

肢体缺血后处理对脑缺血大鼠神经功能恢复和神经细胞增殖的作用*

黄丹^{1,2}, 刘洪红^{1,2}, 杨桢³, 屈云^{1,2,△}

1. 四川大学华西医院 康复医学科(成都 610041); 2. 四川省康复医学重点实验室(成都 610041);

3. 四川大学华西医院 公共实验技术中心(成都 610041)

【摘要】 目的 探索非侵入式肢体缺血后处理(NLIP)对脑缺血大鼠的脑保护作用 and 损伤侧皮质区神经细胞的表达与分布。方法 SD大鼠110只随机分成假手术组($n=10$),缺血再灌注损伤组(I/R组, $n=50$),NLIP组(治疗组, $n=50$)。I/R组和治疗组动物采用线栓法制备大脑中动脉栓塞(MCAO)模型(假手术组不插入线栓),治疗组于再灌注即刻给予NLIP处理(改良的缺血弹性带股动脉近端加压阻断股动脉10 min,再通10 min,循环3次),术后3 d、7 d、14 d、21 d、28 d分别称取大鼠体质量,并进行行为学评估后处死大鼠取脑组织,免疫组织化学染色检测各时点缺血脑皮质中的双皮质素(DCX)和胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)的表达,Western blot检测缺血脑皮质中微管相关蛋白2(MAP2)的表达。结果 假手术组动物术后1~3 d表现出轻度的体质量下降和行为学缺损,术后1 d出现上肢肌力减弱,之后开始恢复。与假手术组比较,以上神经缺损在I/R组和治疗组动物中更加明显($P<0.05$),术后3 d到21 d逐渐缓解,到术后28 d时接近假手术组水平。与I/R组相比,治疗组动物体质量在术后2~7 d有明显恢复($P<0.05$),动物上肢肌力在14~28 d有明显改善($P<0.05$),治疗组行为学评分在各时点与I/R组差异无统计学意义。与假手术组比较,I/R组和治疗组脑皮质缺血区周围DCX阳性细胞和GFAP阳性细胞随时间推移逐渐增多,伴随胞体肥大和突起变长加粗,分别在术后21 d和28 d大量增殖并聚集在脑皮质缺血区周围。I/R组和治疗组在术后3 d缺血脑皮质中MAP2表达量下降,但与假手术组差异无统计学意义($P>0.05$),之后逐渐上调,术后14 d和21 d时高于假手术组($P<0.05$)。治疗组MAP2表达量在术后7~28 d高于假手术组($P<0.05$),在术后7 d时高于I/R组($P<0.05$)。结论 NLIP可减轻脑缺血大鼠神经行为学异常和促进缺血周围区神经细胞的增多。

【关键词】 脑缺血 缺血后处理 神经保护 神经元 星形胶质细胞

Effects of Limb Ischemic Postconditioning on Behavioral Improvement and Proliferation of Neural Cells in Rats with Transient Cerebral Ischemia HUANG Dan^{1,2}, LIU Hong-hong^{1,2}, YANG Yang³, QU Yun^{1,2,△}. 1. Department of Rehabilitation Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Rehabilitation Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Core Facility, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: dr_yunqu@163.com

【Abstract】 **Objective** To determine the effects of non-invasive limb ischemic postconditioning (NLIP) on the behavioral performance and the expression and distribution of neural cells in rats with ischemic cortex. **Methods** Rats were randomly divided into 3 groups: sham group ($n=10$), ischemia/reperfusion (I/R) group ($n=50$), and NLIP group ($n=50$). Focal cerebral ischemia was induced by intraluminal MCAO in the rats in the I/R and NLIP groups, while no suture was inserted in the sham-operated rats. NLIP (reperfusion-10 min, ischemia-10 min, $\times 3$ cycles) was conducted immediately after reperfusion on bilateral femoral arteries by modified ischemic elastic bands. Body mass and behavioral performance of the rats were assessed at 3 d, 7 d, 14 d, 21 d and 28 d post-ischemia ($n=5-10$). Doublecortin (DCX) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the ischemic cortex were detected by immunohistochemistry. The expression of microtubule associated protein 2 (MAP2) was detected by Western blot. **Results** The rats in the sham group showed mild body mass loss and minor neurological deficit 1-3 d post-ischemia and weakened muscle strength 1 d post-ischemia, which were alleviated gradually overtime. Compared with the sham group, neurological deficits were more obvious in the rats in the I/R and NLIP groups, which were alleviated 3-21 d post-ischemia and reached a level close to that of the sham group at 28 d post-ischemia. No significant difference was found between the I/R and NLIP groups in neurologic deficit scores. NLIP significantly alleviated body mass loss 2-7 d post-ischemia ($P<0.05$) and improved muscle strength 14-28 d post-ischemia ($P<0.05$).

* “十二·五”国家科技支撑计划项目(No. 2011BAI08B11)及青年科学基金(No. 81401858)资助

△ 通信作者, E-mail: dr_quyun@163.com

Compared with the sham group, rats in the I/R and NLP groups had increased numbers of DCX and GFAP-labeled cells in the ischemic penumbra over time, increased hypotrophic cell bodies and longer and thickened dendrites, and decreased expression of MAP2 ($P > 0.05$) at 3 d post-ischemia prior to an up-regulation. Higher expression of MAP2 was found 14-21 d post-ischemia ($P < 0.05$) in the I/R group and 7-28 d post-ischemia in the NLIP group ($P < 0.05$). Significant difference in MAP2 was found between the I/R and NLIP groups at 7 d post-ischemia ($P < 0.05$). **Conclusion** NLIP has the potential to improve neurological outcomes and promote increase of neural cells in penumbral cortex after cerebral ischemia.

【Key words】 Cerebral ischemia Ischemic postconditioning Neuroprotection Neurons
Astrocytes

缺血性脑卒中(脑缺血)是常见的致死致残性疾病,占脑卒中的80%以上。近年来,研究者提出了缺血预处理^[1]和缺血后处理(IP)^[2],方案通过激活机体内源性保护机制,减轻靶器官再灌注损伤。缺血性或创伤性损伤可诱发内源性神经干细胞的增殖^[3],并证实 在 7~10 d 达高峰,这些新生细胞可以分化为神经元和胶质细胞,并迁移到损伤区周围^[4],替代或补偿损伤的神经细胞。有研究表明,IP 或肢体缺血后处理(LIP)可抑制神经细胞凋亡、减轻炎症反应,减少梗死体积^[5-6],进而减轻脑损伤程度,改善神经缺损症状。而 LIP 对缺血性脑损伤后内源性神经再生是否有影响,还未见报道。本实验拟观察脑损伤侧皮质区神经细胞的分布情况,探索非侵入式肢体缺血后处理(NLIP)对脑缺血后成年大鼠内源性神经再生的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

清洁级健康成年 SD 大鼠,雄性,体质量(250±30) g,由四川大学实验动物中心提供。实验期间,大鼠被饲养于恒定温度(22±1)℃和光照(12 h 昼,12 h 夜)的环境中,自由饮水和进食,适应环境 7 d,体质量达(280±30) g 时,进行大脑中动脉栓塞(MCAO)造模。实验中所有对动物的操作和处置符合中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关要求。

1.2 大脑中动脉栓塞模型及干预

将动物随机分为 3 组,即假手术(sham)组、缺血再灌注模型(I/R)组和 NLIP 治疗(NLIP)组。对 I/R 组和 NLIP 组大鼠进行 MCAO 造模。参照 LONGA 等^[7]的方法,动物麻醉后,采用线栓法对右侧大脑中动脉进行栓塞,缺血 90 min 后拔栓实现血流再灌注。手术过程中,采用激光多普勒血流监测仪(LDF)对右侧局部脑血流(rCBF)进行监测。探针坐标为前囟右 5 mm,后 1 mm。若 rCBF 在线栓

插入后降至基线的 70%~90%,拔栓后恢复至 60%以上,且大鼠出现 Horner 征(右侧瞳孔缩小、上眼睑下垂、眼球内陷),左前肢瘫痪,麻醉清醒后,提尾悬空时左侧前肢内收、屈曲,自主运动时身体向左侧转圈,提示造模成功。Sham 组大鼠只进行麻醉和颈部组织分离,不插入线栓。手术过程中采用加热板或加热灯保持直肠体温在 37.0~37.5℃。

NLIP 组动物于再灌注即刻将改良的缺血弹性带(5 mm 宽的带齿弹性带两端交叉穿过塑料管固定)在双侧后肢根部(约股动脉近端 1/5~2/5 的位置)加压阻断股动脉,以皮肤发绀、皮温降低、不能触及脚背动脉搏动为缺血成功。阻断 10 min,再通 10 min,循环 3 次。I/R 组和 sham 组动物同时点不进行任何操作。

I/R 组和 NLIP 组造模成功的大鼠于术后 3 d、7 d、14 d、21 d、28 d 五个时点(以造模手术当日为 0 d),完成行为学评估和悬吊实验后处死,每组每时点 10 只;Sham 组共 10 只,分别在术后 7 d 和 28 d 完成行为学评估和悬吊实验后处死(各 5 只)。

1.3 神经行为学评分

采用 LONGA 五分制评分(neurologic deficit score, NDS)^[7]在术后 1 d、2 d、3 d、7 d、14 d、21 d 和 28 d 对各组动物神经缺损进行评分。0 分:无神经系统功能缺损症状,活动正常;1 分:对侧前肢不能完全伸展;2 分:爬行时向偏瘫侧转圈;3 分:行走时身体向偏瘫侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失;5 分,死亡。每只大鼠评定 1 次。

1.4 悬吊实验

在各时点进行神经行为学评分后,对各组大鼠进行悬吊实验,以评估大鼠的上肢肌力。将直径 6 mm、长 1 m 的尼龙绳水平固定于 80 cm 的高度,地面铺以海绵。提尾将动物前爪抓握于绳子中部,记录从绳上掉落的时间(≤60 s),每只大鼠测试 3 次,取平均值。悬吊时间越长,表明上肢肌力越好,反之,肌力越差。

1.5 免疫组织化学染色检测脑缺血皮质双皮质素

(DCX)和胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)蛋白的表达

DCX 蛋白主要表达于未成熟神经元的轴突, GFAP 主要表达于星形胶质细胞胞质和突起, 可分别作为未成熟神经元和星形胶质细胞的标志物。在术后 3 d、7 d、14 d、21 d、28 d, 对 I/R 组和 NLIP 组动物进行脑组织取材(每组每时点 5 只), sham 组于术 7 d 取材。用 10% 水合氯醛深度麻醉大鼠, 体积分数为 4% 多聚甲醛和 0.9% 生理盐水经心脏灌注后取脑。取前囟后 1.0~3.0 mm 脑组织石蜡包埋后进行冠状位切片, 片厚 6 μm (每个脑组织取 5 张)。采用 SP 法对所有切片进行免疫组化染色。切片脱蜡至水, 柠檬酸钠(0.01 mol/L, pH 6.0)热修复, 3% H_2O_2 (80% 甲醇)处理; 5% BSA 封闭后一抗(DCX, 1:2500, GFAP, 1:800, Abcam, UK), 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 二抗 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 h; DAB 显色; 苏木素复染, 盐酸酒精化; 脱水、透明、封片、镜检。定性分析两种蛋白的表达。

1.6 Western blot 检测大鼠脑缺血皮质微管相关蛋白 2(MAP2)的表达水平

MAP2 主要表达于成熟神经元的轴突。在相应时点处死 I/R 组和 NLIP 组其余 5 只大鼠, 在 28 d 时处死 sham 组 5 只大鼠。取缺血侧皮质新鲜组织, 冻存于 -80 $^\circ\text{C}$ 冰箱。取出保存的组织, 进行总

蛋白提取, 蛋白定量后按 40 μg 蛋白量上样, 进行 80 g/L SDS-PAGE 电泳, PVDF 膜电转印, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 鸡抗 MAP2(1:10 000, Abcam) 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h, ECL 显色。以目的条带与内参 $\beta\text{-actin}$ 的光密度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.7 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)比较多组间差异, 使用 LSD 法进行组间两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模前后 rCBF 的变化

见图 1。3 组大鼠 rCBF 在术前无明显差异 ($P > 0.05$)。rCBF 在 sham 组整个手术过程中比较稳定, 而在 I/R 组和 NLIP 组呈现一致的趋势, 即与 sham 组相比, 这两组的 rCBF 在结扎颈总动脉时(CCAO)降低, 并在栓塞大脑中动脉时(MCAO)进一步降低, 在再灌注后有一定程度恢复, 但与 sham 组仍有差距 (P 均 < 0.001)。I/R 组和 NLIP 组在所有时点差异均无统计学意义。

2.2 NLIP 对体质量、神经缺损和上肢肌力的影响

见图 1。3 组动物在术后 3 d 体质量下降至最

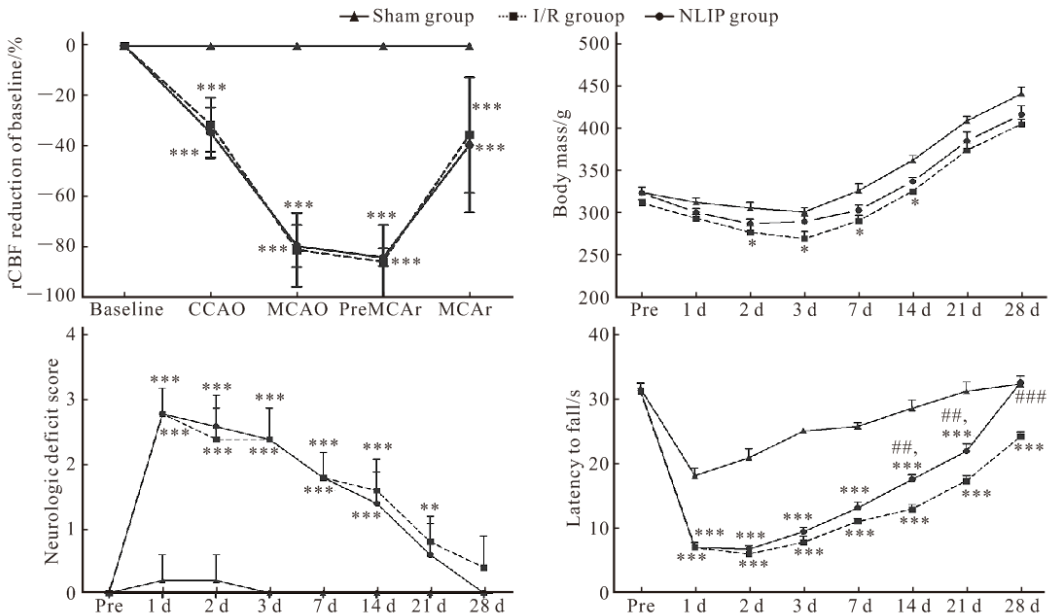


图 1 动物脑局部脑血流变化和行为学测试结果

Fig 1 Reduction of regional cerebral blood flow (rCBF) and results of behavioral tests

CCA0: Common carotid artery occlusion; MCA0: Middle cerebral artery occlusion; PreMCAr: Pre-middle cerebral artery release; MCAr: Middle cerebral artery release. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. sham group at the same time point; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, vs. I/R group at the same time point

低点,并呈现从术后 7 d 开始恢复并逐渐增加的趋势。I/R 组体质量在术后 2~14 d 与 sham 组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),而 NLIP 组体质量在任何时点与其余两组差异均无统计学意义。

NDS 评分发现,I/R 组和 NLIP 组大鼠术后表现出明显的右侧倾倒或右侧转圈等神经缺损症状,sham 组大鼠术后 3 d 后几乎无异常症状,NDS 评分与前两组术后 1~21 d 差异均有统计学意义($P < 0.001$)。I/R 组和 NLIP 组大鼠术后神经缺损症状在术后 1 d 达峰后逐渐减轻,到术后 28 d 时基本恢复至 sham 组水平($P > 0.05$)。I/R 组和 NLIP 组趋势一致,两组各时点差异无统计学意义。

悬吊测试中,3 组大鼠的悬吊时间均呈现术后先缩短后延长的趋势。Sham 组的悬吊时间于术后 1 d 最短,术后 2 d 即开始缓慢恢复,至术后 14 d 已恢复至术前水平($P > 0.05$)。I/R 组和 NLIP 组大鼠悬吊时间曲线于术后 1 d 斜率陡峭,急剧下降,术后 2 d 稍平缓,术后 3 d 开始缓慢爬升。NLIP 组在术后 14 d 及以后,悬吊时间均长于 I/R 组($P < 0.01$);术后 28 d 时,NLIP 组动物的悬吊时间恢复至 sham 组水平($P > 0.05$),而 I/R 组与 sham 组仍有差距($P < 0.001$)。

2.3 大鼠患侧脑皮质缺血半暗带 DCX 阳性细胞的表达

免疫组化染色结果(图 2)发现,在 sham 组大鼠脑皮质区域 DCX 阳性神经元细胞(轴突棕黄色)均匀分布,胞质圆而饱满,核居中。术后 3 d,缺血半暗带区血管间隙变宽,内皮细胞肿胀;缺血中心组织间隙变宽,DCX 阳性标记消失,炎性细胞大量浸润,细胞死亡后形成软化灶。I/R 组大鼠在脑缺血周边区可见少量 DCX 阳性细胞,无突起,NLIP 组 DCX 阳性细胞较多,少数有突起。术后 7 d 时,I/R 组大鼠脑软化灶增大,炎症浸润减轻,缺血周边 DCX 阳性神经元增多,出现突起;在 NLIP 组,DCX 阳性细胞较 I/R 组明显增多,突起变长增粗。术后 14 d 脑皮质缺血半暗带区可见明显增多的 DCX 阳性细胞,神经元胞体增生肥大,突起变多加粗,连接成网,有向缺血中心区迁移的趋势,术后 21 d 时达到高峰,以上病理变化在 NLIP 组更为明显。术后 28 d 时,脑皮质缺血半暗带边缘的 DCX 阳性神经元突起表现出明显的方向性,但神经元数目较术后 21 d 时有所减少。

2.4 大鼠患侧脑皮质缺血半暗带 GFAP 阳性细胞的表达

免疫组化染色结果显示(图 3),在 sham 组,GFAP 阳性细胞(胞质和突起呈棕黄色)主要分布于大鼠脑皮质区域 II~VI 层,阳性反应弱,细胞核较小,呈圆形或卵圆形。术后 3 d,病变中心 GFAP 阳

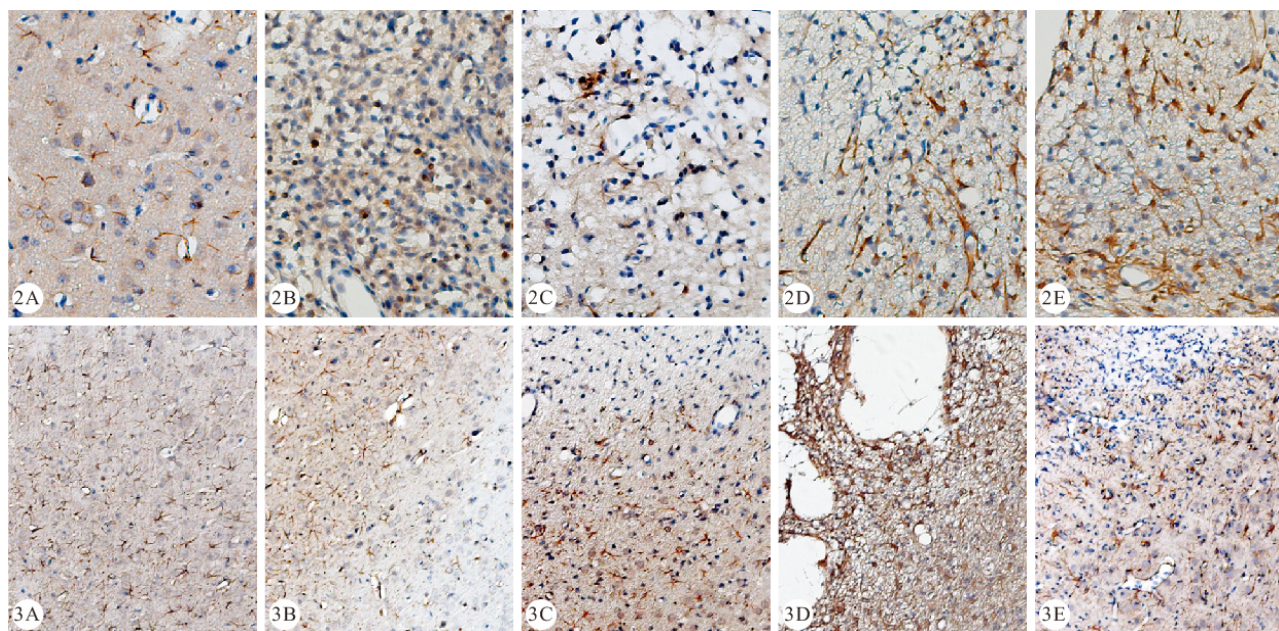


图 2 缺血后 DCX 阳性细胞在缺血皮质的表达。SP × 200

图 3 缺血后 GFAP 阳性细胞在缺血皮质的表达。SP × 200

Fig 2 DCX expression in ipsilateral ischemic cortex. SP × 200

Fig 3 GFAP expression in ipsilateral ischemic cortex. SP × 200

A: Sham group; B: I/R group, 3 d; C: NLIP group, 3 d; D: I/R group, 28 d; E: NLIP group, 28 d

性细胞明显减少,偶见有胞核固缩变小或突起断裂的阳性细胞,组织软化灶和增生的炎性细胞明显,边界清楚;在脑缺血区边缘,I/R 组 GFAP 的表达无明显变化,而在 NLIP 组有明显的增殖,且胞体肥大,突起增粗(反应性星形胶质细胞)。术后 7~28 d,在 I/R 组和 NLIP 组均可见 GFAP 阳性增强,GFAP 阳性细胞增多,伴随胞体肥大、突起增长,逐渐大量向缺血边缘迁移。术后 14 d 时缺血边缘可见散在的固缩胶质细胞,形成胶质瘢痕,显示有不同程度的修复;到术后 28 d 时,胶质细胞大量增殖,交互成网,组织间隙变窄。以上这些变化在 NLIP 组较 I/R 组更明显。

2.5 大鼠缺血脑皮质 MAP2 蛋白的表达

结果显示(图 4),缺血后,I/R 组和 NLIP 组大鼠脑皮质区 MAP2 表达水平轻微下降,随后恢复且高水平表达。与 sham 组比较,I/R 组大鼠脑皮质 MAP2 蛋白在术后 3 d 时表达下降,但差异无统计学意义,术后 7 d 时与 sham 组水平相当,术后 14 d 和术后 21 d 表达量增多并高于 sham 组(P 均 < 0.05),术后 28 d 时表达量高于 sham 组,但差异无统计学意义($P > 0.05$);NLIP 组 MAP2 表达水平在术后 7~28 d 高于 sham 组($P < 0.05$)。与 I/R 组比较,NLIP 组 MAP2 蛋白水平在术后 7 d 时增高($P < 0.05$)。

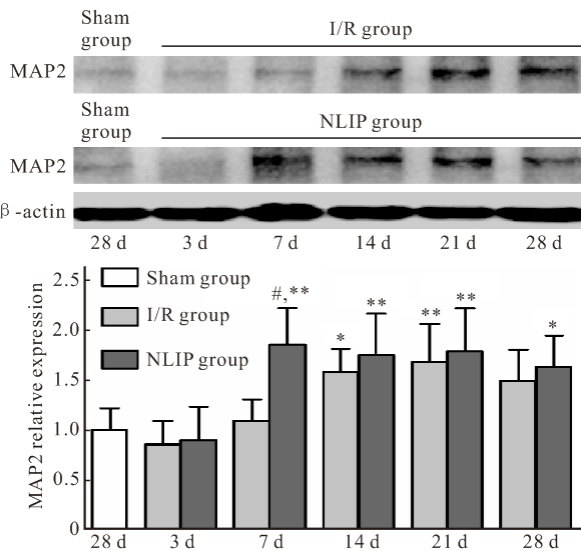


图 4 Western blot 检测缺血皮质 MAP2 蛋白的表达水平

Fig 4 The expression level of MAP2 in the ischemic cortex

* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, vs. sham group at the same time point; # $P < 0.001$, vs. I/R group at the same time point. M_r (MAP2) = 280×10^3 ; M_r (β -actin) = 42×10^3

3 讨论

本研究结果显示,缺血性脑损伤可引起炎性细

胞增多和缺血区神经细胞死亡,诱发自体神经细胞的增殖并迁移至缺血周围;NLIP 可促进神经细胞的增殖、分化与迁移,促进功能障碍的恢复。

本实验采用经典的 MCAO 模型来模拟临床上接受溶栓治疗或抗血小板聚集治疗的脑缺血患者。溶栓后血液突然再通可引起症状性出血,伴随氧自由基(ROS)的爆发、脂质过氧化、酸中毒、钙超载等系列反应,引起机体抗氧化系统的失衡,导致缺血/再灌注(I/R)损伤,其发生率高达 6.4%^[8]。且 ZHAO 等^[9]在大脑中动脉结扎合并阻断 CCA 的缺血模型中,发现部分再灌注较全灌注 2 d 后脑梗死体积小 10%,说明增加再灌注可提高 ROS 的水平,加重缺血损伤。传统的 IP 可抑制缺血再灌注后 ROS 的大量释放,提高 SOD 的活性和降低 MDA 的含量,恢复氧化抗氧化平衡,减轻 I/R 损伤^[10]。在远隔部位施加的 NLIP 可同样通过触发内源性因子及受体、细胞内信号转导途径,提高 SOD 活性和下调 MDA 的表达,使缺血的组织和细胞逐渐适应再灌注状态,维持内环境的平衡^[11],进一步改善神经缺损症状,结果与本研究结果一致。且远隔缺血后处理较传统缺血后处理能大为减少对缺血缺氧敏感器官的直接刺激作用,不仅缺血程度易把控,且降低了风险,操作方便,较传统的 IP 具有更广阔的应用前景。本研究中,脑缺血后的 I/R 组和 NLIP 组大鼠出现体质量下降、上肢肌力减弱和神经行为异常等神经缺损,sham 组大鼠术后 3 d 出现自发改善,这种现象在其他神经系统疾病同样可见(如脑外伤等)。在损伤、缺血等刺激下,神经系统会随环境发生轴突的再生和内源性神经的发生等适应性变化,可在一定程度上弥补和修复损伤。但是,这种由疾病本身所介导的自我修复不可能抵消由缺血所造成的严重后果。

本研究发现,NLIP 在脑缺血刺激的基础上,促进了大鼠脑皮质缺血边缘 DCX 阳性细胞和 GFAP 阳性细胞的增殖,加快了大鼠体质量的恢复,促进了上肢肌力的改善。另外,NLIP 可促进神经细胞胞体增大和轴突增长变粗,促进细胞向缺血中心迁移,并在缺血边缘交织成网。有研究表明,IP 或 NLIP 可明显减少缺血侧海马 CA1 区和缺血半暗带区神经元迟发性死亡,改善神经细胞的形态结构^[11]。以上结果说明,IP 可以挽救缺血半暗带的神经元,促进缺血区周围神经细胞的增殖和改善神经细胞的形态结构,促进新的神经网络的建立,以上这些神经系统对外源性刺激做出的适应性变化均有助于神经缺损的改善。

DCX 和 MAP2 蛋白分别表达于未成熟神经元和成熟神经元。本研究结果发现,I/R 组和 NLIP

组术后7 d缺血区周围持续增多的DCX阳性细胞在术后21 d达峰后开始减少,而I/R组MAP2蛋白表达量在14 d后表达增多,并持续到21 d,这种变化与DCX阳性细胞的变化相呼应,说明缺血刺激了缺血区周围未成熟神经元的增多,在缺血后期未成熟神经元(DCX阳性)逐渐向成熟神经元转化(MAP2阳性)^[12]。在NLIP组各时点DCX阳性反应和阳性细胞数较I/R组明显增强增多,说明了NLIP处理促进了缺血周围神经元的增多和表达。术后7 d MAP2蛋白的表达量在NLIP干预和非干预条件下差异较大,其余时点组间差异并不显著,因此NLIP干预对神经元轴突生长的作用还有待进一步研究。

在成年哺乳动物脑内,邻近侧脑室的脑室下区(SVZ)和海马齿状回的颗粒下层(SGZ)的神经干细胞具有增殖与分化的能力,而在大脑皮层分化了的神经元无再生能力。缺血损伤可刺激内源性神经干细胞增殖和分化,并诱导向缺血部位迁移^[3]。本研究中缺血边缘增多的未成熟神经元和星型胶质细胞,可能是由以上两个区域的神经干细胞分化迁移而来。星形胶质细胞在损伤因素的诱导下可发生有丝分裂^[13],故缺血周围增多的星形胶质细胞也可由皮质局部的胶质细胞增殖而来。在生理状态下,星型胶质细胞对神经元起支持、营养和保护作用。移植人类星型胶质细胞到免疫缺陷新生小鼠,可增强学习与记忆能力^[14]。本实验中,星形胶质细胞在缺血边缘逐渐增多并大量增殖,交织成网,形成胶质屏障,一方面起隔离作用,防止缺血中心早期炎症反应的扩散和炎症相关因子的浸润;另一方面,为缺血半暗带内的组织和细胞提供支持 and 营养^[15],以上研究均说明了星型胶质细胞在中枢神经系统中的重要地位。在NLIP干预下,星型胶质细胞增殖速度快,数量多,形态结构变化明显,从侧面反映出了NLIP对脑缺血的保护作用。

虽已有大量研究提出了IP对脑缺血的保护作用,但其作用机制仍在探索中,通过本实验,我们认为可能机制有:①短暂的缺血和再通使缺血组织和细胞逐渐适应随后的再灌注状态,减少ROS的释放,降低脑损伤程度。②在自我修复基础上,NLIP通过诱导特殊的体液因子或/和诱发神经冲动,刺激内源性神经细胞的增殖、分化和迁移,对损伤的神经元进行替代和补偿;③脑皮质缺血区周围自我增殖或神经干细胞分化迁移而来的星型胶质细胞对结构修复起至关重要的作用。

综上所述,NLIP可通过促进缺血区周围神经

元和星型胶质细胞的增多对局部脑缺血再灌注损伤产生保护作用。NLIP是通过何种途径作用于神经干细胞的增殖和迁移,潜在机制如何,以及星型胶质细胞在该过程中的作用还有待进一步的探讨。

参 考 文 献

- [1] MURRY CE, JENNINGS RB, REIMER KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*,1986,74(5):1124-1136.
- [2] REN C, YAN Z, WEI D, *et al.* Limb remote ischemic preconditioning protects against focal ischemia in rats. *Brain Res*,2009,1288: 88-94[2016-05-04]. <https://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.07.029>.
- [3] BARKHO BZ, ZHAO X. Adult neural stem cells: response to stroke injury and potential for therapeutic applications. *Curr Stem Cell Res Ther*,2011,6(4):327-338.
- [4] HARA Y. Brain plasticity and rehabilitation in stroke patients. *J Nippon Med Sch*,2015,82(1):4-13.
- [5] LIANG J, LUAN Y, LU B, *et al.* Protection of ischemic preconditioning against neuronal apoptosis induced by transient focal ischemia is associated with attenuation of NF-kappaB/p65 activation. *PLoS One*,2014,9(5):e96734[2016-03-07]. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0096734>.
- [6] WANG Q, ZHANG X, DING Q, *et al.* Limb remote preconditioning alleviates cerebral reperfusion injury through reactive oxygen species-mediated inhibition of delta protein kinase C in rats. *Anesth Analg*,2011,113(5):1180-1187.
- [7] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*,1989,20(1):84-91.
- [8] PUNDIK S, XU K, SUNDARAJAN S. Reperfusion brain injury: focus on cellular bioenergetics. *Neurology*,2012,79(13 Suppl 1):S44-S51[2016-04-12]. <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182695a14>.
- [9] 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 Neurochem*,2003,85(4):1026-1036.
- [10] FENG C, LUO T, QI L, *et al.* Ischemic preconditioning alleviates neuronal injury caused by relief of carotid stenosis in a rat model of cerebral hypoperfusion. *Int J Mol Sci*,2012,13(10):13338-13351.
- [11] PENG B, GTO QL, HE ZJ, *et al.* Remote ischemic preconditioning protects the brain from global cerebral ischemia/reperfusion injury by up-regulating endothelial nitric oxide synthase through the PI3K/Akt pathway. *Brain Res*,2012,1445:92-102[2016-03-09]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899312000947>. doi:10.1016/j.brainres.2012.01.033.
- [12] ITOH T, SATOU T, TAKEMORI K, *et al.* Neural stem cells and new neurons in the cerebral cortex of stroke-prone spontaneously hypertensive rats after stroke. *J Mol Neurosci*,2010,41(1):55-65.
- [13] SOFRONIEW MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist*,2005,11(5):400-407.
- [14] HAN X, CHEN M, WANG F, *et al.* Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell*,2013,12(3):342-353.
- [15] SOFRONIEW MV, VINTERS HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*,2010,119(1):7-35.

(2016-12-03 收稿,2017-03-25 修回)

编辑 吕 熙