·基础研究·

不同压力高压氧预处理对大鼠局灶性脑缺血-再灌注自由基损伤的保护作用

蔡宏斌[1] 葛朝明[1,2] 张兰芳[1] 赵翀翀[1] 刘志艳[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-再灌注缺血半暗带氧化应激平衡的调节及对自由基损伤的脑保护作用,选择恰当的预处理压力窗。

方法:将46只SD大鼠随机分为3组:假手术组(n=6);左侧大脑中动脉闭塞(MCAO)组(n=8);HBO-PC+MCAO组(n=32)。HBO-PC+MCAO组按不同的HBO-PC压力分为1.5ATA(0.15MPa)组、2.0ATA(0.20MPa)组、2.5ATA(0.25MPa)组和3.0ATA(0.30MPa)组4个亚组,每组8只。按不同治疗压力,每次吸氧1h、隔日1次,共5次,10d完成。最后一次HBO-PC后24h根据Zea-Longa线栓法制作MCAO再灌注损伤模型,缺血2h再灌注24h后检测缺血半暗带神经元凋亡水平、丙二醛(MDA)含量、同时检测总超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化酶(GSH-px)的抗氧化酶活力。假手术组和对照组不进行HBO/常压氧治疗,10天后处理同实验组。

结果:实验组中各亚组缺血半暗带凋亡细胞数和MDA含量均不同程度下降,总SOD和CAT活动水平均不同程度的增高,与MCAO组比较差异有显著性意义($P<0.05$);各预处理亚组GSH-px表达无明显变化,与MCAO组比较差异无显著性意义($P>0.05$)。预处理组内比较,上述指标(除GSH-px)在2.0ATA和2.5ATA组间,1.5ATA和3.0ATA组间差异均无显著性意义($P>0.05$);但是,2.0ATA和2.5ATA组比较1.5ATA和3.0ATA组差异有显著性意义($P<0.05$)。

结论:HBO-PC可能通过上调抗氧化酶活性减轻局灶性脑缺血-再灌注缺血半暗带的自由基损伤和神经元凋亡,1.5ATA-3.0ATA间为HBO-PC的安全有效压力,发现2.0ATA和2.5ATA压力下HBO-PC抗自由基损伤能力优于1.5ATA和3.0ATA。

关键词: 高压氧;预处理;脑缺血-再灌注;凋亡;抗氧化酶

中图分类号:R459.6, R743.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2011)-09-0803-04

Study on protection of different atmosphere absolute hyperbaric oxygen preconditioning against free radical injury after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats/ CAI Hongbin, GE Zhaoming, ZHANG Lanfang, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(9): 803—806

Abstract

Objective: To study the protection of different atmosphere absolute (ATA) hyperbaric oxygen preconditioning (HBO-PC) on neurons against free radical injury in rats with cerebral ischemia-reperfusion.

Method: Totally 48 Wistar rats were randomly assigned to the following three groups: sham group (n=8), MCAO group (control group, n=8), and HBO-PC plus MCAO group (trial group, n=32). The rats in trial group were sub-divided as, 1.5ATA (0.15MPa) sub-group, 2.0ATA (0.20MPa) sub-group, 2.5ATA (0.25MPa) sub-group, and 3.0ATA (0.30MPa) sub-group, with 8 rats in each. HBO-PC was administered by using 100% oxygen at different ATA for 60min with 24h interval for 5 times in 10d. The last times of HBO-PC was performed at 24h before middle cerebral artery occlusion (MCAO) produced by the filament mothod initially reported by Zea-Longa with some modifications. After ischemia 2h and reperfusion 24h, the samples of each group were detected with TU-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.09.002

1 兰州大学第二医院神经内科高压氧治疗中心,兰州,730000; 2 通讯作者

作者简介:蔡宏斌,男,主治医师;收稿日期:2010-10-16

NEL reaction to observe the apoptosis of neurons in ischemic penumbra, and content of malondialdehyde(MDA) activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-px) sampled from the ischemia penumbra were measured.

Result: After HBO-PC with 1.5ATA, 2.0ATA, 2.5ATA and 3.0ATA the apoptosis of ischemic penumbra tissue decreased, and the level of MDA reduced and the antioxidant activities of CAT and SOD increased. In all trial groups, above indexes, showed significantly different as compared with that in control group ($P<0.05$), but there was no significant effect on the activity of GSH-px($P>0.05$). However, the effect of HBO-PC with 2.0ATA and 2.5ATA were superior to those with 1.5ATA and 3.0ATA ($P<0.05$).

Conclusion: These observations demonstrated that HBO-PC played an important role in the upregulations of antioxidant enzyme activities against free radical injury and neuron apoptosis after brain ischemia-reperfusion, and the effects of HBO-PC with 2.0ATA and 2.5ATA against free radieal injury were superior to that with 1.5ATA and 3.0ATA.

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

Key word hyperbaric oxygen; preconditioning; cerebral ischemia-reperfusion; apoptosis; antioxidant enzyme

氧化应激(oxidative stress, OS)是脑血管疾病的主要发病机制之一,氧化应激就是在脑缺血-再灌注(ischemia-reperfusion, IR)期,破坏了体内强氧化剂和抗氧化剂的平衡所导致的继发性脑损伤,对脑血管疾病的发展乃至预后都有着很重要的影响[1]。高压氧预处理(hyperbaric oxygen preconditioning, HBO-PC)减轻脑IR后自由基反应已在一些动物实验和临床试验中得到证实[2—3]。本研究建立大鼠左侧大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,旨在研究不同压力HBO-PC对大鼠脑IR期间氧化应激平衡的调节及对自由基损伤的脑保护作用,观察恰当的预处理压力窗,为临床工作提供一定的理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康Wistar大鼠46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=6);MCAO组(n=8);HBO-PC+MCAO组(n=32)。实验组按不同的HBO-PC压力分为4个亚组:1.5ATA(0.15MPa)组、2.0ATA(0.20MPa)组、2.5ATA(0.25MPa)组和3.0ATA(0.30MPa)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生产)。实验前给纯氧3—5min洗舱,测得舱内氧浓度>98.6%、CO_2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)。隔日1次,每次进出舱的时间固定,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[4],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)℃。模型成功标志为大鼠手术麻醉清醒后Zea-Longa 5分制[3]评分>2分,评分<2分者剔除并补充。

1.4 细胞凋亡原位检测

大鼠达到缺血-灌注时限后,多聚甲醛液固定脑组织,分离缺血半暗带,取约2mm厚的顶叶皮质缺血半暗带,制作切片(石蜡包埋)。应用TUNEL检测试剂盒(罗氏生物技术有限公司),依照试剂说明书步骤进行严格操作,正常细胞核呈红色,而凋亡细胞核呈蓝黑或蓝紫色。应用多媒体彩色病理分析系统(RY2000型,广东),每组在低倍镜下随机计数5个视野下阳性细胞数量,取其平均值表示。

1.5 氧化应激指标检测

制备缺血半暗带脑组织均浆并离心弃沉淀,留上清液分装检测。脑组织中的总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力采用黄嘌呤氧化酶-羟胺法测定;化学比色法测定谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-px)活力;紫外比

色法测定过氧化氢酶(catalase, CAT)活力;丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量采用硫代巴比妥酸比色法(TBA法)测定。试剂均购自南京建成生物研究所,严格按试剂说明书操作。

1.6 统计学分析

实验结果用SPSS 11.5统计软件包分析处理。所有数据均以均数±标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内重复比较采用q检验。

2 结果

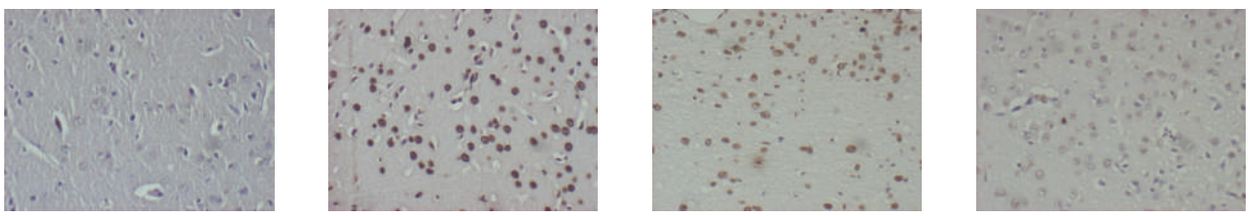
2.1 各组缺血半暗带神经细胞凋亡水平表达

脑缺血-再灌注24h后,假手术组脑缺血半暗带组织TUNEL染色偶见凋亡细胞,MCAO组脑组织中可见大量凋亡细胞,HBO-PC各亚组可见不等量的凋亡细胞表达,见图1。MCAO组神经细胞凋亡率明显高于各预处理组,差异均有显著性意义($P<0.05$),见表1;预处理组内比较细胞凋亡2.0ATA组和2.5ATA组均明显少于1.5ATA组和3.0ATA组($P<0.05$);而2.0ATA组和2.5ATA组间,1.5ATA组和3.0ATA组间比较,差异无显著性意义($P>0.05$),见表2。

2.2 局灶性脑缺血-再灌注各组缺血半暗带区氧化应激水平的影响

MCAO组和预处理4个亚组和假手术组相比较,缺血半暗带区脑组织MDA含量均不同程度增高,其中MCAO组最高,与各亚组比较差异有显著性意义($P<0.05$);预处理各亚组和MCAO组比较,总SOD和CTA活力值均升高,差异均有显著性意义($P>0.05$),见表1。总SOD和CTA在预处理亚组间比较,2.0ATA组和2.5ATA组均显著高于1.5ATA组和3.0ATA组($P<0.05$);而2.0ATA组和2.5ATA组间,1.5ATA组和3.0ATA组间比较,差异无显著性意义($P>0.05$);MDA呈相反的表现。预处理各亚组间GSH-px表达无明显差异,与MCAO组比较差异均无显著性意义($P>0.05$),且都显著低于假手术组($P<0.05$),见表2。

图1 假手术组、MCAO组、1.5ATA组和2.5ATA组缺血半暗带神经细胞凋亡水平表达 (×400, TUNEL染色)



A:假手术组 B:MCAO组 C:1.5ATA组 D:2.5ATA组

表1 各组/亚组缺血-再灌注24h后缺血半暗带凋亡细胞计数和氧化应激反应变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	TUNEL J计数(×400倍)	MDA(nmol/mgprot)	SOD(U/mgprot)	CTA(U/gpro)	GSH-px(vital unit)
假手术组	6	0.00±0.00	4.55±1.48	192.34±15.84	12.57±3.27	33.28±5.79③
MCAO组	8	143.22±16.20	16.43±3.48	124.47±13.86	9.69±3.27	19.38±4.11
1.5ATA亚组	8	91.34±9.44①	14.12±3.12①	205.45±15.34①	13.48±3.09①	21.46±3.86
2.0ATA亚组	8	82.47±8.95①	11.14±2.21①	232.50±14.44①②	22.47±2.89①②	20.54±3.58
2.5ATA亚组	8	84.88±7.69①	10.38±2.94①	244.58±16.37①②	24.56±3.96①②	21.26±2.97
3.0ATA亚组	8	93.40±10.79①	13.88±3.67①	208.06±13.76①	15.48±2.12①	18.93±3.54

①与MCAO组比较:$P<0.05$;②与假手术组比较:$P<0.05$;③与MCAO组及高压氧各组比较:$P<0.05$

表2 HBO-PC亚组间缺血半暗带TUNEL计数与MDA、SOD、CTA和GSH-px表达两两比较

	TUNEL计数		MDA		SOD		CTA		GSH-px	
	q值	P值	q值	P值	q值	P值	q值	P值	q值	P值
1 vs 2	4.2638	<0.05	5.2232	<0.05	3.0753	<0.05	3.8357	<0.05	0.0838	>0.05
1 vs 3	4.0716	<0.05	3.5710	<0.05	4.7652	<0.05	4.8795	<0.05	0.7643	>0.05
1 vs 4	0.6109	>0.05	0.9061	>0.05	0.1356	>0.05	1.3241	>0.05	0.0545	>0.05
2 vs 3	0.9477	>0.05	0.4797	>0.05	0.4765	>0.05	0.0223	>0.05	1.4724	>0.05
2 vs 4	4.2388	<0.05	5.5791	<0.05	5.0873	<0.05	2.9326	<0.05	0.5334	>0.05
3 vs 4	3.8943	<0.05	4.2738	<0.05	3.1264	<0.05	6.1342	<0.05	1.0662	>0.05

1:1.5ATA组;2:2.0ATA组;3:2.5ATA组;4:3.0ATA组

3 讨论

徐春江等[5]对脑创伤大鼠HBO治疗压力窗进行研究，证实压力条件的选择对机体氧化应激反应有很大影响，研究证实[6—7]HBO-PC作为一种氧化应激的刺激因素，通过适量活性氧簇（reactive oxygen species, ROS）的生成，诱导内源性抗氧化酶主要是SOD和CAT的生成，同时上调低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)和凋亡抑制蛋白bcl-2等耐缺血缺氧蛋白的表达水平，达到抗自由基和减轻凋亡的作用。也有研究[8—9]观察到HBO-PC诱导产生适量的一氧化氮合成酶（nitric oxide synthase, NOS），尤其诱导型一氧化氮合成酶(induce nitric oxidesynthase, iNOS)，后者合成适量的一氧化氮（nitric oxide, NO）可减轻缺血-再灌注后中性粒细胞在脑缺血区的聚集和黏附，抑制细胞因子的释放和白细胞整合素Mac-1、细胞间黏附分子-1的表达，同时上调Mn-SOD等抗氧化酶的活性，使缺血-再灌注损伤减轻。实验发现[10—11]在脊髓缺血-再灌注损伤实验中，HBO-PC组大鼠的CAT和SOD的活性都比对照组明显提高，同时凋亡酶Caspase-3和Caspase-9释放减少，而在应用了CAT抑制剂和氧自由基清除剂或应用非选择性NOS抑制剂L-NAME (10mg/kg)后，HBO-PC所诱导的脊髓缺血耐受作用明显减弱。

也有报道[12—13]，连续长时程常压氧下暴露制作MCAO大鼠模型，缺血-再灌注24h后也能通过上调抗氧化酶的活性诱导缺血耐受，主要通过促进GSH-px和谷胱甘肽还原酶类的活性，同时也包括SOD和CAT的活性增加。而本试验中模型组和实验各组GSH-px差异无显著性意义($P>0.05$)，且都显著低于假手术组($P<0.05$)，可能与选择的检测时间点有关，即缺血-再灌注24h后GSH-px的活性已不同程度降低，失去检测意义，也可能说明GSH-px未参与HBO-PC诱导缺血耐受的过程。

本实验观察到HBO-PC能明显提高大鼠脑缺血-再灌注损伤半暗带组织抗氧化酶SOD和CAT的水平，增强机体抗氧自由基的能力，减轻缺血-再灌注引起的脂质过氧化损伤，并抑制神经元凋亡。同时观察到HBO预处理的压力条件有选择性，2.0ATA组和2.5ATA组比较1.5ATA组和3.0ATA组更具有诱导脑缺血耐受的能力，差异有显著性意义($P<0.05$)。故认为1.5—3.0ATA是安全的压力窗，而2.0ATA和2.5ATA是较恰当的压力条件。

参考文献

[1] Heistad DD. Oxidative stress and vascular disease: 2005 Duff Lecture[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(4):689—695.

[2] Stroev SA, Gluschenko TS, Tjulkova EI, et al. The effect of preconditioning on the Cu, Zn superoxide dismutase expression and enzyme activity in rat brain at the early period after severe hypobaric hypoxia[J]. Neurosci Res, 2005, 53(1):39—47.

[3] 陆磊,孙晓江,张进,等.高压氧治疗急性脑梗死的时间窗研究[J].中华物理医学和康复杂志,2007,29(9):618—620.

[4] 龚彪,李长清,黄剑.SD大鼠线栓法局灶性脑缺血/再灌注模型的改进[J].重庆医学,2006,35(4):313.

[5] 徐春江,周士俊,吴玲妹,等.不同压力高压氧对脑创伤大鼠顶叶皮质神经元超微结构的影响[J].中国全科医学,2008,11(15):1359.

[6] Li J, Liu W, Ding S, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against brain ischemia-reperfusion injury by upregulation of antioxidant enzymes in rats[J]. Brain Res, 2008, 19(6):223—229.

[7] Nie H, Xiong L, Lao N, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against spinal cord ischemia by upregulation of antioxidant enzymes in rabbits[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(5):666—674.

[8] Yogaratnam JZ, Laden G, Guvendik L, et al. Pharmacological preconditioning with hyperbaric oxygen: can this therapy attenuate myocardial ischemic reperfusion injury and induce myocardial protection via nitric oxide?[J]. J Surg Res, 2008, 149(1):155—164.

[9] 李东亮,卢娜,王宝英,等.低氧预适应对脑缺血-再灌注大鼠神经元凋亡及P53蛋白表达的影响[J].中国康复医学杂志,2006,(12):1075—1077.

[10] Wang L, Li W, Kang Z, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates early apoptosis after spinal cord ischemia in rats[J]. J Neurotrauma, 2009, 26(1):55—66.

[11] Kim CH, Choi H, Chun YS, et a1. Hyperbaric oxygenation pretreatment induces catalase and reduces infarct size in ischemic rat myocardium[J]. Pflugers Arch, 2001, 442(4):519—525.

[12] 赵红,聂志伟,朱丽娜,等.高压氧对缺血再灌注小鼠脑组织细胞因子IL-10及血脑屏障通透性的影响[J].中国康复医学杂志,2008,(2):110—113.

[13] Bigdeli MR. Preconditioning with prolonged normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance partly by upregulation of antioxidant enzymes in rat brain tissue[J]. Brain Res, 2009, 1260:47—54.