

- [5] Verschueren SMP, Roelants M, Delecluse C, et al. Effect of 6-month whole body vibration training on hip density, muscle strength, and postural control in postmenopausal women: a randomized controlled pilot study. *J Bone Miner Res*, 2004, 19:352-359.
- [6] Liu ZH, Chen JZ, Tang Y, et al. Effects of infrasound on changes of intercellular Calcium ion concentration and on expression of RyRs in hippocampus of rat brain. *J Low Freq Noise Vib*, 2005, 23: 159-165.
- [7] Kanelo S, Okumura K, Numaguchi Y. Melatonin scavenges hydroxyl radical and protects isolated rat hearts from ischemic reperfusion injury. *Life Sci*, 2000, 67:101-102.
- [8] Svidovyi VI, Kitaeva LV. Evaluation of cytogenetic activity in bone marrow cells exposed to infrasound (experimental data). *Med Tr Prom Ekol*, 1998, 5:42-44.
- [9] Yount G, Taft R, West J. Possible influence of infrasound on glioma cell response to chemotherapy: a pilot study. *J Altern Compl Med*, 2004, 10:247-250.
- [10] 陈东, 王连唐, 陈国栋, 等. 去卵巢后大鼠不同部位的骨组织计量学与骨密度研究. *中国骨质疏松杂志*, 2002, 8:208-210.
- [11] 韩利华, 候的门, 王全平, 等. 卵巢切除大鼠皮质骨骨密度与生物力学特性. *第四军医大学学报*, 2001, 22:1023-1035.
- [12] 李青南, 主编. 骨质疏松实验动物研究—骨组织形态计量学. 成都: 四川大学出版社, 2001:41-43.
- [13] Adler RA. Epidemiology and pathophysiology of osteoporosis in men. *Curr Osteoporosis Rep*, 2006, 4:110-115.
- [14] Vandenput L, Ederveen AG, Erben RG, et al. Testosterone prevents orchidectomy induced bone loss in estrogen receptor-alpha knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 285:70-76.
- [15] 陈艳, 吴铁崔, 燎胡彬. 骨形态计量学观察睾酮对雄性去势大鼠皮质骨的影响. *解剖学研究*, 2004, 26:277-278.
- [16] 金世鑫. 男性骨质疏松概况. *中国骨质疏松杂志*, 2000, 6:67-73.
- [17] 梁晓萍, 董少红, 肖学吕, 等. 增龄及去睾丸大鼠骨密度和性激素因子的实验研究. *中国骨质疏松杂志*, 2002, 8: 211-213.
- [18] Frost HM. The Utah paradigm of skeletal physiology: an overview of its insights for bone, cartilage and collagenous tissue organs. *J Bone Miner Metab*, 2000, 18:305-316.

(修回日期:2006-11-27)

(本文编辑:松 明)

· 研究简报 ·

高压氧疗法对颅脑损伤大鼠神经元凋亡的影响及其机制研究

陈大庆 朱烈烈

颅脑损伤严重危害人类健康, 如何减轻原发性损伤所造成的神经组织损害, 延缓颅脑损伤后各种继发性损伤的发生和发展, 进一步改善预后, 一直是临床和基础研究的课题。大量研究发现, 颅脑损伤后因脑缺血缺氧而引起的神经细胞凋亡在神经组织损伤过程中起着重要作用^[1-3]。高压氧治疗可以延缓神经细胞凋亡, 但其具体机制尚不明确^[4]。本实验采用免疫组织化学方法研究高压氧治疗对颅脑损伤大鼠神经元凋亡以及胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 和一氧化氮合酶 (nitric oxide synthetase, NOS) 水平的影响并探讨其机制, 现报道如下。

材料与方法

一、实验动物分组

Sprague-Dawley 雄性大鼠 60 只, 由温州医学院动物实验中心提供, 体重 260 ~ 300 g。大鼠随机分为假手术组、损伤对照组和高压氧治疗组, 每组 20 只, 中途死亡动物即退出该实验研究。

二、动物模型的制作

戊巴比妥钠 (50 mg/kg 体重) 腹腔注射麻醉大鼠后, 用牙科钻于大鼠右侧颅顶部开一直径为 5 mm 的骨窗, 注意保持硬脑膜完整。参照 Feeney 自由落体法^[5]造模, 用 50 g 砝码于 13 cm 高度自由落下, 造成右顶叶较为一致的脑挫裂伤。假手

术组只开放骨窗, 不给予打击。所有动物于术后 48 h 处死。

三、高压氧治疗

高压氧治疗组大鼠于造模后 0.5 h 置于动物氧舱内, 用纯氧洗舱 10 min 后, 匀速加压 10 min 至压力为 0.2 MPa, 稳压 40 min, 按 6 L/min 速率通入医用纯氧, 随后匀速减压 20 min 至常压, 大鼠在常压下呼吸空气 10 min 后重复上述过程 1 次, 此为 1 次治疗。每日治疗 2 次, 每次间隔 40 min, 连续治疗 2 d。损伤对照组不进行高压氧治疗。

四、神经元细胞凋亡的检测

取损伤周边部位的脑组织, 浸入 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液 (4℃, pH 值 7.4) 中固定 24 h, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 常规石蜡包埋, 冠状连续切片, 片厚 6 μm。采用 TUNEL 染色法检测神经元细胞的凋亡情况, 参照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 Sigma 公司提供) 说明进行操作: Tris-HCl 缓冲液漂洗 3 次, 每次 3 min; 加入蛋白酶 K, 于 37℃ 水浴箱中消化 15 min; Tris-HCl 缓冲液漂洗 3 次, 每次 3 min; 加入 TdT 酶和标记液 (按 1:9 稀释) 或空白标记液, 于 37℃ 下孵育 60 min; Tris-HCl 缓冲液漂洗 3 次, 每次 3 min; 加入碱性磷酸酶, 37℃ 下水浴 30 min; 加入新鲜配制的 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色液, 室温下反应 3 min; 蒸馏水漂洗, 烘箱中充分干燥后, 用二甲苯透明, 中性树脂胶封片。

应用 Canon 光学显微镜观察切片 (×400), TJY-4000 真彩色细胞图像分析仪的图像分析系统计数阳性细胞, 并计算随机选取 5 个视野的平均细胞凋亡百分率。

五、GDNF 和 NOS 的检测

取损伤周边部位的脑组织,浸入 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液中(pH 值 7.4),于 4℃ 下固定 24 h,梯度酒精脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋,冠状连续切片,片厚 6 μm 。采用免疫组织化学 SABC 法检测 GDNF 和 NOS 水平,用 DAB 方法显色。兔抗大鼠 GDNF 抗体、山羊抗大鼠 NOS 抗体、SABC 试剂盒与 DAB 显色试剂盒均购于武汉博士德公司,阳性细胞胞浆呈棕褐色。

于显微镜下计数阳性细胞($\times 10$),随机选择 20 个阳性细胞,输入 TJY-4000 真彩色细胞图像分析仪,检测所选阳性细胞的灰度值,最终结果以每张切片的细胞数 $\times$ 该张切片的灰度值表示。

六、统计学分析

所有数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 版统计软件包进行方差分析和多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

各组细胞凋亡率及 GDNF 和 NOS 的表达情况见表 1。与损伤对照组相比,高压氧治疗组的细胞凋亡率显著下降($P < 0.05$),GDNF 和 NOS 的表达也明显下降($P < 0.05$);但损伤对照组与高压氧治疗组的细胞凋亡率以及 GDNF 和 NOS 的表达均明显高于假手术组($P < 0.05$);另外,高压氧治疗组细胞凋亡率的下降与 GDNF 和 NOS 的下降并不平行。

表 1 各组细胞凋亡率及 GDNF 和 NOS 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	细胞凋亡率(%)	GDNF	NOS
假手术组	19	11.59 $\pm$ 1.38	25698.28 $\pm$ 6598.69	15698.36 $\pm$ 5894.67
损伤对照组	16	45.69 $\pm$ 8.65 ^a	46920.56 $\pm$ 10264.12 ^a	36958.23 $\pm$ 8795.39 ^a
高压氧治疗组	17	12.12 $\pm$ 2.36 ^{ab}	42569.99 $\pm$ 9996.32 ^{ab}	30265.48 $\pm$ 7026.54 ^{ab}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与损伤对照组比较,^b $P < 0.05$

讨 论

颅脑损伤后脑细胞耗氧量骤增,导致脑水肿和严重脑缺氧,从而使中枢神经细胞的凋亡和坏死增加^[1]。细胞凋亡参与了颅脑损伤后脑继发性损害的病理生理过程,是除细胞坏死外的另一种细胞死亡方式。高压氧治疗是指周期性呼吸超过一个大气压纯氧的治疗,其基本原理在于通过有效增加氧的弥散能力,促进氧的利用,从而纠正脑缺氧,同时通过促进神经细胞对葡萄糖的利用,从而维持脑细胞的能量代谢。国内外大量临床及实验研究表明,高压氧对严重颅脑损伤有治疗作用^[4-6]。但目前对高压氧通过何种机制产生上述治疗作用尚未达成共识。概括起来包括以下几点^[2,6]:(1)通过阻断细胞凋亡环节使一些“休眠”细胞的功能得以恢复;(2)促进神经细胞代谢,提供蛋白质合成所必需的能量;(3)抑制颅脑外伤后的脂质过氧化反应,减少氧自由基的产生。本研究发现,通过给予颅脑损伤大鼠高压氧治疗,可以抑制受伤神经元细胞的凋亡,这种凋亡抑制与 GDNF 和 NOS 的低表达密切相关,这说明除了上述传统的

机制外,高压氧对颅脑损伤的治疗作用还可能通过降低 NOS 的表达而间接抑制神经元细胞的凋亡。

GDNF 是转化生长因子- β 超家族的成员^[7],对多巴胺能神经元、去甲肾上腺素能神经元、脊髓运动神经元以及基底前脑胆碱能神经元等都具有营养作用,重度颅脑损伤可诱导脑组织 GDNF 蛋白表达升高^[8]。另外,在颅脑损伤过程中,NO 的神经毒性效应已经得到一致公认。在局灶性脑缺血过程中,脑内 NOS 的活性随缺血时间的延长而增高,NOS 的过度激活可产生过量的 NO,从而介导神经元的毒性损伤;应用 NOS 抑制剂可延迟脑缺血后的细胞毒性脑水肿,进而延缓脑缺血损伤的进程^[3,9],这说明 GDNF 和 NOS 与颅脑损伤关系密切。本研究结果显示,经高压氧治疗的大鼠损伤脑组织周围 GDNF 和 NOS 水平明显下降,神经细胞凋亡率也明显下降,与损伤对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。但因 NOS 和 GDNF 的功能在细胞凋亡过程中是截然不同的,GDNF 水平增高可给予受损神经元更多营养,而 NOS 水平的增高反而会造成神经元的进一步损害。本研究发现,高压氧治疗可降低 GDNF 和 NOS 的水平,从而抑制神经细胞的凋亡,但我们认为其抑制 NOS 的表达可能起着更为重要的作用,这一结果可为以后探索颅脑损伤治疗措施提供新的思路和途径。

参 考 文 献

- [1] Chu D, Qiu J, Grafe M, et al. Delayed cell death signaling in traumatized central nervous system; hypoxia. *Neurochem Res*, 2002, 27: 97-106.
- [2] Rockswold SB, Rockswold GL, Vargo JM, et al. Effects of hyperbaric oxygenation therapy on cerebral metabolism and intracranial pressure in severely brain injured patients. *J Neurosurg*, 2001, 94: 403-411.
- [3] 王国忠, 赵立明, 高春锦, 等. 高压氧对脑缺血再灌注大鼠的海马诱导型一氧化氮合酶 mRNA 表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26: 193-195.
- [4] 王晓, 刘畅. 高压氧舱在重症急救中的应用. *中国急救医学*, 2002, 9: 264.
- [5] Feeney BM, Boyaon MG, Lim RT, et al. Response to cortical injury: methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res*, 1981, 211: 67-77.
- [6] 孙传顺. 早期高压氧治疗在脑弥漫性轴索损伤的应用. *中国临床神经外科杂志*, 2004, 3: 114-116.
- [7] Miyazaki H, Nagashima K, Okuma Y, et al. Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor induced by transient forebrain ischemia in rats. *Brain Res*, 2001, 922: 165-172.
- [8] 王欣, 廖志钢, 刘敏, 等. 重度颅脑损伤后 GDNF 表达的实验研究. *法医学杂志*, 2003, 19: 1-3.
- [9] 方玲, 王柠, 吴志英, 等. 一氧化氮合酶与脑缺血早期神经损伤关系研究. *中国临床神经科学*, 2003, 11: 357-360.

(修回日期: 2006-09-25)

(本文编辑: 吴 倩)

欢迎订阅 《中华物理医学与康复杂志》