

不同剂量阿托伐他汀对急性脑缺血 / 再灌注损伤大鼠血管内皮功能的影响及其与自噬相关信号通路 Ca^{2+} /AMPK/mTOR 的关系研究

李玉竹, 邹梅, 于周

【摘要】 背景 阿托伐他汀因具有降脂、改善血管内皮功能等作用而常用于预防急性心血管事件及延缓动脉粥样硬化进展, 而血管内皮功能与自噬密切相关, 因此探讨阿托伐他汀与自噬的关系可能解释其改善血管内皮功能的机制。目的 探讨不同剂量阿托伐他汀对急性脑缺血 / 再灌注损伤大鼠血管内皮功能的影响, 并分析其与自噬相关信号通路 Ca^{2+} /AMPK/mTOR 的关系。方法 本实验于 2017 年 6—12 月完成。采用随机数字表法将 75 只 SPF 级 Wistar 雄性大鼠分为假手术组 (A 组)、模型制备组 (B 组)、阿托伐他汀低剂量组 (C 组)、阿托伐他汀中剂量组 (D 组) 及阿托伐他汀高剂量组 (E 组), 每组 15 只。B、C、D、E 组大鼠采用改良 Zea-Longa 线栓法制备急性脑缺血 / 再灌注损伤模型。模型制备前 2 周, C、D、E 组大鼠分别给予阿托伐他汀 5、10、20 mg/kg 混悬液灌胃, A 组和 B 组大鼠给予等剂量 0.9% 氯化钠溶液灌胃, 均 1 次 /d。比较 5 组大鼠再灌注 2、6、24、48、72 h 神经功能缺损评分、梗死体积 / 大脑总体积, 再灌注 72 h 神经元凋亡率, 再灌注 2、24、72 h 脑组织血管内皮生长因子 (VEGF) 相对表达量及一氧化氮合酶 (NOS)、一氧化氮 (NO) 含量, 再灌注 72 h 脑组织 LC3- II、Beclin-1、腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 及雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 蛋白相对表达量。结果 (1) 再灌注 2、6、24、48、72 h, A 组大鼠神经功能缺损评分均为 0, D 组和 E 组大鼠神经功能缺损评分低于 B 组、C 组 ($P < 0.05$)。 (2) 再灌注 2、6、24、48、72 h, A 组大鼠梗死体积 / 大脑总体积均为 0, D 组和 E 组大鼠梗死体积 / 大脑总体积低于 B 组、C 组 ($P < 0.05$)。 (3) 再灌注 72 h, B、C、D、E 组大鼠神经元凋亡率高于 A 组, D 组和 E 组大鼠神经元凋亡率低于 B 组、C 组 ($P < 0.05$)。 (4) 再灌注 2 h, D 组和 E 组大鼠脑组织 VEGF 相对表达量高于 B 组、C 组, B 组大鼠脑组织 NO、NOS 含量高于 A 组 ($P < 0.05$); 再灌注 24、72 h, D 组和 E 组大鼠脑组织 VEGF 相对表达量高于 B 组、C 组, B、C、D、E 组大鼠脑组织 NO、NOS 含量高于 A 组, D 组和 E 组大鼠脑组织 NO、NOS 含量低于 B 组、C 组 ($P < 0.05$)。 (5) 再灌注 72 h, B、C、D、E 组大鼠脑组织 LC3- II、Beclin-1、AMPK、mTOR 蛋白相对表达量高于 A 组, D 组和 E 组大鼠脑组织 LC3- II、Beclin-1、AMPK、mTOR 蛋白相对表达量低于 B 组、C 组 ($P < 0.05$)。结论 阿托伐他汀 10、20 mg/kg 灌胃可有效减轻急性脑缺血 / 再灌注损伤大鼠神经功能损伤, 减少神经元凋亡, 改善血管内皮功能, 其机制可能与调控自噬相关信号通路 Ca^{2+} /AMPK/mTOR 有关。

【关键词】 脑血管损伤; 缺血再灌注损伤; 阿托伐他汀; 血管内皮; 自噬; Ca^{2+} /AMPK/mTOR 信号通路

【中图分类号】 R 743 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2019.05.011

李玉竹, 邹梅, 于周. 不同剂量阿托伐他汀对急性脑缺血 / 再灌注损伤大鼠血管内皮功能的影响及其与自噬相关信号通路 Ca^{2+} /AMPK/mTOR 的关系研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2019, 27 (5): 50-56. [www.syxnf.net]

LI Y Z, ZOU M, YU Z. Impact of different doses of atorvastatin on vascular endothelial function and its relation with autophagy-related Ca^{2+} /AMPK/mTOR signaling pathway in rats with acute cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2019, 27 (5): 50-56.

Impact of Different Doses of Atorvastatin on Vascular Endothelial Function and Its Relation with Autophagy-related Ca^{2+} /AMPK/mTOR Signaling Pathway in Rats with Acute Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury LI Yuzhu, ZOU Mei, YU Zhou

Department of Neurology, the First People's Hospital of Liangshan Yi Autonomous Prefecture, Xichang 615000, China

Corresponding author: YU Zhou, E-mail: xufab123@163.com

【Abstract】 **Background** Atorvastatin is often used to prevent acute cardiovascular events and delay the progression

基金项目: 四川省科技计划项目 (2014FZ0066)

615000 四川省凉山彝族自治州西昌市, 凉山彝族自治州第一人民医院神经内科

通信作者: 于周, E-mail: xufab123@163.com

of atherosclerosis due to its lipid-lowering effect and improvement of vascular endothelial function, whereas vascular endothelial function is closely related to autophagy, so investigation on the relationship between atorvastatin and autophagy may explain the possible mechanism of improving vascular endothelial function by atorvastatin. **Objective** To investigate the impact of different doses of atorvastatin on vascular endothelial function, to analyze its relation with autophagy-related Ca^{2+} /AMPK/mTOR signaling pathway in rats with acute cerebral ischemia/reperfusion injury. **Methods** This experiment was conducted from June to December 2017. A total of 75 SPF male Wistar rats were randomly and equally divided into five groups: A group (received sham operation), B group (prepare for the model only), C group (received low-dose atorvastatin), D group (received medium-dose atorvastatin) and E group (received high-dose atorvastatin). Rats in B group, C group, D group and E group were prepared for models of acute cerebral ischemia/reperfusion injury by modified Zea-Longa suture-occluded method. Rats in C group, D group and E group received gavage of atorvastatin suspension of 5, 10 and 20 mg/kg (once per day), 2 weeks before model establishment, respectively while rats in A group and B group received gavage of equal volume of 0.9% sodium chloride solution (once per day). Neurological deficit score and infarction volume/total brain volume 2, 6, 24, 48, 72 hours after reperfusion, neuronal apoptosis rate 72 hours after reperfusion, relative expression quantity of VEGF, NOS and NO in brain tissue 2, 24, 72 hours after reperfusion, relative protein expression quantity of LC3-II, Beclin-1, AMPK and mTOR in brain tissue 72 hours after reperfusion were compared in the five groups. **Results** (1) After 2, 6, 24, 48, 72 hours of reperfusion, neurological deficit score in A group was 0, respectively, while neurological deficit score in D group and E group was statistically significantly lower than that in B group and C group, respectively ($P < 0.05$). (2) After 2, 6, 24, 48, 72 hours of reperfusion, infarction volume/total brain volume in A group was 0, respectively, while infarction volume/total brain volume in D group and E group was statistically significantly lower than that in B group and C group, respectively ($P < 0.05$). (3) After 72 hours of reperfusion, neuronal apoptosis rate in B group, C group, D group and E group was statistically significantly higher than that in A group, respectively, meanwhile neuronal apoptosis rate in D group and E group was statistically significantly lower than that in B group and C group, respectively ($P < 0.05$). (4) After 2 hours of reperfusion, relative expression quantity of VEGF in brain tissue in D group and E group was statistically significantly higher than that in B group and C group, respectively, while NOS and NO in brain tissue in B group were statistically significantly higher than those in A group ($P < 0.05$); after 24 and 72 hours of reperfusion, relative expression quantity of VEGF in brain tissue in D group and E group was statistically significantly higher than that in B group and C group, respectively, NOS and NO in brain tissue in B group, C group, D group and E group were statistically significantly higher than those in A group, NOS and NO in brain tissue in D group and E group were statistically significantly lower than those in B group and C group ($P < 0.05$). (5) After 72 hours of reperfusion, relative protein expression quantity of LC3-II, Beclin-1, AMPK and mTOR in brain tissue in B group, C group, D group and E group was statistically significantly higher than that in A group, respectively, while relative protein expression quantity of LC3-II, Beclin-1, AMPK and mTOR in brain tissue in D group and E group was statistically significantly lower than that in B group and C group, respectively ($P < 0.05$). **Conclusion** Gavage of atorvastatin suspension of 10 or 20 mg/kg can effectively reduce the neurological impairment and neuronal apoptosis, and improve the vascular endothelial function in rats with acute cerebral ischemia/reperfusion injury, the mechanism may be related to the regulation of autophagy-related Ca^{2+} /AMPK/mTOR signaling pathway.

【Key words】 Cerebrovascular trauma; Ischemia-reperfusion injury; Atorvastatin; Vascular endothelium; Autophagy; Ca^{2+} /AMPK/mTOR signaling pathway

过去20年,全球年龄标化脑卒中病死率有所下降,但脑卒中新增患者数量及其全球总负担巨大,且仍在增加。据统计,脑卒中居我国城市和农村居民致残和致死原因第一位,其中缺血性脑卒中约占70%^[1]。缺血性脑卒中是由动脉粥样硬化引起颅内血管闭塞或狭窄而导致脑供血不足,进而引发的脑组织坏死,因此其治疗重点为尽快恢复脑组织血供并抑制脑缺血/再灌注损伤^[1-2]。既往研究表明,脑缺血灶中细胞大量死亡的同时可形成新生血管、诱导血管内皮细胞增殖,进而改善脑组织血供,恢复脑功能^[3]。血管内皮功能与自噬

密切相关,但自噬是柄“双刃剑”,正常情况下其可保护机体内皮细胞结构及功能完整,过度激活后又会使脑缺血/再灌注损伤加重。

阿托伐他汀是一种新型人工合成降脂药,可有效降低血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)及总胆固醇水平,阻止血栓形成及改善血管内皮功能,在预防急性心血管事件及延缓动脉粥样硬化进展方面具有重要作用^[4-5],但其与自噬的关系研究报道较少。本研究旨在探讨不同剂量阿托伐他汀对急性脑缺血/再灌注损伤大鼠血管内皮功能的影响,并分析其与自噬相关信号通路 Ca^{2+} /

AMPK/mTOR 的关系, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 本实验于 2017 年 6—12 月完成。选取 75 只 SPF 级 Wistar 雄性大鼠, 6 周龄, 体质量 190~210 g, 平均体质量 (201.4 ± 4.1) g, 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格许可证号: SCXK(京)2018-23。大鼠分笼饲养, 每笼 5 只, 室温维持在 22~26 °C, 相对湿度为 55%~65%, 昼夜循环, 保持 12 h 光照、12 h 黑暗, 灌胃、添加饲料及换水等均有专人负责。常规饲养 1 周后开始实验。

1.2 主要药物、试剂及仪器

1.2.1 主要药物 阿托伐他汀钙片(大连辉瑞制药有限公司生产, 生产批号: L29154); 自制阿托伐他汀混悬液: 将阿托伐他汀钙片研磨为粉, 阿托伐他汀钙片与 0.9% 氯化钠溶液以 1 mg:2 ml 比例混合。

1.2.2 主要试剂 一氧化氮合酶(NOS)、一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所生产), DAB 显色剂、SP 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司生产), 兔抗鼠血管内皮生长因子(VEGF)单克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司生产), LC3-II、Beclin-1、腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)多克隆抗体(美国 Proteintech 公司生产)。

1.2.3 主要仪器 病理组织漂烘仪(常州市中威电子仪器有限公司生产, 型号: PHY-III), 转轮式切片机(德国莱卡公司生产, 型号: 莱卡-2016), 包埋机(常州市中威电子仪器有限公司生产, 型号: BMJ-III), 全自动封闭式组织脱水机(常州市中威电子仪器有限公司生产, 型号: TSJ-II), 电热恒温鼓风干燥箱(美国 KIMBLE 公司生产, 型号: DHG-9023A), 数字显示隔水式电热恒温培养箱(美国 KIMBLE 公司生产, 型号: PYX-DHS), 漩涡混合器(美国 KIMBLE 公司生产, 型号: XW-80A), 离心机(美国 KIMBLE 公司生产, 型号: TGL-168)。

1.3 分组及实验方法 采用随机数字表法将所有大鼠分为假手术组(A组)、模型制备组(B组)、阿托伐他汀低剂量组(C组)、阿托伐他汀中剂量组(D组)及阿托伐他汀高剂量组(E组), 每组 15 只。B、C、D、E 组大鼠制备急性脑缺血/再灌注损伤模型。模型制备前 2 周, C、D、E 组大鼠分别给予阿托伐他汀 5、10、20 mg/kg 混悬液灌胃, A 组和 B 组大鼠给予等剂量 0.9% 氯化钠溶液灌胃, 均 1 次/d。

1.4 急性脑缺血/再灌注损伤模型制备 采用改良 Zea-Longa 线栓法^[6]制备急性脑缺血/再灌注损伤模型, 具体如下: 腹腔注射 2.4% 水合氯醛 0.8 ml/100 g 麻醉大鼠, 麻醉满意后固定大鼠背部, 常规消毒后于颈部正中

作一纵向切口, 依次暴露右侧翼腭动脉、颈总动脉、颈内动脉及颈外动脉, 将颈总动脉近心端与颈外动脉根部结扎, 在颈内动脉起始部位打活结。动脉夹夹于颈内动脉近颅端, 采用眼科剪在颈总动脉结扎位置远端剪一斜口, 插入制备好的线栓, 感觉到阻力后停止, 备线结扎后固定线栓, 缝合切口、消毒。以大鼠苏醒后出现右侧 Horner 征(眼球内陷, 眼裂变小)及左侧以前肢为重的偏瘫为模型制备成功。A 组大鼠于颈部正中作一纵向切口, 依次暴露右侧翼腭动脉、颈总动脉、颈内动脉及颈外动脉。

1.5 观察指标

1.5.1 神经功能缺损评分 再灌注 2、6、24、48、72 h 时分别从 5 组随机选取 3 只大鼠, 采用 Zea-Longa 评分法评估大鼠神经功能缺损评分, 其中无神经功能缺损症状计 0 分, 无法伸展对侧前爪计 1 分, 行走时向偏瘫一侧转圈计 2 分, 行走时向偏瘫一侧倾斜计 3 分, 意识丧失、无法自发行走计 4 分^[7]。

1.5.2 脑梗死体积 神经功能缺损评分结束后腹腔注射 2.4% 水合氯醛 0.8 ml/100 g 麻醉大鼠, 断颈处死, 取脑组织速冻 10 min, 在视神经交叉处向前作冠状切片, 共 4 个脑片, 厚度 2 mm, 放置在 2% 的 TTC 磷酸盐缓冲液中孵育 30 min, 采用 10% 福尔马林固定, 其中梗死组织无着色、正常组织着深红色, 数码相机正反面拍照, 采用病理图像分析仪检测每片总面积与梗死面积, 梗死体积/大脑总体积 = (各片正反面梗死面积总和/2 × 片厚) / (各片正反面总面积总和/2 × 片厚) × 100%。

1.5.3 脑组织病理形态 选取脑组织, 缓冲液冲洗, 10% 甲醛固定后行酒精梯度脱水、透明, 石蜡包埋后切片, 厚度为 4 mm, 常规行 HE 染色, 光镜下观察 5 组大鼠脑组织病理形态。

1.5.4 神经元凋亡率 采用 TUNEL 法检测 5 组大鼠再灌注 72 h 神经元凋亡率, 具体如下: 脑组织切片经梯度酒精脱蜡, 再滴加不含 DNase 酶的蛋白酶 K 溶液 20 mg/ml, 37 °C 冰箱内放置 20 min, 采用 PBS 洗涤; 加入新鲜配制的 3% 过氧化氢(H₂O₂)溶液于室温下孵育 10 min, 采用 PBS 洗涤; 每个样品内滴加新鲜配制的生物素标记液 50 ml, 放置在暗盒内维持切片湿润, 37 °C 环境下孵育 60 min, 采用 PBS 洗涤; 配制 DAB 显色液和 Streptavidin-HRP 工作液, 每个样品内滴加 50 ml, 放置在暗盒内维持切片湿润, 孵育 30 min, 采用 PBS 洗涤; 常规梯度酒精脱水后透明, 封片。光镜下观察切片中棕褐色为凋亡神经元, 高倍镜下每张切片计数 8 个不同视野并取平均值。

1.5.5 脑组织 VEGF 表达情况 采用免疫组化法检测 5 组大鼠再灌注 2、24、72 h 脑组织 VEGF 表达情况, 具体如下: 石蜡切片脱蜡后将内源性过氧化物酶灭活, 热

修复暴露抗原位点,置于孵育盒内,使用PBS溶液冲洗3次,3 min/次,加入山羊血清,孵育10 min,再加入一抗兔抗鼠VEGF单克隆抗体,4℃过夜。PBS溶液冲洗3次,5 min/次,滴入二抗在室温下孵育10 min, PBS溶液冲洗3次,3 min/次,滴入辣根酶标记的链酶卵白素,采用DAB显色剂显色,中性树胶封片。图像中棕黄色细胞为阳性细胞,采用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件检测阳性细胞光密度。

1.5.6 脑组织 NOS、NO 含量 采用化学比色法检测5组大鼠再灌注2、24、72 h 脑组织 NOS、NO 含量,具体如下:取脑组织1份,采用4℃预冷的0.9%氯化钠溶液冲洗脑组织血液,0.1 g 匀浆,1 500×g 离心10 min,取上清液,采用化学比色法检测5组大鼠脑组织 NOS、NO 含量,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.5.7 脑组织 LC3- II、Beclin-1、AMPK 及 mTOR 蛋白表达情况 采用 Western-blot 法检测5组大鼠再灌注72 h 脑组织 LC3- II、Beclin-1、AMPK 及 mTOR 蛋白表达情况,具体如下:选取脑组织研磨,经组织裂解后上样电泳,起始电压80 V,溴酚蓝染料前缘进入到分离胶上缘后电压增加到100 V,溴酚蓝染料泳出分离胶下缘后电泳结束。采用半干电转移仪于PVDF膜内行蛋白质电转移,恒流30 mA,连续90 min。PVDF膜取出后采用5% TBST 脱脂奶粉封闭,震荡60 min。封闭结束后采用TNS-T 漂洗液洗膜3次,10 min/次,然后将膜转移到杂交袋内,加入适量漂洗液稀释抗体,封口后4℃孵育过夜;TBST 漂洗液洗膜3次,10 min/次,在加入漂洗液稀释的辣根过氧化物酶标记二抗,震荡60 min。PVDF膜放置在电化学发光(ECL)显色液内震荡温育5 min,暗室下曝光、显影及定影。清水冲洗后晾干扫描,采用IPP软件分析扫描图像目标条带灰度值。目标蛋白相对表达量=目标蛋白条带灰度值/内参条带灰度值。

1.6 统计学方法 采用SPSS 19.0统计学软件进行数据分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能缺损评分 再灌注2、6、24、48、72 h, A组大鼠神经功能缺损评分均为0; B、C、D、E组大鼠神经功能缺损评分比较,差异有统计学意义($P < 0.05$); 其中D组和E组大鼠神经功能缺损评分低于B组、C组,差异有统计学意义($P < 0.05$, 见表1)。

2.2 梗死体积/大脑总体积 再灌注2、6、24、48、72 h, A组大鼠梗死体积/大脑总体积均为0; B、C、D、E组大鼠梗死体积/大脑总体积比较,差异有统计学意义($P < 0.05$); 其中D组和E组大鼠梗死体积/大脑总体积低于B组、C组,差异有统计学意义($P < 0.05$, 见表2)。

表1 B、C、D、E组大鼠再灌注2、6、24、48、72 h 神经功能缺损评分比较($\bar{x} \pm s$, 分)

Table 1 Comparison of neurological deficit score in groups B, C, D and E 2, 6, 24, 48 and 72 hours after reperfusion

组别	只数	再灌注2 h	再灌注6 h	再灌注24 h	再灌注48 h	再灌注72 h
B组	15	1.81±0.36	2.30±0.48	2.79±0.54	3.41±0.62	3.59±0.65
C组	15	1.80±0.35	2.29±0.46	2.76±0.52	3.38±0.60	3.56±0.62
D组	15	1.56±0.34 ^{ab}	2.09±0.50 ^{ab}	1.65±0.53 ^{ab}	2.53±0.61 ^{ab}	2.60±0.63 ^{ab}
E组	15	1.52±0.32 ^{ab}	2.06±0.49 ^{ab}	1.62±0.51 ^{ab}	2.58±0.62 ^{ab}	2.59±0.61 ^{ab}
F值		4.197	4.013	5.752	5.009	6.751
P值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与B组比较,^a $P < 0.05$;与C组比较,^b $P < 0.05$

表2 B、C、D、E组大鼠再灌注2、6、24、48、72 h 梗死体积/大脑总体积比较($\bar{x} \pm s$, %)

Table 2 Comparison of infarction volume/total brain volume in groups B, C, D and E 2, 6, 24, 48 and 72 hours after reperfusion

组别	只数	再灌注2 h	再灌注6 h	再灌注24 h	再灌注48 h	再灌注72 h
B组	3	12.14±0.47	14.11±0.68	19.30±1.09	16.19±0.64	15.91±0.45
C组	3	12.10±0.46	14.08±0.66	19.28±1.10	16.16±0.61	15.89±0.42
D组	3	10.63±0.45 ^{ab}	13.32±0.65 ^{ab}	16.78±1.12 ^{ab}	12.59±0.60 ^{ab}	12.25±0.43 ^{ab}
E组	3	10.59±0.44 ^{ab}	13.29±0.61 ^{ab}	16.71±1.08 ^{ab}	12.53±0.62 ^{ab}	12.22±0.41 ^{ab}
F值		4.802	4.163	6.052	6.971	8.683
P值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与B组比较,^a $P < 0.05$;与C组比较,^b $P < 0.05$

2.3 脑组织病理形态 A组大鼠脑组织内皮质区域神经元层次分明,神经元形态、结构及数量正常; B组大鼠缺血区域内脑组织坏死神经元较多,正常神经元减少,细胞为梭形,胞核出现皱缩、偏移,胞质较少,为空泡状,排列紊乱且周边明显水肿; C组大鼠脑组织病理形态与B组相似; D组和E组大鼠脑组织损伤较轻,周边水肿明显好转,坏死神经元数量较少,见图1。

2.4 神经元凋亡率 再灌注72 h, A组大鼠凋亡神经元数量极少; B组大鼠凋亡神经元散布在缺血半暗带区域内,且分布不均匀; C组大鼠凋亡神经元数量与B组相近; D组和E组大鼠凋亡神经元数量明显少于B组、C组,见图2。再灌注72 h, A组大鼠神经元凋亡率为(1.00±0.52)%, B组为(42.18±0.49)%, C组为(40.13±0.55)%, D组为(25.10±0.56)%, E组为(24.87±0.58)%。5组大鼠神经元凋亡率比较,差异有统计学意义($F=27.194$, $P < 0.05$); 其中B、C、D、E组大鼠神经元凋亡率高于A组, D组和E组大鼠神经元凋亡率低于B组、C组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 脑组织 VEGF 相对表达量及 NO、NOS 含量 再灌注2、24、72 h, 5组大鼠脑组织 VEGF 相对表达量及 NO、NOS 含量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);

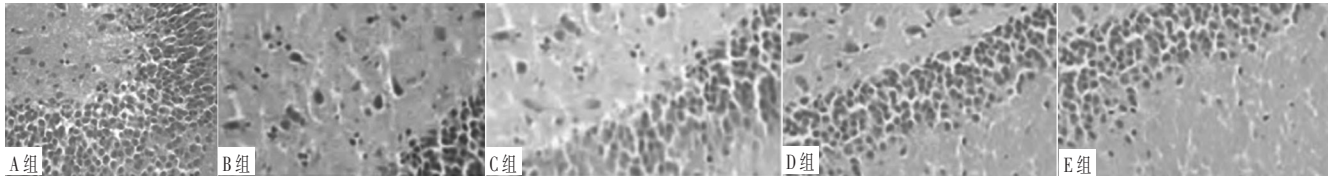


图1 5组大鼠脑组织病理学形态 (HE染色, ×400)
Figure 1 Pathological morphology of brain tissue in the five groups

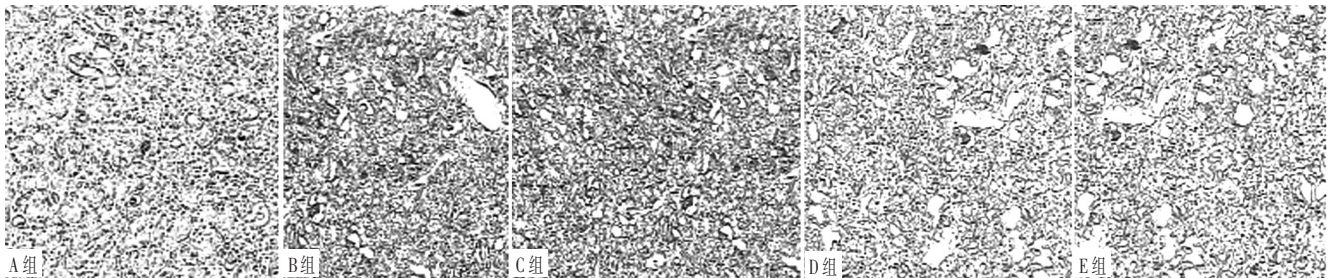


图2 5组大鼠神经元凋亡情况 (TUNEL染色, ×400)
Figure 2 Neuronal apoptosis status in the five groups

再灌注 2 h, D 组和 E 组大鼠脑组织 VEGF 相对表达量高于 B 组、C 组, B 组大鼠脑组织 NO、NOS 含量高于 A 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 再灌注 24、72 h, D 组和 E 组大鼠脑组织 VEGF 相对表达量高于 B 组、C 组, B、C、D、E 组大鼠脑组织 NO、NOS 含量高于 A 组, D 组和 E 组大鼠脑组织 NO、NOS 含量低于 B 组、C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 见表 3)。

2.6 脑组织 LC3- II、Beclin-1、mTOR、AMPK 蛋白表达情况 再灌注 72 h, 5 组大鼠脑组织 LC3- II、Beclin-1、mTOR、AMPK 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 其中 B、C、D、E 组大鼠脑组织 LC3- II、Beclin-1、mTOR、AMPK 蛋白相对表达量高于 A 组, D 组和 E 组大鼠脑组织 LC3- II、Beclin-1、mTOR、AMPK 蛋白相对表达量低于 B 组、C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 见表 4)。

表 4 5 组大鼠再灌注 72 h 脑组织 LC3- II、Beclin-1、AMPK、mTOR 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of relative protein expression quantity of LC3- II, Beclin-1, AMPK and mTOR in brain tissue in the five groups 72 hours after reperfusion

组别	只数	LC3- II 蛋白	Beclin-1 蛋白	AMPK 蛋白	mTOR 蛋白
A 组	3	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.03	0.20 ± 0.05	0.21 ± 0.06
B 组	3	0.24 ± 0.04 ^a	0.21 ± 0.05 ^a	0.61 ± 0.07 ^a	0.56 ± 0.07 ^a
C 组	3	0.22 ± 0.04 ^a	0.20 ± 0.04 ^a	0.59 ± 0.06 ^a	0.54 ± 0.06 ^a
D 组	3	0.13 ± 0.03 ^{abc}	0.11 ± 0.04 ^{abc}	0.29 ± 0.06 ^{abc}	0.32 ± 0.05 ^{abc}
E 组	3	0.12 ± 0.04 ^{abc}	0.10 ± 0.03 ^{abc}	0.27 ± 0.05 ^{abc}	0.30 ± 0.06 ^{abc}
F 值		7.083	8.114	6.053	7.119
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注: AMPK= 腺苷酸活化蛋白激酶, mTOR= 雷帕霉素靶蛋白; 与 A 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 C 组比较, ^c $P < 0.05$

表 3 5 组大鼠再灌注 2、24、72 h 脑组织 VEGF 相对表达量及 NO、NOS 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of relative expression quantity of VEGF, NO and NOS in brain tissue in the five groups 2, 24 and 72 hours after reperfusion

组别	只数	VEGF 相对表达量			NO (μ mol/g)			NOS (μ mol/g)		
		再灌注 2 h	再灌注 24 h	再灌注 72 h	再灌注 2 h	再灌注 24 h	再灌注 72 h	再灌注 2 h	再灌注 24 h	再灌注 72 h
A 组	3	-	-	-	4.62 ± 0.48	4.59 ± 0.47	4.60 ± 0.50	3.25 ± 0.51	3.58 ± 0.55	3.59 ± 0.52
B 组	3	20.41 ± 3.69	52.71 ± 4.82	35.71 ± 3.95	5.69 ± 0.53 ^a	25.21 ± 0.56 ^a	16.20 ± 0.54 ^a	5.05 ± 0.57 ^a	20.42 ± 0.59 ^a	18.23 ± 0.51 ^a
C 组	3	20.46 ± 3.71	53.18 ± 4.77	35.93 ± 3.86	5.63 ± 0.52	24.97 ± 0.54 ^a	16.12 ± 0.51 ^a	5.03 ± 0.56	20.29 ± 0.57 ^a	17.98 ± 0.55 ^a
D 组	3	25.31 ± 3.52 ^{bc}	69.39 ± 4.57 ^{bc}	42.28 ± 3.74 ^{bc}	5.41 ± 0.51	20.16 ± 0.52 ^{abc}	13.07 ± 0.51 ^{abc}	4.99 ± 0.54	16.28 ± 0.53 ^{abc}	12.17 ± 0.54 ^{abc}
E 组	3	25.73 ± 3.48 ^{bc}	69.81 ± 4.62 ^{bc}	42.55 ± 3.69 ^{bc}	5.38 ± 0.50	19.98 ± 0.50 ^{abc}	13.01 ± 0.52 ^{abc}	4.97 ± 0.52	15.99 ± 0.51 ^{abc}	12.02 ± 0.53 ^{abc}
F 值		5.083	13.284	9.073	3.185	10.002	5.723	3.449	8.061	12.390
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注: VEGF= 血管内皮生长因子, NO= 一氧化氮, NOS= 一氧化氮合酶; 与 A 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 C 组比较, ^c $P < 0.05$; “-” 为无相关数据

3 讨论

脑缺血/再灌注损伤指脑组织缺血一定时间后恢复血供,但相应脑组织功能未完全恢复或损伤更严重。脑缺血/再灌注损伤的发生机制较为复杂,可能与自由基过度形成、血管内皮功能损伤、细胞内 Ca^{2+} 超载、炎症反应等有关,其中再灌注是脑缺血后神经功能恢复的根本条件,但再灌注又是加重脑组织损伤的主要原因之一^[8]。脑缺血/再灌注的本质是恢复脑组织循环功能,减轻脑组织损伤,避免脑组织缺血范围扩大,加速缺血半暗带神经元功能恢复等。本研究采用改良 Zea-Longa 线栓法制备急性脑缺血/再灌注损伤大鼠模型,结果显示, B 组大鼠缺血区域内出现缺血/再灌注损伤病理表现,且神经功能缺损评分较高,提示模型制备成功。

阿托伐他汀为他汀类调脂药,其不但具有良好的调脂作用,还具有抑制血栓形成、细胞黏附、平滑肌细胞增殖及改善内皮功能等多种效应。既往研究表明,负荷剂量他汀类药物可降低脑卒中发病率^[9]。动物实验表明,阿托伐他汀能缩小血脂正常的缺血性脑卒中大鼠脑梗死面积,保护其神经功能,降低其心血管事件发生概率^[10]。本研究结果显示,再灌注 2、6、24、48、72 h, D 组和 E 组大鼠神经功能缺损评分和梗死体积/大脑总体积低于 B 组、C 组;再灌注 72 h, B、C、D、E 组大鼠神经元凋亡率高于 A 组, D 组和 E 组大鼠神经元凋亡率低于 B 组、C 组,提示阿托伐他汀 10、20 mg/kg 灌胃可有效减轻急性脑缺血/再灌注损伤大鼠神经功能损伤,减少神经元凋亡。

VEGF 是一种特异地作用于血管内皮细胞的强有力的多功能细胞因子,亦是目前临床发现的增加血管通透性作用最强的物质之一,其可诱导新生血管形成及血管内皮细胞有丝分裂,对局灶性脑缺血后神经功能恢复具有重要促进作用^[11-12]。NO 是经细胞膜扩散的气体自由基,生理条件下其可调节血管张力,抑制血管平滑肌细胞、血小板激活因子及血小板聚集,诱导内皮细胞和中性粒细胞黏附;此外,其还在刺激神经元活动、血栓形成及控制脑血流量等方面具有重要作用。NOS 是 NO 内源性合成的关键酶,可影响 NO 表达。本研究结果显示,再灌注 2 h, D 组和 E 组大鼠脑组织 VEGF 相对表达量高于 B 组、C 组, B 组大鼠脑组织 NO、NOS 含量高于 A 组;再灌注 24、72 h, D 组和 E 组大鼠脑组织 VEGF 相对表达量高于 B 组、C 组, B、C、D、E 组大鼠脑组织 NO、NOS 含量高于 A 组, D 组和 E 组大鼠脑组织 NO、NOS 含量低于 B 组、C 组,提示阿托伐他汀 10、20 mg/kg 灌胃可有效改善急性脑缺血/再灌注损伤大鼠血管内皮功能,分析其原因可能与阿托伐他汀促进局部脑组织血管新生、减少脑组织氧化应激损伤等有关。

自噬是将细胞内受损、变性、衰老的蛋白质或细胞

器运输到溶酶体内并降解的过程,以胞质中出现自噬体作为主要标志。LC3- II 和 Beclin-1 蛋白是哺乳动物自噬相关基因编码产物,二者与 B 细胞淋巴瘤蛋白 2、哺乳动物自噬相关基因编码产物等相互影响而激活细胞自噬,因此 LC3- II 和 Beclin-1 蛋白常被认为是自噬标志分子^[13-14]。既往研究表明,急性脑缺血/再灌注损伤与血管内皮功能密切相关,而再灌注过程中机体血管内皮细胞直接接触循环血液内高浓度血管紧张素 II (Ang II) 而形成大量肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 1 (IL-1)、活性氧 (ROS) 等炎症因子及细胞内 Ca^{2+} ,若机体 Ca^{2+} 超载则血浆内钙调素 (CaM) 含量升高,钙/钙调蛋白激酶依赖性激酶 β (CaMKK- β) 激活,AMPK 活性增大,磷酸化结节性脑硬化复合物 2 (TSC-2) 而抑制重组人表皮因子 (RHE),并经过负反馈抑制 mTOR 活性,进而激活细胞自噬,因此急性脑缺血/再灌注损伤与自噬密切相关,可通过调节 Ca^{2+} /AMPK/mTOR 信号通路而促使血管内皮细胞凋亡、坏死,加重病情^[15-16]。本研究结果显示,再灌注 72 h, B、C、D、E 组大鼠脑组织 LC3- II、Beclin-1、mTOR、AMPK 蛋白相对表达量高于 A 组, D 组和 E 组大鼠脑组织 LC3- II、Beclin-1、mTOR、AMPK 蛋白相对表达量低于 B 组、C 组,提示 Ca^{2+} /AMPK/mTOR 信号通路可能参与急性脑缺血/再灌注损伤的病理过程,而阿托伐他汀 10、20 mg/kg 灌胃可通过抑制 Ca^{2+} /AMPK/mTOR 信号通路激活而减轻自噬对脑组织血管内皮功能的损伤。

综上所述,阿托伐他汀 10、20 mg/kg 灌胃可有效减轻急性脑缺血/再灌注损伤大鼠神经功能损伤,减少神经元凋亡,改善血管内皮功能,其机制可能与调控自噬相关信号通路 Ca^{2+} /AMPK/mTOR 有关。

作者贡献:李玉竹进行文章的构思与设计,研究的实施与可行性分析,进行结果分析与解释,负责撰写论文;李玉竹、邹梅、于周进行数据收集、整理、分析;邹梅负责文章的质量控制及审校;于周对文章整体负责,监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] 李艳芳,费丽萍,牛青英.阿托伐他汀及尼可地尔后处理对兔心肌缺血再灌注细胞自噬的影响[J].中国药物与临床,2016,16(4):486-488.DOI:10.11655/zgywylc2016.04.010.
- [2] YANG H, LI L, ZHOU K, et al. Shengmai injection attenuates the cerebral ischemia/reperfusion induced autophagy via modulation of the AMPK, mTOR and JNK pathways [J]. Pharm Biol, 2016, 54(10): 2288-2297. DOI: 10.3109/13880209.2016.1155625.
- [3] 李丹丹,肖学进,秦书俭,等.脑缺血再灌注损伤程度与自噬相关基因 LC3、mTOR 表达的相关性研究[J].中国临床解剖学杂志,2018,36(2):182-186. DOI: 10.13418/j.issn.1001-165x.

2018.02.012.

[4] 周红霞, 王兴元, 范利娟, 等. 阿托伐他汀在急性缺血性脑卒中患者中的临床研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(1): 72-74. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2016.01.023.

[5] 唐斌, 方翔, 张园芳, 等. 不同剂量阿托伐他汀钙片在缺血性脑血管病患者脑血管介入治疗中应用效果的对比研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2017, 25(6): 57-60.

[6] 张青杰, 胡昔权, 张丽颖, 等. 超早期和早期运动训练对脑梗死大鼠神经功能恢复的影响及机制 [J]. 中国康复医学杂志, 2018, 33(9): 1013-1018. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2018.09.002.

[7] 张波, 伍海军, 钟志军, 等. 丹参川芎嗪注射液对脑出血大鼠神经功能、脑水肿及神经元凋亡的影响研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2018, 26(11): 62-66. DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2018.11.015.

[8] 张精亮, 胡涛, 刘晓岩, 等. 002C-3 通过抑制 MMPs 和细胞自噬并激活细胞存活相关的钙信号通路保护小鼠脑缺血再灌注损伤 [J]. 中国药学 (英文版), 2016, 25(8): 598-604.

[9] 石伟龙. 急性缺血性卒中后他汀使用强度和依从性对长期预后的影响 [J]. 临床药物治疗杂志, 2017, 15(11): 90. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3384.2017.11.021.

[10] 史楠, 张燕, 李晋峰, 等. 黄芪甲苷通过 AKT-mTOR 信号通路促进脑缺血的自噬改善脑缺血再灌注损伤 [J]. 中国临床神经科学, 2017, 25(6): 601-612. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0678.2017.06.001.

[11] DAI S, XU Q, LIU S, et al. Role of autophagy and its signaling pathways in ischemia/reperfusion injury [J]. Am J Transl Res, 2017, 9(10): 4470-4480.

[12] 耿武军, 陈成宇, 张民远, 等. Wnt/ β -catenin 信号通路通过下调自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(3): 222-226.

[13] 方聪聪, 毛善平, 曾智, 等. 大鼠早期局灶性脑缺血再灌注损伤中 USP10 的表达水平变化及其与自噬的关系 [J]. 卒中与神经疾病, 2017, 24(4): 290-296. DOI: 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.04.004.

[14] 彭志锋, 孟健, 张继红. 热休克蛋白 A5 介导的自噬在小鼠脑缺血/再灌注损伤中的作用 [J]. 中国应用生理学杂志, 2017, 33(3): 234-238. DOI: 10.12047/j.cjap.5472.2017.058.

[15] 吴新伟, 谭永星. 线粒体自噬的发生机制及其在脑缺血/再灌注损伤中作用的研究进展 [J]. 医学综述, 2017, 23(21): 4173-4177. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2017.21.003.

[16] 陈萌, 郭森, 王爱乐, 等. 抑制 mTOR 通路对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠自噬的影响 [J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(2): 246-250. DOI: 10.16557/j.cnki.1000-7547.2016.02.018.

(收稿日期: 2019-01-23; 修回日期: 2019-05-16)

(本文编辑: 谢武英)

· 指南 · 共识 · 标准 ·

《眩晕急诊诊断与治疗专家共识》眩晕处理原则

眩晕指因机体对空间定位障碍而产生的一种运动性或位置性错觉, 主要包括中枢性眩晕和周围性眩晕。《眩晕急诊诊断与治疗专家共识》中的眩晕处理原则如下:

1 中枢性眩晕急诊处理原则

中枢性眩晕是中枢前庭通路病变所致。除对症治疗外, 中枢性眩晕的处理原则为针对病因治疗。炎症和脱髓鞘疾病应考虑给予糖皮质激素、免疫球蛋白、抗生素等治疗; 肿瘤需要请神经外科协助诊治; 脑出血应控制血压, 降颅内压, 存在第三、四脑室梗阻者应行脑室外引流, 小脑出血可考虑外科清除血肿。后循环缺血是常见的中枢性眩晕病因, 改善脑血液循环的药物如天麻素(天眩清)、银杏叶制剂、倍他司汀等均有助于改善患者症状。急诊科医生一旦怀疑患者为后循环缺血则应高度重视, 并交由神经内科医生处理。作为接诊的急诊科医生首先应重视此类患者的气道管理, 维持气道通畅, 防止误吸。其他治疗方案包括静脉溶栓、血管内取栓、支架植入术、抗栓、他汀类药物、扩容等, 大面积小脑梗死者可考虑去骨瓣减压术治疗。

2 周围性眩晕处理原则

周围性眩晕指由于前庭神经末梢感受器(球囊、椭圆囊、半规管)、前庭神经或前庭神经节病变引发的眩晕, 一般认为其是在前庭神经核团以下的前庭通路病变。常见疾病包括良性阵发性位置性眩晕(耳石症)、梅尼埃病、前庭神经炎, 少见疾病包括与中耳病变相关的疾病。

对首次就诊的周围性眩晕患者建议对症治疗, 可短期使用前庭抑制剂, 控制眩晕症状后进一步检查, 确诊或会诊; 剧烈呕吐患者可给予止吐治疗, 常用药物有眩晕停、乘晕宁、甲氧氯普胺、异丙嗪等。对有反复发作病史的患者, 既往已明确诊断, 根据病因进行有针对性的治疗: 良性阵发性位置性眩晕建议行手法复位治疗; 梅尼埃病药物治疗参见《梅尼埃病诊断和治疗指南(2017)》; 前庭神经炎患者可予以激素和止晕药治疗; 中耳炎患者请耳鼻喉科医生会诊, 一旦发现化脓性中耳炎合并颅外、颅内并发症, 应行急诊外科手术。

(来源: 《中国全科医学杂志》)