

· 基础研究 ·

高压氧对脑外伤大鼠海马神经元凋亡的影响

陈静 尤春景

【摘要】目的 研究高压氧对于脑外伤大鼠神经细胞凋亡的作用。方法 采用改进的 Feeney 自由落体法建立脑外伤模型,72 只大鼠随机分为正常对照组、脑外伤组、高压氧治疗组。在预定时间点采用 TUNEL 法和免疫组化法观察 3 组细胞的凋亡及 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达情况。结果 高压氧治疗组伤后第 1,7,24 天细胞凋亡率均低于脑外伤组。各时间点 Bcl-2 染色阳性细胞率均高于脑外伤组,各时间点 Bax 染色阳性细胞率均低于脑外伤组。结论 高压氧可明显提高 Bcl-2 的表达,抑制 Bax 的表达,进而抑制细胞凋亡。

【关键词】 高压氧; 脑外伤; Bcl-2; Bax; 大鼠

The effect of hyperbaric oxygen therapy on apoptosis: Expression of Bcl-2 and Bax protein in rats with traumatic brain injury CHEN Jing, YOU Chun-jing. Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To study the effects of hyperbaric oxygen therapy on traumatized cerebral neurons and investigate its mechanism in attenuating cerebral damage. Methods Seventy-two rats were randomly assigned to a control group, a traumatic brain injury group or a traumatic brain injury group treated with hyperbaric oxygen. Each group was observed 1, 7 and 24 days after the operation. TUNEL was used to examine the distribution of apoptosis cells. An immunohistochemical method was used to examine the distribution of Bcl-2 and Bax immunoreactive-positive cells in the brain tissues. Results The average percentages of both apoptosis cells and Bcl-2 immunoreactive-positive cells were lower in the CA1 region of the traumatized brains treated with hyperbaric oxygen than in those of the traumatic injury group at each time of observation. A significant difference in Bax immunoreactive-positive cells between the two groups was also observed. Conclusion Hyperbaric oxygen therapy can significantly protect neurons against traumatic brain injury and modulate the expression of the apoptosis related genes Bcl-2 and Bax. This may explain the protective mechanisms of hyperbaric oxygen therapy in treating traumatic brain injury.

【Key words】 Hyperbaric oxygen therapy; Traumatic brain injury; Bcl-2; Bax; Rats

脑外伤是致残率极高的意外损伤。目前资料显示,高压氧对脑外伤后患者的康复疗效确切。本研究试图通过高压氧治疗脑外伤后大鼠,检测其海马 CA1 区不同时间点的神经元凋亡情况和 Bcl-2、Bax 表达情况,从分子水平探讨高压氧对脑外伤的治疗作用及机制。

材料与方法

一、实验动物与分组

采用健康成年雄性 Wistar 大鼠 72 只(鼠龄 4~6 周),由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,体重为 250~350 g。随机分为正常对照组、脑外伤组、高压氧治疗组,每组 24 只。

二、动物模型的制备

参照 Feeney 自由落体法造模^[1]。脑外伤组、高压氧治疗组大鼠称重后,用 10% 水合氯醛(5 ml/kg 体

重)腹腔注射麻醉。俯卧位固定,消毒后于矢状正中线切开头皮,分离骨膜,于右侧顶部、前囟后 2 mm、中线旁 2 mm 处作一直径约 4 mm 的骨窗,保持硬脑膜完整并置于一空心圆柱体的正下方。以 28 g 砝码放入圆柱体内,于 36 cm 高处落下,撞击其底部的金属体,使其陷入脑组织 2 mm,局部消毒后缝合头皮,置笼内饲养。正常对照组动物操作同上,但不作撞击处理。

三、高压氧治疗

于造模后 2 h 内,将高压氧治疗组大鼠置于动物舱内,用纯氧洗舱 10 min,使舱内 O₂ 浓度 >95%。匀速加压至 0.12 MPa(表压),稳压 60 min,随后匀速减压 20 min 至常压,此为 1 次治疗。实验中通过观察窗仔细观察大鼠在舱内的行为状态。正常对照组和脑外伤组动物亦置于加压舱内,模拟除了压力和氧浓度以外的其他实验过程和环境条件。干预时间为 21 d。

四、脑标本制作

分别于造模后 24 h、7 d 和 24 d 处死 3 组大鼠各 8 只。在深度麻醉状态下,迅速开胸暴露心脏,经左心室行主动脉插管。先用 100 ml(37℃)生理盐水快速冲

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

洗,再用 4% 多聚甲醛 PBS 液(pH 值 7.4,4℃)500 ml 灌注。迅速断头取脑,置于 4% 多聚甲醛溶液(4℃)固定 24 h,根据大鼠脑定位图谱选取冠状切面海马平面,常规石蜡包埋切片(厚 5 μ m)。

五、指标检测

以原位细胞凋亡试剂盒(TUNEL 法,武汉博士德公司)检测凋亡细胞,按说明书进行操作,以 DAB 显色,镜下观察。随机选取 5 个相同平面切片视野,计数每个视野内的凋亡细胞阳性率,计算其平均值,进而算出各组的凋亡细胞率均数。以过氧化酶标记的链霉素卵白素(SP)法(武汉博士德公司)来检测 Bcl-2、Bax 蛋白的表达情况。阴性对照用 0.01 mol/L PBS 代替一抗。随机选取 5 个视野,测定每个视野的阳性细胞率,取其均值。应用图像分析系统(HPIAS-1000 高清晰度彩色图文分析系统,同济医学院)进行计算机图像处理。

六、统计学分析

实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 统计软件包对数据进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、原位细胞凋亡(TUNEL)检测

TUNEL 阳性染色细胞主要表现为细胞核呈棕黄色,在未加 TdT 酶和标志液的空白染色切片未见阳性细胞。脑外伤组和脑外伤+高压氧治疗组均可见散在的 TUNEL 阳性细胞(图 1)。脑外伤组海马 CA1 区阳性细胞数至伤后 24 h 最多,以后呈下降趋势。高压氧治疗组海马 CA1 区 TUNEL 阳性细胞数均少于相应时间点脑外伤组(表 1)。

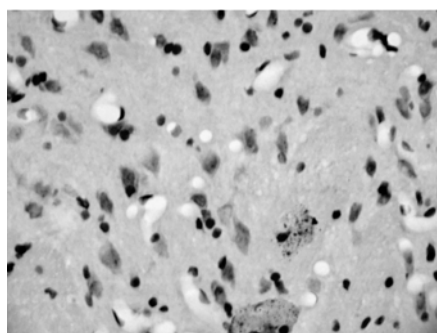


图 1 脑外伤组 7 d 细胞凋亡(TUNEL 染色, $\times 400$)

表 1 各组大鼠不同时间点海马神经元 TUNEL 阳性细胞率比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	伤后时间(d)		
		1	7	24
正常对照组	24	6.2 $\pm$ 1.3	5.8 $\pm$ 1.6	6.6 $\pm$ 2.1
脑外伤组	24	28.4 $\pm$ 3.7 *	36.9 $\pm$ 3.5 *	20.8 $\pm$ 2.6 *
高压氧治疗组	24	20.2 $\pm$ 2.5 *#	23.7 $\pm$ 2.4 *#	17.9 $\pm$ 1.7 * Δ

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与脑外伤组比较,# $P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$

二、Bcl-2、Bax 蛋白表达情况

Bcl-2、Bax 表达的细胞主要在胞浆着色,胞核也能见到,呈弥漫性或散在棕黄色颗粒(见图 2,3)。正常对照组 Bcl-2 和 Bax 表达极其微弱。在高压氧治疗组大脑海马结构中,Bcl-2 和 Bax 均有阳性表达,在高压氧治疗组则有明显表达,2 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组内 Bcl-2 和 Bax 阳性细胞数随着时间延长也在发生变化,Bcl-2 伤后 24 h 表达达到较高水平,Bax 在伤后 7 d 达到较高水平(表 2,3)。

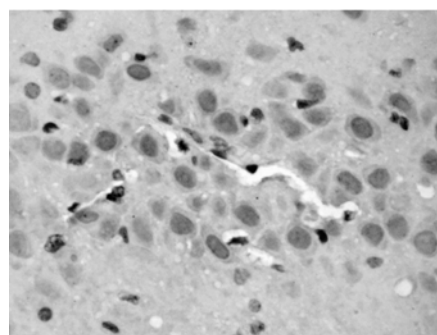


图 2 高压氧治疗组 1 d 后 Bcl-2 表达情况(免疫组化染色, $\times 400$)

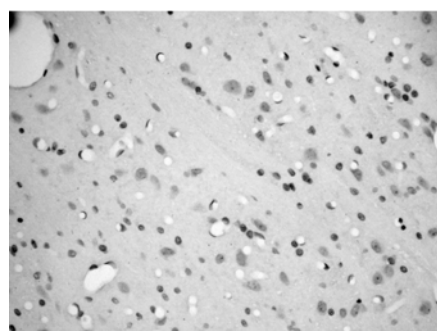


图 3 脑外伤组 7 d 后 Bax 表达情况(免疫组化染色, $\times 200$)

表 2 各组大鼠不同时间点免疫组化染色 Bcl-2 阳性细胞率比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	伤后时间(d)		
		1	7	24
正常对照组	24	8.9 $\pm$ 1.7	9.2 $\pm$ 1.3	9.8 $\pm$ 1.1
脑外伤组	24	19.3 $\pm$ 1.4 *	16.7 $\pm$ 2.0 *	15.4 $\pm$ 1.8 *
高压氧治疗组	24	24.1 $\pm$ 1.8 * Δ	20.5 $\pm$ 2.3 * Δ	19.7 $\pm$ 1.6 *#

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与脑外伤组比较,# $P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$

表 3 脑外伤后不同时间点免疫组化染色 Bax 阳性细胞率比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	伤后时间(d)		
		1	7	24
正常对照组	24	15.6 $\pm$ 3.4	16.8 $\pm$ 2.3	14.9 $\pm$ 1.8
脑外伤组	24	45.6 $\pm$ 5.2 *	48.2 $\pm$ 3.3 *	32.4 $\pm$ 1.3 *
高压氧治疗组	24	30.8 $\pm$ 2.7 * Δ	26.5 $\pm$ 1.8 *#	18.9 $\pm$ 1.2 *#

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与脑外伤组比较,# $P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$

讨 论

脑损伤时会发生缺血缺氧、脑细胞代谢障碍^[2], 脑水肿及脑组织退变等病理变化。自 1995 年 Rink 等^[3]首次在脑外伤后的大鼠皮质、白质、海马 CA3 及齿状回发现凋亡细胞以来, 国内外大量学者都对凋亡细胞作了研究。到目前为止, 此类研究多集中在缺血性脑损伤上^[3-7], 并探讨了药物干预及亚低温等对神经元凋亡的影响。海马作为脑损伤后的选择性易损伤区^[8], 在伤后早期出现某些基因超表达、兴奋性氨基酸过度释放及神经细胞延迟性死亡等对外源性刺激敏感的现象。因此, 本实验选择海马区神经组织作为检测区域, 旨在更灵敏的发现各指标的变化, 特别是本实验干预因素对神经组织的影响。

本实验结果发现, 脑外伤组大鼠脑组织中 TUNEL 阳性细胞与正常对照组、高压氧治疗组与脑外伤组之间差异均有统计学意义。这表明, 脑外伤后存在神经细胞凋亡, 而高压氧能特异性地抑制这一病理过程。TUNEL 染色发现在脑外伤后较长时间内, 均有神经细胞的凋亡; 伤后 7 d 凋亡细胞率达到最大, 伤后 24 d 后仍可以检测到。这提示细胞凋亡是选择性和迁延性的^[9]。从数据上来看, 伤后 7 d 细胞凋亡数为 $(23.7 \pm 2.4)\%$, 经高压氧治疗后, 第 21 天时这一比率有较大下降。

Bcl-2 家族是一系列与凋亡抑制因子 Bcl-2 蛋白结构类似的蛋白质^[10], 由于其螺旋片断的不同, 起着不同的功能, 家族中抑制和促进细胞凋亡的两类蛋白的比例决定了细胞在受到凋亡信号刺激后是否发生凋亡^[11]。本实验提示高压氧对于急性脑损伤的作用能持续到伤后 3 周。实验中 Bcl-2 在脑外伤组有一定量的阳性表达。高压氧治疗组与之相比差异有统计学意义。可见, 高压氧的治疗作用是通过 Bcl-2 蛋白表达的增加来抑制病理性细胞凋亡的发生, 从而保护神经元。Bax 蛋白在脑外伤组表达十分明显, 与高压氧治疗组比较差异有统计学意义, 高压氧组在损伤 24 h 时 Bax 表达达到一个较高水平, 伤后 7 d 表达有所下降。可见高压氧通过抑制 Bax 蛋白的表达从而发挥治疗作用。

研究表明, 高压氧能增加微血管开放数量, 加快微循环血流速度和侧支循环建立^[12], 同时能增大氧的有效弥散半径, 弥散程度和范围也有增加, 血中物理溶解氧量显著增加^[13], 并能改善血液的流变性^[14]。而且介入时间越早, 不间断的足疗程治疗更有利于创伤的恢复^[15]。有报道在外伤后 30 min 后即进行一次治疗亦有效^[16,17]。从分子水平来说, 由于 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白对细胞凋亡的调控作用相反, 因此两者之间可能存在某种平衡, 而高压氧是使 Bcl-2 表达增加, Bax 表达减少。因此调控 Bcl-2、Bax 表达, 从而影响神经细

胞的凋亡是高压氧对脑损伤组织产生作用的机制之一。Palzur 等^[18]的研究也支持这一理论。有研究^[19]提出高压氧治疗效果与治疗剂量 (DHBOT) 有很高的相关性 $[DHBOT = P_{O_2}(\text{治疗舱内氧分压}) \times T_t(\text{单次治疗时间}) \times N_t(\text{治疗次数})]$ 。因此如何掌握最佳治疗剂量/效果比, 以及长时间高压氧的累积疗效通过何种方式实现, 尚需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Feeney DM, Boyeson MG, Lim RT, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res*, 1981, 211:67-77.
- 2 彭慧平, 吴钟琪, 卢晓欣. 高压氧对脑外伤患者血糖的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24:478-479.
- 3 Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, et al. Evidence of apoptotic cell death after experiment brain injury in the rat. *Am J Pathol*, 1995, 147:1575-1583.
- 4 Veltkamp V, Siebing DA, Heiland S, et al. Hyperbaric oxygen induces rapid protection against focal cerebral ischemia. *Brain Res*, 2005, 1037:134-138.
- 5 Flynn EP, Auer RN. Eubarc hyperoxemia and experimental cerebral infarction. *Ann Neurol*, 2002, 52:566-572.
- 6 Lou M, Eschenfelder CC, Herdegen T, et al. Therapeutic window for use of hyperbaric oxygenation in focal transient ischemia in rats. *Stroke*, 2004, 35:578-583.
- 7 许琳琳, 郭根平, 沈丰庆. 早期高压氧治疗对急性脑卒中患者功能恢复的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27:550-551.
- 8 白云驰, 阙志生. 大鼠脑挫裂伤后神经细胞凋亡相关因素研究. *河北医药*, 2004, 2:143-145.
- 9 盛树力. 临床神经科学前沿. 北京: 北京大学出版社, 2003. 205.
- 10 Kelelara A, Thompson CB. Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol*, 1998, 8:324-330.
- 11 Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 1998, 281:1322-1326.
- 12 蒯世龙, 刘景昌. 高压氧对缺血性脑损伤微损伤的作用. *循环杂志*, 2000, 10:23-26.
- 13 吴钟琪. 医用高压氧临床手册. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997. 159.
- 14 郎岳明. 高压氧治疗脑挫伤对血液流变性的影响. *中华理疗杂志*, 2001, 1:24.
- 15 Wang IC, Wen-Neng Ueng S, Yuan LJ, et al. Early administration of hyperbaric oxygen therapy in distraction osteogenesis: a quantitative study in New Zealand rabbits. *J Trauma*, 2005, 58:1230-1235.
- 16 Yu Y, Matsuyama Y, Yanase M, et al. Effects of hyperbaric oxygen on GDNF expression and apoptosis in spinal cord injury. *Neuro Report*, 2004, 15:2369-2373.
- 17 Rogatsky GG, Kamenir Y, Mayevsky A. Effect of hyperbaric oxygenation on intracranial pressure elevation rate in rats during the early phase of severe traumatic brain injury. *Brain Res*, 2005, 1047:131-136.
- 18 Palzur E, Vlodavsky E, Mulla H, et al. Hyperbaric oxygen therapy for reduction of secondary brain damage in head injury: an animal model of brain contusion. *J Neurotrauma*, 2004, 21:41-48.
- 19 Rogatsky GG, Shifrin E, Mayevsky A. Optimal dosing as a necessary condition for the efficacy of hyperbaric oxygen therapy in acute ischemic stroke: a critical review. *Neurol Res*, 2003, 25:95-98.

(收稿日期: 2006-01-12)

(本文编辑: 熊芝兰)