

ATP 敏感性钾通道开放剂对脑缺血/再灌注损伤的保护作用及信号转导机制研究

张鸿 刘艳艳 马英 吕永利

【摘要】 目的 观察 ATP 敏感性钾通道(K_{ATP})开放剂对大鼠脑缺血/再灌注(I/R)损伤后神经元凋亡的保护作用及其信号转导机制。方法 将 200 只雄性 Wistar 大鼠随机分为假手术组(A 组)、缺血组(B 组)、 K_{ATP} 开放剂治疗组(C 组)及 K_{ATP} 开放剂和阻断剂联合治疗组(D 组)。应用线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型,各组于缺血后 2 h 进行再灌注。各组于再灌注 6、12、24、48 和 72 h 分别取 5 只大鼠脑组织标本,用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)检测神经元凋亡,用免疫组化法检测天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)和 caspase-9 的蛋白表达;各组其余 5 只大鼠用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)观察 caspase-3 和 caspase-9 的 mRNA 表达。结果 B、C、D 组再灌注后各时间点凋亡神经元数以及 caspase-3、caspase-9 的蛋白和 mRNA 表达均显著高于 A 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),C 组各指标均显著低于 B 组和 D 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而 B 组与 D 组各指标间比较差异均无显著性($P > 0.05$)。结论 K_{ATP} 开放剂能显著减少脑 I/R 损伤后神经元凋亡以及 caspase-3、caspase-9 的 mRNA 和蛋白表达,提示 K_{ATP} 开放剂可能通过抑制线粒体通路减少脑 I/R 损伤后的神经元凋亡。

【关键词】 缺血/再灌注损伤;脑;凋亡;ATP 敏感性钾通道;线粒体通路;caspase-3; caspase-9

Protective effect of ATP sensitive potassium channel opener on cerebral ischemia/reperfusion injury and its signal transduction mechanism ZHANG Hong*, LIU Yan-yan, MA Ying, LU Yong-li. * Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning, China Corresponding author: LU Yong-li (Email: lyl1944428@yahoo.com.cn)

【Abstract】 Objective To study the protective effect of ATP sensitive potassium channel (K_{ATP}) opener against neuronal apoptosis following focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) and its signal transduction mechanism. Methods Two hundred male Wistar rats were randomly divided into four groups: sham operation group (A group), I/R group (B group), K_{ATP} opener treatment group (C group) and K_{ATP} opener and blocker treatment group (D group). The middle cerebral artery occlusion (MCAO) by intraluminal suture method was used to reproduce cerebral ischemia, and perfusion was restored 2 hours after MCAO. Five rats in each group were used. Brain sections were made 6, 12, 24, 48 and 72 hours after I/R injury, and neuronal apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine 5 triphosphate nick end labeling (TUNEL). The expressions of caspase-3 and caspase-9 proteins were detected by immunohistochemical method. Another five rats in each group were used for assessing the expressions of caspase-3 mRNA and caspase-9 mRNA by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Results The number of apoptotic neurons, the expression of caspase-3 and caspase-9 mRNA and protein in B, C and D groups were significantly higher than A group at all time points ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The number of apoptotic neurons, the expressions of caspase-3 and caspase-9 mRNA and protein in C group were significantly lower than B and D groups at all time points ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There were no differences between B and D groups at all time points (all $P > 0.05$). Conclusion K_{ATP} opener can significantly mitigate neuronal apoptosis and inhibit the expressions of caspase-3 and caspase-9 mRNA and protein after cerebral I/R injury. This result indicates that K_{ATP} opener can decrease neuronal apoptosis by inhibiting mitochondria signaling pathway.

【Key words】 cerebral ischemia/reperfusion injury; apoptosis; ATP sensitive potassium channel; mitochondria signaling pathway; caspase-3; caspase-9

基金项目:辽宁省自然科学基金资助项目(20052097)

作者单位:110004 沈阳,中国医科大学附属第二医院神经内科(张鸿,马英);300050 天津市天和医院(刘艳艳);110001 沈阳,中国医科大学基础医学院解剖教研室(吕永利)

通讯作者:吕永利,教授,博士生导师(Email: lyl1944428@yahoo.com.cn)

作者简介:张鸿(1972-),女(汉族),辽宁省人,医学博士,副教授,主要研究方向为缺血性脑血管病,发表论文 10 余篇(Email: zhangh.7211@163.com)。

已知缺血性脑血管病治疗的关键是减轻缺血半暗带区的神经元凋亡,挽救半暗带^[1]。细胞凋亡受基因调控,目前认为线粒体通路是脑缺血后细胞凋亡的主要信号转导通路之一,而线粒体通路以天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-9(caspase-9)的激活为特征,并进一步激活下游的 caspase-3,最终诱导细胞凋亡^[2]。ATP 敏感性钾通道(K_{ATP})开放剂是近年来一种新兴的脑保护剂,但其保护作用的确切机制

目前尚不清楚。本实验拟观察 K_{ATP} 开放剂对脑缺血/再灌注 (I/R) 损伤后神经元凋亡及 caspase - 9、caspase - 3 基因和蛋白表达的影响, 探明 K_{ATP} 开放剂抗脑 I/R 损伤后神经元凋亡的信号转导机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组: 选择健康雄性 Wistar 大鼠 200 只, 体重 250~300 g, 按随机数字表法分为假手术组 (A 组)、缺血组 (B 组)、 K_{ATP} 开放剂治疗组 (C 组) 及 K_{ATP} 开放剂和阻断剂联合治疗组 (D 组), 每组再分为脑 I/R 损伤后 6、12、24、48 和 72 h 5 个时间点, 每个时间点 10 只大鼠, 其中 5 只用于细胞凋亡及免疫组化检测, 另外 5 只用于逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测。

1.2 动物模型制备及给药方法: 用体积分数为 10% 的水合氯醛 (350 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 参考改良线栓法^[3] 制备大鼠大脑中动脉闭塞 (MCAO) 模型。大鼠麻醉后俯卧位固定于脑立体定位仪上, 颅顶正中矢状切口, 暴露前囟, 于前囟后 0.8 mm、距中线右侧 1.5 mm 处钻孔, 垂直进针约 4.5 mm, 以微量加样器脑室内给药。A 组只切开、不结扎。C 组在缺血前 30 min 脑室内注入 2 mmol/L 吡那地尔 10 μ l, 30 min 后行 MCAO。D 组先脑室内注入 0.2 mol/L 格列吡嗪 10 μ l, 15 min 后再给予吡那地尔 10 μ l, 30 min 后行 MCAO。B 组脑室内注入等量生理盐水后行 MCAO。

1.3 标本的制备: 用于凋亡和免疫组化检测的大鼠于脑 I/R 损伤后各时间点麻醉, 开胸暴露心脏, 心尖部剪开左心室, 插管至主动脉, 剪开右心房, 快速注入 100 ml 生理盐水冲洗后, 再以体积分数为 4% 的多聚甲醛灌注固定, 断头取脑, 多聚甲醛后固定 2 h, 常规脱水、透明、石蜡包埋, 连续冠状切片。用于 RT-PCR 检测的大鼠在脑 I/R 损伤后各时间点快速断头取脑, 取右侧缺血侧大脑半球半暗带区皮质, 液氮中保存待测。

1.4 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法 (TUNEL) 检测神经元凋亡: 切片滴加体积分数为 3% 的 H_2O_2 室温处理 10 min, 蒸馏水洗 2 min \times 3 次; 加蛋白酶 [用 0.1 mol/L 的 Tris 缓冲液 (TBS) 1:200 稀释] 37 $^{\circ}$ C 消化 10 min; 加标记液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, TBS 洗 2 min \times 3 次; 加封闭液, 室温 30 min; 加生物素化抗地高辛抗体 (用封闭液 1:100 稀释), 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min, TBS 洗 2 min \times 3 次; 加链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶 (SABC), 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min, TBS 洗 5 min \times 4 次; 3,3'-二氨

基联苯胺 (DAB) 显色、水洗、苏木素轻度复染, TBS 洗、蒸馏水洗, 脱水、透明、封片。显微镜下观察, 细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞。凋亡试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.5 免疫组化检测 caspase - 3 和 caspase - 9 蛋白: 切片常规脱蜡至水; 滴加 3% H_2O_2 室温 10 min, 蒸馏水洗 3 min \times 3 次, 微波修复抗原; 滴加 5% 血清封闭液 BSA, 室温 20 min 甩去多余液体; 滴加一抗 (兔抗大鼠 IgG), 37 $^{\circ}$ C 孵育 120 min, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 min \times 3 次; 滴加二抗 (生物素标记山羊抗兔 IgG), 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, PBS 洗 2 min \times 3 次; 滴加 SABC, 37 $^{\circ}$ C 反应 20 min, PBS 洗 5 min \times 4 次; DAB 显色、蒸馏水洗、苏木素轻度复染, 脱水、透明、封片。显微镜下观察, 胞浆着色呈棕黄色为阳性细胞。免疫组化试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.6 RT-PCR 检测 caspase - 3 和 caspase - 9 mRNA: 按常规方法提取总 RNA。逆转录反应: 反应体系总体积 20 μ l, 包括 2 \times 缓冲液 buffer 10 μ l、 $MgSO_4$ 4 μ l、dNTPs 1 μ l、BcaBEST Polymerase 1 μ l、oligo-dT15 1 μ l、Rnase - Inhibitor 0.5 μ l、dd. H_2O 0.5 μ l、样品 RNA 2 μ l。PCR 扩增引物由北京三博远志生物技术有限公司合成。caspase - 3 引物序列 (GenBank NM_012922): 上游 (正义引物) 5'-CTG GAC TGC GGT ATT GAG - 3', 下游 (反义引物) 5'-GGG TGC GGT AGA GTA AGC - 3', 扩增产物片段长度 102 bp; caspase - 9 引物序列 (GenBank NM_031632): 上游 (正义引物) 5'-CCA GAT GCT GTC CCA TAC C - 3', 下游 (反义引物) 5'-ATT GGC GAC CCT GAG AAG - 3', 扩增产物片段长度 228 bp; 内参照 β -actin 引物序列: 上游 (正义引物) 5'-CAC CCT GTG CTG CTC ACC GAG GCC - 3', 下游 (反义引物) 5'-CCA CAC AGA TGA CTT GCG CTC AGG - 3', 扩增产物片段长度 690 bp。PCR 反应体系: dd. H_2O 17.1 μ l, cDNA 3 μ l, dNTPs 2 μ l, 10 \times buffer 缓冲液 2.5 μ l, Taq - E 0.2 μ l, caspase - 3, caspase - 8, caspase - 9, β -actin 上下游引物各 0.1 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C、10 min 预变性, 94 $^{\circ}$ C、40 s 变性, 51.5 $^{\circ}$ C、1 min 退火, 72 $^{\circ}$ C、1 min 延伸, 32 个循环, 72 $^{\circ}$ C、7 min 终止反应。将扩增产物用质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶和 Tris - 硼酸盐 - 乙二胺四乙酸 (TBE) 电泳缓冲液电泳。RT-PCR 试剂盒购于大连宝生物技术有限公司。

表 1 各组脑 I/R 损伤后神经元凋亡的变化比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Comparison of apoptosis after cerebral I/R injury in each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
A 组	1.05±0.65	0.95±0.60	1.05±0.48	1.05±0.57	0.95±0.60
B 组	14.45±6.04**	21.70±7.93**	44.50±15.97**	30.19±6.46**	21.95±5.23**
C 组	10.55±5.15*	12.35±5.25**△#	22.65±9.21**△△##	19.05±4.80**△△##	13.90±4.93**△#
D 组	13.05±7.05**	20.65±7.14**	44.05±13.54**	31.45±8.29**	22.30±6.26**

注:与 A 组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 B 组比较:△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与 D 组比较:## $P<0.01$

表 2 各组脑 I/R 损伤后 caspase-3 和 caspase-9 的蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Comparison of caspase-3 and caspase-9 protein expression after cerebral I/R injury in each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

指标	组别	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
caspase-3 蛋白	A 组	1.75±0.88	1.55±0.88	1.72±0.70	1.60±1.02	1.45±0.78
	B 组	8.70±1.41**	18.20±4.49**	39.04±9.04**	26.60±7.95**	21.60±8.26**
	C 组	6.45±2.26**△#	9.20±2.59**△△##	21.62±4.88**△△##	17.95±5.11**△#	12.40±6.23**△#
	D 组	8.65±1.43**	17.60±4.28**	38.54±8.20**	27.90±7.42**	22.00±8.80**
caspase-9 蛋白	A 组	1.49±1.08	1.70±0.67	1.72±0.70	1.68±0.70**	1.86±0.82
	B 组	11.66±3.19**	21.95±7.95**	39.04±9.04**	27.71±8.63**	22.70±7.08**
	C 组	7.20±2.60**△#	13.17±3.81**△#	21.62±4.88**△#	16.74±6.20**△#	13.26±4.99**△#
	D 组	11.21±3.30**	21.26±7.46**	38.54±8.20**	27.50±9.28**	22.14±7.74**

注:与 A 组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 B 组比较:△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与 D 组比较:## $P<0.01$

1.7 数据收集:神经元凋亡和免疫组化切片在高倍镜($\times 400$)下,取每张切片中梗死灶边缘区域相互不重叠的 4 个视野,利用 Meta Morph(美国)图像分析系统分别测定凋亡阳性神经元数和 caspase-3、caspase-9 积分光密度均值。RT-PCR 部分应用 1Dkodak 成像分析系统对电泳条带进行吸光度(A)值半定量分析,结果以 caspase-3、caspase-9 mRNA 产物的 A 值与 β -actin 产物的 A 值的比值来表示。

1.8 统计学分析:所有实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

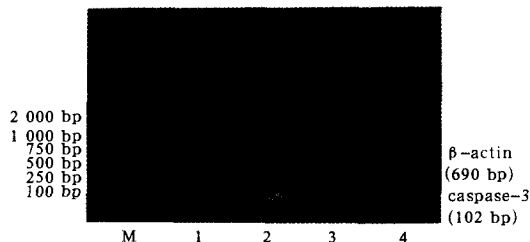
2 结果

2.1 神经元凋亡:凋亡神经元主要分布于各组缺血周边区(即缺血半暗带内),在缺血中心区凋亡神经元较少表达。凋亡神经元核膜结构完整,核内染色质浓聚,且边集于核周,呈新月形、环形、长条形、块状小体甚至形成核碎片,核内可见棕褐色的 TUNEL 反应产物(彩色插页图 1)。表 1 结果显示,A 组仅见少量凋亡神经元,B、C、D 组凋亡神经元于 I/R 损伤后 6 h 开始增多,24 h 时达高峰,48 h 和 72 h 凋亡神经元数逐渐减少。C 组 6 h 时凋亡神经元与 B、D 组相比有所下降,但差异无显著性,而其余各时间点相比均显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。D 组各时间点凋亡神经元与 B 组比较差异均无显著性。

2.2 caspase-3 和 caspase-9 的蛋白表达:表 2

结果显示,A 组中各时间点仅有少量 caspase-3 和 caspase-9 的蛋白表达,B、C、D 组各时间点蛋白表达则显著增多,主要分布于缺血半暗带内,中心区内较少表达(彩色插页图 2,图 3),且于 24 h 达高峰,与神经元凋亡规律基本一致;C 组各时间点蛋白表达均显著少于 B 组和 D 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),B 组与 D 组间比较差异均无显著性。

2.3 caspase-3 和 caspase-9 的 mRNA 表达(图 4,图 5,表 3):A 组各时间点 caspase-3 和 caspase-9 的 mRNA 仅见微弱表达。B、C 和 D 组随 I/R 损伤时间延长表达逐渐增强,24 h 达高峰,以后逐渐减弱,与神经元凋亡规律基本一致。C 组各时间点 caspase-3 和 caspase-9 的 mRNA 表达均显著少于 B 组和 D 组(P 均 <0.01),D 组各时间点 caspase-3 和 caspase-9 的 mRNA 表达与 B 组比较差异均无显著性(P 均 >0.05)。

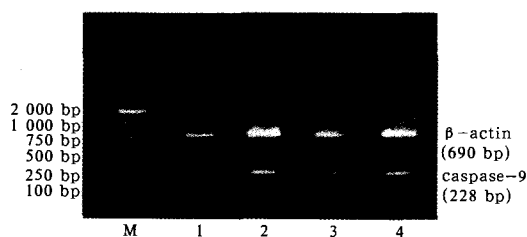


M:Marker;1~4 依次为假手术组、缺血组、KATP 开放剂治疗组、KATP 开放剂和阻断剂联合治疗组
图 4 各组脑 I/R 损伤后 24 h caspase-3 mRNA 变化
Figure 4 Change of caspase-3 mRNA at 24 hours after cerebral I/R injury in each group

表 3 各组脑 I/R 损伤后 caspase - 3 和 caspase - 9 的 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 3 Comparison of caspase - 3 mRNA and caspase - 9 mRNA expression after cerebral I/R injury in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

指标	组别	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
caspase - 3 mRNA	A 组	0.66±0.06	0.65±0.05	0.63±0.06	0.65±0.05	0.67±0.07
	B 组	1.03±0.09**	1.37±0.16**	1.96±0.14**	1.68±0.12**	1.32±0.10**
	C 组	0.84±0.07**△△##	1.13±0.09**△△##	1.68±0.11**△△##	1.28±0.12**△△##	0.94±0.08**△△##
	D 组	1.07±0.10**	1.38±0.13**	1.97±0.11**	1.65±0.12	1.31±0.11**
caspase - 9 mRNA	A 组	0.60±0.05	0.63±0.07	0.62±0.06	0.63±0.07	0.64±0.07
	B 组	1.13±0.11**	1.41±0.13**	2.00±0.15**	1.70±0.10**	1.34±0.11**
	C 组	0.92±0.06**△△##	1.15±0.09**△△##	1.66±0.10**△△##	1.30±0.07**△△##	0.95±0.08**△△##
	D 组	1.12±0.10**	1.40±0.13**	2.04±0.17**	1.69±0.10**	1.30±0.10**

注:与 A 组比较:** $P<0.01$;与 B 组比较:△△ $P<0.01$;与 D 组比较:## $P<0.01$



M:Marker;1~4 依次为假手术组、缺血组、

K_{ATP} 开放剂治疗组、 K_{ATP} 开放剂和阻断剂联合治疗组

图 5 各组脑 I/R 损伤后 24 h caspase - 9 mRNA 变化

Figure 5 Change of caspase - 9 mRNA at 24 hours after cerebral I/R injury in each group

3 讨论

3.1 K_{ATP} 开放剂对脑缺血后神经元凋亡的保护作用:一般认为缺血后神经元死亡的形式包括坏死和凋亡两种。脑缺血时缺血中心区以神经元坏死为主,而缺血半暗带区则以神经元凋亡为主要形式^[4,5]。本实验结果显示:缺血组凋亡神经元主要分布在缺血周边区,即半暗带内,其数量与假手术组相比显著增多,这与以往文献报道的基本一致。Teshima 等^[6]认为 K_{ATP} 开放剂能维持线粒体内膜电位稳定,减少氧化应激诱导的小脑颗粒细胞凋亡。本实验中采用特异性 K_{ATP} 开放剂吡那地尔,观察其脑保护作用机制。结果也证实给予吡那地尔治疗后缺血半暗带内神经元凋亡数目明显减少,而同时给予特异性 K_{ATP} 拮抗剂格列吡嗪后就基本逆转了吡那地尔的抗凋亡作用。这说明 K_{ATP} 开放剂能有效减少脑缺血后神经元凋亡,发挥脑保护作用。

3.2 K_{ATP} 开放剂脑保护作用的信号转导机制:目前认为线粒体通路是细胞凋亡的重要信号转导通路之一,氧自由基、钙超载等凋亡刺激因素可使线粒体通透性增加,线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$)下降,释放细胞色素 C,而细胞色素 C 可激活 caspase - 9,进而激活

下游的 caspase - 3,最终诱导细胞凋亡^[7]。本实验结果表明,脑 I/R 损伤后 caspase - 9、caspase - 3 的蛋白和基因表达均明显升高,其演变过程与神经元凋亡的变化规律基本一致,这提示线粒体通路参与了脑 I/R 损伤后神经元凋亡的调控。本实验结果还表明,吡那地尔能明显减少脑 I/R 损伤后各个时间点 caspase - 3、caspase - 9 的基因及蛋白表达,而格列吡嗪基本抵消了吡那地尔对表达的影响,提示 K_{ATP} 开放剂能显著下调 caspase - 9、caspase - 3 的基因和蛋白表达,通过抑制线粒体通路,减少脑缺血后神经元凋亡,对脑 I/R 损伤发挥保护作用,这进一步说明 K_{ATP} 开放剂对脑 I/R 损伤后神经元凋亡的保护作用可能是通过线粒体通路来实现的。

参考文献:

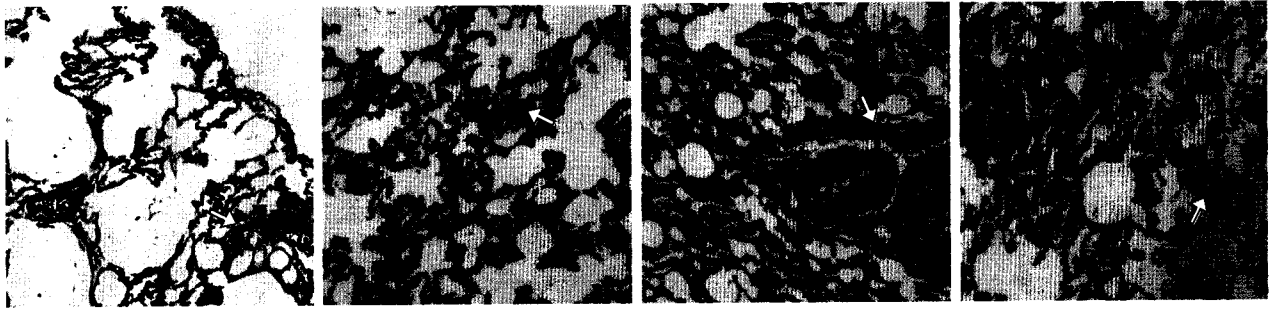
- 1 赵燕玲,曲友直,王宗仁.黄芪对脑缺血/再灌注后神经细胞凋亡及凋亡相关基因表达的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2005,12(6):341-343.
- 2 Prunell G F, Arboleda V A, Troy C M. Caspase function in neuronal death: delineation of the role of caspases in ischemia [J]. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2005, 4(1): 51-61.
- 3 Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion [J]. Stroke, 1989, 20(8): 1037-1043.
- 4 Kametsu Y, Osuga S, Hakim A M. Apoptosis occurs in the penumbra zone during short-duration focal ischemia in the rat [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23(4): 416-422.
- 5 李建生,任小巧,刘轲,等.老龄大鼠脑缺血/再灌注神经细胞凋亡变化规律研究[J].中国危重病急救医学,2004,16(3):151-154.
- 6 Teshima Y, Akao M, Baumgartner W A, et al. Nicorandil prevents oxidative stress-induced apoptosis in neurons by activating mitochondrial ATP-sensitive potassium channels [J]. Brain Res, 2003, 990(1-2): 45-50.
- 7 Chan P H. Mitochondria and neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia [J]. Neurochem Res, 2004, 29(11): 1943-1949.

(收稿日期:2006-11-29 修回日期:2007-03-10)

(本文编辑:李银平)

重度烟雾吸入致大鼠急性肺损伤的免疫应答及其机制探讨

(正文见209页)

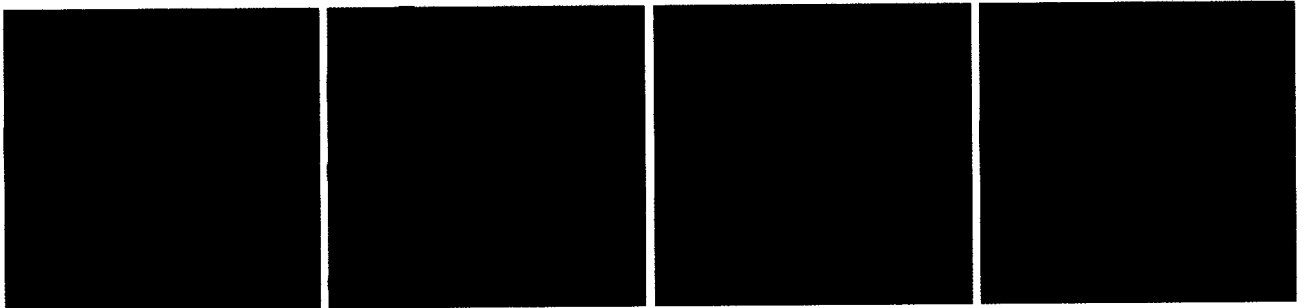


A: 致伤2 h, 箭头示PMN浸润; B: 致伤4 h, 箭头示PMN浸润; C: 致伤6 h, 箭头示“袖套”样改变; D: 致伤24 h, 箭头示单核/巨噬细胞浸润
图1 肺组织病理学变化(HE, × 200)

Figure 1 Pathological change of lung tissues (HE, × 200)

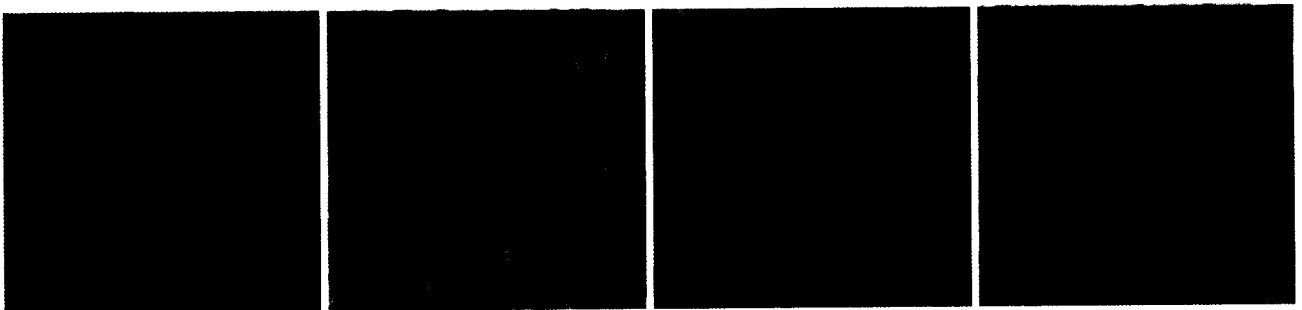
ATP敏感性钾通道开放剂对脑缺血/再灌注损伤的保护作用及信号转导机制研究

(正文见221页)



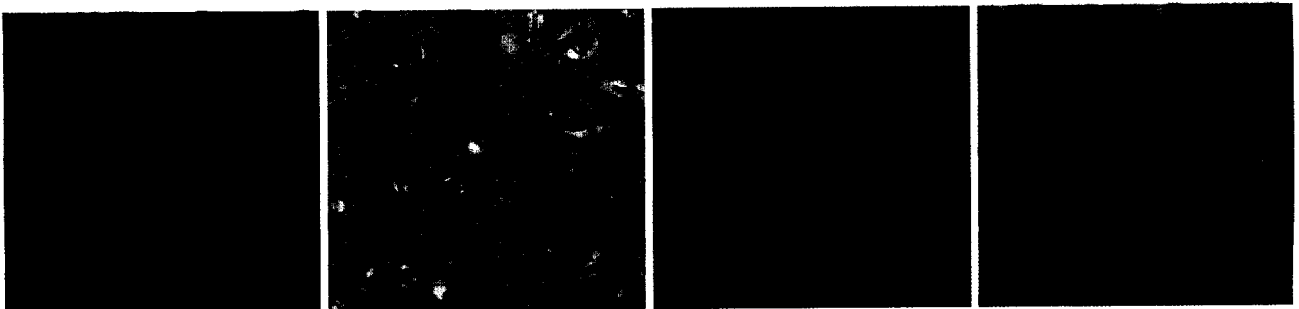
A: 假手术组; B: 缺血组; C: K_{ATP}开放剂治疗组; D: K_{ATP}开放剂和阻断剂联合治疗组
图1 各组脑I/R损伤后24 h神经元凋亡的变化(TUNEL, × 400)

Figure 1 Change of neuronal apoptosis at 24 hours after cerebral I/R injury in each group (TUNEL, × 400)



A: 假手术组; B: 缺血组; C: K_{ATP}开放剂治疗组; D: K_{ATP}开放剂和阻断剂联合治疗组
图2 各组脑I/R损伤后24 h caspase-3蛋白的表达(免疫组化, × 400)

Figure 2 Expression of caspase-3 protein at 24 hours after cerebral I/R injury in each group (immunohistochemistry, × 400)



A: 假手术组; B: 缺血组; C: K_{ATP}开放剂治疗组; D: K_{ATP}开放剂和阻断剂联合治疗组
图3 各组脑I/R损伤后24 h caspase-9蛋白的表达(免疫组化, × 400)

Figure 3 Expression of caspase-9 protein at 24 hours after cerebral I/R injury in each group (immunohistochemistry, × 400)