

## 低氧预处理诱导促红细胞生成素对脑缺血后损伤及认知功能的保护作用

王震虹, 王祥瑞

(上海交通大学医学院附属仁济医院麻醉科, 上海 200127)

**【摘要】** 目的 观察低氧预处理(HPC)对全脑缺血/再灌注(I/R)5 d后大鼠认知功能(学习、记忆)障碍的改善作用及对促红细胞生成素(EPO)表达的调节作用,探讨 HPC 对 I/R 致海马区损伤的保护作用机制。方法 成年健康雄性 SD 大鼠 120 只被随机分为假手术组、I/R 组、HPC 24 h 组(脑缺血前 24 h 低氧)、HPC 48 h 组(脑缺血前 48 h 低氧)4 组。于术后 5 d 进行运动功能实验、被动躲避实验和水迷宫实验,测定大鼠的认知功能;用苏木素-伊红(HE)染色,检测脑海马区组织病理学变化;再灌注后 1 h 和 4 h 用免疫组化测定海马 CA1 和 CA3 区 EPO 蛋白含量。结果 运动功能实验、被动躲避实验和水迷宫实验测定显示,I/R 能损害大鼠的认知功能;HPC 组大鼠的认知功能均得到显著改善,且 HPC 48 h 组较 HPC 24 h 组改善更显著( $P < 0.05$ )。HPC 组神经细胞的坏死程度减轻,且在 HPC 48 h 组更显著。HPC 组在全脑 I/R 后 1 h 和 4 h 海马 CA1 和 CA3 区的 EPO 蛋白表达均明显增加,HPC 48 h 组作用更明显( $P$  均  $< 0.05$ );并且 EPO 蛋白含量与认知功能呈正相关[CA1 区相关系数( $r$ )=0.744,CA3 区  $r=0.822$ , $P$  均  $< 0.01$ ]。结论 全脑 I/R 可导致神经细胞坏死并引发 I/R 后短期内(5 d)的认知功能障碍;HPC 能减轻 I/R 损伤、改善缺血引起的认知功能障碍,且缺血前 48 h 的 HPC 保护作用更强。HPC 可促进 EPO 在海马 CA1 和 CA3 区的表达,这也可能是 HPC 脑保护和改善认知功能障碍的机制之一。

**【关键词】** 缺血/再灌注损伤,脑;低氧预处理;认知功能;细胞坏死;促红细胞生成素

中图分类号:R459.6;R743 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2008)06-0365-05

**The protective role of erythropoietin induced by hypoxic preconditioning on cerebral injury and cognition after global cerebral ischemia** WANG Zhen-hong, WANG Xiang-rui. *Anesthesiology Department of Renji Hospital, Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China*  
Corresponding author: WANG Xiang-rui (Email: xiangruiwang@vip.sina.com)

**【Abstract】** **Objective** To observe the protective effects of hypoxic preconditioning (HPC) on the improvement of the cognitive dysfunction (learning and memory) and the damage in hippocampus induced by global cerebral ischemia/reperfusion (I/R) in CA1 and CA3 for 5 days in rats, and on the regulation of expression of erythropoietin (EPO) protein to approach the mechanism of the protection. **Methods** One hundred and twenty adult male Sprague-Dawley (SD) rats were divided into four groups randomly; sham group, I/R group, HPC24 group (hypoxia for 24 hours before I/R) and HPC48 group (hypoxia for 48 hours before I/R). Hang (motor function), passive avoidance and Morris water maze tests were carried out on the 5th day after I/R to measure the motor and cognition functions; hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detected histopathological changes in hippocampus tissues; and the contents of EPO were tested by immunohistochemistry at 1 hour and 4 hours after I/R from hippocampus CA1 and CA3 regions. **Results** Hang, passive avoidance and Morris water maze tests showed that I/R can injure rat cognition; the improvement of cognition was marked in HPC groups, and it was shown that the effects were more significant in HPC48 group than those in the HPC24 group ( $P < 0.05$ ). Pathological analyses indicated that the necrotic nerve cells decreased in HPC24 and HPC48 groups, and the decrease was more obvious in the latter group than that in the former group. The contents of EPO increased at 1 hour and 4 hours after global I/R in HPC groups, and a more obvious result was obtained in HPC48 group ( $P < 0.05$ ). The correlation between the contents of EPO and cognition was positive [correlation coefficient ( $r$ )=0.744 in CA1,  $r=0.822$  in CA3, both  $P < 0.01$ ]. **Conclusion** Global I/R can induce nerve cell necrosis and cognitive dysfunction in short-term (5 days). HPC can protect nerve cells against I/R injury and improve cognition dysfunction induced by ischemia, and HPC for 48 hours immediately before I/R plays a more effective role on I/R injury than HPC for 24 hours. HPC can promote the expression of EPO in CA1 and CA3 of hippocampus that may be one of the mechanisms for the protection of HPC on brain and improvement of cognition dysfunction.

**【Key words】** global ischemia/reperfusion injury; hypoxic preconditioning; cognition; cellular necrosis; erythropoietin

全脑缺血/再灌注(I/R)是临床上许多疾病和手术过程中常见的病理过程,并影响疾病病程和手术预后。脑 I/R 是引起认知功能障碍的主要原因之一,研究发现,动物短时间暴露在适度低氧环境中 1~2 d 可起到对大脑和心肌缺血的保护作用<sup>[1]</sup>。低氧预处理(HPC)的机制复杂,有研究证明低氧诱导因子(HIF)及其调节的下游蛋白促红细胞生成素(EPO)在 HPC 过程中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。本研究探讨了不同时间接受 HPC 对认知功能的影响及对脑细胞 EPO 的作用,且分析 EPO 和认知功能间的相关性,初步阐明 HPC 对认知功能作用的机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 动物及分组:**成年健康雄性 SD 大鼠 120 只,体重 300~350 g(中科院上海动物中心提供,SCXK 2003-0003)。按随机数字表法分为假手术(sham)组、I/R 组、HPC 24 h 组、HPC 48 h 组,每组 30 只。sham 组大鼠只进行双侧颈动脉、颈静脉和股动脉分离,不做任何干预;I/R 组大鼠不经过低氧过程,动脉压降低后夹闭双侧颈动脉 10 min;HPC 24 h 组和 HPC 48 h 组在脑 I/R 前 24 h 和 48 h 给予 HPC。每组于再灌注后 1 h 和 4 h 各取 10 只进行免疫组化检测;另外 10 只进行认知功能和病理学检测。

**1.2 全脑 I/R 模型制备及 HPC:**按 Konstantin 的方法<sup>[3]</sup>并加以改进进行低氧,采用自制低氧密封箱使大鼠在体积分数为 8% 的氧气中停留 3 h。用体积分数为 10% 的水合氯醛以 3 ml/kg 腹腔注射麻醉大鼠。分离左侧股动脉进行血压监测、抽血降压、动脉血气分析;放置脑电图电极针监测脑电图变化。从股动脉抽血 6~10 ml,使平均动脉压(MAP)降至 25~30 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa),用动脉夹夹闭双侧颈动脉 10 min,用回输血维持动脉压,缺血效果以脑电图波形确认,缺血结束后将抽出的血回输,并松开动脉夹。颈静脉注射质量分数为 5% 的 NaHCO<sub>3</sub> 1 ml 以抵消体内酸中毒,根据大鼠血压补充平衡液 1~2 ml。将大鼠置于高氧浓度环境中恢复至大鼠的反射正常。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 运动功能实验:**于 I/R 后 5 d 检测大鼠抓握

和前肢肌力。将大鼠双上肢悬挂在距地面 20 cm 的绳子上,记录 3 次悬挂时间,计算平均值并评分,≤2 s 为 0 分,≤3 s 为 1 分,≤4 s 为 2 分,≤6 s 为 3 分,≤8 s 为 4 分,≤10 s 为 5 分,≤12 s 为 6 分,≤14 s 为 7 分,≤16 s 为 8 分,>16 s 为 9 分。

**1.3.2 被动躲避实验:**检验大鼠学习和记忆能力。根据大鼠在进入黑隔间之前在白隔间停留时间判断大鼠对电击不良学习、记忆的能力,停留时间越长说明学习越快,记忆越好。实验过程分为驯化阶段、采集阶段和记忆阶段(Otano 1999)3 个阶段。

**1.3.3 Morris 水迷宫实验:**I/R 5 d 开始,实验共进行 5 d,在前 4 d 每日主要记录潜伏期(找到站台时间)、总路程、校正后平均站台接近值,5 d 时记录大鼠在第三象限活动时间和穿越站台的次数。总路程、潜伏期越小说明大鼠的学习和记忆能力越强,第三象限互动时间、站台穿越次数则相反。

**1.3.4 病理学观察:**在结束水迷宫实验后处死大鼠取脑,采用苏木素-伊红(HE)染色,在固定区域内计数脑组织海马 CA1 和 CA3 区的存活细胞个数,结果用 Axioplan 2 imaging 图像分系统分析。

**1.3.5 EPO 蛋白测定:**用免疫组化分析方法测定 I/R 后 1 h 和 4 h 脑组织海马 CA1 和 CA3 区 EPO 蛋白表达,结果用上述图像分系统分析。

**1.4 统计学分析:**采用 SPSS 10.0 统计软件分析。数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,血气分析、运动功能、病理学指标用单因素方差分析(ANOVA);水迷宫数据采用重复数据方差分析,相关分析采用 Spearman 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 脑电图检查:**在 MAP 降低后夹闭双侧颈动脉,脑电波变为低平、波形减少,说明脑存在 I/R,模型制备成功。

**2.2 运动功能实验和被动躲避实验(表 1):**与 sham 组比较,I/R 组大鼠抓握功能明显下降;学习和记忆能力明显减弱,停留时间明显减少。HPC 组运动功能有显著改善,学习和记忆能力改善,停留时间显著延长,并且 HPC 48 h 组较 HPC 24 h 组悬挂和停留时间更长( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

**2.3 Morris 水迷宫实验(表 1~2):**各组 4 d 内随时间延长潜伏期和总路程均缩短。与 sham 组比较,I/R 组潜伏期和总路程明显延长;HPC 组总路程则

通信作者:王祥瑞,Email:xiangruiwang@vip.sina.com

作者简介:王震虹(1976-),女(汉族),山西省人,麻醉学博士,医师,Email:hongwzh@gmail.com.

较 I/R 组显著缩短,且 HPC 48 h 组比 HPC 24 h 组明显缩短( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与 sham 组比较, I/R 组第三象限活动时间和穿越站台次数均明显缩减, HPC 组则较 I/R 组明显增加,而且 HPC 48 h 组较 HPC 24 h 组增加更明显( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

表 1 各组大鼠运动功能、被动躲避实验及水迷宫第三象限活动时间和穿越站台次数比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	运动功能评分(分)	躲避停留时间(s)	第三象限活动时间(s)	穿越站台次数(次)
sham 组	5.30±0.48	37.50±6.34	38.40±6.95	4.20±1.11
I/R 组	2.90±0.57 <sup>a</sup>	9.80±2.62 <sup>a</sup>	21.85±7.04 <sup>a</sup>	1.80±0.53 <sup>a</sup>
HPC 24 h 组	3.90±0.32 <sup>b</sup>	22.90±3.84 <sup>b</sup>	27.67±4.28 <sup>b</sup>	2.75±0.59 <sup>b</sup>
HPC 48 h 组	4.70±0.48 <sup>bc</sup>	27.30±3.62 <sup>bc</sup>	33.16±3.93 <sup>bc</sup>	3.45±0.68 <sup>bc</sup>

注:与 sham 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 I/R 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 HPC 24 h 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

2.4 病理学检测(表 3):I/R 组海马 CA1 和 CA3 区的坏死神经元数量较 sham 组明显增加, HPC 后死亡细胞数较 I/R 组明显减少( $P$  均  $< 0.05$ ), HPC 48 h 组较 HPC 24 h 组改善更明显( $P$  均  $< 0.05$ ), 但各组 CA1 和 CA3 之间差异并无统计学意义。

2.5 免疫组化测定 EPO 蛋白含量(表 3):I/R 后 1 h EPO 含量即明显增加( $P$  均  $< 0.01$ ), 4 h 的表达量显著高于 1 h( $P$  均  $< 0.05$ )。但各组不同时间点 CA1 和 CA3 海马区 EPO 含量并无明显差异( $P$  均  $> 0.05$ )。HPC 组 EPO 含量均显著高于 I/R 组( $P$  均  $< 0.01$ ), 也呈现 I/R 4 h 表达量大于 1 h 的趋势( $P$  均  $< 0.05$ )。且 HPC 48 h 组 EPO 含量较 HPC 24 h 组增加更明显( $P$  均  $< 0.05$ ); 但两组

CA1 和 CA3 间差异并无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ )。

2.6 EPO 蛋白含量与认知功能的相关性分析:对 各组 I/R 4 h 在海马 CA1、CA3 区的 EPO 含量与大鼠被动躲避实验的相关性分析显示, CA1 区相关系数( $r$ )=0.744, CA3 区  $r$ =0.822,  $P$  均  $< 0.01$ , 说明 CA1 和 CA3 区的 EPO 蛋白含量变化与认知功能改变之间存在密切相关性, 且为正相关, 而且不相关性假设的  $P$  值是  $< 0.01$ 。

### 3 讨论

在临床手术后认知障碍特别是体外循环术后出现认知障碍比较常见, 脑缺血是引起认知障碍的主要原因之一<sup>[3]</sup>。在动物实验中发现脑缺血后海马损伤与学习、记忆密切相关, 在大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型上进行了相关的实验证实, 局部脑缺血可以引起术后认知障碍<sup>[4-7]</sup>; Wiard 等<sup>[8]</sup>在大鼠全脑缺血模型上进行了相似的实验, 显示全脑缺血同样可以损害认知功能。本实验中我们发现大鼠全脑 I/R 后认知功能明显障碍, 抓握力和前肢肌力显著降低, 被动躲避和水迷宫实验的表现均比 sham 组差, 学习和记忆能力明显减退。说明全脑 I/R 能损伤海马 CA1 和 CA3 区细胞引起术后数日的认知障碍。

HPC 是指一次或多次短暂、非致死性低氧刺激后, 机体获得的对更严重甚至致死性缺血或缺氧的耐受性<sup>[1]</sup>。预处理是机体抗缺氧或缺血的一种内源性保护现象, 它不仅存在于多种动物的心脏, 而且也存在于肝、肾和脑等多种组织、器官和细胞中<sup>[9-10]</sup>。研究已证实, 缺血预处理能减轻脑损伤<sup>[11]</sup>。HPC 能

表 2 各组大鼠在水迷宫实验中总路程和潜伏期结果比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	水迷宫实验的潜伏期(s)				水迷宫实验的总路程(cm)			
	1 d	2 d	3 d	4 d	1 d	2 d	3 d	4 d
sham 组	55.2±4.6	28.0±6.7	22.9±3.7	13.9±2.3	3 339.4±325.6	2 415.2±199.5	1 506.3±323.7	906.7±80.4
I/R 组	86.2±6.3 <sup>a</sup>	69.2±5.8 <sup>a</sup>	56.6±12.1 <sup>a</sup>	40.7±4.2 <sup>a</sup>	6 736.5±731.7	5 221.2±633.9 <sup>a</sup>	3 752.7±399.2 <sup>a</sup>	2 472.6±332.4 <sup>a</sup>
HPC 24 h 组	73.4±13.7 <sup>b</sup>	51.6±10.2 <sup>b</sup>	30.4±9.2 <sup>b</sup>	25.2±4.3 <sup>b</sup>	5 260.5±1 033.8	3 253.8±445.1 <sup>b</sup>	2 237.1±330.8 <sup>bc</sup>	1 420.6±317.4 <sup>b</sup>
HPC 48 h 组	65.9±13.2 <sup>bc</sup>	44.0±7.9 <sup>bc</sup>	25.3±6.9 <sup>bc</sup>	19.8±4.8 <sup>bc</sup>	4 028.6±442.3	2 745.7±380.7 <sup>bc</sup>	1 856.4±479.0 <sup>bc</sup>	1 048.0±116.0 <sup>bc</sup>

注:与 sham 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 I/R 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 HPC 24 h 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

表 3 各组大鼠死亡细胞数及再灌注 1 h 和 4 h 海马不同区域 EPO 蛋白含量比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	死亡细胞数(%)		1 h EPO(%)		4 h EPO(%)	
	CA1	CA3	CA1	CA3	CA1	CA3
sham 组	9.1±2.8	10.1±1.9	5.07±0.68	4.86±1.22	5.93±1.39 <sup>d</sup>	6.61±0.60 <sup>d</sup>
I/R 组	52.2±13.8 <sup>a</sup>	57.5±10.8 <sup>a</sup>	18.65±1.64 <sup>a</sup>	18.54±1.12 <sup>a</sup>	28.38±1.92 <sup>ad</sup>	27.59±2.29 <sup>ad</sup>
HPC 24 h 组	26.8±3.3 <sup>b</sup>	27.1±3.9 <sup>b</sup>	38.57±1.81 <sup>b</sup>	37.56±1.32 <sup>b</sup>	49.51±2.39 <sup>bd</sup>	49.30±2.36 <sup>bd</sup>
HPC 48 h 组	18.5±3.5 <sup>bc</sup>	17.1±3.8 <sup>bc</sup>	53.83±3.42 <sup>bc</sup>	53.17±2.92 <sup>bc</sup>	61.05±3.42 <sup>bd</sup>	59.26±5.17 <sup>bd</sup>

注:与 sham 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 I/R 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 HPC 24 h 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与 1 h EPO 同指标比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$

减轻缺血、缺氧以及再灌注后的脑细胞坏死。Rising 等<sup>[12]</sup>和 Vannucci 等<sup>[13]</sup>实验均证明了 HPC 能减轻缺血后脑损伤。在本实验中我们也有相似的发现, I/R 组海马区死亡细胞数明显增加; HPC 组的海马区死亡细胞数较 I/R 组明显减少, 且 HPC 48 h 组较 HPC 24 h 组死亡细胞比例更小; 各组海马 CA1 和 CA3 区的细胞死亡比较并无明显差异。

Gustarsson 等<sup>[14]</sup>发现, 新生鼠在缺血、缺氧后短期(1 周)或长期(4 周)可出现认知功能障碍, 而 24 h 前进行 HPC 可明显改善短期和长期内出现的认知功能障碍。本实验中我们使用成年大鼠全脑 I/R 模型, 并采用缺血前 24 h 和 48 h 两个时段的 HPC, 结果显示 HPC 确能改善脑损伤后的认知障碍, 在学习和记忆方面均有改善作用, 而且观察到 HPC 48 h 组大鼠的认知改善程度比 HPC 24 h 组更明显, 说明在缺血前 48 h 进行 HPC 更有效。

EPO 是受缺氧调节的糖蛋白类激素, 过去认为是胎肝和肾脏产生的造血因子<sup>[15-16]</sup>; 近来文献报道 EPO 具有神经保护作用<sup>[17]</sup>。Bernaudin 等<sup>[18]</sup>研究发现, 小鼠局灶性脑 I/R 后神经元、星形胶质细胞和内皮细胞均有 EPO 的表达; 朱红灿等<sup>[19]</sup>和许予明等<sup>[20]</sup>也报道了脑 I/R 后 EPO 的表达结果。本研究显示, I/R 1 h 海马神经细胞内的 EPO 蛋白含量已有显著增加, 并随着时间继续增加; EPO 在海马 CA1 和 CA3 两个区含量均有显著变化, 但两区之间并无明显差异。

研究证实 I/R 后脑源性 EPO 表达是机体的保护机制, EPO 具有减少一氧化氮(NO)介导的氧自由基形成、减轻兴奋性氨基酸毒性作用、抑制神经元凋亡、抗炎及促进血管形成等神经保护作用<sup>[19]</sup>; EPO 在全脑缺血后延迟了神经细胞的死亡, 保护了海马神经元<sup>[21]</sup>; 在大鼠 MCAO 模型上也发现, EPO 抑制了缺血区的程序性细胞死亡<sup>[22]</sup>。EPO 还可抑制缺血细胞谷氨酸的胞吐作用, 抑制谷氨酸在相应受体上的活性, 而神经细胞谷氨酸受体的过分活跃会导致 NO 过量产生和超氧化物反应后形成过亚硝酸盐诱导细胞死亡<sup>[23]</sup>。EPO 与其受体结合使 JAK2 和 STAT-5 磷酸化, 同时激活 STAT-5 和核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)转移到核内与 DNA 结合, 促进抗凋亡基因的表达<sup>[24]</sup>。许予明等<sup>[20]</sup>研究结果显示, 从时间和空间上看, I/R 后 EPO 表达和神经元渐进性病理改变一致, 缺血早期 EPO 在基底节神经元内表达, 抑制神经元死亡, 随着缺血加重, 中心区的细胞死亡, EPO 表达减少, 而周边的 EPO 增多, 保护了

细胞的存活, 说明缺血后内源性 EPO 对神经元具有保护作用。

有研究发现 HPC 后可诱导 EPO 在体内大量表达<sup>[25-26]</sup>。Prass 等<sup>[27]</sup>在大鼠局灶性脑缺血模型的研究中发现, 缺血前 48 h 和 72 h 加以 HPC 能避免海马区脑组织的缺血性损伤, 并能诱导 EPO 大量表达, 且 HPC 后 3 d 作用最明显, 使用 EPO 受体拮抗后其保护作用明显减弱。本研究结果显示, 不论缺血前 24 h 还是 48 h 的 HPC 均能刺激海马神经细胞内 EPO 表达, 但在海马 CA1 和 CA3 区间并无明显差异, 说明 HPC 对这两个区域的作用一样; 而且 I/R 4 h EPO 蛋白含量较 1 h 升高更明显, 这可能是缺血刺激的作用。在实验中还观察到, 缺血前 48 h HPC 诱导的 EPO 表达更显著, 这和病理分析的结果一致, 表明了缺血前 48 h HPC 保护作用更有效, 同时可以推测 EPO 参与了这种作用。

Catania 等<sup>[28]</sup>发现外源性的 EPO 可以改善认知功能, 而本实验发现 HPC 诱导的脑 EPO 蛋白表达与认知功能呈正相关, 这说明内源性 EPO 蛋白表达有相似的作用, 参与了改善认知功能的作用, 并且与 CA3 区 EPO 蛋白含量的相关性更强, 提示在 EPO 参与改善全脑 I/R 后的认知功能障碍机制中, CA3 区起到了更重要的作用。

综上所述, HPC 特别是缺血前 48 h 的 HPC 能阻止全脑 I/R 后的神经损伤, 减轻神经细胞凋亡, 改善 I/R 后认知功能障碍; 诱导海马 EPO 蛋白表达可能是其保护机制之一。

#### 参考文献

- [1] Sharp FR, Ran R, Lu A, et al. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury [J]. *Neurobiol Dis*, 2004, 1(1): 26-35.
- [2] 杜林林, 王朝晖. 低氧诱导因子-1 $\alpha$  在大鼠心肌梗死中的表达及其意义 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2006, 13(6): 367-369.
- [3] Harmon D, Eustace N, Ghori K, et al. Plasma concentrations of nitric oxide products and cognitive dysfunction following coronary artery bypass surgery [J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2005, 22(4): 269-276.
- [4] Wahl F, Allix M, Plotkine M, et al. Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 1992, 23(2): 267-272.
- [5] Markgraf CG, Green EJ, Hurwitz BE, et al. Sensorimotor and cognitive consequences of middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Brain Res*, 1992, 575(2): 238-246.
- [6] Smith SE, Hodges H, Sowinski P, et al. Long-term beneficial effects of BW619C89 on neurological deficit, cognitive deficit and brain damage after middle cerebral artery occlusion in the rat [J]. *Neuroscience*, 1997, 77(4): 1123-1135.
- [7] Yamamoto M, Tamura A, Kirino T, et al. Behavioral changes

- after focal cerebral ischemia by left middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Brain Res, 1988, 452(1-2): 323-328.
- [8] Wiard RP, Dickerson MC, Beek O, et al. Neuroprotective properties of the novel antiepileptic lamotrigine in a gerbil model of global cerebral ischemia[J]. Stroke, 1995, 26(3): 466-472.
- [9] Webster KA, Discher DJ, Bishopric NH. Cardioprotection in an in vitro model of hypoxic preconditioning[J]. J Mol Cell Cardiol, 1995, 27(1): 453-458.
- [10] Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, et al. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cerebral ischemic preconditioning[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(10): 4666-4670.
- [11] 赵翠, 熊利泽, 董海龙, 等. 远程缺血预处理对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(6): 340-342.
- [12] Rising CL, D'Alecy LG. Hypoxia-induced increases in hypoxic tolerance augmented by β-hydroxybutyrate in mice[J]. Stroke, 1989, 20(9): 1219-1225.
- [13] Vannucci RC, Towfighi J, Vannucci SJ. Hypoxic preconditioning and hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat; pathologic and metabolic correlates[J]. J Neurochem, 1998, 71(3): 1215-1220.
- [14] Gustarsson M, Anderson MF, Mallard C, et al. Hypoxic preconditioning confers long-term reduction of brain injury and improvement of neurological ability in immature rats[J]. Pediatr Res, 2005, 57(2): 305-309.
- [15] Ratcliffe PJ. Molecular biology of erythropoietin[J]. Kidney Int, 1993, 44(4): 887-904.
- [16] Semenza GL. Regulation of erythropoietin production, new insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 1994, 8(5): 863-884.
- [17] Marti HH, Bernaudin M, Petite E, et al. Neuroprotection and angiogenesis: dual role of erythropoietin in brain ischemia[J]. News Physiol Sci, 2000, 15: 225-229.
- [18] Bernaudin M, Marti HH, Rnussel S, et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1999, 19(6): 643-651.
- [19] 朱红灿, 孙圣刚, 李红戈. 脑源性促红细胞生成素在短暂性脑缺血沙土鼠海马的表达变化[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2003, 12(1): 22-25.
- [20] 许予明, 朱红灿, 张博爱, 等. 缺血再灌注大鼠脑内促红细胞表达的变化[J]. 基础医学与临床, 2004, 24(4): 398-402.
- [21] Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage[J]. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95(8): 4635-4640.
- [22] Sirén AL, Fratelli M, Brines M, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress[J]. Proc Natl Acad Sci, 2001, 98(7): 4044-4049.
- [23] Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, et al. Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia[J]. J Biol Chem, 2001, 276(42): 39469-39475.
- [24] Silva M, Grillot D, Benito A, et al. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2[J]. Blood, 1996, 88(5): 1576-1582.
- [25] Tang Y, Pacary E, Fréret T, et al. Effect of hypoxic preconditioning on brain genomic response before and following ischemia in the adult mouse: identification of potential neuroprotective candidates for stroke[J]. Neurobiol Dis, 2006, 21(1): 18-28.
- [26] 陈伟, 陈家佩, 葛世丽, 等. 低氧对大鼠肝肾组织内红细胞生成素和低氧诱导因子-1α 基因表达的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(1): 9-12.
- [27] Prass K, Scharff A, Ruscher K, et al. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin[J]. Stroke, 2003, 34(8): 1981-1986.
- [28] Catania MA, Marciano MC, Parisi A, et al. Erythropoietin prevents cognition impairment induced by transient brain ischemia in gerbils[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 437(3): 147-150.

(收稿日期: 2008-07-30 修回日期: 2008-08-30)

(本文编辑: 李银平)


• 科研新闻速递 •

肌球蛋白轻链激酶的变化影响严重创伤后急性肺损伤的发展

以往研究报道, 肌球蛋白轻链激酶(MYLK)单核苷酸多态性表达是脓毒症诱发急性肺损伤(ALI)和哮喘的危险因素之一。MYLK 能对炎症过程中(如细胞凋亡、血管通透性改变和白细胞渗出等)复杂的蛋白亚型进行编码。美国科研人员研究了严重创伤引起 ALI 发展过程中 MYLK 的变化。研究共纳入 273 例严重创伤患者(创伤严重度评分≥16 分), 由 3 名临床医生查阅所有 X 线胸片和临床资料, 将 ALI 归为一类。MYLK 中总共有 17 个标记单核苷酸多态性属于基因型, 逐个分析单核苷酸多态性水平, 采用复杂的逻辑回归模型调节基线变量, 进行 2~5 个单核苷酸多态性单倍型分析。在创伤发生 5 d 内, 273 例受试者中有 91 例符合 ALI 标准(33%)。3 个编码单核苷酸多态性分别与 ALI 相关, 21 位组氨酸(CC 基因, 比值比=1.87, 95%可信区间(CI)1.06~3.33, P=0.022)和 147 位丝氨酸(TT, 比值比=2.13, 95%CI 1.14~4.10, P=0.011)频率高于 335 位苏氨酸(CC 基因, 比值比=0.42, 95%CI 0.20~0.85, P=0.010)。这些关联在遭受创伤的非裔美国人身上更加明显。多元统计分析显示, 每个 ALI MYLK 单核苷酸多态性的关联性 with 年龄、创伤严重度评分、急性生理学与慢性健康状况评分系统 III (APACHE III) 评分以及损伤机制无关。单倍型分析显示, 重度 ALI 与 2~4 个单核苷酸多态性相关, 其中均有组氨酸(P<0.008)。尽管影响方式不同, 但先前与非裔美国人脓毒症诱导的 ALI 和严重哮喘有关的 3 个 MYLK 编码单核苷酸多态性, 也同样影响 ALI 的发展。研究者认为, 该结果证实了以往的观点, MYLK 是明确 ALI 的危险因子, 而不是脓毒症的危险因子。

张立俭, 编译自《Crit Care Med》, 2008-08-28(电子版); 胡森, 审核

# 低氧预处理诱导促红细胞生成素对脑缺血后损伤及认知功能的保护作用

作者: [王震虹](#), [王祥瑞](#), [WANG Zhen-hong](#), [WANG Xiang-ru](#)  
作者单位: [上海交通大学医学院附属仁济医院麻醉科, 上海, 200127](#)  
刊名: [中国中西医结合急救杂志](#)   
英文刊名: [CHINESE JOURNAL OF INTEGRATED TRADITIONAL AND WESTERN MEDICINE IN INTENSIVE AND CRITICAL CARE](#)  
年, 卷(期): 2008, 15(6)  
被引用次数: 3次

## 参考文献(28条)

1. [Catania MA;Marciano MC;Parisi A Erythropoietin prevents cognition impairment induced by transient brain ischemia in gerbils](#) 2002(03)
2. [Prass K;Scharff A;Ruscher K Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin](#) 2003(08)
3. [陈伟;陈家佩;葛世丽 低氧对大鼠肝肾组织内红细胞生成素和低氧诱导因子-1 \$\alpha\$  基因表达的影响\[期刊论文\]-中国危重病急救医学](#) 2004(01)
4. [Tang Y;Pacary E;Fréret T Effect of hypoxic preconditioning on brain genomic response before and following ischemia in the adult mouse:identification of potential neuroprotective candidates for stroke](#) 2006(01)
5. [Silva M;Grillot D;Benito A Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2](#) 1996(05)
6. [Kawakami M;Sekiguchi M;Sato K Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia](#) 2001(42)
7. [Wiard RP;Dickerson MC;Beck O Neuroprotective properties of the novel antiepileptic lamotrigine in a gerbil model of global cerebral ischemia](#) 1995(03)
8. [Yamamoto M;Tamura A;Kirino T Behavioral changes after focal cerebral ischemia by left middle cerebral artery occlusion in rats](#) 1988(1-2)
9. [Smith SE;Hodges H;Sowinski P Long-term beneficial effects of BW619C89 on neurological deficit, cognitive deficit and brain damage after middle cerebral artery occlusion in the rat](#) 1997(04)
10. [Markgraf CG;Green EJ;Hurwitz BE Sensorimotor and cognitive consequences of middle cerebral artery occlusion in rats](#) 1992(02)
11. [Wahl F;Allix M;Plotkine M Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats](#) 1992(02)
12. [Harmon D;Eustace N;Ghori K;et al Plasma concentrations of nitric oxide products and cognitive dysfunction following coronary artery bypass surgery](#) 2005(04)
13. [Webster KA;Discher DJ;Bishopric NH Cardioprotection in an in vitro model of hypoxic preconditioning](#) 1995(01)
14. [Vannucci RC;Towfighi J;Vannucci SJ Hypoxic preconditioning and hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat:pathologic and metabolic correlates](#) 1998(03)

15. [Rising CL;D'Alecy LG Hypoxia-induced increases in hypoxic tolerance augmented by  \$\beta\$ -hydroxybutyrate in mice](#) 1989(09)
16. [Ratcliffe PJ Molecular biology of erythropoietin](#) 1993(04)
17. [Gnstarsson M;Anderson MF;Mallard C Hypoxic preconditioning confers long-term reduction of brain injury and improvement of neurological ability in immature rats](#) 2005(02)
18. [Sharp FR;Ran R;Lu A Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury](#) 2004(01)
19. [杜林林;王朝晖 低氧诱导因子-1 \$\alpha\$ 在大鼠心肌梗死中的表达及其意义](#)[期刊论文]-[中国中西医结合急救杂志](#) 2006(06)
20. [Sirén AL;Fratelli M;Brines M Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress](#) 2001(07)
21. [Sakanaka M;Wen TC;Matsuda S In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage](#) 1998(08)
22. [许予明;朱红灿;张博爱 缺血再灌注大鼠脑内促红细胞表达的变化](#)[期刊论文]-[基础医学与临床](#) 2004(04)
23. [朱红灿;孙圣刚;李红戈 脑源性促红细胞生成素在短暂性前脑缺血沙土鼠海马的表达变化](#)[期刊论文]-[中国组织化学与细胞化学杂志](#) 2003(01)
24. [Bernaudin M;Marti HH;Rnussel S A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice](#) 1999(06)
25. [Marti HH;Bernaudin M;Petite E Neuroprotection and angiogenesis:dual role of erythropoietin in brain ischemia](#) 2000(5)
26. [Semenza GL Regulation of erythropoietin production, new insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis](#) 1994(05)
27. [赵翠;熊利泽;董海龙 远程缺血预处理对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤的保护作用](#)[期刊论文]-[中国危重病急救医学](#) 2007(06)
28. [Heurteaux C;Lauritzen I;Widmann C Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cerebral ischemic preconditioning](#) 1995(10)

## 相似文献(10条)

1. 期刊论文 [方华.王泉云.李昌熙.刘进.FANG Hua.WANG Quan-yun.LI Chang-xi.LIU Jin 兔脊髓分级缺血-再灌注损伤对体感诱发电位的影响](#) -[中国胸心血管外科临床杂志](#)2007, 14(4)

目的 了解不同程度脊髓缺血-再灌注损伤与体感诱发电位(SEP)、神经功能评分及脊髓病理改变的关系.方法 将40只新西兰大白兔随机均分为4组,假手术组、缺血30min组、缺血45min组和缺血60min组.采用腹主动脉阻断法建立兔脊髓缺血-再灌注损伤模型,分别于缺血前、缺血5、10min、再灌注15、30min、1、2、24和48h监测SEP.于再灌注6、12、24和48h进行神经功能评分,再灌注48h进行脊髓病理学观察.结果 阻断腹主动脉血流30、45和60min后开放分别表现为轻、中、重度缺血-再灌注损伤脊髓的病理学改变特点.脊髓轻度缺血-再灌注损伤中SEP波幅和潜伏期分别于再灌注15和30min时恢复至缺血前水平( $P>0.05$ );脊髓中度缺血-再灌注损伤中SEP波幅和潜伏期分别于再灌注30min和再灌注1h恢复至缺血前水平( $P>0.05$ );脊髓重度缺血-再灌注损伤中SEP波幅和潜伏期分别明显下降和延长,与其他各组间比较差异有统计学意义( $P<0.01$ ).各组神经功能评分组间比较差异均有统计学意义( $P<0.01$ ).结论 脊髓缺血-再灌注损伤中SEP波幅较潜伏期恢复迅速.术中SEP监测能够敏感而准确地反映缺血-再灌注损伤中脊髓功能的变化,可为临床应用提供实验依据.

2. 期刊论文 [王凌.林荣 缺血后适应对缺血/再灌注损伤的心脏保护](#) -[心脏杂志](#)2007, 19(5)

急性心肌梗死的再灌注治疗一方面恢复了心肌的血供,另一方面也可能加重缺血心肌的损伤(再灌注损伤).近年来研究发现,在冠状动脉再灌注开始时对冠脉进行短暂、重复的开通及再闭过程,随后恢复冠状动脉血流,即“缺血后适应”,能减少缺血心肌的再灌注损伤,缩小缺血心肌的梗死面积.本文就其研究现状综述如下.

3. 学位论文 [褚薇薇 缺血后处理抗大鼠肠缺血-再灌注损伤的作用及其机制研究](#) 2007

背景和目的:

肠道是对缺血-再灌注(I/R)损伤最敏感的器官.肠缺血.再灌注损伤是外科常见的危重病症,它不仅可引起肠粘膜上皮细胞吸收功能下降、肠粘膜屏障功能受损及肠道内正常菌群失调,而且可以导致肠源性细菌和内毒素移位到体循环,激发机体免疫反应,引起网状内皮系统发生系列反应,造成大量相关炎症介质和细胞因子释放,可以导致全身性炎症反应综合征(SIRS)甚至多器官功能障碍综合征(MODS),具有较高的发病率和死亡率.因此,研究肠缺血-再灌注损伤的发生机制和寻找防治肠缺血-再灌注损伤的措施已成为目前外科领域的研究热点.

缺血预处理被众多学者公认为是一种有效的抗缺血—再灌注损伤的治疗策略。缺血预处理由Murry等在1986年首先提出,指心肌在经过多次短暂缺血和再灌注,能减轻随后长时间缺血—再灌注导致的心肌损伤。大量研究证实,这一现象存在于不同种属的不同组织器官中,包括肠组织。但由于这种预处理必需在缺血前实施,而临床患者常常由于自身原发性疾病的存在,使得术前肠组织已经处于严重缺血状态,从而在根本上失去了缺血预处理的时机,其临床应用价值受到了很大的限制。因而针对已缺血肠组织,采取其他更合理的处理时机和措施以减轻再灌注损伤,无疑具有更直接的临床意义。

新近研究发现,缺血后处理(IPOST)是一种抗缺血、再灌注损伤的新的机械性干预措施。2003年, VinLten-Johansen<sup>s</sup>研究小组对犬的缺血—再灌注研究中,在心肌较长时间内缺血后,再灌注一开始即对心脏进行3个循环的再灌注/停灌注处理,即30秒再灌注/30秒再阻断,结果表明这种新的机械性干预措施可以缩小心肌梗塞面积,保护内皮功能,减轻细胞水肿,减少缺血梗死区中性粒细胞的聚集,改善心功能,能够发挥心脏保护作用。这一保护作用在程度上和缺血预处理相似,他们把这种现象称为缺血后处理。随后,缺血后处理抗损伤的保护作用在一些缺血—再灌注损伤的动物实验和临床研究中也都得到证实。目前,对缺血后处理的研究尚属起步阶段,大多集中在缺血—再灌注损伤的心肌和肝脏方面的研究。然而,缺血后处理对肠缺血、再灌注的抗损伤作用及其机制的研究国内外尚未见报道。因此,本研究通过缺血预处理对比研究,从整体、细胞和分子水平上阐明缺血后处理抗大鼠肠缺血、再灌注损伤的作用及其可能的作用机制,从而为抗肠缺血—再灌注损伤的基础研究奠定一定的理论和实验依据,为临床外科防治肠缺血—再灌注损伤提供新的策略。

#### 方法:

SPF级健康SD成年雄性大鼠,体重220-250 g,被随机分为①假手术组(Sham组);仅行开腹,分离肠系膜上动脉(SMA)不夹闭;②缺血、再灌注组(I/R组):无创血管夹夹闭SMA 45 min松开血管夹;③缺血预处理组(IPC组):夹闭SMA5 min和松夹5 min作为预处理,2个循环,余同I/R组;④缺血后处理组(IPOS I<sup>+</sup>组):缺血45 min后即行3个循环的灌注30 s/阻断30 s,余同I/R组。

#### 本研究分四部分:

1. 缺血后处理抗大鼠肠缺血—再灌注损伤作用研究方法:应用病理形态学、细菌学、动态浊度法、酶联免疫吸附法(ELISA)和生物化学等方法,观测各组大鼠肠粘膜病理形态学、肠组织湿/干比重(W/D),肠道细菌向肠系膜淋巴结、肝、脾移位的频率及组织细菌含量,门、腔静脉血清内毒素含量,腔静脉血清TNF- $\alpha$ 含量和肝功能变化。从不同方面评价缺血后处理抗大鼠肠缺血—再灌注损伤的作用。

2. 缺血后处理对大鼠肠缺血—再灌注损伤的抗氧化作用机制研究方法:应用分光分析法分别检测各组大鼠肠粘膜中丙二醛(MDA)含量、髓过氧化物酶(MPO)和超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化。评价抗氧化作用在缺血后处理抗大鼠肠缺血—再灌注损伤机制中的作用。

3. 缺血后处理对大鼠肠缺血—再灌注损伤的抗细胞凋亡作用机制研究方法:应用末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL)、DNA琼脂糖凝胶电泳方法、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法和免疫组织化学方法分别检测各组大鼠肠粘膜细胞凋亡发生情况以及肠粘膜细胞Bcl-2/Bax mRNA及其蛋白表达的变化。评价抗细胞凋亡作用在缺血后处理抗大鼠肠缺血—再灌注损伤机制中的作用。

#### 4. 线粒体在缺血后处理抗大鼠肠缺血—再灌注损伤中的作用机制研究方法:

应用透射电子显微镜(TEM)、MTT法、激光共聚焦扫描显微镜分别观测各组大鼠肠粘膜细胞线粒体形态结构改变,线粒体呼吸功能以及肠粘膜细胞线粒体跨膜电位的变化。评价线粒体在缺血后处理抗大鼠肠缺血、再灌注损伤机制中的作用。

结果:1. 缺血后处理抗大鼠肠缺血—再灌注损伤的作用研究:①肠组织病理形态学变化:假手术组大鼠肠粘膜绒毛完整,上皮下间隙无扩展。缺血—再灌注组大鼠肠粘膜部分绒毛破损,顶端与固有层分离固有层毛细血管暴露、出血和溃疡。缺血预处理组和缺血后处理组大鼠各时间点肠粘膜损伤程度均有减轻。缺血后处理组肠组织病理评分明显低于缺血—再灌注组( $P < 0.05$ ),缺血后处理组与缺血预处理组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ );②肠道细菌移位:在缺血—再灌注组、缺血预处理组和缺血后处理组大鼠共检出4种细菌,均属肠正常驻菌。缺血后处理组细菌移位频率和细菌含量均明显低于缺血—再灌注组( $P < 0.05$ ),与缺血预处理组相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );③小肠组织W/D,门、腔静脉内毒素和TNF- $\alpha$ 含量以及肝功能变化:与缺血—再灌注组相比,缺血后处理组大鼠组织W/D,门、腔静脉内毒素含量,腔静脉TNF- $\alpha$ 含量和肝功能指标明显降低( $P < 0.05$ ),缺血后处理组与缺血预处理组相比,各项指标差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

2. 缺血后处理对大鼠肠缺血—再灌注损伤的抗氧化作用机制研究:与缺血—再灌注组相比,缺血后处理组大鼠肠粘膜MDA含量和MPO活性均显著降低( $P < 0.05$ ),而SOD活性明显升高( $P < 0.05$ ),缺血后处理组和缺血预处理组相比,各项指标无统计学意义( $P > 0.05$ )。

3. 缺血后处理对大鼠肠缺血—再灌注损伤的抗细胞凋亡作用机制研究:①肠粘膜细胞凋亡的变化:琼脂糖凝胶电泳显示,缺血—再灌注组大鼠肠粘膜细胞可见到明显的DNA断裂梯状带,而缺血后处理组和缺血预处理组则有所减轻;TUNEL法结果显示,假手术组大鼠肠粘膜细胞凋亡率较低,缺血—再灌注组细胞凋亡率明显增加( $P < 0.05$ ),缺血后处理组细胞凋亡率明显低于缺血—再灌注组( $P < 0.05$ ),缺血后处理组和缺血预处理组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ );②肠粘膜细胞Bcl-2和Bax mRNA、蛋白表达变化:假手术组大鼠肠粘膜细胞Bcl-2及Bax mRNA和蛋白有一定的表达;缺血—再灌注组Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平下降,Bax mRNA和蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ ),缺血后处理组Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平明显上升,Bax mRNA和蛋白表达水平明显下降( $P < 0.05$ ),与缺血预处理组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

4. 线粒体在缺血后处理抗大鼠肠缺血—再灌注损伤中的作用机制研究:①肠粘膜细胞线粒体结构变化:假手术组大鼠肠粘膜细胞线粒体基本正常,缺血—再灌注组线粒体明显肿胀,空泡性;缺血后处理组和缺血预处理组线粒体损伤有所恢复。②肠粘膜细胞线粒体呼吸功能变化:与假手术组相比,缺血—再灌注组大鼠肠粘膜细胞线粒体呼吸功能明显下降( $P < 0.05$ );缺血后处理组明显高于缺血—再灌注组( $P < 0.05$ ),与缺血预处理组相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。③肠粘膜细胞线粒体跨膜电位的变化:与假手术组相比,缺血—再灌注组大鼠肠粘膜细胞线粒体跨膜电位显著下降( $P < 0.05$ );缺血后处理组则明显高于缺血—再灌注组( $P < 0.05$ ),与缺血预处理组相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

#### 结论:

1. 肠缺血—再灌注使大鼠肠道结构和功能受损,表现为肠粘膜和线粒体形态改变,肠组织W/D增加,肠粘膜细胞凋亡增加,肠道细菌和内毒素移位,TNF- $\alpha$ 产生增多,肝功能受损,MDA含量增加,SOD活性下降,MPO活性升高,Bcl-2mRNA及蛋白的表达下降,Bax mRNA及蛋白的表达升高,线粒体呼吸功能和线粒体跨膜电位下降。

2. 缺血后处理能够减轻缺血、再灌注大鼠肠道细菌和内毒素移位,减少TNF- $\alpha$ 生成,改善肝功能,保护肠粘膜屏障功能,具有显著的抗肠缺血—再灌注损伤作用。

3. 缺血后处理抗大鼠肠缺血—再灌注损伤作用机制与抗氧化作用有关,可能是通过清除氧自由基,抑制脂质过氧化,提高肠组织的抗氧化能力,减轻中性粒细胞的聚集发挥作用。

4. 缺血后处理抗大鼠肠缺血—再灌注损伤作用机制与抗细胞凋亡作用有关,可能是通过调控细胞凋亡相关基因Bcl-2/Bax mRNA和蛋白的表达。

5. 缺血后处理抗大鼠肠缺血—再灌注损伤的作用机制与改善肠粘膜细胞线粒体形态结构和呼吸功能,提高线粒体跨膜电位有关。

6. 缺血后处理抗大鼠肠缺血—再灌注损伤的作用及其机制和缺血预处理有相似之处。

7. 缺血后处理抗大鼠肠缺血—再灌注损伤的作用及其机制的研究有助于为抗肠缺血—再灌注损伤的基础研究奠定一定的理论和实验依据,可为临床外科防治肠缺血—再灌注损伤提供新策略。

## 4. 期刊论文 张书. 张文芳. 鲁建华. 张金红. 梁丽. ZHANG Shu. ZHANG Wen-fang. LU Jian-hua. ZHANG Jin-hong. LIANG

### [Li a-硫辛酸对视网膜缺血—再灌注损伤大鼠视网膜中血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶表达的影响 -眼科研究](#)

2010, 28(11)

目的 探讨 $\alpha$ -硫辛酸对大鼠视网膜缺血—再灌注损伤中血管内皮生长因子(VEGF)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达的影响及作用机制。方法 随机数字表将78只SPF级健康成年Wistar大鼠分为正常对照组6只及 $\alpha$ -硫辛酸组和缺血—再灌注组各36只。 $\alpha$ -硫辛酸组和缺血—再灌注组根据再灌注时间的不同分为6、12、24、48h、3d和7d组。采用前房灌注生理盐水升高眼压的方法建立视网膜缺血—再灌注动物模型,其中 $\alpha$ -硫辛酸组大鼠自造模前3d开始腹腔注射 $\alpha$ -硫辛酸100mg/(kg·d),缺血—再灌注组大鼠以同样的方法注射等体积生理盐水。在上述时间点分别处死大鼠并摘除眼球,行苏木精-伊红染色并评估各组大鼠在各时间点视网膜组织的结构变化;应用免疫组织化学法检测大鼠视网膜缺血—再灌注损伤后不同时间点视网膜组织中VEGF和MMP-9的表达,并对各组VEGF和MMP-9的表达量进行比较。结果  $\alpha$ -硫辛酸组大鼠在再灌注后6h出现视网膜水肿和视网膜神经节细胞(RGCs)的轻度改变,随着时间的延长,RGCs的结构改变明显加重。 $\alpha$ -硫辛酸组视网膜水肿和RGCs结构的异常变化过程同缺血—再灌注组,但程度较轻。实验前正常对照组大鼠视网膜中未见VEGF的表达;缺血—再灌注组于再灌注后12h开始出现VEGF的表达,随着时间的延长VEGF表达逐渐增加,到再灌注后48h达到高峰。各时间点缺血—再灌注组和 $\alpha$ -硫辛酸组VEGF在视网膜的表达水平明显高于正常对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),但各时间点 $\alpha$ -硫辛酸组VEGF在视网膜的表达水平明显低于缺血—再灌注组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。正常对照组大鼠视网膜未检测到MMP-9的表达;缺血—再灌注组在再灌注后6h可检测到MMP-9在视网膜中的表达,24h后其表



达水平达到高峰。各时间点缺血-再灌注组MMP-9的表达明显高于正常对照组( $P < 0.05$ )， $\alpha$ -硫辛酸组视网膜中MMP-9的表达与缺血-再灌注组比较明显下降，差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。缺血-再灌注组视网膜VEGF和MMP-9的表达呈正相关( $r = 0.834, P < 0.05$ )。结论 视网膜缺血-再灌注损伤可诱导VEGF及MMP-9的表达在视网膜中过度表达， $\alpha$ -硫辛酸可通过抑制视网膜缺血-再灌注损伤中VEGF及MMP-9的表达而对视网膜起保护作用。

## 5. 期刊论文 [云宇, 段为钢, 陈鹏, 武鸿翔, 沈志强, 王殿华, YUN Yu, DUAN Wei-gang, CHEN Peng, WU Hong-xiang, SHEN](#)

### [Zhi-qiang, WANG Dian-hua 不同缺血后处理方案抗大鼠肾缺血-再灌注损伤的作用 - 昆明医学院学报2009\(4\)](#)

目的 探讨不同缺血后处理方案抗大鼠肾缺血-再灌注损伤的作用。方法 在大鼠右肾切除,左肾145 min R24 h缺血-再灌注模型上,分别给予:(1)夹闭(缺血)10 s/松夹(再灌注)10 s 6个循环;(2)20 s, 20s3个循环;(3)30 s/30 s 3个循环;(4)60 s/60 s 3个循环;(5)10 s, 30 s, 30 s 3个循环;(6)30 s/20 s 3个循环的缺血后处理方案干预,观测H染色肾组织病理形态学变化和心肌肌酐和血尿素氮水平。结果 6种不同缺血后处理方案均能减轻-肾组织病理形态学损伤和降低血肌酐和血尿素氮水平。结论 不同缺血后处理方案均可减轻肾脏缺血-再灌注损伤,以6个循环10 s/10s方案最佳。

## 6. 学位论文 [高鹏 缺血后处理对兔脊髓缺血/再灌注损伤保护作用的研究 2006](#)

在临床中主动脉手术或脊髓手术等可能引起不同程度的脊髓缺血,导致神经功能障碍,表现为急性或迟发性截瘫,从而影响手术效果并造成巨大的心理和经济负担。有资料显示,胸腹主动脉瘤手术后截瘫的发生率约在6-20%。寻找有效地预防和治疗脊髓损伤的方法是当前研究的热点之一。众所周知,缺血预处理可以减轻脑和脊髓缺血性损伤,但是由于大部分病人缺血发生的时间不可预知,其在临床应用中没有可操作性。如果短暂缺血处理是在缺血损伤后,其在临床的可应用性就会大大增加。近年来,高峰等研究发现对已经缺氧的心肌细胞进行多次短暂复氧/停氧处理,可以明显提高心肌细胞存活率,从而提出了缺氧后处理(hypoxicpostconditioning)的概念。陶凌等在兔和犬心肌缺血/再灌注模型上进行实验,发现冠脉阻断后再灌注前给予反复多次短暂缺血/再灌注处理,可以减小心肌梗死面积,减轻心肌缺血/再灌注损伤,提出了缺血后处理(ischemiapostconditioning)的概念[陶凌等, 2001]。本实验室在局灶性脑缺血模型上发现,缺血后处理可以减少脑梗死容积,具有脑保护作用。但缺血后处理是否能够减轻脊髓缺血/再灌注损伤尚无定论,而且缺血后处理对缺血/再灌注损伤的保护作用机制很难完全用预处理作用的机制来解释。

本实验拟应用肾下腹主动脉(IRA)阻断致兔脊髓缺血(15min)/再灌注损伤模型,研究缺血后处理是否对脊髓缺血/再灌注损伤具有保护作用,测定缺血后处理对兔脊髓缺血/再灌注损伤后体内丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响,以及缺血后处理对兔脊髓缺血/再灌注损伤后脊髓热休克蛋白70(HSP70)表达的影响,明确缺血后处理部分可能的机制。

实验一缺血后处理对兔脊髓缺血/再灌注损伤的保护作用及最佳处理时间的研究目的研究缺血后处理是否可以减轻兔脊髓缺血/再灌注损伤以及最佳处理时间。方法雄性新西兰大白兔30只,随机分为五组,每组6只。假手术(Sham)组仅行单纯手术操作但不阻断腹主动脉;对照(Control)组行单纯缺血/再灌注处理;缺血后处理15s(PA)组:阻断腹主动脉15min后,再灌注15s,缺血15s,反复3次;缺血后处理30s(PB)组:阻断腹主动脉15min后,再灌注30s,缺血30s,反复3次;缺血后处理60s(PC)组:阻断腹主动脉15min后,再灌注60s,缺血60s,反复3次。再灌注24h时对所有动物的后肢运动功能进行评分并行脊髓前角正常神经元计数。结果PB组再灌注24h后肢运动功能评分[3.5(2~4分)],明显高于Control组[2.1(1~3分)]( $P < 0.05$ ),其他各组与Control组相比差异无显著意义。脊髓前角正常神经元计数PB组为(36.7 $\pm$ 7.0),明显多于Control组(25.7 $\pm$ 4.3)( $P < 0.01$ ),而PA组(18.2 $\pm$ 2.2)和PC组(8.0 $\pm$ 4.1)则明显少于Control组( $P < 0.05$ )。结论缺血后处理对兔脊髓缺血/再灌注损伤的作用取决于处理时间,缺血后处理30s/30s对脊髓缺血/再灌注损伤具有保护作用,而缺血后处理15s/15s和60s/60s会加重缺血/再灌注脊髓的损伤。

实验二缺血后处理对兔脊髓缺血/再灌注损伤中MDA和SOD的影响目的通过在兔脊髓缺血/再灌注模型研究缺血后处理对兔脊髓缺血/再灌注损伤后体内MDA含量、SOD活性的影响。方法雄性新西兰大白兔24只,随机分为四组,每组6只。对照(Control)组仅行单纯缺血/再灌注处理;缺血后处理15s、30s和60s(PA、PB和PC)组分别于阻断腹主动脉15min后,再灌注15s、30s和60s,缺血15s、30s和60s,反复3次。各组均在缺血前、缺血10min和再灌注1h时对所有动物抽取动脉血并于再灌注1h时取脊髓组织匀浆后分别测定MDA含量和SOD活性。结果再灌注1h时血浆和脊髓组织中MDA含量:PA和PB组明显低于Control组( $P < 0.01$ ),而PC组明显高于Control组( $P < 0.01$ );SOD活性:PA和PB组明显高于Control组( $P < 0.01$ ),PC组明显低于Control组( $P < 0.01$ )。结论早期短程缺血后处理(15s/15s和30s/30s)具有抗氧化作用,能够增强内源性抗氧化酶活性,抑制再灌注后氧自由基的过量生成,减轻脂质过氧化,从而对兔脊髓缺血/再灌注损伤具有一定保护作用。

实验三缺血后处理对兔脊髓缺血/再灌注损伤后脊髓HSP70表达的影响目的应用免疫组化方法研究缺血后处理对兔脊髓缺血/再灌注损伤后脊髓HSP70表达的影响。方法雄性新西兰大白兔30只,随机分为五组,每组6只。假手术(Sham)组行除缺血/再灌注以外的相同手术操作;对照(Control)组仅行单纯缺血/再灌注处理;缺血后处理15s、30s和60s(PA、PB和PC)组分别于阻断腹主动脉15min后,再灌注15s、30s和60s,缺血15s、30s和60s,反复3次。再灌注24h时对所有动物取脊髓组织石蜡切片后通过免疫组化方法检测HSP70表达水平。结果再灌注24h时脊髓组织中HSP70阳性表达细胞数PA、PB和PC组明显多于Control组( $P < 0.01$ ),PA和PB组明显多于PC组( $P < 0.01$ ),而PA和PB组之间无显著差异( $P > 0.05$ )。结论缺血后处理可以通过增加HSP70的表达减轻兔脊髓缺血/再灌注损伤,早期后处理比晚期后处理具有更明显的保护作用。

由这三个实验结果,我们认为缺血后处理对脊髓缺血/再灌注损伤具有保护作用,并且早期后处理比晚期后处理具有更明显的保护作用。这种保护作用的部分机制可能是增强内源性抗氧化酶活性,抑制再灌注后氧自由基的过量生成,减轻脂质过氧化,增加HSP70的表达等。

结论1缺血后处理对兔脊髓缺血/再灌注损伤的作用取决于后处理时间,缺血后处理30s/30s对脊髓缺血/再灌注损伤具有保护作用,而缺血后处理15s/15s和60s/60s会加重缺血/再灌注脊髓的损伤。

2缺血后处理的部分机制可能是通过抗氧化,增强内源性抗氧化酶活性,抑制再灌注后氧自由基的过量生成,减轻脂质过氧化以及增加HSP70的表达来减轻兔脊髓缺血/再灌注损伤。

## 7. 期刊论文 [王芳, 赵刚, 吕青, 曲玲, 郭莲军, WANG Fang, ZHAO Gang, U Qing, QU Ling, GUO Lian-jun 蝙蝠葛酚性碱对](#)

### [家兔心脑缺血-再灌注损伤保护作用的研究 - 中国危重病急救医学2005, 17\(3\)](#)

目的探讨蝙蝠葛酚性碱(PAMd)抗心、脑同时缺血-再灌注损伤的机制。方法采用结扎家兔左冠状动脉前降支及双侧颈总动脉30 min后再灌注造成心、脑缺血-再灌注模型,观察PAMd对缺血前后及再灌注后不同时间血清、左心室、海马、皮质及小脑中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响。结果家兔心、脑缺血-再灌注10 min后血清MDA含量显著升高,SOD活性显著降低( $P < 0.05$ )。PAMd 3.5 mg/kg显著降低心、脑缺血-再灌注后血清及组织MDA含量,升高SOD活性( $P < 0.05$ )。结论PAMd通过减轻脂质过氧化所造成的损伤,提高SOD活性,对心、脑缺血-再灌注损伤具有一定保护作用。

## 8. 期刊论文 [汤礼贵, 兰丽琴, 蔡小芳, 安慧敏, 朱华, TANG Li-gui, LAN li-qin, CA Xiao-fang, AN Hui-min, ZHU Hua](#)

### [VEGF对缺血/再灌注损伤胰腺细胞凋亡的影响 - 中国医师杂志2009, 11\(6\)](#)

目的 研究血管内皮生长因子(VEGF)对缺血/再灌注损伤胰腺组织细胞凋亡的影响。方法 将雄性sd大鼠30只随机分为3组(n=10),A组为假手术组,B组为缺血/再灌注损伤组,C组为缺血/再灌注损伤+VEGF反义寡核苷酸组。通过血管夹阻断大鼠腹腔干及肠系膜上动脉30 min,然后去除血管夹再灌注6 h,建立大鼠胰腺缺血/再灌注损伤模型,对各组胰腺组织进行VEGF免疫组化染色及TUNEL法细胞凋亡检测。结果 缺血/再灌注损伤后胰腺组织出现细胞凋亡,同时VEGF蛋白表达上调。缺血/再灌注损伤+VEGF反义寡核苷酸组的胰腺组织VEGF蛋白表达较缺血/再灌注损伤组显著减少( $P < 0.05$ ),前者细胞凋亡指数较后者明显升高( $P < 0.05$ )。结论 VEGF能抑制缺血/再灌注损伤胰腺细胞凋亡,可能对胰腺缺血再灌注损伤具有保护作用。

## 9. 学位论文 [朱付平 复灌 I 号注射液对大鼠肢体缺血-再灌注损伤早期骨骼肌保护机制的研究 2007](#)

第一部分复灌 I 号注射液对大鼠肢体缺血、再灌注骨骼肌损伤保护机制的研究。

第一章复灌 I 号注射液对大鼠肢体缺血、再灌注氧化损伤的保护机制。

目的: 探讨复灌 I 号注射液对大鼠肢体缺血、再灌注骨骼肌氧化损伤的保护机制。

方法: 选用SD雄性大鼠56只,随机分为对照组(Control组)、缺血再灌注组(IR组)和复灌 I 号药物干预组(I-IR组)三大组。对照组8只(未造成缺血、再灌注损伤);缺血、再灌注组24只,再分为再灌注后2h(IR-2)、4h(IR-4)和8h(IR-8)三小组,每小组8只;复灌 I 号药物干预组24只,再分为再灌注后2h(I-IR-2)、4h(I-IR-4)和8h(I-IR-8)三小组,每小组8只。对照组所有大鼠用橡皮筋松驰环绕双下肢阻断血流;IR组和I-IR组,按张连元所报道的方法复制SD大鼠后肢缺血、再灌注模型。对照组动物不给药物;IR组于造成缺血前12小时、造成缺血时和再灌注时于腹腔内各注射生理盐水1ml;I-IR组于造成缺血前12h、缺血时和再灌注时腹腔各注射复灌 I 号注射液1ml。各组动物于相应时间点取约100mg右侧腓肠肌中部肌肉,冰盐水

中快速洗去血液, 滤纸吸干水份, 剪碎制成匀浆, 用于骨髓肌MDA、SOD、MPO的检测, 另切取部分腓肠肌, 固定于福尔马林溶液中进行组织切片检查, 再切取左后腓肠肌行干湿重比值的检查, 然后于下腔静脉穿刺取血, 离心, 行血清MDA、SOD、MPO、NO检测。

结果: (1)MDA的检测: IR与I-IR各组MDA含量均较对照组为高其差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 且在8h内随着时间的延长而逐渐增高。而复灌I号干预各组在相应时间点均较IR组为低, 除骨髓肌I-IR-4组与IR-4组相比其差异为 $P < 0.05$ 外, 其余各时间组相比较其P值均小于0.01。(2)SOD的检测: IR与I-IR各组血清和骨髓肌SOD值均较对照组为低, 其差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 在8h内其含量随着时间的延长而逐渐降低。除血清I-IR-2组与IR-2组相比其差异为 $P < 0.05$ 外, 其余各时间组与IR组相比较其P值均小于0.01。(3)MPO的检测: IR与I-IR各组血清和骨髓肌MPO值均较对照组为高, 其差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 在8h内随着时间的延长其含量逐渐升高, 而I-IR各组在相应时间点上均较IR组为低, 其差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。(4)骨髓肌干湿重的检测结果: IR与I-IR各组骨髓肌水肿明显, 8h内水肿逐渐增加, 与对照组相比其差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 而I-IR各组在相应时间点上水肿程度均较IR组为轻, 除I-IR-2组与IR-2组相比其差异为 $P < 0.05$ 外, 其余各相应时间组I-IR组与IR组相比较其P值均小于0.01。(5)血清NO的检测: 在再灌注后2h时为最高, 8h内随着时间的延长而逐渐下降, IR与I-IR各组NO含量均较对照组为高, 其差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 而I-IR各组较IR组为低, 其差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。(6)组织切片的检测结果: 缺血。再灌注组各时间点肌肉组织水肿、肌纤维断裂并有大量炎症细胞浸润, 而复灌I号注射液可明显减少炎症细胞的浸润, 在肌肉细胞的水肿和肌纤维的损伤方面也有一定的减轻。

小结:

1. 复灌I号注射液可减少氧自由基的产生。
2. 复灌I号注射液可减轻SOD降低的程度, 更有利于机体清除氧自由基。
3. 复灌I号注射液可降低PMN的游出数量, 同时减少其在组织中的聚集, 降低了炎症反应。
4. 复灌I号注射液可降低血清中NO的含量。
5. 复灌I号注射液可减轻组织水肿程度。

第二章复灌I号注射液对大鼠肢体缺血。再灌注损伤骨髓肌细胞凋亡的影响研究。

目的: 探讨复灌I号注射液对大鼠肢体缺血。再灌注骨髓肌细胞凋亡的影响。

方法: 将第一部分所取的部分骨髓肌标本进行固定、脱水、包埋后切片, 采用SABC法进行免疫组化染色, 经Motic Image advanced 3.1图像分析系统测定Bax、Bcl-2蛋白灰度值, 然后对Bax、Bcl-2免疫组化阳性反应产物进行定量分析。

结果: 骨髓肌组织经Bax、Bcl-2免疫组化染色后, 高倍镜下胞浆染色为棕黄色为阳性表达, 标记强度用灰度值表达, 阳性表达愈强, 灰度值愈低。应用图像分析系统(Motic Image advanced 3.1. 北京航空航天大学产品)测定Bax、Bcl-2蛋白灰度值。(1)Bax免疫组化结果: 对照组骨髓肌组织中未见阳性细胞表达, Bax灰度值为 $188.50 \pm 13.43$ , 在再灌注损伤8h内, IR组与I-IR组各时间点灰度值随着时间的延长而逐渐下降, 说明Bax表达随再灌注时间延长而增强, 除IR-2组和I-IR-2组与对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 其余各组与对照组比, 其差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ); 但I-IR各组在相应时间点上其灰度值均较IR组为高, 除2h时其差异无统计学意义( $P > 0.05$ )外, 其余各时间点其差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); (2)Bcl-2免疫组化结果: 对照组未见阳性细胞表达, Bcl-2灰度值为 $183.75 \pm 8.28$ , 再灌注损伤8h内, 2h时表达最为明显, 其后随着时间的延长其表达逐渐减弱, 灰度值逐渐升高, 与对照组相比, 其差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与IR组相比, I-IR组各时间点的阳性表达均稍高, 除2h外, 其他各时间点差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ); (3)Bcl-2/Bax结果: 再灌注8h内, 随着时间的延长, 其比值逐渐增加, 说明其细胞凋亡越来越重, 但I-IR各组在相同时间点上较IR组各为低, 除2h时间点外, 其他时间点其差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 说明复灌I号注射液在缺血。再灌注损伤中有抗骨髓肌细胞凋亡的作用。

小结:

复灌I号注射液可以降低Bax的表达, 升高Bcl-2的表达, 从而减少骨髓肌细胞凋亡, 对肢体缺血-再灌注损伤的骨髓肌起到一定的保护作用。

第二部分大鼠肢体缺血-再灌注损伤骨髓肌钙调蛋白表达的变化及复灌I号注射液对其影响的研究。

目的: 探讨大鼠肢体缺血-再灌注损伤骨髓肌钙调蛋白表达的变化以及复灌I号注射液对变化的影响。

方法: 54只SD大鼠随机分为3大组, 分别为对照组(control组)、缺血-再灌注组(IR组)和复灌I号药物干预组(I-IR组)。对照组6只; 缺血-再灌注组24只, 再分为再灌注后0h(IR-0组)、2h(IR-2组)、4h(IR-4组)和8h(IR-8组)四小组, 每组6只; 复灌I号药物干预组24只, 再分为再灌注后0h(I-IR-0组)、2h(I-IR-2组)、4h(I-IR-4组)和8h(I-IR-8组)四小组, 每组6只。对照组所有大鼠用橡皮筋松驰环绕右后肢阻断血流; IR组和I-IR组, 按张连元所报道的方法复制SD大鼠右后肢缺血。再灌注模型。对照组动物处死前不给药物, 缺血-再灌注组于造成缺血前12小时、造成缺血时和再灌注时于腹腔内各注射生理盐水1ml; 复灌I号药物干预组于造成缺血前12h、缺血时和再灌注时腹腔各注射复灌I号注射液1ml。各组动物于相应时间点在右后肢相应区域内剪毛, 络合碘消毒, 于右后肢内侧沿肢体长轴方向切开皮肤, 游离皮肤及皮下组织, 剪除深筋膜, 切取约1000mg腓肠肌, 冰盐水快速洗去血液, 滤纸吸干水份, 剪碎制成组织匀浆, 用于RyR<sub>c</sub>、 $\text{Ca}^{2+}$ 和SERCA<sub>c</sub>的RT-PCR检测。

结果:

(1)骨髓肌型RyR<sub>c</sub>、 $\text{Ca}^{2+}$ mRNA的RT-PCR结果: 在肢体缺血-再灌注损伤再灌注8h内, IR组骨髓肌型RyR<sub>c</sub>、 $\text{Ca}^{2+}$ mRNA在再灌注0h、2h表达上调, 与对照组相比, 其差异有显著性意义( $P < 0.01$ ), 4h时有所恢复, 但8h时表达下调, 与对照组相比, 其差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。复灌I号注射液干预0h稍有增强, 增强幅度较IR组为小, 与对照组和IR组相比其差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ), 缺血2h时其表达也最强, 但要比IR为弱, 两组差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 4h时与对照组相比, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 8h也表现为降低, 但降幅要比IR组为小, 其差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。(2)SERCA<sub>c</sub>、 $\text{Ca}^{2+}$ mRNA的RT-PCR。

结果: 对于SERCA<sub>c</sub>、 $\text{Ca}^{2+}$ mRNA的表达, 再灌注8h内随着时间的延长其表达逐渐下降, 与对照组相比, 其差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。复灌I号注射液干预各组的表达也随时间延长而下降, 但下降幅度较IR组为小, 可减缓其下降速度, 与IR组相比, 除2h时外, 在0h( $P < 0.05$ )、4h( $P < 0.01$ )、8h( $P < 0.01$ )等时间点其差异均有统计学意义。

小结:

1. 在再灌注8h内, 肢体缺血-再灌注损伤骨髓肌RyR<sub>c</sub>、 $\text{Ca}^{2+}$ mRNA早期表达上调, 后期表达下降, SERCA<sub>c</sub>、 $\text{Ca}^{2+}$ mRNA表达随着时间的延长而逐渐下降。这可能是肢体缺血-再灌注损伤骨髓肌的重要原因之一。
2. 复灌I号对缺血-再灌注损伤中骨髓肌的保护作用可能是通过双向调节RyR<sub>c</sub>、 $\text{Ca}^{2+}$ 以使早期减轻胞浆钙超载, 后期保护细胞器的作用来实现的。这可能是其防治肢体缺血。再灌注损伤, 减轻骨髓肌损伤的主要分子机制之一。

## 10. 期刊论文 高鹏,熊利泽,聂焯,路志红,马福成 缺血后处理对兔脊髓缺血-再灌注损伤的保护作用-临床麻醉学杂志2006,22(4)

目的研究缺血后处理是否可以减轻兔脊髓缺血-再灌注的损伤。方法雄性新西兰大白兔30只,随机分为五组,每组6只。假手术组(N1组)仅行单纯手术操作但不阻断腹主动脉;对照组(N2组)行单纯缺血-再灌注;缺血后处理15s/30s/60s(PA/PB/PC组)分别于阻断腹主动脉15min后,再灌注15s/30s/60s,缺血15s/30s/60s,反复3次。再灌注48 h时对所有动物的后肢运动功能进行评分并行脊髓前角正常神经元计数。结果PB组再灌注48 h后肢运动功能评分[3.5(2~4)分],明显高于N2组[2(1~3)分]( $P < 0.05$ ),其他各组与N2组相比差异无显著意义。脊髓前角正常神经元计数PB组为 $36.7 \pm 7.0$ ,明显多于N2组 $25.7 \pm 4.3$ ( $P < 0.01$ ),而PA组 $18.2 \pm 2.2$ 和PC组 $8.0 \pm 4.1$ 则明显少于N2组( $P < 0.05$ )。结论缺血后处理对兔脊髓缺血-再灌注损伤的作用取决于后处理时间,缺血后处理30s/30s对兔脊髓缺血-再灌注损伤具有保护作用,而缺血后处理15s/15s和60s/60s会加重脊髓损伤。

## 引证文献(3条)

1. 王华军,江慧琳,陈晓辉,林佩仪,朱永城,陶丽丽 促红细胞生成素对缺氧/复氧乳鼠心肌细胞的抗凋亡作用及机制研究[期刊论文]-中国危重病急救医学 2010(5)

2. 王志禄,熊建文,杨小芳,李伊,许哲通,崔丽君,王锋,谈丽丽,张丽 促红细胞生成素预防内皮细胞凋亡时对天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3亚家族的影响[期刊论文]-中国危重病急救医学 2009(12)

3. [杨小芳](#), [熊建文](#), [王志禄](#), [李俨](#), [许哲通](#), [崔丽君](#), [王锋](#), [谈丽丽](#), [张丽](#) [促红细胞生成素预防人脐静脉内皮细胞凋亡的作用](#)[期刊论文]-[中国危重病急救医学](#) 2009(11)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zgzxyjhjjzz200806012.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgzxyjhjjzz200806012.aspx)

授权使用: qkzgz16(qkzgz16), 授权号: 0955711a-3e20-400c-8041-9eec01075037

下载时间: 2011年5月23日