

缺血性卒中病因学与发病机制研究的十年进展

王永亭 曾丽莉 吕海燕 袁法磊 谢博华 蔡蓓蓓 汤耀辉 管永靖 杨国源

【关键词】 脑缺血； 脑梗死； 综述

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2010.01.002

脑卒中是当前威胁人类健康的三大主要疾患之一,具有高发病、高致残及高致死性之特点,其中缺血性卒中发生率占 60%~80%。长期以来一直缺乏有效的治疗手段,给社会和家庭造成沉重的经济和心理负担。因此,明确缺血性卒中的危险因素、筛选高危人群、早期干预从而降低脑卒中发生率,显得尤为重要。近 10 年来,随着生物学技术和神经影像学领域的发展,新方法、新设备不断涌现,对缺血性卒中危险因素的认识取得了长足进步。随着对缺血性脑损伤的病理生理学机制研究的不断深入,越来越多的证据显示氧化应激、缺血性细胞坏死与凋亡、免疫应答与炎症反应、神经血管单元各组成成分之间的相互作用,以及基质金属蛋白酶(MMPs)等均在缺血性脑损伤中扮演着重要的角色。影像学技术是脑卒中诊断与治疗不可缺少的检查手段,现代影像学新技术能否提供缺血性卒中早期甚至超早期的诊断依据,或提供治疗及预后的判断依据,日益为人们所关注。本文将近年来在缺血性卒中病因学与发病机制方面取得的一些主要研究进展简述如下。

缺血性卒中的危险因素

一、不可干预的易患因素

1. 年龄、性别、种族因素 缺血性卒中发病率随着年龄的增长而呈指数上升,好发于 65 岁以上人群,40 岁以下较为少见。但近年来青年脑卒中发生率呈上升趋势,占全部脑卒中发病率的 5%~15%,主要与早发性动脉粥样硬化、动脉炎及血管发育异常等原因有关^[1],其中男性随着年龄的增长呈高发

趋势^[2],可能与雌激素水平有一定关系。雌激素可减少线粒体活性氧自由基的产生,增加内皮舒缩功能,介导血管新生和调节自主神经功能^[3]。非洲和亚洲人种较其他人种更容易发生脑卒中,且不同种族动脉粥样硬化斑块的好发部位有所不同,白种人多发生颅外血管狭窄,而非洲和亚洲人则以颅内血管狭窄为主^[4]。

2. 遗传因素 遗传因素在缺血性卒中发病中的重要作用一直是病因学研究的热点。统计学研究表明,同卵双生较异卵双生者缺血性卒中发生率高 65%,有家族史者发生风险增加 75%^[5]。从遗传学角度分析,脑卒中为一组多基因遗传性疾病,由多种危险因素叠加损害脑血管而发病。仅少数脑卒中是由单基因遗传缺陷所引起。(1)单基因缺血性卒中:①常染色体显性遗传性脑动脉病伴皮质下脑梗死和白质脑病(CADASIL)。为高外显率的单基因缺血性卒中中最常见的病因,是成年起病、累及小动脉的非淀粉样变性、非动脉粥样硬化性的遗传性脑血管病。主要病理表现为小动脉血管平滑肌细胞变性及电子致密颗粒性嗜银物质沉积于小动脉基膜,临床呈现反复发作的皮质下梗死、先兆偏头痛、进行性认知障碍和精神症状。其致病基因定位于 19 号染色体 p13 位点上,与 *Notch3* 基因突变有关。*Notch3* 基因主要编码血管平滑肌细胞和外膜细胞上的一种跨膜细胞表面受体蛋白,由一含 34 个表皮生长因子(EGF)样串联重复区域组成的细胞外部分和一包含跨膜区域的细胞内片段构成,主要功能是参与调节血管平滑肌细胞增殖、分化和凋亡^[6]。约 80% 的基因突变是由胞嘧啶(C)突变为胸腺嘧啶(T),使氨基酸序列中的精氨酸被半胱氨酸所替代,但至今仍未发现其基因型与表型间的确切关系^[7]。病理性 *Notch3* 受体蛋白的异常聚集可干扰平滑肌细胞的生长发育,导致小动脉壁变厚和纤维化,血

作者单位:200030 上海交通大学 Med-X 研究院,上海交通大学附属瑞金医院神经内科

通信作者:杨国源(Email:gyyangl@gmail.com)

管内皮生长因子(VEGF)分泌减少,血管内皮细胞损害,脑血流自动调节(CA)功能障碍,从而诱发脑卒中^[8-10]。目前,虽然已经成功地制备出CADASIL转基因小鼠模型,但其作用机制仍不十分清楚,据推测许多基因突变并不影响受体信号。究竟是介导的信号缺乏还是该蛋白细胞外片段不能被有效清除,或是Notch3蛋白胞饮作用被阻断等,众多假设均无最终定论^[11,12]。②镰状细胞病(SCD)。为儿童脑卒中的常见病因,是血红蛋白分子遗传缺陷造成的一组常染色体隐性遗传性疾病。基因突变使血红蛋白 β 链中N末端第6个氨基酸即谷氨酸被缬氨酸替代,形成异常血红蛋白S(hemoglobin S)。由于缬氨酸为非极性疏水,使血红蛋白溶解度下降,异常血红蛋白形成管状凝胶结构,红细胞扭曲成“镰刀状”而无法通过氧张力低的毛细血管,致血黏度增加,阻塞毛细血管引起局部组织器官缺血、缺氧,其结果是:脾大、胸腹疼痛,以及缺血性卒中等。若血红蛋白S为纯合子状态,即称为镰状细胞病。近年研究表明,镰状细胞病患者在20岁前脑卒中发生率分别为:美洲、非洲10%,欧洲4.10%,亚洲6.70%;无症状性脑梗死22%,且极易复发,复发率约为50%^[13,14]。主要累及大动脉,包括颈内动脉远端、大脑前动脉和大脑中动脉近端等,较常见梗死类型为分水岭梗死,亦可累及小动脉造成皮质下小梗死灶。大动脉和小血管均可累及的病理基础是“镰刀状”红细胞和血管内皮细胞之间的异常相互作用,前者黏附于血管内皮上诱发局部炎性反应增强,同时内膜增厚,纤维母细胞和平滑肌细胞增生,促进血栓形成、血管内阻塞。早期联合经颅多普勒超声检查可筛选脑卒中高危儿童,尽早通过输血治疗能够显著降低脑卒中发生率。但因输血的不良反应,目前采用羟基脲或针对该病发病机制的抗炎治疗正在研究之中^[15-17]。③Fabry病。为X-连锁隐性遗传性疾病,是青年脑卒中的主要病因之一。Rofls等^[18]对一组18~55岁原因不明的脑卒中患者进行基因检测,发现其中4.90%男性和2.40%女性存在 α -半乳糖苷酶基因突变。该病主要由染色体Xq22基因突变引起 α -半乳糖苷酶部分或完全缺乏,造成代谢底物三聚己糖神经酰胺不能分解,病理性堆积于血管壁、神经系统、心肌、肾脏、上皮组织、皮肤、眼睛等部位而致多脏器损害,既可影响大动脉,亦可累及小血管,多见于后循环脑梗死和白质病变。有研究表明,Fabry病与IL-6基因多态性、内皮

一氧化氮合成、V因子和Z蛋白也有一定关联性,但确切的机制尚有待进一步深入研究加以证实^[19]。早期筛选并尽早给予酶替代疗法,有一定治疗前景。(2)多基因缺血性卒中:近年来许多关于缺血性卒中的遗传学研究正在进行,通过全基因组连锁分析法、候选基因研究及全基因组关联研究,以期发现与缺血性卒中密切相关的独立危险因素。但是,由于缺血性卒中的复杂性,迄今仍缺乏定论。①全基因组连锁分析。Gretarsdottir等^[20]采用全基因组连锁分析方法,对冰岛100个有2~6例脑卒中患者的家系进行观察分析,发现位于染色体5q12区的磷酸二酯酶4D(PDE4D)基因变异与缺血性卒中相关。其主要作用为降解第二信使环磷酸腺苷(cAMP),而环磷酸腺苷在血管平滑肌细胞和巨噬细胞增生及动脉粥样硬化稳定斑块形成方面发挥重要作用。进一步分析PDE4D基因单核苷酸多态性(SNP)显示,PDE4D基因与心源性卒中和大动脉粥样硬化性卒中有关,尤其与动脉粥样硬化关系密切;存在SNP45(rs12188950)和微卫星AC008818-1异常时发生缺血性卒中的风险增加1.80倍^[21]。上述研究结果曾一度鼓舞人心,重燃对缺血性卒中独立遗传危险因素进行研究的信心。然而,后续的研究结果却令人感到遗憾:部分重复研究得到相反结果,即磷酸二酯酶4D与脑卒中无关^[21]。②候选基因研究。近10年来,已进行了数百个候选基因的研究,涉及多个作用机制范畴,而各项研究结果之间差异性较大,缺乏一致性肯定的候选基因^[22]。据2009年文献报道,不同脑卒中亚型可能有各自相关的基因,例如,9p21.3位点基因多态性与动脉粥样硬化性脑梗死相关^[23];4q25位点rs2200733-T与欧洲人群的心源性卒中有关^[24];一些新的与血管相关的候选基因还包括细胞周期相关基因CDKN2B、CDKN2A和ANRIL等。提示:按照脑卒中不同亚型分类进行基因学研究的重要性和必要性^[25]。③全基因组关联研究。随着基因组研究的深入,近年来人类正在进入全新的基因组医学时代。利用单核苷酸多态性高通量检测手段,从人类全基因组范围内的序列变异中筛选与疾病性状相关联的单核苷酸多态性,由于不受预先设定的候选基因的限制,除重复过去已经证实的关联信号外,还可以发现与疾病相关的新的候选基因。在缺血性卒中方面的全基因组关联研究甚少,2007年Matarín等^[26]首次发表了其研究结果,经过对249例缺血性卒中患者

和 268 名正常对照者超过 400×10^3 个单核苷酸多态性的检测,其初步结果并未发现有任何单个区域对缺血性卒中有明显作用,但那些筛选出的有意义的单核苷酸多态性大多定位在已知的热点候选基因位点处或邻近该位点^[26]。全基因组关联研究需要大样本观察,价格昂贵,在未来数年缺血性卒中的全基因组关联研究中可能需要更多的国际多中心组织参加。

二、可干预的易患因素

可干预的易患因素包括:高血压、糖尿病、高脂血症、代谢综合征、呼吸睡眠暂停综合征、心脏疾病(房颤、心肌梗死、瓣膜病、二尖瓣狭窄、卵圆孔未闭、心房心室扩大)、偏头痛、镰状细胞贫血、肌纤维发育不良、短暂性脑缺血发作、颈内动脉狭窄、高同型半胱氨酸血症、抗心磷脂抗体、高纤维蛋白原、蛋白 C 及蛋白 S 缺乏,以及不良生活方式(酗酒、吸烟、吸毒、肥胖、缺乏运动)、口服避孕药和抗凝药等。我们仅对两项近期关注较多的易患因素进行总结。

1. 代谢综合征 是一组由遗传因素和环境因素共同决定、伴有胰岛素抵抗的疾病总称,包括中心性肥胖、高血压、糖尿病、脂质代谢紊乱方面的异常。其患病率呈逐年升高趋势,约占人群的 25%,65 岁以上老年人患病率为 25%^[27];可能与老年人雄性激素水平下降、社会心理因素、遗传因素、生物学环境因素、肥胖、体力活动少、高碳水化合物食物等有关。多项研究表明,代谢综合征(MS)与脑卒中密切相关,代谢综合征患者发生脑卒中的风险比无代谢综合征者增加 3 倍,病死率增加 5~6 倍^[28],其中,高血压、高甘油三酯血症和低高密度脂蛋白血症均是脑卒中的危险因素^[29]。代谢综合征的病理学机制为胰岛素抵抗,即胰岛素的生理效应低于正常或组织对胰岛素敏感性降低,代偿性引起胰岛 B 细胞分泌胰岛素增加,导致高胰岛素血症。高胰岛素血症可通过多种途径造成机体高凝状态,如直接损伤血管内皮细胞,使内皮功能障碍,内膜下平滑肌细胞增生并向内膜迁徙,细胞内脂质沉积,炎性反应增强,凝血因子水平增加、纤溶减少,以及血小板活性增强等;还可引起糖、脂肪、蛋白质代谢紊乱而造成血管收缩、高血压、肥胖、血黏度升高等变化,从而促进动脉粥样硬化和脑卒中的发生^[30-32]。

2. 睡眠呼吸暂停综合征 系指各种原因导致的睡眠状态下反复出现的呼吸暂停和(或)通气不足,

引起低氧血症和高碳酸血症,从而使机体发生一系列病理生理改变的临床综合征。近年研究发现,睡眠呼吸暂停综合征(SAHS)在中老年人群中的发病率女性为 5%,男性 15%,老年人群更为常见,是高血压和缺血性卒中的独立危险因素,缺血性卒中发生率随着睡眠呼吸暂停综合征的严重程度呈逐渐升高趋势^[33]。睡眠呼吸暂停综合征患者,因长期低氧而使脑血管化学感受器敏感性降低,血管扩张的储备能力减退,脑缺血易感性增强;反复呼吸暂停及低氧、高碳酸血症使压力和化学感受器受刺激,交感神经兴奋,儿茶酚胺、肾素-血管紧张素分泌增加,外周血管收缩导致血压升高,形成非“杓”性夜间睡眠血压曲线^[34-36]。同时,脑卒中患者尚伴有睡眠相关呼吸异常,加重缺血性脑损伤。50%以上的缺血性卒中患者和短暂性脑缺血发作患者都存在此现象,二者密切相关,相互影响,形成恶性循环。近 10 年来,缺血性卒中易患因素及其作用机制研究一直备受关注,但真正将研究结果应用于临床预防中仍十分缺乏。将以上研究结果与临床密切结合,早期筛选出缺血性卒中的高危人群,并早期进行干预实行一级预防是我们未来需要积极开展的工作,具有深远的社会意义。

脑缺血与细胞死亡

一、缺血性细胞坏死

1. 细胞坏死因素 大多数脑缺血造成的细胞坏死与能量缺失或细胞 ATP 合成代谢水平的急速降低有关,即 ATP 合成减少或消耗过量^[37]。缺血性脑损伤是由血流停止导致的缺血核心区域葡萄糖、氧和生长因子丢失而引起的。脑缺血时,葡萄糖和氧丢失导致线粒体 ATP 合成代谢显著下降,继而造成各种蛋白质功能障碍,包括钠-钾-ATP 酶和钙-镁-ATP 酶功能丧失^[38]。有效的葡萄糖供应可能是阻止神经元损伤级联反应的机制之一,但皮质神经元细胞膜葡萄糖转运蛋白(GLUT)1/4 在无血清或低氧、低糖应激条件下过度内陷,将导致葡萄糖运输显著减少^[39],这可能与缺血诱导的核心区域生长因子缺乏有关^[40]。缺血所诱导的活性氧的产生和随后的线粒体膜损伤,也是线粒体 ATP 合成减少的原因^[41]。因为 ATP 的减少影响了钠-钾-ATP 酶的活性,故推测这一机制启动了细胞坏死途径。钠-钾-ATP 酶活性降低造成的细胞内钠离子聚集,可破坏

渗透压平衡和质膜,因此,可通过恢复 GLUT 外突和增加细胞 ATP 合成代谢或抑制 ATP 的快速减少来阻止细胞坏死。

2. 细胞坏死的实验模型 为了寻找抑制细胞坏死的方法,目前采用无血清和低细胞密度培养方法构建单纯神经元坏死离体模型^[42]。其皮质神经元取自大鼠胚胎 17 d 的脑组织,以 $0.1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 细胞密度接种于多聚鸟氨酸覆盖的培养皿中,经无血清培养 6 h,扫描电子显微镜分析发现神经元表面有许多微孔^[39],透射电子显微镜可观察到典型的细胞坏死的特征性表现:细胞膜破坏,胞质电子密度丢失和线粒体肿胀;培养至 12 h 细胞膜大部分破坏,仅细胞核无变化。细胞坏死可以通过碘化丙啶(PI)染色阳性和活化弹性蛋白酶-3 阴性信号进一步加以证实。局灶性脑缺血后,邻近缺血区神经元快速坏死,且最初缺血核心区的神经元死亡是不可逆的,因此,阻止邻近缺血核心区神经元发生二次坏死是至关重要的。造成神经元二次坏死的原因可能与一些轻度缺血或来源于多种死亡细胞毒性分子有关。由于确定造成二次坏死的特异性分子十分困难,故可采用轻度缺血-再灌注模型产生缺血诱导的晚期神经元轻度坏死。神经元经低糖、低氧平衡盐溶液培养 2 h,再以常规含血清培养基再灌注,继续进行低密度细胞培养^[39],结果显示,60% 以上的皮质神经元于血清再灌注后 3 h 呈现典型坏死,而其他神经元可存活至少 12 h,然而,极少甚至不出现核碎裂或固缩性凋亡。

3. 细胞坏死抑制因子胸腺素原 胸腺素原(ProT α)可在缺血应激时发挥神经保护作用。药理学研究显示,重组胸腺素原活性是通过磷脂酶 C(PLC)和蛋白激酶 C β (PKC β)活化介导的^[39]。无血清培养状态时,皮质神经元 ATP 和脱氧-D-葡萄糖含量迅速降低,缺血-再灌注应激后二者摄取量也迅速降低,而胸腺素原可显著改善上述情况。细胞免疫组织化学研究表明,低氧、低糖应激反应可抑制 GLUT1/4 的膜转运,但这一作用可被胸腺素原所逆转。药理学研究发现,胸腺素原可通过对百日咳毒素敏感的抑制性 G 蛋白 α 亚基、磷脂酶 C 和蛋白激酶 C β II 机制逆转 GLUT1/4 内陷^[43]。Ueda 等^[39]的研究结果提示,加入抗胸腺素原免疫球蛋白(IgG)能够完全逆转来自高细胞密度和无血清培养的神经元条件培养基诱导的细胞从坏死到凋亡形式的转换。

二、缺血诱导的细胞凋亡

1. 凋亡诱导因子 是位于线粒体的黄素蛋白(Fp),具有还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)氧化酶活性,并通过核基因编码。从线粒体易位至核的凋亡诱导因子(AIF)不依赖半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspases)活性即可诱导 DNA 裂解和细胞凋亡^[44]。中枢神经系统损伤如全脑缺血、局灶性脑缺血和新生儿缺氧缺血时,均可发生凋亡诱导因子易位^[45,46]。局灶性脑缺血的最初数小时,缺血半暗带区凋亡诱导因子即可从线粒体易位至核,导致 DNA 损伤和凋亡、核固缩。由于线粒体释放的凋亡诱导因子早于细胞色素 C,故认为凋亡诱导因子所介导的细胞凋亡不依赖于 Caspases 活性^[47]。用于鞘内注射的苯氧羰基缬-丙-天冬氨酸-(O-甲基)-氟甲基酮为 Caspases 抑制剂,可阻止 Caspases 介导的胞衬蛋白(fodrin)降解,但不能明显抑制缺氧缺血脑损伤情况下凋亡诱导因子从线粒体释放^[48]。对离体细胞死亡模型的研究亦发现,无论是采用药物抑制 Caspases 活性还是敲除凋亡蛋白激酶激活因子-1(Apaf-1)或 caspase-9 基因,对线粒体-核易位凋亡诱导因子均无影响^[49]。而以单纯疱疹病毒作为载体将 bcl-2 基因转染至梗死灶周围组织,不仅可阻止凋亡诱导因子易位,还能够增加局灶性缺血后皮质神经元存活^[50]。提示:凋亡诱导因子可在不依赖 Caspases 的情况下从线粒体释放,参与脑缺血后的细胞死亡信号途径。实验性脑缺血模型研究业已证实,经 RNA 干扰培养的神经元或 harlequin 基因突变小鼠,其凋亡诱导因子蛋白表达水平下降,神经元死亡明显减少^[51]。因此,不依赖 Caspases 激发的细胞死亡信号有可能成为脑缺血治疗的新靶点。然而,脑缺血后凋亡诱导因子介导的神经元死亡的确切机制至今尚未阐明,可能与药物抑制或基因敲除阻止凋亡诱导因子易位至核的基因多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶-1(PARP-1)有关,活化型 PARP-1 是凋亡诱导因子介导不依赖于 Caspases 凋亡途径的关键步骤^[52],表明 PARP-1/AIF 途径在介导缺氧缺血后的细胞凋亡方面发挥重要作用^[53]。

2. 凋亡信号途径 神经元凋亡的主要信号途径分为外在途径和内在途径。(1)外在途径——死亡受体介导的神经元凋亡:死亡受体属于肿瘤坏死因子受体超家族,在局灶性脑缺血后提高死亡受体表达水平,可诱导死亡诱导信号复合体(DISC)的组装

和 Caspase-8 前体 (procaspase-8) 活化^[54]。(2) 内在途径: ① 线粒体介导的神经元凋亡。线粒体是否参与神经元凋亡途径取决于损伤的严重性或信号途径的特性。严重的缺血性脑损伤可导致线粒体 ATP 合成障碍, 诱导神经元坏死^[55]; 死亡刺激使线粒体通透性增加, 细胞色素 C、Caspase-9 前体和 Apaf-1 从细胞膜内释放。无论短暂性还是永久性脑缺血后均可观察到细胞色素 C 从线粒体释放至胞质, 进一步证明了线粒体介导的神经元凋亡途径^[56]。Caspase-3 可能是缺血神经元核降解的主要作用分子, 抑制 Caspase-3 样活化可减少脱氧核糖核酸酶活性, 防止 DNA 断裂^[57]。另外, 过表达超氧化物歧化酶 1 (SOD1) 通过减少线粒体释放细胞色素 C 和第二信使半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶激活物 (Smac), 抑制 Caspases 活化、减少凋亡以保护神经元免受缺血性损伤^[58]。因此推测, Caspases 活化的线粒体途径可能在缺血后的神经元凋亡中发挥重要作用。Bcl-2 家族蛋白通过调节线粒体膜通透性在细胞内凋亡信号转导方面发挥关键作用。脑缺血后细胞质内的 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 快速易位至线粒体, 与线粒体腺嘌呤核苷酸转位分子及电压依赖阴离子通道相互作用。促凋亡蛋白 Bad 也在调节脑缺血细胞死亡和存活方面发挥重要作用, 凋亡发生时, Bad 发生去磷酸化, 从分子伴侣 14-3-3 分离并易位至线粒体外膜, 与 Bcl-xL 聚合, 促进线粒体细胞色素 C 的释放^[59]。这些级联反应也可见于大脑中动脉阻塞模型^[60]。脑缺血导致的内质网功能障碍可能在神经元死亡的病理过程中发挥主要作用^[61]。在内质网腔聚集的未折叠蛋白、eIF2 α 磷酸化、蛋白质合成抑制、内质网储存钙离子耗竭、CHOP/GADD153 激活, 以及 Caspase-12 活化等, 均提示内质网在脑缺血后神经元死亡信号中占有重要地位^[62-65]。然而, 内质网介导脑缺血细胞死亡信号的确切机制尚不完全清楚。② 其他内在凋亡调节。包括钙蛋白酶 (calpain), p53 介导凋亡、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 介导凋亡 (ERK、c-Jun、p38 途径) 均参与细胞凋亡的内在途径。钙蛋白酶属于半胱氨酸蛋白酶家族, 可能与 Caspases 一起参与介导急性和慢性神经元死亡^[66]; 可能还参与 Caspase-12 前体裂解和 Bcl-xL 环化, 将抗凋亡蛋白 Bcl-xL 转化为凋亡前因子。据认为, 由钙离子介导的钙蛋白酶活化和 Caspases 激活与神经元凋亡有关^[67]。有研究显示,

p53 在神经损伤后调节细胞凋亡, 例如大脑中动脉阻塞^[68]。p53 诱导细胞死亡的神经元在转录和翻译水平上调 Apaf-1 表达水平, 提示 Apaf-1 为神经损伤后 p53 转录的重要靶点^[69]。另一方面, 在有缺陷的人脑血管内皮, 活化的蛋白激酶 C 通过阻止 p53 介导的细胞凋亡而实现神经保护作用^[70]。因此, 可以认为线粒体 p53 途径可能是脑缺血后介导神经元发生凋亡的新机制^[71]。

3. 凋亡信号途径的调节 (1) Caspases: 迄今为止, 已经获知 14 种哺乳动物的 Caspases, 其中至少有 8 种参与凋亡过程^[72]。两种与凋亡直接相关者为起始因子如 Caspase-8~10; 操纵因子如 Caspase-3 和 7。大量证据提示, 脑缺血可导致 Caspases 活化, 如局灶性和全脑缺血动物模型研究发现, 神经元发生死亡前 Caspase-3 表达水平提高, 活性增强^[73-76]。永久性动脉粥样硬化性脑血管栓形成数小时后即可观察到 Caspase-3 前体表达水平升高, 而心脏停搏-再灌注需数天方可检测到活化的 Caspase-3 和裂解的 PARP, 故认为 Caspase-3 可能参与了人迟发性神经元死亡^[77]。(2) 年龄对 Caspases 介导凋亡的影响: 在发育期和衰退期 Caspase-3、Apaf-1 和 Bax 表达水平均显著降低^[78]; 脑缺氧缺血时, 不成熟脑组织中的 Caspase-3 表达水平迅速升高而成熟脑组织仅轻度升高^[78, 79], 提示可能存在其他不依赖 Caspases 的神经元凋亡途径, 如凋亡诱导因子。(3) Bcl-2 蛋白家族: 包括抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xL 等, 凋亡前体蛋白 Bax、Bak 和 Bad 等。Bcl-2 和 Bcl-xL 位于线粒体外膜并结合于内质网和核周膜^[80]。对啮齿类动物的脑卒中模型研究显示, 缺血后 Bcl-2 蛋白家族成员表达发生改变, 梗死灶核心区和缺血半暗带区 Bax 表达水平升高, Bcl-2 和 Bcl-w 表达水平降低^[81]; 缺血区 Bcl-2、Bcl-xL 或 Bcl-w 表达水平升高则反映存活神经元对缺血损伤的适应性^[82]。另外, Bag-1 和 Bcl-2 高表达及 Bax 和 Bid 缺陷, 可缓解缺血诱导的脑损伤^[81, 83, 84]。这些证据表明, 针对 Bcl-2 家族蛋白的治疗策略可能有效。

4. 凋亡抑制蛋白 凋亡抑制蛋白 (IAP) 家族成员包括细胞凋亡抑制蛋白 1 (cIAP1)、细胞凋亡抑制蛋白 2 (cIAP2)、X 连锁凋亡抑制蛋白 (XIAP)、神经凋亡抑制蛋白 (NAIP)、存活素 (survivin) 和 livin。其中 X 连锁凋亡抑制蛋白最能体现在体和离体情况直接抑制 Caspases 的作用^[85]。凋亡抑制蛋白在神经

系统的表达机制和功能尚不完全清楚。已有的资料表明,凋亡抑制蛋白家族可在多种神经病理情况(包括缺血缺氧)下调节细胞凋亡,如腺病毒介导的 X 连锁凋亡抑制蛋白过表达能够抑制黑质和小脑颗粒细胞发生凋亡^[86]。X 连锁凋亡抑制蛋白阳性细胞数目在缺血缺氧 6、12 和 24 h 后的海马 CA1 区显著增加,而在缺血缺氧 12 和 24 h 检测时 X 连锁凋亡抑制蛋白阳性细胞仅轻度增加^[87]。在哺乳动物,凋亡抑制蛋白的活性可被 Smac/Diablo、Omi/HtrA2 和 GSPT1/eRF3 抑制。正常情况下,这些蛋白质均位于线粒体,当神经元发生凋亡时则释放至细胞质^[85]。Saito 等^[88]报告,X 连锁凋亡抑制蛋白途径可被下游的 Caspases 级联反应激活,也可被 Smac/Diablo 失活,而 Caspases 是缺血神经元凋亡的重要调节因子。X 连锁凋亡抑制蛋白相关因子 1(XAF1)为一新发现的 X 连锁抑制因子,能够直接拮抗内源性 X 连锁凋亡抑制蛋白,正常情况下呈低表达,局灶性脑缺血后 XAF1 表达水平升高,诱发 X 连锁凋亡抑制蛋白从胞质到胞核的再分布^[89]。推测:在缺氧缺血级联反应的早期,仅缺血半暗带区细胞核表达 X 连锁凋亡抑制蛋白及其相关因子 1,而且二者似乎是决定缺血损伤后细胞命运的关键因素^[90]。

三、缺血与细胞自噬

1. 细胞自噬 自噬是细胞内溶酶体介导的分解代谢过程,与大量降解、损伤或功能障碍的胞质成分包括亚细胞器的循环有关^[91]。自体吞噬体为双膜胞质囊泡,吞噬多种细胞内成分如胞质细胞器。自体吞噬体融合至溶酶体成为自噬性溶酶体,其水解酶消化分离细胞成分。自体吞噬体和自噬性溶酶体在大分子自发吞噬作用中形成,通常称为自噬。可于超微结构水平观察到细胞内包括内质网、线粒体和溶酶体水解酶片段的双膜空泡^[92]。自噬被认为既能保护细胞免遭凋亡亦可促进细胞死亡,此过程包括两项主要功能:其一,自噬是营养或氨基酸缺乏情况下的短期应激反应,通过溶酶体降解自身胞质成分,细胞获得能量代谢和重要蛋白质的合成底物,因此可能对细胞存活有益;其二,为自噬细胞死亡中的作用。自噬为一多级过程,由 Atg 基因调节。微管相关蛋白 1 轻链 3 β (MAP1LC3B,简称 LC3),为 Atg8 在哺乳动物的同源体,它在自噬作用中发生脂化,这一脂化形式为自噬空泡的标志蛋白。其他自噬蛋白包括 Atg7 和 Atg3,既辅助 LC3 脂

化也辅助 Atg5 和 Atg12 之间结合^[93]。目前,已经成功构建了 Atg7 和 Atg5 自噬基因缺陷小鼠,小鼠由于缺少自噬基因,可出现神经变性症状^[94]。自噬在结构蛋白质转换方面的重要性,由此可见一斑。

2. 缺血引起的细胞自噬 脑缺血过程中存在自噬,但确切的作用机制尚未明确。据推测,氧化和内质网应激在脑缺氧缺血过程中刺激神经元发生自噬。由于神经元自体吞噬体半衰期短且 LC3 蛋白碎片通过自噬性溶酶体降解,使脑组织中的 LC3-II 数目减少而自噬持续存在^[95]。因此,自噬作用是神经元死亡和存活的重要调节剂,与坏死和凋亡相互作用决定神经元的最终转归和形态。而且,缺氧缺血后脑组织 LC3-II 表达水平升高亦支持自噬存在之理论^[78]。晚近报道,脑缺血后皮质和纹状体自噬基因 *Beclin1* 表达水平急剧升高^[96],其在半暗带区的早期改变出现于缺血后 6 h,于 24 h 达峰值水平且可持续约 2 d。研究显示,多数 *Beclin1* 呈高表达的细胞也同时表达脂质结合形式的 LC3^[97],是否与自噬细胞死亡有关尚未可知。另一个可能参与神经元自噬的细胞死亡调节基因是 *BNIP3*,它编码的 Bcl-2/腺病毒 E1B 19 $\times 10^3$ 相互作用蛋白 3(BNIP3)可促进细胞凋亡^[98]。BNIP3 的 C 末端转膜域是其促进神经元凋亡所必需的。BNIP3 本身并不诱导 Caspases 依赖性神经元凋亡,但参与一些自噬细胞凋亡^[99],包括缺血性心肌细胞的凋亡^[100]。*BNIP3* 基因缺失可保护缺血损伤和维持线粒体完整^[101]。BNIP3 可诱导线粒体网络发生广泛性裂解且增加心肌细胞自噬,激发保护应激反应,去除受损伤的线粒体^[100]。脑缺血是否存在同样的机制,或 BNIP3 激发诱导的自噬参与神经元凋亡的机制,尚不十分清楚。因此,有关自噬调节神经元存活或死亡的研究,可能有助于发现治疗脑缺血的新手段^[102]。

缺血性脑损伤与氧化应激

诸多因素在缺血-再灌注损伤过程中起作用,而其中最为重要的因素即产生大量活性氧自由基(ROS)^[103,104]。氧化应激是体内氧化和抗氧化作用失衡导致的细胞还原电位大幅度下降的过程,脑缺血和缺血-再灌注过程中由于产生大量的氧自由基而诱发氧化应激^[105]。在氧化应激过程中,产生氧自由基的速率超过了细胞自身酶的解毒能力,例如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽

过氧化物酶(GSH-Px),以及一些非酶类抗氧化物质如维生素E、维生素C和谷胱甘肽等,从而破坏了细胞的蛋白质、DNA和脂质结构^[8]。活性氧基团如超氧阴离子(O_2^-)、游离羟基(OH^-)、过氧化氢(H_2O_2)、一氧化氮(NO)和过氧亚硝基($ONOO^-$)等均为氧化应激的主要分子。缺血-再灌注后,缺血中心区域氧自由基明显高于缺血半暗带区^[106]。首先,线粒体大量产生氧自由基,随着线粒体的去极化其水平逐渐下降;第二阶段,ATP代谢产物激活黄嘌呤氧化酶产生氧自由基,并伴随镁离子增加;第三阶段,缺血-再灌注期还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH,还原型辅酶Ⅱ)氧化酶产生氧自由基,此过程依赖钙离子的参与,表明钙离子增加可激活NADPH氧化酶^[41]。

一、缺血后促损伤酶

1. 一氧化氮合酶 在人体,一氧化氮合酶(NOS)利用精氨酸、氧气和NADPH产生一氧化氮,并在缺血-再灌注损伤过程中起重要作用^[103]。一氧化氮可以直接或通过衍生物间接抑制线粒体电子传递链,引起细胞能量危机和DNA损伤,导致DNA合成障碍和神经元死亡^[107],同时增强缺血后兴奋性氨基酸——谷氨酸的释放,加重缺血后脑损伤^[108]。脑组织共存在3种一氧化氮合酶,分别是位于神经元中的神经元型一氧化氮合酶(nNOS);位于小胶质细胞、星形胶质细胞等可于特定条件下诱导产生的诱导型一氧化氮合酶(iNOS);以及位于脑血管内皮细胞中的内皮型一氧化氮合酶(eNOS)。nNOS和iNOS导致中枢神经系统损伤,而eNOS则增加缺血半暗带区血流量,促进血管新生^[109]。eNOS的神经保护作用可能源自一氧化氮的血管扩张作用。含有nNOS的神经元,其自身即具有抵抗缺血损伤的能力,但从这些神经元释放的一氧化氮可杀死不含nNOS的神经元^[110]。nNOS敲除小鼠永久性局灶性脑缺血后,其梗死灶范围较正常小鼠缩小40%,短暂性脑缺血发作后则缩小更明显^[111,112]。nNOS同时还参与激活缺血皮质基质金属蛋白酶-9(MMP-9),导致炎症反应。缺血早期一氧化氮水平的升高与缺血-再灌注时细胞外兴奋性氨基酸水平升高、钙离子内流激活结构型一氧化氮合酶(nNOS和eNOS)密切相关,而缺血后期一氧化氮水平的升高则由iNOS所致^[113]。对缺血-再灌注损伤脑组织进行检测显示,缺血-再灌注1h肿瘤坏死因子- α 表达水平即升

高,24h后再次升高^[114],该因子可通过核因子- κ B(NF- κ B)诱导iNOS表达,核因子- κ B在正常情况下与其抑制蛋白(I κ B)结合,而肿瘤坏死因子- α 可导致核因子- κ B抑制蛋白磷酸化,释放核因子- κ B、启动iNOS等相关基因^[115]。体外细胞培养证实,在缺血、缺糖条件下,诱导iNOS合成一氧化氮并通过诱导神经元凋亡杀死内皮细胞,一氧化氮进而提高缺血脑组织中环氧合酶-2(COX-2)活性,环氧合酶-2阳性神经元与iNOS阳性中性粒细胞的位置相邻近^[116];短暂性缺血可使N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)和磷脂酶A₂(PLA₂)激活,海马、缺血半暗带区神经元和内皮细胞环氧合酶-2水平呈短暂性升高^[117]。一氧化氮通过抑制白细胞和血小板功能而提高缺血-再灌注损伤组织的血液供应,发挥神经保护作用^[118]。对eNOS-/-小鼠进行观察发现,eNOS不仅是血管内皮生长因子诱导血管扩张的下游调节酶,而且还可调控脑源性神经营养因子(BDNF)的表达,影响神经细胞迁徙和神经突触的生长^[119]。

2. 过氧亚硝基 体内精氨酸或四氢生物蝶呤缺乏时,nNOS、iNOS和eNOS即产生超氧化物,与一氧化氮反应生成过氧亚硝基^[120];后者不仅消耗部分eNOS产生的有益的一氧化氮,还可诱导核因子- κ B介导的炎症反应前信号转导通路,提高人内皮细胞胞间黏附分子-1(ICAM-1)和P-选择素(P-selectin)的表达,参与IL-8的表达,降低中性粒细胞L-选择素(L-selectin)表达水平^[121]。过氧亚硝基还可导致DNA双链中的一条断裂,激活PARP-1,耗竭还原型辅酶Ⅱ,继而诱发神经元坏死。PARP-1刺激线粒体释放凋亡诱导因子,诱导与Caspases无关的神经元凋亡程序^[52]。PARP-1可介导多种转录因子,包括核因子- κ B、活化蛋白-1(AP-1)和p53等,p53为诱导线粒体凋亡的关键蛋白质,缺血过程中产生的氧自由基可激活p53,并进一步激活其下游的促凋亡蛋白Bax、Noxa、p53AIP1、PUMA和Bid,这些蛋白质直接作用于线粒体,释放细胞色素C,最终导致神经元死亡^[122]。因此,PARP-1过度激活被认为是短暂性局灶性缺血损伤的重要原因之一^[123]。

3. NADPH氧化酶 共有7种同工酶,均是氧自由基的重要来源^[124]。吞噬细胞吞噬泡中存在大量氧自由基,当缺血诱导的炎症反应发生时,这些细胞将氧自由基带到邻近的组织。线粒体是氧自由基的重要来源,RNA干扰技术表明,诸多条件下产

生的氧自由基均来源于 NADPH 氧化酶而非线粒体呼吸链^[125]。NADPH 氧化酶是 NMDA 受体激活后产生的超氧化物的主要来源^[126], 缺失 NADPH 氧化酶的其中一个亚基 NOX-2 后, 再行 NMDA 刺激则不增加氧自由基水平, 进一步证实 NOX-2 是 NADPH 氧化酶的活性部位^[127]。虽然目前相关文献报道较少, 但源自 NADPH 氧化酶的氧自由基对缺血脑组织的损伤, 值得关注。

4. 其他促损伤酶 其他重要的促损伤酶还有髓过氧化物酶(MPO)、黄嘌呤脱氢酶/黄嘌呤氧化酶、环氧合酶-2 等。髓过氧化物酶广泛存在于中性粒细胞中, 由氯离子和过氧化氢合成次氯酸, 髓过氧化物酶常用于检测脑卒中时的炎症反应^[128], 以及准确预测心肌梗死^[129]。脑缺血时, 氧化应激可激活 MMP-9 等炎症因子, 造成基质蛋白降解。黄嘌呤氧化酶在氧化次黄嘌呤为黄嘌呤的同时, 催化分子氧产生超氧阴离子和过氧化氢, 黄嘌呤脱氢酶转变为黄嘌呤氧化酶的过程被认为是再灌注早期氧自由基的来源^[130]。

二、缺血后抗氧化酶

有证据显示, 施用抗氧化酶可有效防止氧化应激反应^[131]。例如, 抗氧化剂可通过清除活性氧保护海马 CA1 区神经元免受缺血-再灌注损伤, 提示抗氧化剂可以通过血-脑屏障到达脑组织起到神经保护作用^[132]。从植物中萃取的天然抗氧化剂 EGB761 (银杏叶提取物) 和茶多酚, 对缺血-再灌注损伤具有显著保护效果。抗氧化酶分为超氧化物歧化酶、硫氧还蛋白(Trx)、MAPK、过氧化氢酶等。

1. 超氧化物歧化酶 超氧化物歧化酶可将超氧阴离子转换成过氧化氢, 并被过氧化氢酶或谷胱甘肽过氧化物酶分解为水。人体内存在三大类超氧化物歧化酶, 即存在于细胞质内的铜锌超氧化物歧化酶(Cu-InSOD, 又称 SOD1), 位于线粒体的锰超氧化物歧化酶(MnSOD, 又称 SOD2), 以及位于细胞间的细胞外超氧化物歧化酶(ECSOD, 又称 SOD3)。Kinouchi 等^[133]采用转基因小鼠研究 SOD1 在脑缺血病理机制中的作用, 结果显示, 转基因小鼠神经元所含 SOD1 为正常小鼠的 3.10 倍, 梗死灶范围缩小 35%。提示: 提高内源性超氧化物歧化酶活性可改善缺血性脑损伤, 超氧自由基对短暂性缺血性脑损伤和水肿具有重要的治疗作用。超氧化物歧化酶过表达可产生神经保护作用, 它与脑血流量变化无

关, 而与缺血脑组织中氧自由基表达水平的下降有关^[134]。Kawase 等^[135]通过对 SOD1 敲除小鼠的进一步观察, 证实 SOD1 表达水平降低时血管源性脑水肿范围显著增加, 提示脑缺血后产生的氧自由基可破坏血-脑屏障; 这一作用是通过激活基质金属蛋白酶实现的^[136]。抗氧化酶尚具有抗缺血-再灌注神经元凋亡的作用, 如过表达 SOD1 则可减少神经元凋亡数量^[137]。由于超氧化物歧化酶不能有效地到达靶部位, 使其不能有效地发挥治疗作用, 解决这一问题的途径是采用能够通过质膜 HIV-1 病毒 Tat 蛋白转导结构域(PTD)形成 TatSOD 融合蛋白, 后者对海马 CA1 区神经元具有保护作用^[138]。TatSOD 融合蛋白可通过静脉途径给药^[139], 为未来缺血性卒中的治疗提供了新的思路。同样, 过表达 SOD2 和 SOD3 也能够产生神经保护作用, 缺失则使损伤加重^[140]。然而, 动物实验结果显示, 过表达 SOD1 的转基因幼鼠缺血性脑损伤较为严重^[141], 推测可能与幼年和成年小鼠之间抗氧化系统不同有关, 幼年小鼠谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶活性较低, 因此, 当过表达 SOD1 时会造成体内过氧化氢蓄积, 使脑损伤加重。

2. 硫氧还蛋白 硫氧还蛋白 1(Trx1)能够还原其他蛋白质的二硫键。最近的实验研究结果揭示了该蛋白质在缺血后脑组织中的作用^[142], 过量表达人类 *Trx1* 的转基因小鼠具备抗氧化应激能力, 寿命延长^[143]。与野生型相比较, 该转基因小鼠缺血 1 h, 体内蛋白羰基化合物(蛋白质被氧化标志物)表达水平下降, 表明 Trx1 具有神经保护作用^[144]。

三、氧化应激的信号转导通路

MAPK 家族成员在神经元再生、存活和死亡中起重要作用, 天然抗氧化剂可以在多个基因位点与 MAPK 途径相互作用。采用低浓度的天然抗氧化剂对内皮细胞进行预处理可以保护氧化修饰低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的皮质神经元发生凋亡; 但是, 内皮细胞预处理并不能改善氧化修饰低密度脂蛋白造成的细胞内氧化应激状态, 仅是抑制了 c-Jun 氨基端激酶(JNK)、c-Jun 和 Caspases 等促凋亡因子的活化^[145]。4-甲基-内皮细胞为内皮细胞的体内代谢物, 其抗氧化能力不足内皮细胞的一半, 但却具有与内皮细胞相当的对氧化修饰低密度脂蛋白所致损伤的保护作用。上述研究首次发现, 内皮细胞参与神经元在氧化应激状态下的 MAPK 信号转导途

径,并证明内皮细胞的神经保护作用并不依赖于其抗氧化能力。除了作用于 MAPK 家族外,天然抗氧化剂还可对 MAPK 信号转导途径下游发生调控,其中,儿茶素 B 环上的焦没食子酸及没食子酸基团对于抑制活化蛋白 1 活性具有重要作用,而且邻-3-羟基的作用大于没食子酸基团^[146]。由此可见,儿茶素的结构可影响它们与信号转导通路分子的作用,由于儿茶素的基本结构与一些信号转导通路抑制剂十分相似,如细胞外信号调节激酶(ERK)抑制剂 PD98059 和磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)抑制剂 LY294002。因此,推测儿茶素调节细胞氧化应激反应的靶点位置可与信号转导通路中的蛋白质直接作用,或直接影响细胞内钙平衡或线粒体通透性。氧自由基可通过以下途径诱发小胶质细胞活化:(1)增加核因子- κ B 含量,该因子为氧化-还原敏感性转译因子,从而介导小胶质细胞活化。(2)氧自由基引发的细胞坏死信号可以诱发细胞核外培养基释放高迁移率族蛋白 1(HMGB1),与晚期高级糖基化终末产物受体(RAGE)相结合诱发小胶质细胞活化。(3)氧自由基诱导星形胶质细胞表达细胞因子,导致小胶质细胞的活化。(4)核因子- κ B 可影响黏合细胞的转译过程,进而介导白细胞与内皮细胞发生相互作用。

四、茶多酚及其单体化合物

茶多酚及其单体化合物对 6-羟多巴胺(6-OHDA)诱导的神经元凋亡具有保护作用^[147]。例如,天然抗氧化剂大豆异黄酮和尼古丁对阿尔茨海默病的预防和治疗作用;山楂提取物可呈剂量依赖性降低缺血-再灌注过程中产生的活性氧自由基,减少脂质过氧化产物,提高脑匀浆抗氧化水平。同时,缺血-再灌注过程中一氧化氮终产物硝酸盐-亚硝酸盐水平升高,通过红细胞沉降率(ESR)检测可发现一氧化氮含量显著降低,而采用山楂提取物对实验动物进行预处理,可显著降低脑组织中硝酸盐-亚硝酸盐水平,提高生物可利用一氧化氮水平。推测山楂提取物可能是通过清除超氧阴离子的产生而提高一氧化氮水平。iNOS 与缺血-再灌注损伤后期发生的迟发性神经元死亡有关,但蛋白质印迹(Western blotting)和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)研究结果表明,经抗氧化剂预处理的实验动物可呈剂量依赖性肿瘤坏死因子- α 和核因子- κ B 水平降低,继而抑制 iNOS mRNA 表达水平,这可能是山

楂黄酮在缺血-再灌注损伤晚期产生脑组织保护作用的重要机制。透射电子显微镜观察显示,经山楂黄酮预处理的动物缺血-再灌注损伤后海马 CA1 区大锥体神经元存活数量显著增加,凋亡神经元减少,从而达到脑保护作用^[148]。

缺血性脑损伤与炎症反应

一、缺血性脑损伤时诱发的各种炎症因子

1. 细胞因子 为一组小分子糖蛋白,起细胞间信使作用,可提高细胞黏附分子表达水平。在脑组织中,不同类型神经元能够表达不同类型的细胞因子,如缺血性脑损伤时,小胶质细胞、星形胶质细胞、血管内皮细胞和神经元均能表达不同的细胞因子参与炎症反应,并包括外周细胞分泌的细胞因子如吞噬细胞、T 淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞等。目前,对细胞因子 IL-1 和 6、肿瘤坏死因子- α 和转化生长因子- β (TGF- β)研究较多且作用机制相对明确。(1)IL-1:有两种不同异形体,即 IL-1 α 和 IL-1 β ,IL-1 通过两种不同的受体起作用^[149]。IL-1 可诱导内皮细胞黏附分子表达,并促进中性粒细胞浸润;大脑中动脉闭塞小鼠腹腔注射重组 IL-1 β 后,脑水肿和梗死范围增加、白细胞浸润及脑缺血加重^[150]。而 IL-1 受体阻断剂基因高表达小鼠和 IL-1 转化酶基因敲除小鼠,缺血性脑损伤程度明显缓解。尽管目前对 IL-1 功能的认识已有较大提高,然而,对于调节 IL-1 活性的细胞内机制仍存在分歧,尚需进一步研究。近期的离体实验结果显示,IL-1 可激活神经胶质细胞和内皮细胞丝裂原活化蛋白激酶,包括细胞外信号调节激酶、JNK 和 p38 信号转导通路^[151];抑制细胞外信号调节激酶或 p38 活性即可降低 IL-1 表达。(2)IL-6:为另一种在缺血后呈高表达的细胞因子,其血浆水平升高预示神经系统受损,而且,由缺血诱导的 IL-6 表达水平升高可导致梗死灶范围扩大^[152]。但亦有文献报道,IL-6 具有缓解缺血性脑损伤之功效。IL-6 表达水平升高与缺血部位及缺血时程有关,其真正意义尚需进一步研究。(3)肿瘤坏死因子- α :为多功能细胞因子。有研究显示,大鼠脑缺血后 TNF- α mRNA 表达水平与 IL-1 和 IL-6 mRNA 同步升高^[153]。脑缺血发生后,肿瘤坏死因子- α 与其特异性受体 TNFR I (p55)和 TNFR II (p65)结合激活一系列蛋白质,包括蛋白激酶 C、酪氨酸激酶、MAPK、磷脂酶 A₂及卵磷脂-特异性磷脂酶 C^[154]。与

其他细胞因子相同,肿瘤坏死因子- α 信号转导通路中的第二阶段即核内转导,需激活数个转录因子,其中,转录因子核因子- κ B 与活化蛋白 1 从胞质转移至胞核,于核内激活细胞黏附分子及其他细胞因子的基因启动子^[155]。虽然,体内外研究均显示肿瘤坏死因子- α 与 MAPK 信号转导通路存在密切联系^[156],但其第二信使转导系统在缺血性脑损伤过程中的作用机制尚不明确。(4)转化生长因子:为多功能细胞因子,参与调控组织修复、疾病恢复等重要过程。啮齿类动物脑缺血 1~6 h 脑组织即可检测到呈高表达的转化生长因子- β ,并可持续 15 d^[157]。业已证实,于大鼠脑缺血半暗带区注射转化生长因子- β 可缩小梗死灶范围,但在脑的其他部位则不显示这一保护作用^[158]。

2. 趋化因子 主要指一类相对分子量较小的细胞因子,此类细胞因子在细胞信号转导和炎性细胞招募过程中的作用不可或缺。低分子量趋化因子能够引导白细胞穿越脑实质进入缺血区^[159],按照其化学结构两个氨基近端半胱氨酸残基之间是否连接氨基酸,分为两大家族,分别称为 C-X-C 趋化因子和 C-C 趋化因子^[160]。细菌脂多糖、IL-1 和肿瘤坏死因子等均可刺激趋化因子的产生和分泌。(1)单核细胞趋化蛋白-1:为化学诱导剂,其表达水平升高可增加脑缺血半暗带区的白细胞浸润。已知,急性缺血性卒中患者脑脊液中的单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)表达水平明显升高^[161]。离体 IL-1 和肿瘤坏死因子- α 可诱导 MCP-1 基因表达,表明缺血性脑损伤时 IL-1 和肿瘤坏死因子- α 能够诱导单核细胞趋化蛋白-1 的表达,已被实验性大鼠脑中动脉阻塞小鼠研究结果所证实,即单核细胞趋化蛋白-1 在缺血局部呈高表达^[162,163]。(2)巨噬细胞炎性蛋白-1:为 C-C 趋化因子家族成员,主要在脑缺血局部表达^[164]。巨噬细胞炎性蛋白-1(MIP-1)可吸引单核细胞和巨噬细胞,在炎性组织中调节上述细胞活性,其表达水平与单核细胞趋化蛋白-1 相平行^[164]。巨噬细胞炎性蛋白-1 阳性细胞分布与活性星形胶质细胞相似,单核细胞趋化蛋白-1 和巨噬细胞炎性蛋白-1 在颞叶缺血脑实质的表达部位与白细胞聚集部位相一致;可于脑缺血 24~72 h 检出多形核细胞,至 7~16 d 出现单核细胞和巨噬细胞浸润^[165]。(3)环氧合酶-1:脑缺血后,小胶质细胞和白细胞等可持续表达环氧合酶-1^[166]。环氧合酶-1 缺失小鼠对缺血的耐受性强

于正常小鼠^[167],而且,短暂性全脑缺血小鼠应用环氧合酶-1 抑制剂后海马区正常神经元数量显著增加^[168]。(4)基质细胞衍生因子:亦称 CXCL12 因子,是免疫细胞强有力的趋化因子。它可在不同细胞中表达,包括星形胶质细胞和神经元,并在缺氧和炎症过程中呈高表达^[169];血管内皮生长因子也可引起基质细胞衍生因子-1(SDF-1)高表达^[170,171]。基质细胞衍生因子-1 信号转导通路参与各种生理和病理过程,皮下注射可诱导白细胞渗透^[172]。在炎症动物模型中阻断 SDF-1/CXCR4 信号转导通路能够减轻白细胞浸润。除了白细胞招募作用,基质细胞衍生因子-1 在血管形成和重塑过程中亦发挥重要作用^[173]。而且,基质细胞衍生因子-1 表达水平升高也与糖尿病肾病和冠状动脉粥样硬化性疾病密切相关^[174]。由此推测,脑缺血时脑组织中基质细胞衍生因子-1 表达水平升高,异常 SDF-1/CXCR4 信号促进白细胞浸润和局部炎性反应。若基质细胞衍生因子-1 参与了缺血性脑损伤的病理生理过程,它将是缺血性卒中的临床治疗靶点,已经证实部分 SDF-1 信号转导通路阻断剂对缺血性卒中有效^[175]。

3. 细胞间黏附分子 正常状态下,神经元不表达细胞间黏附分子(ICAM),而在脑缺血或炎症过程中细胞因子可提高细胞间黏附分子表达水平^[176]。细胞间黏附分子共分为 3 类,包括选择素(selectin)、免疫球蛋白(IgG)和整合素(integrin)。动物实验证实,啮齿类动物发生局部脑缺血后,微血管中的内皮细胞白细胞黏附分子(ELAM)和白细胞 P-选择素表达水平升高^[177]。(1)选择素:脑缺血后,梗死灶周围组织、血管内皮细胞和白细胞的相互作用,是通过 L-选择素、E-选择素(E-selectin)和 P-选择素这 3 种糖蛋白进行的。而由选择素介导的瞬时信号又可诱发细胞间黏附分子聚集,促进白细胞募集并黏附于血管壁,导致血管内皮细胞发生形态改变,易于血栓形成。(2)整合素:是目前研究最为广泛的一组细胞黏附分子。内皮细胞与胞外分子,如层黏连蛋白和胶原蛋白等之间的通讯是通过位于细胞膜上的整合素完成的,血-脑屏障由内皮细胞、星形胶质细胞和基膜共同建立,而它们之间的联系和通讯则通过整合素进行^[178],因此,整合素过表达可严重破坏血-脑屏障的结构与功能。在正常生理状态下,整合素 $\alpha_6\beta_4$ 可介导星形胶质细胞和细胞外基质的相互作用,而短暂性局部脑缺血时其相互作用会受到

严重破坏^[179]。另外,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 是具有 3 个重要的氨基酸残基即精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列的分子共同受体,短暂性脑缺血 2 h 即可于基底神经节微血管中检测到其表达^[180]。当整合素 $\alpha_v\beta_3$ 与配体分子连接后,其胞内的功能域将得到修饰、构象发生变化,从而引起细胞骨架和细胞形态的改变,最终发生细胞迁徙。

4. 其他 在缺血性脑损伤的免疫应答和炎症反应过程中,还有其他分子参与。对这些分子进行研究有助于更好地理解炎症反应的机制。内皮发育蛋白-1(Del-1)为胚胎血管发育期间内皮细胞表达的一种相对分子质量为 52×10^3 的基质蛋白^[181],出生时停止表达,至成年正常脑组织亦不再表达。然而,经研究发现,在人类肿瘤细胞和出血的肌肉组织中该蛋白重新表达,提示它在血管新生中发挥重要作用^[182,183]。内皮发育蛋白-1 除了促进内皮细胞黏附和迁徙作用,还具有促进血管新生的功能,给予后肢^[183,184]和心脏^[185]缺血小鼠外源性内皮发育蛋白-1 后新生血管增加,血流加速,受损伤组织功能恢复,表明内皮发育蛋白-1 用于治疗缺血性脑损伤还可产生促血管新生的作用。以往的研究证实,内皮发育蛋白-1 受到缺氧或血管损伤刺激后参与血管新生和血管重建过程^[186]。最近的研究表明,来自内皮细胞的内皮发育蛋白-1 参与了炎症和免疫反应的多个方面,可减轻过度的炎症和免疫反应,白细胞黏附和浸润是炎症和免疫反应的中心步骤,内皮发育蛋白-1 通过干扰白细胞功能相关抗原-1 (LFA-1) 依赖的白细胞-内皮细胞相互作用而发挥作用,参与在体白细胞募集,后者可能通过白细胞功能相关抗原-1 与其主要配体细胞间黏附分子-1 之间的相互作用实现的^[187]。基于白细胞募集在脑缺血炎症反应过程中的重要作用,内皮发育蛋白-1 很有可能在针对缺血性脑损伤时抑制白细胞入侵新疗法的设计中,提供更为广阔的治疗前景。

二、缺血性脑损伤中炎症细胞因子的信号通路

脑缺血后细胞释放各种炎症细胞因子,并与相对应的受体进行结合,激活细胞内第二信使系统,例如:蛋白激酶、蛋白磷酸化酶等,进而激活下游的转录因子,达到调节基因表达之目的^[188]。

1. 活化蛋白激酶信号转导途径 MAPK 可使靶蛋白中的丝氨酸和苏氨酸残基发生磷酸化,激活下游蛋白质,从而达到调节基因表达、有丝分裂、代

谢,以及程序性死亡等多种细胞活动^[189]。哺乳动物细胞编码的 3 个主要丝裂原活化蛋白激酶亚家族包括:细胞外信号调节激酶、JNK/应激活化蛋白激酶(SAPK)和 p38 激酶^[190]。当大脑受到缺血刺激时,这 3 种激酶的信号转导可导致多种细胞反应。细胞外信号调节激酶 1/2(ERK 1/2)通过调节神经元分化和可塑性而影响其存活^[191];同时,ERK 1/2 的活化尚参与脑缺血动物模型神经元死亡过程。而 JNK 及 p38 激酶可能在调控缺血后神经元凋亡、参与细胞存活和炎症细胞因子信号转导等方面发挥重要作用。炎症细胞因子诱导 MAPK 途径激活,在蛋白激酶信号级联体系中发挥关键作用,MAPK 活性同时受到酪氨酸蛋白磷酸化酶、白细胞共同抗原(CD45)、蛋白质磷酸酶(PP2A)以及丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸化酶的调节^[192]。

2. 下游转录因子信号转导途径 炎症细胞因子信号转导的第二阶段是激活一系列转录因子。参与缺血性脑损伤的常见转录因子有核因子- κ B、活化蛋白和早期生长应答蛋白 1(EGR1),它们对早期的膜信号作出应答,并将信号传入细胞核,调节相应基因表达。核因子- κ B 是目前研究最为集中的转录因子,其表达广泛,调节与炎症反应相关的重要蛋白质的表达,例如细胞间黏附分子、单核细胞趋化蛋白-1 以及血栓调节蛋白。活化蛋白 1 分别为 Jun 和 Fos 蛋白家族中的蛋白质形成转录复合体,经活化后结合能力显著增强,可进一步调节多种基因的表达^[193]。

三、炎症细胞在缺血性脑损伤中的作用

在缺血性脑损伤的免疫应答和炎症反应过程中,血液中的白细胞和神经系统中的小胶质细胞是最活跃的炎症细胞,缺血性脑损伤后它们快速聚集,可诱发一系列炎症反应。

1. 白细胞浸润 脑缺血后 4~6 h 白细胞即聚集于血管壁,分 4 个阶段与血管内皮细胞相互作用,即内皮细胞活化、白细胞在血管壁上滚动、白细胞黏附于内皮细胞,以及白细胞穿越内皮细胞膜进入胞内;最终白细胞聚集于缺血局部组织,使更多的炎症细胞因子释放。许多炎症细胞因子和黏附分子参与了白细胞的浸润过程,而最早出现的白细胞为中性粒细胞,于脑缺血 6~12 h 即出现于受损脑组织区域,可持续存在 24 h^[194]。

2. 小胶质细胞 主要指存在于脑实质,并拥有

其他系统部分巨噬细胞特征的细胞,但其非活化或静息时特化的分支形态是其他系统巨噬细胞所不具备的。在正常成年人或动物大脑,小胶质细胞可表达免疫调节的重要细胞表面标志物,诸如组织相容性抗原类分子^[195]。然而,当中枢神经损伤时,分支状小胶质细胞形态可迅速变形为反应性或“阿米巴”样细胞,并快速上调多种受体和分泌物的表达水平,有助于防御脑损伤。有大量的调节因子参与了小胶质细胞的活化过程^[196]。神经元通过释放神经递质乙酰胆碱和去甲肾上腺素激活小胶质细胞,产生前炎性因子;小胶质细胞同时还表达烟碱受体 $\alpha 7$,后者可以降低小胶质细胞对前炎性因子的反应。脑缺血时凋亡神经元也可影响炎性细胞因子,若于缺血早期阻断小胶质细胞活化,则可减轻缺血性脑损伤。小胶质细胞产生的氧化应激和细胞因子可以影响脑缺血过程中的神经元存活率^[197]。一项神经元与小胶质细胞共培养研究结果显示,由淀粉样沉淀介导的小胶质细胞活化可调控淀粉样沉淀产生的神经毒性,提示小胶质细胞在神经元损伤中的重要性将会是今后的研究重点^[198]。

3. 星形胶质细胞 为中枢神经系统数量最多的细胞。活化的星形胶质细胞和小胶质细胞相似,均可产生多种炎性细胞因子,影响脑缺血后的炎症反应。星形胶质细胞通过分泌组织相容性复合物和刺激因子,引起 T 辅助淋巴细胞发生免疫应答,并抑制 IL-12 表达,但其病理学机制尚未阐明。S100B 为一重要的钙蛋白,主要在星形胶质细胞中表达,并分泌到细胞外,通过与小胶质细胞膜上的晚期糖基化终末产物受体相结合,活化小胶质细胞。小胶质细胞通过分泌细胞因子和氧自由基而影响星形胶质细胞活性。肿瘤坏死因子- α 等炎性细胞因子可以活化星形胶质细胞分泌的核因子- κB ,促进星形胶质细胞产生炎性细胞因子。尽管,星形胶质细胞的形态和功能与小胶质细胞不同,但二者在中枢神经系统免疫反应中发挥协同作用。随着免疫学领域研究方法的改进,对缺血性脑损伤后免疫应答和炎症反应的研究会进一步深入,而基于对缺血性脑损伤导致的炎症反应认识的加强,脑缺血过程中抗炎和免疫调节等治疗方法也将随之提高。

脑缺血时神经血管单元和血-脑屏障改变

一、脑缺血与神经血管单元的关系

1. 神经血管单元的概念及其意义 神经血管单元是 20 世纪末提出的缺血性脑损伤的概念模型,即将局部的神经血管和神经元之间的相互作用视为动态的结构复合体,主要包括内皮细胞、星形胶质细胞、周细胞(paracytes)、基膜、小胶质细胞、神经元及细胞外基质;神经元与血管通过星形胶质细胞发生信息交流^[199]。这一概念的提出,为神经元与其周围微血管之间通过星形胶质细胞的双向交流提供了框架。脑缺血时,局部血流主要依靠神经血管单元控制与调节,神经血管单元维持着神经元的正常生理功能,以及受损神经元和神经胶质细胞的激活。由于血管内皮细胞周围有星形胶质细胞终足的包绕,而这些细胞对神经元也有支持作用,因此,来自内皮细胞的信息可以通过星形胶质细胞传递到神经元。神经血管单元使血流减少或血流停止的机制尚不明确,其过程十分复杂,因为各神经血管单元之间通过共同享有的微血管以及树突相互连结。这也为脑灌注保护和双向交流创造了条件。微血管完整性的改变会影响神经血管单元和神经元功能^[200]。

2. 神经元和微血管之间的关系 微血管在脑血液循环中的结构分布顺应血流的动态学变化,或由器官的特性和所在解剖部位所决定。生长发育阶段,血管和神经元之间的相对位置为血管沿着基质生长^[201],毛细血管、内皮细胞、星形胶质细胞共同形成基膜屏障,内皮细胞紧密连结为屏障的一部分;内皮细胞与星形胶质细胞终足紧密相连则是屏障渗透性的必要条件^[202]。一般而言,毛细血管与距其最近的神元之间的距离约为 30 μm ^[203]。虽然,神经元与相邻微血管之间的距离并非恒定,但它们的排列很有规则且是可预测的。脑灰质供血动脉从软脑膜出发至脑白质边缘呈“六边”形排列,逐级递减,微血管的这些分支使血流可绕过基膜屏障前行。脑白质毛细血管的分布与轴突一致,但仅有约 10% 的毛细血管分布于灰质^[204]。目前,对于微血管分支在脑白质中的分布特点尚不十分清楚,但从局部脑血流分布来看,沟回处最低,而皮质最高,这种差异与毛细血管分布区域相一致。

3. 神经血管单元在缺血性卒中治疗中的临床价值 “神经血管单元”的提出,使缺血性卒中所导致的神元的不可逆性损伤被视为大脑所有细胞和基质成分均参与的组织损伤的过程,缺血不仅损伤

神经元且累及神经元支持系统的星形胶质细胞及其他胶质细胞,以及起信号传递作用的神经元轴突和为神经组织供血供氧的微血管^[200]。过去的 20 年中,人类经过努力探索,提出了两种治疗缺血性卒中的可行方案即:神经保护治疗和抗血栓治疗。例如 NMDA 受体阻断剂(胞二磷胆碱)、氧自由基清除剂(替拉扎特甲磺酰基)、抗炎性免疫抑制剂(恩莫单抗),以及血浆酶原激活剂,如重组组织型纤溶酶原激活物(rt-PA)等神经保护剂和抗血栓药物的临床应用^[200]。

4. 神经保护剂 此类药物的作用对象为神经元,其主要药理作用是抑制细胞内钙离子转移、神经递质释放以及神经元死亡途径。虽然,神经保护剂在挽救受损神经元的研究中取得了一些进展,但用于治疗脑缺血的疗效却并不乐观。近期研制的 NXY-059 被认为治疗缺血性卒中可能有效,但是在观察该药临床疗效的多中心 I 期临床试验中并未取得预期的效果;其 II 期试验亦未显示出显著的治疗效果。而目前应用于临床的抑制氧自由基的神经保护剂不能透过血-脑屏障进入脑组织,只能到达产生氧自由基的微血管腔表面^[205]。其他药物亦被证实在脑缺血时不能起到神经保护作用。因此,研制新型神经保护药物并使其能够进入神经血管单元而发挥药理作用,是今后抗脑缺血药物研究迫切需要解决的问题。

5. 抗血栓治疗 也是目前治疗脑卒中较为成功的手段。由于,缺血性卒中是继发于脑血管栓塞的脑实质损伤,故疏通血管方案主要是通过早期再灌注来实现的^[130]。rt-PA 是迄今为止首例被美国食品与药品管理局(FDA)批准用于治疗急性缺血性卒中的溶栓药物,但是由于溶栓后出现的症状性颅内出血和治疗时间窗狭窄等限制,仅约 1% 的脑卒中患者能够接受 rt-PA 治疗^[206,207]。

二、脑缺血与血-脑屏障

1. 血-脑屏障的概念 神经血管单元作为脑卒中的概念模型,血-脑屏障对维持其完整性至关重要。大量研究表明,在脑缺血过程中伴随的炎症级联反应可破坏血-脑屏障的完整性,尤其是炎症细胞因子刺激脑组织产生的各种蛋白水解酶对血-脑屏障的损伤越来越受到关注。血-脑屏障由内皮细胞、细胞间紧密连接(TJs)、星形胶质细胞、周细胞以及基膜等共同组成,脑血管内皮细胞与其周围的血管

神经单元的其他成分共同诱导并维持其结构的完整性。周细胞位于血管内皮细胞外侧,并与其紧密相连,共同被 30~40 nm 的基膜所包裹;基膜与星形胶质细胞足突膜相邻,包绕脑毛细血管^[208]。周细胞与内皮细胞紧密相邻,共享基膜,对稳定脑毛细血管结构、血管形成,以及调节血-脑屏障至关重要,然而,鲜有资料显示周细胞对维持血-脑屏障稳定性的重要意义^[209]。(1)体外模型的建立:1973 年,首次建立了血-脑屏障的体外模型,随后,通过细胞培养相继建立起各种不同的血-脑屏障体外模型。由于脑血管内皮细胞在体外培养时易失去其特有的性质,以及神经血管单元在血-脑屏障中发挥着重要作用,因此,共培养取代了单一的内皮细胞培养方法。目前,体外研究所使用的血-脑屏障模型多采用胶质细胞与血管内皮细胞共培养^[210]。研究表明,缺氧-复氧时可导致血-脑屏障通透性增加,其紧密连接结构蛋白咬合蛋白(occludin)和闭锁小带蛋白 1(ZO-1)等表达水平显著下降^[211],而且,在原代周细胞、星形胶质细胞与内皮细胞共培养建立的血-脑屏障体外模型中,紧密连接蛋白表达水平显著高于缺乏旁细胞或星形胶质细胞的血-脑屏障模型^[210]。内皮细胞主要表达葡萄糖转运蛋白 1、释放转运体 P-糖蛋白和多药耐药蛋白 1。在这一新型体外培养模型的共同培养基中首次加入了周细胞,将会为我们进一步认识血-脑屏障的病理学、生理学、药理学,以及候选神经保护剂大有裨益。(2)在体模型的建立:通过测量各种神经保护药物对体内外血-脑屏障模型的透过系数,反映药物对血-脑屏障的通透性。其中亲水性小分子在被动扩散或外排泵配体作用下可透过血-脑屏障,如抗心力衰竭药物地高辛透过血-脑屏障的系数极低,而通过脂质自由扩散调节的药物如咖啡因、安替比林则有较高的分子透过率。脑缺血导致的血-脑屏障破坏主要表现为结构破坏,电子显微镜观察可见内皮细胞紧密连接距离增加并发生功能障碍,如脑水肿、白蛋白渗漏等。血-脑屏障通透性增加可造成脑损伤,但若利用它的短暂性开放提高神经系统药物通过率,则有望解决目前中枢性治疗药物难以到达靶部位的难题。目前,可通过各种监测手段比较准确地测定血-脑屏障损伤程度及范围,例如:检测紧密连接蛋白表达量及表达时间,可了解紧密连接情况;分析伊文蓝(EB)或白蛋白渗出量可获知血-脑屏障损伤程度;电子显微镜或扫描

电子显微镜可观察到血-脑屏障损伤的具体部位。MRI 诊断技术的不断改进,使得无创性实时在体监测血-脑屏障成为可能。目前,伊文蓝染色法替代了早期应用的 CT 增强扫描的半定量测量血-脑屏障的方法。自 1909 年 Ehrlich 通过伊文蓝首先发现了血-脑屏障的存在后,该方法广泛应用于血-脑屏障通透性的定性和定量测量。近年来,通过计算脑组织匀浆伊文蓝含量来定量反映血-脑屏障通透性,方法简便可行。但是由于计算伊文蓝含量必须取脑,使其不能在体实时监测血-脑屏障通透性,故应用受到限制。研究显示,高渗溶液甘露醇所引起的脑血管内皮细胞收缩可导致紧密连接结构破坏、血-脑屏障通透性增加,使原先不能透过血-脑屏障的白蛋白顺利通过,鉴于此,可通过分析白蛋白渗出率而定性或定量测量脑缺血时血-脑屏障破坏程度。但该实验与伊文蓝存在同样的缺陷,即必须处死动物,不能进行实时在体动态研究。而 MRI 检测技术使在体实时测量血-脑屏障通透性成为可能,它可较为准确

地定位和定性诊断神经或血管病变,MRI 测量血-脑屏障的机制主要包括①直接测量血-脑屏障通透性,T₁WI 信号随着血-脑屏障开放时脑组织含水量的增加而逐渐减弱。②通过测量脑组织对比剂扩散时间间接计算血-脑屏障开放程度^[212,213]。利用 MRI 定量测量血-脑屏障通透性安全、可靠、高效,但也存在成像参数多、图像变化大、掌握规律较困难、成像速度相对较慢、运动伪影多等不足。也可应用扫描电子显微镜测量血-脑屏障通透性,通过控制扫描范围来控制放大率,可清晰地反映血-脑屏障的表面结构,其不足之处是仅适用于定性观察血-脑屏障的开放情况^[214]。

2. 血-脑屏障与缺血性卒中 新的研究策略表明,今后的研究方向应着眼于神经血管单元结构完整性的保护,以及明确星形胶质细胞在其中的重要作用,以期获得缺血性卒中治疗的重大突破。目前,研究焦点已从仅关注神经元保护及抵御神经元死亡的策略逐渐转向对神经血管单元的全面保护,它将为缺血性卒中的基础研究和临床治疗带来新的机遇和挑战,保护“神经血管单元”或许是缺血性卒中更为现实的治疗靶点^[200]。

基质金属蛋白酶在脑缺血中的作用

一、基质金属蛋白酶分类

基质金属蛋白酶是一类依赖锌存在发挥作用的蛋白水解酶,参与细胞外基质和基膜重建及降解、细胞迁徙,以及血管增生等过程。根据其底物特异性和结构特点主要分为以下 5 类(表 1):胶原酶(collagenases)、明胶酶(gelatinases)、基质溶素(stromelysins)、细胞膜型基质金属蛋白酶(MT-MMPs),以及其他类型的基质金属蛋白酶^[215]。其基本结构包括前肽区、类凝血素、催化区和跨膜区,前肽区含有一个结合催化区锌原子的半胱氨酸残基,半胱氨酸在催化区与锌相结合而抑制基质金属蛋白酶之活性^[216]。

二、基质金属蛋白酶活性的调控

大多数基质金属蛋白酶不是恒定表达,但是有许多因素可以刺激其基因转录如生长因子、炎症细胞因子、致癌基因产物、细胞与细胞外基质或细胞与细胞间相互作用等。基质金属蛋白酶催化区中的锌原子与前肽区中的半胱氨酸残基相连接,使其以非活性状态存在,当激活因子使半胱氨酸与锌之

表 1 基质金属蛋白酶分类

分类	成员	基质金属蛋白酶	主要底物
胶原酶	间质胶原酶	MMP-1	纤维胶原
	中性粒细胞胶原酶	MMP-8	纤维胶原
	胶原酶-3	MMP-13	纤维胶原
	胶原酶-4	未明确	未明确
明胶酶	明胶酶 A	MMP-2	IV 型明胶、V 型胶原、纤维连接蛋白
	明胶酶 B	MMP-9	IV 型明胶、V 型胶原、纤维连接蛋白
基质溶素	基质溶素-1	MMP-3	层黏连蛋白、非纤维胶原、纤维连接蛋白
	基质溶素-2	MMP-10	层黏连蛋白、非纤维胶原、纤维连接蛋白
	交配相关蛋白	MMP-7	α ₁ 蛋白酶抑制剂
	基质溶素-3	MMP-11	
细胞膜型基质金属蛋白酶	细胞膜 1 型基质金属蛋白酶	MMP-14	MMP-2 前体、胶原、明胶
	细胞膜 2 型基质金属蛋白酶	MMP-15	MMP-2 前体、胶原、明胶
	细胞膜 3 型基质金属蛋白酶	MMP-16	MMP-2 前体、胶原、明胶
	细胞膜 4 型基质金属蛋白酶	MMP-17	MMP-2 前体、胶原、明胶
其他	金属弹性蛋白酶	MMP-12	弹性蛋白
	釉质溶解素	MMP-?	未明确
	爪蟾基质金属蛋白酶	MMP-?	未明确
	未明确	MMP-19	聚集蛋白聚糖

间的连接破坏时,催化区暴露,即可通过自身及酶催化作用清除前肽区,其中激活基质金属蛋白酶前体的重要活性物质即纤溶酶原^[217];细胞膜型基质金属蛋白酶的激活也需要切除前肽区,但它是由丝氨酸蛋白酶(serine protease)中的弗林蛋白酶(furin)催化的。

三、基质金属蛋白酶活性的抑制

基质金属蛋白酶活性主要受两种抑制剂调控,分别为 α_2 巨球蛋白和组织金属蛋白酶抑制剂(TIMP,表2)。人类 α_2 巨球蛋白是相对分子质量为 725×10^3 的血浆糖蛋白,包含4种相同的相对分子质量为 180×10^3 的亚基,通过使蛋白酶内陷而抑制大部分蛋白酶的活性。内源性组织金属蛋白酶抑制剂对基质金属蛋白酶活性具有强烈的抑制作用,至今分子结构业已明确者仅有TIMP-1和TIMP-4。组织金属蛋白酶抑制剂是相对分子质量为 $(20 \sim 29) \times 10^3$ 的分泌蛋白质,包含184~194个氨基酸,分为N末端和C末端区域,每一区域中含有3个保守的二硫键,N末端作为基质金属蛋白酶活性抑制的独立单位呈折叠状,对基质金属蛋白酶有较高的亲和力,N末端与基质金属蛋白酶催化区的非共价键相连接从而抑制其活性。不同的组织金属蛋白酶抑制剂对基质金属蛋白酶的抑制作用有所不同,具有不同的细胞和组织特异性,以及不同的基因调控机制^[218],但是其抑制机制尚未阐明。

四、基质金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制剂在脑缺血中的作用

晚近研究表明,基质金属蛋白酶通过对兴奋毒性、凋亡受体的激活和神经营养因子的控制,进而对神经元的坏死和凋亡进行调控^[219]。基质金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制剂可能在内源性修复,特别是血管新生、血流恢复,以及神经性应答调控

TIMPs	相对分子质量($\times 10^3$)	抑制种类	其他功能	定位
TIMP-1	28	所有 MMPs	MMP-9 强抑制剂	细胞外基质
TIMP-2	21	所有 MMPs	整合素和金属蛋白酶 10	细胞外基质
TIMP-3	24	所有 MMPs	与 MMP-2、MMP-14 形成三聚物以活化 MMP-2	细胞外基质
TIMP-4	22	所有 MMPs	抑制凋亡和血管再生	细胞外基质

注:TIMP,组织金属蛋白酶抑制剂;MMPs,基质金属蛋白酶

表3 脑缺血时基质金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制剂表达情况

缺血模型	组织金属蛋白酶	细胞类型
局灶性缺血	MMP-2	星形胶质细胞
	MMP-9	血管
		神经元
		炎性细胞
	MMP-3	神经元
		小胶质细胞
全脑缺血	TIMP-3	周细胞
		神经元
	MMP-9	CA 区锥形神经元
		齿状颗粒神经元
		小胶质细胞
	TIMP-1	星形胶质细胞
		室管膜和脑膜
	星形胶质细胞	
	CA 区锥形神经元	

方面发挥重要作用。抑制基质金属蛋白酶表达可能对缺血性卒中患者神经功能的恢复有助,因此,如何利用基质金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制剂对于缺血性卒中进行治疗至关重要。

1. 脑缺血后基质金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制剂的表达变化 通常两种类型的刺激能够引起大脑缺血即:大脑中动脉结扎造成的局灶性缺血;主动脉结扎导致的全脑缺血。基质金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制剂的表达取决于缺血模型及缺血时间(表3)。注射 MMP-9 抑制剂小鼠和 MMP-9 基因敲除小鼠实验结果显示,MMP-9 对全脑缺血小鼠有毒害作用^[220]。外源性 MMP-9 可导致海马组织切片和培养的大脑皮质神经元死亡^[221]。目前,对 MMP-9 引起神经元的死亡机制并不十分清楚,可能对神经元与细胞外基质间的相互作用产生影响^[220]。MMP-3 可通过调控细胞表面凋亡细胞受体与其 Fas-Fas 配体系统的相互作用,以及增加胰岛素样生长因子(IGF)和神经生长因子(NGF)活性而发挥神经保护作用。大鼠短暂性全脑缺血 3 d 后,神经元和星形胶质细胞 TIMP-1 表达水平即显著升高^[222]。由于 TIMP-1 对 MMP-9 有抑制作用,因此认为 TIMP-1 为内源性的神经保护剂。TIMP-3 通过影响细胞表面凋亡细胞受体与其 Fas-Fas 配体系统的相互作用从而调控细胞凋亡。成年脑组织极少表

达 TIMP-3, 但是脑缺血后其表达水平则显著升高, 特别是局灶性缺血大鼠模型延迟性细胞凋亡神经元 TIMP-3 表达水平明显升高^[223]。

2. 经体外培养的神经元基质金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制剂的表达变化 经体外培养的多种神经元可有各种基质金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制剂表达, 包括大脑的内皮细胞、星形胶质细胞和神经元。细胞与细胞之间的相互作用对基质金属蛋白酶的激活和功能十分重要。因为, 基质金属蛋白酶前体的激活受其他基质金属蛋白酶、蛋白酶及细胞外生物抑制剂的调控, 基质金属蛋白酶的功能与其表达部位的不同类型细胞的相互作用相关, 共培养的细胞模型或体外动物模型的研究可能更具实际意义。

3. 基质金属蛋白酶对神经血管的损伤作用 虽然基质金属蛋白酶家族成员在脑缺血过程中的表达变化十分复杂, 但对啮齿类动物模型的研究发现, MMP-9 对缺血早期比较敏感, 而 MMP-2 于缺血数天后才表达水平升高, 因此, MMP-9 和 MMP-2 可能在脑缺血的过程中发挥重要作用^[224]。实验表明, MMP-9 不仅在梗死区呈高表达, 在梗死周围组织也呈高表达, 推测其高表达可能增加梗死面积^[225]。重要的是, 在从脑缺血到脑出血的转换过程中, 梗死区 MMP-9 表达达峰值水平, 此与周围受影响的毛细血管中红细胞游离、中性粒细胞浸润, 以及基膜 IV 型胶原基质降解有关^[226]。MMP-3 对脂多糖模型小鼠神经炎性反应后的血-脑屏障通透性有一定影响, 与正常小鼠相比, MMP-3 基因敲除小鼠紧密连接蛋白 (occludin、claudin-5 和 laminin- α -1) 水解程度降低, 而嗜中性粒细胞浸润数量更少^[227]。在神经炎性反应过程中, 基质金属蛋白酶可通过血流聚集到缺血及缺血半暗带区, 使内皮细胞、星形胶质细胞和神经元基质金属蛋白酶表达水平升高, 从而诱导神经血管损伤和梗死面积增加, 尤其是脑内源性基质金属蛋白酶在炎性反应中起主导作用^[228]。嗜中性粒细胞是 MMP-9 的重要来源, 后者在短暂性局灶性脑缺血时可诱导基膜降解, 破坏血-脑屏障, 源于白细胞的 MMP-9 在基膜上与 IV 型胶原蛋白水解酶具有协同作用^[226]。各种羟基化合物均具有抑制啮齿类动物缺血模型基质金属蛋白酶的作用^[229]。

4. 脑缺血后基质金属蛋白酶的调控与血-脑屏障之间的关系 脑卒中通常伴随血-脑屏障的破坏,

从而导致脑水肿和脑出血。动物实验表明, 血-脑屏障通透性增加和脑出血均会引起基质金属蛋白酶高表达, 静脉注射基质金属蛋白酶抑制剂能够降低血-脑屏障通透性。MMP-9 高表达与脑卒中严重程度和脑出血均相关^[230]。基质金属蛋白酶对神经血管单元也有不良作用, 缺氧缺血刺激使中枢神经系统星形胶质细胞和小胶质细胞表达, 继而活化基质金属蛋白酶, 水解基膜蛋白, 血管通透性增加; 同时可影响与内皮细胞紧密连接相关的结构蛋白的表达, 例如 MMP-9 可调控闭合小环蛋白^[231]。

5. 基质金属蛋白酶在血管新生和血管重建中的作用 实验鼠大脑中动脉阻塞 3 d 即开始出现血管新生 (angiogenesis), 并可持续数周, 从而改善局部缺血^[232]。新生血管的形成与缺血性卒中患者生存时间相关, 表明缺血引起的血管新生对患者康复十分重要。研究显示, 基质金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制剂在非中枢神经系统组织血管新生过程中的作用比较复杂^[233], 细胞膜型基质金属蛋白酶 1 (MT1-MMP)、MMP-2、MMP-3 和 MMP-9 在血管新生过程中, 不仅参与细胞外基质降解, 同时还参与血管生成相关因子的释放。基质金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制剂在缺血区脑血管新生中的作用, 可能会成为今后的研究热点。

缺血性卒中的影像学研究

一、缺血性卒中临床诊断中的影像学研究进展

1. CT 常规 CT 是早期出血性卒中的主要影像学诊断方法, 广泛应用于急性脑血管意外的诊断; 但其依赖组织密度的对比强度, 虽能够及时明确诊断, 但是对于发病时间 < 24 h 的急性脑缺血其诊断的灵敏性及特异性均较低。最新临床治疗方案要求: 缩短缺血性卒中诊断的时间窗, 即从以往仅反映形态学改变提前至功能代谢改变水平。根据 Lo 等^[234]提出的脑血流动力学缺血半暗带学说, 脑血流灌注正常或轻度降低而血流通过时间延迟的区域, 定义为缺血半暗带区。CT 灌注成像 (CTPI) 技术由于成本效益、实用性及联合 CT 动脉血管造影 (CTA) 的优势, 以及成像速度快、适宜急诊应用, 是目前临床最为常用的检查方法; 对于累及大脑半球或梗死灶范围较大的脑卒中患者, CT 扫描可明确定位梗死面积、梗死灶中心及缺血低灌注区范围。CT 灌注成像尚可用于评价缺血性脑损伤可恢复性的时间窗,

其评价方法包括定性和定量两方面,前者是以脑血流量(CBF)图、脑血容量(CBV)图、血流平均通过时间(MTT)图和达峰时间(TTP)图为代表的直观图形方式表现;后者则包括脑血容量、脑血流量、血流平均通过时间、峰值时间等量化参数^[235]。一般而言,缺血组织血流平均通过时间延长、血容量显著降低($< 2 \text{ ml}/100 \text{ g}$)提示为不可逆性损伤;而血流平均通过时间延长($>$ 对侧脑组织 145%)、血容量轻度下降,则提示可逆性损伤^[21,236]。若梗死区血流量及血容量均呈异常低灌注,则血流平均通过时间延长,达峰时间后移或消失;而在可逆性缺血区,包括梗死灶周围区域血流量正常或轻度降低,血容量图表现为升高、正常或轻度降低,血流平均通过时间延长,达峰时间后移。

2. MRI 随着磁共振扫描硬件设备和软件序列水平的提高和开发,在常规 MRI 依赖形态学和信号异常的诊断基础上,一些能够反映中枢神经系统生化代谢及功能的 MRI 新技术极大地拓展了其临床诊断范围。广义的功能 MRI (fMRI) 技术包括扩散加权成像(DWI)、灌注成像(PWI)、血氧水平依赖(BOLD)、扩散张量成像(DTI)、磁共振波谱成像(MRSI)、内源性示踪剂的动脉自旋标记(ASL)和磁敏感加权成像(SWI)等,其中大多数技术已成为临床常规诊断方法。磁敏感加权成像是近年发展起来的基于各种组织磁化率差异而进行成像的一种新型技术方法,对显示静脉病变十分有效。由于它对去氧血红蛋白、正铁血红蛋白、含铁血黄素等物质具有极高的灵敏性,是目前可以检测微量出血最为灵敏的诊断技术。急性缺血性卒中时,血栓形成导致动脉血流量减少、去氧血红蛋白水平升高,从而增加磁敏感效应,这种潜在的优势可检出磁共振动脉造影检查遗漏的血管末端血栓^[237,238],尤其对高血压和脑卒中引起的隐匿性和超早期脑出血的阳性检出率极高。尽管,对微量出血性卒中患者接受溶栓治疗的安全性尚存有争议,但磁敏感成像技术无疑为急性缺血性卒中患者血管内溶栓治疗决策提供了重要参考信息,同时其对溶栓前后出血的诊断比 CT 更加灵敏、准确。

3. 正电子发射断层显像 使用¹⁵O-示踪剂,通过氧摄取量及代谢程度来区分缺血中心区、半暗带区及正常脑组织;主要反映神经元能量代谢状态,至今仍是检测缺血性卒中半暗带区、不可逆性缺血组织及判断脑灌注代谢状态的“金标准”,亦是检测

脑氧代谢率(CMRO₂)的最佳方法^[239]。由于正电子发射断层显像(PET)示踪剂制备技术的复杂性,故而阻碍了该项诊断技术在临床的广泛应用。在临床上,一般使用¹⁵O-H₂O和¹⁵O-示踪剂定量检测脑血流量、脑氧代谢率和脑氧摄取率(CEO₂),脑氧摄取率增加提示存在缺血半暗带区^[240]。

4. 单光子发射型计算机体层摄影(SPECT) 与 PET 相似,亦为采用放射性药物评价脑灌注及代谢状态的影像学技术。它具有较高的灵敏性和特异性,放射性示踪剂通常为⁹⁹Tc^m-六甲基丙二胺胍(⁹⁹Tc^m-HMPAO),可进行二维或三维图像重建。在发病最初的 3~6 h,其示踪剂信号为对侧相应区域的 40%~70%,提示为缺血半暗带区^[241]。由于⁹⁹Tc^m-HMPAO 的药物半衰期约为 6 h,可于注射后数小时再成像,反映注射时的灌注状态。与 PET 相比,其更为经济,且具有更大的临床实用性;缺点是为半定量检查方法无法评价脑组织代谢变化,从而限制了它对梗死核心区和缺血半暗带区的具体定义,故不作为脑卒中的常规成像检查内容。

二、缺血性卒中临床治疗的影像学研究

一般而言,急诊脑血管病患者首先应使用 CT 进行检查,排除出血性卒中,在未发现缺血性形态学改变后可进行 CT 灌注成像检查,既可避免搬运患者又能迅速明确诊断。尽管目前临床应用的多层螺旋 CT 扫描仪已经实现了 80 mm 范围的脑灌注成像,但仍不能满足真正的全脑实质血流动力学研究;而且,颅底部骨性伪影的干扰、患者需接受相当剂量的射线辐射等不良反应,短期内不宜多次重复检查,对预后随访也有一定的局限性。目前,尚缺乏有关 CT、CT 灌注成像以及 CT 动脉血管造影检查的大型随机对照临床试验结果,以证明其对患者选择性的干预治疗有效^[9]。虽然, PET 对缺血性卒中的成像清晰,且定量分析十分敏感^[242],但由于对操作人员技术要求高、需制备放射性同位素,且价格昂贵、操作时间长等缺点,影响了它在临床的广泛应用。鉴于此,欧洲神经病学协会联盟(EFNS)指出, PET 对于评价急性缺血性卒中的作用较小^[243],脑卒中治疗的影像学研究重点应拓展 fMRI 的临床应用。

1. MRI 用于早期干预治疗的证据 超早期溶栓治疗是治疗缺血性卒中的有效方法,可挽救缺血半暗带。动脉内溶栓治疗的时间窗要求 $< 6 \text{ h}$,因为,随着缺血时间的延长溶栓疗效呈逐渐衰减趋势。动物实验及临床研究均发现,血管再通、血流再灌

注后可使原有临床症状加重,即再灌注损伤:血管闭塞 3~4 h 血流可全部恢复,发病 3 d 梗死灶面积较动脉完全闭塞所致梗死灶面积大 2.00~2.50 倍。再灌注损伤加重的因素包括中度缺血、脑血流延迟恢复和血-脑屏障破坏,甚至急性缺血性卒中动脉溶栓治疗后必将出现再灌注损伤。据推测:血流再灌注后脑组织氧利用率降低,过剩的氧与线粒体逸出的电子形成活性氧,使生物膜不饱和脂肪酸发生过氧化反应,产生大量氧自由基,从而进一步加重脑水肿。通常梗死后 12 h 内血管再通,缺血脑组织再灌注损伤尚不严重,脑水肿程度较轻;而 12 h 后缺血脑组织则出现过度灌注现象,发生严重脑水肿。DWI/PWI 成像可较为直观地反映上述病理改变,DWI 与 PWI 联合应用将有助于确定缺血半暗带,更为准确地筛选适宜接受溶栓治疗的患者,从而避免缺血-再灌注损伤等并发症^[244]。

2. MRI 对缺血性卒中神经功能恢复的评价 神经生理及病理学研究显示,缺血性卒中后脑皮质功能及结构发生明显变化,原有功能区及其位置改变、神经元突触数量明显增加,此被视为脑可塑性 (brain plasticity) 和功能重组 (functional reorganization) 理论的主要内容。以血氧饱和和依赖为代表的脑功能影像学技术可通过检测与代谢相关的血流含氧量的变化,为受损脑组织的恢复提供动态定量信息,此对缺血性卒中损伤后神经功能恢复的机制有了全新且客观地理解。主要用于评价运动功能恢复和运动环路重组,以及语言和感觉认知功能的恢复。DTI 技术可直观地显示白质纤维传导系统在缺血性卒中后运动功能的恢复情况,通过对缺血性卒中患者受损功能区变化的动态观察有助于准确地了解神经功能恢复机制。

三、缺血性卒中影像学诊断的实验研究

目前对缺血性卒中机制的假说认为,当脑血流量降至 6~8 ml/(100 g·min) 时可引起钠-钾泵功能障碍即 ATP 依赖性离子转运系统功能障碍,造成神经元钾离子外流及钠离子和水内流、神经元去极化,进而引起突触前电压敏感性钙通道开放、钙离子内流;内流的钙离子引发突触释放谷氨酸,谷氨酸的兴奋性毒性作用表现为激活突触后 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异唑丙酸 (AMPA) 受体和 NMDA 受体,从而进一步促进钙离子和钠离子内流,加剧去极化,促进缺血区扩散性神经电活动和细胞内钙超

载;过度钙离子内流同时激活脂肪酶和一氧化氮合酶,前者通过白三烯的促炎症作用引起炎症反应,后者则可导致一氧化氮和氧自由基产生,最终诱发细胞膜破坏和神经元死亡,缺血半暗带转变为不可逆性损伤。此外,缺血半暗带还存在另一种细胞死亡形式即细胞凋亡,目前认为,凋亡与缺血半暗带损伤过程中的细胞死亡,以及由此导致的不可逆性缺血灶扩大密切相关。但是,这些病理变化过程与假说尚未获得确切的影像学证据,缺血半暗带为缺血性卒中治疗的主要靶点,通过影像学技术阐明缺血半暗带形成的细胞与分子机制,尤其明确影像学可显示的缺血半暗带的病理生理学基础与机制对进一步阐明缺血性卒中,尤其是再灌注损伤的病理学机制具有重要临床意义,有助于探索神经保护技术与药物研制。

1. MRI 的实验研究 目前,在 MRI 研究领域出现了一种通过组织氧摄取差异鉴别脑缺血组织的新方法,即通过不同氧合状态的高流速氧存在的逆磁性和顺磁性效应差别原理,采用动脉自旋标记法对氧合血红蛋白、去氧血红蛋白进行 T_2^* 信号强度分析,以确定缺血灶中心和缺血半暗带区^[245]。动物模型研究显示,以 2~3 min 的短时间吸入含 ^{17}O 标记氧,通过分析脑线粒体产生 ^{17}O 的代谢水在磁共振图像上的信号改变^[246],观察脑氧代谢率的变化,但这些新的诊断方法尚需进一步验证;此外,通过超顺磁性氧化铁 (SPIO) 标记炎症特异性物质的分子影像学技术可提供在体动态炎症情况。由新型材料合成的对比剂,如超顺磁性氧化铁纳米微粒在中枢神经系统病变中的诊断与治疗应用,亦极具前景。由于其超顺磁特性,可作为磁共振成像对比剂用于评价与血-脑屏障功能障碍相关的中枢神经系统肿瘤或其他神经炎性病变的病理改变,或通过磁共振灌注加权成像序列评价脑血管循环状态,以及进行中枢神经系统疾病体内细胞的追踪摄影。其临床应用范围的扩大最终可能会促使发现新的疾病,尤其是可对抗血管形成化疗药物或抗炎药物进行治疗监测和疗效评价^[247]。

2. PET 实验研究 近年,乏氧显像剂 ^{18}F -硝基咪唑丙醇 (^{18}F -FMISO) 和神经受体示踪剂 ^{11}C -氟马西尼 (FMZ) 被用于协助 PET 定位缺血半暗带^[248]。Saita 等^[249] 研究发现,大鼠脑缺血-再灌注 20 h 其脑组织对 ^{18}F -FMISO 摄取量即显著增加,而高摄取率仅出

现于大脑中动脉缺血早期的再灌注阶段^[250],提示¹⁸F-FMISO为一有效的缺血半暗带标记物。在针对猫和狒狒脑缺血模型的实验研究中,通过对一系列示踪剂的PET观察表明,可逆性缺血半暗带区脑组织转变为不可逆性损伤为一动态过程,可从梗死灶中心扩展至缺血边缘区域,并随着缺血时间的延长其范围逐渐扩大^[251,252]。

四、影像学研究前景

通过MRI技术,诸如DWI、PWI、T₂WI等多序列和多参数成像,不仅可为临床提供准确的解剖学信息,还可通过质子磁共振波谱(¹H-MRS)和化学位移成像在脑缺血的超急性期和急性期检测乳酸(Lac)和N-乙酰天冬氨酸(NAA)的代谢变化。扩散张量成像则可通过表现扩散系数(ADC)和部分各向异性(FA)等参数显示半暗带中心区和边缘扩散受限的程度,以及细胞细微结构的破坏程度。通过分子影像学检查技术,如标记膜蛋白磷脂结合蛋白V(annexin V)可显示半暗带区神经元凋亡情况;功能影像学血氧饱和和依赖技术可了解半暗带区神经网络功能障碍情况以及机制。总之,运用先进的MRI检查技术有望进一步阐明缺血半暗带区的病理生理学机制,尤其对脑卒中临床治疗产生有利的影响。此外,新兴成像技术的不断发展,如同步辐射光源成像已逐步实现从离体到在体组织的微米级微血管的观察,今后有望进一步阐明缺血性卒中不同病理阶段的微血管改变及再灌注现象,尤其是对缺血性卒中临床治疗对微血管影响的观察及评价将产生积极的影响。

由于脑神经网络结构和内部功能的复杂性,目前神经影像学技术尚难全面获得其详细信息,但我们相信随着功能及分子影像学技术的不断发展完善,以及新技术的开发应用,更多有关脑卒中的发生、发展、转归及康复治疗评价的难题将借助神经影像学平台得以解决。

小 结

综上所述,近10年来对缺血性卒中病因学和发病机制的研究已经取得了一些进展:在遗传因素方面,目前已经认识到大多数缺血性卒中为多基因遗传、多种危险因素叠加损害脑组织所致;在发病机制方面,虽然对钙离子、能量代谢、兴奋性氨基酸等的研究还在继续,但越来越多的注意力已开始关注脑缺血后活性氧和炎症反应,特别是对其转导通路

进行的深入研究;同时,随着对神经血管单元的逐步了解,由过去集中于对单一神经元损伤和死亡的研究转向现在对神经血管单元进行整体研究的趋势。对于脑缺血研究进展的另一特点是充分应用分子影像学诊断技术对缺血脑组织进行更为详细的实时动态观察。

参 考 文 献

- [1] Varona JF, Guerra JM, Bermejo F, et al. Causes of ischemic stroke in young adults, and evolution of the etiological diagnosis over the long term. *Eur Neurol*, 2007, 57:212-218.
- [2] Turtzo LC, McCullough LD. Sex differences in stroke. *Cerebrovasc Dis*, 2008, 26:462-474.
- [3] Miller VM, Duckles SP. Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacol Rev*, 2008, 60:210-241.
- [4] Hajat C, Dundas R, Stewart JA, et al. Cerebrovascular risk factors and stroke subtypes: differences between ethnic groups. *Stroke*, 2001, 32:37-42.
- [5] Meschia JF. Ischemic stroke as a complex genetic disorder. *Semin Neurol*, 2006, 26:49-56.
- [6] Joutel A, Corpechot C, Ducros A, et al. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature*, 1996, 383:707-710.
- [7] Tikka S, Mykkanen K, Ruchoux MM, et al. Congruence between NOTCH3 mutation and GOM in 131 CADASIL patients. *Brain*, 2009, 132(Pt 4):933-939.
- [8] Miao Q, Paloneva T, Tuominen S, et al. Fibrosis and stenosis of the long penetrating cerebral arteries: the cause of the white matter pathology in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Brain Pathol*, 2004, 14:358-364.
- [9] Meschia JF, Brott TG, Brown RD Jr, et al. Phosphodiesterase 4D and 5-lipoxygenase activating protein in ischemic stroke. *Ann Neurol*, 2005, 58:351-361.
- [10] Ishiko A, Shimizu A, Nagata E, et al. Notch3 ectodomain is a major component of granular osmiophilic material (GOM) in CADASIL. *Acta Neuropathol*, 2006, 112:333-339.
- [11] Peters N, Opherck C, Zacherle S, et al. CADASIL-associated Notch3 mutations have differential effects both on ligand binding and ligand-induced Notch3 receptor signaling through RBP-JK. *Exp Cell Res*, 2004, 299:454-464.
- [12] Ruchoux MM, Domenga V, Brulin P, et al. Transgenic mice expression mutant Notch3 develop vascular alterations characteristic of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Am J Pathol*, 2003, 162:329-342.
- [13] Switzer JA, Hess DC, Nichols FT, et al. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. *Lancet Neurol*, 2006, 5:501-512.
- [14] Heibel RP, Osarogiabon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation*, 2004, 11:129-151.
- [15] Colombatti R, Meneghetti G, Emami M, et al. Primary stroke prevention for sickle cell disease in north-east Italy: the role of ethnic issues in establishing a Transcranial Doppler screening program. *Ital J Pediatr*, 2009, 35:15.
- [16] Prohovnik I, Hurler-Jensen A, Adams R, et al. Hemodynamic etiology of elevated flow velocity and stroke in sickle-cell disease. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29:803-810.
- [17] Wiles N, Howard J. Role of hydroxycarbamide in prevention of

- complications in patients with sickle cell disease. *Ther Clin Risk Manag*, 2009, 5:745-755.
- [18] Rolfs A, Böttcher T, Zschiesche M, et al. Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study. *Lancet*, 2005, 366:1794-1796.
- [19] Altarescu G, Moore DF, Schiffmann R. Effect of genetic modifiers on cerebral lesions in Fabry disease. *Neurology*, 2005, 64:2148-2150.
- [20] Gretarsdottir S, Sveinbjörnsdottir S, Jonsson HH, et al. Localization of a susceptibility gene for common forms of stroke to 5q12. *Am J Hum Genet*, 2002, 70:593-603.
- [21] Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke. *Lancet Neurol*, 2007, 6:149-161.
- [22] Domingues-Montanari S, Mendioroz M, del Rio-Espinola A, et al. Genetics of stroke: a review of recent advances. *Expert Rev Mol Diagn*, 2008, 8:495-513.
- [23] Gschwendtner A, Bevan S, Cole JW, et al. Sequence variants on chromosome 9q21.3 confer risk for atherosclerotic stroke. *Ann Neurol*, 2009, 65:531-539.
- [24] Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Manolescu A, et al. Risk variants for atrial fibrillation on chromosome 4q25 associate with ischemic stroke. *Ann Neurol*, 2008, 64:402-409.
- [25] Janzen V, Forkert R, Fleming HE, et al. Stem - cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*, 2006, 443:421-426.
- [26] Matarin M, Brown WM, Scholz S, et al. A genome - wide genotyping study in patients with ischaemic stroke: initial analysis and data release. *Lancet Neurol*, 2007, 6:414-420.
- [27] Denys K, Cankurtaran M, Janssens W, et al. Metabolic syndrome in the elderly: an overview of the evidence. *Acta Clin Belg*, 2009, 64:23-34.
- [28] Kurl S, Laukkanen JA, Niskanen L, et al. Metabolic syndrome and the risk of stroke in middle-aged men. *Stroke*, 2006, 37: 806-811.
- [29] Iso H, Sato S, Kitamura A, et al. Metabolic syndrome and the risk of ischemic heart disease and stroke among Japanese men and women. *Stroke*, 2007, 38:1744-1751.
- [30] Boden-Albala B. Current understanding of multiple risk factors as the metabolic syndrome: distillation or deconstruction. *Semin Neurol*, 2006, 26:108-116.
- [31] Firdaus M, Mathew MK, Wright J. Health promotion in older adults: the role of lifestyle in the metabolic syndrome. *Geriatrics*, 2006, 61:18-22.
- [32] Dentali F, Squizzato A, Ageno W. The metabolic syndrome as a risk factor for venous and arterial thrombosis. *Semin Thromb Hemost*, 2009, 35:451-457.
- [33] Bassetti CL, Milanova M, Gugger M. Sleep - disordered breathing and acute ischemic stroke: diagnosis, risk factors, treatment, evolution, and long - term clinical outcome. *Stroke*, 2006, 37:967-972.
- [34] Punjabi NM, Beamer BA. C-reactive protein is associated with sleep disordered breathing independent of adiposity. *Sleep*, 2007, 30:29-34.
- [35] Tauman R, O'Brien LM, Gozal D. Hyposemia and obesity modulate plasma c-reactive protein and interleukin-6 levels in sleep-disordered breathing. *Sleep Breath*, 2007, 11:77-84.
- [36] Dziewas R, Ritter M, Usta N, et al. Atherosclerosis and obstructive sleep apnea in patients with ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*, 2007, 24:122-126.
- [37] Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol*, 2001, 3:E255-263.
- [38] Albrecht J, Hanganu IL, Heck N, et al. Oxygen and glucose deprivation induces major dysfunction in the somatosensory cortex of the newborn rat. *Eur J Neurosci*, 2005, 22:2295-2305.
- [39] Ueda H, Fujita R, Yoshida A, et al. Identification of prothymosin-alpha1, the necrosis-apoptosis switch molecule in cortical neuronal cultures. *J Cell Biol*, 2007, 176:853-862.
- [40] Watson RT, Pessin JE. Intracellular organization of insulin signaling and GLVT4 translocation. *Recent Prog Horm Res*, 2001, 56:175-193.
- [41] Abramov AY, Scorziello A, Duchen MR. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci*, 2007, 27:1129-1138.
- [42] Fujita R, Ueda H. Protein kinase C-mediated cell death mode switch induced by high glucose. *Cell Death Differ*, 2003, 10: 1336-1347.
- [43] Fujita R, Ueda H. Prothymosin-alpha1 prevents necrosis and apoptosis following stroke. *Cell Death Differ*, 2007, 14:1839-1842.
- [44] Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis - inducing factor. *Nature*, 1999, 397:441-446.
- [45] Cao G, Clark RS, Pei W, et al. Translocation of apoptosis - inducing factor in vulnerable neurons after transient cerebral ischemia and in neuronal cultures after oxygen - glucose deprivation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23:1137-1150.
- [46] Matsumori Y, Hong SM, Aoyama K, et al. Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25:899-910.
- [47] Plesnila N, Zhu C, Culmsee C, et al. Nuclear translocation of apoptosis-inducing factor after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24:458-466.
- [48] Zhu C, Qiu L, Wang X, et al. Involvement of apoptosis - inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neurochem*, 2003, 86:306-317.
- [49] Candé C, Vahsen N, Garrido C, et al. Apoptosis - inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ*, 2004, 11:591-595.
- [50] Zhao H, Yenari MA, Cheng D, et al. Bcl-2 transfection via herpes simplex virus blocks apoptosis - inducing factor translocation after focal ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24:681-692.
- [51] Culmsee C, Zhu C, Landshamer S, et al. Apoptosis-inducing factor triggered by poly (ADP - ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *J Neurosci*, 2005, 25:10262-10272.
- [52] Yu SW, Wang H, Poitras MF, et al. Mediation of poly (ADP - ribose) polymerase - 1 - dependent cell death by apoptosis - inducing factor. *Science*, 2002, 297:259-263.
- [53] Endres M, Wang ZQ, Namura S, et al. Ischemia brain injury is mediated by the activation of poly (ADP - ribose) polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17:1143-1151.
- [54] Velier JJ, Ellison JA, Kikly KK, et al. Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different population of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *J Neurosci*, 1999, 19:5932-5941.
- [55] Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, et al. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102:12005-12010.
- [56] Ouyang YB, Tan Y, Comb M, et al. Survival - and death - promoting events after transient cerebral ischemia: phosphorylation of Akt, release of cytochrome C and activation of caspase-like proteases. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999, 19: 1126-1135.

- [57] Luo Y, Cao G, Pei W, et al. Induction of caspase-activated deoxyribonuclease activity after focal cerebral ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22:15-20.
- [58] Sugawara T, Noshita N, Lewen A, et al. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J Neurosci*, 2002, 22:209-217.
- [59] Zhang L, Chen J, Fu H. Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:8511-8515.
- [60] Saito A, Hayashi T, Okuno S, et al. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice protects against neuronal cell death after transient focal ischemia by blocking activation of the Bad cell death signaling pathway. *J Neurosci*, 2003, 23:1710-1718.
- [61] Paschen W. Disturbances of calcium homeostasis within the endoplasmic reticulum may contribute to the development of ischemic-cell damage. *Med Hypotheses*, 1996, 47:283-288.
- [62] DeGracia DJ, Kumar R, Owen CR, et al. Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: implications for neuronal survival or death. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22:127-141.
- [63] Kumar R, Azam S, Sullivan JM, et al. Brain ischemia and reperfusion activates the eukaryotic initiation factor 2 α kinase, PERK. *J Neurochem*, 2001, 77:1418-1421.
- [64] Althausen S, Mengesdorf T, Mies G, et al. Changes in the phosphorylation of initiation factor eIF-2 α , elongation factor eEF-2 and p70 S6 kinase after transient focal cerebral ischaemia in mice. *J Neurochem*, 2001, 78:779-787.
- [65] Hu BR, Martone ME, Jones YZ, et al. Protein aggregation after transient cerebral ischemia. *J Neurosci*, 2000, 20:3191-3199.
- [66] Chan SL, Mattson MP. Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res*, 1999, 58:167-190.
- [67] Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families: activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*, 2000, 150:887-894.
- [68] Renolleau S, Benjelloun N, Ben-Ari Y, et al. Regulation of apoptosis-associated proteins in cell death following transient focal ischemia in rat pups. *Apoptosis*, 1997, 2:368-376.
- [69] Fortin A, Cregan SP, MacLaurin JG, et al. APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. *J Cell Biol*, 2001, 155:207-216.
- [70] Cheng T, Liu D, Griffin JH, et al. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med*, 2003, 9:338-342.
- [71] Endo H, Kamada H, Nito C, et al. Mitochondrial translocation of p53 mediates release of c and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats. *J Neurosci*, 2006, 26:7974-7983.
- [72] Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*, 2002, 9:459-470.
- [73] Hermann DM, Kilic E, Hata R, et al. Relationship between metabolic dysfunction, gene responses and delayed cell death after mild focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience*, 2001, 104:947-955.
- [74] Niwa M, Hara A, Iwai T, et al. Caspase activation as an apoptotic evidence in the gerbil hippocampal CA1 pyramidal cells following transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett*, 2001, 300:103-106.
- [75] Davoli MA, Fourtounis J, Tam J, et al. Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat. *Neuroscience*, 2002, 115:125-136.
- [76] Gillardon F, Kiprianova I, Sandkühler J, et al. Inhibition of caspase prevents cell death of hippocampal CA1 neurons, but not impairment of hippocampal long-term potentiation following global ischemia. *Neuroscience*, 1999, 93:1219-1222.
- [77] Love S, Barber R, Wilcock GK. Neuronal death in brain infarcts in man. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2000, 26:55-66.
- [78] Zhu C, Wang X, Xu F, et al. The influence of age apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ*, 2005, 12:162-176.
- [79] Gill R, Soriano M, Blomgren K, et al. Role of caspase-3 activation in cerebral ischemia-induced neurodegeneration in adult and neonatal brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22:420-430.
- [80] Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 2000, 407:802-809.
- [81] Ferrer I, Planas AM. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2003, 62:329-339.
- [82] O'Reilly LA, Print C, Hausmann G, et al. Tissue expression and subcellular localization of the pro-survival molecule Bcl-w. *Cell Death Differ*, 2001, 8:486-494.
- [83] Gibson ME, Han BH, Choi J, et al. BAX contributes to apoptotic-like death following neonatal hypoxia-ischemia: evidence for distinct apoptosis pathway. *Mol Med*, 2001, 7:644-655.
- [84] Kermer P, Digicaylioglu MH, Kaul M, et al. BAG1 over-expression in brain protects against stroke. *Brain Pathol*, 2003, 13:495-506.
- [85] Wilkinson JC, Wilkinson AS, Scott FL, et al. Neutralization of Smac/Diablo by inhibitors of apoptosis (IAPs): a caspase-independent mechanism for apoptotic inhibition. *J Biol Chem*, 2004, 279:51082-51090.
- [86] Eberhardt O, Coelln RV, Kugler S, et al. Protection by synergistic effects of adenovirus-mediated X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis and glial cell line-derived neurotrophic factor gene transfer in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 2000, 20:9126-9134.
- [87] Siegelin M, Touzani O, Toutain J, et al. Induction and redistribution of XAF1, a new antagonist of XIAP in the rat brain after transient focal ischemia. *Neurobiol Dis*, 2005, 20:509-518.
- [88] Saito A, Hayashi T, Okuno S, et al. Oxidative stress is associated with XIAP and Smac/DIABLO signaling pathways in mouse brains after transient focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2004, 35:1443-1448.
- [89] Siegelin MD, Kossatz LS, Winckler J, et al. Regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neurochem Int*, 2005, 46:41-51.
- [90] Wang X, Zhu C, Wang X, et al. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) protein protects against caspase activation and tissue loss after neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol Dis*, 2004, 16:179-189.
- [91] Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 2000, 290:1717-1721.
- [92] Tsujimoto Y, Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ*, 2005, 12 Suppl 2:1528-1534.
- [93] Eskelinen EL. Doctor Jekyll and Mister Hyde: autophagy can promote both cell survival and cell death. *Cell Death Differ*, 2005, 12 Suppl 2:1468-1472.

- [94] Komatsu M, Waguri S, Chiba T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 2006, 441:880-884.
- [95] Ogata M, Hino S, Saito A, et al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*, 2006, 26:9220-9231.
- [96] Rami A. Upregulation of Beclin 1 in the ischemic penumbra. *Autophagy*, 2008, 4:227-229.
- [97] Rami A, Langhagen A, Steiger S. Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death. *Neurobiol Dis*, 2008, 29:132-141.
- [98] Zhang HM, Cheung P, Yanagawa B, et al. BNIPs: a group of pro-apoptotic proteins in the Bcl-2 family. *Apoptosis*, 2003, 8: 229-236.
- [99] Azad MB, Chen Y, Henson ES, et al. Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. *Autophagy*, 2008, 4:195-204.
- [100] Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA. The interplay between pro-death and pro-survival signaling pathways in myocardial ischemia/reperfusion injury: apoptosis meets autophagy. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2006, 20:445-462.
- [101] Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE, et al. Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ*, 2007, 14:146-157.
- [102] Adhami F, Schloemer A, Kuan CY. The roles of autophagy in cerebral ischemia. *Autophagy*, 2007, 3:42-44.
- [103] Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci*, 1997, 20:132-139.
- [104] White PM, Wardlaw JM, Easton V. Can noninvasive imaging accurately depict intracranial aneurysms? A systematic review. *Radiology*, 2000, 217:361-370.
- [105] Nita DA, Nita V, Spulber S, et al. Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion: a biochemical study in rat. *J Cell Mol Med*, 2001, 5:163-170.
- [106] Liu S, Liu M, Peterson S, et al. Hydroxyl radical formation is greater in striatal core than in penumbra in a part model of ischemic stroke. *J Neurosci Res*, 2007, 71:882-888.
- [107] Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, et al. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:7162-7166.
- [108] Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, et al. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science*, 1994, 263:973-977.
- [109] Babaei S, Stewart DJ. Overexpression of endothelial NO synthase induces angiogenesis in a co-culture model. *Cardiovasc Res*, 2002, 55:190-200.
- [110] Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, et al. Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci*, 1993, 13:2651-2661.
- [111] Eliasson MJ, Huang Z, Ferrante RJ, et al. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *J Neurosci*, 1999, 19: 5910-5918.
- [112] Hara H, Huang PL, Panahian N, et al. Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996, 16:605-611.
- [113] Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, et al. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol*, 2001, 153:543-553.
- [114] Saito S, Miyoshi S, Yoshikawa D, et al. Regional cerebral oxygen saturation during electroconvulsive therapy: monitoring by near-infrared spectrophotometry. *Anesth Analg*, 1996, 83: 726-730.
- [115] Madrigal JL, Hurtado O, Moro MA, et al. The increase in TNF-alpha levels is implicated in NF-kappaB activation and inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after immobilization stress. *Neuropsychopharmacology*, 2002, 26:155-163.
- [116] Nogawa S, Forster C, Zhang F, et al. Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:10966-10971.
- [117] Miettinen S, Fusco FR, Yrjänheikki J, et al. Spreading depression and focal brain ischemia induce cyclooxygenase-2 in cortical neurons through N-methyl-D-aspartic acid-receptors and phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:6500-6505.
- [118] Iadecola C, Zhang F, Xu X. Role of nitric oxide synthase-containing vascular nerves in cerebrovasodilation elicited from cerebellum. *Am J Physiol*, 1993, 264(4 Pt 2):R738-746.
- [119] Chen J, Zacharek A, Zhang C, et al. Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice. *J Neurosci*, 2005, 25: 2366-2375.
- [120] Beckman JS, Beckman TW, Chen J, et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:1620-1624.
- [121] Zouki C, Zhang SL, Chan JS, et al. Peroxynitrite induces integrin-dependent adhesion of human neutrophils to endothelial cells via activation of the Raf-1/MEK/Erk pathway. *FASEB J*, 2001, 15:25-27.
- [122] Niizuma K, Endo H, Chan P. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J Neurochem*, 2009, 109:133-138.
- [123] Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol*, 1999, 9:119-131.
- [124] Lambeth JD, Krause KH, Clark RA. NOX enzymes as novel targets for drug development. *Semin Immunopathol*, 2008, 30: 339-363.
- [125] Tan NS, Michalik L, Desvergne B, et al. Genetic or transforming growth factor-beta1-induced changes in epidermal peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta expression dictate wound repair kinetics. *J Biol Chem*, 2005, 280:18163-18170.
- [126] Brennan AM, Suh SW, Won SJ, et al. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci*, 2009, 12:857-863.
- [127] Girouard H, Wang G, Gallo EF, et al. NMDA receptor activation increase free radical production through nitric oxide and NOX2. *J Neurosci*, 2009, 29:2545-2552.
- [128] Breckwoldt MO, Chen JW, Stangenberg L, et al. Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme myeloperoxidase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105:18584-18589.
- [129] Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, et al. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med*, 2003, 349:1595-1604.
- [130] Schaller B. Prospects for the future: the role of free radicals in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38:411-425.
- [131] Huang J, Agus DB, Winfree CJ, et al. Dehydroascorbic acid, a blood-brain barrier transportable form of vitamin C, mediates potent cerebroprotection in experimental stroke. *Proc Natl*

- Acad Sci USA, 2001, 98:11720-11724.
- [132] Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Spinnewyn B, et al. Neuroprotective effects of bilobalide, a component of the Ginkgo biloba extract (EGb 761), in gerbil global brain ischemia. *Brain Res Dev Brain Res*, 2001, 922:282-292.
- [133] Kinouchi H, Epstein CJ, Mizui T, et al. Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpression Cuzn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 11158-11162.
- [134] Yang G, Chan P, Chen J, et al. Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 1994, 25:165-170.
- [135] Kawase M, Murakami K, Fujimura M, et al. Exacerbation of delayed cell injury after transient global ischemia in mutant mice with Cuzn superoxide dismutase deficiency. *Stroke*, 1999, 30:1962-1968.
- [136] Gasche Y, Copin JC, Sugawara T, et al. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress - associated blood-brain barriers disruption after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21:1393-1400.
- [137] Saito A, Hayashi T, Okuno S, et al. Modulation of the Omi/HtrA2 signaling pathway after transient focal cerebral ischemia in mouse brains that overexpress SOD1. *Brain Res Mol Brain Res*, 2004, 127(1/2):89-95.
- [138] Kim DW, Eum WS, Jang SH, et al. Transduced Tat-SOD fusion protein protects against ischemic brain injury. *Mol Cells*, 2005, 19:88-96.
- [139] Kilic U, Kilic E, Dietz GP, et al. Intravenous TAT-GANF is protective after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*, 2003, 34:1304-1310.
- [140] Sheng H, Brady TC, Pearlstein RD, et al. Extracellular superoxide dismutase deficiency worsens outcome from focal cerebral ischemia in the mouse. *Neurosci Lett*, 1999, 267:13-16.
- [141] Fullerton HJ, Ditelberg JS, Chen SF, et al. Copper/zinc superoxide dismutase transgenic brain accumulates hydrogen peroxide after perinatal hypoxia ischemia. *Ann Neurol*, 1998, 44:357-364.
- [142] Patenaude A, Murthy MR, Mirault ME. Emerging roles of thioredoxin cycle enzymes in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62:1063-1080.
- [143] Mitsui A, Hamuro J, Nakamura H, et al. Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span. *Antioxid Redox Signal*, 2002, 4:693-696.
- [144] Takagi Y, Mitsui A, Nishiyama A, et al. Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:4131-4136.
- [145] Schroeter H, Boyd C, Spencer JP, et al. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol Aging*, 2002, 23:861-880.
- [146] Chung JH, Han JH, Hwang ET, et al. Dual mechanisms of green tea extract (EGEG) - induced cell survival in human epidermal keratinocytes. *FASEB J*, 2003, 17:1913-1915.
- [147] Nie G, Jin C, Cao Y, et al. Distinct effects of tea catechins on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 397:84-90.
- [148] Guo S, Yan J, Yang T, et al. Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway. *Biol Psychiatry*, 2007, 62:1353-1362.
- [149] Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*, 1991, 77:1627-1652.
- [150] Yang GY, Zhao YJ, Davidson BL, et al. Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in the mouse brain reduces ischemic brain injury. *Brain Res*, 1997, 751:181-188.
- [151] Robinson KA, Stewart CA, Pye QN, et al. Redox-sensitive protein phosphatase activity regulates the phosphorylation state of p38 protein kinase. *J Neurosci Res*, 1999, 55:724-732.
- [152] Castillo J, Rodríguez I. Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischaemia: molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice. *Cerebrovasc Dis*, 2004, 17 Suppl 1:7-18.
- [153] Schindler R, Mancilla J, Endres S, et al. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*, 1990, 75:40-47.
- [154] Kolesnick R, Golde DW. The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell*, 1994, 77:325-328.
- [155] Heller RA, Krönke M. Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J Cell Biol*, 1994, 126:5-9.
- [156] Beutler B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J Investig Med*, 1995, 43:227-235.
- [157] Klempt ND, Sirimanne E, Gunn AJ, et al. Hypoxia-ischemia induces transforming growth factor beta 1 mRNA in the infant rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 1992, 13(1/2):93-101.
- [158] Johnston RE, Dillon-Carter O, Freed WJ, et al. Trophic factor secreting kidney cell lines: in vitro characterization and functional effects following transplantation in ischemic rats. *Brain Res*, 2001, 900:268-276.
- [159] Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 1998, 392:565-568.
- [160] Furie MB, Randolph GJ. Chemokines and tissue injury. *Am J Pathol*, 1995, 146:1287-1301.
- [161] Losy J, Zaremba J. Monocyte chemoattractant protein-1 is increased in the cerebrospinal fluid of patients with ischemic stroke. *Stroke*, 2001, 32:2695.
- [162] Liu T, Clark RK, McDonnell PC, et al. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke*, 1994, 25:1481-1488.
- [163] Sica A, Matsushima K, Van Damme J, et al. IL-1 transcriptionally activates the neutrophil chemotactic factor/IL-8 gene in endothelial cells. *Immunology*, 1990, 69:548-553.
- [164] Kim JS, Gautam SC, Chopp M, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. *J Neuroimmunol*, 1995, 56:127-134.
- [165] Kochanek PM, Hallenbeck JM. Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke*, 1992, 23:1367-1379.
- [166] Schwab JM, Beschoner R, Meyermann R, et al. Persistent accumulation of cyclooxygenase-1-expressing microglial cells and macrophages and transient upregulation by endothelium in human brain injury. *J Neurosurg*, 2002, 96:892-899.
- [167] Iadecola C, Sugimoto K, Niwa K, et al. Increased susceptibility to ischemic brain injury in cyclooxygenase-1-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21:1436-1441.
- [168] Candelario-Jalil E, González-Falcón A, García-Cabrera M, et al. Assessment of the relative contribution of COX-1 and COX-2 isoforms to ischemia-induced oxidative damage and neurodegeneration following transient global cerebral ischemia. *J Neurochem*, 2003, 86:545-555.
- [169] Krumbholz M, Theil D, Cepok S, et al. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain*,

- 2006, 129(Pt 1):200-211.
- [170] Peng H, Erdmann N, Whitney N, et al. HIV-1-induced and/or immune activated macrophages regulate astrocyte SDF - 1 production through IL-1 beta. *Glia*, 2006, 54:619-629.
- [171] Grunewald M, Avraham I, Dor Y, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*, 2006, 124:175-189.
- [172] Salcedo R, Wasserman K, Young HA, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: in vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1 alpha. *Am J Pathol*, 1999, 154:1125-1135.
- [173] Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol*, 2007, 28:299-307.
- [174] Butler JM, Guthrie SM, Koc M, et al. SDF-1 is both necessary and sufficient to promote proliferative retinopathy. *J Clin Invest*, 2005, 115:86-93.
- [175] Tsutsumi H, Tanaka T, Ohashi N, et al. Therapeutic potential of the chemokine receptor CXCR4 antagonists as multifunctional agents. *Biopolymers*, 2007, 88:279-289.
- [176] Feuerstein GZ, Liu T, Barone FC. Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor - alpha. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 1994, 6:341-360.
- [177] Motoyama N, Wang F, Roth KA, et al. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science*, 1995, 267:1506-1510.
- [178] Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules. Part II: blood vessels and blood cells. *N Engl J Med*, 1996, 335:43-45.
- [179] Wagner S, Tagaya M, Koziol JA, et al. Rapid disruption of an astrocyte interaction with the extracellular matrix mediated by integrin alpha 6 beta 4 during focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke*, 1997, 28:858-865.
- [180] Okada Y, Copeland BR, Hamann GF, et al. Integrin alphavbeta3 is expressed in selected microvessels after focal cerebral ischemia. *Am J Pathol*, 1996, 149:37-44.
- [181] Hidai C, Zupancic T, Penta K, et al. Cloning and characterization of developmental endothelial locus - 1: an embryonic endothelial cell protein that binds the alphavbeta3 integrin receptor. *Genes Dev*, 1998, 12:21-33.
- [182] Aoka Y, Johnson FL, Penta K, et al. The embryonic angiogenic factor Del 1 accelerates tumor growth by enhancing vascular formation. *Microvasc Res*, 2002, 64:148-161.
- [183] Ho HK, Jang JJ, Kaji S, et al. Development endothelial locus-1 (Del - 1), a novel angiogenic protein: its role in ischemia. *Circulation*, 2004, 109:1314-1319.
- [184] Zhong J, Eliceiri B, Stupack D, et al. Neovascularization of ischemia tissues by gene delivery of the extracellular matrix protein Bel-1. *J Clin Invest*, 2003, 112:30-41.
- [185] Kwon MH, Suzuki T, Koransky ML, et al. Comparison of development endothelial locus - 1 angiogenic factor with vascular endothelial growth factor in a porcine model of cardiac ischemia. *Ann Thorac Surg*, 2003, 76:1246-1251.
- [186] Fan Y, Zhu W, Yang M, et al. Del-1 gene transfer induces cerebral angiogenesis in mice. *Brain Res*, 2008, 1219:1-7.
- [187] Choi NK, Park BJ, Jeong SW, et al. Nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs and hemorrhagic stroke risk: the Acute Brain Bleeding Analysis Study. *Stroke*, 2008, 39:845-849.
- [188] Wieloch T, Bergstedt K, Hu BR. Protein phosphorylation and the regulation of mRNA translation following cerebral ischemia. *Prog Brain Res*, 1993, 96:179-191.
- [189] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinase. *Science*, 2002, 298:1911-1912.
- [190] Cao G, Minami M, Pei W, et al. Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia: implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21:321-333.
- [191] Cheung EC, Slack RS. Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis. *Sci STKE*, 2004, (251):PE45.
- [192] Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, et al. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature*, 1990, 343:651-653.
- [193] Akins PT, Liu PK, Hsu CY. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia: friend or foe? *Stroke*, 1996, 27:1682-1687.
- [194] Akopov SE, Simonian NA, Grigorian GS. Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. *Stroke*, 1996, 27:1739-1743.
- [195] Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, et al. Local distribution of microglia in the normal adult human central system differs by up to an order of magnitude. *Acta Neuropathol*, 2001, 101:249-255.
- [196] Rock RB, Gekker G, Hu S, et al. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17:942-964.
- [197] Lai AY, Todd KG. Hypoxia-activated microglial mediators of neuronal survival are differentially regulated by tetracyclines. *Glia*, 2006, 53:809-816.
- [198] Faraco G, Fossati S, Bianchi ME, et al. High mobility group box 1 protein is released by neural cells upon different stresses and worsens ischemic neurodegeneration in vitro and in vivo. *J Neurochem*, 2007, 103:590-603.
- [199] Green AR, Shuaib A. Therapeutic strategies for the treatment of stroke. *Drug Discov Today*, 2006, 11:681-693.
- [200] del Zoppo GJ. Stroke and neurovascular protection. *N Engl J Med*, 2006, 354:553-555.
- [201] Grant DS, Kleinman HK. Regulation of capillary formation by laminin and other components of the extracellular matrix. *EXS*, 1997, 79:317-333.
- [202] Hurwitz AA, Berman JW, Rashbaum WK, et al. Human fetal astrocytes induces the expression of blood-brain barrier specific proteins by autologous endothelial cells. *Brain Res*, 1993, 625:238-243.
- [203] Mabuchi T, Lucero J, Feng A, et al. Focal cerebral ischemia preferentially affects neurons distant from their neighboring microvessels. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25:257-266.
- [204] Milner R, Hung S, Wang X, et al. The rapid decrease in astrocyte-associated dystroglycan expression by focal cerebral ischemia is protease-dependent. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28:812-813.
- [205] Kontos CD, Wei EP, Williams JI, et al. Cytochemical detection of superoxide in cerebral inflammation and ischemia in vivo. *Am J Physiol*, 1992, 263(4 Pt 2):H1234-1242.
- [206] European Stroke Initiative Executive Committee, EUSI Writing Committee, Olsen TS, et al. European Stroke Initiative Recommendations for Stroke Management - Update 2003. *Cerebrovasc Dis*, 2003, 16:311-337.
- [207] Gursoy-Ozdemir Y, Qiu J, Matsuoka N, et al. Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9. *J Clin Invest*, 2004, 113:1447-1455.
- [208] Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*, 2005, 57:173-185.
- [209] Lai CH, Kuo KH. The critical component to establish in vitro

- BBB model: pericyte. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005, 50:258-265.
- [210] Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, et al. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol*, 2007, 27:687-694.
- [211] Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 279:G250-254.
- [212] Roberts HC, Roberts TP, Brasch RC, et al. Quantitative measurement of microvascular permeability in human brain tumors achieved using dynamic contrast - enhanced MR imaging: correlation with histologic grade. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2000, 21:891-899.
- [213] Law M, Yang S, Babb JS, et al. Comparison of cerebral blood volume and vascular permeability from dynamic susceptibility contrast - enhanced perfusion MR imaging with glioma grade. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2004, 25:746-755.
- [214] Vorbodt AW, Dobrogowska DH. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. *Brain Res Brain Res Rev*, 2003, 42:221-242.
- [215] Brew K, Dinakarpanian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1477(1/2):267-283.
- [216] Overall CM, López-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post - trial era. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2:657-672.
- [217] Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:5578-5582.
- [218] Apte SS, Olsen BR, Murphy G. Metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem*, 1996, 271:2874.
- [219] Wetzel M, Rosenberg GA, Cunningham LA. Tissue inhibitor of metalloproteinases -3 and matrix metalloproteinase -3 regulate neuronal sensitivity to doxorubicin - induced apoptosis. *Eur J Neurosci*, 2003, 18:1050-1060.
- [220] Lee SR, Tsuji K, Lee SR, et al. Role of matrix metalloproteinases in delayed neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *J Neurosci*, 2004, 24:671-678.
- [221] Jourquin J, Tremblay E, Décanis N, et al. Neuronal activity - dependent increase of net matrix metalloproteinase activity is associated with MMP - 9 neurotoxicity after kainate. *Eur J Neurosci*, 2003, 18:1507-1517.
- [222] Rivera S, Ogier C, Jourquin J, et al. Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell - and time - dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia. *Eur J Neurosci*, 2002, 15:19-32.
- [223] Wallace JA, Alexander S, Estrada EY, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase -3 is associated with neuronal death in reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22:1303-1310.
- [224] Planas AM, Solé S, Justicia C. Expression and activation of matrix metalloproteinase -2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*, 2001, 8:834-846.
- [225] Rosell A, Ortega - Aznar A, Alvarez - Sabín J, et al. Increase brain expression of matrix metalloproteinase -9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke*, 2006, 37:1399-1406.
- [226] Rosell A, Cuadrado E, Ortega - Aznar A, et al. MMP-9-positive neurophil infiltration is associated to blood - brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke*, 2008, 39:1121-1126.
- [227] Gurney KJ, Estrada EY, Rosenberg GA. Blood - brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation. *Neurobiol Dis*, 2006, 23:87-96.
- [228] Harris AK, Ergul A, Kozak A, et al. Effect of neutrophil depletion on gelatinase expression, edema formation and hemorrhagic transformation after focal ischemic stroke. *BMC Neurosci*, 2005, 6:49.
- [229] Rosenberg GA, Estrada EY, Mobashery S. Effect of synthetic matrix metalloproteinase inhibitors on lipopolysaccharide - induced blood-brain barrier opening in rodents: differences in response based on strains and solvents. *Brain Res*, 2007, 1133:186-192.
- [230] Montaner J, Molina CA, Monasterio J, et al. Matrix metalloproteinase - 9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation*, 2003, 107:598-603.
- [231] Harkness KA, Adamson P, Sussman JD, et al. Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinase expression in CNS vascular endothelium. *Brain*, 2000, 123(Pt 4):698-709.
- [232] Lin TN, Sun SW, Cheung WM, et al. Dynamic changes in cerebral blood flow and angiogenesis after transient focal cerebral ischemia in rats: evaluation with serial magnetic resonance imaging. *Stroke*, 2002, 33:2985-2991.
- [233] Heissig B, Hattori K, Friedrich M, et al. Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases. *Curr Opin Hematol*, 2003, 10:136-141.
- [234] Lo EH, Rogowska J, Bogorodski P, et al. Temporal correlation analysis of penumbral dynamics in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996, 16:60-68.
- [235] Koenig M, Kraus M, Theek C, et al. Quantitative assessment of the ischemic brain by means of perfusion - related parameters derived from perfusion CT. *Stroke*, 2001, 32:431-437.
- [236] Wintermark M, Flanders AE, Velthuis B, et al. Perfusion - CT assessment of infarct core and penumbra: receiver operating characteristic curve analysis in 130 patients suspected of acute hemispheric stroke. *Stroke*, 2006, 37:979-985.
- [237] Derex L, Nighoghossian N, Hermier M, et al. Thrombolysis for ischemic stroke in patients with old microbleeds on pretreatment MRI. *Cerebrovasc Dis*, 2004, 17:238-241.
- [238] Rauscher A, Sedlacik J, Deistung A, et al. Susceptibility weighted imaging: data acquisition, image reconstruction and clinical applications. *Z Med Phys*, 2006, 16:240-250.
- [239] Heiss WD, Sorensen AG. Advances in imaging. *Stroke*, 2009, 40:E313-314.
- [240] Ackerman RH, Correia JA, Alpert NM, et al. Positron imaging in ischemic stroke disease using compounds labeled with oxygen 15: initial results of clinicopsiologic correlations. *Arch Neurol*, 1981, 38:537-543.
- [241] Heiss WD. Ischemic penumbra: evidence from functional imaging in man. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20:1276-1293.
- [242] Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 1999, 22:391-397.
- [243] Masdeu JC, Irimia P, Asenbaum S, et al. EFNS guideline on neuroimaging in acute stroke: report of an EFNS task force. *Eur J Neurol*, 2006, 13:1271-1283.
- [244] Albers GW, Thijs VN, Wechsler L, et al. Magnetic resonance imaging profiles predict clinical response to early

- reperfusion: the diffusion and perfusion imaging evaluation for understanding stroke evolution (DEFVSE) study. *Ann Neurol*, 2006, 60:508-517.
- [245] Santosh C, Brennan D, McCabe C, et al. Potential use of oxygen as a metabolic biosensor in combination with 72⁺-weighted MRI to define the ischemic penumbra. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28:1742-1753.
- [246] Arai T, Nakao S, Mori K, et al. Cerebral oxygen utilization analyzed by the use of oxygen-17 and its nuclear magnetic resonance. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 169:153-158.
- [247] Weinstein JS, Varallyay CG, Dosa E, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: diagnostic magnetic resonance imaging and potential therapeutic applications in neurooncology and central nervous system inflammatory pathologies, a review. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, [Epub ahead of print]
- [248] Heiss WD, Sobesky J, Hesselmann V. Identifying thresholds for penumbra and irreversible trissue damage. *Stroke*, 2004, 35 (11 Suppl 1):2671-2674.
- [249] Saita K, Chen M, Spratt NJ, et al. Imaging the ischemic penumbra with 18F-fluoromisonidazole in a rat model of ischemic stroke. *Stroke*, 2004, 35:975-980.
- [250] Takasawa M, Beech JS, Fryer TD, et al. Imaging of brain hypoxia in permanent and temporary middle cerebral artery occlusion in the rat using 18F-fluoromisonidazole and positron emission tomography: a pilot study. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27:679-689.
- [251] Touzani O, Young AR, Derlon JM, et al. Sequential studies of severely hypometabolic tissue volumes after permanent middle cerebral artery occlusion: a positron emission tomographic investigation in anesthetized baboons. *Stroke*, 1995, 26:2112-2119.
- [252] Heiss WD, Graf R, Wienhard K, et al. Dynamic penumbra demonstrated by sequential multitracer PET after middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1994, 14:892-902.

(收稿日期:2009-12-19)

· 专题小词典 ·

中英文对照名词词汇(一)

(按汉语拼音字母顺序排列)

- 阿片样受体 opioid receptor like(ORL1)
- 阿替普酶溶栓治疗急性缺血性卒中
Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke(ATLANTIS)
- γ-氨基丁酸 γ-aminobutyric acid(GABA)
- 氨基多糖 glycosaminoglycan (GAG)
- C-Jun 氨基末端激酶 C-Jun N-terminal kinase(JNK)
- α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异唑丙酸
α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA)
- 白细胞功能相关抗原-1
leukocyte function associated antigen-1(LFA-1)
- 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 caspases
- 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶激活的脱氧核糖核酸酶
caspase-activated deoxyribonuclease(CAD)
- 半球切除术治疗大脑中动脉梗死伴致死性脑水肿试验
Hemicraniectomy after Middle Cerebral Artery Infarction with Life-Threatening Edema Trial(HAMLET)
- 北美放射学会
Radiological Society of North America(RSNA)
- 北美脊柱学会 North American Spine Society(NASS)
- 北美症状性颈动脉内膜切除术试验
North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET)
- 比较基因组杂交 comparative genomic hybridization(CGH)
- 闭锁小带蛋白 1 zonula occludens protein 1(ZO-1)
- 表观扩散系数 apparent diffusion coefficient(ADC)
- 表皮生长因子 epidermal growth factor(EGF)
- 表皮生长因子受体
epidermal growth factor receptor(EGFR)
- Hallervorden-Spatz 病 Hallervorden-Spatz disease(HSD)
- 部分各向异性 fractional anisotropy(FA)
- 残端压力 interface pressure(IP)
- 苍白球内侧部 globus pallidus interuns(Gpi)
- 层面选择可调翻转角绝缘低能量激发
slice selective tunable-flip adiabatic low peak power excitation(STABLE)
- 常染色体显性遗传性脑动脉病伴皮质下脑梗死和白质脑病
cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy(CADASIL)
- 超顺磁性氧化铁 superparamagnetic iron oxide(SPIO)
- 超氧化物歧化酶 superoxide dismutase(SOD)
- 重叠支架 stent-within-a-stent(SWS)
- 重复神经电刺激 repetitive nerve stimulation(RNS)
- 重组活化凝血因子Ⅶ治疗急性脑出血试验
Recombinant Activated Factor Ⅶ for Acute Hemorrhagic Stroke Trial(FAST)
- 重组人骨形态发生蛋白-2
recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2)
- 重组人生长分化因子-5
recombinant human growth and differentiation factor-5 (rhGDF-5)
- 重组组织型纤溶酶原激活物
recombinant tissue-type plasminogen activator(rt-PA)
- 迟发性肌张力障碍 tardive dystonia(TD)
- 持续多巴胺能刺激
continuous dopaminergic stimulation(CDS)
- 持续性植物状态 persistent vegetative state(PVS)
- 抽动秽语综合征 tourette syndrome(TS)
- 垂体腺苷酸环化酶激活肽
pituitary adenylate cyclase activating polypeptide(PACAP)