

## • 综述 •

## 实验中风研究的若干进展

湖北医科大学附属第二医院 廖维靖\* 杨万同 郭雅萍

实验中风研究对研究人的中风具有重要意义。国外在这方面的研究进展迅速,为临床研究提供了颇有价值的资料。鉴于此,本文拟将若干进展作一介绍。

## 1 缺血与再灌注损伤研究

### 1.1 损伤机理

#### 1.1.1 脑血流量与梗塞

以往研究显示脑血流量 (cerebral blood flow, CBF) 减少 50% 并不引起梗塞或神经元电活动的改变,但对 CBF 慢性减少的影响所知甚少。1994 年悉尼大学 Sekhon 进行了慢性低灌注对脑神经元功能影响的研究<sup>[1]</sup>。作者制作大鼠动静脉瘘模型,造成 CBF 减少 25% 至 50% 的慢性低灌注,用<sup>14</sup>C 标记自显影方法测量。6 个月后用体外电生理脑片 (brain slice) 技术进行海马 CA<sub>1</sub> 长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 的细胞外检查,并进行组织学观察。结果显示对照组 12 只中有 9 只出现 LTP,低灌注组 8 只仅 2 只出现 LTP,有显著性差异,提示慢性低灌注动物 LTP 受损。作者认为非梗塞性脑血流减少达 50% 即可损害缺血组织的神经功能,缺血的时间和程度影响细胞活力 (cellular viability),低灌注不引起梗塞。

#### 1.1.2 再灌注对梗塞和血脑屏障的影响

急性缺血引起梗塞,而再灌注对梗塞和血脑屏障 (BBB) 的影响如何? 1994 年密执安大学 Yang 报道中脑动脉 (MCA) 阻断后再灌注加重 (exacerbated) 脑梗塞和 BBB 的破坏。BBB 的破坏与脑血流恢复程

度相关。作者认为早期再灌注可保存梗塞周围组织,迟再灌注加重组织损伤<sup>[2]</sup>。

#### 1.1.3 白细胞对缺血后低再灌注的影响

急性短暂局部脑缺血后常出现特征性的 CBF 变化:在短时间高灌注 (hyperperfusion) 后,接着是较长时间的低灌注 (hypoperfusion) 或无再灌注 (no-reflow)。目前还不清楚引起血流发生这种变化的因素及缺血损伤的后果。一般认为多形核白细胞对局部脑缺血和再灌后的“无再灌注”有影响。为进一步了解粒细胞在微血管阻断中的作用,1994 年加州 Scripps 临床和研究基金会 Okada 制作灵长类动物 MCA 缺血和再灌模型,现察粒细胞—内皮细胞粘连分子 P-selectin 和细胞间粘连分子-1 反应。作者认为缺血/再灌可刺激脑缺血区微血管内皮 P-selectin 和细胞间粘连分子-1 的表达,这有助于促进白细胞粘连和持续激活<sup>[3]</sup>。几乎是在同时,柏林洪堡大学 Dirnagl 报道皮质低灌注并非微血管白细胞栓 (plugging) 引起<sup>[4]</sup>。作者连续测定生理变量和皮质血流量,激光扫描观察缺血前、缺血 10 分钟及再灌注 4 小时脑表面和皮质外层的微循环。对照组 (n=8) 未见白细胞激活,缺血组 (n=16) 从高灌注转为低灌注时未见毛细血管栓 (capillary pluggers)。缺血后期仅见白细胞数目稍增多或粘附小静脉的内皮,极少毛细血管被白细胞栓塞。8 只动物在缺血 2 小时有程度不同的白细胞外渗。

#### 1.1.4 细胞因子源中性白细胞趋化物

中性白细胞在缺血一再灌损伤中起重要作用。1995 年日本 Tohoku 大学 Yamasaki 研究了脑缺血组织的中性白细胞,发现早期灌注时脑和血清中细胞因子源中性白细胞趋化物 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant, CINC) 含量显著增加,提示在脑水肿形成和中性白细胞浸润前已有 CINC 产生。作者认为 CINC 对缺血损伤的中性白细胞浸润和脑水肿形成有重要影响<sup>[5]</sup>。

## 1.2 自由基清除剂与神经元存活

目前关于自由基清除剂 N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine) 对短暂脑缺血的神经保护作用了解不多。1995 年美国布朗大学 Knuckey 对乙酰半胱氨酸促进缺血后海马神经元的存活进行了较深入的研究<sup>[6]</sup>。在平均动脉压为 6KPa 时,缺血前用乙酰半胱氨酸预先处理及缺血后处理的动物,其存活神经元的数目均显著增加,然而在严重缺血损伤时 (平均动脉压为 4KPa) 乙酰半胱氨酸不能促进神经元存活。

众所周知超氧化物歧化酶 (SOD) 对脑缺血损伤具有保护作用,近来研究显示人铜锌超氧化物歧化酶转基因鼠对脑缺血再灌注损伤具有高度耐受性<sup>[7]</sup>。1994 年加利福尼亚大学 Yang 将转基因鼠和非转基因鼠 MCA 阻断 3 小时,再灌注 3 小时,测定两组动物梗塞面积和体积、神经功能缺损、皮质血流和谷胱甘肽含量。结果显示转基因鼠梗塞面积显著减少,体积减小 26%。梗塞体积减小与神经功能缺损减轻密切相关。虽然两组皮质缺血中心血流量和谷胱甘肽含量无显著差异,但转基因鼠梗塞周围组织的谷胱甘肽量显著下降。作者认为梗塞体积减小和神经功能缺损减轻不取决于 CBF 的变化,而与脑组织氧化应激减轻有关。

## 1.3 梗塞测定方法

1994 年德克萨斯大学 Aronowski 报道了梗塞体积的分级生物测定方法<sup>[8]</sup>。作者采用 2, 3, 5-三苯四唑氯化物染色区别梗塞组织,以计算在阻断颈总/中脑动脉 5 至 150 分钟后 24 小时的梗塞体积。用逻辑 (logistic) 功能描述和计算机程序执行的分级生物测定方法评定梗塞区体积,即可计算最大梗塞体积 ( $Vol_{max}$ ) 及在再灌注前的半最大梗塞大小 ( $T_{50}$ )。

临床上虽然 CT、MRI 检查可在 95% 的 MCA 阻断患者神经症状发生后 1~6 小时发现病灶,但对全脑缺血常不能显示病变,所以寻找能提示脑损伤的标记物具有重要意义。1995 年海德堡大学 Horn 进行了一项研究,发现缺血后脑和血清中神经元特异性烯醇酶 (neuron-specific enolase, NSE) 含量增高<sup>[9]</sup>。69 只大鼠,分别阻断双侧颈总动脉 5 分钟 (I 组) 和 15 分钟 (II 组),再灌注后恢复血供。酶免疫检测法测定对照组、假手术组、缺血组动物血清中及非缺血鼠脑中 NSE,对缺血损伤脑组织进行组织学、免疫组织化学和形态学观察。缺血神经元免疫活性的丧失与血清 NSE 增加密切相关。血清 NSE 含量取决于脑缺血的时间,最大浓度几乎为非缺血对照组的 3 倍 (I 组) 和 20 倍 (II 组)。缺血 48 小时 (I 组) 和 12 小时 (II 组) 出现形态上损害。作者认为缺血导致中枢神经系统神经元胞浆释放的 NSE 可由血清中显著增高的 NSE 反映,并能对缺血程度作出定量估价,且在不可逆性神经损伤 (irreversible neuronal injury) 发生前检测到。因此,血清 NSE 测定是临床早期诊断全脑缺血有价值的工具,并可作为判断预后的参数。

## 2 分子生物学研究

### 2.1 肿瘤坏死因子

1994 年美国宾州 Liu 进行了缺血神经元肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor

$-\alpha$ ,  $\text{TNF}-\alpha$ ) 表达的研究<sup>[10]</sup>。作者持续阻断大鼠 MCA, 观察缺血和非缺血脑皮质  $\text{TNF}-\alpha$  mRNA 和蛋白质的表达。阻断 MCA 1 小时即出现  $\text{TNF}-\alpha$  mRNA 的诱导, 阻断 3 小时即增加, 12 小时达高峰。在阻断 5 天后  $\text{TNF}-\alpha$  mRNA 仍显著增加。自发高血压大鼠缺血皮质  $\text{TNF}-\alpha$  mRNA 表达较正常血压大鼠增加。免疫组织化学研究显示缺血 6 小时和 12 小时梗塞部位的神经纤维出现  $\text{TNF}-\alpha$  蛋白, 缺血 24 小时紧邻梗塞部位的组织也有表达增加。将微量  $\text{TNF}-\alpha$  ( $10\text{ng}/\mu\text{l}$ ) 注射到皮质出现毛细血管内亲神经白细胞显著粘附/聚积, 24 小时在小血管出现。

## 2.2 $\text{P}_{53}$ 蛋白和 $\text{P}_{53}$ mRNA

1994 年底特律亨利福特医院 Li 进行了脑缺血  $\text{P}_{53}$  免疫反应蛋白和  $\text{P}_{53}$  mRNA 表达的研究<sup>[11]</sup>。雄性大鼠 73 只, 阻断 MCA 2 小时, 再灌注 0.5~168 小时, 进行  $\text{P}_{53}$  免疫组织化学和 Northern 印迹分析。突变 (mutant)  $\text{P}_{53}$  免疫反应蛋白的细胞表达局限在严重损伤的部位, 最大诱导是再灌注 12 小时后出现, 然后下降。缺血后未发现非野生型 (no-wild-type)  $\text{P}_{53}$  蛋白表达。两半球  $\text{P}_{53}$  mRNA 依时间表达, 再灌注 24 小时达高峰。研究表明短暂脑缺血后  $\text{P}_{53}$  免疫反应蛋白和  $\text{P}_{53}$  mRNA 表达上调 (upregulated)。

## 2.3 即早基因表达

1994 年伦敦 Collaco-Moraes 报道局部缺血造成对 MK-801 敏感的即早基因 (immediately early gene, IEG) 的广泛诱导<sup>[12]</sup>。阻断一侧 MCA, 在阻断侧和对侧 5 个部位 (缺血区、周边区、额叶、枕叶和海马) 观察 IEG 的诱导。用 Northern 和 Slot 印迹分析测定 c-fos、c-jun、zif-268 和 krox-20 mRNA 的量。结果发现阻断侧 4 个皮质区 c-fos mRNA 大量诱导, 缺血区最明显, 而海马和对侧皮质区诱导较

少。预先用 MK-801 处理可强烈抑制 c-fos mRNA 诱导, 提示诱导可通过谷氨酸受体 NMDA 亚型介导 (mediated)。同侧皮质区 c-jun 和 zif-268 mRNA 显著诱导。研究表明局部缺血可造成脑皮质广泛区域多基因表达的调节。MK-801 的显著效应提示谷氨酸拮抗剂具有阻断谷氨酸的破坏作用。

## 3 一氧化氮的研究

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 对神经系统的影响是近年研究的一大热点。目前认为 NO 是一种新的递质。1992 年美国 Science 杂志将 NO 评为明星分子。各国学者较深入地研究了 NO 对缺血与再灌注的影响。1994 年麻省总医院 Morikawa 报道 L-精氨酸促进一氧化氮的血管扩张, 增加局部脑血流, 减小梗塞体积<sup>[13]</sup>。新泽西州大学 Wei 报道抑制一氧化氮合成酶尽管出现脑血流量减少, 但可轻度增加缺血皮质的氧供给和消耗的平衡<sup>[14]</sup>。意大利 Sancesario 报道一氧化氮抑制加重海马而不是 NADPH 神经的缺血损伤<sup>[15]</sup>。1995 年北卡罗莱纳 Duke 大学 Zhang 报道缺血/再灌注后一氧化氮合成酶抑制和细胞外谷氨酸浓度<sup>[16]</sup>。缺血时一氧化氮合成酶抑制不减少细胞外谷氨酸集聚, 再灌注时增加其浓度。亚硝基-L-精氨酸甲酯 ( $\text{N}^G$ -nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME) 治疗大鼠在缺血再灌注后谷氨酸浓度增加, 似乎不是缺血后脑血流量减少反应, 也不是局部屏障通透性的增加。

## 4 梗塞组织的血管形成 (angiogenesis)

目前已知脑损伤后细胞事件 (cellular events) 的特征, 但对参与 CNS 生长和修复的因子还了解不多<sup>[17]</sup>。较清楚的是成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)。FGF 蛋白家族由 7 个结构相关的多肽组成, 首次被描述的是酸性 FGF (aFGF) 和碱性 FGF (bFGF), 两种蛋白

对质膜受体有高度亲和力,通过受体可引发一系列参与生理功能的细胞内事件。FGF有多种生物活性,包括促进有丝分裂、趋化性和分化诱导(induction of differentiation),是体内潜能的血管形成因子。

近年bFGF的研究正渐深入。1994年台湾成功大学Chen报道脑梗塞血管形成和bFGF表达相关<sup>[18]</sup>。作者结扎左颈总动脉、左MCA,短暂结扎右颈总动脉,在术后1~14天取脑进行组织和免疫组织化学研究。术后1天与梗塞邻近的神经元可观察到bFGF免疫反应增加,这种变化随之扩展到同侧半球远端神经元。术后2天,梗塞周围的血管和胶质细胞与溴脱氧尿苷(bromodeoxyuridine)融为一体。第1周伴有巨噬细胞的新血管长入梗塞区,巨噬细胞、内皮细胞和反应性星形胶质细胞呈轻至中度的bFGF免疫反应。作者认为bFGF表达和已知的bFGF生物特性相连的血管形成间的立体(spatial)和短暂(temporal)相关,提示神经元、巨噬细胞、胶

质细胞产生的bFGF可能参与梗塞的血管形成。

1994年英国Krupinski报道了缺血性中风患者的血管形成<sup>[19]</sup>。取10例梗塞后生存5~92天脑组织(年龄46~85岁),研究梗塞区和对侧未受损半球。显微测定微血管密度,用三种单克隆抗体免疫组织化学方法研究内皮细胞激活水平。用体内鸡绒毛膜尿囊膜检测来测定组织提取物的血管活性。9例脑梗塞组织与对侧正常半球比较,微血管数目显著增加,血管数目增加与生存期长相关。梗塞半球含血细胞的微血管数目显著减少。相反,与对侧半球比较梗塞组织空微血管数目显著增加。单克隆抗体与正常脑血管内皮细胞的反应微弱,抗增殖细胞核抗原与抗体阴性。所有三种抗体显著着色梗塞组织的血管,梗塞组织呈血管形成活性。作者认为中风引起主动的血管形成,这在梗塞周围组织尤为明显,这种血管形成是否有益还需作进一步实验研究。

## 参考文献

- 1 Sekhon LHS, Morgan MK, Spence I, et al. Chronic cerebral hypoperfusion and impaired neuronal function in rats. *Stroke*, 1994, 25: 1022
- 2 Yang GY, Betz L. Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 1994, 25: 1658
- 3 Okada Y, Copeland BR, Mori E, et al. P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke*, 1994, 25: 202
- 4 Dirnagl U, Niwa K, Sixt G, et al. Cortical hypoperfusion after global forebrain ischemia in rats is not caused by microvascular leukocyte plugging. *Stroke*, 1994, 25: 1028
- 5 Yamasaki Y, Matsuo Y, Matsuura N, et al. Transient increase of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, in ischemic brain areas after focal ischemia in rats. *Stroke*, 1995, 26: 318
- 6 Knuckey NW, Palm D, Primiano M, et al. N-acetylcysteine enhances hippocampal neuronal survival after transient forebrain ischemia in rats. *Stroke*, 1995, 26: 305
- 7 Yang G, Chan PH, Chen J, et al. Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 1994, 25: 165
- 8 Aronowski J, Ostrow P, Samways E, et al. Graded bioassay for demonstration of brain rescue from

- experimental acute ischemia in rats. *Stroke*, 1994, 25: 2235
- 9 Horn M, Seger F and Schlote W. Neuron-specific enolase in gerbil brain and serum after transient cerebral ischemia. *Stroke*, 1995, 26: 290
- 10 Liu T, Clark RK, McDonnell PC, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in ischemic neurons. *Stroke*, 1994, 25: 1481
- 11 Li Y, Chopp M, Zhang ZG, et al. P-53 immunoreactive protein and p-53 mRNA expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 1994, 25: 849
- 12 Collaco-Moraes Y, Aspey BS, de Belleruche, et al. Focal ischemia causes an extensive induction of immediate early genes that are sensitive to MK-801. *Stroke*, 1994, 25: 1855
- 13 Morikawa E, Moskowitz MA, Huang Z, et al. L-arginine infusion promotes nitric oxide-dependent vasodilation, increases regional cerebral blood flow, and reduces infarction volume in the rat. *Stroke*, 1994, 25: 429
- 14 Wei HM, Chi OZ, Liu X, et al. Nitric oxide synthase inhibition alters cerebral blood flow and oxygen balance in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 1994, 25: 445
- 15 Sancesario G, Iannone M, Morello M, et al. Nitric oxide inhibition aggravates ischemic damage of hippocampal but not of NADPH neurons in gerbils. *Stroke*, 1994, 25: 436
- 16 Zhang J, Benveniste H, Klitzman B, et al. Nitric oxide synthase inhibition and extracellular glutamate concentration after cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke*, 1995, 26: 298
- 17 Cuevas P, Carceller F and Gimenez-Gallego. Fibroblast growth factor and cerebral ischemia. *Neuro Res*, 1994, 16: 181
- 18 Chen HH, Chien CH and Liu HM. Correlation between angiogenesis and basic fibroblast growth factor expression in experimental brain infarct. *Stroke*, 1994, 25: 1651
- 19 Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, et al. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke*, 1994, 25: 1794