

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.21.014

局部亚低温联合硫酸镁对局灶性脑缺血大鼠的保护作用*

张丽 孙萍 谷莹丽 陈团团 刘丽娜[△]

(哈尔滨医科大学附属第四医院 神经内科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨联合应用局部亚低温(32-35℃)及硫酸镁对局灶性脑缺血大鼠的保护作用及其可能机制。**方法:**通过线栓法建立大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型,将40只雄性Wistar大鼠随机分为假手术组、常温组、亚低温组、硫酸镁组、亚低温+硫酸镁组,每组8例,采用Longa神经功能评分、TTC染色、TUNEL技术,检测和比较各组脑缺血后大鼠的神经功能、脑梗死体积、凋亡细胞数。**结果:**与常温组相比,亚低温组与亚低温+硫酸镁组的梗死体积、神经功能评分、凋亡细胞数均明显降低,差异有显著意义($P<0.05$);而与亚低温组相比,亚低温+硫酸镁组局灶性脑缺血大鼠的脑梗死体积、神经功能评分、凋亡细胞数均显著减少,差异有显著意义($P<0.05$)。**结论:**与单独应用亚低温相比,局部亚低温与硫酸镁联合应用,对局灶性脑缺血大鼠可发挥更有效的脑保护作用,其机制可能与抑制脑缺血后凋亡有关。

关键词:亚低温;硫酸镁;脑缺血;凋亡

中图分类号:Q95-3;R743.3 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)21-4056-04

Protective Effect of Focal Mild Hypothermia Combined with $MgSO_4$ on the Rats with Focal Cerebral Ischemia*

ZHANG Li, SUN Ping, GU Ying-li, CHEN Tuan-tuan, LIU Li-na[△]

(Department of Neurology, The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effect of focal mild hypothermia combined with $MgSO_4$ on the rats with focal cerebral ischemia and its possible mechanism. **Methods:** The middle cerebral artery occlusion(MCAO) models of rat were achieved by an intraluminal filament. Forty male adult Wistar rats were randomly divided into sham-operated group, normothermia ischemia group, $MgSO_4$ group, mild hypothermia group and mild hypothermia+ $MgSO_4$ group (each group $n=8$). The neurological function, infarct volumes, apoptotic cell numbers in the ischemic cortex were assessed by Longa neurological scores, TTC staining and TUNEL. **Results:** Compared with the normothermia group, the neurological scores, infarct volumes and apoptotic cell numbers markedly decreased in hypothermia group and hypothermia+ $MgSO_4$ group ($P<0.05$). Compared with mild hypothermia group, the neurological scores, infarct volumes and apoptotic cell numbers markedly decreased in hypothermia+ $MgSO_4$ group ($P<0.05$). **Conclusion:** Focal mild hypothermia combined with $MgSO_4$ was more effective in the protection of rats with focal cerebral ischemia than mild hypothermia, which was partly due to the decrease of apoptosis.

Key words: Mild hypothermia; $MgSO_4$; Cerebral ischemia; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R743.3 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)21-4056-04

前言

缺血性卒中患者能实现再灌注者比例较低^[1]。脑保护疗法旨在减少脑缺血后可挽救脑组织的损害,是目前的研究热点^[2]。将多种脑保护方法联合应用的研究越来越多^[3,4]。研究表明亚低温(32-35℃)应用于脑缺血动物模型及心脏复苏后全脑缺血病人安全、有效,目前两个3期临床试验(EuroHYP,2012;IC-TuS-2/3;Stroke Trials Directory,2012)正在进行,将探讨亚低温治疗脑卒中的有效性^[5,6]。而镁离子作为电压依赖性NMDA受体的非竞争性阻断剂对脑缺血动物也有脑保护作用^[7]。本研究拟探讨局部亚低温联合硫酸镁对局灶性脑缺血大鼠的脑保护作用

及其作用机制,旨在发现更有效、价格便宜、易于实施、且适于目前国内患者的脑保护措施。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

40只雄性Wistar大鼠购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所,体重(250 ± 30)g。将其随机分为假手术组(C)、常温组(NT)、硫酸镁组(Mg)、局部亚低温组(HT)、局部亚低温+硫酸镁组(HT+Mg),每组8只。HT组于大鼠缺血后给予局部亚低温3小时,Mg组经左股静脉给予硫酸镁120 mg/kg,给药时间超过15分钟,大鼠持续缺血24小时。

* 基金项目:黑龙江省教育厅项目(11531208)

作者简介:张丽(1972-),女,博士,副主任医师,主要研究方向:脑血管病,E-mail:mail_zhangli@126.com

△ 通讯作者:刘丽娜,E-mail:llnjy@sina.com

(收稿日期:2014-02-26 接受日期:2014-03-24)

1.2 大鼠局灶缺血模型的建立

采用改良的 Longa 线栓法^[8]建立大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,假手术组栓线插至距分叉处 10 mm。按 Longa 神经功能评分法,以大鼠麻醉清醒后 1~4 分为有效模型。0 分:无神经缺损症状;1 分:左前肢不能完全伸直,提尾试验阳性;2 分:向左旋转;3 分:向左侧倾倒;4 分:不能向左行走或昏迷。缺血 24 小时后,深度麻醉处死动物。

1.3 局部亚低温方法

亚低温组采用可调控半导体制冷仪(哈尔滨工业大学热工教研室研制,专利号 ZL98236936.0),设定制冷器温度为 6~8℃(前期系列实验已证实脑内缺血区温度为 33℃ 左右)^[9]。于脑缺血后立即大鼠病灶侧紧密接触半导体制冷块给予亚低温,采用 SL-4 型针型点温度传感器(上海同济大学研制),于亚低温 10 min 内测量大鼠鼓膜温度(脑温平均高于鼓膜温 0.6 ± 0.08 ℃),证实脑温可以降至(33 ± 0.5)℃。亚低温持续 3 h。亚低温结束后将大鼠置于室温(25℃)下自然复温。

1.4 脑组织 TTC 染色

将拟行 TTC 染色的大鼠断头处死后迅速取脑,距额极 2 mm 向后连续等距切取 6 个冠状脑片,于 37℃ 水浴、避光条件下,2% TTC 染色 15 分钟。数码相机拍照后,图像输入计算机,采用图像分析软件进行计算,以损伤对侧半球的面积减去损伤

侧 TTC 染色正常区的面积求得梗死体积,所有脑片梗死面积之和乘以脑片的厚度即为梗死体积。

1.5 TUNEL 法(原位标记 DNA 片段)

试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,严格按照说明书进行具体操作。

1.6 图像分析方法

在 Motic Images Advanced 3.0 图像处理系统进行显微图像分析,每张切片于梗死灶周围缺血区随机选择 20 个高倍视野,计数每个视野内阳性细胞数,每张切片取平均值。

1.7 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS14.0 统计软件处理,采用单因素方差分析(AVONA),组间资料两两比较采用 SNK-q 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑缺血后各组脑梗死体积的比较

TTC 染色显示正常脑组织染成玫瑰红侧,梗死脑组织为白色,梗死多位于左侧基底节区,其次为顶叶和颞叶皮层。与 NT 组相比,HT 组大鼠脑梗死体积明显缩小($P < 0.001$,减少 31%),HT+Mg 组亦明显减小($P < 0.001$,减少 42%),而 HT+Mg 组大鼠的脑梗死体积与 HT 组相比明显减小,差异有显著统计学意义($P = 0.031$)。见表 1、图 1。C 组未见梗死(图中未显示)。

表 1 脑缺血后各组脑梗死体积、神经功能评分、凋亡细胞数比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the infarct volumes, neurological scores and apoptotic cell numbers among different groups

Group	Number	Infarct volumes (mm ³)	Neurological scores	Apoptotic cell numbers
Control group	8	0	0	0
Normothermia group	8	150.00 $\pm$ 23.66	3.17 $\pm$ 0.75	10.0 $\pm$ 1.41
MgSO ₄ group	8	121.67 $\pm$ 8.16	2.83 $\pm$ 0.41	7.83 $\pm$ 0.75
Mild hypothermia group	8	104.17 $\pm$ 11.58	2.17 $\pm$ 0.4	7.33 $\pm$ 1.86
Mild hypothermia+ MgSO ₄ group	8	86.83 $\pm$ 10.30	1.5 $\pm$ 0.55	5.67 $\pm$ 0.82

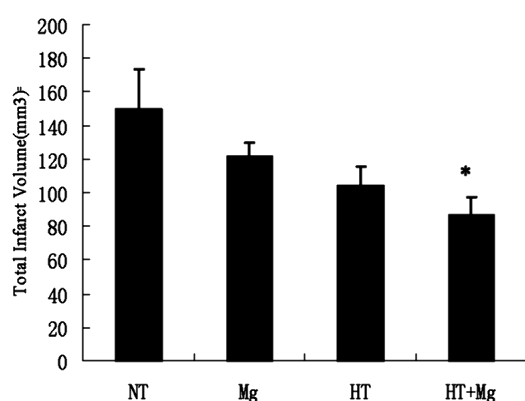


图 1 各组的总脑梗死体积比较

Fig.1 Comparison of the total infarct volume among different groups

*HT+Mg Vs HT, $P = 0.031$

2.2 脑缺血后各组神经功能评分的比较

除假手术对照组外,其余各实验组大鼠均表现处神经功能缺陷。与 NT 组相比,HT 组与 HT+Mg 组的神经功能评分均明显降低(分别 $P = 0.002$, $P < 0.001$)。此外,HT+Mg 组的神经功能评

分明显低于亚低温组,差别有统计学意义($P = 0.027$),而 C 组未见神经功能缺陷(图中未显示)。

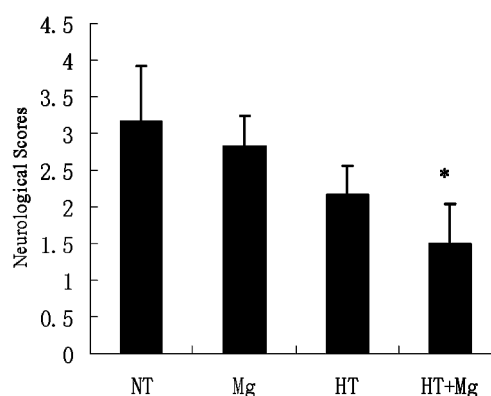


图 2 各组神经功能评分的比较

Fig.2 Comparison of the neurological scores among different groups

* HT+Mg Vs HT, $P = 0.027$

2.3 脑缺血后各组凋亡细胞数的比较

TUNEL 阳性物质位于细胞核内,MCA 阻塞侧半球

TUNEL 阳性细胞主要分布在梗死灶周围的内侧尾壳核和额顶部皮层。与 NT 组相比, HT 组与 HT+Mg 组凋亡阳性细胞数均明显减少 (分别 $P=0.001$, $P<0.001$)。此外, HT+Mg 组与 HT 相比, 凋亡阳性细胞数明显减少, 差异有显著统计学意义($P=0.02$)。C 组细胞未见 TUNEL 阳性物质(图中未显示)。

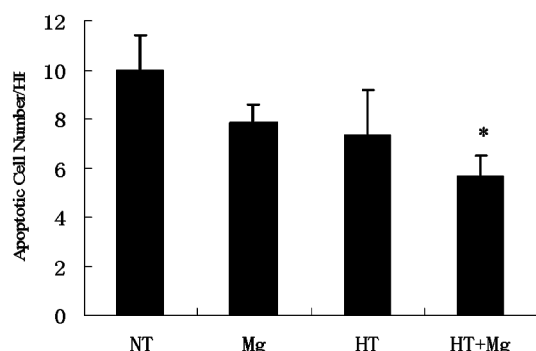


图3 各组每高倍视野凋亡细胞数的比较

Fig.3 Comparison of the apoptotic cell number/HP among different groups

* HT+Mg Vs HT, $P=0.02$

3 讨论

研究显示, 急性缺血性卒中患者仅有 1.5% 能实现 rt-PA 静脉溶栓, 本研究选用 MCAO 大鼠持续脑缺血模型, 更符合广大未能实现再灌注治疗患者的临床实际, 研究所采用的亚低温方法为局部亚低温, 此方法既往已被证实有效、安全, 可避免全身低温所需条件高(全身麻醉、监护)的弊端。硫酸镁选用剂量参考 Lee 等的文献^[10], 通过预试验(60、90、120、150 mg/kg)证实 120 mg/kg 可最大程度地减少脑梗死体积, 而不影响血液动力学, 因而选定 120 mg/kg 为本试验的最适剂量。

研究结果显示, 联合给予亚低温和硫酸镁的局灶性脑缺血大鼠的脑梗死体积及神经功能评分较仅给予亚低温的大鼠显著减少或降低, 表明联合给予亚低温和硫酸镁对持续局灶性脑缺血大鼠的脑保护作用较单纯亚低温更加明显。2005 年, Zhu 等^[11]发现联合应用缺血后亚低温及静脉注射硫酸镁对于减少全脑缺血大鼠海马 CA1 区神经元死亡较单一方法更为有效。本研究主要关注局灶性脑缺血大鼠, 与临床脑梗死病人更加贴近, 并得到了与全脑缺血大鼠模型相近的研究结果。既往的研究采用脑缺血再灌注动物模型模拟临床脑梗死溶栓后再通的模型, 证实二者联用可较单独应用亚低温发挥更强的脑保护作用^[12-14]。

亚低温和硫酸镁联合应用的协同作用机制尚不十分清楚。亚低温在动物实验及临床实验中皆被证实是安全、有效的脑保护方法, 其对脑缺血保护作用的机制包括: 减少自由基的产生, 降低氧代谢率, 减少兴奋性氨基酸的释放, 抑制钙离子内流, 抑制缺血神经元凋亡, 保护血脑屏障, 抑制脑缺血再灌注后炎症反应等^[15-17]。其中, 局部亚低温可以克服全身亚低温的缺点, 被认为是一项很有前途的治疗方法。硫酸镁在临床上早已被广泛应用于治疗急性心肌梗死及子痫, 近年的研究也发现硫酸镁对缺血性脑损害具有脑保护作用, 其机制包括调节脑血流量, 阻断谷氨酸受体 NMDA, 抑制兴奋性氨基酸释放, 拮抗各种亚型

的电压依赖性钙通道及钙内流, 增强线粒体的钙缓冲, 是遏制缺血性级联反应, 减轻迟发性神经元死亡的关键措施^[18,19]。由此可见, 硫酸镁与亚低温一样, 也有多个作用靶点, 通过多重机制发挥作用, 这表明二者联用有发挥协同作用的可能。

细胞凋亡在缺血性脑损伤的过程中发挥重要作用^[20]。本研究用 TUNEL 法对大鼠局灶性脑缺血后凋亡细胞的分布进行初步观察。结果显示局部亚低温 + 硫酸镁处理的大鼠凋亡阳性细胞数明显少于单纯亚低温处理的大鼠, 表明局灶持续脑缺血后, 局部亚低温 + 硫酸镁组可能通过抑制缺血后凋亡发挥其脑保护作用。

本研究的局限性在于缺血后立即给予亚低温及硫酸镁, 未来的研究应进一步明确应用的时间窗, 即脑缺血后多长时间段内二者联用仍能起到脑保护作用。此外, 本研究观察疗效为短期时间点, 若进一步有长期疗效的观察会更完善, 这也是我们进一步研究的方向。总之, 本研究表明局部亚低温联合硫酸镁较单独应用亚低温可对局灶性脑缺血大鼠发挥更有效的脑保护作用, 其机制可能与抑制脑缺血后凋亡有关。这可能为缺血性卒中患者提供一种有效的、价格便宜、易于实施、适于目前国内患者的脑保护方法。

参考文献(References)

- [1] Donnan G A, Davis S M. Stroke drug development: usually, but not always, animal models[J]. Stroke, 2005, 36(10): 2326-2328
- [2] Fisher M. New approaches to neuroprotective drug development1[J]. Stroke, 2011, 42 (Suppl 1): S24-S27
- [3] O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, et al. Evaluation of combination therapy in animal models of cerebral ischaemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2012, 32(4): 585-597
- [4] Lagina AT, Calo L, Deogracias M, et al. Combination therapy with insulin-like growth factor-1 and hypothermia synergistically improves outcome after transient global brain ischemia in the rat [J]. Acad Emerg Med, 2013, 20(4): 344-351
- [5] Arrich J, Holzer M, Havel C, et al. Hypothermia for neuroprotection in adults after cardiopulmonary resuscitation [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2012, 9: 1-34
- [6] EuroHYP. The European Stroke Research Network for Hypothermia-Launch of the Euro HYP-1 trial. 2012. /www.eurohyp.org/index.html
- [7] Meloni BP, Zhu H, Knuckey NW, et al. Is magnesium neuroprotective following global and focal cerebral ischaemia? A review of published studies[J]. Magnesium Res, 2006, 19(2): 123-137
- [8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91
- [9] 王德生, 丰宏林, 盛莉, 等. 病变侧亚低温对局部脑缺血再灌注损伤有关因素的影响[J]. 中华神经外科杂志, 1999, 15(4): 240-242
Wang De-sheng, Feng Hong-lin, Sheng Li, et al. Influence of focal mild hypothermia on cerebral ischemia/reperfusion rats [J]. Chin J Neurosurgery, 1999, 15(4): 240-242
- [10] Lee EJ, Lee MY, Chang GL, et al. Delayed treatment with magnesium: reduction of brain infarction and improvement of electrophysiological recovery following transient focal cerebral ischemia in rats[J]. J Neurosurg, 2005, 102(6): 1085-1093

- [11] Zhu H, Meloni BP, Bojarski C, et al. Post-ischemic modest hypothermia (35 degrees C) combined with intravenous magnesium is more effective at reducing CA1 neuronal death than either treatment used alone following global cerebral ischemia in rats[J]. *Exp Neurol*, 2005, 193(2): 361-368
- [12] Schmid-Elsaesser R, Hungerhuber E, Zausinger S, et al. Combination drug therapy and mild hypothermia: a promising treatment strategy for reversible, focal cerebral ischaemia [J]. *Stroke*, 1999, 30 (9): 1891-1899
- [13] Song W, Wu YM, Ji Z, et al. Intra- carotid cold magnesium sulfate infusion induces selective cerebral hypothermia and neuroprotection in rats with transient middle cerebral artery occlusion [J]. *Neurol Sci*, 2013, 34(4): 479-486
- [14] Zausinger S, Scholler K, Plesnila N, et al. Combination drug therapy and mild hypothermia after transient focal cerebral ischaemia in rats [J]. *Stroke*, 2003, 34(9): 2246-2251
- [15] Delhay C, Mahmoudi M, Waksman R. Hypothermia Therapy: Neurological and Cardiac Benefits [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 59(3): 197-210
- [16] Dehaes M, Aggarwal A, Lin PY, et al. Cerebral oxygen metabolism in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy during and after therapeutic hypothermia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2014, 34(1): 87-94
- [17] Hennerici MG, Kern R, Szabo K. Non-pharmacological strategies for the treatment of acute ischaemic stroke [J]. *Lancet Neurol*, 2013, 12 (6): 572-584
- [18] Westermaier T, Stetter C, Kunze E, et al. Magnesium treatment for neuroprotection in ischemic diseases of the brain [J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2013, 5(1): 6
- [19] Sutherland BA, Minnerup J, Balami JS, et al. Neuroprotection for ischaemic stroke: translation from the bench to the bedside [J]. *Int J Stroke*, 2012, 7(5): 407-418
- [20] Niizuma K, Yoshioka H, Chen H, et al. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(1): 92-99

(上接第 4008 页)

参 考 文 献(References)

- [1] Malim Mh, Bieniasz Pd. HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(5): a006940
- [2] Harris Rs, Hultquist Jf, Evans Dt. The restriction factors of human immunodeficiency virus[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(49): 40875-40883
- [3] Harris Rs, Bishop Kn, Sheehy Am, et al. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection[J]. *Cell*, 2003, 113(6): 803-809
- [4] Jarmuz A, Chester A, Bayliss J, et al. An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22 [J]. *Genomics*, 2002, 79(3): 285-296
- [5] Zheng Yh, Irwin D, Kurosu T, et al. Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication[J]. *J Virol*, 2004, 78(11): 6073-6076
- [6] Chang Y, Cesarman E, Pessin Ms, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma[J]. *Science*, 1994, 266(5192): 1865-1869
- [7] Zheng Yh, Jeang Kt, Tokunaga K. Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction[J]. *Retrovirology*, 2012, 9(112): 45-73
- [8] Wolf D, Goff Sp. Host restriction factors blocking retroviral replication[J]. *Annu Rev Genet*, 2008, 42: 143-163
- [9] Harris Rs. Enhancing immunity to HIV through APOBEC[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(10): 1089-1090
- [10] Koning Fa, Newman En, Kim Ey, et al. Defining APOBEC3 expression patterns in human tissues and hematopoietic cell subsets [J]. *J Virol*, 2009, 83(18): 9474-9485
- [11] Cocchi F, Devico Al, Garzino-Demo A, et al. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells[J]. *Science*, 1995, 270(5243): 1811-1815
- [12] Scarlatti G, Tresoldi E, Bjorndal A, et al. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression [J]. *Nat Med*, 1997, 3(11): 1259-1265
- [13] Kledal Tn, Rosenkilde Mm, Coulin F, et al. A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus[J]. *Science*, 1997, 277(5332): 1656-1659
- [14] Boshoff C, Endo Y, Collins Pd, et al. Angiogenic and HIV-inhibitory functions of KSHV-encoded chemokines[J]. *Science*, 1997, 278(5336): 290-294
- [15] Moore Ps, Boshoff C, Weiss Ra, et al. Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV[J]. *Science*, 1996, 274(5293): 1739-1744
- [16] Sozzani S, Luini W, Bianchi G, et al. The viral chemokine macrophage inflammatory protein-II is a selective Th2 chemoattractant[J]. *Blood*, 1998, 92(11): 4036-4039
- [17] 罗燕, 谭晓华, 狄春红, 等. 细胞穿膜肽 pep-1 与 vMIP-II 的融合表达与纯化[J]. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29(6): 1026-1032
- Luo Yan, Tan Xiao-hua, Di Chun-hong, et al. The fusion expression and purification on cell permeable peptide pep-1 and viral macrophage inflammatory protein-II[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2010, 29(6): 1026-1032
- [18] Chandriani S, Ganem D. Host transcript accumulation during lytic KSHV infection reveals several classes of host responses[J]. *PLoS One*, 2007, 2(8): e811
- [19] Cherqui S, Kingdon Km, Thorpe C, et al. Lentiviral gene delivery of vMIP-II to transplanted endothelial cells and endothelial progenitors is proangiogenic in vivo[J]. *Mol Ther*, 2007, 15(7): 1264-1272
- [20] Chen S, Bacon Kb, Li L, et al. In vivo inhibition of CC and CX3C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II[J]. *J Exp Med*, 1998, 188(1): 193-198