

· 基础研究 ·

高压氧对脑缺血再灌注小鼠脑源性神经营养因子及神经细胞结构的影响

彭慧平 卢晓欣 汤永建 房卫红

【摘要】目的 探讨高压氧对脑缺血再灌注小鼠脑源性神经营养因子(BDNF)及神经细胞结构的影响。**方法** 昆明小鼠 27 只,随机分为高压氧组、对照组、假手术组,每组 9 只。采用无创微动脉夹阻断双侧颈总动脉血流 30 min 后松开动脉夹恢复血流的方法,建立脑缺血再灌注模型。高压氧组在模型完成当天开始高压氧处理,每日 1 次,共 10 次;对照组及假手术组不做高压氧处理。在高压氧处理完成后次日,将高压氧组及其他 2 组小鼠断头处死,取脑后分离额叶皮层和海马,进行 HE 染色,采用免疫组化技术观察神经细胞结构及 BDNF 表达情况。**结果** 普通光镜显示 3 组小鼠额叶皮层及海马有不同程度的神经细胞变性、坏死;高压氧组与对照组异常细胞数比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);同组小鼠的皮质和海马比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。免疫组织化学检测显示,3 组小鼠的皮质与海马均可见 BDNF 染色阳性细胞,高压氧组阳性细胞较多,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);另外,高压氧组和对照组 BDNF 阳性细胞均比假手术组增多,差异有统计学意义($P < 0.05$);同组小鼠的皮质和海马 BDNF 阳性细胞比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 高压氧可减轻脑缺血再灌注损伤,增强 BDNF 在脑神经细胞中的表达;两者的联系及作用机制有待进一步研究。

【关键词】 脑源性神经营养因子; 神经细胞; 高压氧; 缺血再灌注

Effects of hyperbaric oxygen on brain derived neurotrophic factor and the structure of neurons after the cerebral ischemia-reperfusion in mice PENG Hui-ping, LU Xiao-xin, TANG Yong-jian, FANG Wei-hong. Department of Hyperbaric Oxygen, Fuzhou General Hospital, Fuzhou 350025, China

【Abstract】Objective To explore the effects of hyperbaric oxygen(HBO) on brain derived neurotrophic factor(BDNF) and the changes of neuron structure after cerebral ischemia-reperfusion(CIR) in mice. **Methods** Twenty-seven mice were randomly and evenly divided into three groups: a HBO group, a control group and a sham-operation group(SO group). CIR models were established by clamping both carotid arteries in mice for 30 min, and then, untying clamps. 0.20 MPa HBO was applied once a day for 10 days after establishment of models in HBO group, but not in the control and SO groups. Following sacrifice after treatment and acquirement of cortex and hippocampal tissues, HE stain and immunohistochemistry technique were used to observe the changes of neuron structure and expression of BDNF. **Results** The neural degeneration and necrosis in cortex and hippocampus issues were observed under light microscope after CIR, and the amount of abnormal cells in the control group was more than that in HBO group($P < 0.05$). It is shown by the results of immunohistochemistry that the expression of BDNF in cortex and hippocampus tissues was observed in 3 groups, and compared with that in the SO group, the amount of positive cells in the HBO and control groups was increased obviously($P < 0.05$), so was that in the HBO group with comparison with that in the control group($P < 0.05$). **Conclusion** HBO could alleviate brain injury after CIR and improve the expression of BDNF significantly. The relationship between HBO and BDNF and its mechanism should be further studied.

【Key words】 Brain derived neurotrophic factor; Neuron; Hyperbaric oxygen; Cerebral ischemia-reperfusion

脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)参与体内多种病理生理过程,调节细胞生长分化,在神经损伤修复中起重要作用。BDNF 与中枢神经系统疾病关系密切,它对神经系统的损伤有

较好的保护作用。但它的作用机制及其在高压氧作用下的变化情况还不太清楚。本实验复制了小鼠全脑性缺血再灌注模型,观察高压氧对缺血再灌注损伤脑组织的病理形态及 BDNF 表达的影响。

材料与方法

一、实验动物及分组

基金项目:南京军区福州总医院科研基金(No. 20015012)

作者单位:350025 福州,南京军区福州总医院高压氧科

实验动物采用成年健康昆明小鼠 27 只, 体重 (24 ± 2) g, 来源于福州总医院动物实验科, 将小鼠按抽签法随机分成 3 组: 高压氧组、对照组、假手术组, 每组各 9 只。

二、试剂

小鼠用 BDNF 免疫试剂盒 (包括一抗和二抗) 由武汉博士德生物有限公司提供。

三、实验方法和标本采集

1. 模型制作: 参照岑德意等^[1]的方法进行改进, 建立脑缺血再灌注模型。具体方法如下: 高压氧组与对照组小鼠经 0.5% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg 体重) 腹腔注射麻醉后, 仰位固定, 行颈部正中切口, 分离双侧颈总动脉, 高压氧组和对照组用无创微动脉夹夹闭血管, 30 min 后撤夹恢复血流。假手术组亦分离双侧颈总动脉, 但不阻断血流。

2. 高压氧处理: 高压氧组在模型完成当天开始高压氧处理, 对照组及假手术组不做高压氧处理。高压氧处理采用九江产的大型空气加压舱, 将小鼠置于木盒放入舱内, 木盒容积为 $40 \text{ cm} \times 40 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$, 其两侧各有一个直径 2.0 cm 的圆孔, 一孔 (箱下方) 为进气孔与输氧管连接, 另一孔 (箱上方) 为出气孔与排气管相接。经检测, 木盒给氧 5 min 后排气孔处氧浓度为 99.0%, 符合本实验要求。高压氧处理时按 6 L/min 速率通入医用纯氧 (氧纯度为 99.5%), 高压氧舱内温度控制在 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。以计算机程序自动操作, 设定升压速率为 4 kPa/min , 压力升至 100 kPa (表压) 时稳压 35 min, 然后以 4 kPa/min 速率减压出舱, 整个过程持续吸氧, 总时间为 80 min, 每日 1 次, 共 10 次。

3. 标本采集及观察: 高压氧处理完成次日, 3 组小鼠均予断头处死, 取脑后分离额叶皮层和海马进行 HE 染色、常规光镜观察及 BDNF 免疫组化分析。显微镜下随机取 5 个视野计数异常神经细胞和 BDNF 阳性表达细胞数, 取其平均值得出每个高倍镜视野下异常细胞的个数。

四、统计学分析

实验数据用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 t 检验进行统计学分析。

结 果

一、HE 染色后常规光镜观察结果

神经细胞表现为水肿、退变, 出现噬神经现象, 海马区轻度缺血改变, 胶质细胞增生, 并可见颗粒细胞呈空泡样变性, 锥体细胞大量缺失、变性、坏死 (图 1, 2)。高压氧组和对照组比较, 细胞损害明显轻微, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 同组小鼠皮质和海马比较差异

无统计学意义 ($P > 0.05$), 详见表 1。

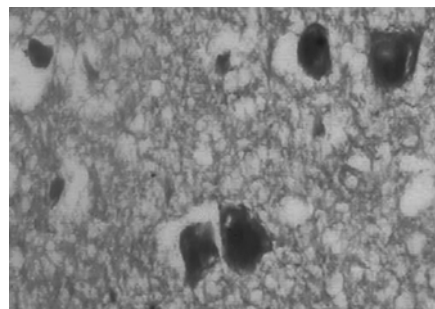


图 1 小鼠缺血再灌注损伤后的神经细胞 (HE 染色, $\times 200$)

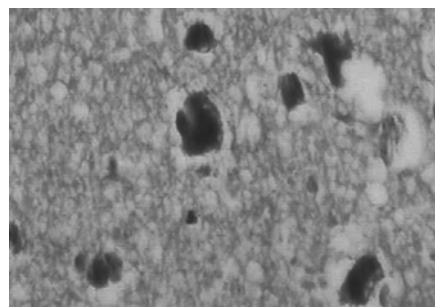


图 2 小鼠缺血再灌注损伤后胶质细胞 (HE 染色, $\times 200$)

表 1 3 组小鼠异常神经细胞数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	皮质	海马
高压氧组	9	$2.41 \pm 0.50^{* \#}$	$2.90 \pm 0.61^{* \#}$
对照组	9	$10.10 \pm 3.90^{\#}$	$12.01 \pm 4.12^{\#}$
假手术组	9	0.91 ± 0.15	0.81 ± 0.21

注: 与对照组比较, $^{*} P < 0.05$; 与假手术组比较, $^{\#} P < 0.05$

二、BDNF 的免疫组化分析

BDNF 表达于细胞浆上, 阳性染色为棕黄色 (图 3, 4)。高压氧组、对照组、假手术组小鼠的皮质和海马均可见 BDNF 染色阳性细胞; 高压氧组、对照组更为明显, 与假手术组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而高压氧组阳性细胞又较对照组为多, 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 同组小鼠的皮质和海马 BDNF 阳性细胞比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 详见表 2。

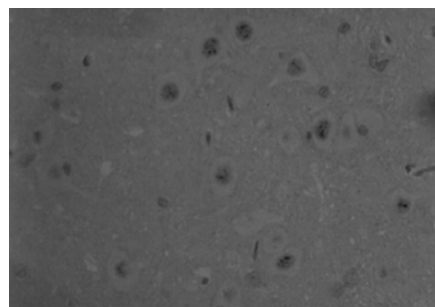


图 3 高压氧组小鼠脑缺血再灌注 BDNF 免疫组化表达 (BDNF 免疫组化染色, $\times 200$)

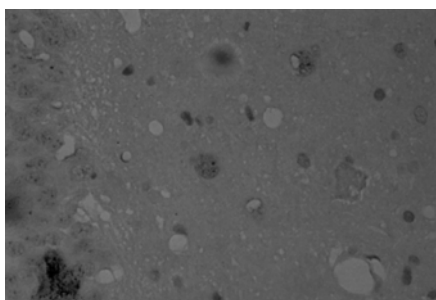


图 4 对照组小鼠脑缺血再灌注 BDNF 免疫组化表达 (BDNF 免疫组化染色, $\times 200$)

表 2 3 组小鼠 BDNF 阳性表达细胞数 (个/视野, $\bar{x} \pm s$)

组 别	n	皮质	海马
高压氧组	9	$5.12 \pm 2.84^{* \#}$	$6.02 \pm 3.05^{* \#}$
对照组	9	$2.01 \pm 0.56^{\#}$	$2.22 \pm 0.65^{\#}$
假手术组	9	0.97 ± 0.40	1.06 ± 0.41

注:与对照组比较, $^{*} P < 0.05$;与假手术组比较, $^{\#} P < 0.05$

讨 论

脑缺血再灌注损伤是一些疾病中会出现的共同病理生理过程,如在脑外伤、脑梗死中。脑组织受损后出现脑水肿,颅内压增高,脑有效血流量减少,导致脑缺血缺氧,从而造成脑组织的进一步损害,并随之形成缺血再灌注损伤。高压氧能够增加脑组织的供氧,从而打断这一恶性循环通路。近几年来高压氧在脑外伤、脑梗死治疗中得到较广泛应用,取得了良好效果。王国忠等^[2,3]的研究表明,早期高压氧治疗可有效抑制鼠脑缺血再灌注后血小板膜糖蛋白及海马诱导型一氧化氮合酶信使核糖核酸的表达,从而有助于减轻脑缺血再灌注损伤。另有研究证实:高压氧在减轻皮层和海马神经细胞凋亡,特别是减轻脑水肿方面有突出的效果,使损伤动物的脑水肿大大减轻,通过运用高压氧辅助治疗,可提高对脑损伤综合治疗的效果^[4]。本研究显示,脑缺血再灌注后神经细胞出现明显损害,而高压氧组小鼠神经细胞损害与对照组比较差异有统计学意义,表明高压氧对脑缺血再灌注的神经细胞具有保护作用,并可促进神经细胞的功能恢复和自我修复。假手术组也出现一定数量的异常细胞,其可能的原因是:神经细胞对缺血缺氧和各种刺激非常敏感,实验操作的各个步骤可能对其产生了影响。

BDNF 是神经系统最主要的神经营养因子之一,具有强效维持神经细胞存活和正常功能、促进损伤细胞修复的效果;同时,它还具有清除氧自由基的作用,使脂质过氧化反应减弱,并且在一定程度上改善脑组织的能量代谢状况,有利于脑损伤的恢复^[4]。20 世纪 90 年代以来,BDNF 在神经损伤中的作用得

到广泛的研究。BDNF 高度集中分布于中枢神经系统内,具有很强的刺激作用,能促进神经细胞生长分化,可维持神经细胞的存活和正常功能^[5,6];BDNF 在创伤性鼠脑损伤中的表达水平的上升具有重要临床意义,表明 BDNF 是神经元抵御创伤的保护因子之一^[7]。我们的研究结果显示,脑缺血再灌注后,BDNF 表达增加,而高压氧处理组的 BDNF 值明显高于对照组,表明 BDNF 参与了小鼠脑缺血再灌注损伤后的神经修复。

本研究结果中,小鼠脑皮层和海马的异常神经细胞数和 BDNF 阳性表达两个方面均显示出海马比皮层损害稍重,但是两者比较差异没有统计学意义。全脑缺血再灌注的损害对于脑组织而言是全面的系统损害,因此,临床工作中对于脑外伤等可能形成缺血再灌注损伤的疾病要及早防治,在条件许可的情况下,应尽早开始高压氧治疗。对于高压氧作用于脑缺血再灌注损伤的作用机制及其和 BDNF 之间的相互关系有待更深入的研究。

致谢:本研究得到南京军区福州总医院病理科宋屿娜教授的指导,特此致谢!

参 考 文 献

- 1 岑德意,周兰兰,明亮,等. 清醒小鼠反复脑缺血再灌注法致学习记忆障碍模型的建立. 中国药理学通报, 2000, 16: 220-223.
- 2 王国忠,吕艳,高春锦,等. 高压氧对脑缺血再灌注小鼠血小板膜糖蛋白 CD31、CD61 和 CD62p 的影响. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2003, 10: 80-83.
- 3 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. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26: 193-195.
- 4 卢晓欣,洪新如,汤永建. 高压氧、脑源性神经营养因子联合治疗新生大鼠缺氧缺血性脑损伤. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2003, 10: 169-172.
- 5 Mitchell JJ, Paiva M, Walker DW, et al. BDNF and NGF afford in vitro neuroprotection against ethanol combined with acute ischemia and chronic hypoglycemia. Dev Neurosci, 1999, 21: 68-75.
- 6 Kinoshita Y, Ueyama T, Senba E, et al. Expression of c-fos, heat shock protein 70, neurotrophins, and cyclooxygenase-2 mRNA in response to focal cerebral ischemia reperfusion in rats and their modification by magnesium sulfate. J Neurotrauma, 2001, 18: 435-445.
- 7 贾丛林,田碧野,迟凤令. 脑源性神经营养因子在创伤后鼠脑中的表达. 齐齐哈尔医学院学报, 2001, 22: 726-727.

(修回日期:2005-02-03)

(本文编辑:阮仕衡)