

· 基础研究 ·

高压氧干预对急性有机磷中毒大鼠脑组织中缺氧诱导因子-1 α 表达的影响

杨勇 杨金连 谢智慧

【摘要】目的 观察急性有机磷中毒大鼠脑组织缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 表达的变化,探讨高压氧 (HBO) 对急性有机磷中毒脑损伤的作用及其机制。**方法** 健康雄性 SD 大鼠 60 只,按随机数字表法分为健康对照组、中毒组、常规治疗组和 HBO 治疗组,健康对照组 6 只大鼠,其余每组 18 只,建立大鼠急性有机磷中毒脑损伤模型,均造模成功。常规治疗组给予长托宁和氯解磷定治疗 1 次,HBO 治疗组在给予常规治疗后即行 HBO 治疗 1 次。中毒组、常规治疗组和 HBO 治疗组分别于造模成功后 1、3 和 7 h (每个时间点 6 只) 下腔静脉采血检测丙二醛 (MDA) 的含量,荧光定量 PCR 检测脑组织 HIF-1 α mRNA 的表达,免疫组织化学法检测脑组织 HIF-1 α 蛋白的表达,同时行 HE 染色观察脑组织病理改变。**结果** ①HE 染色显示,治疗后 HBO 治疗组的脑组织病理损伤形态学表现较中毒组有所减轻;②与健康对照组比较,中毒组常规治疗组和 HBO 治疗组各时间点脑组织 HIF-1 α 蛋白表达明显增高 ($P < 0.05$),各时间点脑组织 HIF-1 α mRNA 相对表达量亦明显增高 ($P < 0.05$);③造模成功后 1、3 和 7 h,HBO 治疗组各时间点的脑组织 HIF-1 α 的表达分别为 (226.57 ± 57.49) 、 (205.91 ± 30.36) 、 (187.67 ± 29.25) ,明显低于较中毒组脑组织 HIF-1 α 的表达 [(1305.67 ± 167.17) 、 (2667.83 ± 367.79) 、 (1709.24 ± 199.07)],且血清 MDA 含量 [(7.74 ± 0.14) 、 (7.40 ± 0.13) 和 (6.10 ± 0.08) nmol/ml] 亦较中毒组的血清 MDA 含量 [(9.48 ± 0.05) 、 (11.56 ± 0.13) 和 (12.26 ± 0.14) nmol/ml] 明显下降,组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);而 HBO 治疗组治疗后 1 h 和 3 h 时间点的上述指标低于同时点常规治疗组,组间差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$);④线性相关分析表明,HIF-1 α mRNA 相对表达量与血清 MDA 含量具有显著的正相关性 ($r = 0.909, P = 0.000$)。**结论** HIF-1 α 参与了急性有机磷中毒性脑损伤的病理生理过程,HBO 对急性有机磷中毒性脑损伤早期的保护作用优于常规治疗组,其作用机制与抗氧化损伤和抑制 HIF-1 α 的表达有关。

【关键词】 有机磷中毒;急性; 脑损伤; 缺氧; 脑; 高压氧; 丙二醛

The effect of hyperbaric oxygen on the expression of hypoxia inducible factor-1 α in brain tissue after acute organophosphate poisoning Yang Yong*, Yang Jinglian, Xie Zhihui. * Department of Internal Medicine and Geriatrics, Dongfeng Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442008, China

Corresponding author: Xie Zhihui, Email: xiezhihui71@126.com

【Abstract】Objective To study the expression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in the brain tissue after the brain injury caused by acute organophosphate poisoning, and the interventional effect and mechanism of hyperbaric oxygen (HBO) therapy. **Methods** Sixty healthy male Sprague-Dawley rats randomly divided into a control group ($n = 6$), a poisoning group ($n = 18$), a routine group ($n = 18$) and an HBO group ($n = 18$) according to a random number table. Acute organophosphate poisoning was induced into all rats except those in the control group. The routine group was given penicillidone hydrochloride and pralidoxime chloride for once, while the HBO group was provided with HBO therapy immediately on the basis of routine treatment. At 1, 3 and 7 hours after acute organophosphate poisoning was induced, six rats were sacrificed at each time point and the blood samples were taken from inferior caval vein to measure the content of Malondialdehyde (MDA). The expression of HIF-1 α mRNA in the brain tissue was detected by the quantitative real-time PCR, and that of HIF-1 protein was evaluated by immunohistochemical method. Meanwhile, pathologic changes of the brain tissues were observed using hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results** Compared with the poisoning group, the pathological damage to cerebral tissues lessened in the HBO group. The expression of HIF-1 protein and HIF-1 mRNA of the poisoning and the HBO groups was significantly higher than the control group at 3 different time points. After the HBO treatment, the protein expression of HIF-1 lowered from 226.57 ± 57.49 , to 205.91 ± 30.36 and further to 187.67 ± 29.25 , while the MDA content decreased from 7.74 ± 0.14 , to 7.40 ± 0.13

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.05.003

基金项目:贵州省科技厅资助项目(20092185)

作者单位:442008 十堰,湖北省十堰市湖北医药学院附属东风医院综合医疗科(杨勇);贵州省遵义医学院附属医院高压氧科(杨金连、谢智慧)

通信作者:谢智慧,Email:xiezhihui71@126.com

and later to 6.10 ± 0.08 , both were significantly lower than those of the poisoning group at all time points, with HIF-1 being 1305.67 ± 167.17 , 2667.83 ± 367.79 and 1709.24 ± 199.07 , along with MDA content being 9.48 ± 0.05 , 11.56 ± 0.13 and 12.26 ± 0.14 , and those in the routine group at the time points of 1 and 3 hour later ($P < 0.05$). A positive correlation was found between the expression level of HIF-1 mRNA and level of MDA in the serum ($r = 0.909$, $P = 0.000$). **Conclusion** HIF-1 plays an important role in the development of brain injury caused by acute organophosphate poisoning. The efficacy of hyperbaric oxygen intervention against AOPP-induced brain injury is better than that of the routine treatment and its mechanism may be its antioxidation and inhibition of HIF-1 expression.

【Key words】 Organophosphorus poisoning, acute; Brain injury; Hypoxia, brain; Hyperbaric oxygenation; Malondialdehyde

急性有机磷农药中毒(acute organophosphorus pesticide poisoning, AOPP)是我国急诊常见的危重症,占急诊中毒患者的 49.1%,占中毒死亡的 83.6%^[1]。AOPP 引起的中枢神经系统损伤表现为不同程度的惊厥、抽搐、意识障碍,其发病机制尚不完全清楚,且无特效治疗药物^[2]。因此,减轻有机磷农药中毒性脑损伤已成为临床医师高度关注的问题。高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)在颅脑外伤、一氧化碳中毒性脑病、缺血缺氧性脑病等脑损伤的治疗中已取得显著的临床效果^[3-6]。本研究通过观察 HBO 对急性有机磷中毒脑损伤模型大鼠脑组织缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)表达和血清丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的影响,旨在探讨 HBO 对急性有机磷中毒性脑损伤的作用及其机制,为临床上防治急性有机磷中毒脑损伤提供理论依据。

材料与方法

一、实验动物及分组

雄性健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 60 只,体重(290 ± 20)g,购自第三军医大学实验动物中心。按随机数字表法分为健康对照组、中毒组、常规治疗组和 HBO 治疗组,健康对照组 6 只,其余每组 18 只。依据预实验将中毒组、常规治疗组和 HBO 治疗组按造模后 1、3 和 7 h 三个时间点分别进行标本采集和检测,每个时间点 6 只大鼠。

二、急性有机磷中毒脑损伤模型制备及其干预方法

取 77.5% 敌敌畏乳油 0.516 g,溶于 100 ml 蒸馏水,配置 0.4% 敌敌畏溶液(4 mg/ml);参考相关文献并结合前期预实验^[7-8],采用颈背部皮下累计注射法,每次敌敌畏用量 4 mg/kg 体重,待大鼠抽搐停止后再予同等剂量皮下注射,一共注射 5 次,保证大鼠不间断抽搐 3 h,即造模完成。动物出现惊厥样抽搐、共济失调或翻正反射消失即判断为脑损伤造模成功。造模过程中如出现动物死亡,或达不到造模要求的动物均剔除,再补充 SD 大鼠,重新造模。

中毒组不予任何治疗;常规治疗组造模成功后立即给予托托宁 0.12 mg/kg 体重和氯解磷定 30 mg/kg 体重肌肉注射治疗 1 次;HBO 治疗组在常规治疗后,立即将大鼠置于动物用实验 HBO 舱内,都仅进行

HBO 治疗 1 次。具体 HBO 治疗方法如下^[9]:加压 5 min,至 0.12 MPa(1.2 ATA),同时纯氧洗舱,之后在 5 min 内使舱内压升至 0.2 MPa(2 ATA),稳压吸氧 40 min,减压 10 min,舱内氧浓度保持在 95% 以上。

三、标本采集

各组于造模完成后 1、3 和 7 h 处死大鼠。腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉(0.3 ml/100 g 体重),固定并暴露腹腔,下腔静脉取血,离心分离血清,用于 MDA 含量检测;断头取脑,在冰上迅速分离海马组织和大脑皮质组织。大脑皮质放入 4% 多聚甲醛中固定,制成石蜡标本并切片,进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色及免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)检测,海马组织放入去酶冻存管中,置入 -80°C 冰箱供提取总 RNA。

四、检测指标

1. 脑组织 HIF-1 α mRNA 的表达:采用荧光定量 PCR 检测,按说明书操作主要步骤如下。①总 RNA 提取;②反转录;③荧光定量 PCR, HIF-1 α 上游引物 5'-CCAGATTCAAGATCAGCCAGCA-3';下游引物 5'-GCTGTCCACATCAAAGCAGTACTCA-3';扩增产物长度 100 bp; β -actin 内参扩增产物长度 150 bp;扩增条件为预变性 95°C 30 s, PCR 反应 95°C 10 s, 61°C 30 s, 40 个循环;④分别测定各组样本 β -actin、HIF-1 α 基因扩增的 CT 值,以正常组平均值做为对照按公式:基因表达量(倍数) = $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算,所得结果即为各样本 HIF-1 α mRNA 的相对表达量。

2. IHC 染色检测脑组织 HIF-1 α 蛋白:一抗为小鼠抗大鼠单克隆抗体,稀释浓度 1:400,按试剂盒说明书操作。HIF-1 α 蛋白以胞核和胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性表达,每组选取非连续的切片 3 张,每张切片随机选取 5 个视野($\times 400$),使用 Image-proplus 6.0 图像分析软件以积分光密度(integral optical density, IOD)为指标,对各组 IHC 染色进行分析。

3. 血清 MDA 含量的检测:采用硫代巴比妥酸比色法,按照试剂盒说明书操作完成。

五、统计学方法

使用 SPSS 19.0 版统计软件对数据进行统计学分析处理,实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,进行单因素方差分

析,两两比较用 LSD 法,并对上述数据进行线性相关分析。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

一、大鼠皮质组织 HE 染色

健康对照组 HE 染色见皮质结构完整,均匀致密,神经细胞排列有序,细胞核形态正常,结构完整,核仁清晰;中毒组 HE 染色见大鼠脑组织疏松,细胞排列稍有紊乱,神经细胞肿胀,微血管外间隙增大,但 3 个时间点区别不明显;常规治疗组和 HBO 治疗组各时间点 HE 染色与中毒组相比,组织水肿有所减轻。详见图 1。

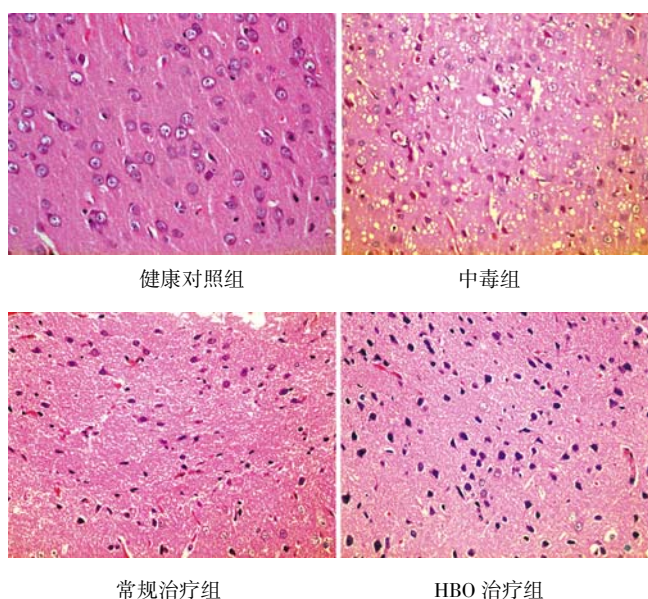


图 1 造模后 3 h 各组大鼠脑皮质细胞形态学改变(HE 染色, $\times 400$)

二、大鼠脑组织 IHC 检测

用 IHC 检测大鼠脑组织 HIF-1 α 蛋白的表达,发现其在胞核及胞浆内均有表达(图 2),健康对照组仅见胞浆内少量表达;中毒组主要在胞核内大量表达;常规治疗组表达较中毒组减少,胞核及胞浆均有表达;HBO 治疗组表达较中毒组、常规治疗组明显减少,仅在胞浆内表达。详见图 2。

与健康对照组比较,中毒组各时间点脑组织 HIF-1 α 蛋白表达明显增高($P < 0.05$);与中毒组各时间点相比,常规治疗组和 HBO 治疗组蛋白表达均降低($P < 0.05$);HBO 治疗组大鼠造模后 1 h 和 3 h 时间点的蛋白表达与常规治疗组同时间点比较,IOD 值明显降低($P < 0.05$),详见表 1。

三、大鼠脑组织 HIF-1 α mRNA 的相对表达量

脑组织 HIF-1 α mRNA 在各组均有表达。与健康对照组比较,中毒组各时间点脑组织 HIF-1 α mRNA 相对表达量亦明显增高($P < 0.05$);与中毒组各时间点相比,常规治疗组及 HBO 治疗组的 mRNA 表达均降

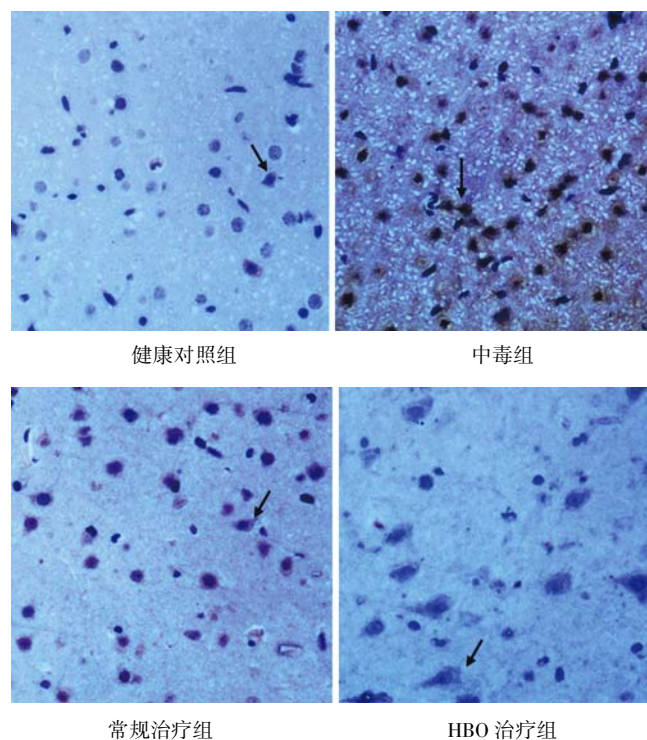


图 2 造模后 3 h 各组大鼠脑组织 HIF-1 α 蛋白的表达(IHC 染色, $\times 400$)

表 1 各组大鼠各观察时间点脑组织 HIF-1 α 表达的 IOD 值变化($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	造模后 1 h	造模后 3 h	造模后 7 h
健康对照组	6	198.18 $\pm$ 29.78	—	—
中毒组	6	1305.67 $\pm$ 167.17 ^a	2667.83 $\pm$ 367.79 ^a	1709.24 $\pm$ 199.07 ^a
常规治疗组	6	678.34 $\pm$ 95.72 ^{ab}	507.27 $\pm$ 49.05 ^{ab}	213.04 $\pm$ 32.48 ^b
HBO 治疗组	6	226.57 $\pm$ 57.49 ^{bc}	205.91 $\pm$ 30.36 ^{bc}	187.67 $\pm$ 29.25 ^b

注:与健康对照组比较,^a $P < 0.05$;与中毒组同时间点比较,^b $P < 0.05$;与常规治疗组同时间点比较,^c $P < 0.05$;—表示未测量

低($P < 0.05$);与常规治疗组各时间点相比,HBO 组造模后 1 h 和 3 h 时间点的 HIF-1 α mRNA 表达降低($P < 0.05$),详见表 2。

表 2 各组大鼠各观察时间点脑组织 HIF-1 α mRNA 相对表达量的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	造模后 1 h	造模后 3 h	造模后 7 h
健康对照组	6	0.99 $\pm$ 0.12	—	—
中毒组	6	1.63 $\pm$ 0.14 ^a	2.15 $\pm$ 0.19 ^a	1.92 $\pm$ 0.13 ^a
常规治疗组	6	1.37 $\pm$ 0.20 ^{ab}	1.16 $\pm$ 0.15 ^{ab}	1.07 $\pm$ 0.16 ^b
HBO 治疗组	6	1.10 $\pm$ 0.09 ^{bc}	1.05 $\pm$ 0.10 ^{bc}	0.95 $\pm$ 0.07 ^b

注:与健康对照组比较,^a $P < 0.05$;与中毒组同时间点比较,^b $P < 0.05$;与常规治疗组同时间点比较,^c $P < 0.05$;—表示未测量

四、血清中 MDA 含量的变化

与健康对照组比较,中毒组血清 MDA 含量随时间延长逐渐增高($P < 0.05$);与中毒组各时间点比较,常规治疗组和 HBO 治疗组血清 MDA 含量降低呈逐渐降低趋势($P < 0.05$);与常规治疗组各时间点比较,

HBO 治疗组 1 h 和 3 h 时间点的血清 MDA 含量降低 ($P < 0.05$), 详见表 3。

表 3 各组大鼠血清中 MDA 含量的变化 (nmol/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	造模后 1 h	造模后 3 h	造模后 7 h
健康对照组	6	6.19 ± 0.12	—	—
中毒组	6	9.48 ± 0.05 ^a	11.56 ± 0.13 ^a	12.26 ± 0.14 ^a
常规治疗组	6	8.84 ± 0.10 ^{ab}	8.26 ± 0.13 ^{ab}	6.19 ± 0.07 ^b
HBO 治疗组	6	7.74 ± 0.14 ^{abc}	7.40 ± 0.13 ^{abc}	6.10 ± 0.08 ^b

注:与健康对照组比较,^a $P < 0.05$;与中毒组同时间点比较,^b $P < 0.05$;与常规治疗组同时间点比较,^c $P < 0.05$;—表示未测量

五、相关性分析

所得数据经相关性分析,结果显示脑组织 HIF-1 α mRNA 相对水平与血清 MDA 含量具有显著的正相关性 ($r = 0.909, P = 0.000$)。

讨 论

HIF-1 α 是一种转录激活因子,在缺氧环境下,可调节许多细胞适应缺氧环境所必需的基因表达,介导与缺氧有关的各种病理生理反应。HIF-1 α 在脑缺血早期表达上调促进细胞凋亡,而晚期表达上调则促进细胞存活^[11-13]。因此,HIF-1 α 可以作为脑组织缺血缺血的标志物。

本研究发现,与健康对照组比较,AOPP 脑损伤后大鼠 HIF-1 α mRNA 及蛋白表达均明显增高,并呈现一定的规律;损伤后 1 h 即出现表达增加,3 h 达高峰,随着有机磷毒性的减弱和缺氧改善、复氧开始,通过泛素-蛋白酶体降解,损伤后 7 h 发现其已经开始下降,但仍高于健康对照组。因损伤区皮质和海马都是对缺血缺氧较敏感的组织,HIF-1 α 表达的增高,表明急性有机磷中毒性脑损伤的发生与缺血缺氧有关;病理学观察可见大鼠脑组织疏松,细胞排列稍有紊乱,神经细胞肿胀,微血管外间隙增大;血清 MDA 含量随时间逐渐增多,表明机体发生了氧化应激反应,导致抗氧化酶大量被消耗,超过机体的清除能力,造成组织损害,且神经细胞更易受损^[16-17]。因此,对急性有机磷中毒性脑损伤进行早期有效干预显得尤为重要。

HBO 能否通过对 HIF-1 α 表达的干预影响脑神经的保护及修复作用,目前尚少有研究。本研究结果显示,在给予 HBO 干预治疗后,大鼠脑组织水肿减轻,HIF-1 α 的表达在 1 h 就被抑制,明显低于中毒组和常规治疗组 ($P < 0.05$),造模后 3 h 和 7 h 时间点仍继续下降(表 1 和表 2),且血清中 MDA 含量随时间变化也呈逐渐降低的趋势(表 3),这与相关的文献报道亦相符^[15],提示 HIF-1 α 参与了急性有机磷中毒性脑损伤的病理生理过程,HBO 能使缺氧诱导的 HIF-1 α 表达明显下调,通过增加缺血缺氧组织的氧含量,降低血清

MDA 含量,减轻对神经细胞的损伤,起到脑保护作用。脑组织 HIF-1 α mRNA 相对表达量和血清 MDA 含量呈明显正相关,表明在中毒性脑损伤的发生、发展及治疗过程中,两者的变化趋势是一致的。

综上所述,HIF-1 α 参与了急性有机磷中毒性脑损伤的病理生理过程,HBO 的早期应用能使缺氧诱导的 HIF-1 α 表达明显下调,改善脑组织缺血缺氧,发挥抗氧化作用,清除氧自由基,从而发挥脑保护作用。

参 考 文 献

- [1] 沈洪,刘中民. 急诊与灾难医学[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:148-149.
- [2] Zhu H, O'Brien JJ, O'Callaghan JP, et al. Nerve agent exposure elicits site-specific changes in protein phosphorylation in mouse brain[J]. Brain Res, 2010, 1342(1):11-23.
- [3] Lou M, Zhang H, Wang J, et al. Hyperbaric oxygen treatment attenuated the decrease in regional glucose metabolism of rats subjected to focal cerebral ischemia: a high resolution positron emission tomography study[J]. Neuroscience, 2007, 146(2):555-561.
- [4] Lim SW, Wang CC, Wang YH, et al. Microglial activation induced by traumatic brain injury is suppressed by postinjury treatment with hyperbaric oxygen therapy[J]. J Surg Res, 2013, 184(2):1076-1084.
- [5] 曹义战,李志立,仲月霞,等. 高压氧治疗急性一氧化碳中毒迟发性脑病的疗效观察[J]. 中华急诊医学杂志,2009,17(4):412-415.
- [6] 周建光,季玉峰,刘长云,等. 高压氧对脑缺血再灌注海马神经元 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响[J]. 中国临床康复,2013,7(16):2278-2279.
- [7] 崔文玉,张雁芳,潘志远,等. 宾赛克嗪拮抗 M 和 N 胆碱受体的特征及其抗胆碱酯酶抑制剂的毒性效应[J]. 中国药理学通报,2012,27(7):915-921.
- [8] Baille V, Clarke PG, Brochier G, et al. Soman-induced convulsions: the neuropathology revisited[J]. Toxicology, 2005, 215(1-2):1-24.
- [9] 谢智慧,陈宗平,曹瑞,等. 高压氧干预对大鼠肾缺血再灌注损伤肾组织低氧诱导因子-1 α mRNA 表达的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志,2010,32(3):182-185.
- [10] Yeh SH, Ou LC, Gean PW, et al. Selective inhibition of early—but not late—expressed HIF-1 α is neuroprotective in rats after focal ischemic brain damage[J]. Brain Pathol, 2011, 21(3):249-262.
- [11] Li L, Qu Y, Li J, et al. Relationship between HIF-1 α expression and neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxia-ischemia brain injury[J]. Brain Res, 2007, 1180(1):133-139.
- [12] 闫焕利,阴怀清,杜洪,等. HIF-1 α 及其抑制剂对新生大鼠缺血缺氧性脑损伤时神经细胞凋亡的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2012,10(8):977-980.
- [13] Román GC, Erkinjuntti T, Wallin A, et al. Subcortical ischaemic vascular dementia[J]. Lancet Neurol, 2002, 1(7):426-436.
- [14] 马萍,焦铭,尤会会,等. 农药毒死蜱对小鼠脑细胞氧化损伤的研究[J]. 环境科学学报,2013,33(3):867-871.
- [15] 王光胜,张克忠,王元伟,等. 高压氧对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其对低氧诱导因子-1 的影响[J]. 中风与神经疾病杂志,2010,27(4):360-362.

(修回日期:2015-03-25)

(本文编辑:汪 玲)