文章编号:1000-5404(2007)22-2113-03

论著

预缺氧对大鼠低压缺氧性脑损伤保护作用的实验研究

陈 建,黄 缄,高钰琪,高文祥,廖卫公,范有明 (第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨预缺氧对严重低压缺氧引起大鼠海马神经细胞损伤及学习记忆能力降低的保护作用。**方法** ①Wistar大鼠分为对照组、单纯缺氧组、预缺氧复合缺氧组。光镜和电镜观察大鼠海马CA1区神经元形态变化;TUNEL法检测海马CA1区神经元凋亡。②单纯缺氧组和预缺氧复合缺氧组大鼠进行穿梭箱主动回避训练,随后进行低压缺氧,观察大鼠学习记忆能力的改变。**结果** 预缺氧复合缺氧组大鼠CA1区神经元病理改变较轻,神经元凋亡显著低于单纯缺氧组($P<0.05$);预缺氧复合缺氧组大鼠在严重缺氧后受电击次数和主动逃避时间的增加显著低于单纯缺氧组($P<0.05$)。**结论** 缺氧引起大鼠海马CA1区神经元凋亡等病理改变,并导致学习记忆能力降低;预缺氧对海马CA1区神经元的缺氧性损伤具有保护作用,并能有效减轻严重缺氧所导致的学习记忆能力下降。

关键词: 缺氧;预缺氧;海马;学习记忆能力;凋亡
中图法分类号: R338.6;R364.4;R743.302 **文献标识码:** A

Protective effects of hypoxia preconditioning on rat brain against hypobaric hypoxia

CHEN Jian, HUANG Jian, GAO Yu-qi, GAO Wen-xiang, LIAO Wei-gong, FAN You-ming (Department of Pathophysiology and High Altitude Physiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the protective effects of hypoxia preconditioning on the injuries of hippocampal neurons and degression of memory ability caused by severe hypobaric hypoxia. Methods Wistar rats were divided randomly into control group (group C), hypoxia group (group H, in hypobaric hypoxia chamber imitating 10 000 meters above sea level for 1 h/d, 3 d) and hypoxia preconditioning plus subsequent hypoxia group (group HP, in hypobaric hypoxia chamber imitating 5 000 meters above sea level for 4 h/d, 7 d, then treated as group H). The injuries and apoptosis of neurons in rat hippocampal CA1 were detected with HE staining, TUNEL and observed with electron microscopy. The changes of memory ability in group H and group HP after hypoxia were investigated with the active avoidance reaction. Results CA1 neuron injury in group HP was significantly slighter than group H, and apoptosis cells counting, electric shock times and mean time of active avoidance of rats in group HP were significantly lower than group H ($P<0.05$). Conclusion Severe hypoxia induced the neuron apoptosis in hippocampal CA1 and lesions of memory in rats, while hypoxia preconditioning can attenuate these injuries efficiently.

Key words: hypoxia; preconditioning; hippocampus; memory ability; apoptosis

缺氧是高原、航空、潜水等特殊环境及某些临床疾病造成机体损伤的重要原因。脑组织以有氧代谢为主,对缺氧的耐受性差,特别是海马、大脑皮层等对缺氧比较敏感的脑区在缺氧时损伤更严重,临床上表现为记忆力和认知能力等障碍[1,2]。预先反复短暂或轻度的低氧/缺血可减轻后续长期或严重缺氧/缺血所造成组织和细胞损伤的现象称为低氧或缺血预适应(hypoxic or ischemic preconditioning)[3],预先的短暂轻度低氧/缺血处理则称为预缺氧/缺血。预缺氧/缺血作为一种有效的提高机体脑缺氧耐受性的方法,越来越受到人们的重视[4]。本实验主要研究预缺氧对缺氧损伤时大鼠海马CA1区神经元病理改变及学习记忆能力的影响,并从结构和功能方面了解预缺氧的神经保护作用,旨在为提高脑缺氧耐受性及机体适应缺氧环境的能力,防治临床缺氧性疾病提供新的思路。

基金项目: 国家自然科学基金(30393131, 30300123)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30393131, 30300123)

作者简介: 陈 建(1974-),男,贵州省毕节市人,博士,讲师,主要从事缺氧病理生理学方面的研究。电话:(023)68752335-8204, E-mail: jchenone@163.com
通讯作者: 高钰琪,电话:(023)68752331, E-mail: gaoyq@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2007-02-17;**修回日期:** 2007-07-21

1 材料与方法

1.1 预缺氧对缺氧大鼠海马CA1区神经元损伤的保护作用

1.1.1 实验动物及分组 健康雄性Wistar大鼠15只,10~12周龄,体质量180~220 g,由本校实验动物中心提供。大鼠分为3组:对照组、单纯缺氧组、预缺氧复合缺氧组,每组5只。对照组:不进行缺氧,与缺氧组同时取材;单纯缺氧组:海拔10 000 m,持续缺氧1 h,缺氧3 d后取材;预缺氧复合缺氧组:海拔5 000 m,预缺氧4 h/d,共7 d,预缺氧结束后,海拔10 000 m,持续缺氧1 h,缺氧3 d后取材。

1.1.2 取材及观察 大鼠以戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉,全身肝素化5 min。以4%多聚甲醛主动脉灌注固定。打开颅腔,取出全脑,于丘脑中后1/3处做大脑厚切片,确定含双侧海马,放入4%的多聚甲醛再固定过夜,常规HE染色。相邻切片留做TUNEL实验,光学显微镜(日本Olympus公司)下观察海马CA1区神经元的形态结构变化。另取海马CA1区做0.5 mm×0.5 mm×1.0 mm的组织块,2.5%戊二醛4 ℃固定,四氧化锇后固定,脱水,树脂包埋,将组织块进行超薄切片。采用透射电镜(JEM-2000Ex型,日本电子公司)进行观察。

1.1.3 缺氧对大鼠海马CA1区神经元凋亡的影响和预缺氧的保护作用 采用末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)介导的dUTP缺口标记技术(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-dig nick end labeling, TUNEL)观察CA1区神经元凋亡情况。按Roche公司凋亡检测试剂盒说明操作。阳性结果判断:细胞核中出现棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞。在光镜(×400)视野下观察海马CA1区4个视野,计数各视野下凋亡神经元数目,计算平均值。

1.2 预缺氧对缺氧大鼠学习记忆能力的保护作用

1.2.1 实验动物及分组 单纯缺氧组和预缺氧复合缺氧组大鼠各12只,大鼠基本情况、缺氧和预缺氧方法同1.1。两组动物每天进行穿梭箱主动回避训练,7 d后挑选训练成绩较好的大鼠(最后2 d内电击次数≤5次)进行缺氧,缺氧3 d后进行穿梭箱主动回避实验,检测其记忆保持能力。

1.2.2 大鼠学习记忆能力的检测 参照文献[5],DCS-2型大鼠穿梭程序自动控制仪由中国医学科学院药物研究所设计,底部铺设铜棒,通交流电,以声音作为条件刺激,由计算机自动控制。大鼠在箱内适应5 min后,开始蜂鸣刺激(20 dB,5 s),间隔5 s,电脑控制电刺激,电流强度为5 mA,持续时间10 s,训练时循环20次。

1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件进行单因素方差分析和t检验。

2 结果

2.1 组织学HE染色观察结果

对照组大鼠海马CA1区锥体神经元细胞核呈圆形或椭圆形,细胞核膜清楚,细胞核染色质均匀;单纯缺氧组大鼠海马CA1区神经元细胞间隙增宽,部分细胞核深染,细胞核膜边界不清,部分细胞核固缩;预缺氧复合缺氧组CA1区神经元细胞排列整齐,细胞核呈圆形或椭圆形,偶见细胞核深染。

2.2 电镜观察结果

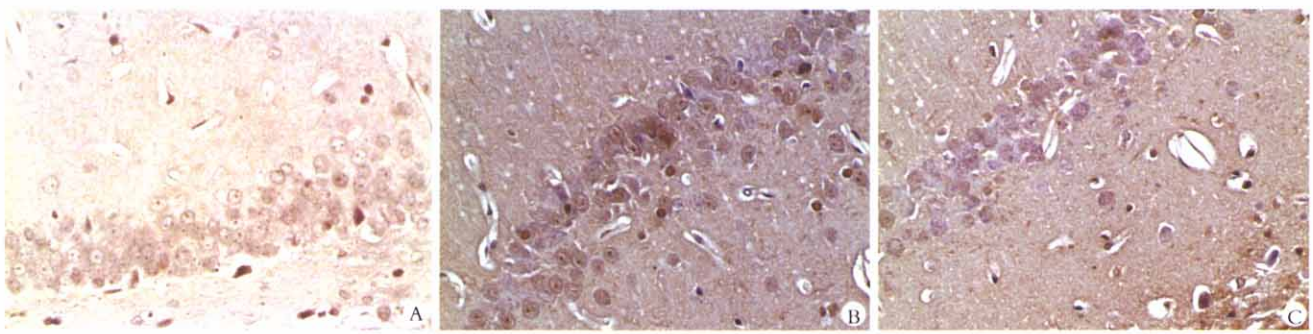
电镜下可见对照组海马CA1区神经元细胞核膜清楚,细胞核内染色质密度均一,细胞质内可见丰富的线粒体,其形态和分布均正常。单纯缺氧组神经元细胞核固缩不规则,异染色质边集;部分线粒体肿胀,嵴断裂或消失。预缺氧复合缺氧组神经元,细胞核内染色质密度较均一,偶见染色质边集,线粒体形态及分布正常。

2.3 TUNEL染色结果

对照组海马CA1区偶见神经元凋亡,数目为(2.1±0.7)。单纯缺氧组海马CA1区神经元凋亡数目为(8.9±1.8),较对照组明显增多($P<0.01$)。预缺氧复合缺氧组凋亡细胞数目为(6.3±1.9),较单纯缺氧组显著减少($P<0.05$)(图1)。

2.4 预缺氧对缺氧大鼠学习记忆能力的保护作用

经过穿梭箱训练后,挑选学习成绩较好的大鼠,每组8只进行缺氧实验。结果见表1,缺氧后单纯缺氧组和预缺氧复合缺氧组的电击次数均显著多于缺氧前($P<0.05$, $P<0.01$),单纯缺氧组主动逃避时间比缺氧前显著增加($P<0.05$),预缺氧复合缺氧组主动逃避时间比缺氧前增加,但差异无统计学意义($P>0.05$)。预缺氧复合缺氧组电击次数和主动逃避时间的增加(Δ电击次数和Δ主动逃避时间)显著低于单纯缺氧组($P<0.05$)。



A:对照组;B:单纯缺氧组;C:预缺氧复合缺氧组

图1 预缺氧对大鼠海马CA1区神经元凋亡的影响 (TUNEL×400)

表 1　预缺氧对大鼠受电击次数和主动逃避时间的影响($n=8$, $x \pm s$)

组别	缺氧前		缺氧后		缺氧前后的变化	
	电击次数	主动逃避时间(s)	电击次数	主动逃避时间(s)	Δ 电击次数	Δ 主动逃避时间(s)
单纯缺氧组	4.13 ± 1.25	3.74 ± 0.69	7.38 ± 1.06[b]	4.92 ± 0.85[a]	3.25 ± 1.49	1.18 ± 0.33
预缺氧复合缺氧组	4.25 ± 1.67	3.50 ± 0.81	5.63 ± 1.06[ad]	4.00 ± 0.94	1.38 ± 0.56[c]	0.50 ± 0.15[c]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与缺氧前比较; c: $P<0.05$, d: $P<0.01$, 与单纯缺氧组比较

3　讨论

20 世纪 90 年代 Kitagawa 等[3]发现短暂脑缺血能显著增强海马神经元对后续严重缺血的耐受能力,即脑的预缺血/缺氧现象。近年来,通过缺血/缺氧预处理提高脑缺氧耐受性的研究已成为一个热门领域[6]。脑缺血的本质是一个以脑缺氧为主的病理生理过程,而缺氧预处理较缺血预处理操作性强,更适用于临床。但是目前对预缺氧特别是低压性预缺氧减轻脑缺氧损伤的研究较少,对预缺氧导致的学习记忆等神经行为功能改变的研究更少。Gorgias 等[7]用浓度为 15% 或 10% 的氧进行预缺氧,能减轻大鼠缺氧时(氧浓度为 3%)海马神经元的损伤,10% 的预缺氧比 15% 具有更好的效果。给予大、小鼠含氧 8% ~11% 的混合气体,持续 2 ~8 h,24 h 后,神经元对严重缺血的耐受能力显著增强[8-10]。随着海拔高度的增加,氧分压随之降低。一般认为,处于海拔 3 000、5 000 m 和 10 000 m 高度时大概相当于吸入浓度为 15%、10% 和 3% 左右的氧。本研究表明,海拔 10 000 m,缺氧 1 h,可导致大鼠海马神经元发生明显的病理改变,TUNEL 及电镜检测示 CA1 区神经元细胞有凋亡、线粒体肿胀、嵴断裂等病理改变;采取海拔 5 000 m,每天 4 h,共 7 d 的预缺氧方案,结果显示,预缺氧能显著减轻缺氧导致的海马 CA1 区神经元病理损伤和凋亡,具有明显的神经保护作用。

我们利用大鼠穿梭箱观察了低压缺氧对大鼠学习记忆的影响以及预缺氧的保护作用。经过穿梭箱训练后,单纯缺氧组和预缺氧复合缺氧组大鼠均能建立起良好的条件反射,习得率分别为 66% 和 71%,训练后对两组的电击次数和主动逃避时间无显著差别,说明本实验所采用的预缺氧方式对大鼠学习和记忆能力没有明显的影响。缺氧后单纯缺氧组的电击次数和主动逃避时间比缺氧前显著增加。预缺氧复合缺氧组电击次数比缺氧前显著增加,但主动逃避时间没有显著性差异。缺氧前后两组大鼠电击次数和主动逃避时间的差值分析显示,预缺氧复合缺氧组电击次数和主动逃避时间的增加值显著低于单纯缺氧组($P<0.05$),说明预缺氧减轻了缺氧对大鼠记忆能力、反应能力的损害。海马 CA1 区神经元细胞病理变化是脑缺氧导致学习记忆功能下降的结构基础[3]。缺氧可降低突触传递,导致兴奋性神经毒作用,引起中枢神经递质代谢的紊乱,甚至使中枢神经细胞形态发生病理性变化,促进延迟性的神经元死亡,损害脑的高级功能。缺氧缺血后海马锥体神经元密度比正常对照组减少,神经元数目的减少是神经元坏死、崩解而消失的结果,神经元的改变影响了信息传递,导致学习记忆障碍等多种脑功能损害。因此,我们猜测预缺氧减轻缺氧对记忆能力、反应能力的损害,可能与其减轻海马神经元病理损伤和减少海马神经细胞的凋亡有关。

参考文献:

[1] Simonova Z, Sterbova K, Brozek G, *et al*. Postnatal hypobaric hypoxia in rats impairs water maze learning and the morphology of neurones and macroglia in cortex and hippocampus[J]. Behav Brain Res, 2003, 141(2): 195 -205.

[2] 鲁利群,赵聪敏,蒲昭霞. 环境刺激对缺氧缺血性脑损伤大鼠海马巢蛋白表达及学习记忆的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(8): 804 -806.

[3] Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, *et al*. "Ischemic tolerance" phenomenon detected in various brain regions[J]. Brain Res, 1991, 561(2): 203 -211.

[4] Ran R, Xu H, Lu A, *et al*. Hypoxia preconditioning in the brain[J]. Dev Neurosci, 2005, 27(2 -4): 87 -92.

[5] 周红梅,孔祥英,何念海,等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(19): 1973 -1975.

[6] Rybnikova E, Sitnik N, Gluschenko T, *et al*. The preconditioning modified neuronal expression of apoptosis-related proteins of Bcl-2 superfamily following severe hypobaric hypoxia in rats[J]. Brain Res, 2006, 1089(1): 195 -202.

[7] Gorgias N, Maidatsi P, Tsolaki M, *et al*. Hypoxic pretreatment protects against neuronal damage of the rat hippocampus induced by severe hypoxia[J]. Brain Res, 1996, 714(1 -2): 215 -225.

[8] Van-den-Beucken T, Koritzinsky M, Wouters B G. Translational control of gene expression during hypoxia[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(7): 749 -755.

[9] Bernaudin M, Nedelec A S, Divoux D, *et al*. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(4): 393 -403.

[10] Jones N M, Lee E M, Brown T G, *et al*. Hypoxic preconditioning produces differential expression of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and its regulatory enzyme HIF prolyl hydroxylase 2 in neonatal rat brain[J]. Neurosci Lett, 2006, 404(1 -2): 72 -77.

(编辑　龙　亮)