

· 基础研究 ·

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

秦杰 尤春景

【摘要】 目的 观察高压氧(HBO)对脑外伤大鼠额叶皮质和海马胆碱乙酰转移酶(ChAT)阳性神经元数目的影响。**方法** 采用自由落体撞击法造模,将 30 只大鼠随机分为假手术对照组(A组)、脑外伤组(B组)和脑外伤加 HBO 治疗组(C组),各组大鼠在造模 24 d 后同时进行 ChAT 阳性细胞数及相关参数的定量分析。**结果** C 组大鼠额叶皮质和海马 ChAT 阳性神经元数目比 B 组明显增多($P < 0.01$)。**结论** HBO 治疗能抑制乙酰胆碱能神经元的退行性变,从而使损伤大鼠海马区 ChAT 阳性纤维增生,这可能是 HBO 治疗改善颅脑损伤大鼠学习记忆功能障碍的原因。

【关键词】 脑外伤; 高压氧; 胆碱乙酰转移酶; 大鼠

Effects of hyperbaric oxygen on choline acetyltransferase in neurons after traumatic brain injury QIN Jie, YOU Chun-jing. Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To observe the effect of hyperbaric oxygen on choline acetyltransferase ChAT levels in the neurons of rats with traumatic brain injury. **Methods** Traumatic brain injuries were modeled in rats using Feeney's method. Thirty male rats were randomly divided into 3 groups: a traumatic brain injury group (group A), a traumatic brain injury plus hyperbaric oxygen (HBO) group (group B), and a sham operation group (group C). Samples of each rat's brain were tested for ChAT using immunohistochemical staining and light microscopy. **Results** ChAT-positive fibers in the hippocampus almost vanished after traumatic brain injury, but positive fibers were markedly increased after HBO treatment. **Conclusion** HBO treatment can activate neurons in the hippocampus and inhibit regression of cholinergic neurons, which may be one of the mechanisms by which HBO therapy improves learning ability in injured rats.

【Key words】 Traumatic brain injury; Hyperbaric oxygen; Choline-acetyltransferase; Rats

脑外伤是致残率极高的常见外伤。由于交通的发达和生产建设的发展,脑外伤的发生率也逐年增加,且受伤人群均为青壮年,给社会和家庭带来巨大负担。脑外伤患者可出现躯体、言语、认知等多方面功能障碍,其中认知功能受损对患者的影响更为严重。研究表明,胆碱能系统在睡眠、情感、学习、记忆等高级神经活动中起着重要的作用,该系统受损时可以引起认知和记忆缺陷,产生痴呆症状^[1]。高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)用于治疗脑外伤所致的认知障碍已有报道^[2,3],但对 HBO 治疗脑外伤的作用机理尚有不少争议。本实验旨在观察 HBO 对大鼠脑外伤后脑组织内额叶皮质和海马胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)阳性神经元数目的影响,并探讨有关的作用机制,以期为临床应用提供实验依据。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物:健康雄性 SD 大鼠 30 只,体重为 250 ~ 300 g,由同济医学院实验动物中心提供,自然光照饲养,实验前禁食 12 h,不禁水。

2. 主要试剂和仪器:水合氯醛(上海试剂二厂),一抗兔抗 ChAT 单克隆抗体、二抗及 ABC 试剂盒(武汉博士德公司),其他试剂(多聚甲醛等)均为市售分析纯产品。图像分析系统(HPIAS-1000 高清晰度彩色图文分析系统,同济医学院),HBO 实验动物舱(烟台宏远氧业有限公司产)。

二、实验方法

1. 实验动物分组:采取随机分组的方法将 30 只大鼠分为 3 组,即假手术对照组(A组)10 只,脑外伤组(B组)10 只,脑外伤加 HBO 治疗组(C组)10 只。

2. 动物模型制备及处理:参照自由落体撞击法造模^[5]。B、C 组大鼠称重后,用 6% 水合氯醛(30 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉,俯卧位固定,消毒后于矢状正中

基金项目:湖北省卫生厅科研基金项目(No. JXIB044)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科

通讯作者:尤春景

线切开头皮与骨膜,分离骨膜,于左侧顶部、前囟后 2 mm、中线旁开 2 mm 处,作一直径约 4 mm 的骨窗,保持硬膜完整,将其置于自由落体底部,用 28 g 砧码于 36 cm 高处落下,撞击于左顶骨窗硬膜圆柱体上,下陷深度为 2 mm。大鼠若出现呼吸暂停数秒、四肢抽搐,则提示造模成功。A 组大鼠操作同上,但最后不做撞击。手术前、后大鼠肛温维持在 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,术后予以 4 万 U 青霉素预防感染。

3. HBO 治疗:C 组大鼠致伤后 24 ~ 48 h 以内开始行 HBO 治疗。使用 GB150-98 型动物高压氧舱,将处理好的大鼠放入动物加压舱,用纯氧洗舱 10 min,使舱内氧浓度 $> 95\%$,以 0.006 MPa/min 的速率加至 0.22 MPa (2.2 ATA),在高压下停留 60 min (期间用纯氧通风 10 min),结束后,匀速减压 20 min 至常压,出舱。B 组大鼠亦置于加压舱内,模拟除压力和氧浓度外的其他实验过程和环境条件。干预时间为 24 d。

4. 标本制作:将大鼠用 6% 水合氯醛 (30 mg/kg 体重) 腹腔麻醉后,开胸暴露心脏,插管,由左心室经主动脉先快速灌注生理盐水 200 ml,接着先快后慢灌注 4% 多聚甲醛 - 0.1 mol/L PB 400 ml,断头取脑,再置于同上固定液中浸泡 6 h,根据大鼠脑定位图谱选取冠状切面 (Bregma - 4.16 mm) 皮质、海马、下丘脑平面,按常规制成厚度约 5 μm 石蜡切片,并行 HE 染色。

5. 免疫组化染色:石蜡切片常规脱蜡至水后,对抗原进行修复 (切片置于 pH 6.0, 0.01 mol/L 柠檬酸-柠檬酸盐缓冲液的水浴锅中, 95°C 、30 min 行热修复),自然冷却,0.01 mol/L PBS 洗涤,分别加入一抗 ChAT (1:3 000) 6 h,二抗 IgG (1:300) 2 h,ABC (1:300) 2 h, DAB 呈色,苏木素轻度复染 1 min,脱水透明,中性树脂封固, PBS 代替一抗作阴性对照。

6. ChAT 阳性细胞数的定量分析:参照大鼠脑立体定位图谱,在光镜下每只大鼠均选取相同层面切片 4 张,在显微方格尺镜下分别计数 ChAT 免疫反应阳性的细胞数。借助经标定的 Leica Q500MC 图像分析仪和 Macintosh II 医学图像病理分析系统对 ChAT 阳性神经元胞体的平均截面面积进行定量测定。每只大鼠均选取相同部位的切片,每个区域测 4 个不同视野,取其均值。

三、统计学分析

用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学分析,数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 t 检验。

结 果

一、动物行为

受打击的动物,伤后即刻出现呼吸暂停数秒,16

只动物出现持续数秒的轻度全身抽搐,有的伴有去皮质综合征 (表现为双侧前肢屈曲、双侧后肢强直及颈项强直等),经辅助呼吸后多数可恢复规则的自主呼吸。4 只大鼠于打击后十余秒钟死亡。

二、病理改变

16 只大鼠在基底池有轻度的蛛网膜下腔出血,脑实质点状出血,多位于低位脑干背侧,脑皮质表面基本正常,无明显大面积挫伤或局灶性挫裂伤。其中 3 只大鼠可见有脑室内出血,但未见脑组织局灶性病灶。光镜观察:HE 染色切片中可见脑室上方的顶叶皮质神经元的变化明显,较多的神经元胞体收缩,色粉红,核皱缩深染偏位,神经元细胞周围出现空隙,甚至胞质与胞核凝结在一起,没有明显界限,距受伤部位越远,上述改变越轻。C 组 HBO 治疗 24 d,细胞存活数量明显多于 B 组。

三、免疫组化分析

A 组中海马结构内含有大量 ChAT 阳性染色纤维,其排列均匀细致,表面光滑。B 组中 ChAT 阳性纤维明显减少,几乎不见正常形态的纤维 (图 1)。C 组 ChAT 阳性纤维明显增多,纤维较粗大,排列紊乱,不如 A 组规则 (图 2)。

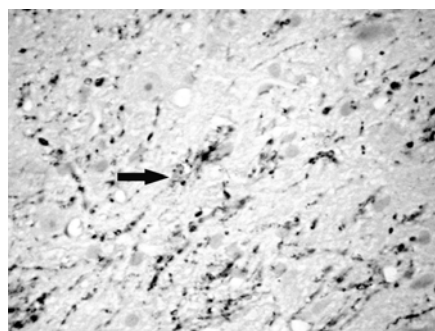


图 1 B 组大鼠 ChAT 阳性纤维

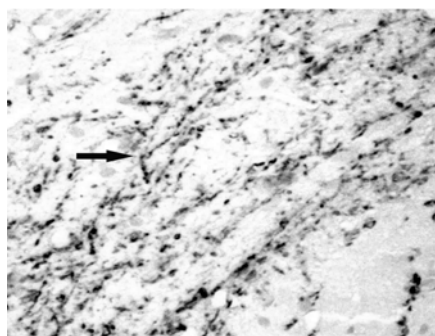


图 2 C 组大鼠 ChAT 阳性纤维

四、定量分析

结果显示各组间存在明显差异,主要表现在细胞数量的改变 (表 1)。B 组 ChAT 阳性神经元的数量显著减少,与 C 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 3 组大鼠 ChAT 阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞数(个)	平均截面积(μm^2)
A 组	25.28 $\pm$ 6.37	103.37 $\pm$ 15.23
B 组	9.26 $\pm$ 4.95 ^{*#}	104.22 $\pm$ 11.73
C 组	18.76 $\pm$ 5.82 [*]	102.79 $\pm$ 13.25

注:与 A 组比较,^{*} $P < 0.05$;与 C 组比较,[#] $P < 0.05$

讨 论

胆碱能系统在睡眠、情感、学习、记忆等高级神经活动中起着重要的作用,该系统受损时可引起认知和记忆缺陷,产生痴呆症状。破坏大脑皮质及海马的胆碱能纤维投射,动物的行为和学习、记忆能力受到明显损害^[1]。脑内胆碱能纤维主要源于前额叶的胆碱能神经元,经穹隆投射到海马。乙酰胆碱是中枢神经系统内的一种重要的神经递质,由乙酰辅酶 A 及胆碱在 ChAT 催化下合成。ChAT 在神经元胞体中合成,经轴浆运输到神经末梢。本实验对损伤大鼠进行 ChAT 免疫组化染色,发现大鼠损伤后 24 d 海马区脑组织 ChAT 阳性纤维明显减少,几乎不见正常形态的纤维,而经过高压氧治疗后的脑外伤大鼠 ChAT 阳性纤维明显增多。

基底前脑的胆碱能系统一个位于嘴端,主要由内侧隔核-斜角带、视前核大细胞部、嘴侧的 ChAT 阳性细胞组成;另一个位于尾端,主要有基底核。在隔-海马-边缘叶胆碱能通路和大脑皮质中存在着丰富的胆碱能纤维、胆碱能神经元和 M-胆碱受体。该通路是以乙酰胆碱为主要神经递质,乙酰胆碱能轴突终末在海马和齿状回各层均有分布。隔区为胆碱能神经元的集结地,其轴突通过穹隆和海马伞投射至海马 CA3、CA4 区及齿状回。ChAT 是乙酰胆碱的生物合成酶,存在于胆碱能神经元中,是衡量胆碱能神经元的标志。

本实验结果显示,C 组大鼠额叶皮质和海马胆碱乙酰转移酶阳性神经元数目明显多于 B 组。HBO 可增加血氧含量、提高血氧分压和弥散率、改善微循环、活化无效神经元和改善细胞膜功能有关^[2]。HBO 亦能改善脑组织供血,使部分处于功能可逆状态的脑细胞恢复功能。HBO 可提高血氧张力、血氧含量,特别是能使溶解氧浓度增大。此外,HBO 可以通过没有发生“无再流”的微血管提高血氧的弥散,增加组织内氧的有效弥散距离,从而有效地改善脑组织缺氧状态,使有氧代谢旺盛,生成 ATP 增多,从而使脑细胞获得较多的能量,脑功能得以提高。HBO 能改善损伤脑组织

的供血、供氧,阻断缺氧-水肿-缺氧的恶性循环。HBO 对脑外伤后的神经功能保护可能与下列因素有关:① HBO 抑制脑组织损伤后内源性毒性产物的生成,如氧自由基、一氧化氮,避免或减轻了自由基对神经细胞膜及其它生物膜的损害^[3,4]。② HBO 减轻缺血细胞膜上的离子泵损伤,使细胞内外的离子分布趋于正常状态,保持细胞膜的稳定^[5]。③ HBO 使红细胞压积、纤维蛋白原降低,并改善细胞膜的流动性;使红细胞变形能力增强,血液粘度降低;使血小板活性增高的持续时间缩短,减少外周血多形核白细胞 CD11/CD18 表达,缩短 CD11/CD18 表达异常时限,减轻细胞黏附分子对组织和血管的损伤作用;使脑损伤所致的血中脂质颗粒或斑块减少,并使血栓松解或缩小^[6-9]。④ HBO 能够减轻脑外伤后的细胞凋亡^[10]。HBO 可通过上述机制保护脑组织,抑制乙酰胆碱能神经元的退行性变,从而使损伤大鼠海马区 ChAT 阳性纤维增生,这可能是 HBO 治疗改善颅脑损伤患者学习记忆功能障碍的原因。其更具体的作用机制,有待于今后进一步研究。

参 考 文 献

- Bartus RT. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science, 1982, 217: 408-412.
- 蔺世龙,刘景昌. 高压氧对缺血性脑损伤微循环的作用. 循环学杂志, 2000, 10: 23-26.
- Neubauer RA, Gottlieb SF. Hyperbaric oxygen for brain injury. J Neurosurg, 1993, 78: 687-688.
- 尤晨,胡秉诚,周思伯,等. 高压氧对脑外伤后一氧化氮及脑水肿的影响. 中华理疗杂志, 1997, 20: 67-71.
- Takahashi M, Iwatsuki N, Ono K, et al. Hyperbaric oxygen therapy accelerates neurologic recovery after 15-minute complete global cerebral ischemia in dogs. Crit Care Med, 1992, 20: 1588-1594.
- 黄志雄,关国梁,邓英,等. 高压氧对重型颅脑损伤性脑血流及脑电信号的影响. 中国医师杂志, 2000, 2: 342-344.
- 段云亨,张勇,张全忠,等. 高压氧对急性一氧化碳中毒患者血液流变学的影响. 现代中西医结合杂志, 2001, 10: 1718-1719.
- 翟凤兰. 高压氧对缺血性脑血管病患者血液流变学的作用. 中华航海医学杂志, 1997, 4: 177-179.
- 葛环,高春锦,赵立明,等. 高压氧对一氧化碳中毒大鼠血小板 CD61 及多形核白细胞粘附分子 CD11/CD18 表达的影响. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2002, 9: 135-138.
- Clark RS, Chen J, Watkins SC, et al. Apoptosis-suppressor gene Bcl-2 expression after traumatic brain injury in rats. J Neurosci, 1997, 17: 9172-9182.

(修回日期:2006-01-17)

(本文编辑:松 明)

欢迎订阅《中华物理医学与康复杂志》