

## · 研究简报 ·

不同时间窗高压氧治疗对脑出血大鼠出血灶周围 HIF-1 $\alpha$  表达的影响牛蕾蕾<sup>1</sup> 李红玲<sup>2</sup> 陈玉燕<sup>2</sup> 赵龙<sup>2</sup><sup>1</sup>河北医科大学第二医院, 石家庄 050000; <sup>2</sup>河北医科大学第二医院康复医学二科, 石家庄 050000

通信作者: 李红玲, Email: 1413585368@qq.com

**【摘要】 目的** 观察不同介入时间的高压氧治疗对脑出血大鼠出血灶周围缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 表达的影响。**方法** 采用胶原酶诱导法建立雄性 Wistar 大鼠脑出血模型, 将 185 只大鼠按照随机数字表法分为正常组(5 只)、假手术组(60 只)、脑出血对照组(60 只)和高压氧治疗组(60 只)。高压氧治疗组再按不同的介入治疗时间分为 6 h 组、1 d 组、2 d 组和 3 d 组 4 个亚组, 每组 15 只。高压氧治疗压力 2.0 ATA, 稳压吸氧 60 min, 每日 1 次。所有大鼠均饲养在相同环境中, 正常组和脑出血对照组不进行特殊治疗。正常组大鼠于饲养 3 d 后处死, 其余各组分别于高压氧治疗 1 d、3 d、5 d 后断头取脑, 每个时间点各 5 只。用免疫组化法测定 HIF-1 $\alpha$  的表达。**结果** 正常组大鼠脑组织 HIF-1 $\alpha$  吸光度值为 (0.0725 $\pm$ 0.064)。与正常组和假手术组组间比较, 脑出血对照组和高压氧治疗组术后各介入点的 HIF-1 $\alpha$  吸光度值均较高 ( $P < 0.05$ )。与脑出血对照组同时间点比较, 高压氧术后 6 h、1 h 介入点的 HIF-1 $\alpha$  吸光度值较低, 且持续至治疗 3 d、5 d, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与高压氧治疗组术后 6 h 比较, 高压氧治疗组术后 1 d、2 d、3 d 介入点的 HIF-1 $\alpha$  吸光度值较高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** 高压氧治疗可以减少出血灶周围 HIF-1 $\alpha$  表达, 且介入时间以 6 h 为佳。

**【关键词】** 高压氧; 介入时间; 脑出血; HIF-1 $\alpha$ 

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.11.017

脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 是指原发的非外力因素引起的脑实质内出血, 在急性脑血管病中约有 20%~30% 为脑出血患者, 死亡率与致残率较高<sup>[1]</sup>。脑水肿常伴随出现在脑出血性疾病的整个病理生理过程, 是 ICH 后继发脑组织损伤的关键因素, 是导致患者死亡和遗留神经功能障碍的主要因素之一<sup>[2-3]</sup>。如何减轻脑水肿成为脑出血治疗的关键<sup>[4]</sup>。缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 广泛存在于哺乳动物和人类细胞的核蛋白中, 其主要作用是参与缺氧因子表达的调控<sup>[5-6]</sup>。作为转录因子, HIF-1 $\alpha$  可以激活多种靶基因的转录和翻译, 提升组织细胞对缺血缺氧的适应能力<sup>[7]</sup>。董静等<sup>[8]</sup>研究发现, 在高血压脑出血患者中, HIF-1 $\alpha$  的表达与脑水肿的程度密切相关, HIF-1 $\alpha$  能够促进脑水肿的发生。

高压氧治疗脑出血患者的疗效确切, 可明显改善脑出血患者血肿周围脑血管的微循环, 改善出血灶周围脑组织中血管的舒张与收缩功能, 从而增加脑组织的氧含量, 促进患者受损神经功能的恢复, 提高脑出血患者的临床治疗效果, 改善患者预后, 提高生存质量, 但其具体的作用机制尚不清楚<sup>[9-10]</sup>。有报道, 对脑出血大鼠进行高压氧预处理或出血后行高压氧治疗, 均可通过调节水通道蛋白-4 (aquaporin-4, AQP-4) 减轻脑水肿, 且早期介入治疗效果较好<sup>[11]</sup>。本研究采用胶原酶诱导法建立雄性 Wistar 大鼠脑出血模型, 研究在不同时间点介入高压氧对大鼠出血灶周围 HIF-1 $\alpha$  表达的影响, 以探寻高压氧治疗减轻脑出血后脑水肿的可能作用机制, 并为寻找高压氧介入治疗脑出血的最佳时机提供依据。

## 材料与方 法

## 一、实验仪器及试剂

大鼠脑立体定向仪 (美国产)、YC3200/22VII 型高压氧舱 (中国烟台产)、尖头改锥 (自制)、VII 型胶原酶 (美国 Sigma 公司产)、兔抗大鼠多克隆 HIF-1 $\alpha$  抗体 (中国博奥森生物工程有限公司产)、免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒 (中国产)、医用光学显微镜及 BX41 显微照相仪 (日本 OLYMPUS 公司产)。

## 二、实验动物与分组

选取成年健康雄性 Wistar 大鼠 185 只 (造模失败者已除外), 体重 (250 $\pm$ 20) g, 由河北医科大学动物实验中心提供, 分笼饲养于河北医科大学第二医院神经病学实验室动物房内, 以标准饲料喂养并饮用自来水。185 只大鼠于相同环境中饲养 3 d 后, 按照随机数字表法分为正常组(5 只)、假手术组(60 只)、脑出血对照组(60 只)和高压氧治疗组(60 只)。脑出血对照组与高压氧治疗组再按不同的高压氧治疗介入时间分为 6 h 组、1 d 组、2 d 组、3 d 组 4 个亚组, 每组 15 只。

## 三、大鼠脑出血模型制备

参照参考文献 [12], 采用胶原酶 VII 定位注射诱导大鼠尾壳核脑出血模型, 见图 1。大鼠称重后, 用注射器将 10% 水合氯醛 (0.4 ml/100 g) 注射入腹腔内麻醉, 保证手术操作期间大鼠有自主呼吸。将大鼠俯卧位固定于立体定位仪上, 使前后囟位于同一水平, 头顶常规备皮消毒, 于颅正中矢状切开头部皮肤约 1.5 cm, 盐水棉球擦拭使前囟清晰显露, 依据立体定位图谱进行

定位,于前囟后 1 mm、矢状线右侧 3 mm 处(尾壳核定位处),以尖头改锥钻 1 个直径约 1 mm 的小孔,深达骨膜。将含有 0.4 U 胶原酶Ⅶ的 2 μl 生理盐水微量注射器垂直固定于立体定位仪上,使针头与小孔在同一直线上,进针约 6 mm(尾壳核位置),然后缓慢匀速推注 5 min,留针 10 min,缓慢出针 5 min,共 20 min。骨蜡封住颅孔,缝合皮肤切口,再次消毒创处,置于空笼内待大鼠苏醒。



注:采用胶原酶Ⅶ制作大鼠脑出血模型并于 6 h 后处死,可见右侧基底节区有明显血肿形成

图 1 大鼠右侧基底节区出血灶大体标本

假手术组模型手术操作过程同脑出血大鼠模型的制作,定位于大鼠尾壳核的位置,将固定于定位仪上的微量注射器缓慢下降,进针深度为 6 mm,缓慢推注 2 μl 生理盐水,约 5 min,封针 10 min,缓慢拔出针头约 10 min。进针孔用骨蜡封闭,缝合切口,将术后的大鼠放于笼内。

大鼠脑出血模型制备后 6 h 观察大鼠行为学变化,采用 Longa 评分法<sup>[13]</sup>进行评分:0 分,无体征;1 分,不能完全伸展针对侧肢体(左侧);2 分,进针对侧肢体瘫痪,向进针对侧转圈,有追尾现象;3 分,不能站立向进针对侧倾倒;4 分,有意识障碍。2 分以上认为造模成功。

#### 四、高压氧治疗

术后 6 h,高压氧治疗组大鼠确定造模成功后,按不同的介入时间(6 h、1 d、2 d、3 d)放入高压氧舱内进行吸氧治疗。将动物置入特制木箱中(为便于观察动物,上盖为玻璃),箱底设供氧管入口,对角箱底设出气口,采用直排式给氧,流量为 10 L/min,实验前给氧 5 min 后在出气口测得氧浓度为 90%。将木箱置于舱内,压力设定为 2.0 ATA,加压 30 min,稳压 60 min,减压 30 min,匀速加、减压,速率约为 0.01 MPa/min,每日 1 次。通过观察窗观察舱内动物行为。脑出血对照组、假手术组及正常组不进行高压氧治疗。

#### 五、HIF-1α 的测定

正常组大鼠于饲养 3 d 后处死。余各组分别于高压氧治疗 1 d、3 d、5 d 后断头取脑,每个时间点各 5 只,经脑表面穿刺点冠状切开标本,取穿刺点后 3 mm 厚脑组织制备石蜡切片,采用免疫组化法观察 HIF-1α 的表达,细胞膜或细胞浆呈棕黄色为阳性细胞。采用 Image Pro Plus 6.0 全自动图像分析系统,测量每高倍镜(10×40 倍)视野内 HIF-1α 的吸光度,每只大鼠选择 3 张脑组织片,每张切片选 3~5 个视野,计算各组的平均光密度值。

#### 六、统计学方法

采用 SPSS 13.0 版统计学软件进行数据处理。计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )形式表示,多组计量资料间的比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 结 果

正常组大鼠脑组织 HIF-1α 含量较低。与正常组和假手术组组间比较,脑出血对照组和高压氧治疗组术后各介入点的 HIF-1α 吸光度值均较高( $P < 0.05$ )。与脑出血对照组同时间点比较,高压氧术后 6 h、1 h 介入点的 HIF-1α 吸光度值较低,且持续至治疗 3 d、5 d,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与高压氧治疗组术后 6 h 比较,高压氧治疗组术后 1 d、2 d、3 d 介入点的 HIF-1α 吸光度值较高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。详见表 1。

表 1 各组大鼠术后不同时间点介入高压氧的 HIF-1α 吸光度值比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	高压氧治疗 1 d	高压氧治疗 3 d	高压氧治疗 5 d
正常组	5	0.0725±0.064	-	-
假手术组				
术后 6 h	5	0.0774±0.0066	0.0803±0.0059	0.0772±0.0072
术后 1 d	5	0.0780±0.0058	0.0790±0.0057	0.0745±0.0051
术后 2 d	5	0.0801±0.0072	0.0774±0.0059	0.0741±0.0055
术后 3 d	5	0.0789±0.0070	0.0755±0.0075	0.0740±0.0050
脑出血对照组				
术后 6 h	5	0.1835±0.0099 <sup>ab</sup>	0.3556±0.0115 <sup>ab</sup>	0.3250±0.0103 <sup>ab</sup>
术后 1 d	5	0.2501±0.0144 <sup>ab</sup>	0.3423±0.0163 <sup>ab</sup>	0.3186±0.0150 <sup>ab</sup>
术后 2 d	5	0.3510±0.0123 <sup>ab</sup>	0.3282±0.0130 <sup>ab</sup>	0.2931±0.0150 <sup>ab</sup>
术后 3 d	5	0.3404±0.0157 <sup>ab</sup>	0.3238±0.0110 <sup>ab</sup>	0.2913±0.0106 <sup>ab</sup>
高压氧治疗组				
术后 6 h	5	0.1498±0.0111 <sup>abc</sup>	0.1755±0.0105 <sup>abc</sup>	0.1677±0.0111 <sup>abc</sup>
术后 1 d	5	0.1755±0.0104 <sup>abcd</sup>	0.2357±0.0163 <sup>abcd</sup>	0.1788±0.0106 <sup>abcd</sup>
术后 2 d	5	0.341±0.0166 <sup>abd</sup>	0.3164±0.0181 <sup>abd</sup>	0.2850±0.0128 <sup>abd</sup>
术后 3 d	5	0.3375±0.0180 <sup>abd</sup>	0.3147±0.0125 <sup>abd</sup>	0.2845±0.0165 <sup>abd</sup>

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与假手术组同时间点比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与脑出血对照组同时间点比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与高压氧治疗组术后 6 h 比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$

## 讨 论

本研究结果显示,假手术组大鼠脑组织中 HIF-1 $\alpha$  表达有所增加,但与正常组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。脑出血对照组和高压氧治疗组大鼠出血灶周围 HIF-1 $\alpha$  表达较正常组明显增加( $P<0.05$ ),与王爱岳等<sup>[14]</sup>研究结果相似。分析其机制,可能是出血后血肿的占位效应对周围组织造成机械性压迫,导致血管应激反应性收缩、血液中活性因子释放及周围组织脑血流下降,使血肿周围产生缺血缺氧半暗带,进而诱导 HIF-1 $\alpha$  表达增加。有研究发现,HIF-1 $\alpha$  与肿瘤抑制因子 p53 结合,可以激活促凋亡的 Caspase-9 和 Caspase-3 通路,进而诱导细胞凋亡;而高压氧治疗则可通过减少 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达,抑制其下游凋亡基因和水通道蛋白表达,阻断细胞凋亡途径,继而减轻水肿形成<sup>[15-18]</sup>。Li 等<sup>[18]</sup>建立大鼠脑梗死模型,建模 1 h 后给予治疗组高压氧治疗,对照组不给予高压氧治疗,分别于 6 h、12 h、24 h、48 h、96 h、7 d 后处死,通过免疫组化、Western blotting 等方法测定 HIF-1 $\alpha$  及神经细胞凋亡基因的变化,发现治疗组大鼠脑梗死灶周围 HIF-1 $\alpha$ 、p53、Caspase-9、Caspase-3 表达较对照组减少,提示早期介入高压氧治疗可以抑制 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达,减少神经细胞凋亡。Zhuo 等<sup>[19]</sup>研究发现,脊髓损伤后 6 h 介入高压氧可以改善大鼠的运动功能,抑制脊髓损伤组织 HIF-1 $\alpha$  表达。本研究结果显示,脑出血后 6 h 介入高压氧治疗,大鼠出血灶周围 HIF-1 $\alpha$  的表达水平较低,其机制可能是早期介入高压氧改善了血肿周围脑血管的微循环及出血灶周围血管的舒缩功能,改善了缺血半暗带的供血、供氧情况,抑制了低氧环境诱导 HIF-1 $\alpha$  表达<sup>[14]</sup>。

综上所述,早期介入高压氧治疗可以抑制出血灶周围组织中的 HIF-1 $\alpha$  表达,减轻脑水肿,其介入时间以 6 h 为佳。本研究的不足之处为仅用免疫组化法观察高压氧治疗对 HIF-1 $\alpha$  表达水平的影响,观察指标比较单一,在后续的研究中将进一步改进。

## 参 考 文 献

- [1] 彭小岭,曾宪容,潘福琼,等.不同介入时间和不同疗程高压氧治疗对脑出血大鼠神经功能的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2018,40(5):321-324. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2018.05.001.
- [2] 盛飞.自发性脑出血病灶周围脑水肿形成机制研究进展[J].癫痫与神经电生理学杂志,2011,20(1):56-59. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8972.2011.01.016.
- [3] Staykov D, Wagner I, Volbers B, et al. Natural course of perihemorrhagic edema after intracerebral hemorrhage[J]. Stroke, 2011, 42(9): 2625-2629. DOI: 10.1161/STROKEAHA.111.618611.
- [4] Jung JS, Bhat RV, Preston GM, et al. Molecular characterization of

anaquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(26): 13052-13056.

- [5] Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion[J]. Bull Cancer, 2006, 93(8): 73-80.
- [6] Lahiri S, Roy A, Baby SM, et al. Oxygen sensing in the body[J]. Prog Biophys Mol Biol, 2006, 91(3): 249-286.
- [7] Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1[J]. Blood, 2005, 105(2): 659-669.
- [8] 董静,刘群.脑出血灶周围 HIF-1 $\alpha$  的表达与脑水肿的实验研究[J].中风与神经疾病杂志.2015,32(9): 803-807.
- [9] Qin Z, Xi G, Keep RF, et al. Hyperbaric oxygen for experimental intracerebral hemorrhage [J]. Acta Neurochir Suppl, 2008, 105(1): 113-117.
- [10] 吕云利,姚向荣,廖军,等.高压氧治疗高血压脑出血临床疗效[J].中国误诊医学杂志,2010,10(19):4646-4647.
- [11] 李红玲,房金勇,纪庆红.高压氧预处理对实验性脑出血大鼠出血灶周围水肿及水通道蛋白-4 表达的影响[J].中国康复医学杂志,2012,27(3):211-215. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2012.03.005.
- [12] 张磊.采用 VII 型胶原酶构建大鼠脑出血模型[J].江汉大学学报(自然科学版),2009,37(2):82-84. DOI: 10.3969/j.issn.1673-0143.2009.02.021.
- [13] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84-91.
- [14] 王爱岳,李强,周治平,等.高压氧对脑出血大鼠脑内 HIF-1 $\alpha$  表达和脑水肿的影响[J].海南医学,2012,23(12):15-17. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6350.2012.12.006.
- [15] Sun L, Strelow H, Mies G, et al. Oxygen therapy improves energy metabolism in focal cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2011, 1415(1): 103-108. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.07.064.
- [16] Verkman AS. More than just water channels unexpected cellular roles of aquaporins[J]. J Cell Sci, 2005, 118(1): 3225-3232.
- [17] Li L, Qu Y, Li J, et al. Relationship between HIF-1 $\alpha$  expression and neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxia-ischemia brain injury [J]. Brain Res, 2007, 1180(1): 133-139.
- [18] Li Y, Zhou CM, Calvert JW, et al. Multiple effects of hyperbaric oxygen on the expression of HIF-1 $\alpha$  and apoptotic genes in a global ischemia-hypotension rat model[J]. Exp Neurol, 2005, 191(1): 198-210.
- [19] Zhuo Y, Liu XH, Qu SD, et al. Hyperbaric oxygen intervention on expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor in spinal cord injury models in rats[J]. Chin Med J, 2013, 126(20): 3897-3903.

(修回日期:2019-10-08)

(本文编辑:凌 琛)