

·基础研究·

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*

蒋杞英¹ 霍本良²

摘要 目的:探讨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。**方法:**选取健康雄性 Wistar 大鼠 60 只,随机分为假手术组、缺血对照组及 HBO 组。采用大脑中动脉(MCA)阻断 3h 制成局灶性脑缺血模型。用 1% 四氮唑染色分别观察各组大鼠脑梗死灶的大小,应用免疫组化方法检测再灌注 6h、24h、48h、72h、120h 时间点大鼠脑组织 bcl-2 蛋白的表达。**结果:**假手术组未发现脑梗死灶及 bcl-2 蛋白表达阴性。HBO 组 120h 大鼠梗死灶体积(15.9±4.2)%明显小于缺血对照组(26.8±4.9)%($P<0.05$);再灌注各时相点缺血对照组和 HBO 组 bcl-2 蛋白的表达均显著高于假手术组($P<0.01$);HBO 组大鼠再灌注各时相点 bcl-2 表达均显著高于缺血对照组($P<0.01$)。**结论:**脑缺血再灌注后 bcl-2 蛋白表达增强,高压氧治疗可以进一步上调 bcl-2 蛋白的表达,抑制脑神经细胞凋亡,具有神经保护作用。

关键词 高压氧;脑缺血;bcl-2;大鼠;梗死灶

中图分类号:R743.33,R459.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2006)-10-0890-03

The effect of hyperbaric oxygen on infarct volume and the bcl-2 protein in brain after focal cerebral ischemia in rats/JIANG Qiying,HUO Benliang//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2006,21(10):890—892

Abstract Objective:To investigate the effect of hyperbaric oxygen(HBO) on the infarct volume and the expression of bcl-2 after cerebral ischemia reperfusion in rats.**Method:**60 health male Wistar rats were randomly divided into sham operation group,ischemic group,hyperbaric oxygen (HBO)groups. Focal cerebral ischemia model was induced by the middle cerebral artery(MCA) occlusion for 3 hours. The infarct volume of each group were measured by 1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining technique,and the expression of bcl-2 protein was measured at 6h、24h、48h、72h、120h after reperfusion by using immunohistochemistry staining.**Result:** The sham operation group could not find infarction focus and bcl-2 protein expression. 120h after ischemia onset, there was remarked difference on the infarct volume between the HBO group (15.9±4.2)%and the control group (26.8±4.9)%($P<0.05$). Compared with that in the sham operation group ,the expression of bcl-2 protein in ischemic group and HBO group was significantly higher($P<0.01$),the expression of bcl-2 protein in HBO group was significantly higher than that in the ischemic group($P<0.01$).**Conclusion:**The expression of bcl-2 protein increases after reperfusion,and HBO therapy can effectively increase bcl-2 protein expression and inhibit the neuronal cell apoptosis. Hyperbaric oxygen provides neuroprotective in rats.

Author's address Nerve Biology Graduate School,Medical College of Henan University,Henan Kaifeng,475001

Key words hyperbaric oxygen;cerebral ischemia;bcl-2;rat;infarct volume

高压氧(hyperbaric oxygen,HBO)用于治疗脑缺血再灌注疾病已有报道^[1]。许多研究证实 HBO 联合药物或其他治疗措施的综合疗法是提高缺血性脑卒中疗效、减轻药物副作用的实用而有效的方法,但其作用机制尚不清楚^[2]。

脑缺血后缺血中心区区域的神经细胞很快出现坏死,但其周围的神经细胞却发生延迟性神经元退变,亦即细胞凋亡(apoptosis)^[3]。bcl-2 是凋亡抑制基因,在缺血性脑损伤模型中,主要在存活神经细胞

中表达,其表达峰值在缺血后 24h^[4]。HBO 对大鼠局灶性脑缺血后神经元 bcl-2 蛋白表达的影响报道较少。本研究采用雄性 Wistar 大鼠制作大脑中动脉阻断持续性局灶性脑缺血模型,观察 HBO 对脑缺血

* 基金项目:河南大学自然科学基础研究项目(xk03rBrx097)

1 河南大学医学院神经生物学研究所,河南开封,475001

2 开封市第二人民医院心血管内科

作者简介:蒋杞英,女,副教授

收稿日期:2006-01-26

bcl-2 蛋白表达的影响, 以探讨 HBO 在缺血性脑损伤中可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性 Wistar 大鼠 60 只, 体重 200—250g (购自郑州大学实验动物中心, 合格证号 4104034) 随机分 3 组: 假手术组 10 只, 缺血对照组 25 只, 脑缺血再灌注加高压氧治疗组 (简称 HBO 组) 25 只。每组各有 5 只大鼠用于 TTC 染色, 其余用于免疫组化染色。缺血对照组和 HBO 组缺血后 3h 分别对应 6h、24h、48h、72h、120h 时间点分为 5 个亚组, 每个亚组 5 只动物。

1.2 局灶性脑缺血动物模型的制备

用 10% 水合氯醛 (300mg/kg 体重, 腹腔注射) 麻醉后, 采用 Longa^[5]报道的颈外动脉栓线法制备局灶性脑缺血再灌注模型。假手术组也插入尼龙线, 深度小于 1.0cm, 不阻断 MCA, 不至于造成脑梗死。缺血大鼠苏醒后, 将大脑中动脉阻断同侧出现霍纳征, 右前肢屈曲、内收, 右侧转圈或向右侧倾倒者列为研究对象。动物缺血后 3h 送入单人高压氧舱。高压 (0.2MPa) 下停留 60min。停留毕, 25min 匀速减压到常压。假手术组大鼠亦置于舱内, 模拟除压力、氧浓度以外的其他过程和环境条件。HBO 组的 5 个亚组每天进行 1 次高压氧治疗, 直到实验时间结束为止, 出舱后 1h 断头取脑, 石蜡包埋, 连续切片。

1.3 梗死灶体积定量计算

假手术组、缺血对照组和 HBO 组各 5 只大鼠于术后 120h 用 10% 水合氯醛深麻醉后处死, 迅速取脑, 将脑组织置于冰箱冷冻 0.5h 后, 切成 2mm 厚冠状切片, 并用 1% 四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 染色 10—15min, 正常组织染成红色, 坏死组织不着色, 经 10% 甲醛溶液固定后照片, 并用多媒体彩色图像分析系统测量梗死灶面积。各脑片梗死面积之和乘以厚度 (2mm) 后为脑梗死灶体积的近似值, 以脑梗死体积/全脑体积作为统计参数。采用单盲法。

1.4 免疫组化检测

Bcl-2 单克隆抗体试剂盒购于北京中山生物试剂公司, 免疫组化染色方法采用 SP 法。兔抗大鼠 Bcl-2 抗体的浓度为 1:50。阴性对照用 PBS 代替一抗, 余步骤同上。阳性结果判断: 细胞质中有棕黄色颗粒者为 Bcl-2 蛋白染色阳性。取每张切片梗死灶区域相互不重叠的 4 个视野, 高倍镜视野下 (10×40) 计数 bcl-2 免疫组化阳性细胞密度。

1.5 统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS12.0 统计软件分析处理, 组间差异的显著性用方差分析进行检验。

2 结果

2.1 梗死灶体积

经 TTC 染色后, 缺血对照组及 HBO 组大鼠皮质及纹状体梗死区呈苍白色, 未缺血区呈红色, 与大脑中动脉支配的脑区一致, 说明模型成功。假手术组未发现缺血性梗死灶。HBO 组 120h 大鼠梗死灶体积 (15.9±4.2)% 明显小于缺血对照组 (26.8±4.9)% ($P<0.05$)。

2.2 Bcl-2 蛋白的测定

Bcl-2 免疫阳性细胞主要位于缺血梗死灶边缘, 梗死灶中心区和远离梗死灶的区域未见阳性细胞。由表 1 可见: ①假手术组: 未见 Bcl-2 蛋白表达阳性细胞。②缺血对照组: 缺血 6h 在缺血边缘区可见少数 Bcl-2 表达阳性细胞, 24h 阳性细胞数达到最大值, 48h 和 72h 仍处于高水平, 第 120h 阳性细胞数明显减少。③HBO 组与缺血对照组比较: 缺血 24h、48h、72h 及 120h 组 Bcl-2 阳性细胞密度增加, 差异有显著性。

表 1 脑缺血 Bcl-2 免疫组化阳性细胞密度 (10×40 视野, 阳性细胞数)

组别	再灌注时间				
	6h	24h	48h	72h	120h
缺血对照组	12±4	59±14	48±14	39±10	16±4
HBO 组	16±5 ^①	68±12 ^②	71±13 ^②	62±12 ^②	28±5 ^③
F 值	1.95	1.19	7.25	10.84	17.56
P 值	0.200	0.307	0.027	0.011	0.003

与缺血对照组比 ① $P>0.05$, ② $P<0.05$, ③ $P<0.01$

3 讨论

近代医学和新技术研究认为, 不论何种脑血管疾病均存在以脑缺血为基础的脑循环和脑代谢障碍等一系列脑缺血-缺氧性生化连锁反应, 最终导致脑血管异常。组织缺氧是局灶性脑缺血发生细胞损伤的一个主要原因^[6]。由于缺氧在缺血性细胞死亡中的重要作用, 脑缺血后恢复足够的氧供成为脑组织恢复的一个关键因素。

本研究结果发现, HBO 组和缺血对照组相比: 缺血 24h 梗死灶体积明显大于 6h, HBO 组 120h 大鼠梗死灶体积明显小于缺血对照组。说明 HBO 治疗可以缩小大鼠局灶性脑缺血再灌注脑梗死体积。表明了 HBO 对脑缺血再灌注动物具有神经保护作用。

实验还发现: 局灶性脑缺血后 Bcl-2 蛋白表达明显增高, 主要分布在梗死灶边缘, 即半暗带内。

HBO组与缺血对照组相比:Bcl-2蛋白表达在缺血24h开始增强,48h、72h及120h阳性细胞数量增加。上述结果提示缺血早期开始给予HBO治疗可加强梗死灶边缘区域Bcl-2蛋白的表达。推测HBO对神经元的保护作用 and 减少局灶脑缺血时梗死灶体积可能通过bcl-2蛋白保护缺血性损伤的神经元,减少神经元的凋亡。

HBO对脑缺血再灌注的保护作用机制十分广泛,涉及多个环节,包括提高血氧分压与血氧含量、改善微循环、降低血脑屏障通透性^[7]、抑制兴奋性氨基酸毒性作用^[8]及抑制海马iNOS mRNA的表达^[9],减少神经元凋亡^[10]、抑制白细胞浸润和减少再灌注损伤等^[11]。HBO治疗缺血性脑卒中始于20世纪60年代,以后在各国得到逐渐推广。HBO治疗缺血性脑血管病的机制及利与弊,仍需进一步的探索、研究和临床的验证。

参考文献

- [1] Krakovsky M, Rogatsky G, Zarchin N, et al. Effect of hyperbaric oxygen therapy on survival after global cerebral ischemia in rats[J]. Surg Neurol, 1998, 49(4): 412—416.
- [2] Nighoghossian N, Trouillas P, Adeleine P, et al. Hyperbaric oxygen in the treatment of acute ischemic stroke—A double blind pilot study[J]. Stroke, 1995, 26(8): 1369—1372.
- [3] Love S. Apoptosis and brain ischemia J [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003, 27(2): 267.
- [4] Chen J, Graham SH, Chen PH, et al. Bcl-2 is expression in neurons that survive focal cerebral ischemia in the rat[J]. Neuroreport, 1995, 26(2): 394.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84—91.
- [6] Seisjoe BK, Kristian T, Katsura KI. Overview of bioenergetic failure and metabolic cascades in brain ischemia. In: Ginsberg MD, Bogousslavsky J eds [M]. Cerebrovascular Disease. Blackwell: Oxford, 1998, 3—13.
- [7] 赵红, 卢晓梅, 陈学新, 等. 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 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26: 196—199.
- [8] Yang ZJ, Camporesi C, Yang X, et al. Hyperbaric oxygenation mitigates focal cerebral injury and reduces striatal dopamine release in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion[J]. Eur J Appl Physiol, 2002, 87: 101—107.
- [9] 王国忠, 赵立明, 高春锦, 等. 高压氧对脑缺血再灌注大鼠的海马诱导型一氧化氮合酶 mRNA 表达的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26: 193—195.
- [10] Yin D, Zhou C, Kusaka I, et al. Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23(7): 855—864.
- [11] Miljkovic-Lolic M, Silbergleit R, Fiskum G, et al. Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen treatment in experimental focal cerebral ischemia are associated with reduced brain leukocyte myeloperoxidase activity[J]. Brain Res, 2003, 971(1): 90—94.

(上接 878 页)

色可以较为方便地追踪和分析移植细胞的迁移和分化^[9]。本实验应用 Nucleofector 转染技术,成功地在神经干细胞中导入 EGFP, 并且在其传代细胞中均有 EGFP 表达。这说明,神经干细胞可以作为载体细胞为中枢神经系统的某些疾病,尤其是退行性疾病导入治疗基因或者一些营养成分,提供一种有效手段。

本实验从细胞标记的角度选用 EGFP 标记神经干细胞,发现转染了 EGFP 的神经干细胞在体外经多次传代后不影响 EGFP 的表达,NSCs 本身仍能分化为神经元和神经胶质细胞。因此 EGFP 可作为基因转染后的良好细胞标记,为进一步行标记细胞移植治疗实验奠定了基础。

参考文献

- [1] McKay R. Stem cells in the central nervous system [J]. Science, 1997, 276(5309): 66.
- [2] Jannotti G, Lu XB, Lu PH, et al. Neural stem cell transplantation in the repair of spinal cord injury [J]. Progress in Natural Science, 2001, 11(7): 490—503.
- [3] 孙旭芳, 项红兵, 招伟贤. 干细胞分化的可控性在神经细胞移植中的研究进展[J]. 中华器官移植杂志, 2005, 26(7): 446—447.
- [4] Naylor LH. Reporter gene technology: the future looks bright[J]. Biochem Pharmacol, 1999, 58(4): 749—757.
- [5] 杨林, 朱剑虹, 王宇倩. 绿色荧光蛋白标记神经干细胞的体外研究[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(10): 1236—1238.
- [6] 王晓静, 张更林, 张衡. 神经干细胞的研究进展[J]. 神经解剖学杂志, 2005, 21(3): 323—326.
- [7] 徐海伟, 黎海蒂. 神经前体细胞的迁移机制及其应用研究进展[J]. 生理科学进展, 2004, 35(1): 42—45.
- [8] 杨志军, 徐如祥. 神经干细胞标记及活体示踪的研究现状及前景[J]. 中华神经医学杂志, 2005, 4(2): 109—114.
- [9] Gerrad L, Zhao D, Clark AJ, et al. Stably transfected human embryonic stem cell clones express OCT4-specific green fluorescent protein and maintain self-renewal and pluripotency [J]. Stem Cells, 2005, 23(1): 124—133.