

· 基础研究 ·

高压氧对大鼠继发性脊髓损伤保护作用的实验研究

刘芳 陈虹 苏华 陈佳

【摘要】 目的 探讨高压氧(HBO)治疗对继发性脊髓损伤(SCI)的保护作用及其机制。方法 96只SD大鼠采用Allen打击法造成SCI后分为HBO组、常氧高压氮组、常压吸氧组和常压空气组,分别于损伤后第1,3,7,14天取材,采用原位末端标记法(TUNEL)检测凋亡细胞,PV-9000 二步法免疫组化检测 caspase-3 表达,光镜下观察,并对结果进行统计学分析;神经功能评价采用 BBB 评分。结果 HBO组在各时间点 caspase-3 表达均低于其他各组;TUNEL 结果亦显示,HBO 组凋亡细胞数低于其他各组;HBO 组大鼠神经功能明显改善。结论 HBO 能通过下调 caspase-3 的表达抑制 SCI 后细胞凋亡,其作用与氧有关。

【关键词】 高压氧; 脊髓损伤; 凋亡

Protective effects of hyperbaric oxygen in secondary spinal cord injury LIU Fang*, CHEN Hong, SU Hua, CHEN Jia. * Department of Hyperbaric Oxygen Treatment, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism underlying the protective effect of hyperbaric oxygen (HBO) in secondary spinal cord injury (SCI). **Methods** Models of acute SCI were established in 96 Sprague-Dawley rats using Allen's dropping weight technique. The rats were then divided into a HBO group, a high pressure nitrogen normal oxygen group, a normal pressure oxygen group and a normal pressure air group. The injured spinal cords were sampled for morphological studies at the 1st, 3rd, 7th and 14th day after injury. Apoptotic cells were labeled using the TUNEL technique, and the expression of caspase-3 was detected. The neurological functionality of the spinal cord was assessed by open field locomotor evaluation (the BBB score). **Results** The expression of caspase-3 in the HBO group decreased significantly more than in the other groups after injury. The number of TUNEL-positive cells was significantly lower in the HBO group as well. Neurological function improved significantly after HBO therapy. **Conclusions** HBO can down-regulate the expression of caspase-3 and inhibit cell apoptosis in rats after SCI. The protective effect of HBO was related with the oxygen level.

【Key words】 Hyperbaric oxygen; Spinal cord injury; Apoptosis

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后广泛存在神经元和胶质细胞的凋亡^[1],造成脊髓的继发性损伤,因而减少细胞凋亡对SCI后脊髓功能的恢复具有重要意义。近几年来,高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)逐渐应用于SCI的治疗并取得了较好的疗效。本研究通过对HBO治疗SCI后细胞凋亡的观察,探讨HBO治疗对继发性SCI的保护作用及其机制。

材料与方法

一、实验动物及分组

成年SD大鼠96只(购自福建医科大学实验动物中心),雌雄各半,体重(220±20)g,SCI后分为HBO

组、常氧高压氮组^[2]、常压吸氧组和常压空气组,每组24只,每组又各分为损伤后第1,3,7,14天4个时间点,每个时间点6只。

二、模型制备

用3%戊巴比妥钠(30 mg/kg 体重)麻醉大鼠后俯卧位固定于手术台上,无菌条件下取背正中切口,以T₁₁为中心,切开皮肤,分离两侧肌肉,暴露T₁₀至T₁₂椎板和棘突并咬除之,暴露硬脊膜,采用改良的Allen打击法^[3],用10 g×5 cm的致伤力损伤脊髓,大鼠出现摆尾放射、双下肢及躯体猛烈收缩扑动为打击成功,然后逐层缝合伤口,无菌包扎。

三、治疗方法

各组大鼠于术后6 h置于自制的木箱内,木箱内径为40 cm×45 cm×20 cm,两侧分别开有一个直径为2 cm的圆孔,一孔(靠近箱底部)为进气孔,连接输氧管,一孔(靠近箱顶部)为出气孔,连接排气管,为便于观察,箱顶采用玻璃推盖。实验采用

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.09.003

基金项目:福建省自然科学基金计划资助项目(X0750030)

作者单位:350005 福州,福建医科大学附属第一医院高压氧治疗科(刘芳、苏华、陈佳),病理科(陈虹)

YC2680/0.3-16 型空气加压舱(烟台产)。HBO 组大鼠置于舱内,经舱内一级供氧装置持续供给纯氧,10 min 后箱内氧浓度 $\geq 95\%$,持续给纯氧至治疗结束。常氧高压氮组大鼠用同样的木箱同时置于同一空气加压舱内,但箱内是含氧 11% 的人工配制的混合气^[2]环境,用 10 min 匀速将舱压升至 0.2 MPa (2 ATA),稳压 60 min,高压暴露结束后,用 25 min 匀速减压出舱,每日 1 次。常压吸氧组大鼠在常压下置于上述木箱,常压下持续供给纯氧,10 min 后箱内氧浓度 $\geq 95\%$ 开始计时,持续给氧 60 min,每日 1 次。常压空气组大鼠则暴露在同一个实验舱的过渡舱的常压空气环境下。

各组大鼠在稳压期间,用各自吸入的气体每 20 min 通风 1 次,每次 3 min,以更新舱内气体。

四、检测与评价方法

1. 凋亡细胞检测:采用原位末端标记法(TdT-mediated x-dUTP nick end labeling, TUNEL)和 Roche 公司生产的试剂盒,各个实验组切片按 TUNEL 标记法对凋亡细胞进行标记。先将切片烤片、脱水脱蜡;内源性过氧化物酶阻断 H_2O_2 孵育;胰蛋白酶消化;生物素阻断剂阻断;TUNEL 反应液孵育;辣根过氧化酶转化液转化;3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)染色;苏木素复染;烘干盖片。以上各步骤均用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗 3 次。TUNEL 反应液的配置:酶浓缩液(末端脱氧核糖核酸转移酶)和标记溶液(含有核苷酸混合液的反应液)以 1:9 的比例混合摇匀。

2. 免疫组化检测:采用 PV-9000 二步法免疫组化检测和 Santa Cruz Biotechnology 公司生产的试剂盒,按试剂盒说明检测 caspase-3。先将切片烤片、脱水脱蜡;PBS 冲洗; H_2O_2 封闭;生物阻断剂阻断;DAB 显色;苏木素复染;蒸馏水冲洗;烘干盖片。本实验抗原修复方式采用高温高压酸性修复 2 min。

3. 细胞计数:采用 Olympus BX-51 显微镜双盲法进行镜检,由 2 名非课题组又熟悉脊髓神经凋亡细胞形态的试验人员在 400 倍光镜下观察统计细胞数, TUNEL 法计算高倍视野下调亡细胞指数(apoptotic index, AI),即每张片选取 6 个阳性细胞最多的高倍视野,计算出平均阳性细胞百分数;caspase-3 计算高倍视野下阳性细胞数并计算阳性细胞率。

4. 脊髓神经功能评价:采用 BBB 评分(Basso, Beattie, and Bresnahan locomotor rating scale)^[4],实验动物在直径 100 cm,高 21 cm 的开放性塑胶浅池内测试,由 2 名熟悉 BBB 评分系统的检验人员相对站立独立评分,每只大鼠每次 4 min,在实验过程中,通过让大鼠跟随一张纸或一支笔而诱使它不停地运动,观察大鼠

后肢关节的运动、主动爪的位置、步伐、前后肢的协调性、足趾的清洁度、躯干的稳定性、尾巴的位置等,并给予评分。评分结果取平均值。

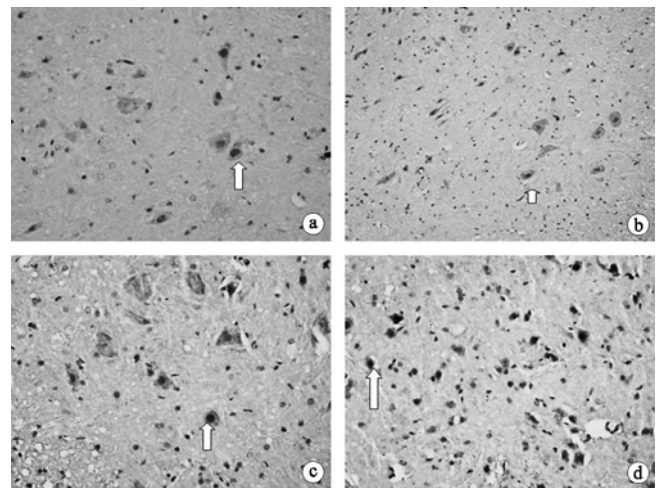
五、统计学分析

所有数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 SPSS 11.5 版统计软件包进行统计分析,组间比较采用独立样本 *t* 检验。

结 果

一、TUNEL 标记凋亡细胞计数

TUNEL 阳性染色细胞核固缩,呈棕褐色(图 1)。各组大鼠于损伤后第 1 天即有凋亡细胞表达,主要见于灰质中;第 3 天达到高峰,灰质与白质均可见;第 7 天后开始下降,灰质与白质均可见阳性细胞,以白质为多;至第 14 天白质中仍可见到阳性细胞。术后各时间点,常压空气组与 HBO 组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);与常氧高压氮组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);与常压吸氧组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);高压氧组与常压吸氧组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。



注:a 为 HBO 组,b 为常氧高压氮组,c 为常压吸氧组,d 为常压空气组
图 1 各组大鼠损伤后第 3 天凋亡细胞的表达(TUNEL 染色, $\times 400$)

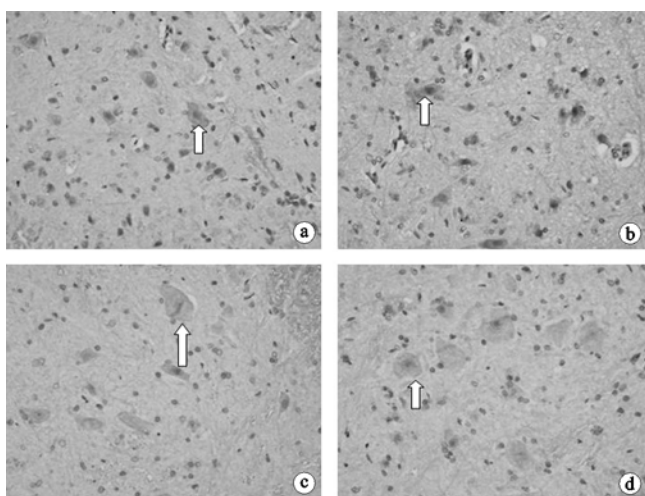
二、caspase-3 的免疫组化表达

Caspase-3 阳性染色为胞浆棕黄色,在神经元细胞和胶质细胞中均有表达,见图 2。各组大鼠于伤后第 1 天即有 caspase-3 表达,主要见于灰质中,以神经元细胞为主;第 3 天达到高峰,在脊髓灰质与白质中均可见阳性细胞;第 7 天后开始下降,第 14 天组仍可见到阳性细胞的表达,主要位于白质中,以少突胶质细胞为主。术后各时间点,常压空气组与 HBO 组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);与常氧高压氮组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);与常压吸氧组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。HBO 组与常压吸氧组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠在不同时间点的 AI、caspase-3、BBB 评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	AI (%)	caspase-3 表达 (%)	BBB 评分 (分)
HBO 组	24			
损伤后第 1 天	6	17 ± 3.22 ^{af}	16 ± 3.56 ^{af}	2.95 ± 1.23 ^{bc}
损伤后第 3 天	6	24 ± 3.34 ^{af}	19 ± 4.11 ^{af}	7.01 ± 2.01 ^{ac}
损伤后第 7 天	6	23 ± 1.93 ^{af}	16 ± 2.71 ^{af}	13.24 ± 1.52 ^{af}
损伤后第 14 天	6	15 ± 3.81 ^{af}	10 ± 3.14 ^{af}	17.25 ± 1.36 ^{ad}
常氧高压氮组	24			
损伤后第 1 天	6	31 ± 2.23 ^b	27 ± 2.88 ^b	1.83 ± 1.66 ^b
损伤后第 3 天	6	42 ± 1.89 ^b	31 ± 3.76 ^b	2.89 ± 1.41 ^b
损伤后第 7 天	6	39 ± 2.16 ^b	29 ± 2.63 ^b	6.22 ± 1.56 ^b
损伤后第 14 天	6	32 ± 3.60 ^b	23 ± 2.41 ^b	9.71 ± 1.03 ^b
常压吸氧组	24			
损伤后第 1 天	6	24 ± 3.01 ^c	22 ± 2.23 ^c	2.03 ± 1.02 ^b
损伤后第 3 天	6	32 ± 2.64 ^c	24 ± 2.68 ^c	5.01 ± 1.31 ^b
损伤后第 7 天	6	29 ± 2.04 ^c	22 ± 3.44 ^c	9.11 ± 1.42 ^b
损伤后第 14 天	6	19 ± 3.23 ^c	17 ± 2.98 ^c	12.20 ± 1.21 ^b
常压空气组	24			
损伤后第 1 天	6	32 ± 2.52	31 ± 3.12	1.90 ± 1.11
损伤后第 3 天	6	43 ± 3.25	36 ± 2.36	2.65 ± 1.25
损伤后第 7 天	6	40 ± 3.16	32 ± 1.89	6.74 ± 1.69
损伤后第 14 天	6	33 ± 2.64	26 ± 4.00	9.19 ± 1.09

注:与常压空气组比较,^a $P < 0.01$,^b $P > 0.05$,^c $P < 0.05$;与常压吸氧组比较,^d $P < 0.01$,^e $P > 0.05$,^f $P < 0.05$



注:a 为 HBO 组,b 为常氧高压氮组,c 为常压吸氧组,d 为常压空气组
图 2 各组大鼠损伤后第 3 天 caspase-3 的表达(免疫组化染色, ×400)

三、脊髓功能评价

各组大鼠于损伤后第 1 天起即有轻微的后肢运动,HBO 组于损伤后第 3 天即有双关节或 3 关节的强烈运动,平均 BBB 评分达 7.01 分。HBO 组与常压空气组比较,损伤后第 1 天差异无统计学意义($P > 0.05$);第 3,7,14 天差异均有统计学意义($P < 0.01$)。常压吸氧组与常压空气组比较,在术后各时间点评分均高于常压空气组但差异无统计学意义($P > 0.05$)。常氧高压氮组与常压空气组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。HBO 组与常压吸氧组比较,损伤后第 1,

3 天差异无统计学意义($P > 0.05$);第 7 天差异有统计学意义($P < 0.05$);第 14 天差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

讨 论

SCI 后,继发性神经损害除了神经细胞坏死外,凋亡也是神经细胞丧失的一种表现形式。Emery 等^[5]报道,在 15 例外伤性 SCI 3 h ~ 2 个月死亡患者的脊髓中发现,胶质细胞的凋亡与 caspase-3 的激活有关。Caspase 是一组与秀丽隐杆线虫 CED-3 同源的执行哺乳动物细胞凋亡的主要蛋白酶家族^[6],迄今为止已发现 14 个家族成员,caspase-3 是其中最为重要的剪切酶。caspase-3 在正常情况下是以无活性的酶原形式存在,由氨基酸原域、大亚单位和小亚单位组成,通过蛋白酶水解去除氨基酸的一段序列而被激活。有研究证实,在缺血和外伤性 SCI 动物模型中,caspase-3 活性增强^[7]。本研究发现,SCI 后 caspase-3 表达增多,于伤后第 3 天达到高峰,此后虽呈下降趋势,但在伤后第 14 天仍见表达,这与国内外一些学者报道一致^[8]。

HBO 可抑制细胞凋亡,对 SCI 有治疗作用。有研究表明,HBO 可抑制 caspase-3 mRNA 的表达,减少细胞凋亡^[9]。本实验观察到,HBO 组的高峰虽然也出现在第 3 天,但与其他组相比峰值下降且差异有统计学意义,提示 HBO 可通过下调 caspase-3 的表达减少细胞凋亡,对 SCI 起保护作用。鉴于已有的报道不能很好地地区分 HBO 与高压的作用,本研究设计了常氧高压氮组,该组加压气体在常压下含氧 11%、含氮 89%,当环境压力升高到 2 ATA 时,混合气中氧分压为 0.22 ATA,与常压下 0.21 ATA 的氧分压接近,造成常氧高压的环境。本研究发现,在常氧高压氮组中暴露,实验大鼠 caspase-3 的表达与常压空气组无显著差别,从而提示高压对治疗效果无明显影响;而常压吸氧组与常压空气组相比差异有统计学意义,提示高浓度高流量的氧在 SCI 治疗中的积极意义;HBO 组疗效明显优于其他各组,推测其机制可能与 HBO 能有效提高血氧张力,增加组织氧储量及提高氧的弥散距离,继而下调 caspase-3 表达,抑制细胞凋亡有关。

王钢和刘世清^[10]报道,HBO 可促进损伤脊髓神经元的再生和修复,对 SCI 起保护作用。本研究观察到,与常压空气组比较,HBO 治疗第 1 天的大鼠 BBB 评分无统计学意义,第 3,7 和 14 天组差异均有统计学意义,提示经 HBO 治疗,SCI 后运动功能的恢复稍滞后于凋亡蛋白的表达,并且疗效随着治疗次数的增多而增强,因而要坚持较长时间的 HBO 治

疗;常氧高压氮组差异无统计学意义,提示高压对 SCI 的疗效无影响;常压吸氧组虽评分较高但差异无统计学意义,提示常压吸氧虽能一定程度抑制细胞凋亡,但对神经功能的恢复无本质的影响,其原因尚待进一步研究。HBO 组与常压吸氧组比较,第 1,3 天差异无统计学意义,第 7,14 天差异有统计学意义,提示与常压吸氧相比,HBO 有减轻脊髓水肿,改善脊髓压迫的优势,更有利于 SCI 后大鼠的神经功能恢复,该优势随着治疗次数的增加而更明显。此效应符合 HBO 暴露具有收缩血管,减少渗出的作用机制。

总之,细胞凋亡是一个程序性的过程,早期 HBO 暴露可抑制细胞凋亡、减少 SCI 后神经细胞的坏死,保护脊髓神经功能,促进大鼠后肢运动功能的恢复。其作用与高分压的氧有关。提示 SCI 后应尽早进行 HBO 治疗。

参 考 文 献

[1] Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, et al. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med*, 1997, 3:73-76.

[2] 倪国坛,俞海泉. “常氧高压氮”的配制和使用. *中华航海医学杂志*, 2000, 4:245-246.
 [3] 胥少汀,郭世绛. 脊髓损伤基础与临床. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2002:191-194.
 [4] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*, 1995, 1: 1-21.
 [5] Emery E, Aldana P, Bunge MB, et al. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg*, 1998, 89:911-920.
 [6] Wang X, Karlsson JO, Zhu C, et al. Caspase-3 activation after neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia. *Biol Neonate*, 2001, 79:172-179.
 [7] Springer JE, Azbill RD, Knapp PE. Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nat Med*, 1999, 5:943-946.
 [8] 王金光,郑启新,赵铭,等. 大鼠脊髓损伤后细胞凋亡及 caspase-3、fas 的表达和意义. *中国康复医学杂志*, 2006, 20:296-300.
 [9] 刘丽旭,杨于嘉,贾延. 高压氧对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠细胞凋亡及 Caspase-3mRNA 表达的影响. *中华航海医学与高压医学杂志*, 2003, 12:226-229.
 [10] 王钢,刘世清. 高压氧对鼠损伤脊髓内神经生长相关蛋白表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26:712-714.

(修回日期:2009-11-23)
(本文编辑:松 明)

· 短篇论著 ·

系统的抗痉挛治疗结合 Bobath 神经发育疗法对痉挛型脑性瘫痪患儿粗大运动的影响

史艳 李静

脑性瘫痪(简称脑瘫)是小儿残疾的重要致病因素之一,而在脑瘫中以痉挛型脑瘫的发病率最高,大约占有所有脑瘫患儿的 60%~70%^[1]。痉挛型脑瘫患儿会因为肌紧张亢进,导致姿势异常,活动受限,关节运动范围变窄,甚至关节挛缩变形等不良症状^[1],直接影响到正常姿势和运动的建立以及预后。目前,康复医学科对于痉挛性脑瘫的治疗主要以康复训练为主,本研究旨在探讨系统的抗痉挛手法结合 Bobath 神经发育疗法对痉挛型脑瘫患儿粗大运动功能的影响。

一、资料与方法

(一)一般资料

选取 2002 年 5 月至 2008 年 11 月于我院康复医学科确诊并接受治疗的痉挛型脑瘫患儿 80 例,均符合全国小儿 CP 座谈会制定的诊断标准^[2]。将所有患儿分成观察组和对照组,每组患儿 40 例。观察组 40 例患儿中,男 26 例,女 14 例;平均年龄(1.8±1.1)岁;临床分型,偏瘫 7 例,四肢瘫 14 例,双瘫 10 例,双重性偏瘫 10 例;痉挛肢体总 148 个。对照组 40 例患儿中,男

24 例,女 16 例;平均年龄(1.6±1.0)岁;临床分型,偏瘫 5 例,四肢瘫 14 例,双瘫 12 例,双重性偏瘫 8 例;痉挛肢体总 148 个。

(二)治疗方法

观察组患儿采用系统的抗痉挛治疗方法(包括 Rood 治疗法、关节活动度训练以及被动牵拉)结合 Bobath 神经发育疗法进行治疗,对照组则仅采用 Bobath 神经发育疗法。2 组患儿均于治疗 4 个疗程后评价疗效。

1. Rood 治疗法:轻叩肌张力增高肌群,对关节、肌腱、肌群进行压、叩、拉、震动,关节负重等治疗,每日上、下午各训练 1 次,每次治疗 20 min,3 周为 1 个疗程,连续治疗 4 个疗程。

2. 关节活动度训练:重复大幅度关节被动活动,逐渐加大运动范围和运动速度,尽量使肌张力增高的肌肉达到充分的牵伸和运动,每日上、下午各训练 1 次,每次训练 20 min,3 周为 1 个疗程,连续治疗 4 个疗程。

3. 被动牵拉:治疗师按照由头至脚,由近端至远端的顺序进行躯干、上肢、下肢的被动牵拉,每日上、下午各训练 1 次,每次牵拉 20 min,3 周为 1 个疗程,连续治疗 4 个疗程。

4. Bobath 神经发育疗法:采用抑制-控制关键点、促通技术以及感觉刺激手法,改善异常运动的控制力,诱发正确的动作。