鼠海马神经元损伤的作用。方法:实验选用24只雄性SD大鼠,随机将24只大鼠分为假手术组、缺血预处理组、生地预处理组、脑缺血再灌注组,采用热凝椎动脉,钳夹双侧颈总动脉建立全脑缺血模型,缺血预处理组预缺血3min,3d后给予缺血10min,再灌注24h后处死。假手术组暴露双侧颈总动脉不夹闭。缺血再灌注组,夹闭双侧大脑颈总动脉10min,再灌注24h后处死。生地预处理组,灌胃2周后,作缺血再灌注处理,运用HE染色光镜下观察存活海马神经元细胞数,电镜下观察海马神经元超微形态的改变。结果:生地预处理存活神经元数与缺血预处理存活神经元数比较, $P>0.05$,两者与缺血再灌注组比较, $P<0.01$ 。假手术组可见海马神经元细胞形态正常,脑缺血预处理组和药物预处理组海马CA1区神经元损伤明显减轻,只有少量细胞有轻度水肿,未见坏死。而脑缺血再灌注组神经元变性严重。结论:生地预处理对随后的脑梗死有明显的保护作用,能诱导缺血耐受的产生。

关键词 脑缺血;缺血预处理;生地预处理;海马神经元

中图分类号:R493,R741,R285 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-09-0810-04

An experimental study on shengdi pretreatment effect on the cerebral ischemia-reperfusion injury in rats/
HAN Zhenxiang, WEI Jianglei, QI Lili, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(9): 810—813

Abstract **Objective:** To investigate the shengdi pretreatment effect and the ischemia preconditioning effect on the changes of neuron structure of hippocampal region in rats with global cerebral ischemia-reperfusion. **Method:** Twenty-four male SD rats (weight 180–220g) were randomly divided into 4 groups: sham operation group ($n=5$); ischemia-reperfusion group ($n=5$); ischemia preconditioning group ($n=5$); shengdi pretreatment group ($n=5$). Global cerebral ischemia and reperfusion model were established with Pulsinelli's method. The amount and ultrastructure of neurons of hippocampus were observed under light microscope and electron-microscope. **Result:** Compared with ischemia-reperfusion group, the number of survival neurons of hippocampal CA1 region increased significantly ($P<0.01$), and the injury of neurons lightened significantly and no necrosis in shengdi pretreatment group and ischemia preconditioning group. Compared shengdi pretreatment group with ischemia preconditioning group, the number of survival neuron had no distinct significance in hippocampal CA1 region ($P>0.05$). **Conclusion:** Shengdi pretreatment can obviously increase brain tissue tolerance to secondary severe infarction and present apparent protection effect.

Author's address Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai, 200021

Key words cerebral ischemia; ischemic preconditioning; shengdi pretreatment; hippocampus

脑缺血预处理 (brain ischemic preconditioning, BIP)是指预先短暂性缺血或轻度缺氧激发或动员机体内在的防护能力,使机体对随后严重的缺血、缺氧产生防御和保护作用的现象。1990年Kitagawa等^[1]最早用沙土鼠全脑缺血模型发现,短暂性全脑缺血后再灌注能减轻随后较长时间的全脑缺血性损伤,首次提出缺血预处理的概念。虽然脑缺血预处理对脑缺血的保护效应已属公认,但BIP诱导损伤性应激过程终究是一种创伤。药物性预处理正是基于这一思路而提出来的,生地具有养阴清热之功,其有效成分梓醇对缺血再灌注受损的神经元有明显的保护作用^[2]。本研究通过观察生药生地预处理SD大鼠全脑缺血再灌注损伤海马神经元形态的变化,在中药

防治缺血性脑血管病的药物性预处理做一些有益的尝试。

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

雄性健康SD大鼠24只,清洁级,体质量180—

* 基金项目:上海市科委登山项目(课题编号:06JC14027)

1 上海中医药大学附属曙光医院中风专科,上海,200021

2 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院急诊科

3 泸州医学院心电实验室

4 通讯作者

作者简介:韩振翔,男,博士研究生

收稿日期:2008-08-14

220g, 由泸州医学院实验动物室提供, 医学实验动物合格证号: 川医动字第 017 号, 清洁环境下分笼饲养, 随机将动物分为假手术组(A 组) $n=5$, 只暴露双侧颈总动脉而不予夹闭; 持续缺血组(B 组) $n=5$, 夹闭双侧大脑颈总动脉 10min; 缺血预处理组(C 组) $n=5$, 阻塞大脑总动脉 3 min(亚致死性缺血)后松开以恢复血流, 3d 后第 2 次阻塞大脑总动脉 10min(持续性缺血); 药物预处理组 $n=5$ 。

1.2 制备双侧大脑缺血模型

参考 Pulsinelli^[3]所记载的方法, 腹腔内注射戊巴比妥钠 4—5mg/100g 麻醉。

1.2.1 分离颈总动脉: 将已麻醉的大鼠平展四肢仰卧用棉线固定在固定板上, 消毒颈部, 剪毛。在两前肢直线上方沿腹正中线切 1cm 长的皮肤切口, 找到跳动的颈总动脉(CCA)和与之伴行的神经。沿血管纵向钝性分离出 CCA, 用无创棉线环 CCA 成 1cm 的线环, 不阻断血流。两侧线环相互交叉埋于皮下, 缝合切口。

1.2.2 热凝椎动脉: 大鼠俯卧。头向下倾斜 30°固定。剪去头颈部的毛, 消毒。在枕骨下沿背正中切 1cm 长的切口, 切开皮肤和斜方肌, 分离肌肉, 找到第一颈椎后弓上的横突孔, 用直径 0.5mm 针灸针酒精灯烧灼后快速插入 2—3mm, 灼断孔中的椎动脉, 使之永久性阻塞, 热凝完毕, 缝合切口。大鼠放回饲养笼中, 让其自然苏醒, 禁食过夜, 自由饮水。

1.2.3 制备缺血模型: 以上手术 24h 后, 大鼠在清醒状态下仰卧固定, 重新打开颈部切口, 用显微动脉夹夹住双侧的颈总动脉, 使大鼠脑部供血完全阻断, 大鼠先挣扎数秒后于 30—60s 内昏迷, 放开固定, 可见大鼠四肢上举, 翻正反射消失, 痛觉反应消失, 双侧瞳孔散大, 眼球呈灰白色, 身体可呈角弓反张, 用脑电图 (electroencephalogram, EEG)[脑电图仪: ADInstruments Power Lab.BioAmp, (MacLab, AD Instrument, USA), 以 20k/s 速率采样, 双通道记录]验证, 脑电图几乎呈一直线。实验过程中, 室温保持 20℃ 以上。缺血时间达到实验所需的时间后, 松开动脉夹, 让血液重新流动。

术中保持肛温(以白炽灯照射)(37 ± 0.5)℃, 凡术中动物死亡、出现蛛网膜下腔出血或无梗死灶均为模型制作失败, 不纳入本实验, 再随机补充病例, 保证实验动物每组数量不变。

1.2.4 药物预处理: 生地(玄参科多年生草本植物地黄 *R. glutinosa*(Gaertn.)Libosch. 的根)15g 水煎浓缩, 按体表面积换算公式以 15ml/kg 灌胃, bid, 连续两周, 然后做缺血再灌注处理。

1.3 HE 染色

手术后 24h 麻醉动物, 心尖穿刺置管至主动脉, 依次用生理盐水 500ml、4℃4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液 500ml 灌注固定。断头后取脑, 在视交叉后 1—4mm 之间冠状切面切开, 取中间脑组织, 固定 2h, 洗涤 4h。梯度酒精脱水(分别于 80%酒精, 95%酒精, 100%酒精中各浸泡 1h, 行常规脱水)、二甲苯透明(组织行透明处理)、浸蜡(在 38℃ I 号, II 号, III 号熔蜡液中浸泡 40min, 40min, 50min 后)、包埋、在海马齿状回平面连续冠状切片, 制成 5 μ m 厚的冠状切片, 分 I、II、III 套切片, 贴片后室温保存备用。将已染好的切片在显微镜下放大 100、400 倍, 在海马区随机选择不重复的 3 个视野, 统计存活海马神经元细胞数(以个/高倍镜视野)。

1.4 电镜检测

于手术后 24h 麻醉动物, 开胸, 心尖穿刺置管至主动脉, 依次用生理盐水 500ml、4℃4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液 500ml 灌注固定。断头后取脑, 分离皮质、海马取脑分离海马 CA1 区组织, 切成 1mm $\times$ 1mm $\times$ 1mm 组织块, 置于 20L 戊二醛溶液中(pH 7.2)固定, 常规丙酮脱水, 树脂包埋, 超薄切片(50 nm), 乙酸铀和硝酸铅双染色, 透射电镜(JEM.1400 型)观察神经元的超微结构。

1.5 主要观察指标

光镜下存活海马神经元细胞数。以个/高倍镜视野表示。各组大鼠脑组织光镜下电镜下海马神经元 CA1 区组织细胞形态变化。

1.6 统计学分析

计量资料用均数 $\pm$ 标准差表示, 应用 SPSS12.0 统计软件, 组间均数差异显著性检验采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 生地预处理对全脑缺血海马神经元存活数的影响

缺血再灌注组全脑缺血后存活海马神经元数为 37.8 ± 22.3 个/高倍视野 ($\bar{x}\pm s$), 少于假手术组 416.0 ± 52.1 /高倍视野, $P<0.05$, 缺血预处理与生地预处理后全脑缺血后存活海马神经元数分别为 181.6 ± 105.8 个/高倍视野, 224.0 ± 141.7 /高倍视野, 均少于假手术组 ($P<0.05$), 两个预处理组间无显著性差异 ($P>0.05$)。生地预处理组、缺血预处理组与缺血再灌注组比较 $P<0.01$ 。

2.2 生地预处理对全脑缺血海马神经元病理组织的影响

见图1(见彩色插页)。假手术组低倍镜下可见海马神经元外形规则,略呈锥形,有的可见大的顶树突,高倍镜下可见神经元核大而圆,核膜清楚,有1—2个明显的核仁,核染色质均匀清楚,少量锥体神经元变性,外形皱缩,核染色质浓缩、深染,核膜境界不清,细胞间隙增大。未见核固缩,核碎裂,核溶解,细胞膜完整,边缘清晰,细胞和微血管周围间隙正常,间质致密。脑缺血预处理组和药物预处理组海马CA1区损伤明显减轻,只有少量细胞有轻度水肿,细胞核清晰,未见坏死。而持续脑缺血组核固缩深染神经元明显增多,神经元变性严重,部分神经细胞和胶质细胞显著肿胀、变圆,细胞与微血管周围间

隙增宽,组织间质水肿。

2.3 生地预处理对全脑缺血海马神经元超微结构的影响

见图2。假手术组大鼠海马神经元内可见正常细胞器,包括高尔基体,粗面内质网,多聚核糖体,线粒体,溶酶体等。缺血再灌注组大鼠海马神经元细胞不同程度固缩,高尔基体扩张呈大泡状,核内染色质溶解,核膜不清,胞浆内空泡形成,有大量水肿液。药物预处理与缺血预处理均可见染色质淡染,核膜皱缩,核孔不清,胞浆内水肿明显,线粒体肿胀变大,嵴断裂,内部结构疏松,但较持续缺血组损害为轻。

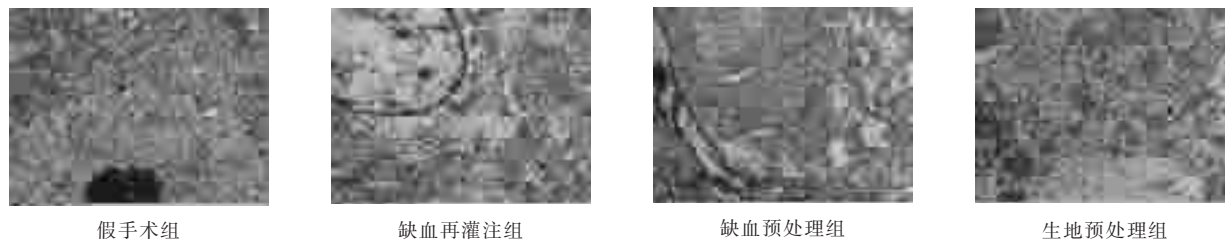


图2 电镜下海马神经元组织超微结构

(×15000)

3 讨论

BIP是指预先短暂性缺血或轻度缺氧激发或动员机体内在的防护能力,使机体对随后严重的缺血、缺氧产生防御和保护作用的现象。虽然BIP对脑缺血的保护效应已属公认,但BIP诱导损伤性应激过程终究是一种创伤。药物性预处理正是基于这一思路而提出来的。

国内外制作脑缺血预处理诱导脑缺血耐受动物模型主要是采用Wistar和SD大鼠、沙鼠或小鼠通过全脑缺血和局灶性脑缺血或二者结合建立模型,如:①全脑-全脑模型:大鼠四血管闭塞模型^[4]及沙鼠双侧颈总动脉夹闭模型^[5];②局灶-全脑模型:大鼠大脑中动脉短暂阻塞-再灌注-双侧颈动脉阻塞和出血性低血压诱导全脑缺血损伤模型^[6];③局灶-局灶模型:大鼠大脑中动脉短暂阻塞-再灌注-MCA阻塞缺血损伤模型^[7-8]。大鼠具有较完整的脑底动脉环,解剖与人脑相似,为研究中常用。

以往的资料表明^[9],大鼠全脑缺血模型中诱导脑缺血耐受(brain ischemic tolerance,BIT)的脑缺血预处理(cerebral ischemic preconditioning,CIP)适宜时间为3min。用3min作为CIP时间,可成功地诱导BIT的产生,诱导海马CA1区神经元缺血耐受的时间为1—7d,第二次损伤性缺血的持续时间为5—10min^[10-11],也是本实验中缺血预处理采用预缺血3min,间隔3d后缺血10min的原因。

缺血预处理虽可诱导脑缺血耐受形成而产生保

护用,但是,在预想可能发生的脑缺血之前给予一次短性缺血进行预处理,在临床应用中尚不实际。例如,用结扎脑供血动脉的方法预处理,在实践上是不可行的。体内的化学预处理在动物实验中得到实施,也能在人类得到实施。药物或化学性预处理(pharmacological chemical preconditioning)即根据缺血处理机制,应用亚致死剂量干扰细胞能量代谢的物质激发或模拟机体内源性物质(如腺苷、缓激肽、NO等)而发挥保护作用,提高组织缺血、缺氧的耐受性;已研究证实,内毒素、肿瘤坏死因子(TNF-α)、白细胞介素1(IL-1)、低剂量的脂多糖等可诱导脑缺血耐受的产生^[12]。Riepe报道了应用神经毒素,氧化磷酸化用——琥珀酸脱氢酶特异性抑制剂3-硝基丙酸(3-nitro-propionic acid, 3-NPA)预处理引起大鼠的海马缺氧耐受^[13]。

中医药治疗中风的方法较多,多数医者强调“急则治其标”,然祖国医学认为中风多属肝肾阴亏,水不涵木,肝阳上亢而致阳升风动,脑窍蒙蔽,证属本虚标实,故当以本虚立论,冯兆张《冯氏锦囊秘录》明确指出:“中风一证,多由肝肾不足,肾水有亏,虚火上承,无故卒倒,筋骨无养,偏枯不遂,故滋肾养肝,治本之至要”。生地性寒,味甘,有清热凉血,养阴生津之功,针对中风病机之本而设。可奏养阴生津,清热凉血,使阴复而风火自除,痰瘀易散,气血运行正常,现代研究表明其有效成分梓醇可保护缺血受损神经元^[3]。

缺血时所见大鼠海马 CA1 区神经元神经细胞水肿, 细胞器消失, 核固缩或溶解均属于结构性损伤, 是细胞变性、坏死的形态学标志。本研究表明生地预处理可明显减轻海马 CA1 区神经元变性损伤, 与缺血预处理相比无明显差异, 只有少量细胞有轻度水肿, 细胞核清晰, 未见坏死。而持续脑缺血组核固缩深染神经元明显增多, 神经元变性严重, 组织间质水肿。电镜下缺血再灌注组大鼠海马神经元细胞不同程度固缩, 高尔基体扩张呈大泡状, 核内染色质溶解, 核膜不清, 胞浆内空泡形成, 有大量水肿液。药物预处理与缺血预处理均可见染色质淡染, 核膜皱缩, 核孔不清, 但较持续缺血组损害为轻。

本研究初步探索了中药生地预处理对大鼠全脑缺血再灌注的影响, 结果表明生地预处理能够保护随后的缺血性损伤且生地预处理与缺血预处理相比, 无明显差别, 为脑缺血损伤的预防, 治疗提供了一种新的思路, 但生地预处理保护脑缺血损伤、减轻脑细胞凋亡的内在机制尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, et al. "Ischemic tolerance" phenomenon found in the brain [J]. Brain Res, 1990, 528: 21—24.
- [2] Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation [J]. Stroke, 1988, 19(7): 913—914.
- [3] 李杨, 李丹青, 包永明, 等. 梓醇对缺血再灌注受损伤神经元保护作用的研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(10): 1454—1456, 1460.
- [4] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. Stroke, 1979, 10(8): 267.
- [5] Dowden J, Corbett D. Ischemic preconditioning in 18-to 20-month-old gerbils long-term survival with functional outcome measures [J]. Stroke, 1999, 30(6): 240.
- [6] Abe H, Nowak TS Jr. Gene expression and undeduced ischemic tolerance following brief insults [J]. Acta Neurobiol Exp, 1996, 56(1): 3—8.
- [7] Pera J, Zawadzka M, Kzminska B, et al. Neurotrophic factor expression after focal brain ischemia preceded by different preconditioning strategies [J]. Cerebrprvasc Dis, 2005, 19(4): 247.
- [8] 郝玉曼, 罗祖明, 周东. 局灶性缺血诱导脑缺血耐受的动物模型 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2003, 20(2): 129.
- [9] Bickler PE, Fahlman CS. Moderate increases in intracellular calcium activate neuroprotective signals in hippocampal neurons [J]. Neuroscience, 2004, 127(3): 673—683.
- [10] Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, et al. "ischemic tolerance" phenomenon found in the brain [J]. Brain Res, 1990, 528: 21—24.
- [11] Kato H, Liu Y, Araki T, et al. Temporal profile of the effects of pretreatment with brief cerebral ischemia on the neuronal damage following secondary ischemic insult in the gerbil: cumulative damage and protective effects [J]. Brain R, 1991, 553: 238—242.
- [12] Bordet R, Deplanque D, Maboudou P, et al. Increase in endogenous brain superoxide dismutase as a potential mechanism of lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20: 1190—1196.
- [13] Riepe MW, Niemi WN, Megow D, et al. Mitochondrial oxidation in rat hippocampus can be preconditioned by selective chemical inhibition of succinic dehydrogenase [J]. Exp Neurol, 1996, 138: 15221.

(上接第 809 页)

症状, 达到治疗目的^[1]。

综上, 系统正规的综合康复治疗神经根型颈椎病有较高的阳性结果率, 较手术治疗具有无创、费用少、患者易接受等优点, 是治疗该病的基本疗法。但仍有部分患者即便经过科学、系统、规范和长程的保守治疗, 疗效仍不明显或症状改善不大, 其原因可能与患者的年龄、是否伴有颈椎骨质增生、椎间孔是否变窄以及是否有不良工作体位等因素有关, 应当引起骨科和康复科医师的高度重视。对于经临床和影像学明确诊断为神经根型颈椎病的患者, 尤其是年龄较大及伴有颈椎骨质增生和椎间孔变窄的, 在疗效不佳时, 应仔细分析原因, 及时调整治疗方案, 以提高疗效。

由于本文纳入的样本量尚不够多, 属于初步研究, 有关影响综合康复治疗神经根型颈椎病疗效的危险因素产生之确切机制尚不明确, 有待今后进一步

步深入探讨。

参考文献

- [1] 南登崑主编. 康复医学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 217—222.
- [2] 吴在德, 吴肇汉主编. 外科学 [M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 855—859.
- [3] 郑晓黄主编. 中药新药临床研究指导原则 (试行) [M]. 第 1 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 346—349.
- [4] 贾东向, 胡延娜. 综合疗法治疗神经根型颈椎病 49 例疗效观察 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27(11): 676.
- [5] 陈丽娜, 杨丹丹, 纵亚, 等. 综合物理疗法治疗神经根型颈椎病的疗效观察 [J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(12): 936.
- [6] 张衍波, 刘增宇, 郭相华. 矿泉中药泥外敷治疗神经根型颈椎病的疗效观察 [J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(7): 660.
- [7] 王刚, 王军, 瓮长水. 神经根型颈椎病病程与愈后的关系 [J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2006, 21(9): 693—695.
- [8] 王刚, 瓮长水, 王军. 握力检查在神经根型颈椎病疗效评价中的应用 [J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(3): 256—257.
- [9] 郭会利, 张敏, 孔凡国, 等. 神经根型颈椎病的影像学诊断及神经根障碍的相关性研究 [J]. 实用放射学杂志, 2008, 24(4): 442—445.
- [10] 章岩. 交感型颈椎病的研究进展 [J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(8): 768—770.