

脑缺血预处理对脑缺血再灌注大鼠的保护作用及对神经营养因子表达的影响

方晓艳¹, 王琳琳¹, 张帆¹, 孙建宁², 苗明三^{1*}

(1. 河南中医药大学药学院, 郑州 450046; 2. 北京中医药大学药学院, 北京 100102)

[摘要] **目的:**观察脑缺血预处理(CIP)对再次缺血损伤大鼠的保护作用及脑组织中神经营养因子脑源性神经营养因子(BDNF),胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)及血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达的变化,探讨脑缺血耐受的作用机制。**方法:**Wistar大鼠随机分为3组,分别为假手术组(Sham),脑缺血再灌注损伤组(I/R),脑缺血预处理再次损伤组(CIP+MCAO)。采用神经缺损评分(NDS)法评价行为学的改变,苏木素-伊红(HE)染色法评价脑组织病理形态的改变、酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中神经元特异性烯醇化酶(NSE)的水平,免疫组化法观察BDNF,GDNF,VEGF在皮质、海马CA1区的表达变化。**结果:**与Sham组比较,I/R组大鼠神经缺损评分明显升高,脑组织病理损伤程度较明显,血清中NSE水平明显升高($P < 0.01$),大鼠患侧脑组织皮层、海马CA1区BDNF阳性表达面积和积分吸光度IA均明显降低,但仅有脑组织皮层与Sham组比较有统计学差异($P < 0.01$);与I/R组比较,CIP+MCAO组可明显降低大鼠的神经缺损评分($P < 0.05$),明显减轻脑组织病理损伤程度($P < 0.05$),降低血清中NSE水平($P < 0.01$),CIP+MCAO组大鼠患侧脑组织皮层、海马CA1区BDNF,VEGF阳性表达面积和IA均明显增加($P < 0.05, P < 0.01$)。GDNF的阳性表达虽有增加的趋势但没有统计学差别。**结论:**脑缺血预处理的神经保护作用与上调BDNF,VEGF内源性保护蛋白的表达有关。

[关键词] 脑缺血预处理; 脑缺血再灌注; 脑缺血耐受; 神经营养因子; 内源性保护作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)18-0112-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016180112

Neuroprotective Effects of Cerebral Ischemic Preconditioning

FANG Xiao-yan¹, WANG Lin-lin¹, ZHANG Fan¹, SUN Jian-ning², MIAO Ming-san^{1*}

(1. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the neuroprotective effects of cerebral ischemic preconditioning (CIP) on cerebral ischemia reperfusion and the expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the cortex and hippocampus CA1 area of rats. **Method:** Wistar rats were randomly divided into three groups, Sham operation group, cerebral ischemia reperfusion (I/R) group, and cerebral ischemic tolerance (CIP + MCAO) group. The behavioral changes were detected by neurologic deficit scores (NDS), the cerebral histopathology was detected by HE staining, and the level of NSE in serum were detected by ELISA. The expressions of BDNF, GDNF and VEGF in cortex, hippocampus CA1 area were measured by immunohistochemical staining. **Result:** Compared with Sham operation group, I/R group showed significant increases in neurologic deficit scores and the level of NSE in serum, and improved cerebral histopathology injury ($P < 0.01$), notable decreases in positive area and integral absorbance (IA) in cortex and hippocampus CA1 area at the damage side, but only statistical differences between brain cortex

[收稿日期] 20160623(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(U1204827);河南中医药大学省属高校基本科研业务费专项(2014KYYWF-YQ11)

[第一作者] 方晓艳,博士,副教授,从事中药防治脑缺血疾病研究,Tel:13598869300,E-mail:fxylele@yeah.net

[通讯作者] *苗明三,博士,教授,从事中药药理学研究,Tel:0371-65962546,E-mail:miaomingsan@163.com

and Sham operation group; Compared with I/R group, CIP + MCAO decreased the neurologic deficit scores ($P < 0.05$), cerebral histopathology injury ($P < 0.05$), and NSE in serum ($P < 0.01$). At the same time, the positive area and integral absorbance (IA) of BDNF, VEGF in cortex, and CA1 area at the damage side increased obviously ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The positive expression of GDNF showed an increasing trend, but with no statistical difference. **Conclusion:** The neuroprotective effects of CIP were correlated with the up-regulation of the endogenous proteins BDNF and VEGF.

[Key words] cerebral ischemic preconditioning; cerebral ischemiareperfusion; cerebral ischemic tolerance; neurotrophic factor; endogenous protective effect

短暂的脑缺血预处理(CIP)诱导脑组织对后续更严重的脑缺血产生抵抗能力的现象称为脑缺血耐受(CIT)。缺血、缺氧预处理的保护作用是在缺血缺氧诱因的刺激下,激发了机体内源性保护机制,增强了抗损伤能力^[1]。内源性保护现象证实了机体存在抗病、愈病的内在机制和能力,该现象与中医学的正气理论、扶正固本理论有高度的一致性,是中医正气作用的体现^[2]。内源性保护作用最关键的环节是诱导了内源性保护蛋白的产生^[3],发现内源性保护蛋白将有助于发现药物(尤其是不良反应小的中药)模拟预处理,以获得与其类似的长期保护作用,也将为中医理论的发展起到推动作用。

神经营养因子(NTF)是一组能支持神经元发育和存活的小分子多肽,包括神经生长因子(NGF),脑源性神经营养因子(BDNF)和胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)等^[4]。研究表明神经营养因子对于促进脑缺血灶周围神经元的恢复、神经突起新生、新突触形成及神经功能重塑等具有明显促进作用^[5-6]。BDNF和血管内皮生长因子(VEGF)是低氧诱导因子(HIF-1)的靶蛋白,在缺氧预处理中是强效神经保护蛋白^[7],但在CIP中的作用报道并不多,GDNF的研究更少。脑缺血前期研究表明,CIP能减小脑梗死面积,改善脑组织病理损伤^[8-9]。同时发现,炎性细胞因子作为触发物质刺激了机体内源性的保护机制,发挥内源性保护作用^[10]。本实验重点观察CIP后神经营养因子的变化,探讨BDNF, GDNF, VEGF是否作为内源性的保护蛋白参与脑缺血耐受的形成,以期探讨脑缺血耐受的发生机制,为以后应用相应药物来模拟或增强此过程,为缺血性脑血管疾病临床防治提供思路。

1 材料

1.1 动物 Wistar大鼠,雄性,SPF级,体重280~300g,由河北省实验动物中心提供,合格证号907048,动物饲养于SPF级环境中,自由饮食进水。

1.2 试剂 兔抗大鼠BDNF, GDNF, VEGF抗体及

即用型SABC-POD试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为BA0565-1, BA0890, BA0407, SA1022);大鼠NSE酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国Novateinbio公司,批号041803KB)。

1.3 材料及仪器 MCAO线栓(北京沙东生物技术有限公司), DP70型显微镜及显微照相系统(日本奥林巴斯株式会社), Image-Pro Plus 5.1专业图像分析系统(新加坡Media Cybernetics, Inc公司)。

2 方法

2.1 分组及模型复制 造模方法:采用阻断双侧颈总动脉血流10min的方法,作为CIP模型;采用大鼠中动脉阻塞(MCAO)2h方法,作为再次缺血损伤模型,具体的制备方法如下^[8]。

CIP模型:大鼠10%水合氯醛($3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)ip麻醉,仰卧位固定。分离双侧颈总动脉,无创微动脉夹夹闭双侧颈总动脉,阻断血流10min。

再次缺血损伤模型:大鼠于缺血预处理后72h,再次麻醉,颈部正中切口,逐层分离暴露左侧颈总动脉,颈外动脉及颈内动脉,结扎颈总动脉和颈外动脉,以动脉夹夹闭颈内动脉远心端后,于颈总动脉上做一小切口,从切口处插入MCAO线栓,插入深度20mm左右,实现大脑中动脉阻塞。结扎入口处,尼龙线外留1~2cm,缝合皮肤。2h后轻轻拔出线头至略有阻力,实现再灌注。脑缺血及再灌注过程中保持室温23~25℃。以动物清醒后左侧出现Horner征,提尾时右前肢内收屈曲,或爬行时向右侧旋转视为造模成功。

将大鼠按随机数字表分为3组,每组12只,分别为假手术组(Sham),脑缺血再灌注损伤组(I/R),CIP再次损伤组(CIP+MCAO)。CIP组先行10min的缺血预处理,于预处理后72h后再次缺血(MCAO)2h,脑缺血再灌注损伤组只行最后一次缺血损伤(MCAO,2h),假手术组同样分离颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉但不结扎,不栓塞中动脉。各组动物于最后一次缺血后24h取材。

2.2 神经功能缺损评分(NDS) 按照 Zea Longa 5 级评分法^[11],于术后 24 h 进行评定。评分标准:无明显神经症状,0 分;不能完全伸展对侧前爪,1 分;行走时向对侧旋转,2 分;行走时向对侧倾倒,3 分;不能自行行走,4 分。0 分、昏迷不醒者和死亡的动物不纳入结果统计。

2.3 ELISA 法检测 NSE 水平 术后 24 h,麻醉动物,腹主动脉取血,分离血清,ELISA 法检测血清中神经元特异性烯醇化酶(NSE)水平。

2.4 苏木素-伊红(HE)法检测脑组织病理形态 取血后,开颅取全脑,冠状位取视交叉向尾端 3~4 mm 组织块,用 40 g·L⁻¹多聚甲醛固定,石蜡包埋,冠状切片,做 HE 染色。参照 Kato 等^[12]分级方法,于光学显微镜下对缺血侧皮质区组织学改变进行分级,标准如下:Ⅰ级,皮层神经元细胞水肿,变性,少数神经元死亡;Ⅱ级,少量神经元死亡,梗死面积小于缺血侧皮质总面积的 1/3;Ⅲ级,成片神经元死亡,梗死面积大于缺血侧皮质总面积的 1/3 小于总面积的 2/3;Ⅳ级,大片神经元死亡,梗死面积大于缺血侧皮质总面积的 2/3。

2.5 免疫组化法检测 BDNF, GDNF, VEGF 表达 每组随机取 6 个蜡块,每个蜡块连续冠状切 3 片,切片厚度为 3 μm,采用 SP 免疫组化染色法(操作步骤按试剂盒说明书进行)分别做 BDNF, GDNF, VEGF 免疫组化染色。阳性细胞均为细胞浆呈棕黄色着色。在 Olympus 光学显微镜下观察免疫组化染色切片(400 倍),Olympus 数字显微照相机采集图像,在各动物缺血侧皮层、海马 CA1 区各选取 2 个视野,观察视野下 BDNF, GDNF, VEGF 阳性表达细胞,采集每个视野下 BDNF, GDNF, VEGF 阳性细胞的表达面积和积分吸光度 IA,综合反应 BDNF, GDNF, VEGF 的免疫染色强度。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件进行数据统计分析,计量资料数值采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法进行,计数资料用频率指标描述,采用 Kruskal-Wallis 法进行多样本等级资料的秩和检验,组间两两比较采用 Mann-Whitney U 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CIP 对 MCAO 大鼠神经功能缺损评分的影响 与 Sham 组比较,I/R 组大鼠出现了不同程度的神经功能缺损症状。表现为右侧前爪不能完全伸展,行走时向右侧旋转或倾倒。与 I/R 组比较,CIP +

MCAO 组大鼠的神经功能缺损评分明显降低($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 CIP 对 MCAO 大鼠神经功能的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of CIP on neurologic deficit scores of MCAO rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NDS/分
Sham	10	0 ¹⁾
I/R	9	2.33 ± 0.50
CIP + MCAO	10	1.70 ± 0.67 ¹⁾

注:与 I/R 组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

3.2 CIP 对 MCAO 大鼠血清中 NSE 水平的影响 与 Sham 组比较,I/R 组大鼠血清中 NSE 水平明显升高($P < 0.01$);与 I/R 组比较,CIP + MCAO 组能明显降低血清中 NSE 水平($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 CIP 对 MCAO 大鼠血清 NSE 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of CIP on NSE level of MCAO rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NSE/μg·L ⁻¹
Sham	10	3.62 ± 0.87 ²⁾
I/R	9	29.83 ± 10.98
CIP + MCAO	10	18.30 ± 6.59 ²⁾

注:与 I/R 组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 CIP 对 MCAO 大鼠脑组织病理形态变化的影响 Sham 组大鼠皮层脑组织结构完整,神经元排列整齐、规则,胞浆丰富,胞核清楚;I/R 组大鼠皮质可见明显的椭圆形梗死灶,筛状软化灶内神经元细胞消失或有固缩核残,缺血半暗带有明显水肿,细胞膜与周围组织分界明显;CIP + MCAO 组皮层神经元细胞固缩减轻,梗死范围缩小,水肿程度减轻。组织学等级资料显示与 I/R 组比较,CIP + MCAO 组能明显减轻缺血侧脑组织的病理损伤($P < 0.05$)。见表 3 及图 1。

表 3 CIP 对 MCAO 大鼠脑皮层病理形态学变化的影响

Table 3 Effects of CIP on histopathology changes in cortex of MCAO rats

组别	n	分级			
		I	II	III	IV
Sham	10	0	0	0	0
I/R	9	0	1	4	4
CIP + MCAO	10	1	4	4	1 ¹⁾

3.4 CIP 对 MCAO 大鼠脑组织 BDNF 表达的影响 免疫组化染色显示,在 Sham 组和缺血各组大鼠脑组织皮层、海马 CA1 区均有 BDNF 阳性表达,阳性表达产物位于神经元细胞胞浆中,呈棕黄色。

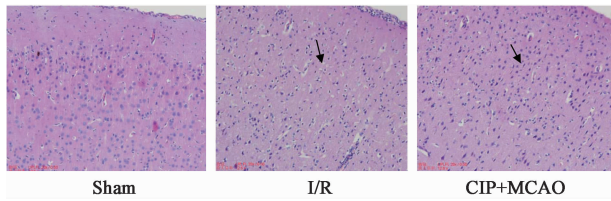


图 1 CIP 对 MCAO 大鼠脑皮层病理形态学变化的影响 (HE, × 200)

Fig.1 Effects of CIP on histopathology changes in cortex of MCAO rats (HE, × 200)

表 4 CIP 对 MCAO 大鼠皮层、海马 CA1 区 BDNF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 4 Expressions of BDNF in cortex and hippocampus CA1 area of rats with CIP ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	皮层		海马 CA1 区	
	阳性表达面积/ μm^2	IA	阳性表达面积/ μm^2	IA
Sham	178.63 ± 45.41 ²⁾	56.47 ± 16.52 ²⁾	84.27 ± 26.34	24.76 ± 10.43
I/R	58.90 ± 21.38	20.90 ± 8.13	71.87 ± 20.64	26.61 ± 8.15
CIP + MCAO	157.1 ± 36.15 ²⁾	74.10 ± 19.47 ^{2,3)}	109.79 ± 27.41 ^{1,3)}	48.56 ± 13.13 ^{2,4)}

注: 与 I/R 比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 Sham 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 6 同)。

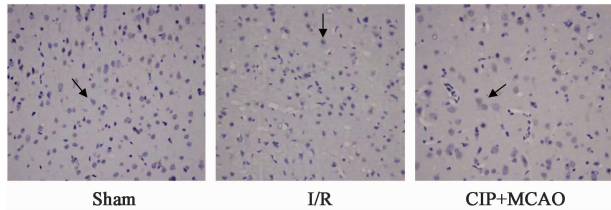


图 2 CIP 对 MCAO 大鼠皮层、海马 CA1 区 BDNF 表达的影响 (免疫组化, × 400)

Fig.2 Expressions of BDNF in cortex and hippocampus CA1 area of rats with CIP (IHC, × 400)

表 5 CIP 对 MCAO 大鼠皮层、海马 CA1 区 GDNF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 5 Expressions of GDNF in cortex and hippocampus CA1 area of rats with CIP ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	皮层		海马 CA1 区	
	阳性表达面积/ μm^2	IA	阳性表达面积/ μm^2	IA
Sham	57.87 ± 20.96	34.27 ± 5.81	23.45 ± 9.58	10.83 ± 3.46
I/R	71.87 ± 16.85	46.99 ± 10.80	29.32 ± 9.81	13.01 ± 3.24
CIP + MCAO	73.01 ± 14.71	44.47 ± 6.61	35.25 ± 11.43	14.12 ± 4.88

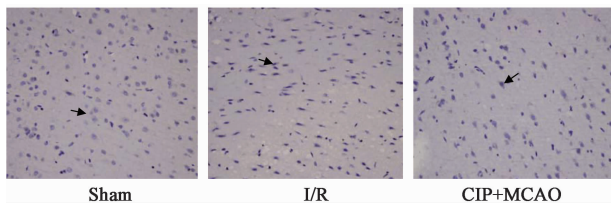


图 3 CIP 对 MCAO 大鼠皮层、海马 CA1 区 GDNF 表达的影响 (免疫组化, × 400)

Fig.3 Expressions of GDNF in cortex and hippocampus CA1 area of rats with CIP (IHC, × 400)

3.6 CIP 对 MCAO 大鼠脑组织中 VEGF 表达的影

与 Sham 组比较, I/R 组大鼠患侧脑组织皮层 BDNF 阳性表达面积和积分光密度值明显降低 ($P < 0.01$)。CIP + MCAO 组虽然没有明显增加皮层 BDNF 阳性表达面积, 但却明显增加了积分光密度值, 在海马 CA1 区, CIP + MCAO 组既能明显提高阳性表达面积, 又能提高积分光密度值; 与 I/R 组比较, CIP + MCAO 组大鼠皮层、海马 CA1 区 BDNF 阳性表达面积和积分光密度值明显增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 4, 图 2。

3.5 CIP 对 MCAO 大鼠脑组织中 GDNF 表达的影响

免疫组化染色显示, 在 Sham 组和缺血各组大鼠患侧脑组织皮层、海马 CA1 区均有 GDNF 阳性表达, 但表达较弱, 阳性表达产物位于神经元细胞, 胶质细胞胞浆中, 呈浅灰棕色。与 Sham 组比较, I/R 组大鼠患侧脑组织皮层、海马 CA1 区 GDNF 阳性表达略有升高, 但没有显著差别; 与 I/R 组比较, CIP + MCAO 组 GDNF 的阳性表达没有显著升高。见表 5, 图 3。

免疫组化染色显示, 在 Sham 组和缺血各组大鼠脑组织皮层、海马 CA1 区均有明显的 VEGF 阳性表达, 阳性反应产物位于神经元细胞胞浆中, 血管内皮细胞也有阳性表达, 呈明显棕黄色; 与 Sham 组比较, I/R 组大鼠患侧脑组织中 VEGF 表达略有升高, CIP + MCAO 组大鼠皮层、海马 CA1 区 VEGF 阳性表达面积和 IA 明显增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 I/R 组比较, CIP + MCAO 组大鼠皮层、海马 CA1 区 VEGF 阳性表达面积和 IA 也明显增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 6, 图 4。

表 6 CIP 对 MCAO 大鼠皮层、海马 CA1 区 VEGF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 6 Expressions of VEGF in cortex and hippocampus CA1 area of rats with CIP ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	皮层		海马 CA1 区	
	阳性表达面积/ μm^2	IA	阳性表达面积/ μm^2	IA
Sham	172.01 \pm 41.24	45.10 \pm 6.55	295.57 \pm 47.60	79.80 \pm 34.60
I/R	187.57 \pm 73.73	48.07 \pm 14.90	322.95 \pm 130.76	88.75 \pm 30.80
CIP + MCAO	302.40 \pm 51.96 ^{2,4)}	74.01 \pm 11.70 ^{2,4)}	514.63 \pm 103.66 ^{2,4)}	118.96 \pm 24.68 ^{1,3)}

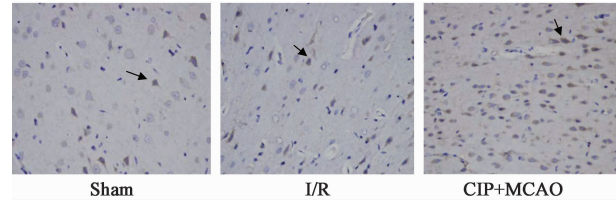


图 4 CIP 对 MCAO 大鼠皮层、海马 CA1 区 VEGF 表达的影响 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 4 Expressions of VEGF in cortex and hippocampus CA1 area of rats with CIP (IHC, $\times 400$)

4 讨论

神经元损伤的特异性生化指标是 NSE, 它的水平变化能反映神经元受损程度。临床上缺血缺氧脑病人血清中 NSE 水平明显升高, 可作为疾病诊断和预后的生物标志物^[13]。局灶性脑缺血大鼠血清 NSE 水平也明显升高^[14]。本研究结果表明, CIP 后大鼠血清中 NSE 水平明显降低, 神经功能缺损评分明显降低, 脑组织病理损伤也明显减轻, 说明 CIP 对脑缺血再灌注损伤有一定的保护作用。

CIP 的保护作用在于调动了机体内源性防御能力, 产生了保护蛋白, 神经营养因子如 BDNF, GDNF, VEGF 等作为神经保护蛋白, 可保护神经元对缺血缺氧的损伤, 在中风、帕金森病、阿尔茨海默病等的治疗中具有重要意义^[15]。实验研究也表明脑缺血缺氧时引起神经营养因子在缺血半暗带和缺血远隔区域表达增高, 修复受损的神经元^[4]。BDNF 最初是在脑缺血中被发现具有促进神经功能恢复的生长因子, 后来又发现它具有促进血管生成的作用, 而 VEGF 最初被发现具有促进血管新生的作用, 后来又发现它具有多种神经保护作用^[16-17]。现有的研究资料认为, 迟发性的脑缺血耐受可能与神经营养因子有关。

有报道电针预处理后使局灶性脑缺血小鼠皮层 BDNF 的蛋白表达从 6 h 开始明显增加, 12 h 达到一个平台期^[18]; 临床试验也证明给 14 岁健康青年人急性缺氧预处理 (血氧浓度降到 75%), 可使血清 BDNF 水平明显升高^[19]; 新生乳猪缺氧预处理能诱

导低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 及其靶基因 VEGF mRNA 在缺血缺氧后 0 h, 6 h, 24 h, 3 d, 7 d 明显升高, 说明缺氧预处理诱导的耐受与上调 VEGF 有关^[20]。小鼠 CIP 后海马 CA1 区 VEGF-C 和血管内皮生长因子受体-3 (VEGFR-3) 表达明显增多, 使用 VEGFR-3 受体拮抗剂后, 缺血预处理的保护效应消失, 说明 VEGF-C 参与了缺血预处理诱导的海马缺血耐受^[21]。

国外很少有报道 GDNF 参与脑缺血耐受现象, 国内有研究提示脑缺血耐受现象与胶质细胞有关。GDNF 侧脑室注射给药可明显降低 MCAO 大鼠脑梗死体积, 减少神经功能缺失症状, 诱导大鼠脑缺血耐受^[22]。缺血预处理可提高 MCAO 大鼠皮层梗死周边区 GDNF 蛋白及 mRNA 表达水平明显升高, 呈双峰现象, 分别在 3 h 和 3 d, 提示 CIP 诱导了 GDNF 的表达增强是对抗脑缺血损伤的一种方式^[23]。

本实验研究结果表明, CIP 后 VEGF 与 BDNF 皮层、海马 CA1 区的阳性表达面积和 IA 均明显升高, 说明预处理后不仅表达 BDNF, VEGF 的神经元数量增多, 而且强度也明显增强。笔者以前的研究表明, CIP 后 72 h 可明显诱导脑缺血耐受的产生^[8], 本实验结果显示 CIP 后 72 h BDNF, VEGF 的蛋白表达明显升高, 提示在 CIP 的刺激下 BDNF, VEGF 作为内源性的保护蛋白, 参与了脑缺血耐受。

虽然多数文献报道, 脑缺血时星形胶质细胞激活, 通过合成多种蛋白质、细胞因子和神经营养因子等对神经元起保护作用。而笔者的实验结果表明, 不管是脑缺血再灌注损伤组, 还是 CIP 组, 在大鼠患侧脑组织皮层, 海马 CA1 区 GDNF 的表达与 BDNF 相比, 表达量比较少, CIP 组虽有升高 GDNF 的趋势, 但没有统计学差异。这可能与胶质细胞对缺血缺氧的敏感性有关。胶质细胞对缺血缺氧的耐受性比神经元细胞强, 所以短暂的缺血预处理能明显刺激神经元细胞合成 BDNF, 但对胶质细胞影响较小。另外, 脑缺血后 GDNF 蛋白及 mRNA 表达呈双峰现象, 分别在 3 h 和 3 d^[23], 笔者的取材时间点是缺血

再灌注后 24 h, 这个时间点 GDNF 表达的第 1 个高峰之后, 第 2 个表达高峰之前, 处于 GDNF 表达的一个低谷时间段, 所以笔者的实验结果中 GDNF 的表达较弱, CIP 对 GDNF 的表达影响较小。

本实验结果表明神经营养因子 BDNF, VEGF 在 CIP 后 72 h 阳性表达明显增加, 该表达时间点正好与笔者前期研究的 CIP 的神经保护时间窗一致^[8], 提示 BDNF, VEGF 作为内源性保护蛋白参与了 CIP 的神经保护作用。该研究为探讨中药是否能调动内源性保护作用, 加强缺血预处理的保护效应, 提供了理论依据, 并对相关药物的开发产生良好的推动作用。

[参考文献]

[1] 吴慧, 金义超, 杨绍峰, 等. 缺血预处理对大鼠局灶性脑缺血的保护作用[J]. 中国临床神经外科杂志, 2015, 20(1): 37-40.

[2] 张晓文, 宋清, 徐志伟. 内源性保护对中医药研究的启发和意义[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(1): 14-16.

[3] 王小琴, 邹玉安, 郭春燕. 脑缺血预处理和脑缺血耐受机制的研究进展[J]. 神经药理学报, 2015, 5(2): 30-37.

[4] 刘鹏, 王瑾, 苗常青, 等. 大鼠局灶性脑缺血后神经营养因子表达的自然变化[J]. 卒中与神经疾病, 2015, 22(4): 211-214.

[5] Yang J P, Liu H J, Yang H, et al. therapeutic time window for the neuroprotective effects of NGF when administered after focal cerebral ischemia[J]. *Neurol Sci*, 2011, 32(3): 433-441.

[6] 李映辰, 王瑾茜, 刘侃, 等. 肾脑复元汤联合人脐带间充质干细胞移植对脑缺血再灌注大鼠神经营养因子表达的影响[J]. 中草药, 2016, 47(5): 781-787.

[7] Li Q, Michaud M, Stewart W, et al. Modeling the neurovascular niche: murine strain differences mimic the range of responses to chronic hypoxia in the premature newborn[J]. *J Neurosci Res*, 2008, 86(6): 1227-1242.

[8] 方晓艳, 孙建宁, 苗明三. 缺血预处理后不同间隔时间对大鼠脑缺血耐受的诱导作用[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(3): 65-67.

[9] 方晓艳, 白明, 李建平, 等. 诱导大鼠产生脑缺血耐受的时间剂量探讨[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(6): 585-587.

[10] 方晓艳, 孙建宁, 苗明三. 不同脑缺血预处理时相对再次缺血损伤大鼠脑组织中 IL-1 β , TNF- α , IL-10 含量的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(8): 537-540.

[11] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in

rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.

[12] Kato H, Liu Y, Araki T, et al. Temporal profile of the effects of pretreatment with brief cerebral ischemia on the neuronal damage following secondary ischemic insult in the gerbil: cumulative damage and protective effects[J]. *Brain Res*, 1991, 553: 238-242.

[13] Pei X M, Gao R, Zhang G Y, et al. Effects of erythropoietin on serum NSE and S-100B levels in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Chin J Contemp Pediatr*, 2014, 16(7): 705-708.

[14] 甄丽芳, 罗远带, 黄福开. 七十味珍珠丸对局灶性脑缺血大鼠的神经保护作用[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(1): 90-92.

[15] Shimamura M, Sato N, Morishita R. Experimental and clinical application of plasmid DNA in the field of central nervous diseases[J]. *Curr Gene Ther*, 2011, 11(6): 491-500.

[16] Kim J M, Stewart R, Kim S W, et al. BDNF genotype potentially modifying the association between incident stroke and depression[J]. *Neurobiol Aging*, 2008, 29(5): 789-792.

[17] Zacchigna S, Lambrechts D, Carmeliet P. Neurovascular signalling defects in neurodegeneration[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(3): 169-181.

[18] Kim J H, Choi K H, Jang Y J, et al. Electroacupuncture preconditioning reduces cerebral ischemic injury via BDNF and SDF-1 α in mice[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13(1): 22.

[19] Hubold C, Lang U E, Gehring H. Increased serum brain-derived neurotrophic factor protein upon hypoxia in healthy young men[J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2009, 116(10): 1221-1225.

[20] Ara J, Fekete S, Frank M, et al. Hypoxic-preconditioning induces neuroprotection against hypoxia-ischemia in newborn piglet brain[J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 43(2): 473-485.

[21] Bhuiyan M I, Kim J C, Hwang S N. Ischemic tolerance is associated with VEGF-C and VEGFR-3 signaling in the mouse hippocampus[J]. *Neuroscience*, 2015, 290: 90-102.

[22] 康治臣, 郭颖杰, 刘忠良. 大鼠 GDNF 干预后诱导脑缺血耐受的研究[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(18): 1807-1808.

[23] 胡跃强, 唐农, 刘泰, 等. 大鼠局灶性脑缺血再灌注后 GDNF mRNA 及其蛋白表达的变化[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(20): 3984-3986.

[责任编辑 周冰冰]