

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.28.001

不同压力高压氧促进大脑中动脉闭塞大鼠梗死周边区细胞增殖的研究^{*}

曾晓鹏,牟 君,曾令琼[△]
(重庆医科大学附属第一医院神经内科 400016)

摘 要:目的 比较延迟、连续给予不同压力(1.5 ATA 和 2.5 ATA)的高压氧治疗(HBOT),对永久性大脑中动脉闭塞(pMCAO)大鼠梗死周边区细胞增殖的影响。方法 雄性 SD 大鼠 80 只,分为假手术组、空气组(pMCAO 加空气)、1.5 ATA 组(pMCAO 加 1.5 ATA HBOT)和 2.5 ATA 组(pMCAO 加 2.5 ATA HBOT),每组 20 只。采用大脑中动脉线栓法建立永久性大鼠缺血模型。于术后 48 h 开始高压氧治疗,连续 10 d,每天 1 h。于术后 28 d 采用改良 Garcia 评分法和平衡能力测试评估神经功能,尼氏染色观察脑梗死面积和细胞增殖情况,Western blot 法检测环磷酸腺苷反应单元结合蛋白(CREB)在大鼠脑梗死区的表达情况。结果 术后 28 d 各组的改良 Garcia 评分分别为假手术组 18 分,空气组(13.25±0.57)分,1.5 ATA 组(13.80±0.62)分和 2.5 ATA 组(16.32±0.35)分。平衡能力测试各组得分为假手术组 3 分,空气组(0.98±0.33)分,1.5 ATA 组(1.30±0.52)分和 2.5 ATA 组(2.25±0.35)分。各组的梗死率分别为假手术组 0,空气组(33.15±2.66)%,1.5 ATA 组(31.20±3.25)%和 2.5 ATA 组(13.58±2.15)%。2.5 ATA HBOT 组与空气组比较神经功能评分有明显改善,梗死面积减少,梗死周边区域的细胞增殖增加,且该区域 CREB 的表达上调($P<0.05$);而 1.5 ATA HBOT 组与空气组比较,上述指标差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 2.5 ATA 高压氧的神经保护作用可能与 CREB 上调促进梗死周边区细胞增殖有关。

关键词:高压氧;脑动脉疾病;细胞增殖
中图分类号:R741 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2014)28-3697-03

Hyperbaric oxygen therapy promote the proliferation in peri-infarct region of cerebral artery occlusion rats^{*}
Zeng Xiaopeng, Mu Jun, Zeng Lingqiong[△]
(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the effect of different pressure(1.5 ATA and 2.5 ATA) of hyperbaric oxygen therapy (HBOT) on proliferation in the permanent middle cerebral artery occlusion(pMCAO) rats. **Methods** Male SD rats were randomly divided into 4 groups, including sham+air group, pMCAO+air group, pMCAO+1.5 ATA HBOT(1.5 ATA) group and pMCAO+HBOT(2.5 ATA)group ($n=20$). HBOT(100% O₂) was started 48 h after pMCAO, 1 h daily over 10 consecutive days. Garcia score and beam balance test were performed after 28 d of pMCAO to evaluate neurological deficits. The infarct size and cell proliferation were analyzed by immunohistochemistry. Western blot was used to detect the level of cAMP response element-binding protein(CREB). **Results** Garcia scores were 18 in sham+air group, 13.25±0.57 in air group, 13.80±0.62 in the 1.5 ATA group and 16.32±0.35 in the 2.5 ATA group. scores of beam balance test were 3 in sham+air group, 0.98±0.33 in the air group, 1.30±0.52 in 1.5 ATA group and 2.25±0.35 in 2.5 ATA group. infarct ratios were 0 in sham+air group, (33.15±2.66)% in air group, (31.20±3.25)% in 1.5 ATA group and (13.58±2.15)% in 2.5 ATA group. Compared to the air group, 2.5 ATA group effectively reduced the mortality and infarct size. Also it increased the peri-infarct region cell proliferation with up-regulated expression of CREB($P<0.05$). **Conclusion** 2.5 ATA HBOT may promote the cell proliferation in the peri-infarct region after pMCAO through CREB expression.

Key words: hyperbaric oxygen therapy; cerebral artery occlusion; proliferation

高压氧治疗(hyperbaric oxygen therapy, HBOT)已经在动物实验被证实可有效降低梗死面积,减少出血转化和改善神经功能。其神经保护机制与减轻脑水肿,抑制炎症反应和凋亡,稳定血脑屏障和激活细胞转录因子等因素有关^[1]。有研究提示高压氧的神经保护机制还与其对神经发生的促进作用有关,而这个机制很可能是通过上调环磷酸腺苷反应单元结合蛋白(cyclic AMP response element-binding protein, CREB)的表达来实现。CREB 是一种细胞转录因子,在脑组织的神经可塑性和神经元存活中起着重要作用。近期有研究报道提示高压氧可促进永久性大脑中动脉闭塞(permanent middle cerebral artery occlusion, pMCAO)大鼠神经发生,但是不同压力高压氧的作用是否有差别,其差别是否由于 CREB 表达量的不同,国内外尚未见文献报道。本研究利用 pMCAO 大鼠,模拟临床脑梗死的真实病理生理过程,比较连续给予不同压力(1.5 ATA 和 2.5 ATA)高压氧治疗对神经发生的影响,并初步探讨 CREB 在其中的作用。

^{*} 基金项目:国家自然科学基金面上项目资助(81371310);重庆市卫生局课题面上项目资助(2012-2-033)。 作者简介:曾晓鹏(1979—),主治医师,本科,主要从事神经内科研究。 [△] 通讯作者, E-mail:925758056@qq.com。

ATA HBOT)和 2.5 ATA 组(pMCAO 加 2.5 ATA HBOT), 每组 20 只。

1.2 动物模型制备 采用 Tu 等^[2]的方法制备 pMCAO 大鼠模型。5% 水合氯醛 35 mg/kg 腹腔注射麻醉,保持肛温(37.0±0.5)℃。4-0 尼龙线栓前端加热成光滑半球形。将线栓经颈外动脉断端插入颈内动脉,阻塞大脑中动脉。线栓顶部距离颈总动脉分叉处约 18~20 mm。假手术组大鼠所有操作步骤同上,不插入尼龙线栓。

1.3 高压氧治疗方案 术后 48 h 开始高压氧治疗,连续 10 d,每天 1 h。每次实验前,用纯氧反复洗高压氧动物舱(浙江船舶机械厂制造生产)10 min,使舱内氧浓度达到 100%。匀速加压 15 min 至目标气压,稳压 60 min 后,15 min 内匀速减至常压。假手术组及空气组不做任何处理。

1.4 行为学评价

1.4.1 改良 Garcia 评分法(3~18 分,3 分最差,18 分最好)^[3]

术后 28 d 由对实验分组不知情的同一实验人员进行测评。分别对运动功能的 6 个方面进行测试。即:自发运动、肢体活动的对称性、前肢伸展的对称性、爬行、本体感觉和对触须的反应。

1.4.2 平衡能力测试(0~3 分,0 分最差,3 分最好)^[4] 术后 28 d 行平衡能力测试。自制平衡木(长 80 cm,宽 2.5 cm,高 70 cm)。以在平衡木上的行走距离评分。3 分:行走距离大于或等于 20 cm;2 分:行走距离小于 20 cm;1 分:行走距离小于 10 cm;0 分:行走距离小于 10 cm,并跌落平衡木。

1.5 梗死区域观察 术后 28 d 处死大鼠,PBS 心脏灌注,10%甲醛固定。根据定位图谱(Bregma +3 至 Bregma -7),每隔 1 mm 连续收集 10 张 10 μm 厚的冠状脑片。尼氏染色显示梗死区域^[5]。尼氏染色的主要步骤为 0.5%的焦油紫(cresyl violet)染色 2 min,无水乙醇脱水 2 次,每次 1 min 30 s,自来水清洗 30 s,二甲苯透明 2 次,每次 1 min 30 s,自来水清洗 30 s 树胶封片。梗死区域的大小由梗死率来表示。梗死率=(对侧大脑半球面积之和-同侧大脑半球非梗死区面积之和)/对侧大脑半球面积之和×100%^[6]。

1.6 Western blot 检测 Western blot 法检测 CREB 在大鼠脑梗死区中的表达情况。于术后 28 d 处死大鼠,提取各组动物梗死区脑组织并测定其含量,上样 50 μg 行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳,50 V 35 min,125 V 2 h。电泳后转膜,100 V 90 min。一抗 4 ℃ 孵育过夜[兔抗 CREB(1:2 000),兔抗磷酸化 CREB(p-CREB)1:500,美国 Cell Signaling 公司],洗膜,加二抗(美国 Santa Cruz 公

司,1:2 000),再与化学发光底物结合,显影,采用软件(美国 NIH,Image J)分析计算平均光密度值。β-actin(1:2 000)二抗购自美国 Santa Cruz 公司作为对照。

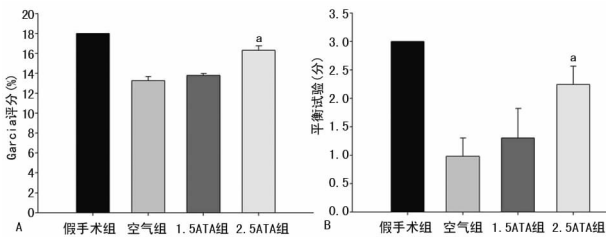
1.7 免疫组织化学和细胞计数 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)购自美国 Sigma-Aldrich 公司,用 0.9%生理盐水配制成溶液,于最后 1 次高压氧治疗结束后,连续 3 d,每天 2 次,以 50 mg/kg 行腹腔注射。术后 28 d 处死大鼠,PBS 心脏灌注,10%甲醛固定。根据定位图谱,每隔 1 mm 连续收集 10 张 10 μm 厚的脑梗死部位的冠状脑片。经 DNA 变性、抗原修复、一抗孵育(1:100,美国 Millipore,Chemicon 公司),DAB 显影,显微镜照相,由对实验设计未知的人员,经 Image J 软件辅助计数。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间资料比较行独立样本 *t* 检验,多组间资料比较行单因素方差分析; χ^2 检验用于比较各组间的病死率。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 病死率 手术后 28 d 各组的病死率分别为:假手术组 0(0/20),空气组 30%(6/20),1.5 ATA 组 15%(3/20)及 2.5 ATA 组 10%(2/20)。2.5 ATA 组的病死率低于空气组和 1.5 ATA 组,但各组间的病死率差异无统计学意义(*P*>0.05)。

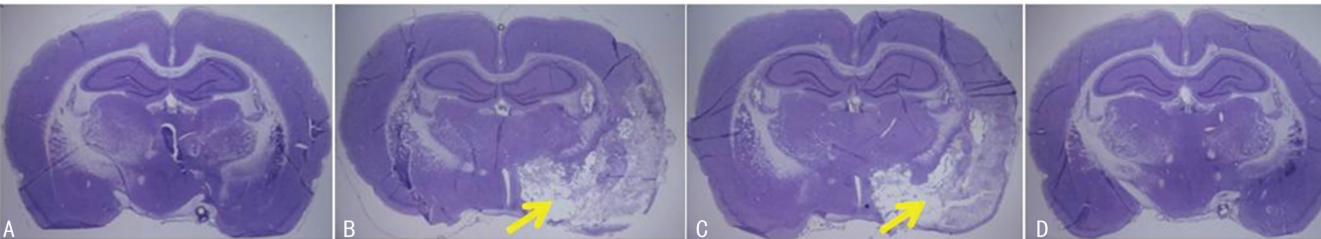
2.2 行为学评价 假手术组大鼠神经功能无缺损。2.5 ATA 组的改良 Garcia 评分和平衡能力测试均较空气组和 1.5 ATA 组有明显改善(*P*<0.05),见图 1。



A:改良 Carica 评分;B:平衡试验;^a:*P*<0.05,与空气组比较。

图 1 神经功能评分

2.3 脑梗死区域 手术后 28 d 各组的梗死率分别为:假手术组 0,空气组(33.15±2.66)%,1.5 ATA 组(31.20±3.25)%和 2.5 ATA 组(13.58±2.15)%。2.5 ATA 组的梗死率明显低于空气组和 1.5 ATA 组(*P*<0.05)。有代表性的尼氏染色显示空气组和 1.5 ATA 组的梗死率明显高于 2.5 ATA 组(*P*<0.05),见图 2(蓝紫色为正常脑组织,白色为梗死区)。

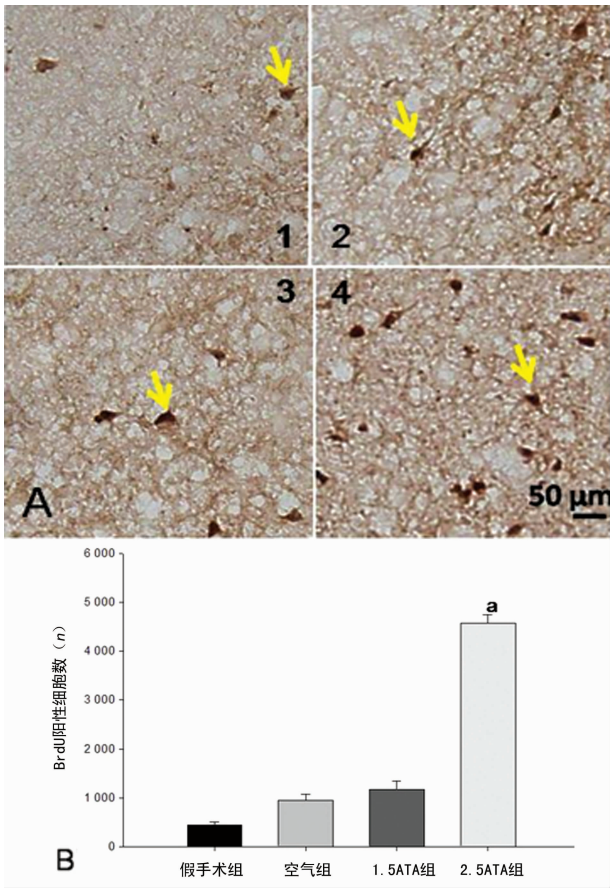


A:假手术组;B:空气组;C:1.5 ATA 组;D:2.5 ATA 组。

图 2 尼氏染色显示梗死区域(×40)

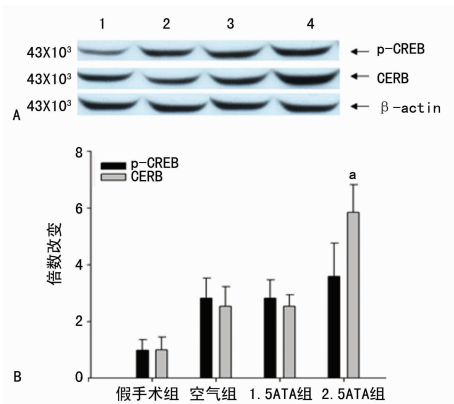
2.4 细胞增殖 手术后 28 d,较空气组和 1.5 ATA 组,2.5 ATA 组明显增加了梗死周边区域 BrdU 阳性细胞的数量(*P*<0.05),见图 3。

2.5 Western blot 检测结果 相对于空气组和 1.5 ATA 组,2.5 ATA 组明显增加了梗死侧半球的 CREB 和 p-CREB 的表达,CREB 的表达较空气组差异有统计学意义(*P*<0.05),见图 4。



A: 免疫组织化学检测结果, 1 为假手术组; 2 为空气组; 3 为 1.5 ATA 组; 4 为 2.5 ATA 组; B: 免疫组织化学半定量分析结果, ^a: $P < 0.05$, 与空气组及 1.5 ATA 组比较。

图 3 pMCAO 建模后 28d 各组大鼠脑梗死周边区 BrdU 阳性细胞计数



A: Western blot, 1 为假手术组; 2 为空气组; 3 为 1.5 ATA 组; 4 为 2.5 ATA 组。B: Western blot 半定量分析结果; ^a: $P < 0.05$, 与空气组比较。

图 4 Western blot 检测 CREB、p-CREB 在各组大鼠缺血脑组织中的表达

3 讨论

本研究在 pMCAO 术后 48 h 开始给予高压氧治疗, 连续 10 d, 每天 1 h, 结果发现相对 1.5 ATA, 2.5 ATA 能明显改善神经功能, 减少梗死面积, 增加梗死区细胞增殖, 并伴随 CREB 和 p-CREB 的表达上调。虽然 1.5 ATA 组的神经功能评分和梗死面积均好于空气组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。因此, 2.5 ATA 的神经保护作用很有可能是通过激活 CREB 通

路来促进细胞增殖。

美国海底及高压医学会 (undersea and hyperbaric medical society, UHMS) 将有效的高压氧治疗定义为 1.4 ATA 及以上。临床工作中 1.5 ATA 和 2.5 ATA 是最常用的压力。本文没有选择更高的压力, 因为连续给予更高压力治疗可能会增加氧化应激, 诱导炎症反应, 不利于临床康复。

大部分关于脑缺血的研究多采用缺血再灌注模型, 即 pMCAO 闭塞 90 min 后再灌注。近年来, 越来越多的研究开始关注 pMCAO 模型^[7-12]。相对于缺血再灌注模型, pMCAO 模型更接近临床脑梗死的真实病理生理过程^[11], 且造模重复性高, 梗死面积较一致^[13]。

大量将高压氧应用于脑梗死的动物试验研究证实, 早期给予高压氧治疗可有效减少梗死面积、降低出血转化发生率和改善神经功能。最早可于 pMCAO 模型后 10 min 开始。由于脑梗死患者急性期通常需重症监护下行重组组织型纤溶酶源激活剂 (rt-PA) 溶栓, 故临床实践中不可能超早期接受高压氧治疗。为了有效实现临床转化, 高压氧治疗的开始时间已经成功的延时到造模后 48 h。

研究已证实成年脑组织具有新生神经元的潜力。脑梗死可刺激机体内源性神经发生, 但是内源性神经发生常常发生在梗死早期, 持续时间短, 新生神经元数量有限, 不足以代偿梗死后的功能缺损。CREB 信号通路在成人的神经发生中起着至关重要的作用, 在海马、脑室管膜下区 (subventricular zone, SVZ) 和嗅球区域, 调节新生神经元的发育、增殖、存活、成熟和功能整合。CREB 在 Ser133 位点的磷酸化对激活下游基因的转录至关重要, 如脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)、Bcl-2 和 c-fos。梗死后 28 d, 海马和脑室旁区域存活的新生细胞逐渐迁移到梗死周边区域, 进行功能修复和代偿。研究显示注射入人体内的 BrdU 可以存在于脑组织分裂的细胞中数周时间^[14], 也为本研究观察新生细胞的存活和迁移提供了有效的手段^[15]。

本研究发现 2.5 ATA 组能有效减少梗死面积, 增加梗死周边区域的细胞增殖, 并上调该区域 CREB 的表达, 为临床实践提供了有益的参考。2.5 ATA 高压氧的神经保护作用可能与 CREB 上调梗死后细胞增殖有关。今后进一步研究将针对高压氧促进增殖细胞分化的类型、迁移及功能整合。

参考文献:

- [1] Matchett GA, Martin RD, Zhang JH. Hyperbaric Oxygen therapy and cerebral ischemia: neuroprotective mechanisms[J]. Neurol Res, 2009, 31(2): 114-121.
- [2] Tu XK, Yang WZ, Wang CH, et al. Zileuton reduces inflammatory reaction and brain damage following permanent cerebral ischemia in rats[J]. Inflammation, 2010, 33(5): 344-352.
- [3] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation[J]. Stroke, 1995, 26(4): 627-634.
- [4] Mu J, Ostrowski RP, Soejima Y, et al. Delayed hyperbaric Oxygen therapy induces cell proliferation through stabilization of cAMP responsive element binding protein in the rat model of MCAo-induced ischemic brain injury[J]. Neurobiol Dis, 2013, 51: 133-143. (下转第 3703 页)

结果对阐明结肠癌的发病机制及寻找新的结肠癌治疗分子靶点具有一定意义。

参考文献:

- [1] Wang Y, Morrow JS. Identification and characterization of human SLP-2, a novel homologue of stomatin(band 7. 2b) present in erythrocytes and other tissues[J]. J Biol Chem, 2000, 275(11):8062-8071.
- [2] Chang D, Ma K, Gong M, et al. SLP-2 overexpression is associated with tumour distant metastasis and poor prognosis in pulmonary squamous cell carcinoma[J]. Biomarkers, 2010, 15(2):104-110.
- [3] 张剑, 李建生, 吴敏, 等. SLP-2 在胃癌组织中的表达及对胃腺癌细胞 SGC7901 运动侵袭的影响[J]. 中华消化杂志, 2013, 33(1):37-41.
- [4] Cui Z, Zhang L, Hua Z, et al. Stomatin-like protein 2 is overexpressed and related to cell growth in human endometrial adenocarcinoma[J]. Oncol Rep, 2007, 17(4):829-833.
- [5] Cao WF, Zhang B, Li J, et al. SLP-2 overexpression could serve as a prognostic factor in node positive and HER2 negative breast cancer[J]. Pathology, 2011, 43(7):713-718.
- [6] Liu DN, Zhang L, Shen ZY, et al. Increased levels of SLP-2 correlate with poor prognosis in gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2013, 16(4):498-504.
- [7] Wang Y, Cao W, Yu Z, et al. Downregulation of a mitochondria associated protein SLP-2 inhibits tumor cell motility, proliferation and enhances cell sensitivity to chemotherapeutic reagents[J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(17):1651-1658.
- [8] Sprenger RR, Speijer D, Back JW, et al. Comparative proteomics of human endothelial cell caveolae and rafts using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry[J]. Electrophoresis, 2004, 25(1):156-172.
- [9] Hájek P, Chomyn A, Attardi G. Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2[J]. J Biol Chem, 2007, 282(8):5670-5681.
- [10] Zhang L, Ding F, Cao W, et al. Stomatin-like protein 2 is overexpressed in cancer and involved in regulating cell growth and cell adhesion in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(5):1639-1646.
- [11] Cao W, Zhang B, Liu Y, et al. High-level SLP-2 expression and HER-2/neu protein expression are associated with decreased breast cancer patient survival[J]. Am J Clin Pathol, 2007, 128(3):430-436.
- [12] Horiuchi A, Imai T, Wang C, et al. Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma[J]. Lab Invest, 2003, 83(6):861-870.
- [13] 祁代华, 李建生, 王康康. SLP-2 和 CDC42 蛋白在结直肠癌组织中的表达及临床意义[J]. 中华消化杂志, 2009, 29(3):191-192.

(收稿日期:2014-05-26 修回日期:2014-06-17)

(上接第 3699 页)

- [5] Ostrowski RP, Graupner G, Titova E, et al. The hyperbaric Oxygen preconditioning-induced brain protection is mediated by a reduction of early apoptosis after transient global cerebral ischemia[J]. Neurobiol Dis, 2008, 29(1):1-13.
- [6] Aoki Y, Huang Z, Thomas SS, et al. Increased susceptibility to ischemia-induced brain damage in transgenic mice overexpressing a dominant negative form of SHP2[J]. FASEB J, 2000, 14(13):1965-1973.
- [7] Acka G, Sen A, Canakci Z, et al. Effect of combined therapy with hyperbaric Oxygen and antioxidant on infarct volume after permanent focal cerebral ischemia[J]. Physiol Res, 2007, 56(3):369-373.
- [8] Gao-Yu C, Cong-Yina D, Li-Jun Z, et al. Effects of hyperbaric Oxygen preconditioning on energy metabolism and glutamate level in the peri-infarct area following permanent MCAO[J]. Undersea Hyperb Med, 2011, 38(2):91-99.
- [9] Günther A, Küppers-Tiedt L, Schneider PM, et al. Reduced infarct volume and differential effects on glial cell activation after hyperbaric Oxygen treatment in rat permanent focal cerebral ischaemia[J]. Eur J Neurosci, 2005, 21(11):3189-3194.
- [10] Lou M, Zhang H, Wang J, et al. Hyperbaric Oxygen treatment attenuated the decrease in regional glucose metabolism of rats subjected to focal cerebral ischemia; a high resolution positron emission tomography study[J]. Neuroscience, 2007, 146(2):555-561.
- [11] Veltkamp R, Sun L, Herrmann O, et al. Oxygen therapy in permanent brain ischemia: potential and limitations[J]. Brain Res, 2006, 1107(1):185-191.
- [12] Xue L, Yu Q, Zhang H, et al. Effect of large dose hyperbaric oxygenation therapy on prognosis and oxidative stress of acute permanent cerebral ischemic stroke in rats[J]. Neurol Res, 2008, 30(4):389-393.
- [13] Liu L, Wang Z, Wang X, et al. Comparison of two rat models of cerebral ischemia under hyperglycemic conditions[J]. Microsurgery, 2007, 27(4):258-262.
- [14] Li S, Sun G, Murai K, et al. Characterization of TLX expression in neural stem cells and progenitor cells in adult brains[J]. PLoS One, 2012, 7(8):e43324.
- [15] Magavi SS, Macklis JD. Identification of newborn cells by BrdU labeling and immunocytochemistry in vivo[J]. Methods Mol Biol, 2002, 198:283-290.

(收稿日期:2014-05-08 修回日期:2014-06-11)