

缺血耐受的研究进展

方芳综述, 方云祥审阅

(中南大学药学院药理系, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 药理学; 缺血预适应; 脑缺血耐受; 缺血后适应

[摘要] 对缺血耐受现象的探索有三个明显的阶段, 第一阶段为缺血预适应, 即先给予一亚致死性的缺血, 可减轻其后发生的致死性缺血带来的损害, 缺血预适应在临床得到验证, 能给予心、脑等器官强大的保护作用, 表现为梗死范围大幅度缩小, 器官功能障碍明显减轻等。其次为药物预适应。第三阶段是缺血后适应, 近年研究发现, 缺血再灌注开始时, 给予几次短暂的灌注、停灌, 然后长时间再灌注, 能诱导组织器官对缺血再灌注损伤的耐受。缺血耐受现象来源于临床, 对缺血耐受机制进行的研究, 又服务于临床, 这是医学科研模式的一个典范。

[中图分类号] R9

[文献标识码] A

缺血耐受现象最早由 Maroko 等^[1]在 1970 年提出。这方面的探索有三个阶段^[2]: 第一个阶段是在犬心肌缺血模型中发现, 一系列短暂的缺血后, 可以保护随后长时间的心肌缺血, 并提出缺血预适应。1990 年 Kitagawa 等^[3]发现, 短暂轻微的脑缺血可以对 1 到 7 天后的再次严重的脑缺血产生部分保护作用, 此现象被称为脑缺血耐受, 而提前给予的短暂性缺血称为缺血预适应。第二个阶段是药物预适应, 即在缺血前给予胰岛素、转移生长因子, 腺苷激动剂 AMP579, 缓激肽和人参皂甙等, 这些药物依赖激动 p42/44MAP 激酶 (ERK), AKt 或释放 PGI₂, CGRP 等发挥保护缺血器官的作用^[4]。第三个阶段是缺血后适应, 即在长期缺血之后, 再灌注开始时, 经历的短暂的、重复的、缺血再灌注, 从而保护缺血器官的现象。缺血耐受现象来源于临床, 又服务于临床, 并不但深入。这是科研服务于临床实践的典范。

1 缺血耐受

1.1 缺血预适应

临床研究发现存在脑缺血耐受。Moncavo 等^[5]对 2492 例首次发生脑梗塞的患者进行研究, 发现有短暂性脑缺血发作病史的患者与脑梗塞的预后具良好的相关性, 有短暂性脑缺血发作病史的患者预后相对较好, 无短暂性脑缺血发作病史者相对严重。研究表明, 夹闭蒙古沙鼠双侧颈总动脉 2 min 可产生明显的脑缺血耐受, 低于 1.5 min 的短暂缺血不能诱导出脑缺血耐受, 但如夹闭时间超过 5 min, 不但不能引起脑缺血耐受, 反而会导致海马神经元死亡^[6]。Masada 等^[7]认为, 大脑中动脉闭塞 15 min 并不能引起相应的脑区神经元死亡, 但却可以对 3 天后的永久性脑缺血产生保护作用。由此可见, 引起脑缺血耐受需要一定范围或强度的刺激量, 其次, 须要一定的时间间隔, 预适应须在 24 h 前, 一般可产生 1

~ 7 天的耐受效应。

1.2 药物预适应

许多药物可以引起脑缺血耐受。如 COX-2 抑制剂塞来昔布、阿司匹林, 钙通道阻断剂尼莫地平。激活线粒体上的 ATP 敏感性钾通道, 可以减少线粒体内钙的聚集, 减轻线粒体的水肿, 活化线粒体渗透性转换孔。如果大脑中动脉梗塞 (MCAO) 前给予 ATP 敏感性钾通道阻断剂格列本脲, 或是选择性的 KATP 通道拮抗剂 5- 羟基羧酸盐都可以取消缺血预处理的保护作用, 说明促进线粒体 ATP 敏感性钾通道的开放是脑缺血保护作用的机制之一。

抗血小板聚集药, 包括 PGI₂, 磷酸二酯酶抑制剂, 人参皂甙等通过增加 cAMP 抑制血小板聚集, PGI₂ 还有明显的扩张血管作用, TXA₂ 的作用正好相反。阿司匹林每天 50 mg, 可增加 PGI₂ 释放, 减少 TXA₂ 生成。因而小剂量服用阿司匹林对脑血管疾病, 预防脑血管意外有益。血小板激活和聚集与凝血酶和血小板激活因子有关, 依赖于表面糖蛋白 GP IIb/IIIa 复合物, 纤维蛋白原是 GP IIb/IIIa 复合物的配合体。人参皂甙和银杏内酯通过增加释放 PGI₂ 或降钙素基因相关肽 (CGRP), 减少内皮素, 扩张脑血管, 增加脑血流量, 对脑缺血发挥保护作用等。谢立新等^[8,9]在 MCAO 脑缺血再灌注大鼠模型, 应用银杏内酯或钾通道抑制剂格列本脲, 可明显减少再灌注脑损伤, 并认为与促进 CGRP 释放和减少内皮素, 增加 CGRP 与内皮素的比值, 开放钾通道有关。

1.3 缺血后适应

2003 年, 熊利泽等^[10]在研究成年大鼠脑缺氧/复氧模型时发现, 如果在长时间的再灌注之前经过三次短暂的复氧-缺氧, 可缩小脑梗塞范围, 减少细胞凋亡, 提高细胞存活率。2005 年, Vinterr Johansen 实验室发现在犬的缺血再灌注模型中, 将犬心脏的左冠状动脉前降支结扎 1 h 后, 给予再灌 30 s, 结扎 30 s 的三个循环后恢复冠状动脉血流, 结果发现缺血区中性粒细胞浸润减少, 内皮细胞损伤减轻, 减少氧化应激和心肌梗死面积^[11]。这种在再灌注开始时进行的重复的短暂的再灌、结扎, 随后恢复血流的现象称为“缺血后适应”^[12-14]。

[收稿日期] 2006-06-21

[修回日期] 2006-12-29

[作者简介] 方芳, 博士, 主要从事心脑血管药理学研究。方云祥, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心脑血管药理学研究, 联系电话 0731-2355082, Email 为 angelaff2001@yahoo.com.cn。

2 缺血耐受机制

缺血耐受是迄今为止发现的最强大的内源性保护作用,对其机理的研究仍在进行,其保护作用与诱导机体的某些活性物质合成和细胞的一些早期基因表达增加有关。

2.1 兴奋性氨基酸和受体

脑缺血时,神经元释放大量的 EAA,对脑组织产生损伤作用。Grabb 等^[15]报道,在低氧低糖引起的耐受中,N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体发挥作用,并认为这种耐受现象只是激活了 NMDA 受体,并没有增加 NMDA 受体的含量。脑缺血时,神经元释放大量的 EAA 兴奋氨基酸转运体(ETTA)进入突触间隙,激活突触后膜上相应的受体,使膜通透性增加,钙离子大量内流,导致脑缺血损伤加重。大鼠大脑内出血后的第 1、3 和 7 天,胶质细胞 ETTA1 和 ETTA2 的含量下降,ETTA3 无变化。认为脑缺血耐受的机制可能是通过下调胶质细胞的 ETTA1 和 ETTA2,减少兴奋性氨基酸水平,保护缺血后的脑损伤。Alsbo 等^[16]的实验发现,脑缺血耐受海马 CA1 区总的谷氨酸 R2 受体(GluR2) mRNA 亚单位较对照组动物明显增加,因此认为缺氧耐受上调 GluR2 mRNA 的腺苷化作用,降低 AMPA 受体与谷氨酸的亲合力,保护脑缺血损伤。

2.2 炎症和自由基

在脑缺血及缺血-再灌注过程中,释放大量的自由基,细胞因子和黏附分子,导致炎症的发生,炎症破坏组织结构,释放更多的自由基,加重脑组织缺血性损伤。大鼠行短暂的 MCAO 后 6~8 h 同侧皮层 IL-1 β mRNA 的表达量明显增加,IL-1 β 蛋白的增加在 7 天时最高,与脑缺血耐受的时程一致。提示 IL-1 β 在脑缺血耐受中起一定的作用。Wang 等^[17]报道,大鼠在短暂的 MCAO 后 1 h,同侧皮层的 TNF- α mRNA 表达即增加,6 h 达高峰,持续 2 天。因此在大鼠 MCAO 前 2 天通过侧脑室注射不同剂量的 TNF,则可剂量依赖式的影响脑梗死范围。大量研究表明,脑缺血/再灌注炎症反应时,产生大量的氧自由基,自由基可以攻击血管内皮细胞膜,加重血管源性脑水肿,还可使大脑缺血半暗区的血管痉挛及血管内凝血,导致脑梗死范围扩大而加重脑组织损伤。神经元内氧自由基大量生成及其引起的脂质过氧化加剧造成线粒体膜脂质过氧化、损伤线粒体膜结构和线粒体 DNA,氧化磷酸化受阻,ATP 产生减少,同时钙离子在线粒体大量堆积,进一步损伤线粒体。

2.3 Ca^{2+} 和线粒体

线粒体渗透性转换孔(mPTP)在缺血的过程中是关闭的,但在再灌注开始时,自由基大量释放,钙离子内流增加,诱导 mPTP 开放,mPTP 的开放导致膜电位降低,呼吸链解偶联,细胞色素 C 以及其他坏死因子的外流,促进细胞凋亡和坏死,推测后适应减少了自由基的释放和钙离子的内流,通过抑制 mPTP 的开放而减少梗死面积^[18]。Zhao 等^[19]也认为后适应是通过减少活性氧簇产物而延迟 mPTP 通道的开放。更进一步的研究表明,再灌注时通过激活 ERKs 和 Akt 抑制 mPTP 的开放。

自由基与线粒体通透性转换和钙超载有关,全脑缺血再灌注的开始 10 min,是神经元对氧化应激高度敏感期,这一

时期以组织过氧化和线粒体过氧化作用为特征,适当限制氧供给有利于减轻自由基对线粒体的损伤。后适应可能是在再灌注开始时,经过几次短暂的再灌-停灌,减少自由基的释放和钙离子的内流,增加 SOD 活性,保护线粒体功能,保护脑缺血组织。

2.4 热休克蛋白

脑缺血可使神经元内蛋白变性,变性蛋白使 HSF 活化。活化的 HSF 转位到核内,启动 HSP70 的转录。缺血预适应诱导神经元产生 HSP70, HSP70 通过维持细胞蛋白质自稳和提高细胞对应激反应的耐受性,具有神经保护作用^[20]。大鼠大脑中动脉短暂阻塞 10 min,开放 45 min,3 个循环的预适应后阻断大脑中动脉,发现 HSP70 在 2~5 天内持续升高,脑梗死体积明显减少。Currie 等^[21]报道,缺血 6 h, HSP70 mRNA 开始增高, HSP27 mRNA 则在预适应后 24 h 后开始升高。在沙鼠和大鼠脑缺血预适应诱导缺血耐受的实验中发现,在海马 CA1 区的锥体细胞中 HSP70 表达增高。免疫组化检测预适应后 1~5 天 HSP70 蛋白在缺血皮质广泛表达,而 HSP27 蛋白主要见于胶质细胞,且持续时间较长,约 1~7 天。应用病毒载体使大鼠 HSP70 过度表达可改善脑缺血后神经元存活率。

2.5 腺苷

短暂性脑缺血可引起腺苷大量释放,腺苷作为一种神经递质,与 G 蛋白偶联 A1 受体,促进 ATP 敏感性钾通道开放,细胞膜超极化,减少钙离子内流和兴奋性氨基酸的释放,保护脑缺血性损伤。用外源性腺苷 AMP579(腺苷 A1 和 A2 受体激动剂)可以模拟缺血预适应效应,腺苷拮抗剂则可以阻断预适应的效应^[22]。

2.6 凋亡与凋亡相关基因

bcl-2、Bax、Fas、c-fos 和 p53 等凋亡相关基因在脑缺血耐受的形中受到广泛的关注^[23,24]。大鼠脑缺血 2 min 可使海马 bcl-2 的表达明显升高,同时增强神经元对再次缺血的耐受性,通过反义寡脱氧核糖核酸抑制 bcl-2 的表达可加重大鼠脑缺血后神经元的死亡。脑内 bcl-2 基因过度表达的转基因小鼠,其局灶性缺血后梗塞体积明显缩小。利用缺陷型单纯疱疹病毒做载体,使 bcl-2 基因在缺血神经细胞中表达增多,可减少神经元凋亡。我们的实验结果亦发现^[25]大鼠 MCAO 后再灌注时在缺血侧大脑皮层和基底节区均有 bcl-2 阳性表达。bcl-2 过表达可防止或减少脑缺血再灌注时神经细胞凋亡的发生。其作用机制可能有,bcl-2 具有抗氧化剂作用,从而抑制细胞凋亡。bcl-2 是一种跨膜蛋白,bcl-2 蛋白可抑制 p53 诱导的细胞凋亡。bcl-2 与 Bax 结合成异二聚体,抑制 Bax 的促凋亡作用。

p53 在细胞凋亡反应中起重要作用^[26],野生型 p53 基因具有诱导细胞凋亡的功能,突变型 p53 基因可抑制凋亡。脑缺血时 DNA 损伤,DNA 损伤可激活两种调节 p53 的激酶,共济失调毛细血管扩张空变激酶(ATM)和 DNA 依赖性蛋白激酶(DNA-PK)。p53 活化后转移至胞核,起转录因子作用,诱导凋亡基因 Bax 表达。

缺血 10 min 可以使海马 CA1 区 p53 基因表达增高,但经

过缺血耐受的动物,再灌注时脑内 p53 基因表达明显下降,说明预适应与降低凋亡 p53 基因有关。

缺血耐受的分子机制很复杂^[27], Fas(APO-1) 和肿瘤坏死因子受体(TNF- α) 与相应的配体 Fas 和肿瘤坏死因子结合形成死亡受体复合物(DISC)。DISC 形成后引起脑浆内前半胱氨酸天冬酶 8(Procaspase-8) 分子激活,引起线粒体膜通透性改变,跨膜电位降低,激活 Caspase-9,引发下游的 Caspase 级联反应,造成细胞凋亡。促凋亡基因 Bax 被认为是线粒体损伤的重要诱导分子。当死亡信号刺激后,激活的 Bax 移动到线粒体的外膜上,改变线粒体膜的通透性,Bax 还能直接结合到线粒体膜通透性转运孔(MPTP),增强线粒体膜的通透性,促进凋亡因子(AIF)释放,从而启动凋亡信号途径,cytochrome C 从线粒体释放到细胞浆后与凋亡蛋白酶激活因子 Apaf-1 结合,激活 Caspase-9, Caspase-9 切割后激活 Caspase-3。后者被认为是凋亡的最终执行蛋白从而导致细胞发生凋亡。此外,脑缺血预适应可增加核因子 κ B,及其上游的丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 的磷酸化水平。核因子 κ B 与其下游的 TNF- α 结合,通过 Caspase-8,影响细胞凋亡^[28,29]。

缺血耐受现象存在早期和晚期两个阶段,腺苷受体和 ATP 敏感性钾通道可能在早期耐受效应中发挥作用;晚期耐受现象(预适应 1 天后)则需要新的蛋白质合成。这种蛋白质合成可能是由外界刺激激活 NMDA 受体,介导钙离子内流,依次激活 MAPKs 信号转导途径引起的。

3 脑缺血耐受的临床意义

缺血耐受现象来源于临床,实际上是外界刺激激活了机体内源性的保护机制,对下一次的严重损伤提供了抵抗能力。对缺血耐受进行的研究,有助于阐明机体的内源性保护机制,延长缺血性脑血管疾病的治疗时间,又服务于临床,通过预适应、药物或后适应提高脑组织对缺血缺氧的耐受性,如血栓栓塞在大脑梗塞的保护,减少急性脑卒中的发生率、死亡率与致残率,并有利于新的脑保护药物的发现。

[参考文献]

- [1] Maroko PR, Kjekshus JK, Sobel BE, Watanabe T, Covell JW, Ross JJ, et al. Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusions [J]. *Circulation*, 1971, **43**: 67-82.
- [2] James MD, Michael VC. We think we see a pattern emerging here [J]. *Circulation*, 2005, **111**: 120-121.
- [3] Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M. "Ischemic tolerance" phenomenon found in the brain [J]. *Brain Res*, 1990, **528** (1): 21-24.
- [4] 王建设,袁 灿,王慷慨,王尧玲,刘梅冬,刘 可,等. 大鼠心肌缺血预适应相关基因 5 的克隆与特性分析[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (3): 185-188.
- [5] Moncayo J, de Freitas GR, Bogousslavsky J, Altieri M, Van Melle G. Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? [J]. *Neurology*, 2000, **54** (11): 2 089-094.
- [6] Dowden J, Corbett D. Ischemic preconditioning in 18- to 20-month-old gerbils: long-term survival with functional outcome measures [J]. *Stroke*, 1999, **30** (6): 1 240-246.
- [7] Masada T, Hua Y, Ennis SR. Attenuation of ischemic brain edema and cerebrovascular injury after ischemic preconditioning in the rat [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, **21** (1): 22-33.

- [8] 谢立新,方 芳,刘志晖,肖应华,朱艳萍,方云祥. 银杏内酯A上调 CGRP 对大鼠脑缺血再灌注损伤产生保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2004, **20** (9): 993-997.
- [9] 刘 勇,谢立新,宋 涛,方 芳,董 敏,方云祥. L-NAME 和格列苯脲对辛伐他汀脑缺血再灌注损伤保护作用的影响[J]. *中国药理学通报*, 2004, **20** (9): 1 007-011.
- [10] 王 强,熊利泽,陈绍洋,王 颖,金卫林,路志红. 川芎素对脑缺血再灌注损伤细胞外信号调节激酶活化的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2003, **23** (12): 918-921.
- [11] Vinten J, Derek MY, Lionel HO. Postconditioning: A simple, clinically applicable procedure to improve revascularization in acute myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2005, **112** (14): 2 085-088.
- [12] Fantinelli JC, Mosca SM. Comparative effects of ischemic pre and postconditioning on ischemic reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats (SHR) [J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, **296** (1-2): 45-51.
- [13] Iliodromitis EK, Kremastinos DT. From preconditioning to postconditioning: novel interventions in the armory of salvage of the ischemic heart [J]. *Hellenic J Cardiol*, 2006, **47** (6): 321-323.
- [14] Yang XC, Liu Y, Wang LF, Cui L, Ge YG, Wang HS. Permanent reduction in myocardial infarct size by postconditioning in patients after primary coronary angioplasty [J]. *Circulation*, 2006, **114** (18): 812.
- [15] Grabb MC, Choi DW. Ischemic tolerance in murine cortical cell culture: critical role for NMDA receptors [J]. *J Neurosci*, 1999, **19** (5): 1 657-662.
- [16] Alsbo CW, Wrang ML, Nielsen M, Diemer NH. Ischemic tolerance affects the adenylation state of GluR2 mRNA [J]. *Neuroreport*, 2000, **11** (14): 3 279-282.
- [17] Wang X, Li X, Erhardt JA. Detection of tumor necrosis factor- α mRNA induction in ischemic brain tolerance by means of real-time polymerase chain reaction [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, **20** (1): 15-20.
- [18] Argaud L, Gateau RO, Raissy O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition [J]. *Circulation*, 2005, **111** (2): 194-197.
- [19] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning [J]. *Am J Physiol*, 2003, **285**: H579-588.
- [20] Yenari MA, Liu JL, Zheng Z, Vexler ZS, Lee JE, Giffard RG. Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat-shock protein protection [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2005, **1 053**: 74-83.
- [21] Currie RW, Ellison JA, White RF. Benign focal ischemic preconditioning induces neuronal HSP70 and prolonged astrogliosis with expression of HSP27 [J]. *Brain Res*, 2000, **863** (1-2): 169-181.
- [22] Smits GJ, McVey M, Cox BF. Cardioprotective effects of the novel adenosine A1/A2 receptor agonist AMP 579 in a porcine model of myocardial infarction [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, **286**: 611-618.
- [23] Wu Ch, Fujihara H, Yao J, Qi SH, Li HP, Shimoji K, et al. Different Expression Patterns of Bcl-2, Bcl-x1, and Bax Proteins After Sublethal Forebrain Ischemia in C57Black/6J Mouse Striatum [J]. *Stroke*, 2003, **34** (7): 1 803-808.
- [24] Soane L, Fiskum G. Inhibition of mitochondrial neural cell death pathways by protein transduction of bcl-2 family proteins [J]. *J Bioenerg Biomemb*, 2005, **37** (3): 179-190.
- [25] 方芳,王婉灵,余术宜,张辉,谢立新,方云祥. 后适应对大鼠脑缺血神经细胞凋亡和内皮型一氧化氮合酶与诱导型一氧化氮合酶的影响[J]. *中国临床药理学和治疗学*, 2006, **11** (10): 1 106-109.
- [26] Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernandez JA, Castellino F, Rosen ED, et al. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective [J]. *Nat Med*, 2003, **9**: 338-342.
- [27] Group I. Cerebral ischemia/molecular biology [J]. *J Neurosurg Anes*, 2003, **15** (4): 362-364.
- [28] Nummi A, Lindsberg PJ, Koistinaho M. Nuclear factor- κ B contributes to infarction after permanent focal ischemia [J]. *Stroke*, 2004, **35** (4): 987-991.
- [29] Ferrer I. Apoptosis: future targets for neuroprotective strategies [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2006, **21** (SI 2): 9-20.

(此文编辑 胡必利)