

· 基础研究 ·

高压氧治疗对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠内源性神经干细胞增殖的影响

王晓莉 赵岩松 杨于嘉 谢岷

【摘要】目的 探讨高压氧(HBO)治疗缺氧缺血性脑损伤新生大鼠后,内源性神经干细胞增殖的动态变化。**方法** 将7日龄 Sprague-Dawley 新生大鼠随机分为正常对照组(对照组)、缺氧缺血性脑损伤组(模型组)与 HBO 治疗组(HBO 组)。采用经典的 Rice-Vannucci 法制作缺氧缺血性脑损伤模型,HBO 组在脑损伤后3 h内进行 HBO 治疗,治疗压力为2个绝对大气压,稳压60 min,每日1次,连续7 d。分别于 HBO 治疗后第3小时、第21小时、第3天、第7天和第14天,采用5-溴-2-脱氧尿苷(BrdU)/巢蛋白免疫荧光双重标记法动态检测缺血侧侧脑室室管膜下区与海马齿状回内源性神经干细胞增殖的动态变化;采用 Western blot 法检测缺血侧大脑半球巢蛋白的动态变化。**结果** HBO 组室管膜下区与海马齿状回 BrdU⁺/巢蛋白标记的神经干阳性细胞数分别于 HBO 治疗后第3小时及第21小时显著增加,第7天达最高水平,并显著高于模型组和对照组($P < 0.01$),第14天 BrdU⁺/巢蛋白阳性细胞数开始下降,仍高于模型组和对照组($P < 0.01$);巢蛋白的 Western blot 分析发现,缺血侧大脑半球巢蛋白于 HBO 治疗后第21小时开始增加,第7天达峰值后下降。**结论** 缺氧缺血性脑损伤后3 h内给予 HBO 治疗,可以促进缺氧缺血性脑损伤新生大鼠内源性神经干细胞的增殖。

【关键词】 缺氧缺血性脑损伤; 高压氧; 神经干细胞

The promoting effect of hyperbaric oxygen on the proliferation of endogenous neural stem cells in neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage WANG Xiao-li*, ZHAO Yan-song, YANG Yu-jia, XIE Min. *Molecular Imaging Centre, Department of Medical Imaging, Weifang Medical University, Weifang 261042, China
Corresponding author: YANG Yu-jia, Email: wxlpine@yahoo.com.cn

【Abstract】Objective To study the effect of hyperbaric oxygen (HBO) therapy on changes in the proliferation of endogenous neural stem cells (NSCs) in neonatal rats after hypoxic ischemic brain damage (HIBD). **Methods** A total of 150 Sprague-Dawley rats aged 7 d were randomly divided into a normal control group (CON), a HIBD group and a HBO treatment group. HBO was administered to the HBO treatment group within 3 h after HIBD at 2 atmospheres, once daily for 7 d. The HIBD model rats were subjected to unilateral carotid artery ligation followed by 2 h of hypoxia (8% O₂). BrdU/nestin immunofluorescence was used to examine the proliferation of NSCs dynamically in the subventricular zone (SVZ) and the dentate gyrus (DG) at the 3rd h, 21st h, 3rd d, 7th d and 14th d after HBO therapy. Nestin protein was detected by Western blot analysis at various time points after HIBD. **Results** In the HIBD rats treated with HBO, proliferation of endogenous NSCs was observed in the SVZ and DG. The proliferating NSCs increased at the 3rd h and 21st h after HBO therapy in the SVZ and DG respectively, peaked at the 7th d after HBO therapy, and decreased by the 14th d after HBO therapy, though their level was still higher than that in the controls. The Western blot analysis showed that nestin protein began to increase at the 21st h after HBO therapy, peaked at the 7th d after HBO therapy, then decreased. **Conclusion** HBO administered within 3 h after HIBD can promote proliferation of endogenous NSCs in neonatal rats after HIBD.

【Key words】 Hypoxic-ischemic brain damage; Hyperbaric oxygen; Neural stem cells

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic enceph-

alopathy, HIE) 是围产期足月儿脑损伤的最常见原因^[1],常可引起脑瘫、癫痫、智力低下等严重后遗症,给家庭和社会带来沉重的负担。但由于新生儿 HIE 的发病机制复杂,目前临床上仍以对症、支持等综合治疗为主,缺少特异性的治疗方法。干细胞疗法与高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)是目前认为治疗 HIE 比较有效的两种方法。目前研究发现, HBO 治疗缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)新生

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.05.008

基金资助:国家自然科学基金(30672240),潍坊医学院博士启动基金(KB200802)

作者单位:261042 潍坊,潍坊医学院医学影像学系分子影像学研究中心(王晓莉);潍坊医学院附属医院眼科(赵岩松);中南大学湘雅医院儿科(杨于嘉、谢岷)

通信作者:杨于嘉, Email: wxlpine@yahoo.com.cn

大鼠时,可促进脑内神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的增殖^[2];另外由于脑内 NSCs 终生存在,且可以激活^[3],故推测 HBO 治疗后脑内 NSCs 的增多可能与内源性 NSCs 的增殖有关。本研究动态观察 HBO 治疗后不同时间点,侧脑室室管膜下区(subventricular zone, SVZ)和海马齿状回(dentate gyrus, DG)区内源性 NSCs 的变化,以期为 HBO 治疗 HIBD 的临床应用提供有效的理论依据。

材料与方法

一、实验动物与分组

健康 7 日龄 Sprague-Dawley 新生大鼠 150 只,由潍坊医学院实验动物中心提供,雌雄不限,体重为 12.2 ~ 15.8 g。随机分为 3 组:正常对照组(对照组, $n = 50$),不做任何处理;缺氧缺血性脑损伤组(模型组, $n = 50$)和 HBO 治疗组(HBO 组, $n = 50$);各组又根据 HBO 治疗后处死的时间(HBO 治疗后第 3 小时、第 21 小时、第 3 天、第 7 天和第 14 天)随机分为 5 个亚组,每亚组 10 只。新生大鼠均由母鼠母乳喂养,21 日龄时断奶,按性别分笼喂养。

二、仪器与试剂

1. 主要仪器:常压缺氧舱,自制 30 cm × 40 cm × 50 cm 有机玻璃舱,两侧各有一 1 cm × 1 cm 小孔,一侧通氮氧混合气,另一侧与测氧仪相通;YLC 0.5/1A 型婴儿高压氧舱,为中国船舶工业总公司第七〇一研究所研制;CY-12C 型测氧仪,为杭州梅城电化分析仪器厂产品;LSM 510 型激光共聚焦扫描显微镜,为德国 Zeiss 公司产品;TANON 2020 型凝胶成像分析系统为上海产;SM2000R 型石蜡切片机,为德国 Leica 公司产品。

2. 主要试剂:小鼠抗巢蛋白抗体、小鼠抗 O4 抗体,为 Chemicon 公司产品;兔抗 GFAP 抗体、小鼠抗 5-溴-2-脱氧尿苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU)抗体、兔抗巢蛋白抗体、山羊抗小鼠 IgG-TRITC、山羊抗兔 IgG-FITC,为北京中杉金桥生物试剂有限公司产品;羊抗辣根过氧化物酶,为美国 Zymed 公司产品;磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH),为上海康成生物公司产品。

三、HIBD 模型制作

采用 Rice-Vannucci 经典方法^[4]制成 HIBD 模型,分离大鼠左侧颈总动脉,双线结扎,两个结扎点中间剪断,放入自制的低氧舱内,按一定比例输入氧气与氮气,测氧仪监测氧浓度在 $(8 \pm 1)\%$,缺氧 2 h,舱内温度控制在 $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$,湿度为 $(70 \pm 5)\%$ 。

四、高压氧治疗

HIBD 模型制成后 3 h 内开始 HBO 治疗,应用武

汉产 YLC0.5/1A 型婴儿高压氧舱。①洗舱:纯氧洗舱,氧流量 10 L/min, 15 min;②升压:氧流量 5 ~ 8 L/min,加压时间为 15 ~ 20 min;③稳压:给予 0.10 mPa,即 2 个绝对大气压(atmosphere absolute, ATA)的压力治疗,氧流量为 3 ~ 5 L/min,稳压时间为 60 min,稳压期间平均氧浓度不低于 85%;④减压:匀速减压 20 ~ 30 min。HBO 治疗每日 1 次,连续 7 d。

五、BrdU 标记与标本的制备

各组大鼠在处死前 2 d,以 50 mg/kg 体重腹腔注射 BrdU,每 8 h 注射 1 次,共 5 次,最后 1 次注射后 2 h 处死大鼠^[5,6]。各组分别在 HBO 治疗后第 3 小时、第 21 小时、第 3 天、第 7 天和第 14 天腹腔麻醉,4%多聚甲醛(用 0.1 mol/L 的 PB 液配制, pH 值 7.4)灌注,断头取脑,前囟处以美蓝标记,放入 4%多聚甲醛中后固定过夜,常规方法制成石蜡块。应用石蜡切片机,分别在前囟前 1.0 ~ -0.8 mm(前囟前 1.0 至前囟后 0.8)处与 -3.0 ~ -4.5(前囟后 3.0 至前囟后 4.5)处行冠状切片(可以观察到相同部位的 SVZ 与 DG 区),制成 4 μm 的石蜡切片。

六、脑组织 BrdU/巢蛋白免疫荧光双重标记

石蜡切片脱蜡至水,微波修复抗原,加入盐酸与胃蛋白酶行 DNA 变性;血清封闭后,加入兔抗巢蛋白抗体(1:200)、小鼠抗 BrdU 抗体(1:200),4℃冰箱中过夜;冲洗后,滴加 TRITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:100)与 FITC 标记的山羊抗兔 IgG(1:100)混合液,37℃避光孵育 60 min;冲洗、封片后,激光扫描共聚焦显微镜下观察,每只大鼠取 4 ~ 5 片非连续脑片计数。

七、巢蛋白的 Western blot 分析

HBO 治疗后第 3 小时、第 21 小时、第 3 天、第 7 天和第 14 天处死各组动物,自前囟前 1.0 ~ -4.5 mm 处(前囟前 1.0 至前囟后 4.5)取左侧脑组织约 100 mg,并提取蛋白,观察侧脑室与海马区的巢蛋白。取 60 ~ 80 μg 蛋白在 5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移电泳槽中转至 PDVF 膜,室温下封闭 1 h;加入小鼠抗巢蛋白(1:1000),室温中孵育 1 h,4℃孵育过夜;洗膜后,加入羊抗小鼠辣根过氧化物酶(1:2000)、GAPDH(1:10000, 36 kD),37℃下孵育 60 min;洗膜后,用 ECL 化学发光试剂盒显影,曝光,扫描;应用凝胶成像分析系统测定目标条带的光密度值,计算其与 GAPDH 光密度值的比值,并进行统计学分析。

八、细胞计数

HBO 治疗后第 3 小时、第 21 小时、第 3 天、第 7 天和第 14 天观察左侧脑室 SVZ 的 BrdU⁺/巢蛋白阳性细胞数,采用计算机图像分析系统软件计数。

九、统计学分析

所有计量数据用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,全部资料应用 SPSS

11.5 版软件与 Excel 7.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

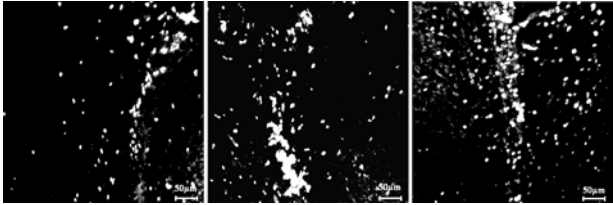
一、HIBD 后不同时间点各组侧脑室 SVZ 的 BrdU/巢蛋白免疫荧光双重标记结果比较

各组侧脑室 SVZ 背外侧角均可见 BrdU⁺/巢蛋白阳性细胞密集分布。HBO 治疗后第 3 小时,HBO 组 BrdU⁺/巢蛋白阳性细胞数开始增加,显著多于对照组($Q = 4.5720, P < 0.05$),与模型组差异无统计学意义($Q = 1.7780, P > 0.05$)。HBO 治疗后第 21 小时和第 3 天,HBO 组 BrdU⁺/巢蛋白阳性细胞数进一步增加,至第 7 天达峰值,与对照组、模型组比较,差异均有统计学意义($Q = 18.7305, P < 0.01; Q = 10.9886, P < 0.01$);HBO 治疗后第 14 天,BrdU⁺/巢蛋白阳性细胞数开始下降,仍显著多于对照组($Q = 8.3484, P < 0.01$)与模型组($Q = 4.0303, P < 0.05$)。见表 1 和图 1。

表 1 各组 HBO 治疗后不同时间点 SVZ 的 BrdU⁺/巢蛋白阳性细胞数比较(个/mm², $\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	第 3 小时	第 21 小时	第 3 天	第 7 天	第 14 天
对照组	10	59 ± 10 ^a	55 ± 10 ^b	58 ± 9 ^b	54 ± 9 ^b	53 ± 7 ^a
模型组	10	70 ± 13	80 ± 11	97 ± 14	85 ± 12 ^b	68 ± 12 ^a
HBO 组	10	79 ± 14	91 ± 14	115 ± 12	129 ± 16	82 ± 13

注:与 HBO 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$



对照组 模型组 HBO 组
注:HBO 治疗后第 7 天

图 1 各组大脑 SVZ 的 BrdU/巢蛋白表达(免疫荧光双重标记,标尺为 50 μm)

二、HIBD 后不同时间点各组侧脑室 DG 区 BrdU/巢蛋白免疫荧光双重标记结果比较

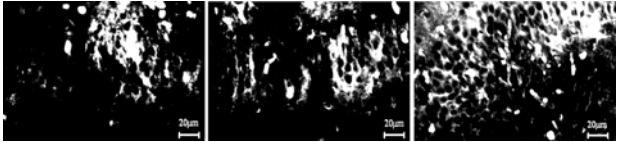
各组大鼠海马 DG 区均可见 BrdU⁺/巢蛋白阳性细胞,集中分布在多形细胞层、锥体细胞层。HBO 治疗后第 21 小时,HBO 组 BrdU⁺/巢蛋白阳性细胞数开

始增加,并多于对照组($Q = 7.8875, P < 0.05$);HBO 治疗后第 3 天,BrdU⁺/巢蛋白阳性细胞数进一步增加;HBO 治疗后第 7 天,HBO 组 BrdU⁺/巢蛋白阳性细胞数达峰值,显著多于对照组与模型组($Q = 18.3073, P < 0.01; Q = 14.5455, P < 0.01$);HBO 治疗后第 14 天,HBO 组 BrdU⁺/巢蛋白阳性细胞数开始下降,仍多于模型组与对照组($Q = 10.7492, P < 0.01; Q = 3.8390, P < 0.05$)。见表 2 和图 2。

表 2 HBO 治疗后不同时间点海马 DG 区 BrdU⁺/巢蛋白阳性细胞数比较(个/mm², $\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	第 3 小时	第 21 小时	第 3 天	第 7 天	第 14 天
对照组	10	42 ± 9	43 ± 11 ^a	45 ± 9 ^b	43 ± 10 ^b	32 ± 8 ^a
模型组	10	47 ± 11	59 ± 12	72 ± 13	58 ± 11 ^a	53 ± 12 ^a
HBO 组	10	49 ± 12	73 ± 12	89 ± 14	116 ± 16	75 ± 14

注:与 HBO 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$



对照组 模型组 HBO 组
注:HBO 治疗后第 7 天

图 2 各组海马 DG 区 BrdU/巢蛋白表达(免疫荧光双重标记,标尺为 20 μm)

三、巢蛋白总蛋白的 Western blot 检测结果

各组不同时间点左侧大脑半球巢蛋白总蛋白相对光密度的动态变化见表 3。HBO 治疗后第 21 小时,HBO 组巢蛋白表达开始增加,HBO 治疗后第 3 天进一步升高,并显著高于对照组($Q = 17.1583, P < 0.01$)与模型组($Q = 3.7099, P < 0.05$),HBO 治疗后第 7 天,巢蛋白表达达峰值,并显著高于对照组与模型组($Q = 21.3087, P < 0.01; Q = 8.1608, P < 0.01$);HBO 治疗后第 14 天,巢蛋白表达开始下降,仍显著高于对照组与模型组($Q = 16.7222, P < 0.01; Q = 6.3938, P < 0.01$)。

讨 论

NSCs 能够自我更新,具有分化成神经元、神经胶质细胞的潜能,从而修复缺损的神经。新生大鼠在 HIBD 后,内源性 NSCs 出现增殖和分化现象^[7],但这种自身的增殖修复能力有限,只有提高这种机体自身

表 3 HBO 治疗后不同时间点巢蛋白总蛋白表达比较(相对 OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	第 3 小时	第 21 小时	第 3 天	第 7 天	第 14 天
对照组	10	0.44 ± 0.061	0.42 ± 0.058	0.40 ± 0.061 ^a	0.38 ± 0.055 ^a	0.36 ± 0.056 ^a
模型组	10	0.47 ± 0.061	0.54 ± 0.059	0.69 ± 0.070 ^b	0.67 ± 0.073 ^a	0.57 ± 0.065 ^a
HBO 组	10	0.53 ± 0.065	0.60 ± 0.067	0.75 ± 0.073	0.85 ± 0.075	0.70 ± 0.071

注:与 HBO 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

修复能力,才能为干细胞治疗开拓广阔的前景^[8,9]。本研究观察了 HBO 治疗后,内源性 NSCs 增殖的动态变化。

BrdU 是一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物,在细胞增殖周期的 S 期嵌入细胞核 DNA,因而 BrdU 阳性细胞被看作是具有增殖活性的细胞^[10]。在脑发育中具有增殖活性的细胞主要为 NSCs 与星形胶质细胞,所以仅阳性 BrdU 细胞表达增加并不能说明 NSCs 增殖。巢蛋白属第 IV 类中间丝蛋白,系早期原始神经细胞的标志,已被广泛用于 NSCs 的鉴定,故本研究中用巢蛋白、BrdU 免疫荧光双重标记内源性 NSCs,即增殖的 NSCs。

一般认为,哺乳动物的神经再生限于侧脑室 SVZ 和海马 DG 区,这两个部位是出生后 NSCs 增殖的主要部位,最初的 NSCs 就是从胚胎大脑的这两个区域分离得到的。也有学者认为,室管膜区存在 NSCs,但海马齿状回仅存在限制性的祖细胞(restricted progenitors)^[11]。SVZ 的 NSCs 沿喙侧迁移流(rostral migratory stream,RMS)迁移至嗅球,经历终末分化后发育成新的中间神经元并进一步建立起神经连接;SGZ 的干细胞则发育形成另一种不同类型的神经元——颗粒细胞,并与海马齿状回建立突触联系。其中侧脑室 SVZ 终生保持着旺盛的有丝分裂能力,是目前公认的哺乳动物出生后神经系统中 NSCs 最为集中的部位^[12,13]。HBO 治疗后,BrdU⁺/巢蛋白阳性细胞表达增加,显著高于对照组与模型组,这证实了我们的设想:HBO 可以促进内源性 NSCs 的增殖。研究还发现,HBO 治疗后,侧脑室 SVZ 与海马 DG 区 BrdU⁺/巢蛋白阳性细胞达峰值后逐渐下降,至于适合的治疗次数还有待于进一步研究。我们还发现,SVZ 的 BrdU⁺/巢蛋白阳性细胞远多于 DG 区,且表达上调时间早于 DG 区。有学者认为,出生后有增殖能力的内源性 NSCs 主要位于 SVZ,而 DG 区的 NSCs 是由 SVZ 迁移而来^[14],是否出生后 DG 区仍可能产生有增殖活性的 NSCs,有待于进一步验证。Western blot 检测巢蛋白表达时得到相同的结论:该蛋白在 HBO 治疗后第 7 天达峰值后下降,其变化趋势与 HBO 治疗后新生大鼠 BrdU⁺/巢蛋白阳性细胞变化规律一致,说明 HBO 对 HIBD 新生大鼠内源性 NSCs 有保护作用,且这种保护作用与 HBO 对 NSCs 的促增殖作用有关。HBO 治疗后,HIBD 新生大鼠脑内 NSCs 激活而增殖,这种增殖的 NSCs 是否能存活并迁移分化为成熟的神经元,有待于进一步研究。

总之,新生大鼠 HIBD 后 3 h 内给予 HBO 治疗可以促进内源性 NSCs 的增殖,其增殖的机制以及增殖的

NSCs 是否可以迁移并分化为成熟的神经元有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Triulzi F, Parazzini C, Righini A. Patterns of damage in the mature neonatal brain. *Pediatr Radiol*, 2006, 36:608-620.
- [2] 余小河, 杨于嘉, 王霞, 等. 高压氧对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠内源性神经干细胞和髓鞘的保护作用. *中国当代儿科杂志*, 2006, 8:33-37.
- [3] Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*, 2000, 287:1433-1438.
- [4] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*, 1981, 9:131-141.
- [5] Sugiura S, Kitagawa K, Tanaka S, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor enhances neurogenesis and angiogenesis after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 2005, 36:859-864.
- [6] Yang Z, Levison SW. Hypoxia/ischemia expands the regenerative capacity of progenitors in the perinatal subventricular zone. *Neuroscience*, 2006, 139:555-564.
- [7] Hayashi T, Iwai M, Ikeda T, et al. Neural precursor cells division and migration in neonatal rat brain after ischemic/hypoxic injury. *Brain Res*, 2005, 1038:41-49.
- [8] Felling RJ, Snyder MJ, Romanko MJ, et al. Neural stem/progenitor cells participate in the regenerative response to perinatal hypoxia/ischemia. *J Neurosci*, 2006, 26:4359-4369.
- [9] 刘明发, 庄明华, 骆健明, 等. 针刺对新生鼠缺血缺氧性脑损伤皮质 Nestin 表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28:437-440.
- [10] Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, et al. Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats. *Stroke*, 2005, 36:1278-1282.
- [11] Seaberg RM, Vander KD. Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci*, 2002, 22:1784-1793.
- [12] Romanko MJ, Rothstein RP, Levison SW, et al. Neural stem cells in the subventricular zone are resilient to hypoxia/ischemia whereas progenitors are vulnerable. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24:814-825.
- [13] Levison SW, Rothstein RP, Romanko MJ, et al. Hypoxia/ischemia depletes the rat perinatal subventricular zone of oligodendrocyte progenitors and neural stem cells. *Dev Neurosci*, 2001, 23:234-247.
- [14] Nakatomi K, Yoshikawa M, Oka M, et al. Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288:827-832.

(修回日期:2008-10-12)

(本文编辑:吴倩)