

· 基础研究 ·

高压氧治疗对大鼠脑梗死后大脑皮质病理改变的影响

陈胜利 李长清 陈康宁 张书琼

【摘要】目的 探讨高压氧治疗对脑梗死大鼠大脑皮质病理改变的影响。**方法** 选择 48 只健康的雄性 Sprague-Dawley 大鼠,用线栓法制作大脑中动脉闭塞模型,缺血 2 h 后实现再灌注。将造模大鼠分为高压氧治疗组(治疗组)和模型对照组(模型组),治疗组给予高压氧治疗。分别于再灌注后第 48 小时、第 7 天、第 14 天取材,在光学显微镜和电子显微镜下观察其大脑皮质的形态学改变。**结果** 治疗组脑梗死体积率为 $(20.15 \pm 1.58)\%$,明显小于模型组的 $(32.09 \pm 1.19)\%$,2 组差异有统计学意义($P < 0.01$);治疗组细胞的肿胀程度、细胞膜结构的改变、细胞核及细胞器的病理改变均明显较模型组轻。**结论** 高压氧治疗对脑缺血急性期的神经细胞具有保护作用。

【关键词】 高压氧; 大鼠; 脑梗死; 病理; 超微结构

The effect of hyperbaric oxygen therapy on neurons in the cortex after cerebral ischemia CHEN Sheng-li*, LI Chang-qing, CHEN Kang-ning, ZHANG Shu-qiong. *Department of Neurology, Sanxia Central Hospital, Chongqing 404000, China

Corresponding author: LI Chang-qing, Email: licq9217@163.com

【Abstract】Objective To evaluate the effect of hyperbaric oxygen (HBO) therapy on pathological and ultrastructure changes in cortical neurons after model focal cerebral ischemia. **Methods** Middle cerebral artery occlusion (MCAO) using the Zea-Longa method was administered to 48 Sprague-Dawley rats, who were subjected to cerebral ischemia for 2 hours followed by reperfusion. They were then randomly divided into a treatment group and a control group. HBO was applied to the rats in the treatment group, and any changes in the pathology and ultrastructure of neurons in the cortex were observed at preset time points. **Results** The infarct volume was significantly smaller in the treatment group than in the control group, and pathological changes in brain tissue were also milder. **Conclusions** HBO could help protect cortical neurons in acute cerebral ischemia.

【Key words】 Hyperbaric oxygen; Cerebral infarct; Pathology; Cortical ultrastructure

脑梗死是中老年人的常见病和多发病,其发病占脑血管病的 75%。近年来,国内外广泛应用高压氧疗法辅助治疗脑梗死,对神经功能的恢复疗效较好,但高压氧治疗脑梗死的机制有待进一步明确。本研究探讨了高压氧对脑梗死大鼠模型大脑皮质的影响,为高压氧治疗脑梗死提供实验依据。

材料与方法

一、实验动物分组

选用清洁级健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 48 只,体重 250 ~ 300 g,由第三军医大学野战外科研究所动物中心提供。将大鼠分为高压氧治疗组(治疗组)和

模型对照组(模型组),每组 24 只。

二、动物模型制备

2 组大鼠均参照 Longa 线栓法^[1]制备大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)再灌注模型,缺血 2 h 后实现再灌注。治疗组造模成功后接受 HBO 治疗,模型组造模成功后除不给予 HBO,余处理与治疗组完全相同。各时间点的确认从完成皮肤缝合开始计算。

三、HBO 治疗方法

采用烟台产专用实验动物氧舱,由第三军医大学西南医院高压氧舱室提供,纯氧舱洗舱 10 min 后匀速加压 10 min,使舱内压力达到治疗压力 2.0 ATA,吸氧时间为 120 min,最后 20 min 匀速减压至常压。HBO 治疗每日 1 次,直至实验终点。

四、检测指标

1. 脑梗死体积率的测定:采用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride, TTC)染色方法^[2]。模型组和治疗组于造模后 48 h

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.04.007

作者单位:404000 重庆,重庆三峡中心医院神经内科(陈胜利、张书琼);重庆医科大学附属第二医院神经内科(李长清);第三军医大学西南医院神经内科(陈康宁)

通信作者:李长清,Email:licq9217@163.com

评分,然后每组处死 6 只大鼠,肉眼观察大脑中动脉有无缺血;去掉低位脑干和小脑,取冠状切面下厚约 2 mm 的脑切片 5 张;置于 2% 的 TTC 溶液中在 37 ℃ 下孵育 15 ~ 20 min;放入 4% 多聚甲醛固定 24 h 后观察并拍照。TTC 是一种水溶性盐类物质,它可以与活细胞线粒体脱氢酶反应生成深红色脂溶性物质,死亡细胞由于线粒体内脱氢酶失活而不显色,即正常组织染成均匀的桔红色,而梗死灶呈白色。用 Olympus Imaging Pro Plus 图像分析系统进行处理,计算每张脑片半球的梗死面积(用损伤对侧半球的面积减去损伤侧 TTC 染色正常区的面积),每张冠状脑片梗死面积乘以其厚度即为其体积,所有冠状脑片体积之和即为梗死体积。

2. 光镜下观察:2 组动物分别于缺血再灌注第 48 小时、第 7 天和第 14 天,用水合氯醛麻醉,4% 多聚甲醛灌注固定后,迅速断头取脑,每组 6 只大鼠,连续冠状切片(厚约 2 mm);置入固定液中后固定 48 h,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,浸蜡、包埋、切片(片厚 5 μ m),H-E 染色后封片,于光镜下观察病变区及附近脑组织的病理变化。

3. 电镜下观察:2 组动物在缺血再灌注第 48 小时用水合氯醛麻醉,打开胸腔暴露心脏,经左心室插管至主动脉起始处,剪开右心耳,进行灌注固定,灌注压为 110 mmHg,首先用生理盐水 200 ~ 300 ml 快速冲洗,至右心耳流出清亮液体,再用 25% 的戊二醛进行原位固定,至动物全身僵硬后迅速断头取脑。在缺血区取数块大小 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 的标本,放入相同的固定液中后固定 2 ~ 4 h;用 4 ℃ 的 0.01 mol/L PBS(pH 值 7.25 ~ 7.35)溶液反复冲洗,浸泡 12 h,1% 锇酸固定 2 h,丙酮脱水,环氧树脂 618 包埋;解剖显微镜下修整,制成超薄切片,3% 柠檬酸加 0.1% 醋酸铀双重电子染色,透射电镜下观察并拍照。

五、统计学分析

计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 11.0 版软件包进行统计学分析,采用 t 检验或非参检验比较组间差异, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、脑梗死体积率

缺血再灌注第 48 小时,大体标本可以看到缺血脑组织对侧体积增大,TTC 染色呈白色梗死灶,周围正常组织呈红色(图 1)。缺血第 48 小时治疗组脑梗死体积率为 $(20.15 \pm 1.58)\%$,明显小于模型组的 $(32.09 \pm 1.19)\%$,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示高压氧治疗可促进脑梗死体积缩小。

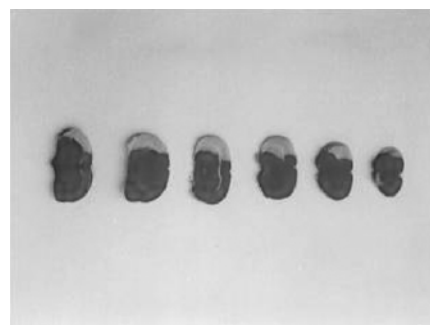


图 1 TTC 染色局灶性脑缺血图片

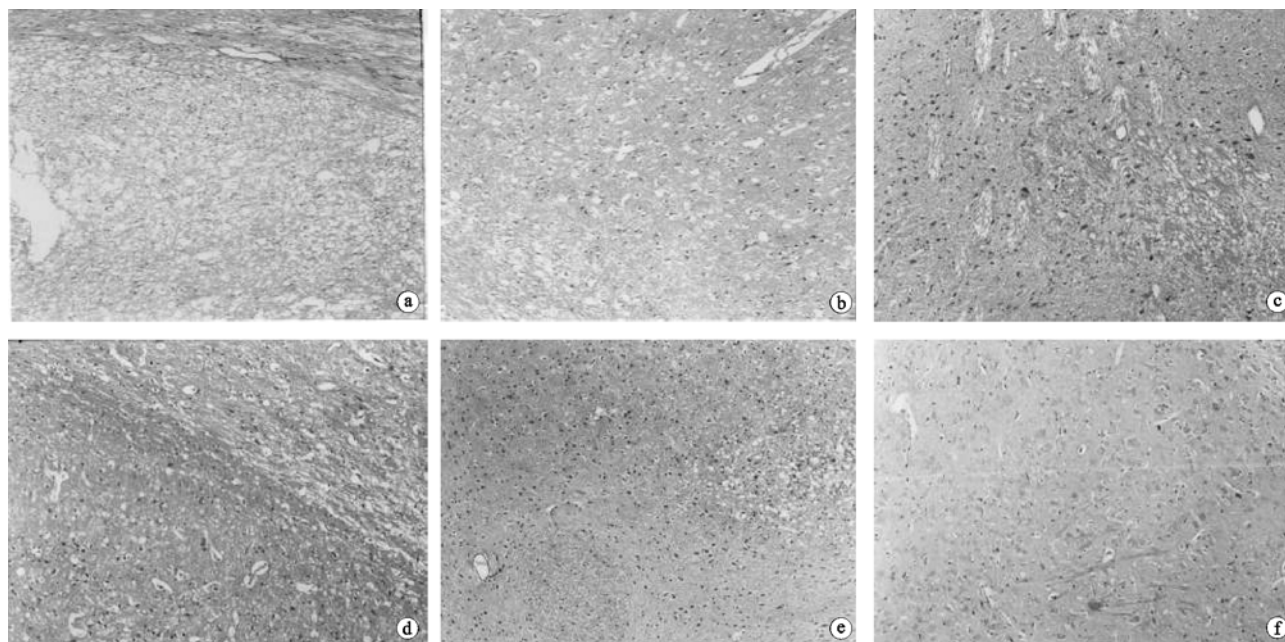
二、2 组脑组织病理改变

缺血再灌注第 48 小时:模型组脑组织肉眼见缺血侧表面略苍白,触之组织松软,脑组织肿胀明显,中线结构移位明显;光镜下见缺血侧皮质组织疏松样变,胞浆空泡样变明显,并且可见泡沫细胞,神经元细胞数减少(图 2a)。治疗组肉眼可见脑组织肿胀、脑沟变窄、脑回肿胀、中线结构移位较模型组轻;光镜下见胞浆空泡样变,但较模型组稍轻,病变范围明显小于模型组(图 2b)。缺血再灌注第 7 天:模型组脑组织肉眼可见缺血侧苍白,肿胀不明显,出现液化坏死灶;光镜下见中央区组织崩解,多处镂空样软化病灶,胶质增生明显,排列紊乱(图 2c)。治疗组未见明确的软化病灶,但仍可见胞浆空泡样及疏松样变(图 2d)。缺血再灌注第 14 天:模型组脑组织肉眼见缺血侧肿胀已不明显,中线结构无移位;光镜下可见胶质细胞增多,排列紊乱,胞浆空泡样及疏松样变明显(图 2e)。治疗组可见神经胶质细胞增生,排列紊乱(图 2f)。

缺血再灌注第 48 小时电镜下观察:模型组脑组织见大量胶质细胞增生和神经元受损,胶质细胞凋亡,细胞内外严重水肿,核膜结构破坏,核内异染色质增多、聚集,线粒体肿胀,嵴断裂、溶解、消失,细胞器肿胀、消失,胞质空泡化,细胞突起消失,内皮细胞肿胀,细胞间紧密连接破坏,血管周围水肿明显,突触水肿明显(图 3)。治疗组脑组织神经元受损程度较轻,神经细胞轻度肿胀,核膜结构尚存,核内异染色质较少,线粒体轻度肿胀,可见嵴,细胞器形态基本正常,内皮细胞间紧密连接未见破坏,血管周围和突触轻度水肿(图 4)。

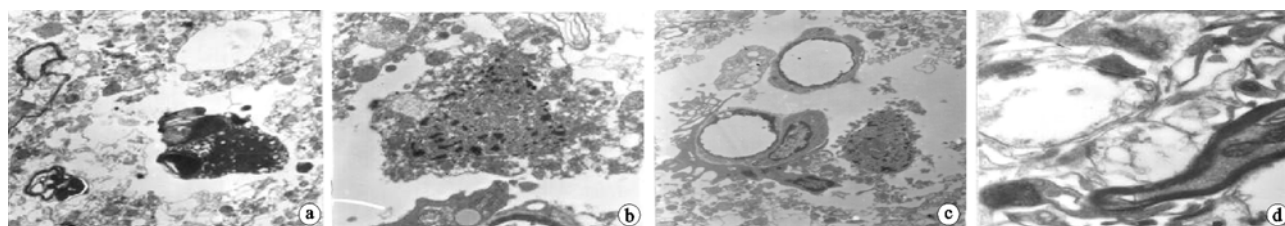
讨 论

我们的研究采用 MCAO 模型,线栓直接插到大脑中动脉,阻断了前、后交通动脉的代偿性血液供应,该方法制作模型可靠,动物神经功能缺损明显。模型组大鼠脑梗死后脑组织发生缺血缺氧,导致乳酸中毒,细胞内钙离子超载,大量游离脂肪酸和兴奋性氨基酸释



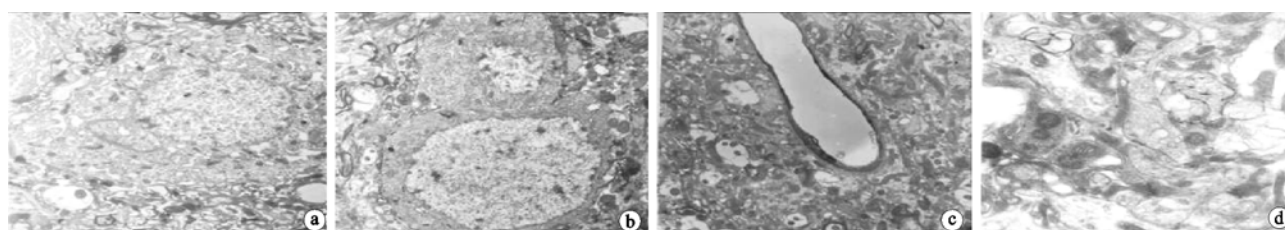
a. 模型组,造模后第 48 小时;b. 治疗组,造模后第 48 小时;c. 模型组,造模后第 7 天;d. 治疗组,造模后第 7 天;e. 模型组,造模后第 14 天;f. 治疗组,造模后第 14 天

图 2 模型组和治疗组不同时间点的脑组织显微观察(HE 染色, $\times 100$)



a. 模型组凋亡的神经元细胞 ($\times 8000$); b. 模型组肿胀的神经元 ($\times 8000$); c. 模型组肿胀的血管 ($\times 8000$); d. 模型组肿胀的突触 ($\times 25\ 000$)

图 3 模型组缺血再灌注第 48 小时超微结构观察(柠檬酸-醋酸铀染色)



a. 治疗组的神经元细胞 ($\times 8000$); b. 治疗组肿胀的神经元 ($\times 6000$); c. 治疗组肿胀的血管 ($\times 8000$); d. 治疗组肿胀的突触 ($\times 25\ 000$)

图 4 治疗组缺血再灌注第 48 小时超微结构观察(柠檬酸-醋酸铀染色)

放,血栓烷素 A2 增加,并激活自由基连锁反应,导致迟发性神经元坏死^[3-4]。我们的实验观察到,再灌注第 48 小时模型组 TTC 染色脑梗死体积明显;光镜下观察到细胞肿胀、细胞膜结构改变、细胞核及细胞器的病理改变明显,而治疗组 TTC 染色脑梗死体积明显小于模型组,光镜下见脑细胞的病理形态学改变明显较模型组轻;电镜下的超微结构观察可见 2 组细胞膜、线粒体和细胞核的改变以及细胞周围的血管和突触的变化均有明显差异,提示高压氧治疗可明显减小脑梗死面积,

改善脑细胞超微结构,说明高压氧治疗对脑缺血急性期的神经细胞有保护作用^[5]。

有关高压氧治疗防止脑细胞损害的机制研究较多,可能与以下几个方面有关:①高压氧治疗可减小脑梗死体积,抑制神经细胞的凋亡。②提高血氧分压、血氧含量以及组织氧储备^[6-7]。③提高组织内毛细血管中氧的弥散能力,使血氧含量增加,改善病灶区域供氧及代谢,减少酸性代谢物质。④维护血脑屏障的完整性,减少血液中水分向组织渗透,减轻组织水肿,降低

颅内压^[8-9]。⑤可提高脑梗死后神经营养因子-3 mRNA 的表达,高压氧治疗后缺血 48 h,轴突生长抑制因子 Nogo-A 在轴突髓鞘中的表达明显降低,提示高压氧治疗有利于神经轴突的再生和提高皮质脊髓束的可塑性,从而促进神经功能的康复^[10]。⑥脑梗死后产生过多的自由基,从而发生一系列的反应,对细胞膜和线粒体膜造成损害。高压氧治疗可提高超氧化物歧化酶的含量,降低大鼠脑梗死后再灌注脑组织环氧化酶-2 的表达^[11],加强自由基的清除和抗氧化能力,减少再灌注对脑组织的损伤,防止细胞器膜脂质过氧化。

综上所述,高压氧是治疗缺血性脑血管病的一种有潜力的物理疗法^[12]。但其治疗的确切机制还不十分清楚,并且有一定的副作用,如气压伤、减压病和氧中毒等。近年来,对高压氧治疗的基础研究进一步深入,高压氧治疗和改善急性期和恢复期脑梗死神经功能障碍的机制会更加明确,为高压氧在临床的应用提供更多的理论依据和支持,高压氧治疗脑梗死将会成为一种有前途的物理治疗方法^[13]。

参 考 文 献

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20:84-91.
- [2] Swanson RA. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1990, 10:2902-2905.
- [3] Beynon C, Sun L, Marti HH, et al. Delayed hyperbaric oxygenation is more effective than early prolonged normobaric hyperoxia in experimental focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett*, 2007, 425:141-145.
- [4] Singhal AB. A review of oxygen therapy in ischemic stroke. *Neurol Res*, 2007, 29:173-183.
- [5] Nemoto EM, Betterman K. Basic physiology of hyperbaric oxygen in brain. *Neurol Res*, 2007, 29:116-126.
- [6] Eschenfelder CC, Krug R, Yusof AF, et al. Neuroprotection by oxygen in acute transient focal cerebral ischemia is dose dependent and shows superiority of hyperbaric oxygenation. *Cerebrovasc Dis*, 2008, 25:193-201.
- [7] Hou H, Grinberg O, Williams B. The effect of oxygen therapy on brain damage and cerebral pO₂ in transient focal cerebral ischemia in the rat. *Physiol Meas*, 2007, 28:963-976.
- [8] 秦杰, 尤春景. 高压氧对脑外伤大鼠额叶皮质和海马胆碱乙酰转移酶阳性神经元数目的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28:22-24.
- [9] Xue L, Yu Q, Zhang H, et al. Effect of large dose hyperbaric oxygenation therapy on prognosis and oxidative stress of acute permanent cerebral ischemic stroke in rats. *Neurol Res*, 2008, 30:389-393.
- [10] 陈胜利, 李长清, 陈康宁, 等. 高压氧对实验性大鼠脑卒中后 RhoA 表达及神经功能的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2007, 29:557-580.
- [11] Sun L, Marti HH, Veltkamp R. Hyperbaric oxygen reduces tissue hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2008, 39:1000-1006.
- [12] Veltkamp R, Bieber K, Wagner S, et al. Hyperbaric oxygen reduces basal lamina degradation after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*, 2006, 1076:231-237.
- [13] Acka G, Sen A, Canakci Z, et al. Effect of combined therapy with hyperbaric oxygen and antioxidant on infarct volume after permanent focal cerebral ischemia. *Physiol Res*, 2007, 56:369-373.

(修回日期:2009-09-10)

(本文编辑:吴 倩)

· 消息 ·

无锡同仁国际康复医院诚招康复医学专业高级人才

无锡同仁国际康复医院现有开放床位 480 张,目前开展的主要业务包括精神康复、脑神经康复及躯体康复等,拥有德国先进康复设备,并与德国柏林医院开展技术合作。

为满足我院业务发展需求,现招聘康复医学专业高级人才。要求:博士研究生学历,副高以上职称。一旦录用,年薪不低于 30 万,科研课题经费不低于 50 万,购房补贴不低于 50 万。详情请咨询:0510-83219301 83012201,或登录 <http://www.wuximhc.com/trgj.asp>。