·基础研究·

高压氧治疗对大鼠重度脑创伤后炎性反应的影响

包长顺　夏佐中　王强　梁平　李映良　翟喧

【摘　要】 **目的**　观察高压氧治疗对重度脑创伤大鼠其脑组织内炎性细胞因子水平的影响及大鼠脑组织病理学改变,并探讨高压氧治疗的作用机制。**方法**　将SD大鼠随机分为假手术组、高压氧组及脑创伤组。采用高压气体冲击脑组织制作大鼠局部脑创伤模型。分别于术后3 h、1 d、3 d、5 d及7 d时观察大鼠脑组织病理学改变;同时应用放射免疫检测技术测定脑创伤组及高压氧组在上述各时间点时脑内TNF-α、IL-6、IL-8及IL-10的水平。**结果**　当大鼠发生脑创伤后,上述各炎性细胞因子水平较假手术组均有不同程度提高,经高压氧治疗后,发现炎性细胞向脑组织内浸润现象减缓,并有大量小胶质细胞、星形胶质细胞聚集、增生,而且高压氧组大鼠脑组织内上述炎性细胞因子在各时间点均较脑创伤组降低(均 $P<0.01$);与假手术组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论**　高压氧可抑制炎性细胞向脑创伤组织处浸润,降低各炎性细胞因子水平,促进小胶质细胞、星形胶质细胞聚集、增生,具有保护受损脑组织的功效。

【关键词】 脑创伤;　高压氧;　细胞因子

Effects of hyperbaric oxygen on the inflammatory response after severe traumatic brain injury in rats　*BAO Chang-shun*, XIA Zuo-zhong, WANG Qiang, LIANG Ping, LI Ying-liang, ZHAI Xuan.*

** Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China*

【**Abstract**】 **Objective**　To observe the effects of hyperbaric oxygen (HBO) on inflammatory cytokines in cerebral tissues and the histopathological changes after traumatic brain injury (TBI) in rats, and to explore the mechanisms of HBO therapy. **Methods**　SD rats were randomly divided into a sham-operation group (SO group), a HBO group and a TBI group. The partial TBI models were established by impacting cerebral tissues with hyperbaric gas. The histopathological changes were observed at 1 hour, 1 day, 3 days, 5 days, 7 days after treatment, while the levels of inflammatory cytokines, such as TNF-α, IL-6, IL-8 and IL-10, in cerebral tissues of rats were measured by using radioimmunoassay (RIA). **Results**　Compared with those in the SO group, the levels of inflammatory cytokines were significantly increased at different time points after traumatic brain injury, while these parameters were decreased obviously after HBO treatment in the HBO group with the comparison of those in the TBI group ($P<0.01$), and the infiltration of inflammatory cells inside cerebral tissues was slower, as well as the gathering and proliferating of microglia and astrocyte were observed. **Conclusion**　HBO could protect the injured cerebral tissues by inhibiting the infiltration of inflammatory cells, decreasing the levels of inflammatory cytokines and promoting collection and proliferation of microglia and astrocyte after TBI.

【**Key words**】 Traumatic brain injury;　Hyperbaric oxygen;　Cytokines

近年来研究发现,当机体发生脑创伤(traumatic brain injury,TBI)后,其脑组织内有大量炎性细胞浸润、聚集,炎性因子水平升高,引发颅内炎性反应,可诱发或加剧TBI后继发性脑损伤(secondary brain injury,SBI)。目前,高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗在颅脑损伤中的应用及疗效已获到广泛关注及认可,并已成为治疗颅脑损伤的重要手段之一。本实验拟通过观察HBO对大鼠TBI后脑组织内促炎性细胞因子TNF-α、IL-6、IL-8及抗炎性细胞因子IL-10水平的影响,并结合病理组织学观察,探讨HBO对大鼠TBI后炎性反应的影响及其相关治疗机理。

材料与方法

一、实验动物及分组

实验动物为健康SD大鼠,雄性,250~300 g,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。将其随机分为假手术组($n=6$)、TBI组(包含5个观察时间点,共30只)及HBO组(包含5个观察时间点,共30只)。TBI组及HBO组的5个观察时间点分别对应脑损伤后3 h、1 d、3 d、5 d及7 d,每组各个观察时间点均有6只大鼠。

作者单位:646000　泸州,四川省泸州医学院附属第一医院神经外科(包长顺);重庆医科大学儿童医院神经外科(夏佐中、梁平、李映良、翟喧);第三军医大学大坪医院高压氧科(王强)

二、大鼠重度脑创伤模型制备

参照刘海鹏等[1]介绍的方法制备大鼠脑创伤模型。具体操作步骤如下:TBI 组及 HBO 组大鼠于术前 12 h 禁食,自由饮水,采用盐酸氯胺酮(100 mg/kg 体重)进行腹腔注射麻醉。待麻醉剂生效后,将大鼠固定于(俯卧位)立体定向仪上,头部剪毛,常规消毒铺巾。于正中矢状位切开大鼠头部皮肤,显露左顶部颅骨,于中线左侧旁开 2 mm、前囟后 3 mm 处钻一直径约 3 mm 的小孔,暴露出硬脑膜(注意保持硬脑膜完整性)。随后将大鼠移至气体冲击机前,调整大鼠脑表面与冲击管口间距离为 4 mm,调节气源压力为 700 kPa,波宽为(60 ± 0.3)ms,释放冲击气体致大鼠脑创伤。如气体冲击后大鼠呼吸暂停数秒、四肢出现抽搐,则说明脑创伤模型制作成功。最后用骨蜡封闭大鼠脑部骨窗并缝合头皮,待其清醒后分笼喂养。假手术组大鼠只进行颅骨钻孔(手术方式与各实验组相同),显露硬脑膜,但不给予气体冲击。

三、治疗方法

HBO 组大鼠于术后 30 min 即首次入高压氧舱治疗。先用纯氧充分洗舱 10 min,使舱内氧浓度大于 90%,随后匀速加压 10 min 至舱内压强为 0.2 MPa(2 ATA),稳压 60 min,期间向舱内连续输入纯氧以维持舱内氧浓度为(95 ± 5)%,温度控制在(22 ~ 26)℃,相对湿度为(63 ~ 88)%。待治疗结束后,匀速减压 20 min至常压,动物出舱。HBO 组大鼠每天接受 1 次 HBO 治疗,并持续至各观察时间点结束。TBI 组及假手术组大鼠术后均不作任何特殊处理。

四、组织取材及细胞因子检测

TBI 组和 HBO 组大鼠分别于模型建立后 3 h、1 d、3 d、5 d 及 7 d 时取材。各组实验动物以 10% 水合氯醛(400 mg/kg 体重)进行腹腔麻醉,待麻醉剂生效后迅速断头并剪开颅骨,取出完整脑组织,置于冰面上。以创伤区为中心取直径 6 mm 的全层脑组织,一半放入 10% 甲醛溶液中固定,用作形态学观察;另一半则取脑皮质部分,于电子天平上称重,按 1:10[脑组织重量(mg)/PBS 液体积(ml)]的比例加入 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)。采用内切式匀浆机将其充分匀浆5 min,随后将匀浆液置入高速低温离心机内离心4 min(12 000 g,4℃),取上清液,放入 -70℃低温冰箱内保存,用作放射免疫检测。采用放射免疫法(radioimmunoassay, RIA)测定 TNF-α、IL-6、IL-8 及 IL-10 含量,RIA 试剂盒由北京东亚免疫技术研究所提供,由专人严格按照药盒说明书进行操作。

五、统计学分析

所有实验所得数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 版统计分析软件进行组间 t 检验比较,$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠脑组织病理学改变

假手术组:肉眼观察发现其脑组织表面光滑,沟回整齐、清晰,无充血、肿胀及出血灶等。光镜下显示组织结构正常,细胞排列有序,染色均匀,无出血、水肿及明显损伤,未见炎性细胞浸润及血管扩张现象。

TBI 组:肉眼观察发现该组大鼠脑组织表面可高出骨窗,伤区脑皮层有表面挫裂伤,可观察到点灶状、小片状或斑块状出血灶,组织充血、肿胀。在光镜下,可发现大鼠受伤后 3 h 时即有皮层神经细胞、胶质细胞水肿;伤后 24 h 时脑组织结构紊乱,局部出血,组织水肿,神经细胞大量变性坏死,可出现大量无定形空泡;伤后 72 h 时脑组织结构疏松,仍伴有水肿、充血、细胞坏死、溶解后空泡形成等,创伤区可见炎性细胞、血管扩张,创伤部位出血现象较前期有所缓解;伤后 5 d及 7 d 时,可发现大鼠脑组织水肿减轻,创伤区炎性细胞减少,胶质细胞及纤维组织增生,可见泡沫细胞,未发现损伤区海马组织有明显病理改变。

HBO 组:肉眼观察 HBO 组脑组织,与 TBI 组各相应时间点比较,均无显著差异。在光镜下,HBO 组大鼠受伤24 h 内的病理改变与 TBI 组亦无明显差异;伤后 3 ~ 7 d可发现其脑组织损伤区炎性细胞减少,组织水肿减轻,胶质细胞聚集、增生,局部纤维组织增生明显, 另外脑组织损伤区还可见大量新生毛细血管生成。

二、HBO 对 TBI 大鼠各炎性细胞因子水平的影响

与 TBI 组各相应时间点比较,HBO 组各炎性细胞因子水平均有所降低,如 TNF-α、IL-10 从损伤后 1 d, IL-6、IL-8 从损伤后 3 d 即开始显著性降低,并均持续到受伤后第 7 天。具体数据详见表 1。

讨 论

目前,HBO 治疗作为颅脑损伤后重要的无创性治疗手段之一,正在临床中得到广泛应用,因其可以改善患者脑组织缺氧及代谢水平,降低颅内压,促进侧支循环建立,从而显示出独特功效。脑创伤(尤其是重型脑创伤)因其高致残率及高致死率,一直备受临床医师及科研工作者关注。近年来研究发现,TBI 后脑组织内有大量炎性细胞浸润、聚集,炎性细胞因子水平持续升高,可引起脑组织及机体全身系统的免疫功能紊乱,加重 TBI 后脑水肿、脑缺氧、脑血管痉挛及全身各系统病理改变等,造成脑组织不可逆性损伤甚至引发全身炎性反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)[2]。如能及早采取措施,减少或抑制

表 1 高压氧对大鼠脑创伤后脑组织内细胞因子水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	TNF-α(ng/ml)	IL-6(pg/ml)	IL-8(ng/ml)	IL-10(ng/ml)
假手术组(n=6)	4.66±0.45	103±8.11	0.50±0.03	81±7.58
TBI 组(n=30)				
损伤后 3 h	5.71±0.38	113±8.28	0.62±0.03	101±6.59
损伤后 1 d	6.91±0.48	144±14.40	0.66±0.04*	157±12.00*
损伤后 3 d	7.26±0.31*	156±4.53*	0.72±0.05*	125±15.60*
损伤后 5 d	7.51±0.52*	167±6.21*	0.65±0.03*	135±6.25*
损伤后 7 d	7.22±0.70*	184±20.9*	0.63±0.06*	137±6.25*
HBO 组(n=30)				
损伤后 3 h	5.23±1.06	109±7.83	0.61±0.02	100±5.54
损伤后 1 d	5.69±0.40△	134±9.83	0.63±0.05	115±17.00△
损伤后 3 d	6.20±0.56△	108±9.67△	0.58±0.04△	85±6.32△
损伤后 5 d	5.87±0.59△	106±12.70△	0.58±0.05△	84±6.88△
损伤后 7 d	4.88±0.77△	136±36.80△	0.56±0.04△	97±8.36△

注:与假手术组比较,* $P<0.01$;与 TBI 组相应时间点比较,△ $P<0.01$

TBI 后有害炎性因子、炎性介质的合成及释放,调节各种炎性因子及介质达到新的平衡,可减轻 TBI 后继发性脑损伤及全身组织器官损害,对 TBI 患者的早期救治、减少后遗症及提高生存质量等方面均具有重要意义。基于上述观点,本实验拟通过观察 HBO 对炎性细胞因子水平的影响,并结合病理组织学变化,从而探讨 HBO 治疗 TBI 的相关机制。

有研究表明,HBO 能保护受损脑组织,并调节机体炎性细胞因子水平。Atochin 等[3]研究发现,HBO 可抑制中性粒细胞向受损脑组织内浸润、聚集,从而保护受损脑组织。李胜年[4]亦指出,HBO 治疗可降低中性粒细胞粘附因子 CD_{18} 水平,抑制中性粒细胞粘附、聚集,减轻局部损伤组织的炎性反应,从而起到免疫保护作用。本实验病理结果表明,HBO 组与 TBI 组比较,前者创伤区中性粒细胞数量减少,组织水肿程度减轻,胶质细胞聚集、增生,局部纤维增生明显, 创伤区可见大量毛细血管生成。以上结果提示 HBO 可以抑制血源性炎性细胞向创伤脑组织内浸润、聚集,促进小胶质细胞、星形胶质细胞聚集、增生,减轻 TBI 后的继发性脑损伤。

目前,关于 HBO 治疗对 TBI 后炎性细胞因子水平的影响鲜见报道。赵红等[5]研究发现,HBO 可明显减少脑缺血再灌注损伤后脑内炎性细胞因子的含量,从而降低血脑屏障通透性,发挥治疗效应。于方等[6]采用 HBO 治疗缺血、缺氧性脑病患者,发现患者经 HBO 治疗后,其血浆及脑脊液中 IL-6、TNF-α 的降幅明显大于常规治疗组,提示 HBO 可能通过减少 IL-6、TNF-α 的生成,发挥脑保护效应。本实验结果亦显示,HBO 组大鼠脑组织中 TNF-α、IL-6、IL-8 及 IL-10 水平在各观察时间点均显著低于 TBI 组,其中 TNF-α、IL-10 从 HBO 治疗后 1 d,IL-6、IL-8 从 HBO 治疗后 3 d 开始显著下降,并持续至本研究的观察终点(HBO 治疗后第 7 天);而 HBO 组上述各炎性细胞因子水平与假手术组比较,差异均无统计学意义。上述结果提示,HBO 治疗可有效抑制 TBI 后反应性升高的炎性细胞因子水平,保护或修复受损脑组织,减轻 TBI 后继发性脑损伤。

但本实验结果同时还提示,脑创伤后 HBO 治疗不仅使促炎性细胞因子水平降低,抗炎性细胞因子 IL-10 的含量同时也会下降,而 IL-10 一直被认为是脑创伤后中枢神经系统重要的保护性因子之一,它可抑制炎性细胞的活化、聚集,降低多种炎性细胞因子的合成及释放,以对抗脑组织内的过度炎性反应。因此在进行 HBO 治疗时,应尽量提高被治疗者的免疫功能,并动态检测患者各种炎性细胞因子的含量,及时加入外源性抗炎性细胞因子(如神经生长因子等),这些措施的综合应用将有助于提高 HBO 的治疗效果,减少各种不良反应的发生,为进一步提高 HBO 治疗效果创造条件。

参 考 文 献

1 刘海鹏,尹志勇,王正国,等. 颅脑局部冲击伤——一种新的颅脑损伤模型. 中华实验外科杂志,1999,16:91.

2 Neugebauer E, Hensler T, Rose S, et al. Severe craniocerebral trauma in multiple trauma. An assessment of the interaction of local and systemic mediator responses. Unfallchirurg,2000,103:122-131.

3 Atochin DN, Fisher D, Thom SR, et al. Hyperbaric oxygen inhibits neutrophil infiltration and reduces postischemic brain injury in rats. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova,2001,87:1118-1125.

4 李胜年. 高压氧疗法及其适应症. 日本医学介绍,2000,21:89.

5 赵红,卢晓梅,陈学新,等. 高压氧对缺血再灌注小鼠脑组织中细胞因子和血脑屏障的影响. 中华物理医学与康复杂志,2002,24:608-610.

6 于方,林汉华,张怡娟,等. 高压氧对新生儿缺血缺氧性脑病血浆和脑脊液中 IL-6、TNF-α 的影响. 中华物理医学与康复杂志,2002,24:539-540.

(修回日期:2005-01-12)
(本文编辑:易 浩)