

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001636

亚甲蓝预处理对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响

孙鸿然, 苟 杨, 刘丹彦

(重庆医科大学附属第一医院麻醉科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究亚甲蓝(methylene blue, MB)预处理对大鼠局灶性脑缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤的影响及其可能机制。**方法:**64 只健康成年雄性 SD 大鼠随机分为 4 组($n=16$):假手术(S)组、亚甲蓝对照(S+M)组、局灶性脑缺血再灌注(I/R)组、亚甲蓝预处理(I/R+M)组,采用大脑中动脉线栓法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。S 组于假手术后腹腔注射生理盐水 0.5 mL/kg, S+M 组于假手术后腹腔注射亚甲蓝 5 mg/kg, I/R 组于再灌注前 5 min 腹腔注射生理盐水 0.5 mL/kg, I/R+M 组于再灌注前 5 min 腹腔注射亚甲蓝 5 mg/kg。各组于再灌注前 5 min 和再灌注 24 h 时采用 Longa 评分法行大鼠神经功能缺失评分;再灌注 24 h 时 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC)染色后计算脑梗死体积及其百分比;HE 染色观察缺血侧脑皮质病理学变化;化学发光法测定缺血侧脑组织活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量;Western blot、免疫组织化学法检测缺血侧脑组织核因子 E2 相关因子(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)和血红素氧合酶-1(heme oxygenase 1, HO-1)蛋白表达水平。**结果:**与 S 组和 S+M 组相比, I/R 组和 I/R+M 组的神经功能缺失评分、脑梗死体积及其百分比、脑组织 ROS 含量均升高, Nrf2 和 HO-1 蛋白表达上调($P<0.01$), 缺血侧脑皮质有明显病理学损伤。与 I/R 组相比较, I/R+M 组的神经功能缺失评分、脑梗死体积及其百分比、脑组织 ROS 含量均降低, Nrf2 和 HO-1 蛋白表达上调($P<0.01$), 缺血侧脑皮质病理学损伤较轻;S 组和 S+M 组之间上述指标差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**亚甲蓝预处理可以改善大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤,其机制可能与上调 Nrf2 和 HO-1 的表达、降低脑 ROS 的含量、产生抗氧化应激作用有关。

【关键词】亚甲蓝;缺血再灌注;氧化应激;核因子 E2 相关因子;血红素氧合酶-1

【中图分类号】R743.33

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-09-21

Effects of methylene blue pretreatment on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

Sun Hongran, Gou Yang, Liu Danyan

(Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To research the effect of methylene blue (MB) pretreatment on focal cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury in rats and its possibly mechanism. **Methods:** Sixty-four adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups ($n=16$): sham group (group S), methylene blue control group (group S+M), focal cerebral ischemia-reperfusion group (group I/R), methylene blue pretreatment group (group I/R+M). The rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion was established by middle cerebral artery occlusion. The neurological deficit scores were performed with Longa's scale at 5 min before reperfusion and at 24 h after reperfusion. The pathological changes in pallium of ischemic area were observed by HE staining. Reactive oxygen species (ROS) in ischemic brain tissue were measured by chemiluminescent. The expressions of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase 1 (HO-1) in ischemic brain tissue were detected by Western blot and immunohistochemistry staining. **Results:** The neurological deficit scores, the cerebral infarct volume and the infarct volume fraction, the content of ROS, the expression of Nrf2 and HO-1 were all obviously higher in group I/R and I/R+M than in group S and S+M respectively ($P<0.01$). The neurological deficit scores, the cerebral infarct volume and the infarct volume fraction, the content of ROS were all obviously lower in group I/R+M than in group I/R ($P<0.01$). The expressions of Nrf2 and HO-1 were obviously increased in group I/R+M than in group I/R ($P<0.01$). The pathological changes in pallium of ischemic area were significantly ameliorated in group I/R+M than in group I/R. The difference between group S and group S+M was not statistical significant ($P>0.05$). **Conclusion:** The pretreatment of methylene blue can im-

prove the focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, which might be related to upregulated the expression of Nrf2 and HO-1, reduce the content of ROS in brain, produce antioxidant stress.

【Key words】 methylene blue; ischemia-reperfusion; oxidative stress; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; heme oxygenase 1

作者介绍:孙鸿然, Email: sunhongran0108@qq.com,

研究方向: 围术期脑保护。

通信作者:刘丹彦, Email: liudanyan418@qq.com。

基金项目: 国家临床重点专科资助项目 (编号: 财社[2011]170 号); 重庆市医学重点学科资助项目 (编号: 渝卫科教[2007]2 号)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180411.1007.004.html>

(2018-04-11)

脑卒中是导致人类死亡的主要疾病之一,其中缺血性脑卒中发病率达 80%,发病时除了原发性缺血性脑损伤,在恢复血供后出现大脑功能进一步损伤加重称为脑缺血再灌注损伤,过量活性氧(reactive oxygen species,ROS)引起的氧化应激反应在脑缺血再灌注损伤中起着关键作用^[1]。核因子 E2 相关因子(nuclear factor erythroid 2-related factor 2,Nrf2)及其所调控的抗氧化反应元件(antioxidant responsive element,ARE)是机体内极重要的抗氧化防御体系,氧化应激反应可以激活 Nrf2 并促进其下游 ARE 靶基因血红素氧合酶-1(heme oxygenase 1,HO-1)的表达,减轻氧化应激损伤,Nrf2/ARE 已成为最重要的抗氧化应激通路之一^[2]。亚甲蓝是一种易透过血脑屏障的吩噻嗪类化合物,分子式为 $C_{16}H_{18}N_3SCl$,分子量为 373.1,已有研究发现亚甲蓝在急性脑缺血损伤和全脑缺血再灌注损伤中均具有保护作用^[3-4],亚甲蓝减轻脑缺血性损伤及脑缺血再灌注损伤的机制是否与 Nrf2/ARE 通路有关尚未见报道。本实验拟在大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型中使用亚甲蓝预处理,观察亚甲蓝是否能减轻局灶性脑缺血再灌注损伤,研究其作用机制是否与上调 Nrf2 和 HO-1 的表达产生抗氧化应激作用有关。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂

SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠 64 只,体质量 250~300 g,购于重庆医科大学动物实验中心。亚甲蓝(江苏济川生物有限公司,批号 1602042);TTC(Sigma 公司);兔抗 Nrf2 多克隆抗体(ABclonal 公司);兔抗 HO-1 多克隆抗体(ABclonal 公司);鲁米诺(Sigma 公司);RIPA 裂解液、BCA 蛋白分析试剂盒(碧云天生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组、给药及脑缺血再灌注模型的制备 SD 大鼠 64 只采用随机数字表法分成 4 组($n=16$),分别是假手术(S)组、亚甲蓝对照(S+M)组、局灶性脑缺血再灌注(I/R)组、亚甲蓝预处理(I/R+M)组,S 组和 I/R 组分别于再灌注前 5 min 腹腔注射生理盐水 0.5 mL/kg,S+M 组和 I/R+M 组分别于再灌注前 5 min 腹腔注射亚甲蓝 5 mg/kg。采用大脑中动脉线栓法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型^[5]:3.5%水合氯醛溶液 1 mL/100 g 麻醉大鼠,仰卧位固定行颈正中切口,暴露右侧颈总动脉(common carotid artery,CCA),游离分出颈内动脉(internal carotid artery,ICA)及颈外动脉(external carotid artery,ECA)。ECA 距颈总动脉分叉部 10 mm 处结扎并离断,动脉夹夹闭 CCA 和 ICA,于 ECA 距离 CCA 分叉部 5 mm 处剪开

一小切口。用直径 0.24 mm 线栓经小切口插入延 CCA 分叉处入 ICA,于小切口和 CCA 分叉处之间结扎 ECA,松开 ICA 处动脉夹,线栓继续缓慢插入至右侧大脑中动脉,线栓头端距离 CCA 分叉处 18~20 mm 有阻力感时停止,松开 CCA 动脉夹。待大鼠苏醒后行 Longa 神经功能缺失评分,Longa 评分 ≥ 2 分为栓塞成功。栓塞 2 h 后将线栓退至 ECA 残端处实现再灌注。S 组和 S+M 组不插入线栓,其他操作同 I/R 组。

1.2.2 神经功能缺失体征评分 再灌注前 5 min (亚甲蓝腹腔注射前)和再灌注 24 h 时采用 Longa 神经功能缺失评分法对各组大鼠进行评分:0 分:无神经损伤症状;1 分:不能完全伸展对侧前爪;2 分:行走时向对侧转圈;3 分:行走时向对侧倾倒;4 分:不能自行行走,意识丧失。

1.2.3 TTC 染色后测定脑梗死体积及其百分比 评分后各组随机抽取 6 只大鼠,断头处死取出完整脑组织,置入 -20°C 冰箱中冷冻 30 min,沿冠状面自前向后于脑前极与视交叉连线中点处、视交叉处、漏斗柄部、漏斗柄与后叶尾极之间将脑组织均匀切为 5 等份。将脑片浸入 2%TTC 溶液中, 37°C 下恒温避光孵育 30 min,染色后取出脑片于 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h 后摄像,图像中红色区域为正常脑组织,苍白色区域为梗死区。应用 Image-pro plus 6.0 图像分析软件(Media Cybernetics,美国)计算脑梗死体积和梗死体积百分比。

1.2.4 脑组织灌注取材及 HE 染色 评分后各组随机抽取 4 只大鼠,麻醉后经左心室插入灌注针头,剪开右心耳,生理盐水灌注冲洗,待流出液清亮用 4%多聚甲醛灌注固定,当大鼠颈部僵硬,断头取出脑组织在 4%多聚甲醛中固定过夜,再进行石蜡包埋、冠状切片。HE 染色后,光学显微镜(Olympus 公司,日本)下观察缺血侧脑皮质病理学改变。

1.2.5 化学发光法检测脑组织 ROS 含量 评分后各组随机抽取 6 只大鼠,麻醉后取缺血侧脑组织均匀分成 2 份。在避光环境中取其中 1 份脑组织,400 μL 的 PBS 溶液和 10 μL 的鲁米诺溶液(5 mmol/L)置入 1.5 mL 离心管中,放入 Glo-max-Multi JR 单管多功能发光检测仪(Promega 公司,美国)中检测,连续测定时长 5 min,每分钟测定 1 次相对光单位值(RLU),测定值减去背景值后取 RLU 平均值。检测完成后取出离心管中脑组织放入 80°C 烤箱 24 h 后称取脑组织干重,以 RLU 平均值与脑组织干重比值反映 ROS 含量^[6-7]。

1.2.6 Western blot 检测 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达 取 1 份缺血侧脑组织制备脑组织匀浆,提取总蛋白,并检测蛋白浓度。各组取总蛋白 50 mg 置于已配好的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上,封闭 2 h,分别加入兔抗 Nrf2 多克隆抗体(1:500)、兔抗 HO-1 多克隆抗体(1:500)、鼠抗 β -actin 多克隆抗体(1:1 000)后于 4°C 孵育过夜,次日加入羊抗兔 IgG 荧光抗体(1:3 000), 37°C 孵育 1 h,显影后条带用 Quantity One 图像分析软件(Bio-Rad 公司,美国)测定灰度值,以目标蛋白和 β -actin 的灰度值比值作为数据收集。

1.2.7 免疫组织化学检测 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达 取已备好的脑组织切片,抗原热修复后滴加一抗溶液:兔抗 Nrf2 多克隆抗体(1:50)、兔抗 HO-1 多克隆抗体(1:50), 4°C 过夜后

滴加二抗,37℃孵育 1 h,显色、复染、脱水后封片,光学显微镜观察,在高倍镜(400×)下随机取缺血侧脑皮质 5 个视野采用 Image-pro plus 6.0 图像软件分析阳性细胞光密度均值(optical density, OD)。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件分析数据,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)的方式显示计量资料,组间比较采用单因素方差分析。神经功能缺失评分采用重复测量方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 神经功能缺失评分

重复测量方差分析结果显示,不同时间点的神经功能缺失评分差异具有统计学意义($F=94.697, P=0.000$),不同分组之间的神经功能缺失评分差异具有统计学意义($F=449.298, P=0.000$),时间和分组对神经功能缺失评分存在交互影响($F=68.030, P=0.000$)。与 S 组和 S+M 组分别相比较,在 2 个测量时间点 I/R 组和 I/R+M 组大鼠神经功能缺失评分明显升高($P=0.000$);与 I/R 组相比,再灌注 24 h 时 I/R+M 组大鼠在经亚甲蓝预处理后神经功能缺失评分明显降低($P=0.000$)。S 组和 S+M 组在 2 个测量时间点神经功能缺失评分差异无统计学意义($P=1.000$),I/R 组和 I/R+M 组的神经功能缺失评分于再灌注前 5 min 时差异无统计学意义($P=0.623$)。见表 1。

表 1 各组大鼠神经功能缺失评分的比较 ($n=16, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of neurologic deficit scores among various groups ($n=16, \bar{x} \pm s$)

组别	再灌注前 5 min	再灌注 24 h
S 组	0	0
S+M 组	0	0
I/R 组	2.37 ± 0.50^{ab}	3.75 ± 0.45^{ab}
I/R+M 组	2.44 ± 0.51^{ab}	2.62 ± 0.50^{abc}

注:a,与 S 组比较, $P=0.000$;b:与 S+M 组比较, $P=0.000$;c:与 I/R 组比较, $P=0.000$

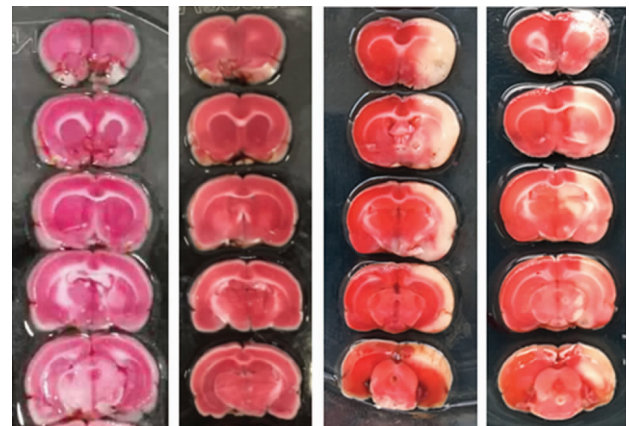
2.2 TTC 染色后脑梗死体积及其百分比

S 组和 S+M 组脑组织切片 TTC 染色后均呈红色而未见梗死灶,I/R 组和 I/R+M 组脑组织切片可见明显白色梗死灶。方差分析结果显示 4 组大鼠脑梗死体积($F=1564.697, P=0.000$)和梗死体积百分比($F=2543.807, P=0.000$)差异有统计学意义。与 S 组和 S+M 组分别相比,I/R 组和 I/R+M 组脑梗死体积明显增大、梗死体积百分比明显上升($P=0.000$);与 I/R 组相比,I/R+M 组脑梗死体积减小($P=0.000$)、梗死体积百分比下降($P=0.000$);S 组和 S+M 组差异无统计学意义($P=1.000$)(图 1,表 2)。

2.3 缺血侧脑皮质病理改变

S 组和 S+M 组脑皮质神经元胞体排列紧密,形态正常,胞核蓝染,胞质红染,核仁清晰可见。I/R 组缺血侧脑皮质结构疏松,间质水肿,神经元发生明显坏死,胞核固缩,胞质嗜

酸性增强。与 I/R 组相比,I/R+M 组脑皮质正常神经元较多,病理学损伤较轻(图 2)。



A. S 组 B. S+M 组 C. I/R 组 D. I/R+M 组

图 1 各组大鼠脑组织 TTC 染色结果

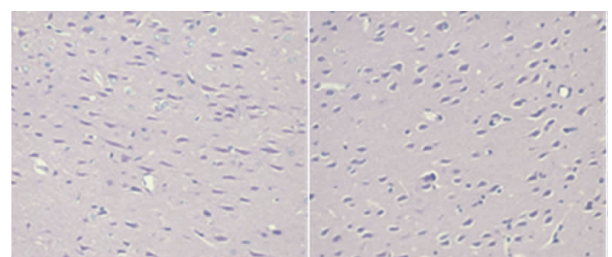
Fig.1 Results of TTC staining method of rat brain tissue among various groups

表 2 各组大鼠脑梗死体积及其百分比的比较 ($n=16, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of infarct volume and infarct volume fraction among various groups ($n=16, \bar{x} \pm s$)

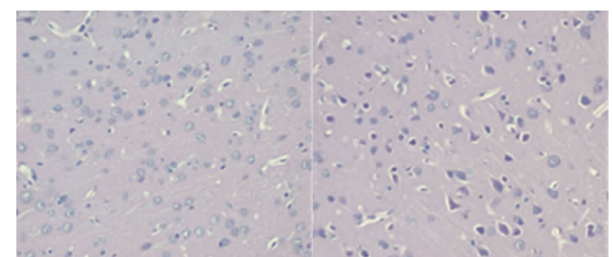
组别	脑梗死体积 (mm^3)	梗死体积百分比 (%)
S 组	0	0
S+M 组	0	0
I/R 组	185.2 ± 8.1^{ab}	19.9 ± 0.7^{ab}
I/R+M 组	100.5 ± 7.5^{abc}	10.8 ± 0.6^{abc}
F 值	1 564.697	2 543.807
P 值	0.000	0.000

注:a,与 S 组比较, $P=0.000$;b:与 S+M 组比较, $P=0.000$;c:与 I/R 组比较, $P=0.000$



A. S 组

B. S+M 组



C. I/R 组

D. I/R+M 组

图 2 各组大鼠缺血侧脑皮质 HE 染色结果 (400×)

Fig.2 Pathological changes in cerebral cortex of ischemic among various groups (400×)

2.4 缺血侧脑组织 ROS 含量

方差分析结果显示 4 组大鼠缺血侧脑组织 ROS 含量差异有统计学意义 ($F=493.612, P=0.000$)。与 S 组和 S+M 组分别相比, I/R 组和 I/R+M 组脑组织 ROS 含量明显升高 ($P=0.000$); 与 I/R 组相比, I/R+M 组脑组织 ROS 含量明显降低 ($P=0.000$)。S 组和 S+M 组脑组织 ROS 含量差异无统计学意义 ($P=0.988$) (表 3)。

表 3 各组大鼠 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平及 ROS 含量的比较
($n=16, \bar{x} \pm s$)

Tab.3 Comparison of protein expression of Nrf2, HO-1 and content of ROS among various groups ($n=16, \bar{x} \pm s$)

组别	Nrf2	HO-1	ROS(RLU/mg)
S组	0.35 ± 0.02	0.24 ± 0.02	1.65 ± 0.07
S+M组	0.35 ± 0.02	0.23 ± 0.01	1.66 ± 0.11
I/R组	0.47 ± 0.02^{ab}	0.47 ± 0.02^{ab}	5.18 ± 0.29^{ab}
I/R+M组	0.67 ± 0.02^{abc}	0.81 ± 0.01^{abc}	3.59 ± 0.20^{abc}
F 值	381.435	1 601.942	493.612
P 值	0.000	0.000	0.000

注: a, 与 S 组比较, $P=0.000$; b, 与 S+M 组比较, $P=0.000$; c, 与 I/R 组比较, $P=0.000$

2.5 Western blot 检测

方差分析结果显示 4 组大鼠缺血侧脑组织 Nrf2 ($F=381.435, P=0.000$) 和 HO-1 ($F=1601.942, P=0.000$) 蛋白表达差异具有统计学意义, 与 S 组和 S+M 组分别相比, I/R 组和 I/R+M 组 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达上调 ($P=0.000$); 与 I/R 组相比, I/R+M 组 Nrf2 ($P=0.000$) 和 HO-1 ($P=0.000$) 蛋白表达增高 ($P=0.000$); S 组与 S+M 组之间 Nrf2 ($P=0.543$) 和 HO-1 ($P=0.735$) 蛋白表达差异无统计学意义 (图 3, 表 3)。

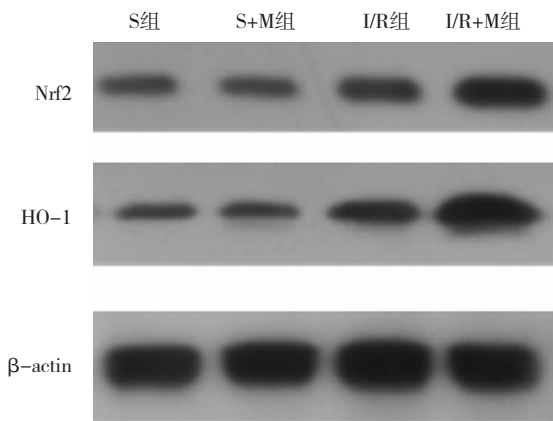


图 3 各组大鼠缺血侧脑组织 Nrf2 及 HO-1 蛋白表达水平

Fig.3 Protein expression of Nrf2 and HO-1 among various groups

2.6 免疫组织化学结果

相对于 S 组和 S+M 组, I/R 组和 I/R+M 组再灌注 24 h 大鼠缺血侧组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达较多, Nrf2 的棕黄色颗粒样染色在胞核表达明显增多。方差分析结果显示 4 组

大鼠缺血侧脑组织 Nrf2 ($F=684.137, P=0.000$) 和 HO-1 ($F=348.770, P=0.000$) 蛋白表达水平差异具有统计学意义。与 S 组和 S+M 组分别相比, I/R 组和 I/R+M 组 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平增高 ($P=0.000$); 与 I/R 组相比, I/R+M 组 Nrf2 ($P=0.000$) 和 HO-1 ($P=0.000$) 蛋白表达增高; S 组与 S+M 组 Nrf2 ($P=0.195$) 和 HO-1 ($P=0.234$) 表达差异无统计学意义 (图 4, 图 5, 表 4)。

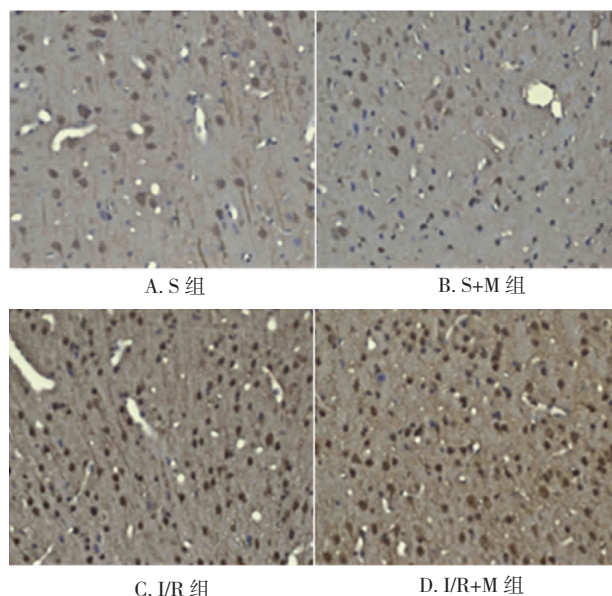


图 4 免疫组化显示各组大鼠脑皮质 Nrf2 蛋白的表达 (400 ×)
Fig.4 Immunohistochemical staining showing the protein expression of Nrf2 in cerebral cortex among various groups (400 ×)

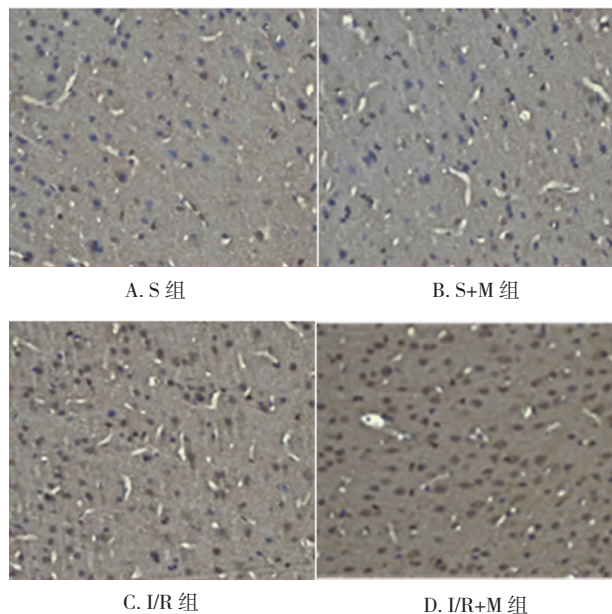


图 5 免疫组化显示各组缺血侧脑皮质 HO-1 蛋白的表达 (400 ×)

Fig.5 Immunohistochemical staining showing the protein expression of HO-1 in cerebral cortex among various groups (400 ×)

表 4 各组大鼠脑组织 Nrf2 和 HO-1 光密度均值的比较($n=4, \bar{x} \pm s$)Tab.4 Comparison of OD value of Nrf2 and HO-1 among various groups($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	Nrf2	HO-1
S组	0.32 ± 0.01	0.34 ± 0.01
S+M组	0.33 ± 0.01	0.35 ± 0.01
I/R组	0.47 ± 0.01 ^{ab}	0.48 ± 0.01 ^{ab}
I/R+M组	0.60 ± 0.01 ^{abc}	0.55 ± 0.01 ^{abc}
F 值	684.137	348.770
P 值	0.000	0.000

注:a,与 S 组比较, $P=0.000$;b:与 S+M 组比较, $P=0.000$;c:与 I/R 组比较, $P=0.000$

3 讨 论

ROS是一类机体新陈代谢的自然产物,包括氧离子、自由基以及过氧化物,在细胞信号转导、有丝分裂等生理过程中起着重要作用^[8]。在脑缺血再灌注损伤的病理生理过程中,过量 ROS 导致的氧化应激打破了机体氧化还原的平衡状态,引起脂质、蛋白质以及核酸的过氧化,破坏细胞膜结构,最终导致神经元的凋亡及坏死^[1]。Nrf2 属于一种亮氨酸拉链转录因子是内源性抗氧化应激的关键因子,生理状态下 Nrf2 与 Kelch 样 ECH 相关蛋白-1(Kelch-like ECH associated protein 1,Keap1)相结合不进入细胞核发挥转录活性,当机体受到 ROS 攻击或蛋白激酶磷酸化作用时,Nrf2 与 Keap1 解离并核转位,促进 ARE 基因调控的 II 相解毒酶 HO-1 等的表达增强细胞对氧化应激的抗性^[9]。HO-1 是参与血红素代谢的限速酶,同时作为机体内的 ROS 清除剂,可阻滞游离血红素参加氧化反应,催化血红素生成胆红素和 CO 共同发挥抗氧化应激、抗细胞凋亡和改善微循环等作用^[10]。在动物模型实验和体外细胞实验中均已证明,激活 Nrf2/ARE 通路,上调 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达可以抗氧化应激减轻脑缺血再灌注损伤^[11-12]。

亚甲蓝临床使用已超过 100 年,目前主要用于治疗高铁血红蛋白血症、氰化物中毒,近年来亚甲蓝在脑卒中、外伤性颅脑损伤、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)等疾病中均表现出脑保护作用^[13]。Stack 等研究^[14]发现在 AD 模型小鼠脑组织中,亚甲蓝可以通过激活 Nrf2/ARE 通路上调 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达减轻氧化应激反应,缓解神经退行性病变。在大鼠局灶性脑缺血再灌注模型中,亚甲蓝是否具有与上调 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达有关的保护作用尚未明确。

本实验采用右侧大脑中动脉栓塞 2 h 后恢复血供建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,参考文献^[3]研究结果以亚甲蓝 5 mg/kg 腹腔注射为预处理方式。再灌注 24 h 时 I/R 组大鼠神经功能缺失明显,HE 染色显示缺血侧脑皮质出现病理损伤,TTC 染色显示缺血侧脑组织有明显梗死,提示模型建立成功;S+M 组检测各项指标与 S 组无明显差异提示在未发生脑缺血再灌注时,实验采用的亚甲蓝剂量本身不引起氧化应激反应及造成脑组织损伤。

实验结果显示,在大鼠局灶性脑缺血再灌注 24 h 后,缺血侧脑组织 ROS 含量明显增高,Nrf2 和 HO-1 表达水平增高,Nrf2 出现了明显的核表达,表明为适应再灌注后过量 ROS 导致的氧化应激状态脑组织 Nrf2 表达上调,促进下游抗氧化酶 HO-1 蛋白表达对抗氧化应激导致的脑组织损伤,这是机体内源性抗氧化应激的保护反应。相对 I/R 组,I/R+M 组大鼠再灌注前 5 min 亚甲蓝经腹腔注射,再灌注后 24 h 时神经功能缺失评分明显降低,脑组织梗死体积下降,缺血侧脑皮质病理损伤较轻,提示亚甲蓝预处理可减轻大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤;Western blot 和免疫组织化学结果显示,亚甲蓝预处理可以进一步上调缺血侧脑组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达,同时缺血侧脑组织 ROS 含量下降,提示亚甲蓝在大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤中同样可以通过上调 Nrf2 和 HO-1 的表达产生抗氧化应激作用。

综上所述,亚甲蓝预处理能够减轻大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤,其机制可能与上调 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达、减少脑组织 ROS 的含量、减轻氧化应激损伤有关。

参 考 文 献

- [1] Allen CL,Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke[J]. Int J Stroke,2009,4(6):461-470.
- [2] Niture SK,Khatri R,Jaiswal AK. Regulation of Nrf2—an update[J]. Free Radic Biol Med,2014,66:36-44.
- [3] Di Y,He YL,Zhao T,et al. Methylene blue reduces acute cerebral ischemic injury via the induction of mitophagy[J]. Mol Med,2015,21:420-429.
- [4] Lu Q,Tucker D,Dong Y,et al. Neuroprotective and functional improvement effects of methylene blue in global cerebral ischemia[J]. Mol Neurobiol,2016,53(8):5344-5355.
- [5] 孙念霞,高维娟,易忠良,等. 改良线栓法制作 SD 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型[J]. 中国组织工程研究,2014,18(2):225-230.
- [6] Fang IM,Yang CM,Yang CH,et al. Transplantation of induced pluripotent stem cells without C-Myc attenuates retinal ischemia and