

· 基础研究 ·

不同压力高压氧预处理与大鼠脑缺血灌注损伤缺血半暗带神经元细胞凋亡

蔡宏斌¹ 葛朝明^{1,2} 赵昶昶¹ 武国德¹

摘要

目的:观察不同压力高压氧预处理(HBO-PC)对大鼠脑缺血再灌注后缺血半暗带神经细胞凋亡的影响。

方法:将 48 只 Wistar 大鼠随机分为 3 组:假手术组(n=8);对照组:大脑中动脉闭塞(MCAO)模型组(n=8);实验组:HBO-PC+MCAO 组(n=32)。实验组再按不同的 HBO-PC 压力分为 1.5 ATA (0.15MPa)、2.0ATA (0.20MPa)、2.5ATA (0.25MPa)和 3.0ATA (0.30MPa) 4 个亚组,每组 8 只。按不同治疗压力,每次吸氧 1h、隔天 1 次、共 5 次,10d 完成。最后一次 HBO-PC 24h 后,根据 Zea-Longa 线栓法制作 MCAO 再灌注损伤模型,缺血 2h 再灌注 24h 后用免疫组织化学法和原位末端脱氧核糖转移酶标记(TUNEL)法检测脑缺血半暗带神经细胞凋亡情况。假手术组和对照组不进行 HBO 或常压氧治疗,10d 后处理同实验组。

结果:实验组动物行为改善,脑梗死灶缩小,脑缺血半暗带凋亡细胞数和半胱天冬蛋白酶-3(caspase-3)阳性细胞数不同程度降低,B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)表达不同水平增高,与对照组比较差异均有显著性意义($P<0.05$);而 2.0ATA 和 2.5ATA 压力条件相比较 1.5ATA 和 3.0ATA 上述凋亡指标差异亦有显著性 ($P<0.05$);但 2.0 ATA 和 2.5 ATA 间,1.5ATA 和 3.0ATA 间差异均无显著性意义($P>0.05$)。

结论:通过下调缺血半暗带神经元线粒体途径的凋亡水平,HBO-PC 可以减轻大鼠脑缺血再灌注损伤,组内比较 2.0ATA 和 2.5 ATA 下 HBO-PC 优于 1.5 ATA 和 3.0 ATA。

关键词: 高压氧;预处理;脑缺血再灌注;半胱天冬蛋白酶-3;B 细胞淋巴瘤/白血病-2

中图分类号:R743.3,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2011)-01-0050-05

Influences of different atmosphere absolute hyperbaric oxygen preconditioning on the ischemia penumbra apoptosis in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion injury/CAI Hongbin,GE Zhaoming,ZHAO Chongchong, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(1): 50-54

Abstract

Objective:To study the influences of different atmosphere absolute (ATA) hyperbaric oxygen preconditioning (HBO-PC) on the neuroprotective and apoptosis related protein/gene expressions of caspase-3 and Bcl-2 in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury.

Method: Totally 48 Wistar rats were randomly assigned to the following three groups: sham group (n=8), control group (MCAO group, n = 8),and trial group (HBO-PC plus MCAO group,n=32). The rats in trial group were subdivided into, 1.5ATA (0.15MPa) subgroup, 2.0ATA (0.2 MPa) subgroup, 2.5ATA (0.25MPa) subgroup, and 3.0ATA (0.3MPa) sub group, with 8 rats in each group. HBO-BC was administered by using 100% oxygen at different ATA for 60min at 24h interval for 5 times in 10d. The last HBO-PC was performed at 24h before middle cerebral artery occlusion (MCAO) produced by Zea-Longa filament method with some modifications. The samples of each group underwent immunohistochemistry staining and TUNEL reaction to observe the expressions of cysteine-asparate protease-3 (caspase-3) and B cell lymphoma/leucemia gene (Bcl-2) and apoptosis of neurons in ischemia

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.01.011

1 兰州大学第二医院神经内科高压氧治疗中心,兰州市城关区翠英门 82 号,730000;2 通讯作者
作者简介:蔡宏斌,男,在读研究生,主治医师;收稿日期:2009-11-15

penumbra.

Result: After HBO-PC with 1.5ATA, 2.0ATA, 2.5ATA and 3.0ATA all rat's infarction volume decreased, neurological behavior improved, meanwhile caspase-3 activity decreased, expression of Bcl-2 upregulated, and apoptosis of ischemic penumbra tissue abated. In all trial sub groups, above indexes showed significant difference as compared with that in control group ($P < 0.05$), however, the effects of HBO-PC with 2.0ATA and 2.5ATA were superior to that 1.5ATA and 3.0ATA ($P < 0.05$).

Conclusion: HBO-PC protects brain tissues from ischemia-reperfusion injury by suppressing mitochondrial apoptotic pathways. The effects of HBO-PC with 2.0ATA and 2.5ATA were superior to that with 1.5ATA and 3.0ATA.

Author's address Dept. of Neurology, The Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, 730000

Key word hyperbaric oxygen; preconditioning; ischemia-reperfusion; cysteine-aspartate protease-3; B cell lymphoma/leucemia-2

临床上高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗的压力范围是 1.5—3.0ATA, 目前许多动物实验证实高压氧预处理(hyperbaric oxygen preconditioning, HBO-PC)可明显减轻脑、脊髓和心肌的缺血缺氧性损伤^[1]。我们采用大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠模型, 探讨不同压力 HBO-PC 对缺血-再灌注损伤的影响及其作用机制。现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

健康 Wistar 大鼠 48 只, 体重 250—280g, 雌雄各半, 兰州大学实验动物室提供。随机分为 3 组: 假手术组 (n=8); 对照组: MCAO 组 (n=8); 实验组: HBO-PC+MCAO 组 (n=32); 实验组再按不同的 HBO-PC 压力分为 1.5ATA (0.15MPa)、2.0ATA (0.20MPa)、2.5ATA (0.25MPa) 和 3.0ATA (0.30MPa) 4 个亚组, 每组 8 只。

1.2 高压氧预处理

使用 2 座 SYC 800 高压氧动物试验舱(青岛市平度高压氧舱设备厂产)。实验前给纯氧 3—5min 洗舱, 测得舱内氧浓度 >98.6%、CO₂ 浓度 <0.05% 以上为止。将动物置入舱内, 舱内压力根据分组而定, 采用直排式给氧, 流量 5L/min, 舱内温度控制在 23—25℃, 稳压吸氧 60min(持续纯氧通风), 约 0.01MPa/min 匀速加减压至常压后出舱(过程中持续供氧)。1 次/d, 隔日 1 次, 每天进出舱时间固定, 共 5 次 10d 完成。

1.3 动物模型制备

大鼠最后一次吸氧完成后 24h, 参照 Zea-Longa

线栓法^[2], 建立大鼠左侧 MCAO 模型。假手术对照只是不插入尼龙鱼线, 其余步骤同手术组。缺血期间及再灌注后 2h 保持体温在 (37±0.5)℃。模型成功的标志为大鼠手术麻醉清醒后 Zea-Longa 5 分制评分^[2] > 2 分, 评分 < 2 分者剔除并补充。

1.4 观察脑梗死灶体积

在缺血 2h 再灌注 24h 后麻醉并处死大鼠速冻后取脑行冠状切片(共 5 片厚 2mm), 行 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色, 正常组织染成红色, 梗死组织染成白色。固定切片并照片后用 OSIRIS 图像处理软件计算各脑片脑梗死灶百分比(梗死百分比=梗死面积/总面积), 计算平均值测量脑梗死体积, 水肿对梗死的影响用 Swanson 等方法进行校正。

1.5 缺血半暗带细胞凋亡原位检测(TUNEL), 免疫组织化学法检测半胱天冬蛋白酶-3(caspase-3)和 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)。

1.5.1 TUNEL 检测试剂盒(罗氏生物技术有限公司产)和兔抗鼠 caspase-3 和 Bcl-2 成套免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司产), 多媒体彩色病理分析系统(RY2000 型, 广东瑞医科技有限公司产)。

1.5.2 大鼠缺血-再灌注 24h 后, 4%多聚甲醛液固定后断头取脑置入同种液固定 24h, 分离缺血半暗带, 取约 2mm 厚的皮质缺血半暗带组织(假手术组取顶叶皮质组织), 常规脱水、透明、石蜡包埋、切片(4μm)、贴片置冰箱待测。

1.5.3 TUNEL 法检测凋亡细胞按 TUNEL 检测试剂盒说明书, 神经细胞 caspase-3 和 Bcl-2 免疫组化采用抗生物素-生物素-过氧化物酶复合物(ABC)法检测, 步骤按试剂说明书。多媒体彩色病理分析系统照

相,每组在高倍镜($\times 400$)下随机计数 5 个视野下阳性细胞数量,以其平均值表示。

1.6 统计学分析

实验结果用 SPSS 11.0 统计软件包分析处理。所有数据均以均数 \pm 标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两均数比较采用 q 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 动物行为学改变

各 HBO-PC 亚组动物造模后与 MCAO 组比较,精神状态好,毛色光滑,较为活泼,反应迅速,对水和食物的摄取也有较强的主动性。采用 Zea-Longa 5 分制评定大鼠缺血再灌注后 24h 神经功能缺损情况,MCAO 组症状重于各 HBO-PC 亚组($P < 0.05$),见表 1,各 HBO-PC 亚组间组内比较未见显著性差异($P > 0.05$),见表 2。

2.2 不同组大鼠脑梗死灶体积变化

通过 TTC 染色观察(图 1),假手术组未见明确梗死灶,不同压力 HBO-PC 后缺血再灌注大鼠模型脑梗死灶体积均明显低于 MCAO 组 ($P < 0.05$),见表 1;组内比较,2.0ATA 和 2.5ATA 亚组梗死灶体积的差异显著小于 1.5ATA 和 3.0ATA 亚组 ($P < 0.05$);在 2.0ATA 和 2.5ATA 亚组间,1.5ATA 和 3.0ATA 亚组间差异无显著性意义($P > 0.05$),见表 2。

2.3 各组缺血半暗带组织 TUNEL 凋亡细胞计数与 caspase-3 和 Bcl-2 的表达

2.3.1 TUNEL 法染色神经元凋亡细胞核呈棕色或淡棕色,假手术组脑组织偶见凋亡细胞,MCAO 组缺血半暗带组织中可见大量凋亡细胞,HBO-PC 亚组见不同程度凋亡水平(图 2)。

2.3.2 caspase-3 蛋白主要表达于神经元,其免疫阳性细胞呈棕黄色,为胞质着色,MCAO 组脑缺血半暗带皮质边缘的内侧大量 caspase-3,而假手术组只见少量表达(图 3)。

2.3.3 Bcl-2 蛋白主要表达于缺血中心区与半暗带的交界处,其阳性细胞胞浆呈棕黄色,均匀弥漫染色,MCAO 组见少量 Bcl-2 阳性细胞表达,而假手术组未见表达(图 4)。

2.3.4 脑缺血再灌注 24h 后缺血半暗带皮质,MCAO 组神经细胞凋亡 TUNEL 计数和 caspase-3 阳性细胞表达均显著高于各 HBO-PC 亚组,而 Bcl-2 表达在后者显著高于前者,差异有显著性意义($P < 0.05$),见表 1;组内两两比较发现 TUNEL 凋亡计数和 caspase-3 阳性细胞数在 2.0ATA 和 2.5ATA 亚组均显著低于 1.5ATA 和 3.0ATA 亚组 ($P < 0.05$),而 2.0ATA 和 2.5ATA 亚组间,1.5ATA 和 3.0ATA 亚组间比较,差异无显著性意义($P > 0.05$);Bcl-2 呈相反的表现,见表 2。

表 1 各组缺血-再灌注 24h 后 Zea-Longa 评分、脑梗死灶体积和缺血半暗带 TUNEL 计数及 caspase-3、Bcl-2 表达

组别	动物数	Zea-Longa 评分 ($\bar{x} \pm s$)	脑梗死灶体积 ($\bar{x} \pm s, \%$)	TUNEL 计数 ($\times 400$)	caspase-3 计数 ($\times 400$)	Bcl-2 计数 ($\times 400$)
假手术组	8	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	2.28 \pm 0.18	0.00 \pm 0.00
MCAO 组	8	3.24 \pm 0.24	0.27 \pm 0.06	143.22 \pm 16.2	43.42 \pm 3.67	13.32 \pm 0.24
1.5ATA 亚组	8	2.66 \pm 0.18 ^①	0.21 \pm 0.04 ^①	91.34 \pm 9.44 ^①	29.64 \pm 4.21 ^①	18.75 \pm 3.16 ^①
2.0ATA 亚组	8	2.51 \pm 0.21 ^①	0.15 \pm 0.05 ^①	82.47 \pm 8.95 ^①	23.54 \pm 2.85 ^①	23.56 \pm 2.38 ^①
2.5ATA 亚组	8	2.56 \pm 0.22 ^①	0.14 \pm 0.04 ^①	84.88 \pm 7.69 ^①	21.83 \pm 3.65 ^①	22.13 \pm 2.24 ^①
3.0ATA 亚组	8	2.74 \pm 0.19 ^①	0.22 \pm 0.03 ^①	93.44 \pm 10.79 ^①	27.94 \pm 3.69 ^①	18.17 \pm 2.93 ^①

①与 MCAO 组比较 $P < 0.05$

表 2 HBO-PC 亚组间 Zea-Longa 评分、脑梗死灶体积和缺血半暗带 TUNEL 计数及 caspase-3、Bcl-2 表达两两比较

亚组	Zea-Longa 评分		脑梗死灶体积		TUNEL 计数		caspase-3 计数		Bcl-2 计数	
	q 值	P 值	q 值	P 值	q 值	P 值	q 值	P 值	q 值	P 值
1Vs2	0.0838	>0.05	5.2232	<0.05	3.0753	<0.05	3.8357	<0.05	5.5791	<0.05
1Vs3	0.7643	>0.05	3.5710	<0.05	4.7652	<0.05	4.8795	<0.05	4.2139	<0.05
1Vs4	0.0545	>0.05	0.9061	>0.05	0.1356	>0.05	1.3241	>0.05	0.9276	>0.05
2Vs3	1.4724	>0.05	0.4797	>0.05	0.4765	>0.05	0.0221	>0.05	1.9548	>0.05
2Vs4	0.5334	>0.05	5.5791	<0.05	5.0873	<0.05	2.9326	<0.05	5.7098	<0.05
3Vs4	1.0662	>0.05	4.2738	<0.05	3.1264	<0.05	6.1342	<0.05	3.0357	<0.05

注:1:1.5 ATA,2:2.0ATA,3:2.5ATA,4:3.0ATA

图1 不同组大鼠脑梗死灶体积变化(TTC染色)



图4 各组缺血半暗带凋亡促进酶 caspase-3 表达情况

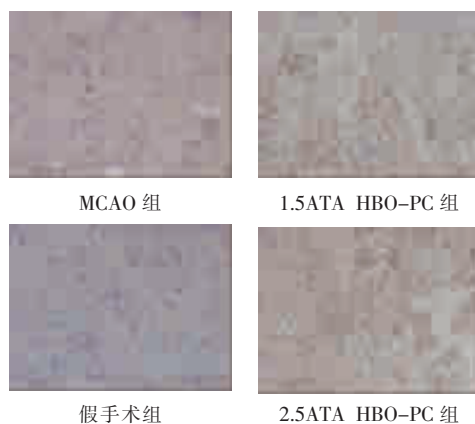


图2 各组缺血半暗带 TUNEL 阳性细胞数表达情况

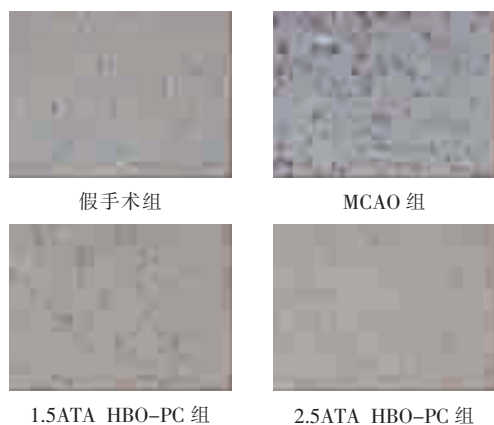
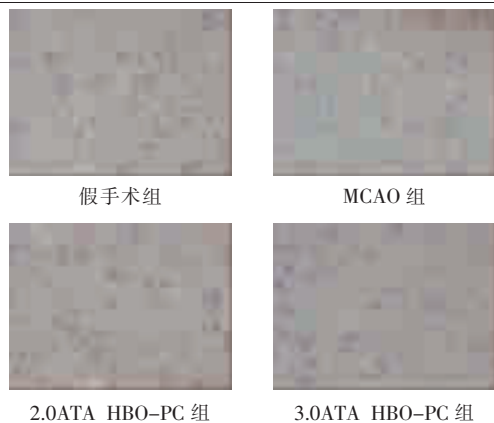


图3 各组缺血半暗带凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达情况



3 讨论

脑缺血是常见的凋亡刺激因素, 可以导致神经元细胞内凋亡与抗凋亡反应机制同时激活, 当刺激较小时, 以抗凋亡为主, 而当刺激较大时, 则以凋亡

为主。在大脑皮质缺血半暗带, 缺血所诱发的细胞内级联反应, 如 ATP 减少, 胞内离子浓度的改变, 兴奋性氨基酸的释放以及氧化应激等, 都可能诱发半暗带的神经元凋亡^[3-4]。细胞缺血缺氧后的凋亡通路主要是依赖半胱天冬蛋白酶 (cysteine - aspartate protease, caspase) 的线粒体途径和激活死亡受体 (经由 TNF 通路), 在神经元细胞凋亡过程中起重要作用的 caspase 家族成员是 caspase-3^[5]。有研究报道了凋亡的形态学和生化标志, 表明用 caspase 拮抗剂抑制凋亡通路能减轻局灶性脑缺血损伤或脊髓损伤^[6-7]。Bcl-2 是一种具有抗氧化剂及自由基清除剂活性的抗凋亡蛋白, 在对抗应激、调节细胞的氧化还原状态中起着重要作用^[8]。它包括诱导凋亡和抑制凋亡两大亚族。而 Bcl-2 的脑保护作用与抑制线粒体膜上 Bax 介导的细胞色素 C 释放有关, 并且 Bcl-2 表达水平的上调更能明显减轻凋亡^[9-10]。脑缺血后血流的再通对缺血组织非常重要, 而再灌注本身可导致级联反应对脑组织损伤, 再灌注过程中, 分子氧再次进入缺血组织增加了活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的产量。ROS 的水平超过了内源性抗氧化酶活性后就导致细胞的氧化损伤^[11]。HBO 可适量增加体内自由基的产生, 可以对人体起到预防性的保护作用, 提高机体的氧应激能力, 减轻脑缺血再灌注时氧自由基对神经元的损伤^[12-13]。HBO 预处理作为一种氧化应激刺激, 通过适量 ROS 诱导提高内源性抗氧化酶活性, 同时上调 Bcl-2 蛋白表达水平, Bcl-2 表达增强之后反过来减少 ROS 产生并且抑制 caspase-3 活性, 使脑缺血再灌注时凋亡为主转变为

抗凋亡为主^[14-15]。

我们在实验中观察到不同压力 HBO-PC 后动物行为改善,造模后 Zea-Longa 5 分制评分不同程度提高,与 MCAO 组比较有显著性意义 ($P < 0.05$), HBO-PC 组内比较未见显著差异 ($P > 0.05$) 可能与评分者的主观误差有关。HBO-PC 显著缩小了脑梗死灶 ($P < 0.05$) 说明 HBO-PC 有很好的脑保护作用。不同压力 HBO-PC 均抑制或减轻了皮质缺血半暗带 caspase-3 的激活和 Bcl-2 表达水平的上调,各压力 HBO-PC 亚组的皮质缺血半暗带 TUNEL 阳性细胞数比 MCAO 组显著减少,表明 HBO-PC 后增强了皮质缺血半暗带神经元的缺血缺氧耐受能力,说明 HBO-PC 有很好的诱导神经元缺血耐受作用。同时实验结果也观察到在 HBO 治疗的安全压力范围内 2.0ATA 和 2.5ATA 优于 1.5ATA 和 3.0ATA, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$),提示,2.0—2.5ATA 作为预处理压力较为理想,这为临床 HBO-PC 预防缺血-再灌注损伤,如缺血性卒中、心源性休克、心肺旁路手术和心脏移植等提供一定的理论依据。另外对于 HBO 预处理压力间的差异可能有其他机制的参与,这有待于进步研究。

参考文献

[1] Gu GJ, Li YP, Peng ZY, et al. Mechanism of ischemic tolerance induced by hyperbaric oxygen preconditioning involves upregulation of hypoxia-inducible factor-1 α and erythropoietin in rats[J]. J Appl Physiol, 2008, 104(4):1185—1191.

[2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. J Stroke, 1989, 20(1):84—91.

[3] 侯艳芝, 陈瑞, 于培兰等. 高压氧对急性损伤期全脑缺血再灌注大鼠脑内兴奋性氨基酸水平的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21

(1):38—41.

[4] Maulik N, Sasaki H, Addya S, et al. Regulation of cardiomyocyte apoptosis by redox-sensitive transcription factors [J]. FEBS Lett J, 2000, 48 (5):7—12.

[5] Graham SH, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(7):99—109.

[6] Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons [J]. Physiol Rev, 1999, 79:1561—1568.

[7] 王金光, 郑启新, 赵铭, 等. Caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 对大鼠脊髓损伤后细胞凋亡的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(9): 792—795.

[8] Jingye Wang, Jia Shen, Qin Gao, et al. Ischemia postconditioning protects against global cerebral ischemia/Reperfusion-Induced Injury in Rats[J]. J. Stroke, 2008, 39(11):983—990.

[9] 蒋杞英, 霍本良, 高压氧对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑梗死灶及 Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(10):890—892.

[10] Jiasi Li, Wenwu Liu, Suju Ding, et al. Hyperbaric Oxygen preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury by inhibition of apoptosis via mitochondrial way in rat[J]. Brain J Neuroscience, 2009, 10(9):1016—1020.

[11] Gim HR, Ahilathirunayagam S. Reperfusion syndrome: cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies [J]. Vasc Endovascular Surg J, 2007, 41(4): 77—93.

[12] Calvert JW, Yin W, Patel M, et al. Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia ischemia in a neonatal rat model[J]. J Brain Res, 2002, 51(4):128—131.

[13] Hua -Wei Liang, Shui -Feng Qiu, Jia Shen, et al. Genistein attenuates oxidative stress and neuronal damage following transient global cerebral ischemia in rat hippocampus [J]. Neuro Science Letters, 2008, 438(1):983—990.

[14] Nemoto EM, Betterman K. Basic physiology of hyperbaric oxygen in brain[J]. J. Neurol Res, 2007, 29(5):116—126.

[15] 李浩, 刘开祥, 俸军林, 等. 丹参酮 II A 对鼠脑缺血再灌注损伤 Bcl-2 和 caspase-3 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23 (8):691—694.