

# 缺血后处理对脑保护作用的研究进展

陈志敏 陈丽霞 张荟雪 王健健 杨永梅 王丽华

【中图分类号】 R743.3    【文献标识码】 A    【文章编号】 1007-0478(2017)02-0150-03  
【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.02.020

缺血后处理是一种可以减轻脑缺血再灌注损伤的新方法,对脑缺血的再灌注损伤也具有显著保护作用。通过抑制基因过表达,调控炎症、凋亡及氧化应激、自我吞噬,影响泛连接蛋白 1/P2X7 嘌呤受体复合物途径、p38 MAPK-ATF2 通路作用,下调 AQP4 的表达等机制,其改善了血管神经单元细胞的相互作用,实现神经系统的保护作用。

脑缺血是危害人类健康的常见病、多发病,其较高发病率、病死率和致残率给社会、家庭带来沉重的负担和痛苦。研究者发现脑组织经过一定时间的缺血后再次恢复血液灌注时其功能及结构损伤反而会加重,即“脑缺血再灌注损伤”。目前大量研究表明缺血后处理(Ischemic postconditioning, IPoC)对缺血再灌注损伤后的脑组织具有内源性保护作用,例如国内研究者王贝娜等对 290 例急性脑梗死患者使用血压袖带模拟肢体 IPoC 操作,结果显示肢体缺血后处理能够改善急性脑梗死患者的神经功能。因此,本研究就 IPoC 的脑保护作用的机制和方法做一综述。

## 1 IPoC 的脑保护作用机制

### 1.1 抑制转录因子的过度表达

Tang 等发现钟样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)表达于神经元,TLR4 基因活化后可以直接或间接地导致神经元死亡<sup>[1]</sup>。核因子  $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)是最常见的一种炎症反应相关的转录因子,缺血脑组织中发现 TLR 的内生型配体,其与 TLRs 结合后引起下游信号通路的激活,包括 NF- $\kappa$ B 可引起促炎细胞因子和趋化因子的生成,参与缺血/再灌注后的脑组织的炎症反应,免疫荧光表明 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 显著表达于神经元<sup>[2]</sup>。Qi 等人证明实验大鼠脑组织缺血/再灌注损伤后 1 d 内神经组织中 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 的转录显著上调,随后 Qi 等人对大鼠脑中动脉短暂闭塞的 SD 大鼠股骨后动脉进行 10 min 夹闭/10 min 开放的 3 个循环后发现,远隔 IPoC 显著改善了缺血脑组织的神经功能缺陷,而且缩小了梗死体积;进一步研究显示此机制是通过抑制由大鼠脑中动脉闭塞/再灌注引起的 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 的过度表达,进而减弱缺血再灌注后的 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 信号通路的过度激活,来实现其神经保护作用<sup>[3]</sup>。

HIF-1 $\alpha$ (缺氧诱导因子-1 $\alpha$ )是与脑缺血相关的另一个重要的转录因子。作为多数基因缺氧条件下的转录调节器,在缺血情况下它不仅参与调节血管生成、糖代谢和细胞生长<sup>[4]</sup>,还在细胞凋亡、炎症反应等过程中起至关重要的作用<sup>[5]</sup>。Zong 等人通过对 IPoC 大鼠脑组织进行神经功能缺损评分、梗死体积及脑水肿程度测算,发现 IPoC 发挥神经保护作用的机制是通过抑制 HIF-1 $\alpha$  的过度表达,进而抑制炎症反应来实现的<sup>[6]</sup>。上述研究证实了 IPoC 通过抑制转录因子过表达来发挥神经保护作用,为临床研究提供了新思路。

### 1.2 核因子 NF- $\kappa$ B/P65 激活的衰减

大量研究证实核因子 NF- $\kappa$ B/p65 在脑 IPoC 中起保护作用,而在程序性细胞死亡如细胞凋亡和自噬性死亡过程中起破坏性作用,为了探究它在脑 IPoC 中的保护机制,Liang 等人对大鼠脑中动脉阻塞大鼠进行试验,发现 IPoC 减弱缺血诱导 NF- $\kappa$ B/P65 从细胞浆到细胞核的转移,进而抑制神经核中 NF- $\kappa$ B/P65 的激活来抑制神经元凋亡,最终达到神经保护作用<sup>[7]</sup>。

### 1.3 抑制氧化应激

越来越多的研究已经证实远隔肢体 IPoC 能够通过保护性刺激来减少缺血再灌注损伤和 ROS(活性氧簇)的产生。Li 等人通过对大鼠脑中动脉闭塞大鼠进行 5 min 再灌注/5 min 缺血的反复 3 个循环研究,发现远隔肢体 IPoC 可以通过上调 Nrf2、HO1、NQO1 的表达和 SOD 的激活,下调 MDA 的表达来激活 Nrf2-ARE 通路,进而通过减轻氧化应激损伤来显著地促进神经功能恢复,减少梗死体积,减轻脑水肿,保护脑组织免受缺血再灌注损伤<sup>[8]</sup>。

### 1.4 触发自我吞噬

自我吞噬是细胞内一个至关重要的细胞内大分子或受损细胞器的降解途径<sup>[9]</sup>。研究者发现在缺血性脑损伤过程中自我吞噬可能有助于减轻缺血脑组织的氧化损伤和线粒体损伤<sup>[10]</sup>。有报道显示 Bcl-2 的磷酸化作用促发 Bcl-2/Bcl-11 复合体(与自我吞噬相关的分子机制之一)的解聚<sup>[11]</sup>。另有研究显示,通过激活缺血大鼠半球的 AKT(蛋白激酶)来对大鼠中动脉阻塞模型的脑组织起到神经保护作用<sup>[12]</sup>。已有实验证实 AKT 依赖的自我吞噬途径在 IPoC 中起到神经保护作用<sup>[13]</sup>。

Qi 等人通过对大鼠大鼠脑中动脉闭塞模型股动脉进行 10 min 闭塞/10 min 再通的 3 个循环,发现磷酸化的 Bcl-2 比例在缺血后处理组中显著上调,AKT 抑制剂通过抑制 Bcl-2 磷酸化来削弱了 IPoC 介导的自我吞噬、加重了线粒体损害,通过检测 LC3 阳性斑点,来评估不同组的自我吞噬水平,发现

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12541313);国家自然科学基金(81371324)

作者单位:150086 哈尔滨医科大学附属第二医院神经内科[陈志敏 陈丽霞 张荟雪 王健健 杨永梅 王丽华(通信作者)]

在缺血后处理组 LC3II/LC3I (LC3 是微管蛋白质轻链 3, 经过连续转换机制形成 LC3I 和磷脂酰乙醇胺共轭的 LC3II, 此两者表达在自噬小体薄膜上) 比例显著提高, 自我吞噬水平明显上升, 最终 Qi 等人发现肢体远隔 IPoC 激活自我吞噬机制, 进而减轻线粒体损伤, 通过 AKT 激活 Bcl-2 磷酸化, 降解 Bcl-2/Bcl-1 复合体达到神经保护作用, 而且早期实施 IPoC 保护作用更显著<sup>[14]</sup>。

### 1.5 泛连接蛋白 1/P2X7 嘌呤受体复合物途径

泛连接蛋白(Pannexins)是新被发现的表达在脑组织和外周组织的蛋白质, 包括泛连接蛋白 1、2、3(Panx1、2、3)三个成员, 泛连接蛋白寡聚体化后会在细胞膜表面形成较大的孔道<sup>[15]</sup>。在所有的泛连接蛋白中 Panx1 在中枢神经系统中大量表达<sup>[16]</sup>。有报道显示 P2X7 嘌呤受体、膜结构被拉伸以及细胞外高钾可以激活泛连接蛋白 1 通道<sup>[17]</sup>。有研究证实 Panx1 和 P2X7 嘌呤受体通道在功能上是互相联系的<sup>[18]</sup>。Mahi 等人通过试验发现双侧颈动脉闭塞后实施再灌注会显著增大大脑梗死体积、提高 NSS 评分、造成严重的记忆及运动功能障碍, 而且同时会增加脑组织的乙酰胆碱酯酶、硫代巴比妥酸活性物质水平, 减少谷胱甘肽水平, 而实施 IPoC 可以减小脑梗死体积, 降低 NSS 评分, 逆转缺血/再灌注引起的记忆和运动功能障碍, 同时改变脑组织相关的生化水平, 但是预先应用甲氟喹(Panx1/P2X7 嘌呤受体阻滞剂)等。以上谈及的 IPoC 的神经保护作用会极大被削减<sup>[19]</sup>。

### 1.6 下调缺血半影区的 p38 MAPK-ATF2 通路

越来越多的证据证实, IPoC 形成的缺血耐受实现对缺血器官的功能保护涉及许多潜在的机制, 包括大量信号通路和蛋白激酶<sup>[20]</sup>。作为促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族的成员, p38 MAPK 可以被环境应激优先激活, 像紫外线照射、X 射线、热休克、促炎细胞因子等这些环境应激可涉及细胞分化、细胞凋亡、自我吞噬等多种过程<sup>[21]</sup>。p38 MAPK 活化加强在应激导致的神经元死亡过程中起关键作用, 对它的抑制明显减弱脑缺血性损伤, 该神经保护作用在体内外实验中均得到证实<sup>[22]</sup>。目前研究表明, 大脑中动脉闭塞显著增加了活化的 p38 MAPK, 进而导致神经元凋亡, 然而 IPoC 或者给予 p38 MAPK 抑制剂可以减少磷酸化的 p38, 进而减弱缺血/再灌注损伤, 故选择性地阻断 p38 通路可减弱神经元损伤作用, 因此 Li HAO 等人认为肢体 IPoC 可以抑制大鼠脑缺血/再灌注损伤中的 p38 MAPK 信号<sup>[23]</sup>。

p38 MAPK 通路对下游信号分子起重要调控作用, 发挥多种细胞功能。ATF2 是其中的一个下游信号靶点, 它参与了 MAPK 在细胞凋亡中的复杂作用。ATF2 高表达于脑组织<sup>[24]</sup>, 它通过磷酸化反应被 p38 激活后<sup>[25]</sup> ATF2 反转录地调控大量基因靶点, 这些基因靶点调控其他细胞通路。Li HAO 等人实验发现表达在缺血半影区的磷酸化 ATF2 蛋白可以显著增强缺血脑组织的缺血/再灌注损伤, IPoC 或 p38 MAPK 抑制剂可以抑制此增强作用<sup>[23]</sup>。故 IPoC 的神经保护作用可能与下调缺血半影区的 p38 MAPK-ATF2 通路有关, 并且这些改变可能对神经元的凋亡起抑制作用。

### 1.7 下调 AQP4 在细胞膜表面的表达

脑水肿是与缺血再灌注损伤相关的严重而复杂的病理

过程, 水通道蛋白 4(aquaporin4, AQP4)在此过程中发挥了重要作用。AQP4 是膜蛋白大家庭中的一员, 可以促进水的跨膜转运。AQP4 在脑组织中分布十分广泛, 参与脑水肿的形成及水的平衡调节, 协助水通过 BBB(血脑屏障)。大量研究表明 AQP4 在脑水肿的发病机制中扮演了举足轻重的角色, 缺乏 AQP4 的大鼠在局灶性脑缺血早期以及全脑缺血时可以免受脑水肿损害, 它的抑制剂可以显著减少与缺血损伤有关的脑水肿体积。Han 等人证实 IPoC 通过抑制 AQP4, 抑制脑水肿, 进而实现神经功能保护<sup>[26]</sup>。另有研究证实远隔 IPoC 组的 AQP4 表达显著减少, 通过下调星形胶质细胞膜表面的 AQP4 来实现远隔 IPoC 在局灶脑缺血模型中的脑保护作用。

## 2 IPoC 是脑卒中治疗中简单的、十分有应用前景的方法

2.1 按作用时间分为早期 IPoC、延迟 IPoC, 然而两者的联合效应更显著, 通过早期和延迟后处理的联合可以减少缺血脑组织的最终梗死体积、稳定脑血流、减少神经细胞凋亡, 同时还可以减轻脑水肿, 以上效应是通过加强缺血脑组织大脑皮层中 ERK1/2 和 CREB 的磷酸化, 进而增加脑神经营养因子[BDNF, 包括 ERK1/2(细胞外信号相关蛋白激酶 1/2)和 CREB(cAMP 反应元件相关蛋白)]的表达来实现的<sup>[27]</sup>。

2.2 按作用方法分为(1)药物 IPoC: 红藻氨酸后处理、丙泊酚后处理、纳洛酮后处理、七氟烷后处理、异氟烷后处理、右旋美托咪啶后处理、盐酸戊乙奎醚后处理等;(2)物理 IPoC: 低压缺氧后处理、延迟缺氧后处理、氧糖剥夺后处理、缓激肽后处理等。

## 3 展望

许多神经保护措施的有效性只是暂时的, 带给我们一种假象, IPoC 的脑保护作用具有相对持久性, 与溶栓时间窗比较, IPoC 能够在相对较长的时间窗内进行, 实现脑保护。早期有效的溶栓治疗已成为公认有效的缺血性脑卒中的治疗手段, 但同时再灌注损伤以及 t-PA 所带来的神经损伤是溶栓治疗的明显副作用, 而 IPoC 能明显降低再灌注所带来的神经损伤, 同时减轻 t-PA 在溶栓的同时所带来的神经毒性作用, 所以如果将 IPoC 应用于缺血溶栓治疗之后可以弥补溶栓所带来的神经损伤, 改善神经功能。此外, 发生脑出血后在相对非重要器官比如下肢进行 IPoC 或能够直接给予某些药物来实现 IPoC, 能够更好地实现脑保护。总之, IPoC 有较好的临床应用前景, 然而关于 IPoC 的有效时间窗、闭塞/开放模式、确切机制等问题尚需进一步的实验研究以及临床应用。

## 参考文献

- [1] Tang SC, Arumugam TV, Xu X, et al. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(34): 13798-13803.
- [2] Wang Y, Ge P, Zhu Y. TLR2 and TLR4 in the brain injury caused by cerebral ischemia and reperfusion[J]. Mediators In-

- flamm, 2013, (5785):124614.
- [3] Qi W, Zhou F, Li S, et al. Remote ischemic postconditioning protects ischemic brain from injury in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion associated with suppression of TLR4 and NF- $\kappa$ B expression[J]. *Neuroreport*, 2016, 27(7):469-475.
  - [4] Acker T, Acker H. Cellular Oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications[J]. *J Exp Biol*, 2004, 207(Pt 18):3171-3188.
  - [5] Fan X, Heijnen CJ, Van der kooij Ma, groenendaal F, van Bel F. the role and regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in brain development and neonatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. *Brain Res Rev*, 2009, 62(1):99-108.
  - [6] Zong Y, Jiang L, Zhang M, et al. Limb remote ischemic postconditioning protects cerebral ischemia from injury associated with expression of HIF-1 $\alpha$  in rats[J]. *BMC Neurosci*, 2015, 16(1):97.
  - [7] Liang J, Luan Y, Lu B, et al. Protection of ischemic postconditioning against neuronal apoptosis induced by transient focal ischemia is associated with attenuation of NF- $\kappa$ B/p65 activation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5):e96734.
  - [8] Li P, Su L, Li X, et al. Remote limb ischemic postconditioning protects mouse brain against cerebral ischemia/reperfusion injury via upregulating expression of Nrf2, HO1, NQO1 in mice [J]. *Int J Neurosci*, 2015(1):1-8.
  - [9] Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(7):651-662.
  - [10] Sun K, Xie X, Liu Y, et al. Autophagy lessens ischemic liver injury by reducing oxidative damage[J]. *Cell Biosci*, 2013, 3(1):26.
  - [11] Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy [J]. *Autophagy*, 2008, 4(5):600-606.
  - [12] Hoda MN, Siddiqui S, Herberg S, et al. Remote ischemic perconditioning is effective alone and in combination with intravenous tissue-type plasminogen activator in murine model of embolic stroke[J]. *Stroke*, 2012, 43(10):2794-2799.
  - [13] Qi ZF, Luo YM, Liu XR, et al. AKT/GSK3 $\beta$ -Dependent autophagy contributes to the neuroprotection of limb remote ischemic postconditioning in the transient cerebral ischemic rat model[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012, 18(12):965-973.
  - [14] Qi Z, Dong W, Shi W, et al. Bcl-2 phosphorylation triggers autophagy Switch and reduces mitochondrial damage in limb remote ischemic conditioned rats after ischemic stroke[J]. *Transl Stroke Res*, 2015, 6(3):198-206.
  - [15] Wicki-Stordeur LE, Swayne LA. Large pore ion and Metabolite-Permeable Channel regulation of postnatal ventricular Zone neural stem and progenitor cells: interplay between aquaporins, connexins, and pannexins? [J]. *Stem Cells Int*, 2012(2):454180.
  - [16] Karpuk N, Burkovetskaya M, Fritz T, et al. Neuroinflammation leads to region-dependent alterations in astrocyte gap junction communication and hemichannel activity[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(2):414-425.
  - [17] Suadcani SO, Iglesias R, Wang J, et al. ATP signaling is deficient in cultured Pannexin1-null mouse astrocytes [J]. *Glia*, 2012, 60(7):1106-1116.
  - [18] Pelegrin P, Surprenant A. The P2X(7) receptor-pannexin connection to dye uptake and IL-1 $\beta$  release[J]. *Purinergic Signal*, 2009, 5(2):129-137.
  - [19] Mahi N, Kumar A, Jaggi AS, et al. Possible role of pannexin 1/P2x7 purinoceptor in neuroprotective mechanism of ischemic postconditioning in mice[J]. *J Surg Res*, 2015, 196(1):190-199.
  - [20] Zhao H, Ren C, Chen X, et al. From rapid to delayed and remote postconditioning: the evolving concept of ischemic postconditioning in brain ischemia[J]. *Curr Drug Targets*, 2012, 13(2):173-187.
  - [21] Duch A, De Nadal E, Posas F. The p38 and hog1 SAPKs control cell cycle progression in response to environmental stresses [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(18):2925-2931.
  - [22] Strassburger M, Braun H, Reymann KG. Anti-inflammatory treatment with the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB239063 is neuroprotective, decreases the number of activated microglia and facilitates neurogenesis in Oxygen glucose-deprived hippocampal slice cultures[J]. *Eur J Pharmacol* *J Neurol Sci*, 2015, 357(1/2):270-275.
  - [23] Li H, Zhou S, Wu L, et al. The role of p38MAPK signal pathway in the neuroprotective mechanism of limb postconditioning against rat cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *J Neurol Sci*, 2015, 357(1/2):270-275.
  - [24] Gozdecka M, Breitwieser W. The roles of ATF2 (activating transcription factor 2) in tumorigenesis [J]. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40(1):230-234.
  - [25] Seong KH, Maekawa T, Ishii S. Inheritance and memory of stress-induced epigenome change: roles played by the ATF-2 family of transcription factors[J]. *Genes Cells*, 2012, 17(4):249-263.
  - [26] Han D, Sun M, He PP, et al. Ischemic postconditioning alleviates brain edema after focal cerebral ischemia reperfusion in rats through Down-Regulation of aquaporin-4[J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 56(3):722-729.
  - [27] Wu H, Yang SF, Dai J, et al. Combination of early and delayed ischemic postconditioning enhances brain-derived neurotrophic factor production by upregulating the ERK-CREB pathway in rats with focal ischemia[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5):6427-6434.

(2016-07-02 收稿 2016-07-26 修回)