

· 基础研究 ·

高压氧对脑缺血再灌注大鼠核因子- κ B 及细胞间粘附分子-1 表达的影响

徐江 黄晓琳

【摘要】 目的 观察高压氧 (HBO) 对脑缺血再灌注大鼠核因子 (NF- κ B) 及细胞间粘附分子-1 (ICAM-1) 表达的影响。**方法** 采用改良栓线法阻断大脑中动脉建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。将 72 只大鼠随机分为脑缺血再灌注组 (CIR 组)、脑缺血再灌注加高压氧治疗组 (HBO 组) 和假手术对照组 (SO 组), 分别观察各组大鼠脑梗死灶的大小, 并用免疫组织化学染色检测再灌注 24 h、48 h、72 h、120 h 时相点大鼠脑组织 NF- κ B 和 ICAM-1 表达的变化。**结果** HBO 组大鼠氯化三苯四氮唑 (TTC) 染色后梗死体积小于 CIR 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。再灌注各时相点 CIR 组和 HBO 组的 NF- κ B 及 ICAM-1 表达均显著高于 SO 组 ($P < 0.01$); HBO 组大鼠再灌注各时相点 NF- κ B 及 ICAM-1 表达均显著低于 CIR 组 ($P < 0.05$)。**结论** 脑缺血再灌注后 NF- κ B 和 ICAM-1 明显上调, HBO 治疗可以减轻大鼠脑缺血再灌注损伤的程度, 其机制可能与抑制 NF- κ B 活化, 减少 ICAM-1 的表达, 进而降低缺血灶炎症反应的程度有关。

【关键词】 脑缺血; 高压氧; 核因子- κ B; 细胞间粘附分子-1; 大鼠

Effects of hyperbaric oxygen on the expression of NF- κ B and ICAM-1 after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats XU Jiang, HUANG Xiao-lin. Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To observe the effects of hyperbaric oxygen (HBO) on the expression of NF- κ B and ICAM-1 after cerebral ischemia-reperfusion in rats. **Methods** The middle cerebral artery occlusion-reperfusion (MCAOR) model was established by using Zea-Longa's method in rats. Seventy-two rats were recruited in this study and randomly divided into 3 groups: a cerebral ischemia-reperfusion group (CIR group), a CIR + HBO group (HBO group), and a sham-operation group (SO group). The infarct volume of each group was measured by TTC staining technique, and the expression of NF- κ B and ICAM-1 was measured at 24 h, 48 h, 72 h and 120 h, respectively, after reperfusion by using immunohistochemistry staining. **Results** The infarct volume in HBO group was significantly smaller than that in CIR group ($P < 0.05$). Compared with that in the SO group, the expression of NF- κ B and ICAM-1 in CIR group was significantly higher ($P < 0.01$) and the expression of NF- κ B and ICAM-1 in HBO group was significantly lower than that in the CIR group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of NF- κ B and ICAM-1 remarkably increases after reperfusion, and HBO could inhibit markedly the expression of NF- κ B and ICAM-1. HBO treatment can effectively relieve the CIR injury. This mechanism might be relative with inhibiting the activation of NF- κ B and decreasing the expression of ICAM-1.

【Key words】 Cerebral ischemia; Hyperbaric oxygen; NF- κ B; ICAM-1; Rat

脑缺血再灌注损伤与很多因素有关。近年大量研究表明^[1], 脑缺血再灌注后脑组织局部过度的炎症反应促进了继发性脑损害, 是造成再灌注损伤的主要原因之一。核因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 作为一种核转录因子, 在激活后可高效诱导多种致炎因子的表达, 细胞间粘附分子 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 是其中重要的一种, 其表达上调及其诱导的内皮细胞与白细胞的相互作用导致白细胞在血管内聚集、粘附、游出, 是炎症反应的关键性因素。

高压氧 (hyperbaric oxygen, HBO) 用于治疗脑缺血再灌注疾病已有报道^[2], 但对 HBO 治疗缺血性脑血管病的作用机理尚存在不少争议。本实验旨在观察 HBO 对大鼠局灶性脑缺血再灌注后脑组织内 NF- κ B 和 ICAM-1 表达的影响, 并探讨有关的作用机制, 以期为临床应用提供实验依据。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物: 健康雄性 SD 大鼠 72 只, 体重 200 ~ 250 g, 由同济医学院实验动物中心提供。自然光照和饲养, 实验前禁食 12 h, 不禁水。

2. 主要试剂和仪器: 主要试剂包括水合氯醛 (上

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科

通讯作者: 黄晓琳

海试剂二厂),氯化三苯四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium, TTC, 上海化学试剂公司),小鼠 NF- κ B 单抗和 ICAM-1 单抗(美国 Santa Cruz 公司),SP 试剂盒(北京中山生物技术有限公司),其他试剂均为市售分析纯产品。仪器包括图像分析系统(HPIAS-1000 高清晰度彩色图文分析系统,同济医学院),高压氧实验动物舱(烟台宏远氧业有限公司产)。

二、实验方法

1. 实验动物分组:采取随机分组的方法将 72 只大鼠分为 3 组,即假手术对照组(SO 组)12 只,脑缺血再灌注组(CIR 组)30 只,脑缺血再灌注加高压氧治疗组(HBO 组)30 只。每组各有 6 只大鼠用于 TTC 染色,其余用于免疫组化染色。CIR 组和 HBO 组又按再灌注 24 h、48 h、72 h、120 h 时相点分为 4 个亚组,每个亚组 6 只,HBO 组的 4 个亚组分别行 1 次、2 次、3 次、5 次 HBO 治疗。

2. 动物模型制备及处理:用 10% 水合氯醛(300 mg/kg 体重,腹腔注射)麻醉后,参照 Longa 等^[3]的方法略加改进制作大鼠脑缺血再灌注模型,即分离、结扎并切断左侧颈外动脉,由颈总和颈内动脉缓慢插入直径为 0.185 mm 的单尼龙栓线,进线深度距颈总动脉分叉处(1.8 ± 0.1) cm,阻塞大脑中动脉入口造成缺血,于缺血 1 h 后轻轻拔除栓线进行再灌注。SO 组手术操作过程同上,但插线深度为 1.0 cm,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。手术前、后大鼠肛温维持在(37 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$,术后予以 4 万 U 青霉素预防感染。

3. 高压氧治疗:大鼠在术后 3 h 后进舱,先用纯氧充分洗舱 10 min,使舱内氧浓度 $> 95\%$,按 0.012 5 MPa/min 速率加至 0.25 MPa,在高压状态下停留 60 min,其间用纯氧通风 10 min。停留毕,25 min 匀速减压到常压。SO 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。实验过程中通过观察窗仔细观察大鼠在舱内的行为状态。HBO 组的 4 个亚组每天进行 1 次高压氧治疗,直到其实验时间结束断头处死为止。

4. 行为学观察:在手术结束大鼠麻醉苏醒后,观察行为及肢体瘫痪情况。神经病学评分参考 Longa 等^[3]所拟的 5 分制评分标准,即 0 分——无神经损伤症状,1 分——不能完全伸展对侧前爪,2 分——向外侧转圈,3 分——向对侧倾倒,4 分——不能自发行走,意识丧失。

5. 标本制备:将 54 只各组对应时间点大鼠麻醉后用 37 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水 200 ml 快速左心室灌注冲洗,再

用 4% 多聚甲醛(pH7.4、0.01 mol/L PBS 配制)400 ml 灌注固定,恒定灌注(输液瓶高出心脏 1 m)时间 30 min。灌注完毕立即断头取脑,4% 多聚甲醛溶液中固定 2~3 h,然后浸泡在 30% 蔗糖溶液中过夜,制作冰冻切片。

6. 测定脑梗死体积:SO 组、CIR 组和 HBO 组各 6 只大鼠于术后 120 h 用 10% 水合氯醛深麻醉后处死,迅速取脑,冰冻 10 min,去除嗅球和脑干,切成 2 mm 厚的冠状切片,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 2% TTC 溶液中孵育 30 min 后,再以新鲜配制的 4% 甲醛固定。24 h 后拍照并输入计算机,用图像处理软件计算梗死面积(粉红色区为正常脑组织,白色区为梗死区),各脑片梗死面积之和乘以厚度(2 mm)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(观察者不知道实验分组)。

7. NF- κ B 及 ICAM-1 组化染色及测定方法:标本置于恒冷切片机上通过尾状核的切面行连续冠状冰冻切片(厚 10 μm)。切片固定后 NF- κ B 及 ICAM-1 单克隆抗体分别于室温下孵育过夜。SP 试剂盒按说明书进行操作,DAB 显色系统闭光显色。阴性对照实验用 PBS 代替一抗,其余步骤相同。常规脱水、透明、封片。NF- κ B 阳性染色为胞浆或胞核棕色颗粒,用计算机图像分析处理系统 HPIAS-1000 检测积分光密度。ICAM-1 结果用半定量分析,每张切片在缺血侧随机选取 6 个相互非重叠高倍镜视野进行观察,计数染成深棕色的阳性血管数目,计算平均值。

三、统计学分析

实验结果以($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 10.0 统计软件进行统计,组间差异的显著性用方差分析进行检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠神经功能评分的比较

由图 1 可见,SO 组动物无明显神经功能缺损(评分为 0 分),CIR 组及 HBO 组动物均有不同程度的神经功能缺损,且 HBO 组的各亚组神经功能评分显著低于 CIR 组。

二、各组大鼠梗死灶体积的比较

从图 2 可见,经 TTC 染色后,CIR 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(middle cerebral artery, MCA)支配的脑区一致,说明模型成功。由表 1 可见 HBO 组的梗死体积为(17.9 ± 3.7)%,明显小于 CIR 组的(29.8 ± 8.9)%,差异有统计学意义($P < 0.05$),SO 组未见梗死灶。

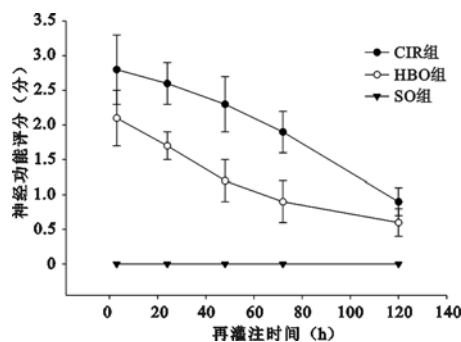
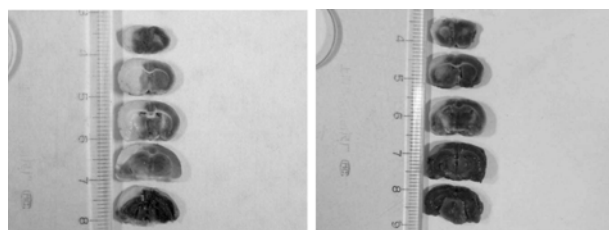


图1 HBO对脑缺血再灌注大鼠行为学的影响

注: CIR组与 HBO组大鼠行为学评分随缺血再灌注术后时间的增加而逐渐下降,但在各对应时间点, HBO组的各亚组评分明显低于 CIR组, $P < 0.05$



CIR组 HBO组
图2 CIR组和 HBO组大鼠脑片 TTC 染色照片

注: 白色组织为梗死灶, 暗红色部分为正常组织

表1 各组脑缺血再灌注大鼠梗死体积比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	梗死体积
SO组	6	0
CIR组	6	29.8 ± 8.9
HBO组	6	$17.9 \pm 3.7^*$

注: 与 CIR组比较, $^* P < 0.05$

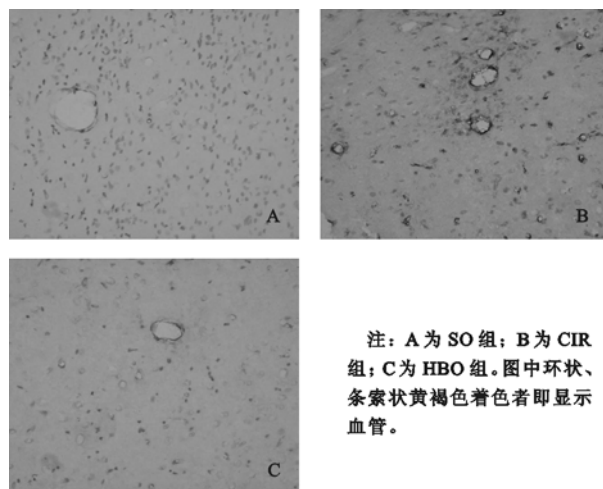
三、各组大鼠 ICAM-1 的表达

在脑组织切片中, ICAM-1 免疫阳性染色见于梗死灶周围脑组织内微血管和毛细血管的内皮细胞胞浆内, 表现为血管壁棕黄色深染。SO 组在双侧大脑半球均未见有明显的 ICAM-1 阳性染色血管; CIR 组和 HBO 组不同时间点脑组织均有不同程度 ICAM-1 阳性反应血管(图 3)。从表 2 可见再灌注 24 h、48 h、72 h、120 h 时 ICAM-1 表达明显增强, 再灌注 48 h 时最显著, 与 SO 组相比, 差异有统计学意义(均 $P < 0.01$); HBO 组再灌注 24 h、48 h、72 h、120 h ICAM-1 的表达均较 CIR 组对应时间点低(均 $P < 0.01$)。

四、各组大鼠 NF- κ B 表达的比较

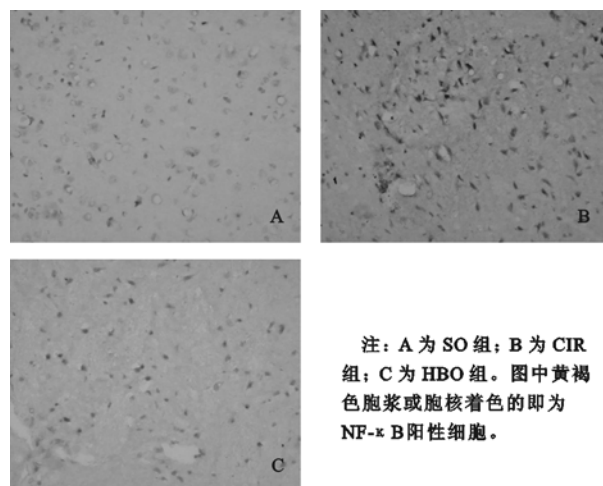
SO 组在双侧大脑半球均未见有明显的 NF- κ B 阳性细胞; CIR 组和 HBO 组不同时间点脑组织均有不同程度 NF- κ B 阳性反应细胞(图 4), 从表 3 可见再灌注 24 h、48 h、72 h、120 h 时 NF- κ B 表达明显增强, 以再灌注 24 h 时最显著, 与 SO 组相比, 差异有统计学意义(均 $P < 0.01$); HBO 组再灌注 24 h、48 h、72 h、120 h NF- κ B 的表达均较 CIR 组对应时间点低

(均 $P < 0.05$)。

图3 各组大鼠脑组织中 ICAM-1 (再灌注 48 h) 的表达($\times 400$)表2 不同时间大鼠脑组织 ICAM-1 阳性血管数的变化(个/高倍视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	再灌注时间			
	24 h	48 h	72 h	120 h
SO组	0.97 ± 0.08	—	—	—
CIR组	$24.63 \pm 2.57^*$	$33.78 \pm 4.94^*$	$27.53 \pm 2.74^*$	$13.80 \pm 2.68^*$
HBO组	$13.18 \pm 2.04^{\#}$	$17.62 \pm 2.49^{\#}$	$11.07 \pm 1.82^{\#}$	$7.84 \pm 1.40^{\#}$

注: 与 SO 组比较, $^* P < 0.01$; 与同时相点 CIR 组比较, $^{\#} P < 0.01$

图4 各组大鼠脑组织中 NF- κ B (再灌注 24 h) 的表达($\times 400$)表3 再灌注各时间点大鼠脑组织 NF- κ B 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	再灌注时间			
	24 h	48 h	72 h	120 h
SO组	0.081 ± 0.017	—	—	—
CIR组	$0.676 \pm 0.055^*$	$0.625 \pm 0.048^*$	$0.583 \pm 0.103^*$	$0.390 \pm 0.082^*$
HBO组	$0.307 \pm 0.016^{\#}$	$0.343 \pm 0.028^{\#}$	$0.289 \pm 0.022^{\#}$	$0.212 \pm 0.010^{\#}$

注: 与 SO 组比较, $^* P < 0.01$; 与同时相点 CIR 组比较, $^{\#} P < 0.05$

讨 论

本研究结果显示, HBO 治疗可以减少局灶性脑缺血再灌注大鼠的脑梗死体积, 改善神经行为学症状, 表

明 HBO 对脑缺血再灌注动物具有神经保护作用。

局灶脑缺血再灌注后多种损伤机制共同作用,加剧了缺血性脑损伤,如兴奋性氨基酸神经毒性损伤、梗塞后炎性损伤以及细胞凋亡等,其中梗塞后炎性损伤机制的作用日益受到人们的重视^[4]。近年发现^[5-7], NF- κ B 与炎症反应密切相关, NF- κ B 蛋白家族是一种多效性的转录因子,可以与多种基因启动子部位的 κ B 位点发生特异性的结合,从而促进其转录表达。NF- κ B 活化被认为是介导或加剧脑缺血再灌注后炎性损伤的中心环节,活化的 NF- κ B 可直接调控参与脑缺血再灌注后炎性损伤的多种介质的表达,其中包括 ICAM-1。

ICAM-1 为 NF- κ B 下游的靶基因表达产物,在体内主要表达于血管内皮细胞。正常情况下,内皮细胞表面粘附分子的亲和力较弱,不会影响血液循环功能。但在脑缺血再灌注时,血管内皮细胞表面粘附分子数量及功能显著上调,细胞粘附性增强,结果白细胞牢固地粘附于血管内皮细胞表面,这一方面可机械性堵塞微循环通道,影响组织的血液供应;另一方面,活化的以及已浸润于脑组织的白细胞可释放大量的毒性氧自由基和蛋白水解酶炎症介质和细胞因子等,损害局部血管,导致血管通透性增加,造成组织水肿,破坏幸存的神经元和胶质细胞,从而加重组织的损伤,并吸引更多的白细胞进入组织,形成恶性循环^[8]。所以粘附分子的表达是白细胞发挥细胞毒作用的重要条件和基础。

本实验应用免疫组织化学技术对脑缺血再灌注损伤时 NF- κ B 和 ICAM-1 的表达进行了定性和半定量研究。结果显示,脑缺血再灌注后 NF- κ B 和 ICAM-1 明显上调, NF- κ B 的表达高峰出现在脑缺血再灌注后 24 h,而 ICAM-1 的表达高峰出现在缺血再灌注后 48 h,表明 NF- κ B 先于 ICAM-1 表达,提示在缺血再灌注后缺血侧脑组织已经有了明显的炎症反应,而且 NF- κ B 具有调节 ICAM-1 表达的作用。

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^[9]、抑制兴奋性氨基酸毒性作用^[10]及抑制海马 iNOS mRNA 的表达^[11],减少神经元凋亡等^[12]。有研究表明^[13], HBO 对脑缺血再灌注后的白细胞浸润有抑制作用,但其具体机制并不十分清楚。本实验对脑缺血再灌注大鼠进行 HBO 治疗后,发现 HBO 组 NF- κ B 的活性和 ICAM-1 的表达较 CIR 组降低,同时可减小脑缺血再灌注后的梗塞灶体

积,表明 HBO 治疗可以减轻大鼠脑缺血再灌注损伤的程度,这可能与 HBO 抑制 NF- κ B 活化,进而减少 ICAM-1 的表达,降低缺血灶炎症反应的程度有关,但其具体作用机制尚不十分清楚,有待于今后更进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 邢成名,主编. 缺血性脑血管病. 北京:人民卫生出版社, 2003. 124-127.
- 2 Krakovsky M, Rogatsky G, Zarchin N, et al. Effect of hyperbaric oxygen therapy on survival after global cerebral ischemia in rats. *Surg Neurol*, 1998, 49:412-416.
- 3 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson SML, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20:84-91.
- 4 Stanimirovic D, Satoh K. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. *Brain Pathol*, 2000, 10: 113-126.
- 5 Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB, et al. Global ischemia activates nuclear factor- κ B in forebrain neurons of rats. *Stroke*, 1997, 28: 1073-1080.
- 6 Seegers H, Grillon E, Trioullier Y, et al. Nuclear factor-kappa B activation in permanent intraluminal focal cerebral ischemia in the rat. *Neurosci Lett*, 2000, 288:241-245.
- 7 田晔,万琪,王洪典. 核因子 κ B 在脑缺血及再灌注损伤炎症机制中的作用. 国外医学脑血管疾病分册, 2002, 10:143-144.
- 8 Lindsberg PJ, Carpen O, Paetau A, et al. Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke. *Circulation*, 1996, 94:939-945.
- 9 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. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26: 196-199.
- 10 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. *Eur J Appl Physiol*, 2002, 87:101-107.
- 11 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.
- 12 Yin D, Zhou C, Kusaka I, et al. Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23:855-864.
- 13 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. *Brain Res*, 2003, 971:90-94.

(收稿日期:2004-11-18)

(本文编辑:松 明)