

引用本文:钟超超,徐兴国,苗海航,等.亚低温对缺血性脑卒中小鼠血脑屏障损伤保护作用[J].安徽医药,2023,27(2):337-340.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.02.028.

◇临床医学◇



亚低温对缺血性脑卒中小鼠血脑屏障损伤保护作用

钟超超,徐兴国,苗海航,乔峤,秦毅彬

作者单位:南通大学附属医院麻醉科,江苏 南通 226001

通信作者:秦毅彬,男,硕士生导师,研究方向为围术期重要脏器的保护,Email:572537172@qq.com

基金项目:南通市科技发展计划项目(MS12020026)

摘要: **目的** 探讨亚低温对缺血性脑卒中小鼠血脑屏障的保护作用,寻找亚低温发挥保护作用的机制。**方法** 选取由南通大学实验动物中心提供的SPF级别雄性C57/BL6小鼠54只,分为假手术组($n=18$)和卒中组($n=36$),卒中组分为亚低温组($n=18$)和常温组($n=18$)。卒中组在行大脑中动脉阻塞手术后对亚低温组小鼠予以亚低温处理,在口腔温度监测下维持小鼠温度为 $(34\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$,其他组术后均置于保温毯上正常复温。术后每日对各组神经功能进行评分,同时使用错步时间检测卒中后小鼠行为运动功能。于术后第3天处死小鼠,取梗死脑区行蛋白质印迹法(Western blotting)检测血脑屏障黏附分子紧密连接蛋白(ZO-1),紧密连接跨膜蛋白(Claudin-5)的蛋白表达以判断血脑屏障损伤的程度。**结果** 假手术组、亚低温组、常温组小鼠存活率分别为100%(18/18),94.44%(17/18),88.89%(16/18)。三组存活率比较,差异无统计学意义($\chi^2=53.72$, $P=0.122$)。卒中组小鼠术后第1、2、3天神经功能评分 $[(2.8\pm 0.2)$ 、 (2.6 ± 0.3) 、 (2.4 ± 0.3) 分]明显高于假手术组 $[(0.6\pm 0.04)$ 、 (0.5 ± 0.03) 、 (0.4 ± 0.01) 分],差异有统计学意义($t=2.94$, $P<0.001$; $t=2.86$, $P<0.001$; $t=2.98$, $P<0.001$);卒中组中,常温组小鼠术后第1、2、3天神经功能评分均明显高于亚低温组 $[(2.0\pm 0.3)$ 、 (1.9 ± 0.2) 、 (1.8 ± 0.2) 分],差异有统计学意义。卒中组小鼠术后第1、2、3天前后肢的平均错步比例(26.8%_前、32%_后;29.0%_前、31.1%_后;31.8%_前、33.1%_后)均高于假手术组(均为3%_前、3%_后),差异有统计学意义($\chi^2=29.05$, $P=0.002$; $\chi^2=28.76$, $P=0.003$; $\chi^2=26.42$, $P=0.005$),且常温组小鼠术后第1、2、3天前后肢平均错步的比例高于亚低温组(16.6%_前、16.9%_后;18.6%_前、17.9%_后;20.8%_前、19.9%_后),差异有统计学意义($\chi^2=27.35$, $P=0.004$; $\chi^2=26.59$, $P=0.004$; $\chi^2=24.12$, $P=0.007$)。存活的小鼠,脑卒中中可以显著降低小鼠脑卒中脑组织中血脑屏障黏附分子ZO-1, Claudin-5的蛋白表达($t=2.54$, $P=0.001$; $t=2.46$, $P=0.003$),亚低温处理组小鼠脑组织血脑屏障黏附分子ZO-1, Claudin-5的蛋白表达比常温处理组显著增高($t=2.48$, $P=0.003$; $t=1.68$, $P=0.043$)。**结论** 脑卒中术后予以6 h的亚低温处理可降低卒中后小鼠神经功能评分,改善术后短期运动行为功能,减少血脑屏障的破坏。

关键词: 低温,人工; 脑梗死; 缺血性脑卒中; 血脑屏障

Protective effect of subhypothermia on blood-brain barrier injury in mice with ischemic stroke

ZHONG Chaochao, XU Xingguo, MIAO Haihang, QIAO Qiao, QIN Yibin

Author Affiliation: Department of Anesthesiology, the Hospital Affiliated of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of subhypothermia on blood-brain barrier injury in mice with ischemic stroke, and to explore the mechanism of the protective effect of subhypothermia. **Methods** A total of 54 SPF-grade male C57/BL6 mice provided by the Experimental Animal Center of Nantong University were selected and divided into a sham-operated group ($n=18$) and a stroke group ($n=36$), and the stroke group was divided into a subhypothermia group ($n=18$) and a normothermic group ($n=18$). In the stroke group, mice in the subcritical group were treated with subcritical temperature after middle cerebral artery obstruction surgery, and the temperature of the mice was maintained at $(34\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ under oral temperature monitoring, while all other groups were placed on a thermal blanket for normal rewarming after surgery. The neurological function of each group was scored daily after surgery, and the poststroke behavioral-motor function of the mice was also measured using staggered time. The mice were sacrificed on the third day after surgery, and the protein expression of ZO-1 and Claudin-5 was measured by western blotting to determine the extent of blood-brain barrier damage. **Results** The survival rates of the sham group, subhypothermia group and normothermic groups of mice were 100% (18/18), 94.44% (17/18), and 88.89% (16/18), respectively. There was no significant difference in the survival rate among the three groups ($\chi^2=53.72$, $P=0.122$). The neurological function scores on postoperative days 1, 2, and 3 were significantly higher in the stroke group $[(2.8\pm 0.2)$, (2.6 ± 0.3) , $(2.4\pm 0.3)]$ than in the sham group $[(0.6\pm 0.04)$, (0.5 ± 0.03) , and $(0.4\pm 0.01)]$, with statistically signifi-

cant differences ($t=2.94, P<0.001; t=2.86, P<0.001; t=2.98, P<0.001$). In the stroke group, the neurological function scores on postoperative days 1, 2 and 3 were significantly higher in the normothermic group than in the subhypothermia group [(2.0±0.3), (1.9±0.2), and (1.8±0.2)], and the differences were statistically significant. In the stroke group, the average proportion of hind limb missteps before the 1st, 2nd, and 3rd postoperative days was higher in the mice (26.8% forelimb and 32% posterior limb; 29.0% forelimb and 31.1% posterior limb; 31.8% forelimb and 33.1% posterior limb) than in the sham-operated group (both forelimb and posterior limb 3%), and the differences were statistically significant ($\chi^2=29.05, P=0.002; \chi^2=28.76, P=0.003; \chi^2=26.42, P=0.005$). The average proportion of hind limb missteps before the 1st, 2nd, and 3rd postoperative days were higher in the normothermic group than in the sham-operated group (16.6% forelimb and 16.9% posterior limb; 18.6% forelimb and 17.9% posterior limb; 20.8% forelimb and 19.9% posterior limb), and the difference was statistically significant ($\chi^2=27.35, P=0.004; \chi^2=26.59, P=0.004; \chi^2=24.12, P=0.007$). In surviving mice, stroke significantly reduced the protein expression of ZO-1 and Claudin-5 in the brain tissue of mice with stroke ($t=2.54, P=0.001; t=2.46, P=0.003$), and the protein expression of ZO-1 and Claudin-5 in the brain tissue of mice treated with subhypothermia was significantly higher than that in the normothermic treatment group ($t=2.48, P=0.003; t=1.68, P=0.043$). **Conclusion** Subhypothermia treatment for 6 h after stroke surgery reduced the neurological scores, improved the short-term postoperative motor behavioral function, and reduced the damage to the blood-brain barrier.

Key words: Hypothermia, induced; Brain infarction; Ischemic stroke; Blood-brain barrier

缺血性脑卒中是全球致死致残的主要疾病之一,每年大约有600万人死于脑卒中^[1],然而治疗手段十分有限。目前经FDA批准的仅tPA治疗或血管内治疗,但都具有严格的时间窗限制,只有不足5%的急性脑卒中病人可以及时接受tPA再通治疗^[2-3]。因此探究缺血性脑卒中损伤机制并对其进行干预显得极为迫切。亚低温^[4](33~35℃)对缺血/缺氧性脑病、颅脑外伤等有确切的治疗作用,但是亚低温对缺血性脑卒中的保护作用以及保护机制仍然需要更多的研究。本研究通过对小鼠大脑中动脉阻塞60 min的模型进行亚低温处理6 h,观察小鼠术后3 d内的行为学变化,探讨亚低温对缺血性脑卒中的保护作用及其作用机制,为进一步应用于临床打下基础。

1 材料与方法

1.1 动物选择及分组 SPF级别雄性C57/BL6小鼠54只,23~25 g,由南通大学实验动物中心提供。小鼠分为假手术组(假手术组, $n=18$)和卒中组($n=36$),卒中组小鼠行大脑中动脉阻塞手术建立缺血性脑卒中模型,术后分为亚低温组[(34.0±0.5)℃, $n=18$]和常温组[(37.0±0.2)℃, $n=18$]。所有实验均经南通大学动物伦理委员会审批通过(审批号S20220210-008)。

1.2 建立模型 卒中模型:用显微动脉夹暂时夹闭颈总动脉,将颈外动脉残端牵向外下方,使之与颈内动脉呈一条直线,在颈外动脉残端剪一小口,将长径为0.23 mm的8号线栓自颈外动脉插入颈内动脉,轻柔缓慢向前推进至遇阻力,将线栓与颈外动脉共同结扎以固定线栓,松开动脉夹,缝合切口。此时封闭了大脑中动脉开口,阻断了大脑中动脉的血流。大脑中动脉血流阻断60 min后暴露颈部切

口,缓慢拔出线栓实现再灌注。

假手术:仅进行暴露颈总动脉,颈内动脉,颈外动脉,电凝颈外动脉近端和远端并离断。

1.3 亚低温处理 假手术组和常温组小鼠造模后立即置于烤灯(60 W)下复温,直至体温在(37.0±0.2)℃。亚低温组小鼠头部放置冰块局部降温,将口腔温度维持在(34.0±0.5)℃,维持6 h,后缓慢复温,直至体温维持在(37.0±0.2)℃。

1.4 观察指标及监测方法

1.4.1 口咽温 将特制的温度探头置于小鼠的舌下,记录小鼠温度的变化,当小鼠温度偏离时,予以升温或降温处理。

1.4.2 神经功能评分 采用动物行为学进行评分,0分:无神经损伤症状;1分:不能完全伸展对侧前爪;2分:向瘫痪侧转圈;3分:向对侧倾倒;4分:不能自发行走,意识丧失。

1.4.3 错步实验 是一种在啮齿动物模型中确定中枢神经系统疾病的运动功能的工具。将小鼠放在钢格上(长径2.5 mm的杆,相距1 cm),记录小鼠每一成功放置脚位置的步数,一只爪子滑过钢格被认为是错步。确定每个爪的步数和错步数。错步实验百分比=错步/(步数+错步)×100%。

1.4.4 蛋白质印迹法检测 将从每只大鼠收集的脑组织(100 mg)匀浆并在RIPA裂解缓冲液中裂解,然后使用BCA试剂盒(北京TransGen Biotech Co., Ltd.)进行分析以检测紧密连接蛋白(ZO-1),紧密连接跨膜蛋白(Claudin-5)浓度。将组织总蛋白加载到10%SDS-PAGE凝胶上,并转移到硝酸纤维素膜上。用5%脱脂乳封闭膜,然后在4℃与一抗孵育过夜。然后将膜与二抗孵育,然后显色分析蛋白质印迹。

1.5 统计学方法 应用Graphpad 6.0统计学软件进

行数据分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用成组设计的 t 检验;计数资料用率表示,比较采用 χ^2 检验或校正标准差 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 存活率 共54只小鼠纳入研究,假手术组、常温组和亚低温组存活率分别为100% (18/18)、94.44% (17/18)、88.89% (16/18)。亚低温组与常温组存活率比较,差异无统计学意义($\chi^2=53.72$, $P=0.122$)。

2.2 神经功能评分 于卒中术前1天,术后第1、2、3天进行神经功能评分。术前各组小鼠神经功能评分均为0分,差异无统计学意义。常温组术后第1、2、3天神神经功能评分明显高于假手术组($t=2.94$, $P < 0.001$; $t=2.86$, $P < 0.001$; $t=2.98$, $P < 0.001$),卒中组中,亚低温组术后第1、2、3天神神经功能评分均明显低于常温组(分别为 $t=1.68$, $P < 0.05$; $t=2.39$, $P < 0.01$; $t=1.67$, $P < 0.05$)。见表1。

表1 缺血性脑卒中组及假手术组术后不同时间的神经功能评分/(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第1天	第2天	第3天
假手术组	18	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0
亚低温组	18	2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.2
常温组	18	2.8 ± 0.2	2.6 ± 0.3	2.4 ± 0.3

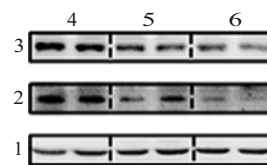
2.3 错步实验 卒中组小鼠术后第1、2、3天前肢的平均错步比例均值均高于假手术组,差异有统计学意义($\chi^2=29.05$, $P=0.002$; $\chi^2=28.76$, $P=0.003$; $\chi^2=26.42$, $P=0.005$)。脑卒中术后第1、2、3天亚低温组前肢后肢错步比例均值均明显低于常温组($\chi^2=29.05$, $P=0.002$; $\chi^2=28.76$, $P=0.003$; $\chi^2=26.42$, $P=0.005$)。亚低温处理可以显著降低卒中后小鼠前肢和后肢的错步次数。见表2。

表2 缺血性脑卒中组及假手术组术后不同时间的前肢和后肢错步比例均值比较/%

组别	鼠数	第1天		第2天		第3天	
		前肢	后肢	前肢	后肢	前肢	后肢
假手术	18	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
亚低温	18	16.6	16.9	18.6	17.9	20.8	19.9
常温	18	26.8	32.0	29.0	31.1	31.8	33.1

2.4 血脑屏障黏附分子蛋白质印迹法 存活的小鼠,脑卒中可以显著降低小鼠脑卒中脑组织中血脑屏障黏附分子ZO-1, Claudin-5的蛋白表达($t=2.54$, $P=0.001$; $t=2.46$, $P=0.003$),亚低温组小鼠脑组织血脑屏障黏附分子ZO-1 [(0.71±0.08)比(0.36±

0.07)], Claudin-5 [(0.52±0.06)比(0.22±0.03)]的蛋白表达明显高于常温组($t=2.48$, $P=0.003$; $t=1.68$, $P=0.043$)。见图1。



注:1—β肌动蛋白(β-actin);2—Claudin-5;3—ZO-1;4—假手术组;5—亚低温组;6—常温组。

图1 黏附分子ZO-1及Claudin-5的蛋白质印迹图

3 讨论

血脑屏障是分隔中枢和外周的神经血管单元,使得中枢处于免疫监视和调节中,维持神经元活动的脑微环境的稳定^[5-7]。血脑屏障破坏是缺血性脑卒中发生后的最为常见的病理进程,血脑屏障的破坏与卒中的神经功能障碍息息相关。众多研究表明亚低温(32~35℃)作为一种有效的脑保护方法,已应用于严重颅脑损伤^[8]、心脏手术^[9]和心肺复苏后病人的治疗中,其保护作用被认为是多因素交互作用的结果^[10-13],亚低温是脑损伤后有效的保护措施,已被广泛用于动物缺血性脑卒中后的处理^[14-15],可能与亚低温可以降低脑卒中后代谢率预防ATP耗竭相关,但亚低温是否可以通过血脑屏障发挥脑保护作用尚不清楚。

在本研究中,我们检测了卒中后血脑屏障遭受破坏,其黏附分子ZO-1, Claudin-5的表达下调,卒中后神经功能显著降低,当在卒中发生后进行亚低温处理,虽然不改变卒中后的存活率,但是可以有效改善卒中术后神经功能评分,减少卒中小鼠在错步实验中的错步次数,增加血脑屏障黏附分子ZO-1、Claudin-5的蛋白表达。我们的结果表明,治疗性亚低温处理可以通过改善血脑屏障的完整性来发挥神经保护作用。

综上所述,亚低温处理尽管不改变脑卒中后的生存率,但可以改善神经功能评分,可能是通过对血脑屏障的影响发挥了保护作用,但具体机制尚需进一步研究,亚低温在临床应用中的价值也需要大样本的随机对照试验来证实。

参考文献

- [1] BENJAMIN EJ, BLAHA MJ, CHIUVE SE, et al. Heart disease and stroke statistics-2017 update: a report from the American heart association [J/OL]. Circulation 2017, 135: e146-e603. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000485.
- [2] ARBO BD, BENNETTI F, RIBEIRO MF. Astrocytes as a target for neuro-protection: modulation by progesterone and dehydroepi-

- androstosterone[J]. *Prog Neurobiol*, 2016, 144: 27-47.
- [3] DHARMASAROJA PA. Fluid intake related to brain edema in acute middle cerebral artery infarction [J]. *Transl Stroke Res*, 2016, 7: 49-53.
- [4] SARAIVA C, PRACA C, FERREIRA R, et al. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases [J]. *J Control Release*, 2016, 235: 34-47.
- [5] LI Y. The peripheral immune response after stroke-A double edge sword for blood-brain barrier integrity [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2018, 24(12): 1115-1128.
- [6] DIRNAGL U. Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1268: 21-25.
- [7] ZHANG JH. The vascular neural network-a new paradigm in stroke pathophysiology [J]. *Nat Rev Neurol*, 2012, 8(12): 711-716.
- [8] CHOI HA, BADJATIA N, MAYER SA. Hypothermia for acute brain injury - mechanisms and practical aspects [J]. *Nature Reviews Neurology*, 2012, 8(4): 214-222.
- [9] RAB T, KERN KB, TAMIS-HOLLAND JE, et al. Cardiac arrest: a treatment algorithm for emergent invasive cardiac procedures in the resuscitated comatose patient [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2015, 66(1): 62-73.
- [10] XIAO Q, YE Q, WANG W, et al. Mild hypothermia pretreatment protects against liver ischemia reperfusion injury via the PI3K/AKT/FOXO3a pathway [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16(5): 7520-7526.
- [11] XIA Z, WANG W, XIAO Q, et al. Mild hypothermia protects renal function in ischemia-reperfusion kidney: an experimental study in mice [J]. *Transplantation Proceedings*, 2018, 50(10): 3816-3821.
- [12] XIAO Q, YE QF, WANG W, et al. Mild hypothermia pretreatment protects hepatocytes against ischemia reperfusion injury via down-regulating miR-122 and IGF-1R/AKT pathway [J]. *Cryobiology*, 2017, 75: 100-105.
- [13] WANG W, XIAO Q, HU XY, et al. Mild hypothermia pretreatment attenuates liver ischemia reperfusion injury through inhibiting c-Jun NH2-terminal kinase phosphorylation in rats [J]. *Transplantation Proceedings*, 2018, 50(1): 259-266.
- [14] Wang CF. Mild hypothermia reduces endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and improves neuronal functions after severe traumatic brain injury [J/OL]. *Brain Behav*, 2019, 9(4): e01248. DOI: 10.1002/brb3.1248.
- [15] LIU XY, WU D, WEN S, et al. Mild therapeutic hypothermia protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting miR-15b expression in rats [J]. *Brain Circ*, 2017, 3(4): 219-226.
- (收稿日期: 2021-09-02, 修回日期: 2021-10-26)

引用本文: 史雨璇, 殷其改. 生后早期血小板参数与早产儿支气管肺发育不良的相关性分析[J]. 安徽医药, 2023, 27(2): 340-344. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2023.02.029.

◇临床医学◇



生后早期血小板参数与早产儿支气管肺发育不良的相关性分析

史雨璇, 殷其改

作者单位: 徐州医科大学附属连云港医院儿科, 江苏 连云港 222003

通信作者: 殷其改, 女, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为新生儿疾病, Email: yinqigai@njmu.com

摘要: **目的** 探讨生后早期血小板参数与早产儿支气管肺发育不良(BPD)的相关性。**方法** 采用回顾性病例对照研究, 收集2013年1月至2020年12月徐州医科大学附属连云港医院新生儿重症监护病房收治的胎龄 ≤ 32 周的早产儿的临床一般资料和生后2 h、生后24~48 h的血小板参数: 血小板计数(PLT)、平均血小板体积(MPV)、血小板压积(PCT)、血小板分布宽度(PDW), 根据早产儿是否患有BPD分为BPD与非BPD组, 比较两组的一般资料、围产资料、临床特征及血小板参数。采用二元logistic回归分析BPD发生的危险因素, 受试者操作特征曲线(ROC曲线)分析血小板参数对BPD的预测价值。**结果** 两组间生后2 h内PLT、MPV、PCT、PDW比较差异无统计学意义。BPD组生后24~48 h内MPV水平高于非BPD组[(10.18 $\pm$ 0.80) fL比(9.43 $\pm$ 0.63) fL], 差异有统计学意义; 两组间PLT、PCT、PDW差异无统计学意义。多因素logistic回归分析显示出生胎龄小[OR=0.24, 95%CI: (0.07, 0.87)]、CPAP时间长[OR=1.42, 95%CI: (1.08, 1.87)]、机械通气时间长[OR=1.57, 95%CI: (1.11, 2.21)]、输注红细胞次数多[OR=2.28, 95%CI: (1.07, 4.86)]、生后24~48 h内MPV大[OR=17.80, 95%CI: (2.56, 123.90)]是发生BPD的独立危险因素。当生后24~48 h内MPV的诊断界值为9.6时, 预测BPD的灵敏度为77.1%, 特异度为64.9%。**结论** 生后24~48 h内较高水平的MPV是发生BPD的独立危险因素。生后24~48 h MPV >9.6 fL可作为 ≤ 32 周早产儿BPD发生的较敏感的预测指标。

关键词: 支气管肺发育不良; 平均血小板体积; 血小板参数; 血小板; 早产儿