

· 基础研究 ·

高压氧对脑缺血再灌注小鼠抗氧化酶类及血脑屏障通透性的影响

赵红 卢晓梅 陈学新 张海鹏

【摘要】目的 探讨高压氧(HBO)在脑缺血再灌注损伤中对自由基的产生及血脑屏障(BBB)通透性的影响。**方法** 昆明种小鼠 320 只,随机分为假手术组、HBO 组、脑缺血再灌注组和 HBO + 脑缺血再灌注组,每组各 80 只。复制清醒脑缺血再灌注模型,并于术后经 0.25 MPa HBO 治疗 5 次,采用比色法检测各组小鼠海马组织 SOD、CAT、GSH-PX 活性和 MDA 及 EB 的含量。取小鼠海马组织常规制片,透射电镜下观察并进行比较。**结果** 脑缺血再灌注组与假手术组比较,SOD、CAT 及 GSH-PX 活性明显下降($P < 0.01$),MDA 含量明显升高($P < 0.01$),与脑部 EB 含量增高相一致。HBO + 脑缺血再灌注组与脑缺血再灌注组相比,SOD、CAT、GSH-PX 活性明显升高($P < 0.05$),MDA 含量明显下降($P < 0.01$),并与脑部 EB 含量减少相一致。HBO 组与假手术组相比,GSH-PX 酶活性明显增高($P < 0.05$)。电镜下示脑缺血再灌注组神经元坏死明显,星形胶质细胞胞体水肿,微管、微丝明显减少;HBO + 脑缺血再灌注组神经元坏死不明显。**结论** 高压氧可增强脑缺血再灌注小鼠脑组织抗氧化酶类活性,恢复星形胶质细胞功能,降低 BBB 通透性。

【关键词】 抗氧化酶; 缺血再灌注; 星形胶质细胞; 高压氧; 血脑屏障

Effects of hyperbaric oxygenation on the activity of antioxidation enzymes and the permeability of blood-brain barrier in mice with cerebral ischemia-reperfusion ZHAO Hong*, LU Xiao-mei, CHEN Xue-xin, ZHANG Hai-peng. * Department of Pathophysiology, China Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of hyperbaric oxygenation (HBO) on generation of free radicals and the permeability of blood-brain barrier (BBB) during cerebral ischemia-reperfusion (CIR). **Methods** Three hundred and twenty Kunming mice were randomly divided into four groups; a sham operation group, a HBO group, a CIR group, and a HBO + CIR group, with 80 mice in each group. Conscious mice were used to establish the CIR model, and 0.25 MPa (ATA) HBO were applied 5 times after operations. The activities of SOD, CAT, GSH-PX and the concentration of MDA, EB in the cerebral hippocampal tissues in each group were measured with colorimetry. The cerebral hippocampal tissues were harvested and processed, then observed and compared with transmission electron microscopic observation. **Results** Compared with the sham operation group, the activities of antioxidation enzymes (GSH-PX, SOD, CAT) in CIR group decreased significantly ($P < 0.01$), while the concentration of MDA and EB increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the CIR group, the activities of antioxidation enzymes (GSH-PX, SOD, CAT) in the HBO + CIR group raised obviously, ($P < 0.01$), while the concentration of MDA and EB lowered significantly ($P < 0.01$). Compared with the sham operation group, the activity of GSH-PX in HBO group increased significantly ($P < 0.05$). Meanwhile, in the CIR group, necrosis of neurons and edema of astrocyte were obvious, and the microtubule and microfilament of astrocyte decreased significantly. However, necrosis of neurons was not obvious in HBO + CIR group. **Conclusion** HBO could increase the activity of antioxidation enzymes, restore the function of astrocyte and decrease the permeability of BBB.

【Key words】 Antioxidation enzymes; Cerebral ischemia-reperfusion; Astrocyte; Hyperbaric oxygenation; Blood brain barrier

脑缺血再灌注损伤中伴随着大量白细胞浸润,产生大量的自由基,如 O_2^- 、 H_2O_2 、 OH^- 等,导致脂质、蛋白质及核酸过氧化反应,造成血脑屏障 (brain-blood barrier, BBB) 通透性增加^[1]。高压氧 (hyperbaric ox-

gen, HBO) 用于治疗脑缺血再灌注疾病,文献已有报道^[2],但对 HBO 治疗缺血性脑血管疾病的作用机理尚存在不少争议,本实验从抗氧化酶类及亚细胞水平做了进一步研究,以期为临床提供实验依据。

材料与方法

一、材料

作者单位:110001 北京,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)

1. 主要试剂:南京产谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)的酶活力及丙二醛(MDA)含量检测盒,进口分装伊文思蓝。

2. 主要仪器:美国 Sigma 公司产 3K-30 离心机、上海产 722 光栅分光光度计、美国产 H-600 透射电镜、浙江产高压氧舱。

二、方法

1. 实验动物及分组:由中国医科大学提供健康昆明种小鼠 320 只,雌、雄各半,体重(30.0 ± 0.5)g,随机分为假手术组、HBO 组、脑缺血再灌注组和 HBO + 脑缺血再灌注组,每组各 80 只。

2. 复制脑缺血再灌注动物模型:采用清醒小鼠行颈部手术,分离双侧颈总动脉,用橡皮泥固定拉紧尼龙丝线阻断双侧颈总动脉血流 30 min,松线后无菌缝合颈部皮肤。假手术组与 HBO 组仅作颈部手术,不阻断颈总动脉血流。

3. HBO 处理:HBO 组与 HBO + 脑缺血再灌注组于术后 2, 9, 21, 45 及 69 h 进入 HBO 舱内,待动物进舱后,先用纯氧洗舱 10 min,使舱内 O_2 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,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,除气压和氧浓度外,其它处理过程和环境条件均与前述两组相同。

4. 脑组织伊文思蓝(Evans blue, EB)含量的测定:在处死动物前 1 h 经尾静脉注射 2% EB,检测前 20 min 进行在体心脏灌注,直至心房流出清亮的液体为准。术后 4, 11, 23, 48 及 72 h 每组各处死小鼠 12 只,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°C 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($\lambda = 632$ nm)。

5. 抗氧化酶类 GSH-PX、SOD、CAT 酶活性及 MDA 含量的检测:①制备脑组织匀浆及上清液——术后 72 h 处死各组剩余小鼠,于冰盘上取海马区的脑组织置匀浆管中,加入预冷的生理盐水若干毫升,用匀浆器制成 10% 的匀浆,离心 5 min ($1\,000$ r/min),取上清液。②GSH-PX 的检测——取上清液 0.1 ml,经 37°C 水溶进行酶促氧化,离心 10 min ($3\,500 \sim 4\,000$ r/min),取上清液 2 ml 做显色反应,加入显色剂混匀 15 min,在波长 $\lambda = 412$ nm 处测各管 OD 值。③CAT 的检测——取上清液 100 μl ,加入 CAT 检测试剂混匀, 37°C 水溶 1 min,在 $\lambda = 405$ nm 处调零测各管吸光度。④SOD 的检测——取上清液 50 μl ,加入 SOD

检测剂,用旋涡混匀器充分混匀,置 37°C 恒温水浴 40 min,在波长 $\lambda = 550$ nm 处比色。⑤MDA 的检测——取上清液 0.1 ml,加入 MDA 检测剂,旋涡混匀器混匀, 95°C 水浴 80 min,离心 10 min ($3\,500 \sim 4\,000$ r/min),在波长 $\lambda = 532$ nm 处比色各管吸光值。

6. 电镜标本的制备:术后 72 h 取脑缺血再灌注组和 HBO + 脑缺血再灌注组小鼠海马 CA_1 区脑组织标本,放入 60% 戊二醛和 0.1 MPBS 中固定 2 ~ 3 h (4°C),于 0.1 mol/L PBS 中保存 3 d (4°C , pH = 7.4), OsO_4 固定 2 h,丙酮脱水,包埋剂包埋,制备超薄切片,醋酸钠枸橼酸盐双染,透射电镜下观察神经元、胶质细胞及毛细血管。

三、统计学分析

用 SPSS 统计学软件进行统计学处理,所有数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组均数比较采用 t 检验。

结 果

一、各组小鼠术后不同时间脑组织中 EB 含量的比较

由图 1 可见,脑缺血再灌注后 4h 脑组织 EB 渗出最多,术后 11, 23, 48 及 72 h 各时间点 EB 渗出逐渐减少 ($P < 0.01$)。HBO + 脑缺血再灌注组于 11, 23, 48 及 72 h EB 渗出明显低于相应时间点的脑缺血再灌注组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。HBO 组于术后 4, 11, 23, 48 及 72 h EB 渗出与相应时间点假手术组相比,差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

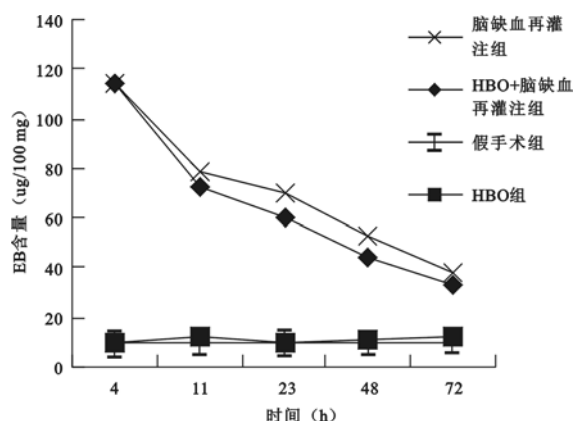


图 1 各组小鼠术后不同时间脑组织中 EB 含量的比较

二、各组小鼠脑组织抗氧化酶类及 MDA 的比较

脑缺血再灌注组 SOD、CAT、GSH-PX 活性较假手术组明显下降,MDA 含量明显升高 ($P < 0.01$); HBO + 脑缺血再灌注组与脑缺血再灌注组相比, SOD、CAT、GSH-PX 活性明显增高,MDA 含量明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); HBO 组与假手术组相比, GSH-PX 活性明显增加 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 各组小鼠脑组织抗氧化酶类及 MDA 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	SOD (Nu/mg)	CAT (v/mg)	GSH-PX (v/mg)	MDA (nmol/mg)
假手术组	10.14 ± 1.72	25.33 ± 3.02	48.69 ± 17.9	6.96 ± 1.03
脑缺血再灌注组	3.29 ± 0.80 *	18.02 ± 2.09 *	15.19 ± 6.66 *	9.05 ± 1.29 *
HBO 组	9.74 ± 1.32	26.28 ± 2.60	55.97 ± 11.5 **	6.31 ± 0.77
HBO + 脑缺血再灌注组	7.03 ± 1.32 [△]	20.95 ± 1.11 ^{△△}	32.62 ± 7.64 [△]	7.42 ± 1.02 [△]

注:与假手术组比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$;与脑缺血再灌注组比较, $\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta P < 0.05$

三、HBO 对脑缺血再灌注小鼠海马 CA₁ 区超微结构的影响

1. 脑缺血再灌注组:神经元坏死明显,胞膜完整,线粒体肿胀、结构模糊、电子密度稍增加,核膜完整,胞核电子密度降低,核染色质凝集为大小不等的团块,核仁清晰;星形胶质细胞胞体水肿,微管、微丝明显减少,胞浆电子密度明显减小,胞核缩小,核染色质浓缩聚集于核周、呈半月形,线粒体嵴断裂(图 2)。

2. HBO + 脑缺血再灌注组:与脑缺血再灌注组相比,神经元坏死不明显,胶质细胞内胞浆淡染,胞核明显,线粒体结构清晰,嵴明显(图 3)。

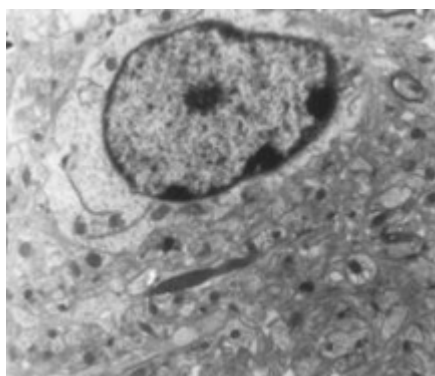


图 2 脑缺血再灌注小鼠海马 CA₁ 区超微结构(醋酸钠枸橼酸盐双染 ×6 000)

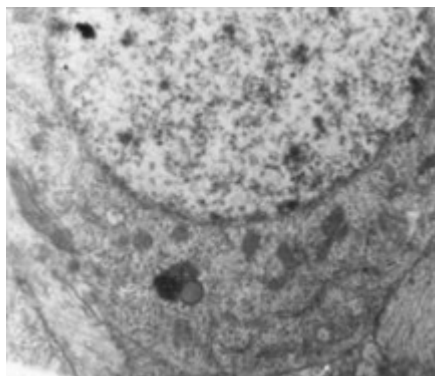


图 3 HBO 治疗后脑缺血再灌注小鼠海马 CA₁ 区超微结构(醋酸钠枸橼酸盐双染 ×8 000)

讨 论

BBB 是脑部屏障的重要组成部分,是由内皮细胞、内皮细胞间的紧密连接、基膜及星形胶质细胞组成的

位于脑组织和微血管之间的物质调节界面,对进出脑组织的物质有选择性通过作用。通常以脑组织 EB 的含量作为其通透性的检测指标。

BBB 被破坏是缺血再灌注性脑损伤的重要病理生理基础。目前认为,自由基是缺血再灌注损伤中极为重要的发病因素和环节。脑缺血再灌注过程中可产生大量自由基,如 O_2^- 、 NO_2^- 、 H_2O_2 、 OH^- 等,同时,白细胞被激活也是产生自由基的一个重要来源,过量的自由基可导致脂质、蛋白质及核酸过氧化,破坏 BBB 的完整性^[3]。机体内也存在对抗自由基和过氧化物的防御系统,主要通过 SOD、GSH-PX、CAT 催化自由基及 H_2O_2 的降解,保护 BBB 的完整性。SOD 属于金属酶, Fishman 等^[4]发现 CuZn SOD 纯合性基因敲除鼠脑缺血 1 h 即出现明显的 BBB 的损害,2 h 死亡率达 100%。SOD 通过催化歧化反应清除 O_2^- ,以消除 O_2^- 对细胞的损害^[5]。GSH-PX 是不含过渡金属元素的抗氧化酶,可使 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 ,特异地催化还原型谷胱甘肽对过氧化氢的还原反应,起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。CAT 亦是金属酶,主要功能是催化 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 。MDA 作为自由基的降解产物,也是自由基水平测定的一个指标。本实验观察到,脑缺血再灌注组抗氧化酶类 SOD、CAT、GSH-PX 活性较假手术组明显下降,MDA 的含量明显升高 ($P < 0.01$),并与脑部 EB 含量渗出增多相一致。表明在脑缺血再灌注损伤过程中,抗氧化酶类的减少是导致自由基产生增多,造成 BBB 通透性增高的一个重要的因素。

HBO 作为临床上治疗脑部疾病的一种非创伤性手法正在得以应用^[6]。HBO 能有效地增强氧的弥散能力,扩大氧的有效弥散范围,提高氧分压。Chan 等^[7]在缺血再灌注皮瓣上发现,高压氧能明显增加自由基清除剂 SOD 的活性。本实验观察到 HBO + 脑缺血再灌注组与脑缺血再灌注组相比,脑组织抗氧化酶类 SOD、CAT、GSH-PX 酶活性均明显升高,MDA 的含量明显下降 ($P < 0.05$),并与脑部 EB 渗出减少相一致。HBO 组与假手术组相比,GSH-PX 的酶活性明显升高。结果提示高压氧能降低正常脑组织及脑缺血再灌注损伤过程中自由基的含量,其机理可能为 HBO 能提高血氧含量和氧分压,促进氧的弥散,使抗氧化酶类分解自由基的过程加强,从而减轻自由基对机体的损害。实

验同时观察了 HBO 作用后脑组织海马 CA₁ 区的超微结构,发现 HBO 可减轻脑缺血再灌注损伤后神经元坏死与胶质细胞水肿,还能促进线粒体功能的恢复。研究表明,高压氧一方面通过提高 GSH-PX、SOD、CAT 等抗氧化酶类的活性清除氧自由基,防止细胞进一步脂质过氧化造成的损害;另一方面逐渐增加局部供氧,恢复细胞正常代谢过程,并使线粒体大量增生,保护线粒体的功能,增加细胞能量供给,维持脑组织的正常生理功能及 BBB 的完整性,为临床上扩大高压氧对脑血管疾病的治疗提供了实验依据。

参 考 文 献

- 1 Small DL, Morley P, Buchan AM, et al. Biology of ischemic cerebral cell death. *Prog Cardiovasc Dis*, 1999, 42: 185-207.
- 2 Heo JH, Lucero J, Abumiya J, et al. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood*

Flow Metab, 1999, 19: 624-623.

- 3 Franko J, Pomfy M, Novakova B, et al. Stobadine protects against ischemia-reperfusion induced morphological alterations of cerebral microcirculation in dogs. *Life Sci*, 1999, 65: 1963-1967.
- 4 Fishman RA, Chan PH. Metabolic basis of brain edema. *Adv Neurol*, 1980, 28: 207-215.
- 5 Jean WC, Spellman SR, Nussbaum ES, et al. Reperfusion injury after focal cerebral ischemia: the role of inflammation and the therapeutic horizon. *Neurosurgery*, 1998, 43: 1382-1397.
- 6 刘景昌. 高压氧对缺血、缺氧性疾病的治疗效用及机理. 见: 刘景昌, 主编. 高压氧医学的理论与新技术. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 142-147.
- 7 Chan PH, Yang GY, Chen SF, et al. Cold induced brain edema and infarction are reduced in transgenic mice overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Ann Neurol*, 1991, 29: 482-486.

(收稿日期:2003-06-10)

(本文编辑:吴 倩)

· 短篇论著 ·

两种波长激光治疗犬咬伤的疗效观察

王利君 卞学平 刘永连

近年家庭养犬逐渐增多,犬咬伤时有发生。我们利用氩-氟激光治疗犬咬伤取得了较好的疗效^[1]。为了探索犬咬伤治疗的新方法,观察不同波长激光治疗犬咬伤的效果,我们采用了镱铝砷半导体激光和氩-氟激光局部照射对 66 例犬咬伤患者进行了疗效对比观察。报道如下。

一、资料与方法

经外科确诊犬咬伤患者 66 例,伤后均注射狂犬病疫苗,按就诊顺序随机分为半导体激光组和氩-氟激光组,每组 33 例。半导体激光组男 21 例,女 12 例;年龄 5~78 岁,平均(34.03±20.63)岁;病程 1~36 d,平均(7.64±7.74)d;创面直径 0.5~4.0 cm,平均(1.88±0.86)cm;咬伤部位头面部 9 例,上肢 9 例,下肢 15 例。氩-氟激光组男 23 例,女 10 例;年龄 5~72 岁,平均(32.06±19.69)岁;病程 1~32 d,平均(8.27±8.27)d;创面直径 0.5~3.5 cm,平均(1.73±0.75)cm;咬伤部位头面部 8 例,上肢 9 例,下肢 16 例。两组患者年龄、病程、创面直径、咬伤部位等,经统计学处理差异均无显著性意义($P>0.05$)。

半导体激光组采用上海产 MDC-500 型镱铝砷半导体激光仪,波长 830 nm,输出功率 0~500 mW 连续可调,光斑直径 0.3~3.0 cm,距创面 5 cm 进行照射,选择功率 300 mW,光斑直径 3 cm,功率密度 42.5 mW/cm²,依创面大小分区照射,每日 1 次,每光斑照射 8 min,10 次为 1 个疗程,疗程间隔 5 d,治疗 2 个疗程。氩-氟激光组采用上海产 HN2SQ-2 型氩-氟激光治疗仪,波长 632.8 nm,功率 30 mW,距创面 50 cm,光斑直径 3 cm,功率密度 4.3 mW/cm²,方法同半导体激光组。照射前均常规

清洁伤口,观察创面炎症反应及愈合情况,照射后无菌纱布包扎。

疗效标准:痊愈——全身或局部炎症反应消失,创面愈合或溃疡愈合形成瘢痕;好转——全身或局部反应减轻,创面缩小;无效——全身或局部反应无改变,创面无变化或加重。

统计学分析采用 Ridit 分析。

二、结果

疗程结束后,半导体激光组治愈 26 例,好转 7 例;氩-氟激光组治愈 24 例,好转 9 例,总有效率均为 100%。两组治愈率经 Ridit 分析,差异无显著性意义($\chi^2=0.33, P>0.05$)。

三、讨论

犬咬伤伤口深且细,周围组织常有不同程度挫裂伤,动物口腔内菌种多,菌量大,伤口污染严重,异物也常被带入伤口,容易继发感染^[2]。另外唾液中的各种酶类和酸碱作用也可引起局部组织红肿、坏死,如不及时处理极易形成溃疡。半导体激光及氩-氟激光均能降低血管壁通透性,减轻炎症渗出的速度和程度,且减轻充血、水肿。两种激光还可促进新生血管生成和生长,使成纤维细胞及肉芽组织增生,从而促进创面愈合。观察结果表明,两种激光对犬咬伤均有较好的治疗作用。

参 考 文 献

- 1 刘永连,卞学平,王利君,等. 氩-氟激光局部照射治疗犬咬伤 18 例疗效观察. *激光杂志*, 1990, 4: 215-218.
- 2 吴在德,主编. 外科学. 第 5 版. 北京:人民卫生出版社, 2002. 231-232.

(收稿日期:2003-12-10)

(本文编辑:阮仕衡)