

## · 实验研究 ·

## 七氟醚后处理对糖尿病大鼠脑缺血-再灌注损伤的影响

刘振国 董桂敏 张海燕 刘伟亮

**【摘要】 目的** 研究七氟醚后处理对糖尿病大鼠脑缺血-再灌注损伤的影响。**方法** 雄性 SD 大鼠 32 只, 3.0~3.5 月龄, 体重 280~320 g, 采用随机数字表法分为四组: 非糖尿病缺血-再灌注对照组(NDC 组)、糖尿病缺血-再灌注对照组(DC 组)、非糖尿病缺血-再灌注七氟醚后处理组(NDS 组)和糖尿病缺血-再灌注七氟醚后处理组(DS 组), 每组 8 只。采用栓线法和链脲佐霉素制备缺血-再灌注损伤大鼠模型和糖尿病大鼠模型。缺血 2 h, 再灌注 24 h 后, 进行大鼠神经缺损评分, 采用 TTC 法测定脑梗死体积, Western blot 法测定血管生成素-1(angiotensin-1, Ang-1)蛋白含量。**结果** DC 组神经缺损评分、脑梗死体积百分比明显高于 NDC 组, Ang-1 蛋白含量明显低于 NDC 组( $P<0.05$ ); NDS 组神经缺损评分、脑梗死体积百分比明显低于 DC 组, Ang-1 蛋白含量明显高于 DC 组( $P<0.05$ ); DS 组神经缺损评分、脑梗死体积百分比明显低于 DC 组, Ang-1 蛋白含量明显高于 DC 组( $P<0.05$ )。**结论** 大鼠脑缺血-再灌注后, 糖尿病可加重神经缺损, 增大脑梗死体积, 减少 Ang-1 蛋白含量; 七氟醚可减轻神经缺损, 减小脑梗死体积, 增加 Ang-1 蛋白含量; 七氟醚后处理减轻大鼠脑缺血-再灌注损伤与 Ang-1 蛋白含量增加有关。

**【关键词】** 七氟醚; 糖尿病; 缺血-再灌注损伤; 血管生成素-1

Effects of sevoflurane post treatment on cerebral ischemia-reperfusion injury in diabetic rats and non-diabetic rats LIU Zhenguo, DONG Guimin, ZHANG Haiyan, LIU Weiliang. Weifang People's Hospital, Weifang 261000, China

Corresponding author: LIU Zhenguo, Email: liuzhenguo1974@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of sevoflurane post treatment on cerebral ischemia-reperfusion injury in diabetic rats and non-diabetic rats. **Methods** Thirty-two male SD rats, aged 3.0-3.5 months, weighing 280-320 g, were divided into four groups by random number method ( $n=8$ ): non diabetic ischemia reperfusion group (group NDC); diabetic ischemia reperfusion group (group DC); non diabetic ischemia reperfusion group with the sevoflurane post-treatment (group NDS); diabetic ischemia reperfusion group with the sevoflurane post-treatment (group DS). The middle cerebral artery occlusion method and streptozotocin were used to establish the ischemia-reperfusion injury model and diabetic model. 2 h after ischemia and 24 h after reperfusion, the rats nerve defect scale was detected, the cerebral infarction volume was evaluated by TTC method, and Western blot method was used to detect angiogenin-1 (Ang-1) expression. **Results** Between the four groups of rats, nerve deficit score and infarct volume were significantly higher, Ang-1 protein relative expression was significantly lower in group DC than those in group NDC ( $P<0.05$ ); neural deficit score and infarct volume were significantly lower, Ang-1 protein relative expression was significantly higher in group NDS than those in group NDC ( $P<0.05$ ); nerve deficit score and infarct volume were significantly lower, Ang-1 protein relative expression was significantly higher in group DS than those in group DC ( $P<0.05$ ). **Conclusion** In the rats after cerebral ischemia reperfusion, diabetes could aggravate the nerve defect, increase the volume of cerebral infarction, reduce the expression of Ang-1; sevoflurane could reduce nerve defects, reduce infarct volume, increase the expression of Ang-1. The expression of Ang-1 and degree of injury after cerebral ischemia reperfusion in rats have relationship.

**【Key words】** Sevoflurane; Diabetes; Ischemia-reperfusion injury; Angiogenin-1

DOI:10.12089/jca.2018.02.017

基金项目:潍坊市科学技术发展计划项目(2015WS084)

作者单位:261000 山东省潍坊市人民医院麻醉科

通信作者:刘振国, Email: liuzhenguo1974@126.com

近年来,糖尿病患病率逐年上升,已成为影响我国居民健康的主要慢性非传染性疾病之一<sup>[1]</sup>。糖尿病引起的缺血性脑血管并发症,目前以溶栓治疗

为主,在治疗中需要采取有效的方法减轻溶栓后产生的脑缺血-再灌注对脑组织的再次损伤,但与非糖尿病患者比较,糖尿病患者治疗效果较差<sup>[2]</sup>。七氟醚是临床常用的吸入性麻醉药,研究表明,七氟醚具有保护脑组织的作用,能减轻缺血-再灌注对脑组织的损伤<sup>[2,4]</sup>。血管生成素-1(angiotensin-1, Ang-1)是特异性作用于血管内皮细胞的生长因子,具有保持血管内皮稳定性、促进血管再生、降低血管通透性重要作用。研究表明 Ang-1 对脑缺血-再灌注损伤具有保护作用<sup>[4]</sup>。

本研究通过建立糖尿病和局灶性缺血-再灌注损伤大鼠模型,研究七氟醚对糖尿病缺血-再灌注损伤大鼠的作用,并探讨七氟醚、糖尿病及 Ang-1 表达对缺血-再灌注损伤的影响。

### 材料与方法

**实验动物与分组** SPF 级雄性 SD 大鼠 32 只,3.0~3.5 月龄,体重 280~320 g,购自山东大学实验动物中心。在通风良好、室温 25℃、相对湿度 45%的环境中饲养,自由摄取食物。采用随机数字表法将大鼠分为四组:非糖尿病缺血-再灌注对照组(NDC 组)、糖尿病缺血-再灌注对照组(DC 组)、非糖尿病缺血-再灌注七氟醚后处理组(NDS 组)和糖尿病缺血-再灌注七氟醚后处理组(DS 组),每组 8 只。

**实验仪器** 美国 CWE SAR-830 型小动物呼吸机;德国罗氏 ACCU-CHEK Advantage 型血糖仪;美国伯乐 Bio-rad PowerPac 型电泳仪;美国伯乐 Bio-rad GelDoc XR 型凝胶成像系统。

**糖尿病大鼠模型建立** 大鼠禁食 6 h,将链脲佐菌素溶于 0.5 mol/L 柠檬酸盐缓冲液中,按照 40 mg/kg 的剂量对大鼠进行腹腔注射。第 1 次注射 24 h 后注射同等剂量链脲佐菌素。第 2 次注射链脲佐菌素后 3 d,使用血糖仪监测大鼠尾静脉血糖浓度,血糖浓度>16.7 mmol/L 表明 1 型糖尿病大鼠模型制作成功<sup>[5]</sup>。非糖尿病对照组大鼠腹腔注射柠檬酸盐缓冲液。

**局灶性脑缺血大鼠模型建立** 糖尿病建模成功后,所有大鼠采用线栓法制备局灶性脑缺血大鼠模型。大鼠全麻采用 10%水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射。麻醉后仰卧位固定消毒后皮肤正中切开,右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉进行分离并结扎,在颈总动脉远心端,采用 4/0 手术用单股尼龙线插入,经颈内动脉与颈总动脉分叉处进线约 18

mm,栓塞右侧大脑中动脉,缝合皮肤<sup>[6]</sup>。在阻断大脑中动脉血流 2 h 后,将尼龙线外抽,恢复血流灌注 24 h。接受七氟醚后处理的大鼠放置在密闭的动物箱中,再灌注开始后,参考文献<sup>[7]</sup>的方法,小动物呼吸机与密闭动物箱连接,保持大鼠暴露在含有 2.6%七氟醚的氧气中。

**神经缺损评分测定** 在局灶性缺血-再灌注 24 h 后,参考文献<sup>[8]</sup>的方法,对实验大鼠进行神经行为学测试评分,评分标准如下:0 分,无神经功能缺损;1 分,轻度神经功能缺损(不能完全伸展对侧前肢);2 分,中度神经功能缺损(向对侧转圈);3 分,重度神经功能缺损(向对侧倾倒);4 分,不能自发行走,意识水平降低。

**脑梗死体积测定** 大鼠断头处死,取出大脑组织,自脑前极连续切取 2 mm 厚度脑冠状切片,浸入 2%的 TTC 溶液于 37℃下避光浸染 30 min,10%甲醛中性缓冲液固定并过夜。采集切片图像,参照文献<sup>[9]</sup>的方法使用图像分析软件计算脑梗死体积占全脑体积的百分比。

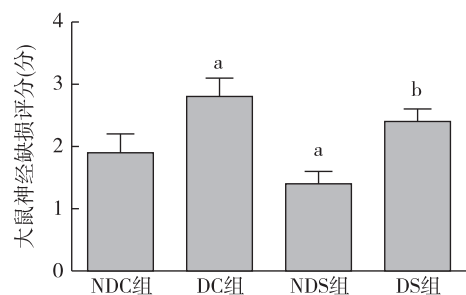
**Ang-1 蛋白含量测定** 再灌注 24 h 后采用 Western blot 法测定大鼠脑组织中 Ang-1 蛋白含量。按照文献<sup>[10]</sup>的方法从脑组织中提取蛋白质,蛋白样品与等体积的上样缓冲液混合,煮沸 5 min,冷却后用 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳对蛋白质进行分离,并将分离后的蛋白质转移到 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭 1 h。加入 Ang-1 (1:2 000)和  $\beta$ -Actin (1:500)一抗 4℃孵育过夜。清洗膜,加入二抗 (1:4 000)进行孵育。ECL 显色,凝胶成像仪采集图像并分析。采用 Ang-1 蛋白与内参照  $\beta$ -actin 积分光密度值的比值来反映 Ang-1 蛋白含量。

**统计分析** 采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,组间各因素之间的比较采用 SNK-q 检验;计数资料比较采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

**神经缺损评分** 糖尿病大鼠造模成功率 100%。DC 组神经缺损评分明显高于 NDC 组( $P < 0.05$ );NDS 组神经缺损评分明显低于 NDC 组( $P < 0.05$ );DS 组神经缺损评分明显低于 DC 组( $P < 0.05$ )(图 1)。

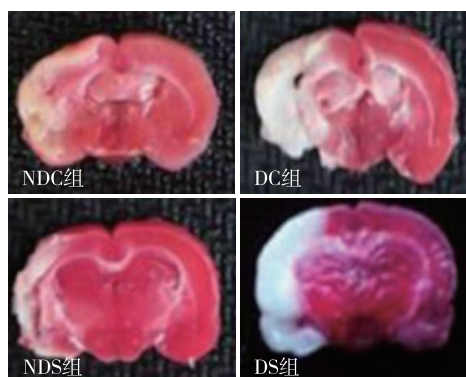
**脑梗死体积百分比** DC 组脑梗死体积百分比明显高于 NDC 组( $P < 0.05$ );NDS 组脑梗死体积



注:与 NDC 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 DC 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

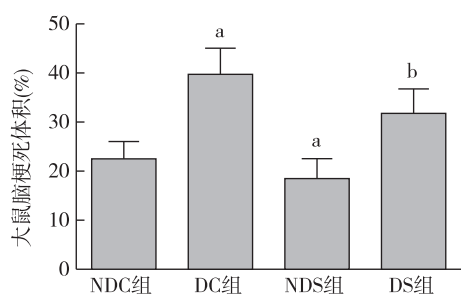
图 1 四组大鼠神经缺损评分的比较

百分比明显低于 NDC 组 ( $P < 0.05$ );DS 组脑梗死体积百分比明显低于 DC 组 ( $P < 0.05$ )(图 2,3)。



注:与 NDC 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 DC 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 2 四组大鼠脑组织 TTC 染色图



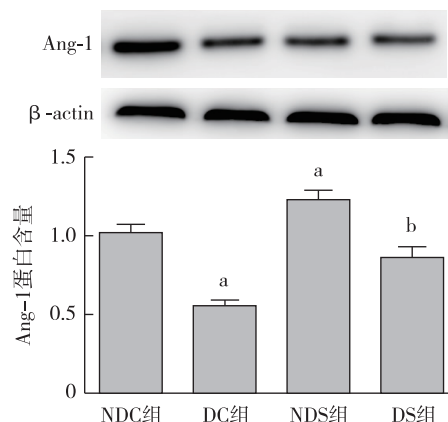
注:与 NDC 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 DC 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 3 四组大鼠脑梗死体积百分比的比较

Ang-1 蛋白含量 DC 组 Ang-1 蛋白含量明显低于 NDC 组 ( $P < 0.05$ );NDS 组 Ang-1 蛋白含量明显高于 NDC 组 ( $P < 0.05$ );DS 组 Ang-1 蛋白含量明显高于 DC 组 ( $P < 0.05$ )(图 4)。

## 讨 论

在缺血性脑血管疾病治疗过程中,不可避免出现脑缺血-再灌注损伤,其机制涉及自由基损伤、神



注:与 NDC 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 DC 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 4 四组大鼠脑组织 Ang-1 蛋白含量的比较

经细胞内  $Ca^{2+}$  超载、兴奋性氨基酸、细胞凋亡、血脑屏障破坏等众多因素。糖尿病会加重这一损伤,因此寻找有效的方法减少损伤的发生具有重要的临床意义。

本研究结果显示,发生缺血-再灌注损伤后糖尿病大鼠比非糖尿病大鼠脑梗死体积更大,神经缺损评分更高,这表明糖尿病会加重大鼠脑缺血-再灌注损伤;采用七氟醚处理后,糖尿病大鼠和非糖尿病大鼠脑梗死体积百分比明显减小,神经缺损评分明显降低,表明七氟醚可以有效减轻缺血-再灌注损伤。

Ang-1 是一种血管生长因子,在缺血等病理条件下,能够起到血管生成调节的作用,可以特异性作用于内皮细胞,干预平滑肌细胞、内皮细胞和周细胞的相互作用,保持血管内皮的稳定、促进血管的生成、降低血管损伤导致的神经元损害。研究表明,Ang-1 通过促进缺血脑组织周围侧支循环的建立,提高血管内皮的稳定性和存活能力,帮助缺血脑组织周围神经血管新生等多种作用,发挥对神经元的保护作用<sup>[11]</sup>。本研究结果显示,非糖尿病大鼠 Ang-1 蛋白含量明显高于糖尿病大鼠,在发生缺血-再灌注损伤时,可能由于糖尿病大鼠血管更为脆弱,神经元更易发生损害,导致糖尿病大鼠神经缺损评分和脑梗死体积百分比明显高于非糖尿病大鼠。临床研究表明,1 型糖尿病患者脑血管的舒展、收缩功能以及脑血流量自我调节功能都发生下降,这些变化加剧了糖尿病患者缺血-再灌注后大脑损伤<sup>[12]</sup>。七氟醚处理后大鼠脑组织中 Ang-1 表达量明显高于未经过七氟醚处理组,血管稳定性提高,脑梗死体积百分比明显减小,神经缺损评分明

显降低。

综上所述,七氟醚处理可以减轻大鼠脑缺血-再灌注损伤与增加 Ang-1 的表达有关。

### 参 考 文 献

- [1] 宇传华,季洁,张干深,等. 中国人寿、死因与健康危险因素——全球疾病负担研究最新结果. 中国卫生统计, 2015, 32(1): 181-182.
- [2] Wen XR, Fu YY, Liu HZ, et al. Neuroprotection of sevoflurane against ischemia/reperfusion-induced brain injury through inhibiting JNK3/Caspase-3 by enhancing Akt signaling pathway. Mol Neurobiol, 2016, 53(3): 1661-1671.
- [3] 张静,余鹏,刘琴,等. 七氟醚后处理在心肌缺血-再灌注损伤中的保护作用及机制. 临床麻醉学杂志, 2016, 32(1): 96-99.
- [4] 高轩,李洪亮,李永秋,等. 血管生成素-1 对大鼠局灶性脑缺血再灌注后血脑屏障的保护作用. 中华实验外科杂志, 2014, 31(6): 1289-1291.
- [5] Lenzen S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia, 2008, 51(2): 216-226.
- [6] Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. Pharmacol Biochem Behav, 2007, 87(1): 179-197.
- [7] Dong P, Zhao J, Zhang Y, et al. Aging causes exacerbated ischemic brain injury and failure of sevoflurane post-conditioning: role of B-cell lymphoma-2. Neuroscience, 2014, 275: 2-11.
- [8] 赵丹,袁林辉,张静,等. 七氟醚后处理对大鼠脑缺血-再灌注时氧化应激和炎症反应的影响. 临床麻醉学杂志, 2017, 33(7): 688-692.
- [9] Karasawa Y, Komiyama H, Yoshida S, et al. Effect of TTC-909 on cerebral infarction following permanent occlusion of the middle cerebral artery in stroke prone spontaneously hypertensive rats. J Pharmacol Sci, 2003, 91(4): 305-312.
- [10] Chen JX, Tuo Q, Liao DF, et al. Inhibition of protein tyrosine phosphatase improves angiogenesis via enhancing Ang-1/Tie-2 signaling in diabetes. Exp Diabetes Res, 2012, 2012: 836759.
- [11] 刘凯,姜云霞,邓文帅,等. 血管生成素-1 基因修饰的骨髓间充质干细胞移植对脑梗死大鼠行为学的影响. 山东医药, 2015, 55(40): 4-7.
- [12] Hoffman WH, Litaker MS, Pluta RM, et al. Cerebral vasoreactivity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. Endocr Res, 2009, 30(3): 315-325.

(收稿日期:2017-06-18)

## · 消息 ·

### 《临床麻醉学杂志》2018 年重点号征文通知

《临床麻醉学杂志》拟于 2018 年出刊三个重点号专辑:“心血管手术麻醉专辑”、“骨科手术麻醉专辑”和“老年患者手术麻醉专辑”,与此相关的临床研究、实验研究、临床经验、综述、继续教育、知识更新、病例报道等均可投稿。稿件经编委评审后择优刊用。投稿请登录 <http://www.lcmzxzz.com>,并在文题后注明“重点号”。编辑部联系电话:025-83472912,Email:jca@lcmzxzz.com。

### 《临床麻醉学杂志》2018 年度征订通知

本刊中国标准连续出版物号 CN 32-1211/R,ISSN 1004-5805。2018 年度本刊仍从邮局发行,邮发代号 28-35,大 16 开本,每期 104 页,每月 15 日出版,15 元/期,全年 180 元(含邮费)。请到当地邮局或中国邮政网(<http://bk.11185.cn/index.do>)订阅,或与本刊编辑部联系,地址:南京市鼓楼区紫竹林 3 号《临床麻醉学杂志》编辑部,邮编:210003,电话:025-83472912,Email:jca@lcmzxzz.com。