

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

赵红 卢晓梅 陈学新 张海鹏

【摘 要】 目的 探讨高压氧(HBO)对缺血再灌注小鼠脑组织中细胞因子和血脑屏障的影响。**方法** 复制清醒小鼠脑缺血再灌注模型,并于再灌注期间行 0.25 MPa (ATA) HBO 治疗 5 次,在处死动物前 1 h 经尾静脉注射 2% 伊文思蓝(Evans),采用 ABC-ELISA 法检测脑组织中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8 的含量及分光光度计法检测脑组织中 Evans 蓝的含量。**结果** 脑缺血再灌注组脑组织中细胞因子及 Evans 蓝的含量较假手术组显著升高($P < 0.05$)。高压氧组与假手术组相比细胞因子及 Evans 蓝的含量变化不显著($P > 0.05$)。HBO + 缺血再灌注组脑组织中细胞因子及 Evans 蓝的含量较缺血再灌注组显著降低(分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** HBO 可明显减少脑缺血再灌注损伤中脑部细胞因子的含量,降低血脑屏障的通透性,而对正常脑组织的作用很小。

【关键词】 高压氧; 小鼠; 缺血再灌注; 细胞因子; 血脑屏障

The effect of hyperbaric oxygen (HBO) on cytokines in the brain tissues and blood-brain barrier after cerebral ischemia-reperfusion in mice ZHAO Hong*, LU Xiaomei, CHEN Xuexin, ZHANG Haipeng. * Department of Pathophysiology, China Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of hyperbaric oxygen (HBO) on cytokines in the brain tissues and blood-brain barrier after cerebral ischemia-reperfusion in mice. **Methods** Using conscious mice cerebral ischemia-reperfusion models, 0.25MPa (ATA) HBO were applied 5 times during the reperfusion period, and an injection of 2% Evans blue into tail veins was conducted an hour before the animals were sacrificed. The levels of IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 and content of Evans blue in the brain tissue were examined by using ABC-ELISA method and spectrophotometry. **Results** The levels of the cytokines mentioned above and content of Evans blue were successively increased ($P > 0.05$) in the ischemia-reperfusion group as compared with those in the sham surgery group. The levels of cytokines and content of Evans blue in brain in the HBO group are similar to those in the sham surgery group ($P > 0.05$). The levels of cytokines and content of Evans Blue in the HBO + ischemia-reperfusion group were successively decreased as compared with those in the ischemia-reperfusion group ($P > 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** HBO (0.25MPa 5 times) has significant effect of reducing the levels of cytokines and the permeability of blood-brain barrier, but has little effect on normal brain tissues.

【Key words】 Hyperbaric oxygenation; Mice; Brain ischemia reperfusion; Cytokines; Blood-brain barrier

高压氧作为治疗脑部疾病的一种有效的非创伤性方法,被临床上广泛地应用^[1]。但高压氧在缺血再灌注损伤中对血脑屏障的作用却报道甚少。脑缺血再灌注早期伴随着细胞因子的表达,特别是 IL-1 β 、TNF- α 、IL-8、IL-6 等,这些细胞因子促使缺血性损伤向炎症性损伤转变,使血脑屏障的通透性发生改变^[2]。本实验通过检测经 HBO 治疗 5 次缺血再灌注小鼠脑部细胞因子及 Evans 蓝的含量,进一步探讨高压氧在脑缺血再灌注损伤中对炎症细胞因子及血脑屏障的影响。

材料与方法

一、主要试剂及仪器

小鼠 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、ABC-ELISA 检测盒(Sigma 公司);Wellscan MK2 型酶标仪(芬兰 Lab-system 公司);Wellwash2 型洗板机(芬兰 Lab-system 公司);三 K30 离心机(Sigma 公司);激光多普勒血流检测仪(瑞典 PERIMED);伊文思蓝(进口分装);甲酰胺(Sigma 公司);722 光栅分光光度计(上海第三仪器厂生产);高压氧舱(浙江宁波设备厂生产)。

二、实验方法

1. 实验动物及分组:健康昆明种小鼠,雌雄各半,体重为(30 $\pm$ 0.5)g(由中国医科大学动物部提供)。

作者单位:110001 中国医科大学病理生理教研室(赵红、卢晓梅、张海鹏);中国医科大学附属第一医院高压氧科(陈学新)

动物随机分为假手术组(30只)、HBO组(32只)、HBO+脑缺血再灌注组(40只)、脑缺血再灌注组(46只)。

2. 脑缺血再灌注动物模型的复制:采用清醒小鼠颈部手术分离双侧颈总动脉,用橡皮泥固定拉紧丝线阻断双侧颈总动脉 30 min,松线后无菌缝合颈部皮肤^[3]。假手术组与 HBO 组只作颈部手术,不阻断颈总动脉血流。

3. 实验鼠的高压氧处理:HBO 组与 HBO+脑缺血再灌注组于术后 2h、9h、21h、45h、69h 进入 HBO 舱内,待动物进舱后,先用纯氧洗舱 10 min,使舱内 O₂ 浓度 > 90%,加压速率为 0.0125 MPa/min,加压至 0.25 MPa,在高压氧状态下停留 60 min,其间用纯氧通气 10 min。停留毕,以 20 min 匀速减至常压。假手术组与脑缺血再灌注组亦置于舱内,模拟除压力和氧浓度外的类同实验组的其它处理过程和环境条件,各组动物出舱后 72 h 处死。

4. 缺血时脑血流检测:打开颅腔,用激光多普勒血流仪动态监测正常脑组织以及缺血 10 min、20 min、30 min 的脑皮质血流情况。

5. 脑组织伊文思蓝定量测定:参考 Udaka 等的方法^[4]用甲酰胺测定皮肤伊文思蓝含量并加以改进。在处死小鼠前 1 h 经尾静脉注射 2% Evans 蓝,在检测前 20 分钟进行心脏生理盐水灌注,直至心房流出清亮的液体为准。术后 72 h 处死小鼠,摘取脑组织用电子天平精确称量其湿重后,投入中号试管,分别加入 3 ml 甲酰胺,加盖后于 45℃ 的水浴箱孵育 48 h,轻轻摇匀,离心 15 min(3 000 r/min),取上清液在 722 型光栅分光光度计比色($\lambda = 632 \text{ nm}$)。

6. 标本采集与测定:术后 72 h 处死小鼠于冰盘上

快速剥离脑部组织,以冰冷的 PBS 冲洗,滤纸吸干,立即于电子天平称重,配成 10% 脑组织匀浆,匀浆液于 4℃ 以 4 000 r/min 转速离心 15 min,取上清液,采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法在波长 492 nm 处理检测 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8 的含量。

三、统计学方法

用 SPSS 统计学软件进行统计学分析,所有资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组均数间的比较用 *t* 检验。

结 果

一、HBO 对缺血再灌注小鼠脑组织中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8 含量的影响(见表 1)

从表 1 可见 HBO+脑缺血再灌注组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8 明显低于脑缺血再灌注组($P < 0.05$)。HBO 组与假手术组相比细胞因子含量差异不显著($P > 0.05$)。脑缺血再灌注组与假手术组相比细胞因子含量显著升高($P < 0.05$)。

二、HBO 对缺血再灌注小鼠脑组织 Evans 蓝含量的影响(见表 2)

从表 2 可见脑缺血再灌注组脑部 Evans 蓝含量明显高于假手术组($P < 0.01$)。HBO+脑缺血再灌注组比脑缺血再灌注组脑 Evans 蓝含量明显下降($P < 0.05$)。HBO 组与假手术组相比脑组织 Evans 蓝含量无明显差异($P > 0.05$)。

三、激光多普勒动态监测脑皮质血流(见表 3)

从表 3 可见脑缺血 10 min 脑血流较正常脑流下降($P < 0.05$)。脑缺血 20 min 脑皮质血流显著低于正常脑部血流($P < 0.05$)。当缺血 30 min 时脑部血流降到正常脑血流的 15.6%,达到脑部缺血状态。这表明,动物缺血模型复制是成功的。

表 1 HBO 对小鼠脑组织 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8 含量的影响(PG/ml, $\bar{x} \pm s$)

组 别	IL-1 β	TNF- α	IL-6	IL-8
假手术组	48.86 $\pm$ 3.23	84.01 $\pm$ 5.54	50.40 $\pm$ 5.56	254.71 $\pm$ 26.26
HBO 组	50.37 $\pm$ 4.91 ^{**}	85.53 $\pm$ 4.14 [*]	49.00 $\pm$ 5.26 ^{**}	264.45 $\pm$ 27.39 ^{**}
HBO+脑缺血再灌注组	34.58 $\pm$ 3.30 ^Δ	59.20 $\pm$ 3.27 ^Δ	32.97 $\pm$ 2.80 ^Δ	209.63 $\pm$ 28.04 ^Δ
脑缺血再灌注组	55.13 $\pm$ 4.04 [*]	90.36 $\pm$ 2.75 [*]	90.36 $\pm$ 2.75 [*]	333.86 $\pm$ 18.99 [*]

注:与假手术组比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P > 0.05$;与脑缺血再灌注组比,^Δ $P < 0.05$

表 2 高压氧对缺血再灌注小鼠脑组织 Evans 蓝含量的影响($\mu\text{g}/100\text{mg}$ 组织, $\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	Evans 含量
假手术组	10	10.15 $\pm$ 3.76
脑缺血再灌注组	12	38.21 $\pm$ 9.07 [*]
HBO 组	11	10.56 $\pm$ 3.10 ^Δ
HBO+脑缺血再灌注组	13	34.13 $\pm$ 7.02 ^{**}

注:与假手术组比,^{*} $P < 0.05$,^Δ $P > 0.05$;与脑缺血再灌注组比,^{**} $P < 0.01$

表 3 小鼠脑缺血不同时间皮质血流值($\mu\text{pu}\%$, $\bar{x} \pm s$)

组 别	N	皮质血流值
正常脑血流	8	0.94 $\pm$ 0.31
缺血 10 min	9	0.75 $\pm$ 0.05 [*]
缺血 20 min	9	0.54 $\pm$ 0.05 [*]
缺血 30 min	9	0.21 $\pm$ 0.02 [*]

注:^{*} 与正常脑血流比, $P < 0.05$

讨 论

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)破坏是脑缺血再灌注性脑损伤的重要病理生理基础。脑缺血再灌注早期伴有大量细胞因子的表达,通过炎症反应导致脑毛细血管内皮及基底膜损害,使血脑屏障的通透性增加^[5]。研究表明,脑部细胞因子水平增高主要在脑内产生并留存于此,而血液来源甚微^[6]。在缺血再灌注损伤中造成血脑屏障破坏的主要细胞因子是 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8 等^[7]。实验证明,短暂性脑缺血可诱导 IL-1 β 的表达,IL-1 β 通过促进白细胞与内皮细胞粘附而激发炎症反应,造成 BBB 的破坏^[8]。TNF- α 早期通过对毛细血管的直接毒性作用,导致微小动脉痉挛,增加毛细血管的通透性,开放 BBB。TNF- α 还可与 IL-1 β 协同作用加剧 BBB 的破坏范围^[9]。IL-8 在再灌注后 8 h 增加,IL-8 具有多形核白细胞的化学趋化和激活作用,增加 CD_{11b} 和 CD₁₈ 与巨噬细胞的结合,使 BBB 的通透性增加。IL-6 作为单核巨噬细胞的化学趋化因子,在脑缺血再灌注 48 h 开始增加^[10]。本实验观察到脑缺血再灌注组细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8 含量显著高于假手术组($P < 0.05$),并与经尾静脉注射伊文思蓝在脑部通透量增多相一致。表明脑缺血再灌注时细胞因子增加是造成血脑屏障通透性改变的重要因素。

高压氧疗法作为临床上治疗脑血管疾病的一种手段正在得以应用,因其能增加血氧含量,提高动脉血的氧分压,增加氧的扩散能力,从而改善脑缺氧状态^[1]。本实验检测到 HBO + 脑缺血再灌注组细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8 含量较脑缺血再灌注组显著降低,并与经尾静脉注射 Evans 蓝脑部 Evans 蓝含量减少相一致,表明高压氧具有降低脑缺血再灌注小鼠脑部细胞因子的含量,从而减少血脑屏障的通透性的作用,与国外有关报道相一致^[11]。本实验为临床上扩大高压氧在脑血管疾病治疗中的应用提供了实验依

据。

参 考 文 献

- 1 Shiokawa O, Fujishima M, Yanai T, et al. Hyperbaric oxygen therapy in experimentally induce acute cerebral ischemia. Undersea Biomed Res, 1986,13:337-344.
- 2 Jean WC, Spellman SR, Nussbaum ES, et al. Reperfusion in jury after focal cerebral ischemia; the role of inflammation and the therapeutic horizon. Neurosurgery, 1998,43:1382-1397.
- 3 岑德意,周兰兰,明亮,等. 清醒小鼠反复脑缺血灌注法致学习记忆障碍模型的建立. 中国药理学通报, 2000,16:220-223.
- 4 Uda K, Takeuchi Y Z, Movat H. Simple Method for quantitation of enhanced vascular permeability. Pro Soc Exp Biol Med, 1970,133:1384.
- 5 Fujimura M, Gache Y, Morita- Fujimura Y, et al. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. Brain Res, 1999,842:92-100.
- 6 Ott L, McClan CJ, Gillespie M, et al. Cytokines and metabolic dysfunction after severe head injury. J Neurotrauma, 1994,11:447-472.
- 7 Yang GY, Mao Y, Zhou LF, et al. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ECAM-1) is reduced in permanent focal cerebral ischemic mouse brain using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist. Brain Res Mol Brain Res, 1999,65:143-150.
- 8 Yang GY, Gong C, Qin Z, et al. Tumor necrosis factor alpha expression produces increased blood-brain barrier permeability following temporary focal cerebral ischemia in mice. Brain Res Mol Brain Res, 1999,69:135-143.
- 9 Arvin B, Neville LF, Barone FC, et al. The role of inflammation and cytokine in brain injury. Neurosci Biobehav Rev, 1996,20:445-452.
- 10 Tomita M, Fukuuchi Y. Leukocytes, macrophages and secondary brain damage following cerebral ischemia. Acta Neurochir Suppl (Wien), 1996,66:32-39.
- 11 Richard B, Mink MD, Andrew J, et al. Hyperbaric oxygen after global cerebral ischemia in rabbits reduces brain vascular permeability and blood flow. Stroke, 1995,26:2307-2312.

(收稿日期:2002-05-17)

(本文编辑:郭铁成)

· 征 订 ·

2003 年《中国康复理论与实践》征订启事

《中国康复理论与实践》杂志是由中国康复研究中心和中国中西医结合学会主办的国家级核心学术期刊,为“国家科技部中国科技论文统计源期刊”和《中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范》执行优秀期刊,是万方数据资源系统和《中国学术期刊光盘版全文数据库》来源期刊,国家医药管理局批准的医药专业媒体。创刊于 1995 年 12 月,国际大 16 开版式,64 页,ISSN 1006-9771, CN 11-3759/R。每期定价:8 元,全年定价:96 元。

在办刊方针上,以康复医学为龙头,以宣传全面康复为宗旨,不断增加社区康复内容,充分体现理论与实践相结合、普及与提高并重的特点。2003 年我们拟推出以神经系统康复为重点的基础研究和社区康复方面的专题。

在稿件刊发方面,我们建立了快速通道,优先考虑国家级科研课题方面的论文;同时,还会兼顾临床和基层稿件等。