

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.05.05

❖ 论著 ❖

异氟烷对兔脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究

蒋砾, 张新疆

(博尔塔拉蒙古自治州人民医院麻醉科, 新疆 博州 833400)

【摘要】目的: 通过研究异氟烷(ISO)预处理对兔脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制,为临床治疗脑缺血提供实验依据。**方法:** 取健康雄性兔45只随机分为5组:假手术组(Sham组)、缺血再灌注组(模型组)、1% ISO预处理10 min组(A组)、1.5% ISO预处理10 min组(B组)及2% ISO预处理10 min组(C组),每组各9只。线栓法制备脑缺血再灌注损伤模型,缺血2 h再灌注24 h后对其进行以下实验:(1)神经功能损害评估 Zeal Longa5 及 NSS 评分;(2)氯化三苯基四氮唑(TTC)染色检测脑梗死体积;(3)免疫组织化学检测测定脑内 NF-κBP56 蛋白的表达;(4)流式细胞术检测细胞凋亡数;(5)脑中脑皮质组织超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化。**结果:** 模型组 Longa5 评分、脑梗死体积、脑内 NF-κBP56 含量均大于其它组($P < 0.05$),C组各项指标低于其它两组,差异有统计学意义($P < 0.05$);A、B、C组脑中 SOD 活性均略低于 Sham 组,其中 C 组与 Sham 组最为接近,模型组脑中 SOD 活性明显低于 A、B、C 组与 Sham 组。Sham 组细胞凋亡比例低于 A、B、C 组及模型组($P < 0.05$)。**结论:** 异氟烷对兔脑缺血再灌注损伤有明显的保护作用,且在本研究中高剂量 ISO 作用效果最佳。

【关键词】 异氟烷;脑损伤;缺血再灌注;脑梗死;超氧化物歧化酶

【中图分类号】 R74 **【文献标志码】** A

Study on the protective effect and mechanism of isoflurane on cerebral ischemia-reperfusion injury in rabbits

JIANG Li, ZHANG Xin-jiang

(Department of Anesthesiology, People's Hospital of Bortala Mongolian Autonomous Prefecture, Bozhou 833400, Xinjiang, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the protective effect and mechanism of isoflurane (ISO) preconditioning on cerebral ischemia reperfusion injury in rabbits, and to provide experimental evidence for the clinical treatment of cerebral ischemia. **Methods:** 45 healthy male rabbits were randomly divided into 5 groups, 9 rabbits in each group. They were divided into Sham group, ischemia-reperfusion group (I/R), 1% ISO preconditioning group (group A), 1.5% ISO preconditioning group (group B), and 2% ISO preconditioning group (group C). Thread embolism method was used to establish cerebral ischemia-reperfusion injury model, and the following experiments were performed after 2h of ischemia and 24h of reperfusion: (1) Zeal Longa5 and NSS scores for neurological impairment assessment. (2) Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining test Cerebral infarction volume. (3) Immunohistochemical detection was used to determine the expression of NF-κB P56 protein in the brain. (4) Flow cytometry was used to detect the number of apoptosis. (5) The change of SOD activity in the middle cerebral cortex of the brain. **Results:** The Longa5 score, cerebral infarction area, and NF-κBP56 content in the brain of the group I/R were higher than those in other groups ($P < 0.05$). The indicators in the pretreatment group C were lower than those in the other two groups, and there were statistical differences between the groups ($P < 0.05$). SOD activity in the three pretreatment groups was slightly lower than that in the Sham group, of which group C was the closest to that in the Sham group, and SOD activity in the group I/R was significantly lower than that in the ISO group and Sham group. The proportion of apoptosis in Sham group was lower than that in ISO group and lower than that in I/R group, with statistical difference ($P < 0.05$). **Conclusion:** Isoflurane has a significant protective effect on cerebral ischemia-reperfusion injury in rabbits, and its efficacy increases with concentration in a certain concentration range.

【Key words】 Isoflurane; Brain injury; Ischemia-reperfusion; Cerebral infarction; Superoxide dismutase

缺血性脑血管疾病(ischemic cerebral vascular disease, ICVD)为临床多发病之一,其发展快、恢复慢、死亡率及致残率均较高且预后差,是危害中老年

人群生命安全的主要疾病之一^[1]。同时脑缺血再灌注损伤是脑中中风后溶栓治疗、失血性休克和心肺复苏后的必然过程,是影响患者治疗效果的重要

基金项目:博尔塔拉蒙古自治区科技计划项目(zdkj2019002)

作者简介:蒋砾(1979-),女,副主任医师。E-mail:jiangli19791220@163.com

通讯作者:张新疆。E-mail:jiangli19791220@163.com

病理过程之一。相关研究^[2-4]表明,使用麻醉剂预处理可降低缺血性损伤,其作用机制包括:氧自由基损伤、炎症反应、腺甘受体的活化、蛋白激酶 C 的活化以及细胞的凋亡与抗凋亡机制。

本研究通过建立兔病灶性脑缺血再灌注模型,使用不同浓度异氟烷(isoflurane, ISO)对模型进行麻醉预处理,并分别对各组动物进行神经功能评分、脑梗死体积的测定、NF- κ B P56 表达和细胞凋亡检测、观察脑皮质中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的浓度变化,探讨不同浓度下的异氟烷预处理对兔脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

选取体质量在 2~2.5 kg 的健康雄性兔 45 只,造模手术前适应性喂养 7 d。手术前 12 h 禁食禁水以防呛咳。将实验兔数表法随机分为假手术组(Sham 组)、缺血再灌注组(模型组)、1% ISO 预处理 10 min 组(A 组)、1.5% ISO 预处理 10 min 组(B 组)、2% ISO 预处理 10 min 组(C 组),共 5 个实验组,每组各 9 只。

1.2 方法

1.2.1 动物中动脉栓塞模型(MCAO)制备 10% 水合氯醛 2.5 mL/kg 腹腔麻醉兔,取前颈部备皮,消毒处理后取颈前正中位置作 2~3 cm 的纵行切口,分离皮下组织,显露右侧颈动脉鞘,仔细分离暴露右侧颈总动脉(CCA)、右侧颈外动脉(ECA)以及颈内动脉(ICA),在距离以上动脉分叉处约 5 mm 处结扎 ECA 后剪断,使其与 ICA 轴向一致,于 ECA 根部用手术线以活结结扎,在 CCA 近心端和 ICA 远心端处设置动脉夹阻断血流,于 ECA 近端插入线栓,当线栓插入遇到轻微阻力时停止插线,移除 CCA 处动脉夹,兔右侧大脑中动脉血流成功阻闭,导致脑缺血,缺血 2 h 后再灌注 24 h。

1.2.2 分组处理方式 Sham 组:除不进行颈动脉栓塞其余操作与 MCAO 造模一致;模型组:MCAO 模型;A、B、C 三组:在建立 MCAO 模型前分别持续吸入 1%、1.5% 和 2% 浓度的 ISO 10 min,然后建立 MCAO 模型。

1.3 观察指标

1.3.1 神经功能评分 再灌注 24 h 后对所有实验动物进行 Longa5 与 NSS 评分标准进行评分。Longa5 评分标准^[5]:0 分为无神经损伤体征;1 分为不能完全伸直左侧前爪;2 分为向左侧转圈;3 分为向左侧倾倒;4 分为无自主活动伴意识障碍。神经功

能损伤评分(NSS 评分)包括运动测试、感觉测试、平衡测试、反射消失和不正常运动等 5 个方面,得分越高表明神经功能损伤程度越高。

1.3.2 氯化三苯基四氮唑(TTC)染色检测脑梗死体积 神经功能损害评估后每组随机抽取 2 只兔麻醉成功后迅速断头取脑,然后制作脑组织切片,将切片浸入 2% 的四氮唑红(TTC)溶液中孵育 20 min,完全显色后 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h 后应用 Image J 图像处理软件测量脑梗死体积,并计算脑梗死体积百分比,其中染红色部分为存活组织,白色或淡粉色区域为坏死组织。

1.3.3 免疫组织化学检测测定脑内 NF- κ B P56 蛋白的表达 制作脑组织切片,脱蜡、脱水,PBS 漂洗,4℃ 孵育过夜,第 2 天室温孵育 2 h 后 PBS 漂洗,DAB 显色,脱水透明封片。观察并记录 NF- κ B/p65 阳性细胞(棕黄色)占整个视野的比例。

1.3.4 ELISA(酶联免疫吸附测定)检测脑皮质中 SOD 含量 麻醉后断头取脑,收集脑皮质组织,加入 PBS,置于冰上剪碎后加入裂解液研磨成浆,3 000 rpm 离心 20 min,取上清液,用 ELISA 试剂盒测定组织中 SOD 的含量。

1.3.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 再灌注后各组随机取兔 2 只,麻醉后断头取脑,取出脑组织放置于装有 PBS 的培养皿中清洗,另取新培养皿剪碎脑组织至 1 mm³ 的组织块,胰酶消化后,吸取上清液置于新的离心管中,使用 FBS 中和,37℃ 保存。剩余组织块二次胰酶消化后取上清液,FBS 中和,将两次消化细胞混匀,1 000 rpm 离心 5 min,PBS 重悬,采用细胞凋亡试剂盒上机做流式检测凋亡率。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件分析数据。组间均数比较 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能损害评估(Zea-Longa5 及 NSS 评分)

Longa5 评分和 NSS 评分比较结果显示:模型组 > A 组 > B 组 > C 组 > Sham 组,且各组间两两比较,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 神经功能损害评估 Longa5 及 NSS 评分结果($\bar{x} \pm s$,分)

组别	Longa5 评分	NSS 评分
Sham 组($n=9$)	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.10
模型组($n=9$)	2.67 ± 0.82*	8.92 ± 1.29*
A 组($n=9$)	1.96 ± 0.28**	5.51 ± 1.01**
B 组($n=9$)	1.51 ± 0.86** Δ	5.14 ± 0.32** Δ
C 组($n=9$)	1.15 ± 0.76** Δ \blacktriangle	4.52 ± 0.21** Δ \blacktriangle

* $P < 0.05$,与 Sham 组相比; ** $P < 0.05$,与模型组相比; $\Delta P < 0.05$,与 A 组相比; $\blacktriangle P < 0.05$,与 B 组相比。

2.2 脑梗死体积检测

脑梗死体积比较结果显示:模型组 > A 组 > B 组 > C 组 > Sham 组,且各组间两两比较,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 脑梗死体积对照表($\bar{x} \pm s$)

组别	脑梗死体积(%)
sham 组($n=4$)	0
模型组($n=4$)	37.0 ± 6.6 *
A 组($n=4$)	21.2 ± 3.3 *#
B 组($n=4$)	12.5 ± 3.1 *#△
C 组($n=4$)	8.8 ± 2.6 *#△▲

* $P < 0.05$,与 Sham 组相比;# $P < 0.05$,与模型组相比;△ $P < 0.05$,与 A 组相比;▲ $P < 0.05$,与 B 组相比。

2.3 免疫组织化学检测测定脑内 NF-κBP56 蛋白的表达

与 Sham 组相比,其余四组 NF-κB/p65 阳性细胞百分比显著升高($P < 0.01$);C 组 NF-κB/p65 表达的阳性率较模型组和 A、B 组显著降低($P < 0.05$),而 A、B、C 组两两比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 脑组织切片中 NF-κB/p65 表达阳性率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	NF-κB p65 阳性率(%)
Sham 组($n=5$)	10.68 ± 7.24
模型组($n=5$)	70.29 ± 11.18 *
A 组($n=5$)	63.46 ± 10.57 *
B 组($n=5$)	60.68 ± 10.24 *
C 组($n=5$)	55.32 ± 8.55 *#

* $P < 0.05$,与 Sham 组相比;# $P < 0.05$,与模型组相比。

2.4 脑皮质组织中 SOD 活性的变化

与 Sham 组相比,其余四组脑皮质组织中 SOD 活性显著降低($P < 0.05$);与模型组相比,B、C 组 SOD 活性均显著升高($P < 0.05$),而 A 组与其相比差异不具有统计学意义($P > 0.05$);C 组 SOD 活性显著高于 A 组和 B 组($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 SOD 活性的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD 活性(U/mL)
Sham 组($n=5$)	134.26 ± 6.22
模型组($n=5$)	83.93 ± 6.68 *
A 组($n=5$)	88.43 ± 5.27 *
B 组($n=5$)	95.62 ± 10.68 *#
C 组($n=5$)	112.34 ± 9.22 *#△▲

* $P < 0.05$,与 Sham 组相比;# $P < 0.05$,与模型组相比;△ $P < 0.05$,与 A 组相比;▲ $P < 0.05$,与 B 组相比。

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

与 Sham 组相比,其余四组细胞凋亡率明显增高($P < 0.05$);与 I/R 组相比,ISO 预处理 B、C 组脑细胞凋亡显著降低($P < 0.05$),而 A 组无显著差异

($P > 0.05$);与 ISO 预处理 A 组相比,C 组脑细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$),而 B 组与其相比相比差异不具有统计学意义,且 B、C 组相比差异也不具有统计学意义($P > 0.05$)。见表 5。

表 5 脑细胞凋亡率($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率(%)
Sham 组($n=5$)	3.61 ± 0.74
模型组($n=5$)	53.38 ± 6.92 *
A 组($n=5$)	46.77 ± 5.51 *
B 组($n=5$)	40.52 ± 5.63 *#
C 组($n=5$)	36.38 ± 4.37 *#△

* $P < 0.05$,与 Sham 组相比;# $P < 0.05$,与模型组相比;△ $P < 0.05$,与 A 组相比。

3 讨论

缺血性脑血管病是老年人神经系统的常见疾病,且具有较高的致死率和致残率,目前临床上常采用药物溶栓治疗,但其在提高治疗有效率和患者生存率方面作用有限。由于脑缺血再灌注损伤机制复杂,因此临床上仍未提出新的有效治疗手段,这也是该疾病相关研究内容的重点。大脑中动脉是缺血性脑血管疾病发病的关键部位,脑梗死患者大脑组织中该部位梗死率达 80% 以上,其也是急性中枢神经系统功能紊乱的重要部位^[6]。发生缺血性脑血管病损伤的原因主要在于:患者脑部缺血持续一段时间后,会恢复供血,但此时大脑功能并未恢复,因而恢复供血反而会对脑组织造成二次损伤,加重脑组织的病理程度。脑缺血再灌注发生时,若大脑缺血时间较短,供血恢复后能减轻缺血所致神经元损伤;而一旦大脑缺血时间过长,发生再灌注会加重脑缺血带来的损伤。另外,脑缺血再灌注损伤所引起的脑缺氧可导致活性氧和自由基的积累,引发炎症反应和代谢紊乱,从而促进脑细胞凋亡^[7]。有研究^[8]表明,脑梗死体积与缺血时间具有密切关系,表现为前者随后者增加而增大。ISO 是常用麻醉剂,具有一定的镇痛和肌松作用,目前暂无使用禁忌,适用于各类术中麻醉,但相关研究^[9-10]表明其可能通过引发神经炎症、破坏胆碱功能和突触可塑性等途径导致老年患者术后认知功能障碍。相关研究^[11]表明,七氟烷和 ISO 可促进脑缺血再灌注大鼠神经功能恢复,对其损伤具有保护作用。本研究结果表明,经 ISO 预处理可显著减小脑缺血再灌注模型兔脑梗死体积,表明其可降低脑缺血再灌注损伤,推测其在临床应用方面对脑缺血再灌注损伤具有一定保护作用。

相关研究^[12]表明: NF- κ B 信号通路可通过介导炎症反应来加重缺血再灌注所导致的脑损伤。本研究表明, 脑缺血再灌注模型组动物脑组织中 NF- κ B/p65 阳性细胞的表达率较假手术组显著增高, 说明 NF- κ B p65 与缺血再灌注损伤过程密切相关, 脑缺血损伤的发生伴随着 NF- κ B p65 的活化。而经 ISO 预处理后, 实验兔神经功能评分显著降低, 表明其脑缺血损伤程度降低; 另外, ISO 预处理三组 MCAO 模型兔脑组织 NF- κ B/p65 表达率较 Sham 组显著增加, 且预处理三组中; B 组均显著高于 A 组及 C 组。以上结果表明, MCAO 手术前经 ISO 预处理可通过下调 NF- κ B 信号通路相关因子的表达, 发挥对实验兔脑缺血再灌注损伤的保护作用, 且经对比表明 2% ISO 10min 预处理效果最为明显。

脑缺血再灌注损伤机制目前仍无准确定论, 还需进一步探讨, 但氧自由基损伤学说是其相关研究中占有重要地位的学说之一, 其原因在于 SOD 可通过歧化作用清除自由基保护周围细胞^[13-14], 因此 SOD 的活性能够反映机体抗氧化能力, 从而可将该指标检测结果作为脑缺血再灌注损伤评判标准之一。本研究表明, ISO 预处理在一定浓度范围内能显著提高脑组织中 SOD 的活性, 有效清除氧自由基, 减少脑细胞凋亡, 这可能也是其发挥对脑缺血再灌注损伤保护作用的机制之一。另外, 本研究不足之处在于未从分子角度对 ISO 的作用机制进行探讨, 这将在后续研究中进行探讨。综上所述, ISO 对兔脑缺血再灌注损伤有明显的保护作用, 且在一定浓度范围内其疗效随浓度的增加而增强。

参考文献

[1] Puyal J, Ginet V, Clarke PG. Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: a challenge for neuroprotection [J]. *Prog Neurobiol*, 2013, 105 (4): 24-48.

[2] Wang X, Zhang M, Yang SD, et al. Pre-ischemic treadmill training

alleviates brain damage via GLT-1-mediated signal pathway after ischemic stroke in rats [J]. *Neuroscience*, 2014, 274 (10): 393-402.

[3] 陈燕婷. PSD-95 抑制剂、PARP-1 抑制剂和 OCT4b-190 对缺血性脑损伤的保护作用及其机制研究 [D]. 南京: 南京大学, 2014.

[4] 牛佳媛. 吸入麻醉药对新生儿缺血缺氧性脑损伤保护作用的研究进展 [J]. *国际儿科学杂志*, 2018, 45 (9): 671-674.

[5] Zhang L, Zhang ZG, Zhang RL, et al. Effects of a Selective CD11b/CD18 Antagonist and Recombinant Human Tissue Plasminogen Activator Treatment Alone and in Combination in a Rat Embolic Model of Stroke [J]. *Stroke*, 2003, 34 (7): 1790-1795.

[6] Park JH, Cho JH, Ahn JH, et al. Neuronal loss and gliosis in the rat striatum subjected to 15 and 30 minutes of middle cerebral artery occlusion [J]. *Metabolic Brain Disease*, 2018, 33 (3): 775-784.

[7] Lei JR, Tu XK, Wang Y, et al. Resveratrol downregulates the TLR4 signaling pathway to reduce brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia [J]. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 2019, 17 (4): 3215-3221.

[8] 孙巨, 温红梅, 李超, 等. 不同缺血再灌注时间对脑梗死大鼠运动及认知功能的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2017, 32 (5): 495-500.

[9] 陈耀雄, 黄忠阳, 高兰娟, 等. 异氟烷麻醉对老年患者术后认知功能影响的研究 [J]. *临床医药文献电子杂志*, 2016, 3 (25): 4955-4956.

[10] 孙龙, 段宏伟. 异氟烷对老年患者术后认知功能障碍相关性的研究进展 [J]. *浙江临床医学*, 2016, 18 (9): 1762-1764.

[11] 王海莲, 周守静. 七氟烷和异氟烷对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤的保护作用 [J]. *上海医学*, 2008, 31 (8): 592-594.

[12] Shi CX, Ding YB, Fyj J, et al. Effects of sevoflurane post-conditioning in cerebral ischemia-reperfusion injury via TLR4/NF- κ B pathway in rats [J]. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 2018, 22 (6): 1770.

[13] Lartigue A, Buriat B, Coutard B, et al. The megavirus chilensis Cu, Zn-superoxide dismutase; the first viral structure of a typical cellular copper chaperone-independent hyperstable dimeric enzyme [J]. *Virology*, 2015, 89 (1): 824-832.

[14] 杨毅猛, 薛荣亮, 孟丽华, 等. 蛋白质转导 4 型-铜锌超氧化物歧化酶融合蛋白对大鼠脑缺血/再灌注损伤保护作用的研究 [J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2019, 40 (5): 426-431.

(收稿日期: 2020-02-28)

学术编辑: 杨小霖)