文章编号:1000-5404(2006)19-1973-03

论著

高压氧对缺血缺氧性脑损伤幼鼠海马超微结构及主动回避反应的影响

周红梅[1],孔祥英[1],何念海[1],肖桃元[2] (第三军医大学:[1]西南医院儿科,[2]高原军事医学系中心实验室,重庆 400038)

提 要:目的 观察高压氧治疗对新生大鼠缺血缺氧损伤后脑超微结构和在青春期对主动回避反应的影响。**方法** 出生7 d的Wistar大鼠制作缺血缺氧性脑损伤模型,采用随机数字表法分为高压氧治疗组和未治疗组,并设正常对照组,采用穿梭箱主动回避行为模型进行主动回避反应(AAR)及被动回避反应(PAR)测试,并观察各组幼鼠海马超微结构。**结果** 高压氧治疗1次后24 h的幼鼠脑重量较缺血缺氧后不治疗组脑重明显轻。缺氧缺血后海马超微结构变化明显,经高压氧治疗后,海马神经元和突触无明显异常。高压氧治疗组无论是主动回避反应还是被动回避反应均比未治疗组成功率高,两组比较AAR及PAR都有显著性差异($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** 高压氧治疗可减轻缺氧所致脑损伤,有利于受损幼鼠认知能力的恢复。

关键词: 高压氧;缺血缺氧;海马;主动回避反应;被动回避反应;穿梭箱;大鼠
中图法分类号: R338.26;R459.6;R743.31 **文献标识码:** A

Effect of hyperbaric oxygen treatment on hippocampal ultrastructure and active avoidance response of 7-day-old rats with hypoxic-ischemic injury

ZHOU Hong-mei[1], KONG Xiang-ying[1], HE Nian-hai[1], XIAO Tao-yuan[2] ([1]Department of Pediatrics, Southwest Hospital, [2]Central Laboratory, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of hyperbaric oxygen treatment (HBOT) on active avoidance response of neonate rats with hypoxic-ischemic injure. **Methods** Forty Wistar rats of 7 days old were established into hypoxic-ischemic injury, and were randomly divided into HBOT group and no-HBOT group. Ten normal rats served as normal controls. AAR and PAR of rats were measured in shuttle box. The hippocampal ultrastructure was detected with electron microscope. **Results** Brain weight of rats underwent HBOT once after 24 h were decreased significantly as compared with no-HBOT group. The hippocampal ultrastructure after hypoxic-ischemic injure changed obviously. Nerve cells were of puff and intumesce. In kytoplasm, rough endoplasmic reticulum and Golgi saccule were expanding and vacuolated, and ridge of bioblast was blur. Regardless of active avoidance response (AAR) or passive avoidance response (PAR), the achievement ratio of HBOT group increased significantly. AAR and PAR between the two groups were of significant difference ($P<0.05$, $P<0.001$). **Conclusion** HBOT may relieve the cerebral anoxic injury and be conducive to cognitive ability of injured immature rats.

Key words: high pressure oxygen; hypoxic-ischemic; hippocampus; active avoidance response; passive avoidance response; shuttle box; rat

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是由于围生期缺氧缺血导致的脑组织损伤,是新生儿常见且致残率较高的一种疾病。高压氧(hyperbaric oxygen,HBO)治疗成人和成年动物脑损伤模型具有明显效果[1-4],但由于新生儿与成年人生理上的差异,目前国内外对HBO治疗新生儿HIE仍存在较大争议,虽然国内有较多文献报道HBO治疗新生儿HIE有明显疗效[5-7],但尚缺乏足够有力的证据。本研究用HBO对新生鼠缺氧缺血性脑损伤模型进行治疗,观察HBO对其的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组

出生7 d的Wistar大鼠50只(雌雄不拘),购于本校实验

作者简介:周红梅(1973-),女,重庆市綦江县人,硕士,主治医师,电话:(023)68765413
通讯作者:孔祥英,电话:(023)68753467
收稿日期:2005-11-22;修回日期:2006-06-20

动物中心，采用随机数字表法分成3组：正常对照组10只；缺血缺氧后成活者分为未治疗组20只，高压氧治疗组（HBO）20只（其中治疗1次10只，治疗8次10只）。

1.2 动物模型复制

参照文献[8]将出生7 d的Wistar大鼠经乙醚麻醉后结扎左颈总动脉，缝合伤口，置常温下2 h后置于特定的容器内给予吸入8%氧气和92%氮气的混合气体2.5 h，即复制成缺血缺氧性脑病（HIE）模型。HIE幼鼠随机分为2组即：HIE未治疗组与高压氧治疗组。正常对照组为假手术组即只暴露颈动脉而不做结扎。

1.3 高压氧治疗（HBO）

将缺血缺氧后的大鼠19只置于由中国船舶工业公司第7研究院701研究所生产的婴儿氧舱内，以纯氧洗舱10 min后匀速加压20 min，使其压力达0.02 MPa后，稳压20 min，期间稳压换气：即同时开启进气阀和排气阀以通入氧气排出舱内的混合气体保持舱内的氧浓度及压力3 min，然后匀速减压约20 min至常压出舱。每日1次，其中10只于次日采集标本，另外9只共治疗8次。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 高压氧治疗对脑水肿的影响 取HIE幼鼠高压氧治疗1次后24 h及缺血缺氧后24 h的幼鼠各8只，迅速断头取脑，用滤纸吸干血液、称重后，放于烘干箱内以100 ℃烘干4 h至衡重，再次称重并记录。

1.4.2 电镜观察脑海马超微结构 取正常对照组2只，高压氧治疗1次和治疗8次以及缺血缺氧后未治疗组幼鼠（缺血缺氧后1、10 d）各2只，以3%戊二醛经心脏行内灌注然后取大脑皮层及海马，按电镜切片常规做超薄切片，观察其超微结构。

1.4.3 学习记忆能力检测 于幼鼠8周时取正常对照组7只、HIE未治疗组6只、HBO治疗组7只，采用电脑控制穿梭箱系统[9]进行学习记忆能力检测。大鼠放入穿梭箱内暗适应5 min后灯光刺激5 s，然后给箱底通10～20 mA、频率10～15 Hz的电刺激5 s。每只大鼠每次实验进行20次光、电刺激，每次刺激后给予60 s适应时间。结果以采用灯光刺激大鼠即能自动跑到对侧无灯光无电刺激箱内躲避为完成主动回避反应（active avoiding reaction，AAR），经电刺激才能完成穿梭动作为被动回避反应（passive avoiding reaction，PAR）每日1次，连续进行7 d实验，并记录成绩。

1.5 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件，组间比较采用t检验，大鼠认知功能（AAR和PAR）检测结果采用χ^2检验。

2 结果

2.1 一般情况

动物模型制作过程中夭亡3只，在饲养过程中HIE未治疗组幼鼠夭亡1只，1只有偏瘫、1只一侧肢体短小；HBO治疗组幼鼠一般情况好。

2.2 HBO治疗对脑水肿的影响

从表1可见HBO治疗1次后24 h幼鼠脑的质量较HIE未治疗组脑质量明显减轻（$P<0.05$），水分丢失也明显减少（$P<0.01$），提示HBO治疗能减轻缺血缺氧所致的脑水肿。

表1 HBO治疗对脑水肿的影响（mg，$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

组别	脑质量	烘干后脑质量	丢失水分
HBO治疗组	0.617±0.1	0.609±0.09	0.078±0.01
HIE未治疗组	0.746±0.12[a]	0.610±0.08	0.136±0.01[b]

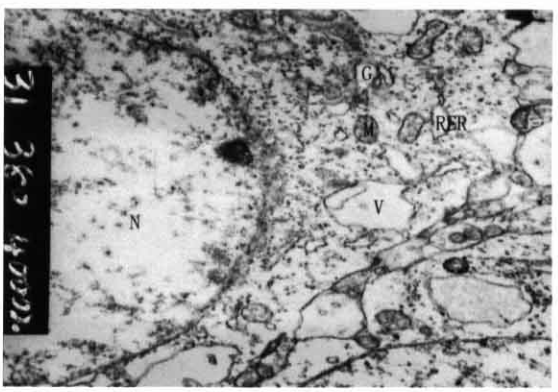
a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与HBO治疗组比较

2.3 海马超微结构变化

正常对照组大鼠出生8 d后，神经元发育较好，染色质密度降低、核仁明显，细胞器丰富，神经毡较充实，神经纤维有髓鞘形成，突触发育成熟，微血管基底膜明显。

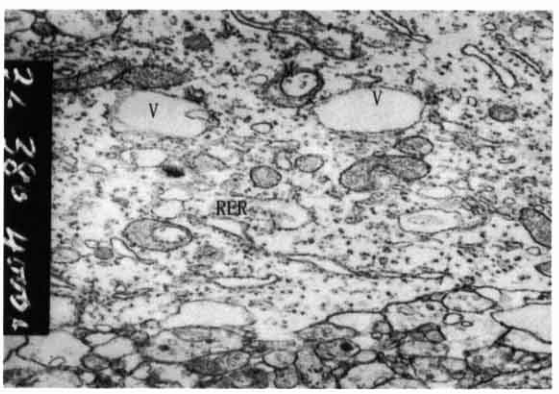
给予缺血缺氧处理1 d后（生后第8天），见神经细胞线粒体肿胀、嵴断裂模糊、高尔基体囊泡扩张空泡化（图1），神经毡水肿明显，尤以微血管周明显。缺血缺氧后10 d，见神经细胞固缩改变、核膜皱褶、染色体致密、双核仁，细胞质致密，线粒体肿胀，神经细胞的细胞质内有空泡（图2），周围髓鞘变性，胶质细胞增生，微血管周围胶质足肿胀、破裂、微血管腔受压变形。

缺血缺氧后立即给予高压氧治疗，经治疗8 d后，海马脑组织除胶质细胞和突起轻微肿胀外，神经元和突触无明显异常。



神经细胞细胞核（N）疏松肿胀，细胞质粗面内质网（RER）、高尔基囊泡（G）扩张空泡化，线粒体嵴模糊（M）

图1 缺氧1 d大鼠海马细胞超微结构 （TEM×4 000）



神经细胞细胞质内空泡[粗面内质网、线粒体及其他空泡（V）]

图2 缺氧10 d大鼠海马细胞超微结构 （TEM×4 000）

2.4 幼鼠学习记忆情况

由表2可见HBO治疗组无论是AAR还是PAR均较HIE

未治疗组成功率高，两组比较 AAR 及 PAR 都有显著性差异（$P<0.05$）。而 HIE 未治疗组 AAR、AAR + PAR 成功率均比正常对照组低（$P<0.01$）。治疗组虽然 AAR + PAR 成功率与对照组无明显差异（$P>0.05$），但 AAR 成功率仍明显低于健康对照组（$P<0.01$）。

表 2　大鼠认知功能检测结果

组别	例数	AAR		AAR + PAR	
		成功	失败	成功	失败
正常对照组	7	392	686	755	225
HIE 未治疗组	6	168[a]	672	504[a]	336
HBO 治疗组	7	245[ab]	735	774[c]	206

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.05$，c：$P<0.01$，与 HIE 未治疗组比较

3　讨论

哺乳动物海马及额皮质是缺氧缺血性脑损伤的易损区，而它们又是学习记忆相关的重要部位，缺氧缺血性脑损伤易导致学习记忆功能障碍。本研究结果显示缺血缺氧性脑病模型复制成功后次日幼鼠脑质量明显高于经高压氧治疗 1 次的治疗组，脑组织在同样的条件下烘干后的重量基本相等，治疗组丢失的水分明显少于未治疗组。进一步的检查显示，电镜下缺血缺氧处理 1 d 后神经细胞线粒体肿胀、嵴断裂、高尔基体囊泡扩张，神经毡水肿明显，尤以微血管周围明显；缺氧后 10 d，见神经细胞固缩改变、核膜皱折、染色质致密、双核仁，细胞质致密，线粒体肿胀，脑组织点状溶解灶，周围髓鞘变性，胶质细胞增生，微血管周围胶质足肿胀、破裂、微血管腔受压变形。而经高压氧治疗1 d 后上述病变明显减轻，经治疗 10 d 后，海马脑组织除胶质细胞和突起轻微肿胀外，神经元和突触无明显异常。分析其原因可能与 HBO 增加了脑组织对氧的摄取和利用，使神经元的缺氧状况得到改善，细胞能量代谢障碍迅速恢复，纠正缺氧所致的生化级联反应如兴奋性氨基酸的释放、氧自由基的损伤，稳定线粒体细胞膜，减轻线粒体损伤，最终减轻神经细胞凋亡有关[10,11]。

缺血缺氧性脑损伤的后遗症往往包括智力低下。高压氧治疗对于幼鼠的认知能力有何影响？本实验结果显示 HIE 组学习记忆能力明显下降，与文献[12－15]报道一致。缺血缺氧性脑损伤模型复制成功后立即给予高压氧治疗的幼鼠无论是 AAR 成功率还是 AAR + PAR 成功率均明显高于未治疗组，提示高压氧治疗由于阻断了缺血缺氧所造成的脑水肿以及由此所致的脑组织无氧酵解增加、组织中乳酸堆积、能量产生急剧减少、最终因能量衰竭，出现一系列使损害进一步恶化并导致脑细胞死亡的瀑布样反应，从而保护了脑细胞，改善预后。

参考文献：

[1] REN H, WANG W, GE Z. Glasgow Coma Scale, brain electric activity mapping and Glasgow Outcome Scale after hyperbaric oxygen treatment of severe brain injury[J]. Clin J Traumatol, 2001, 4(4): 239－241.

[2] CHANG C F, NIU K C, HOFFER B J, *et al*. Hyperbaric oxygen therapy for treatment of postischemic stroke in adult rats[J]. Exp Neurol, 2000, 166(2): 298－306.

[3] ROCKSWOLD S B, ROCKSWOLD G L, VARGO J M, *et al*. Effects of hyperbaric oxygenation therapy on cerebral metabolism and intracranial pressure in severely brain injured patients[J]. J Neurosurg, 2001, 94(3): 403－411.

[4] RUSYNIAK D E, KIRD M A, MAY J D, *et al*. Hyperbaric oxygen therapy in acute ischemic stroke: results of the Hyperbaric Oxygen In Acute Ischemic Stroke Trial Pilot Study[J]. Stroke, 2003, 34(2): 571－574.

[5] 叶　红. 高压氧早期干预对缺氧缺血性脑病新生儿行为神经评分及智能发育商的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 9(23): 194－195.

[6] 盖　勇，张　曦. 高压氧对新生儿重度缺氧缺血性脑病的治疗时间选择[J]. 实用儿科临床杂志, 2005, 20(5): 489,496.

[7] 陈奋湘，陈少华，卜文萍，等. 高压氧治疗新生儿缺氧缺血性脑病的临床研究[J]. 中国医学工程, 2004, 12(4): 44－47,51.

[8] 胡志兵，陆雪芬，郑得枢，等. 神经节苷脂 GM_1 对缺血缺氧后脑中 HSP70 表达的影响[J]. 卒中与神经疾病, 2001, 8(5): 278－281.

[9] 刘　彦，何庆华，廖维宏，等. 微机控制的穿梭箱双向主动回避反应实验系统[J]. 中国应用生理学杂志, 1999, 15(4): 366－368.

[10] 薄　涛，韩玉昆，舒　航. 高压氧治疗实验性新生猪缺氧缺血性脑损伤的研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2001, 3(4): 352－354.

[11] CALVERT J W, Yin W, PATEL M, *et al*. Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia-ischemia in a neonatal rat model[J]. Brain Res, 2002, 951(1): 1－8.

[12] 孔祥英，萧桃元，白家驷. 高压氧对缺氧新生大鼠脑超微结构及细胞凋亡的影响[J]. 重庆医学, 2004, 33(4): 491－493.

[13] ARTENI N S, SALGUEIRO J, TORRES I, *et al*. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat[J]. Brain Res, 2003, 973(2): 171－178.

[14] IKEDA T, MISHIMA K, YOSHIKAWA K, *et al*. Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats[J]. Behav Brain Res, 2001, 118(1): 17－25.

[15] 曹　云，邵肖梅，梅镇彤，等. 环境刺激对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑功能的影响[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(7): 394－397.

（编辑　王　红）