

文章编号 1006-8147(2021)03-0222-07

论著

间歇性低氧干预对脑缺血大鼠神经功能恢复的影响

苏悦¹, 史昱¹, 姜俐洋^{1,2}, 黄传¹, 万春晓¹

(1.天津医科大学总医院康复医学科, 天津 300052; 2.天津市海河医院康复医学科, 天津 300350)

摘要 目的:探究脑缺血后间歇性低氧干预的神经保护作用及机制。方法:8周龄雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠随机分为假手术组(SHAM, $n=6$)、脑缺血-静息组(MCAO-SED, $n=7$)和脑缺血-间歇性低氧组(MCAO-IH, $n=7$)。术后1周开始对MCAO-IH组进行低氧干预,持续4周。每周进行改良神经损伤程度评分(mNSS);干预4周后采用MRI检测大鼠脑梗死体积;Western印迹法检测脑皮质梗死边缘区脑组织腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子-1 α (PGC-1 α)的表达量。结果:与MCAO-SED组相比,MCAO-IH组死亡率无差异(14.29%, $P>0.05$);mNSS评分显著降低($P<0.05$);脑梗死体积明显减小($P<0.01$);梗死边缘区AMPK和PGC-1 α 表达量显著升高($P_{\text{AMPK}}<0.001$, $P_{\text{PGC-1}\alpha}<0.05$)。相关性分析结果显示,梗死边缘区AMPK和PGC-1 α 表达量与mNSS评分之间均呈显著负相关($P<0.05$)。结论:间歇性低氧干预可通过上调脑组织中AMPK和PGC-1 α 蛋白表达,进而减小脑梗死体积,促进运动功能恢复,可能通过激活AMPK/PGC-1 α 信号通路发挥神经保护作用。

关键词 间歇性低氧;脑缺血;AMPK;PGC-1 α ;神经保护

中图分类号 R493.743

文献标志码 A

Effect of intermittent hypoxic intervention on neurological function recovery in cerebral ischemic rats

SU Yue¹, SHI Yu¹, JIANG Li-yang^{1,2}, HUANG Chuan¹, WAN Chun-xiao¹

(1.Department of Rehabilitation Medicine, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2.Department of Rehabilitation Medicine, Tianjin Haihe Hospital, Tianjin 300350, China)

Abstract Objective: To explore the neuroprotective effect and mechanism of intermittent hypoxia intervention after cerebral ischemia.

Methods: 8-week male Sprague-Dawley(SD) rats were randomly divided into sham operation group(SHAM, $n=6$), MCAO-Sedentary group(MCAO-SED, $n=7$) and MCAO-Intermittent Hypoxia group(MCAO-IH, $n=7$). In MCAO-IH group, hypoxia was conducted 1 week after operation and lasted for 4 weeks. The modified neurological severity score(mNSS) was performed weekly. After 4 weeks of intervention, MRI was used to detect cerebral infarct volume in rats; Western blotting was used to detect the expression of AMPK and PGC-1 α in the peri-infarction region. **Results:** Compared with MCAO-SED group, MCAO-IH group performed the same mortality rate(14.29%, $P>0.05$), decreased mNSS score($P<0.05$), decreased infarct volume($P<0.01$), and increased the expression of AMPK and PGC-1 α ($P_{\text{AMPK}}<0.001$, $P_{\text{PGC-1}\alpha}<0.05$). Correlation analysis results showed that the expression of AMPK and PGC-1 α in the peri-infarction region were significantly negatively correlated with mNSS score($P<0.05$). **Conclusion:** Intermittent hypoxia can increase the expression of AMPK and PGC-1 α in brain tissue, thereby reducing the infarct volume and promoting the recovery of motor function after cerebral ischemia. It may play a neuro-protective role by activating AMPK/PGC-1 α signaling pathway.

Key words intermittent hypoxia; cerebral ischemia; AMPK; PGC-1 α ; neuroprotection

脑缺血被认为是一项全球性的医学挑战,因其表现出高死亡率、高发病率和致残率特征而倍受关注^[1]。康复训练常要求主动训练,但是由于部分神经疾病重症患者可能存在严重肢体功能障碍、意识障碍或者合并严重心功能障碍等情况,主动康复存在局限性。过去的研究表明,高海拔环境有助于提高运动员的心肺功能、耐力性能和运动表现。因

此,低氧训练近年来广泛应用于改善早期高血压、冠心病、心肌梗死、糖尿病、哮喘和肥胖^[2-4]等疾病中。间歇性低氧是指周期性地交替暴露于低氧和常氧状态^[5],造成体内适度缺氧,从而导致一系列有利于提高有氧代谢能力的抗缺氧生理适应,有望应用于上述重症患者的康复中,改善早期神经功能。

腺苷酸活化蛋白激酶(5'-AMP-activated protein kinase, AMPK)作为细胞能量传感器,是脑损伤疾病的关键和保护性分子^[6],本课题组前期研究发现间歇性低氧可促进AMPK的表达,产生心脏保护作用^[4]。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gam-

基金项目 国家重点研发计划(2017YFC1308504);天津特支计划高层次人才创新团队项目;天津市自然科学基金重点项目(18JCZDJC98900);天津市卫生局重点发展项目(16KJ122);国家重点研发计划(2017YFC1104004)

作者简介 苏悦(1996-),女,硕士在读,研究方向:康复医学与理疗学;通信作者:万春晓, E-mail: cwan@tmu.edu.cn。

ma coactivator 1- α , PGC-1 α)是 AMPK 的下游调节因子^[7],是线粒体生物发生和呼吸链的主要调节因子^[8]。目前间歇性低氧主要用于模拟阻塞性睡眠呼吸暂停综合征对后续发生脑缺血的影响,而脑缺血后应用低氧训练对运动功能的影响尚未清楚。基于此,本研究通过建立大鼠大脑中动脉闭塞模型(middle cerebral ischemia occlusion, MCAO),采用间歇性低氧干预,观察神经功能评分、脑梗死体积以及脑皮质梗死边缘区 AMPK、PGC-1 α 蛋白表达水平的差异,研究间歇性低氧对脑缺血后神经功能恢复的影响及潜在机理,旨在为重症患者提供补充康复方案。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 按照随机数字表法将 24 只 SPF 级雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠 8 周龄,体重 280~300 g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司[许可证号 SCXK(京)2019-0008]随机分为假手术组 (SHAM, $n=6$) 和脑缺血模型组 (MCAO, $n=18$),将造模成功的动物再随机分为脑缺血-静息组 (MCAO-SED, $n=7$) 和脑缺血-间歇性低氧组 (MCAO-IH, $n=7$)。各组动物分笼饲养[室温(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 12~12 h 明暗循环及相对湿度 50%~60%],自由获取食物和水。实验过程中动物饲养及处置符合动物福利,并严格遵循美国国立卫生研究院《实验动物护理和使用指南》(NIH 出版物第 85-23 号,1996 年修订),并由天津医科大学伦理委员会批准。

1.2 脑缺血性模型建立 采用 Longa 线栓法制备左侧大脑中动脉闭塞模型^[9],大鼠经戊巴比妥钠麻醉后(40 mg/kg, i.p.),完全结扎左侧颈总动脉和颈外动脉近心端,将线栓[型号:2838-A4,直径:(0.38 ± 0.02)mm,北京西浓科技有限公司]引入左侧颈内动脉约 18.0~20.0 mm,阻塞 60 min 后取出。术中直肠温度保持在(37 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 。假手术组仅分离动脉,不插入线栓。于术后 24 h 进行 ZeaLonga 评分,选择 1~3 分大鼠作为造模成功的标准,即患侧前爪或后爪屈曲;行走时向患侧转圈或倾倒^[9]。剔除无损伤、蛛网膜下腔出血及术中意外死亡的大鼠,共 4 只。实验流程见图 1。

1.3 间歇性低氧干预 术后 1 周将大鼠置于动物低氧舱内(模拟氧浓度 13.0%,大气压力 54.0 kPa,相当于海拔 5 000 m 的氧分压)。按照低氧 1 h,随后常氧 10 min 的方式间歇干预,4 h/d,7 d/周^[10],持续 4 周。干预期间大鼠出现兴奋性降低(嗜睡)、体重降低、行为迟缓、呼吸加深加快、群聚等反应(图 2)。SHAM 组和 MCAO-SED 组置于常氧环境中,干预时

间相同。

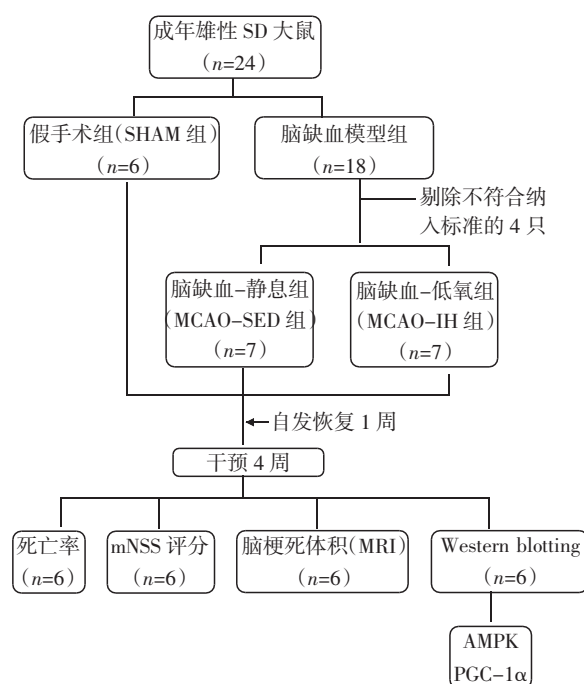


图 1 实验流程图

Fig 1 Experimental flowchart



图 2 间歇性低氧干预过程中大鼠的生理反应状态

Fig 2 Physiological response state of rats during intermittent hypoxia intervention

1.4 神经功能评估 干预前及干预后 1~4 周采用改良神经损伤程度评分(modified neurological severity score, mNSS)进行神经功能评估,该评定是一项对运动、感觉、反射和平衡的综合测评^[11]。评分范围为 0~18 分,分数高低反映大鼠神经损伤状态(0 分表示无功能缺损;1~6 分为轻度损伤,7~12 分为中度损伤,13~18 分为重度损伤)。

1.5 脑梗死体积测定 采用磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)测定梗死体积。干预前和 4 周干预结束后对大鼠行 T2WI 扫描(3.0T,德国西门子公司)。将大鼠仰卧位固定,采用 T2-SPACE 序列扫描(TR=1 000 ms,TE=155 ms,72 层,层厚=0.4 mm,

矩阵=192×192,FOV=60 mm×60 mm,FA=120°)。为减少脑水肿对梗死体积的影响,梗死体积表示为:梗死体积比(%)=(右侧半球体积-左侧半球中非梗死体积)/右侧半球体积×100%^[12]。

1.6 Western 印迹测定脑皮质梗死边缘区 AMPK 及 PGC-1 α 蛋白表达 4 周训练结束,将大鼠麻醉后,开胸暴露心脏,剪开右心耳,将针头插入左心室,快速滴注生理盐水 200~250 mL 进行心脏灌注,断头取脑,分离缺血区周围 1~2 mm³ 的脑皮质组织,于-80℃冷冻保存。取部分组织加入蛋白裂解液(RIPA:PMSF=100:1)提取总蛋白,用 BCA 试剂盒定量蛋白浓度。制成蛋白样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,然后将蛋白转膜至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上,室温下用 5%脱脂牛奶封闭 1 h,孵育一抗,AMPK(1:1 000,Abcam,UK)、PGC-1 α (1:1 000,Abcam,UK)、 β -actin(1:1 000,Cell Signaling,USA),4℃过夜。次日在室温下用辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000,Cell Signaling,USA)孵育 1 h。TBST 洗膜后,采用 ECL 于暗室曝光、显影、定影。运用 Image J 处理后计算蛋白条带的灰度值,结果采用目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值表示。

1.7 统计学处理 采用 SPSS22.0 和 Graphpad Prism6.0 对数据进行统计学分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两两比较采用 LSD-*t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,采用 Pearson 线性相关分析 AMPK、PGC-1 α 表达与 mNSS 评分间相关性。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠死亡率差异 死亡率自符合入组标准的 MCAO 大鼠开始干预后进行统计,各组死亡率(%)=(入组大鼠总数-最终存活大鼠总数)/入组大鼠总数×100%。SHAM 组大鼠没有造成脑器质性损伤,实验过程中没有死亡,故死亡率为 0,MCAO-SED 和 MCAO-IH 组大鼠在干预过程中各有 1 只死亡,死亡率相同,均为 14.29%,见表 1。

表 1 各组大鼠死亡率比较

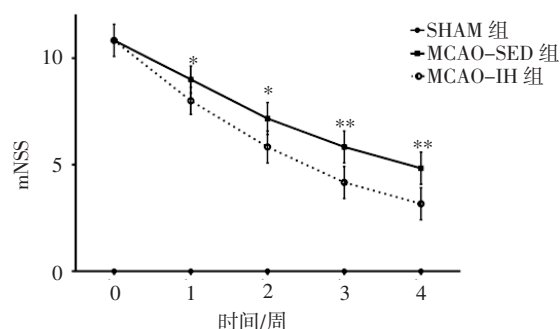
Tab 1 Comparison of rat mortality in each group

分组	入组动物数 (只)	最终存活 动物数(只)	死亡率 (%)
SHAM 组	6	6	0
MCAO-SED 组	7	6	14.29
MCAO-IH 组	7	6	14.29

注:MCAO-SED:脑缺血-静息组;MCAO-IH:脑缺血-间歇性低氧组;SHAM:假手术组

2.2 各组大鼠神经功能评分结果 SHAM 组大鼠没有神经功能障碍,mNSS 评分始终为 0 分。干预前

MCAO-SED 和 MCAO-IH 两组大鼠的 mNSS 评分无差异($P>0.05$)。从干预后 1 周开始直至干预 4 周结束,MCAO-IH 组的 mNSS 评分均显著优于 MCAO-SED 组($P<0.05$),且时间越长差异越显著,见图 3。

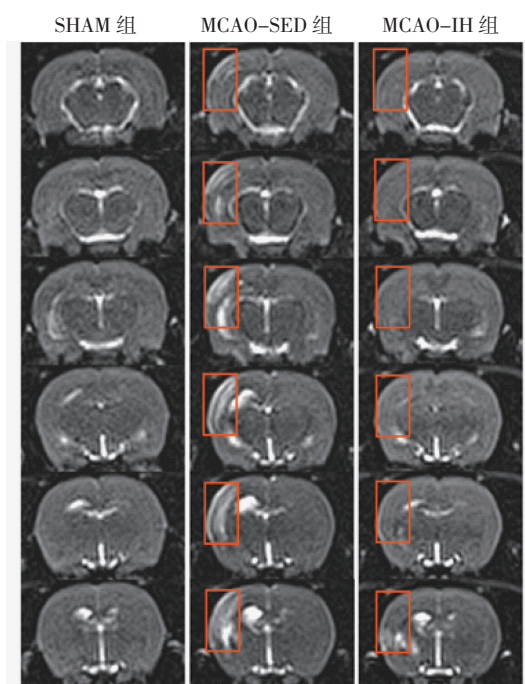


注:mNSS:改良神经损伤程度评分;MCAO-SED 组:脑缺血-静息组;MCAO-IH 组:脑缺血-间歇性低氧组;SHAM 组:假手术组,与 MCAO-IH 组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图 3 各组大鼠干预 4 周神经功能评分结果

Fig 3 Neurological function scores of rats in each group of intervention for 4 weeks

2.3 脑梗死体积测量结果 干预前 MCAO-SED 组与 MCAO-IH 组脑梗死体积比无显著差异($P=0.631$),干预 4 周后采用 MRI 测定梗死体积,结果显示 MCAO-IH 组脑梗死体积比明显小于 MCAO-SED 组($P<0.01$),见图 4 和表 2。



注:从各组大鼠中获得具有代表性的核磁共振冠状 T2 图像,自上而下显示 Bregma-2.8 至-0.8 mm 的层面,在同侧半球主要观察到异常的 T2 高信号(红色框线部分);mNSS:改良神经损伤程度评分;MCAO-SED:脑缺血-静息组;MCAO-IH:脑缺血-间歇性低氧组;SHAM:假手术组

图 4 各组大鼠干预 4 周后核磁共振检测图像

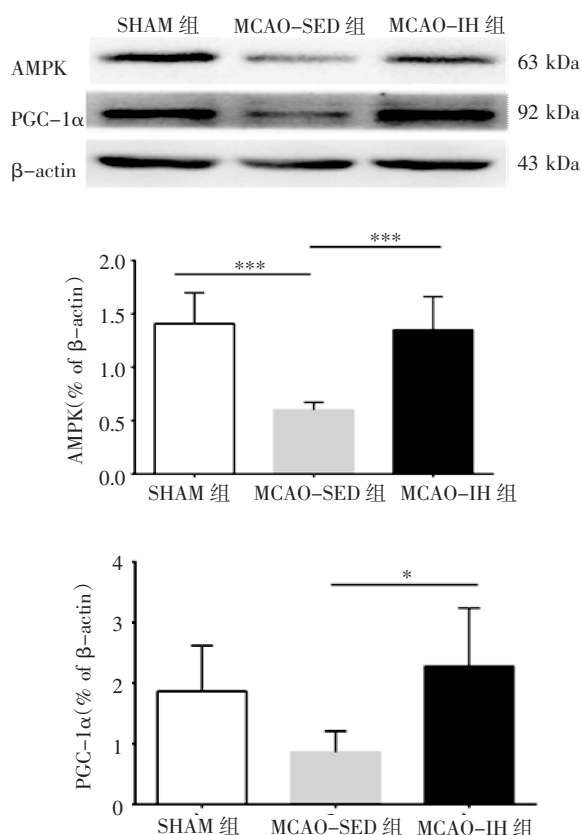
Fig 4 MRI images of rats in each group after 4 weeks of intervention

表2 各组脑缺血大鼠干预前和干预4周后脑梗死体积比比较($\bar{x} \pm s$)Tab 2 Comparison of cerebral infarction volume ratio before and after 4 weeks of intervention in each group of MCAO rats ($\bar{x} \pm s$)

分组	动物数 (只)	干预前脑梗死 体积比	干预4周脑梗死 体积比
MCAO-SED组	6	37.58 \pm 1.58	23.20 \pm 1.02
MCAO-IH组	6	38.53 \pm 1.05	16.41 \pm 1.01**

注:MCAO-SED组:脑缺血-静息组;MCAO-IH组:脑缺血-间歇性低氧组;与MCAO-SED组相比,** $P < 0.01$

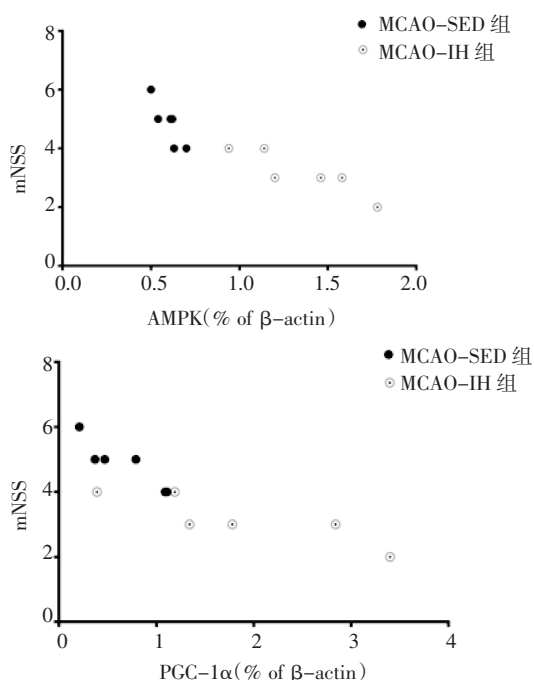
2.4 间歇性低氧对大鼠脑组织 AMPK 及 PGC-1 α 表达水平的影响 Western 印迹结果显示,脑缺血损伤后 MCAO-SED 组梗死边缘区 AMPK 和 PGC-1 α 的表达较 SHAM 组降低,其中 AMPK 更为显著($P < 0.001$)。4 周间歇性低氧干预后,MCAO-IH 组 AMPK 和 PGC-1 α 的表达较 MCAO-SED 组显著升高($P_{AMPK} < 0.001, P_{PGC-1\alpha} < 0.05$)(图 5)。



注:与 MCAO-SED 组相比,* $P < 0.05$;MCAO-SED 组与 SHAM 组、MCAO-IH 组与 MCAO-SED 组相比 *** $P < 0.001$;MCAO-SED 组:脑缺血-静息组;MCAO-IH 组:脑缺血-间歇性低氧组;SHAM 组:假手术组;AMPK:腺苷酸活化蛋白激酶;PGC-1 α 组:过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α

图5 干预4周后各组大鼠脑皮质梗死边缘区 AMPK 和 PGC-1 α 蛋白表达Fig 5 The expression of AMPK and PGC-1 α protein in the peri-infarction region after 4 weeks of intervention in each group of rats

2.5 大鼠脑组织 AMPK、PGC-1 α 表达水平与 mNSS 评分间的相关性 将干预4周后 MCAO-SED 和 MCAO-IH 组大鼠脑皮质梗死边缘区 AMPK 和 PGC-1 α 表达水平分别与 mNSS 评分进行相关性分析,结果显示:两组 AMPK 表达量与 mNSS 评分之间呈显著负相关($r_{MCAO-SED} = -0.880, P < 0.05; r_{MCAO-IH} = -0.894, P < 0.05$,图 6A);PGC-1 α 表达量也与 mNSS 评分之间存在显著负相关关系($r_{MCAO-SED} = -0.918, P < 0.01; r_{MCAO-IH} = -0.869, P < 0.05$,图 6B)。



注: mNSS:改良神经损伤程度评分;MCAO-SED:脑缺血-静息组;MCAO-IH 组:脑缺血-间歇性低氧组;AMPK:腺苷酸活化蛋白激酶;PGC-1 α :过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α

图6 脑缺血大鼠脑皮质梗死边缘区 AMPK 和 PGC-1 α 表达与 mNSS 评分间的相关性Fig 6 Correlation between the expression of AMPK and PGC-1 α in the peri-infarction region and mNSS in MCAO rats

3 讨论

中枢神经系统疾病是当今世界上致残率最高的疾病,可导致一系列功能障碍,其中以肢体运动障碍最为显著,严重影响患者的生活质量。急性脑损伤(即脑卒中)的神经保护和运动功能恢复问题一直是神经科学和康复医学领域的挑战和机遇。随着细胞损伤和修复进程的变化,可通过多种不同的刺激来诱导内源性耐药性或耐损伤的耐受性,从而促进损伤康复,其中包括低氧^[13]。本研究对 MCAO 大鼠进行了 4 周间歇性低氧训练,发现 MCAO-IH 组相较于 MCAO-SED 组死亡率无差异,mNSS 评分

和脑梗死体积显著改善,脑梗死皮质边缘区的 AMPK 和 PGC-1 α 表达水平明显提高,通过相关性分析验证 AMPK、PGC-1 α 表达量升高显著改善 mNSS 评分,以上结果表明间歇性低氧可促进脑损伤大鼠运动功能恢复,具有神经保护作用。

间歇性低氧的安全性取决于低氧的时间和浓度。查阅文献发现若间歇性低氧干预中氧气浓度低于 8%,每天干预时长超过 7 h,会产生颅脑损伤的危害,引起神经元凋亡和认知功能下降^[14-15]。而大量文献表明,在动物脑缺血模型中,恢复 7 d 后开始施加 12% 左右浓度氧气(或模拟海拔高度 5 000 m),4 h/d 间歇性低氧干预,不仅是最佳恢复时机,可以显著减小脑梗死体积^[16],还可以有效挽救神经元细胞^[16]、增强脑室下区和海马齿状回的神经发生^[17]、逆转脑缺血引起的空间学习和记忆障碍^[18],促进认知功能恢复。

本研究采用的低氧训练是模拟海拔 5 000 m 的高原环境,高原缺氧状态会导致血液中 PO₂ 下降,刺激颈动脉体等化学感受器,引起呼吸中枢兴奋,再通过传出神经使呼吸肌运动加强,吸入更多的 O₂ 使血液中 PO₂ 回升,维持内环境稳态。间歇性低氧相当于不断重复从平原进入高海拔环境的过程,血液中 PCO₂ 升高,红细胞中糖酵解产物 2,3-二磷酸甘油酸(2,3-DPG)增加,这与运动产生的作用效果相一致,均导致血红蛋白对 O₂ 亲和力下降,氧离曲线右移,从而使血液释放出更多的 O₂。本研究在低氧训练中观察到大鼠呼吸加深加快,且低氧舱内出现雾气,证实间歇性低氧状态下大鼠体内的生理调节作用。

通过对各组大鼠死亡率的统计发现,4 周间歇性低氧同常氧对照组的死亡率没有差异,说明间歇性低氧是一种相对安全的方法。笔者先前的研究也表明 4 周间歇性低氧可增强心肌梗死大鼠的心脏功能和运动耐力^[4];Naidu 等^[19]的临床试验表明间歇性低氧可安全促进创伤性亚急性脊髓损伤患者步行能力的恢复,这与本研究得出的安全性结果相一致。

高原低氧环境下训练近年来成为提高运动员心肺能力和运动表现的一种重要方式,广泛应用于长跑、自行车、游泳及团体项目中。鉴于其在运动员中发挥的有效作用,越来越多的研究将低氧作为临床医学中的一种治疗手段,有研究发现,低氧不仅可引发呼吸系统的可塑性,也可能是恢复神经系统损伤的有效疗法^[20]。在动物实验中,mNSS 评分是 MCAO 大鼠模型最常用的综合量表之一,该评分对于长期的测评相对敏感,大量研究通过 mNSS 评分的变化,

来验证神经功能的恢复^[21]。本研究中,低氧干预后 mNSS 评分降低,显著优于常氧对照组,说明间歇性低氧可以促进脑缺血大鼠神经功能恢复。

梗死体积被认为是判断疗效和预测预后的关键指标,MRI 对检测缺血性脑损伤具有很高的敏感性,已成为脑卒中临床评估的重要指标^[22]。通常在脑卒中发作后 30 或 90 d 采用 MRI 来测量最终梗死体积,此时与临床结果指标(例如 NIHSS 量表)吻合度高^[23]。许多动物研究也采用 MRI 测定脑梗死体积,其属于活体成像,不仅可以获取比传统病理染色更精确的结果,还有助于动态观察和分析治疗前后脑损伤的恢复情况,更具有临床意义^[24-25]。Kim 等^[26]通过 MRI 检测梗死体积的变化,探究 PARP-1 抑制剂对 MCAO 大鼠的神经保护作用。本研究采用成熟的 MRI 技术测量 MCAO-SED 和 MCAO-IH 组大鼠干预前后脑梗死体积,结果发现与常氧组相比,4 周间歇性低氧干预可以显著减小 MCAO 大鼠脑梗死体积,梗死体积减小也有助于改善神经功能。重症脑卒中患者脑梗死体积较大,早期神经损伤严重,无法进行主动运动,甚至处于昏迷状态,结合本研究结果在此阶段给予低氧疗法,有利于促进神经功能恢复,为临床康复提供了新的机会。

AMPK 是丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)激酶家族的成员,是能量剥夺的早期传感器,处于各种代谢过程的十字路口,并参与和细胞存活、生长、衰老及死亡密切相关的代谢变化^[27]。AMPK 在脑缺血中的调节机制包括氧化应激、自噬、细胞凋亡、线粒体功能障碍、谷氨酸兴奋性毒性、神经炎症和血管生成^[28]。有研究表明,间歇性低氧可以激活 AMPK 发挥多种保护作用,包括心脏保护^[4]、调节运动可塑性^[29]、改善葡萄糖耐量^[30]等。本研究发现间歇性低氧组相较于常氧静息组,脑梗死边缘区 AMPK 的蛋白表达显著上调,这表明间歇性低氧激活了 AMPK。脑缺血条件下,线粒体数量和结构变化以及功能障碍是脑损伤的始动环节,AMPK 可通过线粒体裂变因子诱导新线粒体的生物发生并减轻线粒体功能障碍,产生脑保护作用^[31]。Yu 等^[32]发现 AMPK 激活后,通过 ULK1 诱导自噬,从而减弱神经元凋亡,减小梗死体积。本研究中发现脑组织 AMPK 表达量与神经功能评分呈显著负相关,意味着间歇性低氧通过上调 AMPK,减小梗死体积,进而诱导神经功能恢复,同这些研究的结论保持一致。

PGC-1 α 作为能量代谢的中枢调节因子,广泛存在于心脏、骨骼肌和脑等能量需求较高的组织中,既控制骨骼肌细胞可塑性,又参与维持脑缺血

后线粒体的生物发生和呼吸功能,被认为是线粒体生物发生的起始因子。PGC-1 α 可在氧化应激状态下被激活,研究表明,低氧可上调PGC-1 α 的表达并减少活性氧簇(ROS)的产生,调节线粒体功能^[33]。PGC-1 α 的激活或过表达可用于补偿神经元线粒体损失,激活PGC-1 α 的方法对于治疗引起线粒体功能障碍和氧化损伤的神经退行性疾病具有重要价值^[34]。本研究结果显示,低氧可提高脑组织中PGC-1 α 的蛋白表达,进而维持能量代谢稳定。此外,通过相关性分析发现,PGC-1 α 表达水平越高,神经功能恢复越好,这也与现有文献结论一致^[35]。

AMPK是PGC-1 α 信号转导的关键诱导因子,在AMPK和PGC-1 α 能量代谢信号轴中构成两个关键调控因子,AMPK/PGC-1 α 之间的相关性已在肥胖、糖尿病和代谢综合征等研究中得到充分证实^[36]。研究人员还发现,AMPK缺陷型人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中PGC-1 α 的mRNA和蛋白表达降低,提示AMPK是PGC-1 α 的上游调节因子^[7]。AMPK不仅通过直接磷酸化激活PGC-1 α ,还通过增加NAD⁺的水平,增强SIRT1活性和PGC-1 α 去乙酰化,间接激活PGC-1 α ,从而影响线粒体功能和生物发生^[37]。Ashabi等^[38]发现AMPK通过PGC-1 α 信号转导诱导缺血大鼠的神经元线粒体生物发生,然而,通过AMPK的抑制剂抑制AMPK/PGC-1 α 途径,可阻碍神经元线粒体生物发生,逆转这种保护作用并加剧功能障碍。Chen等^[39]研究发现间歇性低氧可以通过上调骨骼肌中AMPK/PGC-1 α 途径改善肌肉形态和葡萄糖耐受性。本研究低氧组AMPK和PGC-1 α 蛋白表达均有所上调,推测AMPK/PGC-1 α 信号通路可能被间歇性低氧激活,诱导神经元线粒体的生物发生过程。但是,PGC-1 α 可受多个调控因子影响,本研究观察到神经功能的改善可能还涉及其他信号通路的共同作用。此外,PGC-1 α 激活后引起线粒体形态、数量及功能变化的具体表现也有待深入探讨。

间歇性低氧与目前临床常用的康复训练和药物治疗相比,具有操作简单、不良反应小等优点,其作为一种高海拔训练模式也广泛应用于运动员中,后续笔者将进一步探究间歇性低氧对正常动物是否会产生影响及其作用机制,拓宽其应用范围。本研究证实间歇性低氧可上调脑组织AMPK和PGC-1 α 蛋白表达,减小脑梗死体积,促进脑缺血后神经功能的恢复,可能与AMPK/PGC-1 α 信号通路的介导有关。本研究为早期无法主动运动的脑卒中重症患者提供一种补充康复方案,帮助患者早日恢复,同时为临床应用提供实验依据。

参考文献:

- [1] Benjamin E J, Blaha M J, Chiuve S E, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2017, 135(10):e146
- [2] Dale E A, Mitchell G S. Spinal vascular endothelial growth factor (VEGF) and erythropoietin (EPO) induced phrenic motor facilitation after repetitive acute intermittent hypoxia[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2013, 185(3):481
- [3] Gutierrez D V, Clark M, Nwanna O, et al. Intermittent hypoxia training after C2 hemisection modifies the expression of PTEN and mTOR[J]. *Exp Neurol*, 2013, 248:45
- [4] 徐凯月, 孟祥雪, 黄传, 等. 间歇性低氧干预提高心肌梗死大鼠心功能和运动耐力[J]. *天津医科大学学报*, 2019, 25(5):459
- [5] Baillicul S, Chacaroun S, Dautreleau S, et al. Hypoxic conditioning and the central nervous system: a new therapeutic opportunity for brain and spinal cord injuries? [J]. *Exp Biol Med*, 2017, 242(11):1198
- [6] Spasić M R, Callaerts P, Norga K K. AMP-activated protein kinase (AMPK) molecular crossroad for metabolic control and survival of neurons[J]. *Neuroscientist*, 2009, 15(4):309
- [7] Colombo S L, Moncada S. AMPK α 1 regulates the antioxidant status of vascular endothelial cells[J]. *Biochem J*, 2009, 421(2):163
- [8] St-Pierre J, Drori S, Uldry M, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators[J]. *Cell*, 2006, 127(2):397
- [9] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84
- [10] Tsai Y W, Yang Y R, Chen G H, et al. The time window of intermittent hypoxia intervention after middle cerebral artery occlusion[J]. *Chin J Physiol*, 2008, 51(5):324
- [11] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(4):1005
- [12] Swanson R A, Morton M T, Tsao-Wu G, et al. A semiautomated method for measuring brain infarct volume[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1990, 10(2):290
- [13] Verges S, Chacaroun S, Godin-Ribuot D, et al. Hypoxic conditioning as a new therapeutic modality[J]. *Front Pediatr*, 2015(3):58
- [14] Zhu J Y, Zhu Z, Ren Y P, et al. Role of the Nrdp1 in brain injury induced by chronic intermittent hypoxia in rats via regulating the protein levels of ErbB3[J]. *Neurotox Res*, 2020, 38:124
- [15] Zhang Y C, Cao H C, Qiu X H, et al. Neuroprotective effects of Adenosine A1 receptor signaling on cognitive impairment induced by chronic intermittent hypoxia in mice[J]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14:202
- [16] Qiao Y, Liu Z, Yan X, et al. Effect of intermittent hypoxia on neurofunctional recovery post brain ischemia in mice[J]. *J Mol Neurosci*: MN, 2015, 55(4):923
- [17] Zhu L L, Zhao T, Li H S, et al. Neurogenesis in the adult rat brain after intermittent hypoxia[J]. *Brain Res*, 2005, 1055(1/6):45
- [18] Tsai Y W, Yang Y R, Wang P S, et al. Intermittent hypoxia after transient focal ischemia induces hippocampal neurogenesis and c-Fos

- expression and reverses spatial memory deficits in rats [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e24001
- [19] Naidu A, Peters D M, Tan A Q, et al. Daily acute intermittent hypoxia to improve walking function in persons with subacute spinal cord injury: a randomized clinical trial study protocol [J]. *BMC Neurol*, 2020, 20(1): 273
- [20] Hassan A, Arnold B M, Caine S, et al. Acute intermittent hypoxia and rehabilitative training following cervical spinal injury alters neuronal hypoxia-and plasticity-associated protein expression [J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0197486
- [21] Cui L L, Golubczyk D, Jolkonen J. Top 3 behavioral tests in cell therapy studies after stroke: difficult to stop a moving train [J]. *Stroke*, 2017, 48(11): 3165
- [22] Ritzl A, Meisel S, Wittsack H J, et al. Development of brain infarct volume as assessed by magnetic resonance imaging (MRI): follow-up of diffusion-weighted MRI lesions [J]. *JMRI*, 2004, 20(2): 201
- [23] Tipirneni-Sajja A, Christensen S, Straka M, et al. Prediction of final infarct volume on subacute MRI by quantifying cerebral edema in ischemic stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37(8): 3077
- [24] Diekhorst L, Gómez-de Frutos M C, Laso-García F, et al. Mesenchymal stem cells from adipose tissue do not improve functional recovery after ischemic stroke in hypertensive rats [J]. *Stroke*, 2020, 51: 342
- [25] Yang C J, DeMars K M, Alexander J C, et al. Sustained neurological recovery after stroke in aged rats treated with a novel prostacyclin analog [J]. *Stroke*, 2017, 48: 1948
- [26] Kim Y, Kim Y S, Kim H Y, et al. Early treatment with poly(ADP-Ribose) polymerase-1 inhibitor (JPI-289) reduces infarct volume and improves long-term behavior in an animal model of ischemic stroke [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(9): 7153
- [27] Carling D. AMPK signalling in health and disease [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 45: 31
- [28] Jiang S, Li T, Ji T, et al. AMPK: potential therapeutic target for ischemic stroke [J]. *Theranostics*, 2018, 8(16): 4535
- [29] Thomas A, Belaidi E, Moulin S, et al. Chronic intermittent hypoxia impairs insulin sensitivity but improves whole-body glucose tolerance by activating skeletal muscle AMPK [J]. *Diabetes*, 2017, 66(12): 2942
- [30] Perim R R, Fields D P, Mitchell G S. Spinal AMP kinase activity differentially regulates phrenic motor plasticity [J]. *J Appl Physiol*, 2020, 128(3): 523
- [31] Toyama E Q, Herzig S, Courchet J, et al. Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress [J]. *Science*, 2016, 351(6270): 275
- [32] Yu J, Li X, Matei N, et al. Ezetimibe, a NPC1L1 inhibitor, attenuates neuronal apoptosis through AMPK dependent autophagy activation after MCAO in rats [J]. *Exp Neurol*, 2018, 307: 12
- [33] Yun C W, Lee J H, Lee S H. Hypoxia-induced PGC-1 α regulates mitochondrial function and tumorigenesis of colorectal cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(9): 4865
- [34] Wareski P, Vaarmann A, Choubey V, et al. PGC-1{alpha} and PGC-1{beta} regulate mitochondrial density in neurons [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(32): 21379
- [35] Yu K, Kuang S, Wang C, et al. Changes in mitochondria-associated protein expression and mitochondrial function in response to 2 weeks of enriched environment training after cerebral ischaemia-reperfusion injury [J]. *J Mol Neurosci*, 2020, 70(3): 413
- [36] Zhang Q, Liang X C. Effects of mitochondrial dysfunction via AMPK/PGC-1 α signal pathway on pathogenic mechanism of diabetic peripheral neuropathy and the protective effects of Chinese medicine [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(5): 386
- [37] Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige J N, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity [J]. *Nature*, 2009, 458(7241): 1056
- [38] Ashabi G, Khodagholi F, Khalaj L, et al. Activation of AMP-activated protein kinase by metformin protects against global cerebral ischemia in male rats: interference of AMPK/PGC-1 α pathway [J]. *Metab Brain Dis*, 2014, 29(1): 47
- [39] Chen C Y, Tsai Y L, Kao C L, et al. Effect of mild intermittent hypoxia on glucose tolerance, muscle morphology and AMPK-PGC-1 α signaling [J]. *Chin J Physiol*, 2010, 53(1): 62

(2020-11-24 收稿)

(上接第 221 页)

- [14] Kim J H, Liu X, Wang J, et al. Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases [J]. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2013, 5(1): 13
- [15] 肖启程, 严光文, 田一男, 等. Wnt 信号配体种类及其在骨代谢中的作用 [J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2018, 11(6): 613
- [16] Hii H P, Liao M H, Chen S J, et al. Distinct patterns of Wnt3a and Wnt5a signaling pathway in the lung from rats with endotoxin-shock [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e134492
- [17] Almeida M, Han L, Ambrogini E, et al. Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha increase oxidative stress and suppress Wnt protein signaling in osteoblasts [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(52): 44326
- [18] Gomathi K, Akshaya N, Srinath N, et al. Regulation of Runx2 by post-translational modifications in osteoblast differentiation [J]. *Life Sci*, 2020, 245: 117389
- [19] Komori T. Roles of Runx2 in skeletal development [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 962: 83
- [20] Xu M L, Bi C, Liu E, et al. Wnt3a induces the expression of acetylcholinesterase during osteoblast differentiation via the Runx2 transcription factor [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(30): 12667
- [21] 张晓晓, 李婧, 王俊妹, 等. 银杏叶提取物对成骨细胞分化的影响及相关机制研究 [J]. *口腔医学研究*, 2017, 33(5): 491
- [22] Komori T. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2 [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7): 1964

(2020-11-14 收稿)