

·基础研究·

# 高压氧治疗对创伤性脑损伤大鼠认知功能的影响

刘颖<sup>1</sup> 张淑珍<sup>1</sup> 朱晓红<sup>1</sup> 沈光宇<sup>1</sup> 刘苏<sup>1,2</sup>

## 摘要

**目的:**观察高压氧治疗对脑损伤大鼠认知功能的影响及海马区 CCL2 及其受体 CCR2 的表达变化。

**方法:**75 只成年雄性 SD 大鼠按数字表法随机分为假手术组(Sham 组)、脑外伤组(TBI 组)和高压氧治疗组(HBOT 组),每组各 25 只。HBOT 组和 TBI 组均采用 Feeney 自由落体法制作脑外伤模型,HBOT 组每天进行 HBO 治疗;Sham 组暴露硬脑膜不予打击。运用 Morris 水迷宫测试认知功能;荧光免疫双标检测海马 CA1 区 CCL2 和 CCR2 的表达。实时定量 PCR 测定损伤侧海马 CCL2 和 CCR2 mRNA 的表达情况。

**结果:**Morris 水迷宫测试结果显示,HBOT 组高压氧治疗后 7d、14d 和 21d 平均潜伏期下降,同时穿越平台次数增多,与 TBI 组相比,差异均有显著性意义( $P<0.05$ );免疫荧光双染法检测显示,大鼠 TBI 后海马 CA1 区 CCL2 主要表达在星形胶质细胞,CCR2 主要表达在神经元;实时定量 PCR 显示,脑损伤后 3—21d 损伤侧海马 CCL2 mRNA、CCR2 mRNA 水平明显上升,差异有显著性意义;高压氧治疗后海马 CCL2 mRNA 明显下降,与 TBI 组相比,7d 组、14d 组及 21d 组差异有显著性意义( $P<0.05$ )。高压氧治疗 7d、14d 后海马 CCR2 mRNA 明显下降,与 TBI 组相比,7d 组及 14d 组差异有显著性意义( $P<0.05$ )。

**结论:**HBO 治疗可以改善创伤性脑损伤大鼠认知功能,其机制可能与海马 CCL2/CCR2 表达下调有关。

**关键词** 高压氧;创伤性脑损伤;认知

**中图分类号:**R742, R459.7, R651 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-11-1214-06

**Effects of hyperbaric oxygen on cognitive function recovery in rats following traumatic brain injury/LIU Ying, ZHANG Shuzhen, ZHU Xiaohong, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(11): 1214—1219**

## Abstract

**Objective:** To investigate the effect of hyperbaric oxygen(HBO) on cognitive function recovery in rats following traumatic brain injury(TBI) and the expression of CCL2 and its receptor CCR2 in hippocampus.

**Method:** Seventy-five adult male SD rats were randomly divided into sham surgical group (Sham group), traumatic brain injury group (TBI group) and hyperbaric oxygen therapy group (HBOT group), each consisting of 25 animals. Traumatic brain injury model was established with Feeney's free fall in the TBI group and the HBOT group. The HBOT group received HBO therapy daily every day. The animals in sham surgical group just exposed dura mater, but without free fall impact. Cognitive function was assessed by Morris water maze. The expression of CCL2 and CCR2 in hippocampal CA1 region was detected with immunofluorescence staining method, and real-time quantitative PCR was used to evaluate changes of the levels of CCL2 and CCR2 mRNA in hippocampus.

**Result:** 7d,14d and 21d after HBO therapy, escape latency decreased and the number of times crossing the platform increased for the animals in the HBOT group. Statistical significance could be noted, when they were compared with those of the TBI group. The expression of CCL2 in hippocampal CA1 region was detected mainly in astrocytes, CCR2 mainly in the neurons. CCL2 mRNA, CCR2 mRNA levels in hippocampus signifi-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.11.002

1 南通大学附属医院,226001;2 通讯作者

作者简介:刘颖,女,硕士研究生,主治医师;收稿日期:2017-02-23

1214 www.rehabi.com.cn

cantly increased 3—21 days after traumatic brain injury, the difference was statistically significant. CCL2 mRNA levels in the HBOT group significantly decreased after 1 week, 2 weeks and 3 weeks HBO therapy compared with the TBI group, CCR2 mRNA levels in the HBOT group significantly decreased after 1 week and 2 weeks HBO therapy compared with the TBI group.

**Conclusion:** HBO therapy could promote the recovery of cognitive function in rats with traumatic brain injury, the possible mechanism might be associated with the decreases in CCL2/CCR2 levels in hippocampus.

**Author's address** Department of Pathology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, 226001

**Key word** hyperbaric oxygen; cognitive function; traumatic brain injury

重度创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 幸存者常遗留有认知、神经生理、心理、情感及行为功能等各种各样的损害,严重影响着患者的生活质量。海马是脑边缘系统中的重要结构,与学习记忆及认知功能有关。高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)疗法作为一种安全无创的辅助治疗方法已被临床广泛应用于颅脑损伤中,其疗效已受到广泛认可。本研究通过观察TBI大鼠HBO治疗后的认知功能变化情况,探讨其可能作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和分组

成年雄性 SPF 级 SD 大鼠 75 只(购于南通大学实验动物中心),体重 260—300g。将实验大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、脑外伤组(TBI 组)和脑外伤后高压氧组(HBO 组),每组 25 只,适应性喂养 7d 后进行实验。

### 1.2 脑外伤模型制作

参照 Feeney 自由落体法<sup>[1]</sup>制作 TBI 模型,大鼠经 1%戊巴比妥钠 (40mg/kg 腹腔注射) 麻醉后固定于立体定位仪(WPI 公司)上,常规剃毛、消毒、暴露前囟,于前囟后 2.8mm,矢状缝向右旁开 2.8mm 处用牙科钻轻钻一直径 4.0mm 的骨窗,重物自一定高度沿套管下落打击致伤,造成右侧中度脑损伤。假手术组用相同方法暴露出硬脑膜不予打击。

### 1.3 HBO 治疗

HBO 组大鼠于术后 6h 内进行首次 HBO 治疗,将大鼠放入制动笼内置于单人氧舱中,治疗前纯氧洗舱 10min,然后加压 15—20min,于 2 个绝对大气压 (absolute atmosphere, ATA) 稳压 60min,期间纯氧通风 10min,使舱内氧浓度 $\geq 96\%$ ,然后匀速减压 15—20min 至常压(1 个 ATA)。1 次/d, 7d 为 1 个疗

程,连续治疗 21d。

### 1.4 认知功能评估

造模后进行 Morris 水迷宫<sup>[2]</sup>(上海欣软信息科技有限公司)测试,实验前 1 天 3 组大鼠自由游泳 2 min 以适应环境。定位航行实验:大鼠从第 4 象限入水,站台置于第 1 象限中间,实验过程中保持站台位置不变,记录大鼠寻找并爬上站台所需时间,即逃避潜伏期。以 120s 为限,未爬上则记录为 120s。每日 3 次,每次间隔 5min,每次结束后在站台停留 20s。逃避潜伏期取术后 7d、14d 和 21d 的数值。空间探索实验:定位航行实验后当天撤除平台,记录大鼠从同一点入水后 120s 通过虚拟平台的次数。

### 1.5 免疫荧光双标染色方法

术后 3d 分别将 3 组大鼠予腹腔麻醉,灌注 4%多聚甲醛,然后剥离脑组织并将其放入 4%多聚甲醛中固定 24h,蔗糖梯度脱水至沉底,进行损伤侧海马区冠状位连续冰冻切片(Leica 公司,黑森州,德国),厚度为 10 $\mu$ m,切片经放入 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)浸洗 3 次,每次 10min,滴加 8%正常山羊血清室温封闭 1h;吸去血清,切片分别加入一抗 Rabbit-anti-CCL2(cc chemokine ligand 2, cc 趋化因子配体 2) (1:50) (Millipore, 美国)、Goat -anti-CCR2 (cc chemokine receptor 2, cc 趋化因子受体 2) (1:50) (Santa Cruz, 美国)、Mouse-anti-GFAP (1:5000) (Millipore, 美国)、Mouse-anti-NeuN (1:500) (Millipore, 美国)及 Mouse-anti-OX-42 (1:200) (AbD Serotec, 英国)孵育, 4 $^{\circ}$ C 12h。PBS 浸洗 3 次,每次 15min。再分别将切片加入相应的二抗 Cy3-goat anti-rabbit IgG (1:1000) (Jackson, 美国)、FITC-goat anti-mouse IgG (1:1000) (Jackson, 美国)及 Alexa Fluor 488 donkey-anti-goat IgG (1:1000) (Invitrogen, 美国)孵育 2h。PBS 浸洗 3 次,每次 15min,

荧光封片剂封片,荧光显微镜下观察,摄片。免疫荧光染色对照:用正常山羊血清(1:50)代替一抗,结果为阴性。

### 1.6 损伤侧海马CCL2和CCR2 mRNA的测定

每组分别于术后3d、7d、14d和21d随机取5只大鼠行腹腔麻醉,取损伤侧海马组织,按Trizol (Invitrogen公司,法国)说明书提取总RNA,将其逆转录为cDNA (TaKaRa公司),使用BioEasy的SYBR Green I的PCR试剂盒行定量PCR检测。

### 1.7 统计学分析

采用SPSS17.0软件进行统计学分析,数据以均值±标准差表示,组间比较选用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 Morris水迷宫测试结果

**2.1.1 定位航行实验结果:**与Sham组相比,术后7d、14d及21d TBI组和HBOT组平均潜伏期延长,差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。与TBI组相比,高压氧治疗7d、14d及21d后平均潜伏期均下降,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),见表1。

**2.1.2 空间探索实验结果:**与Sham组相比,术后7d、14d及21d TBI组和HBOT组穿越平台次数减少,差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。与TBI组相比,高压氧治疗7d、14d及21d后穿越平台次数均增加,差异均有显著性意义( $P < 0.05$ ),见表2。

### 2.2 免疫荧光双标确定TBI后海马CA1区CCL2及CCR2的表达情况

**2.2.1 海马CA1区CCL2表达情况:**分别用GFAP、OX-42及NeuN分别作为星形胶质细胞、小胶质细胞及神经元的标记物,与CCL2行免疫荧光双染。结果显示,海马区CCL2主要与GFAP共存,与OX-42及NeuN基本没有显示双标,表明CCL2主要表达在星形胶质细胞(图1)。

**2.2.2 海马CA1区CCR2表达情况:**分别用GFAP、OX-42及NeuN分别作为星形胶质细胞、小胶质细胞及神经元的标记物,与CCR2行免疫荧光双染。结果显示,海马区CCR2主要与NeuN共存,与GFAP及OX-42基本没有显示双标,表明CCR2主要表达于神经元(图2)。

### 2.3 损伤侧海马区CCL2和CCR2 mRNA表达

与Sham组相比,术后3d、7d、14d及21d TBI组和HBOT组CCL2mRNA表达均增高,差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。与TBI组相比,高压氧治疗7d、14d及21d后CCL2 mRNA明显下降,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),见表3。

与Sham组相比,术后3d、7d、14d和21d TBI组CCR2 mRNA表达均增高,术后3d、7d、14d HBOT组CCR2 mRNA表达均增高,差异均有显著性意义( $P < 0.05$ )。与TBI组相比,高压氧治疗7d、14d CCR2 mRNA明显下降,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),见表4。

表1 三组大鼠逃避潜伏期比较 ( $\bar{x} \pm s, s$ )

组别	7d	14d	21d
HBOT组	56.30±7.81 <sup>①②</sup>	26.00±3.51 <sup>①②</sup>	12.70±2.83 <sup>②</sup>
TBI组	99.50±12.71 <sup>①</sup>	40.40±5.92 <sup>①</sup>	27.40±3.81 <sup>①</sup>
Sham组	11.30±2.77	9.30±1.96	7.40±1.24

注:①与假手术组比较 $P < 0.05$ ;②与脑损伤组比较 $P < 0.05$

表2 三组大鼠120s内通过虚拟平台的次数比较 ( $\bar{x} \pm s, 次$ )

组别	7d	14d	21d
HBOT组	4.60±0.88 <sup>②</sup>	4.50±0.76 <sup>①②</sup>	5.10±0.77 <sup>①②</sup>
TBI组	2.00±0.38 <sup>①</sup>	2.61±0.81 <sup>①</sup>	2.90±0.74 <sup>①</sup>
Sham组	6.30±0.54	6.50±0.80	7.00±0.82

注:①与假手术组比较 $P < 0.05$ ;②与脑损伤组比较 $P < 0.05$

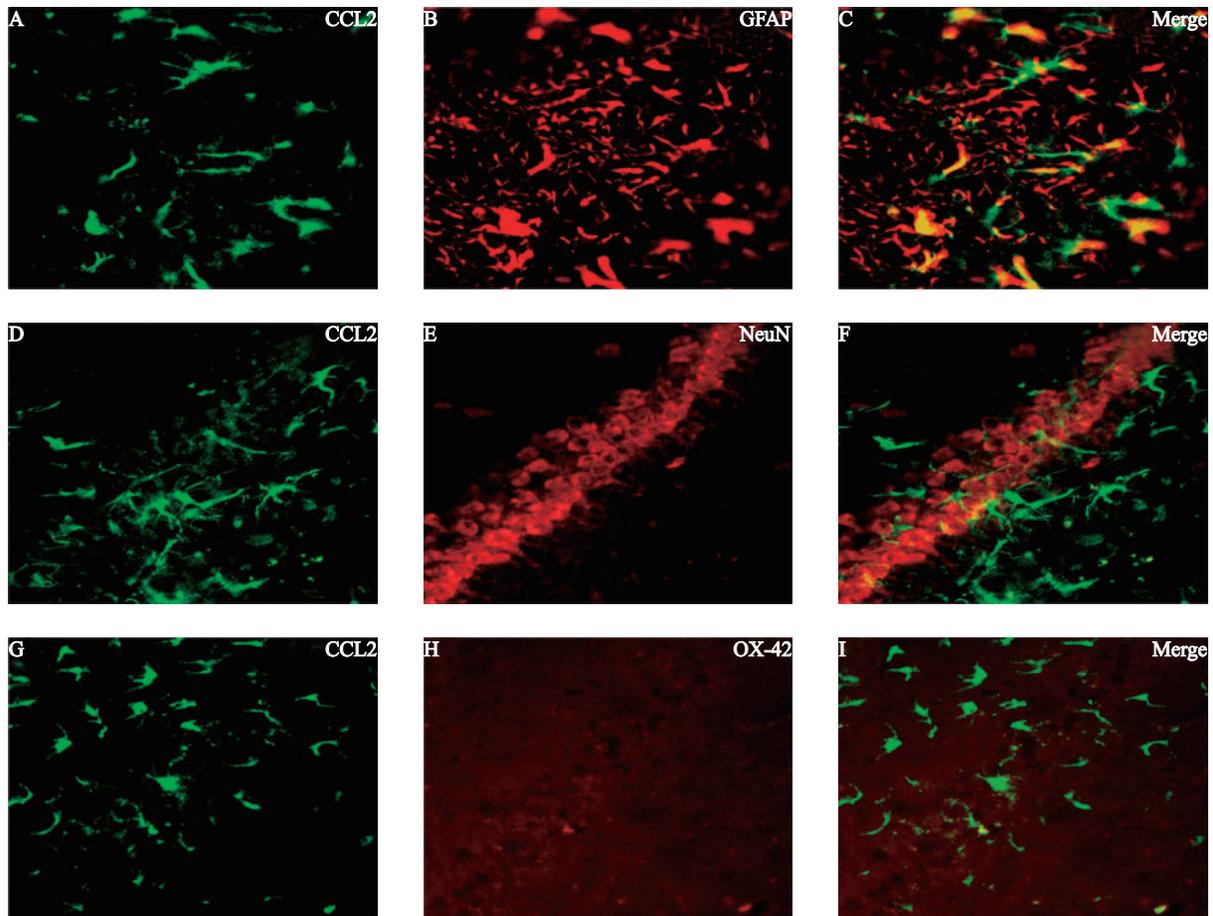
## 3 讨论

TBI是外科常见的急症之一,特别是重症TBI,死亡率很高。TBI可以分为原发性和继发性脑损伤。原发性损伤是由于机械撞击作用引起的血肿或其他弥漫性损伤。在原发性损伤的基础上诱发一系列病理级联反应,包括脑组织缺血缺氧、水肿、局部炎症反应、兴奋性氨基酸释放等,进而导致细胞损伤、凋亡、死亡,患者昏迷、残疾等,即继发性损伤<sup>[3]</sup>。继发性脑损伤是治疗及科研重点内容<sup>[4]</sup>。

海马是调控人类学习、记忆和情感等认知功能的重要脑区。研究显示<sup>[5-6]</sup>,海马可接收加工大脑皮质和皮质下中枢神经元传递的感知信息,形成短时记忆,然后短时记忆信号转存至大脑皮质或皮质下中枢神经元,形成长时记忆,在空间、航行定位功能中起重要作用。HBO疗法安全无创,临床用于治疗TBI后引起的继发性损伤,研究显示<sup>[7]</sup>HBO最佳治

图1 CCL2主要表达在星形胶质细胞

(免疫荧光双染,×200)



CCR2 阳性细胞(图 A,D,G,绿色),GFAP 阳性细胞(图 B,红色),NeuN 阳性细胞(图 E,红色),OX-42 阳性细胞(图 H 红色)。图 C、F 及 I 分别为 CCR2 和 GFAP、CCR2 和 NeuN、CCR2 和 OX-42 的叠加图。

表3 三组大鼠海马 CCL2 mRNA 表达水平比较

( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	3d	7d	14d	21d
HBOT 组	159.67±29.40 <sup>①</sup>	261.85±29.04 <sup>①②</sup>	186.14±15.88 <sup>①②</sup>	111.53±21.32 <sup>①②</sup>
TBI 组	234.44±36.39 <sup>①</sup>	392.93±48.05 <sup>①</sup>	396.24±35.98 <sup>①</sup>	232.04±34.94 <sup>①</sup>
Sham 组	1.30±0.55	1.34±0.51	1.29±0.49	1.33±0.53

注:①与假手术组比较  $P<0.05$ ;②与脑损伤组比较  $P<0.05$

表4 三组大鼠海马 CCR2 mRNA 表达水平比较

( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	3d	7d	14d	21d
HBOT 组	5.15±0.94 <sup>①</sup>	4.52±1.07 <sup>①②</sup>	4.62±0.67 <sup>①②</sup>	2.83±0.45
TBI 组	4.86±0.70 <sup>①</sup>	6.79±1.04 <sup>①</sup>	7.64±1.17 <sup>①</sup>	2.95±0.72 <sup>①</sup>
Sham 组	1.18±0.22	1.17±0.21	1.19±0.32	1.18±0.25

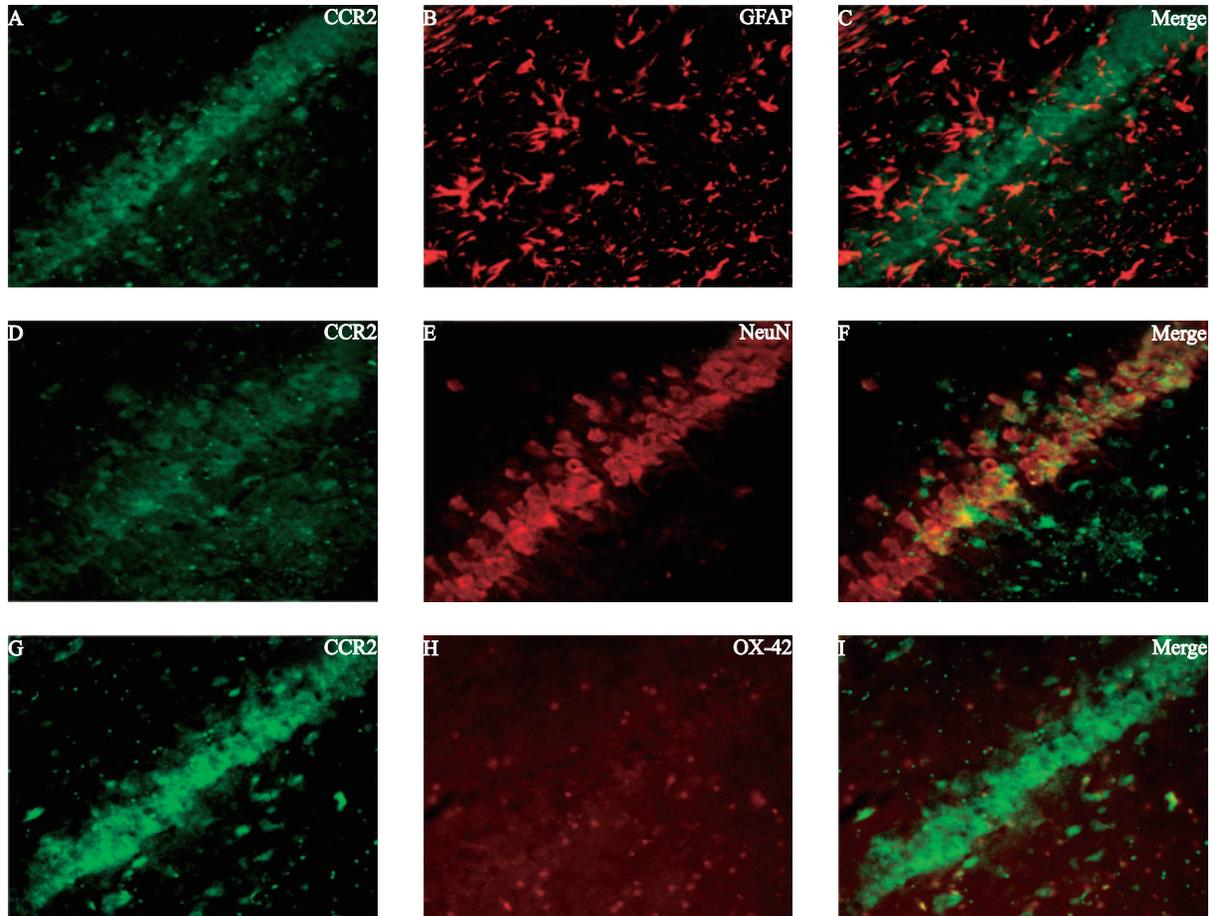
注:①与假手术组比较  $P<0.05$ ;②与脑损伤组比较  $P<0.05$

疗时间为 TBI 后 6h 内,且连续多次治疗明显减轻脑损伤,其对 TBI 后神经功能恢复有显著疗效。本实验于脑损伤后 6h 行 HBO 首次治疗时间,并且连续治疗 21d。

本研究运用水迷宫实验评定大鼠的认知功能,结果显示大鼠脑外伤后认知功能明显下降。但经 HBO 治疗 7—21d 后,大鼠认知功能明显改善,说明 HBO 疗法能帮助脑外伤后认知功能的恢复。与以

图2 CCL2 的主要作用受体 CCR2表达在神经元

(免疫荧光双染,×200)



CCL2 阳性细胞(图 A,D,G,绿色),GFAP 阳性细胞(图 B,红色),NeuN 阳性细胞(图 E,红色),OX-42 阳性细胞(图 H,红色)。图 C、F 及 I 分别为 CCL2 和 GFAP、CCL2 和 NeuN 及 CCL2 和 OX-42 的叠加图。

往研究结果一致<sup>[8]</sup>。但关于 HBO 治疗 TBI 的机制目前尚不完全清楚,可能与以下几点有关<sup>[9-11]</sup>:提高血氧含量,提高大脑氧代谢率;抑制神经细胞和神经元的凋亡;抑制自由基的生成,减少促炎细胞因子生成,促进抗炎细胞因子产生等等,从而减轻 TBI 引起的继发性损伤。目前文献报道 HBO 治疗后表达下调的促炎细胞因子有白介素 6、TNF- $\alpha$ 、MMP9、巨噬细胞炎症蛋白 2、趋化因子 CXCL2 等<sup>[12-13]</sup>。

趋化因子 CCL2(chemokine C-C motif ligand 2,又称单核细胞趋化蛋白 1,MCP-1)在炎症反应中发挥重要作用。CCR2 是 CC 型趋化因子的代表受体。CCL2 通过与其受体 CCR2 结合发挥作用,参与炎症的反应,血管的生成、损伤后修复等过程<sup>[14]</sup>。我们前期研究发现<sup>[15]</sup>,大鼠 TBI 后损伤区皮质 CCL2 表

达情况,显示其表达峰值高且持续时间长。还发现了 TBI 大鼠皮质区 CCL2 主要表达于星形胶质细胞,CCR2 主要表达于神经元,应用 CCR2 拮抗剂后 TBI 大鼠皮质区凋亡细胞减少,学习记忆能力改善,提示可能 CCL2-CCR2 介导了活化的星形胶质细胞和神经元的相互作用,加重了继发性损伤<sup>[15]</sup>。本次实验进一步发现 TBI 后大鼠海马区 CCL2 mRNA 和 CCR2 mRNA 表达显著增高,经 HBO 治疗后海马区 CCL2 mRNA 和 CCR2 mRNA 表达均下降。同时实验表明脑损伤后海马区 CCL2 和 CCR2 也分别表达于星形胶质细胞和神经元,结合前期实验结果提示 HBO 治疗可以下调损伤侧海马区 CCL2 和 CCR2 mRNA 的表达,抑制了活化的星形胶质细胞和神经元之间的相互作用。

综上所述,脑外伤后认知功能受损,而HBO治疗可以促进脑损伤大鼠认知功能的恢复,其机制可能与抑制损伤海马区CCL2-CCR2通路有关。但CCL2-CCR2在HBO治疗抑制神经炎症通过哪些途径激发而发挥作用目前尚未见报道,有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat[J]. Brain Res,1981, 211(1):67—77.
- [2] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. J Neurosci Methods, 1984, 11(1):47—60.
- [3] Liu S, Shen GY, Deng SK, et al. Hyperbaric oxygen therapy improves cognitive functioning after brain injury[J]. Neural Regen Res. 2013,8(35):3334—3343.
- [4] Jiang JD, Bu XY, Liu M, et al. Transplantation of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for traumatic brain injury[J]. Neural Regen Res, 2012, 7(1):46—53.
- [5] 曾玉娥,吴晓牧,杨海玉. 乙醇诱导海马损伤与学习记忆功能障碍分子机制关系的研究进展[J]. 南昌大学学报(医学版), 2013, 53(8):77—80.
- [6] Stella F,Cerasti E,Si B,et al.Self-organization of multiple spatial and context memories in the hippocampus[J].Neurosci Biobehav Rev,2012, 36(7):1609—1625.
- [7] Wang GH, Zhang XG, Jiang ZL, et al. Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen treatment on traumatic brain injury in the rat[J]. J Neurotrauma,2010, 27 (9):1733—1743.
- [8] Gossett WA, Rockswold GL, Rockswold SB, et al. The safe treatment, monitoring and management of severe traumatic brain injury patients in a monoplace chamber[J]. Undersea Hyperb Med,2010, 37(1):35—48.
- [9] Fu M, Zhao H, Zhang LD, et al. Effects of hyperbaric oxygen therapy on the brain trauma injury in rabbits with magnetic resonance imaging[J]. Chin Naut Med and Hyperbar Med,2011, 18(2):82—85.
- [10] Thorn SR. Hyperbaric oxygen:its mechanisms and efficacy [J]. Plast Reeonstr Surg,2011, 127(1):131—141.
- [11] Zhong XG, Wang GH, Li YC, et al. The influences of hyperbaric oxygen on the oxidative stress variables and pro-/anti-inflammatory cgtokines in rats after traumatic brain injury[J]. Chin J Appl Physiol,2010,26(3):373—375.
- [12] Chen X, Duan XS, Xu LJ, et al. Interleukin-10 mediates the neuroprotection of hyperbaric oxygen therapy against traumatic brain injury in mice[J]. Neuroscience, 2014, 266: 235—243.
- [13] Lim SW, Wang CC, Wang YH, et al. Microglial activation induced by traumatic brain injury is suppressed by post injury treatment with hyperbaric oxygen therapy[J]. J Surg Res, 2013, 184(2):1076—1084.
- [14] 罗宇家,李如波,马诗雨,等. CCR2 和 CCL2 与缺氧缺血性脑损伤的相关性研究进展[J]. 法医学杂志,2016, 32(1):54—57.
- [15] Liu S, Zhang L, Wu Q, et al. Chemokine CCL2 induces apoptosis in cortex following traumatic brain injury[J]. J Mol Neurosci, 2013, 51(3):1021—1029.

## 本刊影响因子居国内同类期刊之首

据《2017年版中国科技期刊引证报告(核心版)》,2017年本刊的影响因子和总被引频次等主要期刊评价指标再创新高。影响因子为1.034,总被引频次为2860,综合评价总分为88.6。影响因子、总被引频次、综合评价总分均居国内同类期刊之首,其中综合评价总分在中国科技核心期刊数据库收录的2008种期刊中排名居第22位。

感谢所有读者和作者对本刊的关注!感谢为本刊付出辛勤劳动的审稿专家团队和把握本刊导向的本刊主编团队!

《中国康复医学杂志》编辑部

