

三氧预处理保护大鼠脑缺血 / 再灌注损伤及其对谷氨酸受体的影响

张琳 李云琦 刘阳阳 孙晓彤 隽兆东 张蕊 孙丽娜

潍坊医学院麻醉学院, 山东省医药卫生临床麻醉重点实验室, 山东潍坊 261053

通信作者: 孙丽娜, Email: sln@wfmec.edu.cn

【摘要】 目的 研究三氧预处理对大鼠脑缺血 / 再灌注 (I/R) 损伤的作用。方法 选择 24 只清洁级雄性 SD 大鼠, 按随机数字表法分为假手术组 (Sham 组)、脑 I/R 损伤组 (I/R 组) 和三氧预处理组 (Ozone 组), 每组 8 只。各组大鼠均常规喂养, Ozone 组给予腹腔注射 80 mg/L 三氧水 (剂量为 0.01 mL/g) 预处理, Sham 组和 I/R 组分别输注等体积 0.9% 生理盐水; 每日 1 次, 共注射 5 d。之后 I/R 组与 Ozone 组采用线栓法制备大鼠脑 I/R 模型, Sham 组只分离不结扎动脉。缺血 2 h 后, 测定大鼠神经功能缺损评分 (NDS); 再灌注 24 h 后, 测定改良神经功能缺损评分 (mNSS); 并麻醉大鼠取脑组织, 采用 2,3,5-三苯基氯化四氮唑 (TTC) 染色观察大鼠的脑梗死情况, 计算脑梗死体积占比; 另外采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 测定脑缺血半暗带区代谢型谷氨酸受体 5 (mGluR5) 和离子型谷氨酸 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体 (AMPA) 亚基 GluA2 的蛋白表达。结果 与 Sham 组相比, I/R 组大鼠的 NDS 评分、mNSS 评分和脑梗死体积占比均明显升高 [NDS 评分 (分): 2.63 ± 0.52 比 0, mNSS 评分 (分): 9.63 ± 1.19 比 1.13 ± 0.64 , 脑梗死体积占比: $(41.25 \pm 2.93)\%$ 比 0%, 均 $P < 0.05$], 脑缺血半暗带区 mGluR5 和 GluA2 的蛋白表达水平均明显降低 [mGluR5 蛋白 (mGluR5/ β -actin): 0.44 ± 0.14 比 1.00 ± 0.10 , GluA2 蛋白 (GluA2/ β -actin): 0.23 ± 0.08 比 1.00 ± 0.25 , 均 $P < 0.05$]; 与 I/R 组相比, Ozone 组大鼠 mNSS 评分和脑梗死体积占比均明显降低 [mNSS 评分 (分): 7.00 ± 1.20 比 9.63 ± 1.19 , 脑梗死体积占比: $(27.23 \pm 6.21)\%$ 比 $(41.25 \pm 2.93)\%$, 均 $P < 0.05$], 脑缺血半暗带区 mGluR5 和 GluA2 的蛋白表达水平均明显升高 [mGluR5 蛋白 (mGluR5/ β -actin): 0.81 ± 0.10 比 0.44 ± 0.14 , GluA2 蛋白 (GluA2/ β -actin): 0.76 ± 0.13 比 0.23 ± 0.08 , 均 $P < 0.05$]。结论 三氧预处理可减轻大鼠脑 I/R 损伤, 其机制可能与脑缺血半暗带区 GluR5 和 GluA2 蛋白表达上调有关。

【关键词】 三氧; 缺血 / 再灌注损伤; 脑; 谷氨酸

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目 (202004110567); 山东省自然科学基金 (ZR2017MH066, ZR2020MH017)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20211021-01533

Effects of trioxigen preconditioning on cerebral ischemia/reperfusion injury and glutamate receptor in rats

Zhang Lin, Li Yunqi, Liu Yangyang, Sun Xiaotong, Juan Zhaodong, Zhang Rui, Sun Li'na

Weifang Medical University, School of Anesthesiology, Shandong Provincial Medicine and Health Key Laboratory of Clinical Anesthesia, Weifang 261053, Shandong, China

Corresponding author: Sun Li'na, Email: sln@wfmec.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the effects of trioxigen pretreatment on cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats. **Methods** A total of 24 clean grade male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into Sham group, brain I/R group (I/R group) and Ozone pretreatment group (Ozone group), with 8 rats in each group. The animals were routinely fed, and the operation was performed 5 days after the intervention of Ozone group by intraperitoneal injection of trioxigen water (concentration 80 mg/L, 0.01 mL/g), and the Sham group and I/R group were injected with equal volume normal saline. The Sham group only separated the arteries without ligation, and the I/R group and Ozone group established the rat cerebral I/R model. Neurological deficit score (NDS) was performed 2 hours after ischemia and modified neurological deficit score (mNSS) was performed 24 hours after reperfusion. Brain tissue was collected after anesthesia. Cerebral infarction was observed by 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining and the percentage of cerebral infarction volume was calculated. Protein expression of metabolic glutamate receptor 5 (mGluR5) and ionic glutamate α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor (AMPA) subunit GluA2 in cerebral ischemic penumbra was determined by Western blotting. **Results** Compared with the Sham group, NDS score, mNSS score and percentage of cerebral infarction volume in I/R group were increased [NDS score: 2.63 ± 0.52 vs. 0, mNSS score: 9.63 ± 1.19 vs. 1.13 ± 0.64 , cerebral infarction volume: $(41.25 \pm 2.93)\%$ vs. 0%, all $P < 0.05$], and expressions of mGluR5 and GluA2 in penumbra area of cerebral ischemia were decreased [mGluR5 protein (mGluR5/ β -actin): 0.44 ± 0.14 vs. 1.00 ± 0.10 , GluA2 protein (GluA2/ β -actin): 0.23 ± 0.08 vs. 1.00 ± 0.25 , both $P < 0.05$]. Compared with the I/R group, mNSS score and percentage of cerebral infarction volume in the Ozone group were decreased [mNSS score: 7.00 ± 1.20 vs. 9.63 ± 1.19 , cerebral infarction volume: $(27.23 \pm 6.21)\%$ vs. $(41.25 \pm 2.93)\%$, both $P < 0.05$], and mGluR5 and GluA2 expressions in the penumbra of cerebral ischemia were up-regulated [mGluR5 protein (mGluR5/ β -actin):

0.81 ± 0.10 vs. 0.44 ± 0.14, GluA2 protein (GluA2/β-actin): 0.76 ± 0.13 vs. 0.23 ± 0.08, both $P < 0.05$]. **Conclusion** Trioxigen preconditioning can alleviate cerebral I/R injury in rats, and its mechanism may be related to the upregulation of GluR5 and GluA2 in the ischemic penumbra.

【Key words】 Trioxigen; Ischemia/reperfusion injury; Brain; Glutamate

Fund program: Medical and Health Science and Technology Development Program of Shandong Province (202004110567); Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2017MH066, ZR2020MH017)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20211021-01533

脑卒中是手术的严重并发症之一^[1]。缺血性脑卒中患者经过溶栓治疗后损伤的结构得到修复,阻塞的血管获得再通,但再通的血流反而使得组织和器官进一步受损,称为缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤。三氧(即 O₃)是氧的同素异形体,具有极强的氧化性,氧与三氧的混合物即是医用三氧。临床研究表明,三氧对急性脑梗死有保护作用^[2];动物研究显示,三氧预处理可减轻肝、肾、肺等器官 I/R 损伤的严重程度^[3-4],但尚无三氧在脑 I/R 损伤方面的相关研究。预处理诱导缺血耐受是脑卒中后脑抵抗增加的重要机制之一^[5]。代谢型谷氨酸受体 5 (metabotropic glutamate receptor 5, mGluR5)、离子型谷氨酸 α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸受体(α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor, AMPAR)都属于谷氨酸受体家族,研究显示,通过增强 mGluR5 信号可以阻止 AMPAR 亚基 GluA2 下调^[6],从而减轻脑缺血损伤程度^[7]。因此,本实验通过构建大鼠脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型来研究三氧预处理对大鼠脑 I/R 损伤的作用及其可能机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物: 24 只清洁级雄性 SD 大鼠, 8 周龄, 体质量 250 ~ 280 g, 购自山东济南朋悦动物繁育中心, 动物合格证号: SCXK(鲁)2019003。本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准, 经潍坊医学院实验动物伦理委员会批准(审批号: 2021SDL026)。

1.2 动物分组: 按随机数字表法分为假手术组(Sham 组)、脑 I/R 损伤组(I/R 组)和三氧预处理组(Ozone 组), 每组 8 只。

1.3 模型制备与给药: 采用线栓法^[8]制备脑 I/R 模型, 结扎右侧大脑中动脉 2 h, 然后松开结扎线再灌注 24 h; Sham 组只分离动脉, 不插入栓线。Ozone 组大鼠于制模前按 0.01 mL/g 用量每日腹腔注射三氧水(80 mg/L), Sham 组和 I/R 组大鼠输注等体积生理盐水, 3 组均每日注射 1 次, 共 5 次。三氧水由医用三氧溶于 100 mL 生理盐水中配制而成, 医用三氧由赫尔曼臭氧治疗仪(德国 Herrmann Apparatebau

公司)完成制备^[9]。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 神经功能缺损评分(neurological deficit score, NDS)测定: 大鼠缺血 2 h 后测定 NDS 评分。0 分为能够完成常规活动; 1 分为对侧前肢不能充分伸直; 2 分为行走时向对侧旋转; 3 分为行走时向对侧偏斜; 4 分为无法完成自发活动。以 NDS 评分 1 ~ 3 分为制模成功^[10]。

1.4.2 改良神经功能缺损评分(modified neurological severity scores, mNSS)测定: 大鼠再灌注 24 h 后, 采用双盲法测定 mNSS 评分^[11], 从运动实验、感觉实验、平衡木实验、反射实验 4 个方面评价神经功能缺损情况, 4 个方面测试评分之和为 mNSS 评分结果。0 分为最低分, 18 分为最高分, 得分越高说明神经功能状态越差。

1.4.3 脑梗死检测: 大鼠完成 mNSS 评分后, 于冰面上将取出的全脑置于脑槽中。冠状位切取脑组织并切片, 采用 2% 2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑(2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色液染色, 4% 多聚甲醛固定, 拍照后用 Image J 软件进行检测分析。梗死区域呈白色, 正常区域呈红色, 计算脑梗死体积占比(脑梗死体积/全脑体积 × 100%)。

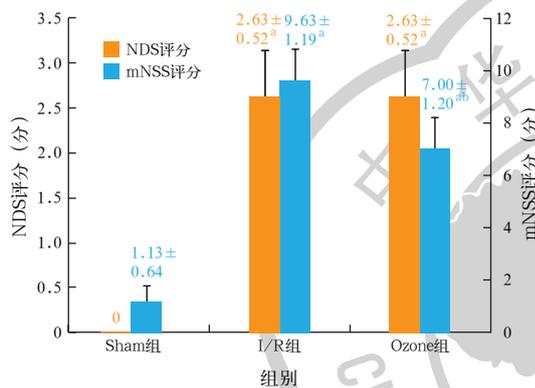
1.4.4 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 mGluR5 和 GluA2 的蛋白表达量: 大鼠完成 mNSS 评分后麻醉, 断头取脑。取出脑缺血半暗带后加入裂解液(RIPA), 按 1 mg : 10 μL 配比, 测定所需蛋白浓度。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离蛋白后, 将蛋白转至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上。室温摇床封闭 2 h, 加入一抗后 4 °C 过夜, 一抗分别为兔抗大鼠 mGluR5 受体(1 : 7 500)及兔抗大鼠 GluA2 受体(1 : 1 200); 充分漂洗后, 加入二抗室温孵育 2 h, 二抗为辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG(1 : 5 000)。Image J 软件分析比较 mGluR5 和 GluA2 与 β-肌动蛋白(β-actin)的条带灰度值, mGluR5/β-actin 和 GluA2/β-actin

分别反映 mGluR5 及 GluA2 受体的表达水平。

1.5 统计学处理:采用 SPSS 19.0 统计软件分析数据。正态分布的计量资料以均数 ± 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

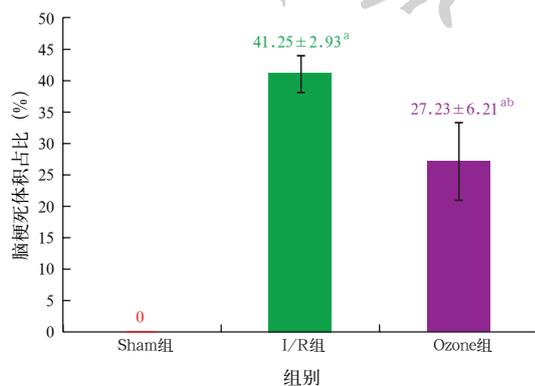
2.1 各组大鼠缺血 2 h NDS 评分和再灌注 24 h mNSS 评分比较(图 1):与 Sham 组比较, I/R 组和 Ozone 组大鼠缺血 2 h NDS 评分和再灌注 24 h mNSS 评分均明显升高(均 $P < 0.05$); 而 Ozone 组大鼠再灌注 24 h mNSS 评分明显低于 I/R 组 ($P < 0.05$)。



注: Sham 组为假手术组, I/R 组为脑缺血/再灌注(I/R)损伤组, Ozone 组为三氧预处理组; NDS 为神经功能缺损评分, mNSS 为改良神经功能缺损评分; 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 I/R 组比较, ^b $P < 0.05$

图 1 各组大鼠脑缺血 2 h 后 NDS 评分和再灌注 24 h 后 mNSS 评分比较

2.2 各组大鼠再灌注 24 h 后脑梗死体积占比比较(图 2):与 Sham 组比较, I/R 组和 Ozone 组大鼠再灌注 24 h 后脑梗死体积占比均明显升高(均 $P < 0.05$); 而 Ozone 组明显低于 I/R 组 ($P < 0.05$)。



注: Sham 组为假手术组, I/R 组为脑缺血/再灌注(I/R)损伤组, Ozone 组为三氧预处理组; 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 I/R 组比较, ^b $P < 0.05$

图 2 各组大鼠脑再灌注 24 h 后脑梗死体积占比比较

2.3 各组大鼠再灌注 24 h 后脑组织 TTC 染色情况(图 3):TTC 染色后, I/R 组和 Ozone 组大鼠脑组织均出现明显的白色梗死区域, 但 I/R 组白色梗死区域较 Ozone 组更大。

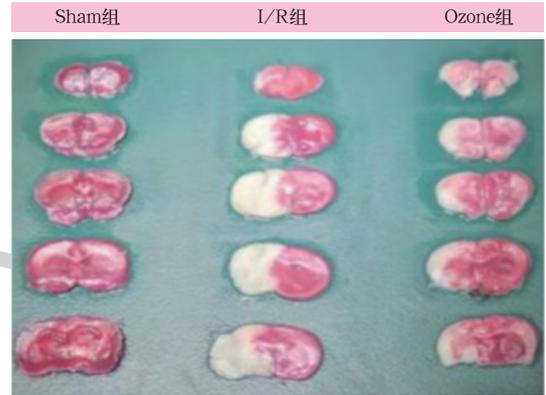
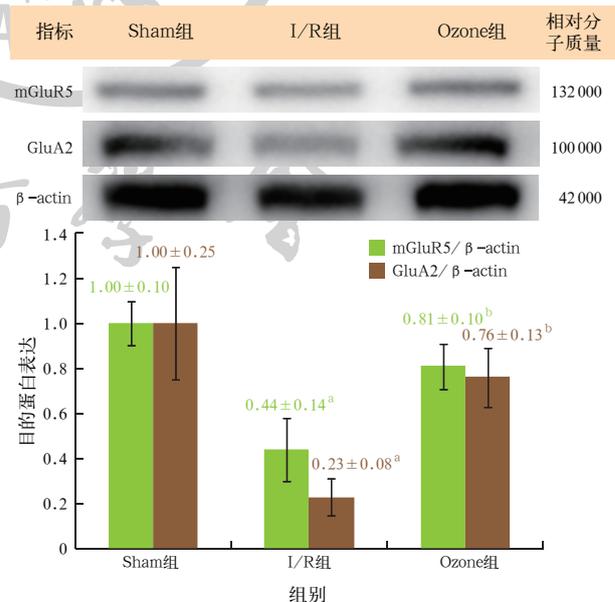


图 3 大体观察各组大鼠再灌注 24 h 后脑组织 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色情况 TTC 染色后, 正常区域呈红色, 梗死区域呈白色。假手术组(Sham 组)脑组织呈均匀一致的鲜红色, 未见白色梗死区域; 脑缺血/再灌注损伤组(I/R 组)和三氧预处理组(Ozone 组)均出现明显白色梗死区域; I/R 组白色梗死区域较 Ozone 组更大

2.4 各组大鼠再灌注 24 h 后脑组织 mGluR5 和 GluA2 蛋白表达水平比较(图 4):与 Sham 组比较, I/R 组大鼠再灌注 24 h 后脑组织 mGluR5 和 GluA2 的蛋白表达水平均明显降低(均 $P < 0.05$); 而 Ozone 组 mGluR5 和 GluA2 蛋白表达水平均明显高于 I/R 组(均 $P < 0.05$)。



Sham 组为假手术组, I/R 组为脑缺血/再灌注(I/R)损伤组, Ozone 组为三氧预处理组; mGluR5 为代谢型谷氨酸受体 5, GluA2 为离子型谷氨酸 α-氨基-3-羧基-5 甲基-4 异恶唑丙酸受体亚基; 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 I/R 组比较, ^b $P < 0.05$

图 4 蛋白质免疫印迹实验(Western blotting)检测各组大鼠再灌注 24 h 后脑组织 mGluR5 和 GluA2 的蛋白表达

3 讨论

大鼠 MCAO 模型是制备脑 I/R 模型中的一种经典模型,具有操作简单、创伤小、阻断血流效果好的优点。本实验通过 NDS 评分、mNSS 评分以及 TTC 染色结果表明脑 I/R 大鼠模型制备成功。以 0.01 mL/g 的剂量向 Ozone 组大鼠腹腔注射三氧水 (80 mg/L)^[9],干预 5 d 后进行手术, Ozone 组脑缺血 2 h NDS 评分以及再灌注 24 h mNSS 评分和脑梗死体积占比均较 I/R 组明显降低,提示三氧预处理对大鼠脑 I/R 损伤起到了一定的保护作用。

脑组织对缺氧缺血极为敏感,当脑血管阻塞后,向脑组织输送的营养物质和氧气被中断,就会引起脑缺血损伤。虽然有必要将血流重新引入梗死区,但这一行为也会因激发炎症、氧化应激和延迟性神经元死亡,从而对脑梗死区产生进一步的损害。

代谢型谷氨酸 (metabotropic glutamate receptor, mGlu) 受体根据信号转导途径和相关药理学等分为 3 个亚组 (I、II 和 III 组)^[12],其中, I 组包括 mGlu1 和 mGlu5 亚型, mGlu5 亚型是一种突触后受体,磷酸肌醇遇其水解,细胞内三磷酸肌醇的含量升高,从而使细胞处于活跃状态。有研究表明,用 VU0092273 (mGluR5 激活剂) 激活 mGluR5 对脑缺血有保护作用, mGluR5 表达量的增加可以清除过量的谷氨酸,从而维持稳态平衡,这是一种自我保护机制,可以通过增强 mGluR5 阻止 GluA2 下调,从而对脑缺血损伤起到神经保护作用^[7]。AMPA 是由 GluA1-4 亚单位组成的离子型谷氨酸受体,由于 GluA2 通道孔中的转录后修饰,大多数 AMPAR 对钙离子 (Ca²⁺) 不渗透。当发生脑 I/R 损伤时, AMPAR 经历了 1 个亚单位组成的转换,从 Ca²⁺ 不渗透、含有 GluA2 的 AMPAR,到 Ca²⁺ 渗透、缺少 GluA2 的 AMPAR^[13]。这种转换使得 AMPAR 传导过量 Ca²⁺,细胞内 Ca²⁺ 含量持续升高,从而导致延迟的选择性细胞死亡。有研究表明, I/R 诱导的含有 GluA2 的 AMPAR 亚单位的转换由氧化应激信号通路介导^[6]。

预处理被描述为呈现亚致死应激以诱导内源性适应性反应,从而增强对随后致死应激的抵抗力,保护大脑免受额外的压力,这种内源性神经保护现象在包括大脑在内的各种器官中均有报道。给予药物进行预处理产生的缺血耐受被看作是脑缺血后减轻脑损伤的重要机制之一。有研究表明,三氧表现出来的抗炎和抗氧化是通过减少血液中的炎症因子、增加超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、

降低活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平从而起作用^[14]。

本研究结果显示,与 I/R 组相比, Ozone 组大鼠脑缺血半暗带区 mGluR5 和 GluA2 表达上调,提示三氧预处理可通过增强脑缺血半暗带区 mGluR5 和 GluA2 的蛋白表达来减轻大鼠脑 I/R 损伤。三氧预处理上调 mGluR5 和 GluA2 的蛋白表达可能与其减轻氧化应激反应或炎症反应有关,这或许是三氧预处理保护脑 I/R 损伤的一个重要机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国中西医结合学会急救医学专业委员会. 中国急性缺血性脑卒中中西医结合急诊诊治专家共识 [J]. 中华危重病急救医学, 2018, 30 (3): 193-197. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.03.001.
- [2] 邹仁林, 薛彬, 郭静, 等. 医用三氧大自血疗法治疗急性脑梗死的临床观察 [J]. 中国实用内科学杂志, 2018, 38 (S2): 50-53. DOI: 10.19538/j.nk2018S20302.
- [3] Di Filippo C, Marfella R, Capodanno P, et al. Acute oxygen-ozone administration to rats protects the heart from ischemia reperfusion infarct [J]. *Inflamm Res*, 2008, 57 (10): 445-449. DOI: 10.1007/s00011-008-7237-0.
- [4] Wang ZW, Zhang A, Meng WX, et al. Ozone protects the rat lung from ischemia-reperfusion injury by attenuating NLRP3-mediated inflammation, enhancing Nrf2 antioxidant activity and inhibiting apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 835: 82-93. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.07.059.
- [5] Baranovicova E, Kalenska D, Grendar M, et al. Metabolomic recovery as a result of ischemic preconditioning was more pronounced in hippocampus than in cortex that appeared more sensitive to metabolomic blood components [J]. *Metabolites*, 2021, 11 (8): 516. DOI: 10.3390/metabo11080516.
- [6] Achzet LM, Davison CJ, Shea M, et al. Oxidative stress underlies the ischemia/reperfusion-induced internalization and degradation of AMPA receptors [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (2): 717. DOI: 10.3390/ijms22020717.
- [7] Cavallo D, Landucci E, Gerace E, et al. Neuroprotective effects of mGluR5 activation through the PI3K/Akt pathway and the molecular switch of AMPA receptors [J]. *Neuropharmacology*, 2020, 162: 107810. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2019.107810.
- [8] 李国福, 贾佳, 符加红, 等. 异氟烷预处理或后处理对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (6): 431-435. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.06.013.
- [9] 芦国芳, 安建雄, 马钧, 等. 三氧可通过减轻小鼠脑小胶质细胞激活预防抑郁症发生 [J]. 转化医学杂志, 2018, 7 (1): 20-26. DOI: 10.3969/j.issn.2095-3097.2018.01.006.
- [10] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20 (1): 84-91. DOI: 10.1161/01.str.20.1.84.
- [11] Bonilla C, Zurita M, Otero L, et al. Failure of delayed intravenous administration of bone marrow stromal cells after traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2012, 29 (2): 394-400. DOI: 10.1089/neu.2011.2101.
- [12] Sun YJ, Feng X, Ding Y, et al. Phased treatment strategies for cerebral ischemia based on glutamate receptors [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 168. DOI: 10.3389/fncel.2019.00168.
- [13] Zhai DX, Li SP, Wang M, et al. Disruption of the GluR2/GAPDH complex protects against ischemia-induced neuronal damage [J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 54: 392-403. DOI: 10.1016/j.nbd.2013.01.013.
- [14] Azuma K, Mori T, Kawamoto K, et al. Anti-inflammatory effects of ozonated water in an experimental mouse model [J]. *Biomed Rep*, 2014, 2 (5): 671-674. DOI: 10.3892/br.2014.290.

(收稿日期: 2021-10-21)