论著

文章编号:1000-5404(2007)22-2116-04

高压氧及低压氧预适应对家兔大脑中动脉闭塞后梗死灶体积的影响

邓聪颖,张礼均,李 飞,朱 刚,林江凯,王宪荣,冯 华 (第三军医大学西南医院神经外科,全军神经系统疾病微创诊治专科中心,重庆 400038)

提 要: 目的 观察高压氧预适应(hyperbaric oxygen preconditioning, HBOP)及低压缺氧预适应(hypobaric hypoxia preconditioning, HHP)对实验性家兔大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)后梗死灶体积的影响,探讨HBOP及HHP的神经保护作用。**方法** 雄性家兔72只,按随机数字表法分为单纯MCAO组、HBOP+MCAO组、HHP+MCAO组,采用改良Bederson法建立家兔MCAO模型,分别于MCAO后第1、3、10、20天观察家兔行为学、病理学及脑梗死灶体积的变化。**结果** 与单纯MCAO组比较,HBOP+MCAO组和HHP+MCAO组行为学评分明显改善($P<0.05$);HBOP+MCAO组和HHP+MCAO组的脑梗死灶体积于MACO后的第3、10、20天小于单纯MCAO组($P<0.05$),但HBOP+MCAO组和HHP+MCAO组之间没有显著性差异($P>0.05$)。**结论** HBOP和HHP能明显改善实验性MCAO家兔行为学,缩小梗死灶体积,对缺血性脑损伤有一定的神经保护作用。

关键词: 高压氧;低压缺氧;预适应;脑梗死灶体积

中图法分类号: R-332;R459.6;R743.330.2 **文献标识码**: A

Protective effects of different preconditioning methods on infarct volume after permanent middle cerebral artery occlusion in rabbits

DENG Cong-ying, ZHANG Li-jun, LI Fei, ZHU Gang, LIN Jiang-kai, WANG Xian-rong, FENG Hua (Department of Neurosurgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of hyperbaric oxygen preconditioning (HBOP) and hypobaric hypoxia preconditioning (HHP) on the infarct volume after permanent middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rabbits and investigate the neuroprotective effects of the 2 preconditioning methods. **Methods** Totally 72 male rabbits were randomly and equally divided into 3 groups, simple MCAO group, HBOP+MCAO group and HHP+MCAO group. The improved Bederson method was used to establish rabbits permanent MCAO model. The neurological deficits, pathological changes and infarct volumes were detected at 1, 3, 10 and 20 d after permanent MCAO. **Results** Compared with simple MCAO group, the score of neurological deficits was reduced significantly in HBOP group and HHP group at every time points after permanent MCAO ($P<0.05$). In the simple MCAO group, the score were (3.91±0.14), (3.42±0.47), (2.03±0.56) and (1.97±0.35) respectively, but for the HBOP and HHP groups, the scores were (3.58±0.27) and (3.47±0.46), (2.85±0.69) and (2.78±0.70), (1.63±0.81) and (1.59±1.02), and (1.55±1.12) and (1.41±0.82) respectively. The infarct volumes were (332.0±17.6) and (324.2±15.4), (202.2±12.2) and (208.1±12.1), and (195.3±14.3) and (201.9±9.9) in HBOP group and HHP group at 3, 10, 20 d after permanent MCAO, which was significantly lower than simple MCAO group. **Conclusion** HBOP and HHP can improve neurological deficits and reduce infarct volume in rabbits after permanent MCAO.

Key words: hyperbaric oxygen; hypobaric hypoxia; preconditioning; cerebral infarct volume

基金项目:国家"十一五"科技支撑计划(2006BAI01A13);全军医学科研"十一五"计划专项课题(06MB241)

Supported by the Supporting Project of the National "Eleventh Five-year Plan" (2006BAI01A13) and the Mandatory Project of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Sci & Tech of PLA (06MB241)

作者简介:邓聪颖(1972-),男,四川省资中县人,硕士研究生,主治医师,主要从事颅脑创伤方面的研究。电话:(023)68762170,E-mail: dcy6789zl@163.com

通讯作者:冯 华,电话:(023)68754153,E-mail: FengHua8888@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-08-30;**修回日期**:2007-10-18

预先给予机体某种刺激可以使机体产生对有害因素的耐受性或适应性增强，称为预适应[1]。目前低压缺氧预适应（hypobaric hypoxia preconditioning，HHP）对缺血性脑损伤的神经保护作用研究较广泛。1996 年 Wada 等[2]发现高压氧预适应（hyperbaric oxygen preconditioning，HBOP）对缺血性脑损伤有保护作用，但目前 HBOP 的研究仍然较少，且 HBOP 和 HHP 的神经保护作用谁更强呢？目前尚缺乏这方面的报道。本研究利用家兔大脑中动脉闭塞（middle cerebral artery occlusion，MCAO）模型，观察 HBOP 和 HHP 对 MCAO 家兔行为学、病理学及脑梗死灶体积的影响，探讨并比较 HBOP 和 HHP 对 MCAO 后脑梗死灶体积的作用及对缺血性脑损伤的神经保护作用。

1　材料与方法

1.1　动物及分组

体质量 2.0～2.5 kg，3～4 月龄的雄性家兔 72 只（第三军医大学实验动物中心提供），按随机数字表法分为单纯 MCAO 组、HBOP＋MCAO 组和 HHP＋MCAO 组，每组 24 只，每组下设 MCAO 后第 1、3、10、20 天 4 个时相点，每个时相点 6 只。

1.2　动物预适应方法

1.2.1　高压氧预适应　　动物放入高压氧动物舱（烟台冰轮氧舱厂生产），进舱后先用纯氧反复洗舱 10 min，使舱内氧浓度达到 100%，匀速加压 10 min 至 0.25 MPa，在高压下稳定 60 min 后，20 min 匀速减至常压，每天 1 次，共预适应 5 d 后进行实验[3]。

1.2.2　低压缺氧预适应　　动物放入低压氧舱内（烟台冰轮氧舱厂生产），连续缺氧饲养 3 d，舱内压力维持在 61.6 kPa（模拟海拔 4 000 m 的高原，舱内温度 18 ℃），每日开舱 2 次，每次 30 min，更换、添加食水，打扫舱内卫生，共预适应 3 d 后进行实验[4]。

1.3　动物模型制备

动物禁食但不禁水 12 h 后，采用改良 Benderson 法[5]，经眶后入颅制作家兔 MCAO 模型：不摘除右侧眼球，仅切开角膜，清除晶体和玻璃体，切开外眦，分离眶内组织，在眶后壁开窗，显露大脑中动脉主干。在外侧纹状体动脉进行电凝，以闭塞大脑中动脉，造成局灶性脑缺血。

1.4　行为学评分标准

参照 Bederson 法[5]行神经功能损害评分，0 分：无神经功能缺失；1 分：病灶对侧前爪曲屈；2 分：瘫痪侧不能够对抗来自对侧的推力；3 分：行走时转圈；4 分：摇动或行走时向瘫痪侧倾倒；5 分：神志恍惚或意识丧失。

1.5　梗死灶病理观察

动物麻醉成功后，打开胸腔，剪开右心房，于心尖部剪开左心室，插管至主动脉，注入 100 ml 生理盐水后，再注入 4% 多聚甲醛 250 ml 以灌注固定，断头取脑，多聚甲醛固定 24 h。常规脱水、透明、石蜡包埋、切片，厚度为 5 mm，行 HE 染色。

1.6　脑梗死灶体积测定

实验动物处死后，快速取脑，去掉嗅球、小脑和低位脑干，－20 ℃ 下冰冻 30 min。将脑冠状面切成 5 片，第 1 刀位于脑前极与视交叉连线中点处，第 2 刀位于视交叉，第 3 刀在漏斗部，第 4 刀在漏斗柄与叶尾极之间。用 4% 的 2,3,5-氯化三苯四氮唑（TTC）磷酸盐缓冲液染色，检测梗死灶体积大小。TTC 染色结果判定：正常脑组织区域染为红色，缺血梗死区脑组织为灰白色。梗死灶体积（V）按公式 $V = SD/2$ 计算［S 为每一脑片梗死灶面积（mm^2），D 为脑片厚度（mm）］，所有脑片梗死灶体积之和为脑梗死灶总体积。

1.7　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件进行处理，两组间资料比较行独立样本 t 检验，多组间资料比较行方差分析。

2　结果

2.1　行为学评分

与单纯 MCAO 组比较，HBOP＋MCAO 组和 HHP＋MCAO 组行为学评分在 MCAO 后第 1、3、10、20 天差异均有统计学意义（$P<0.05$），而 HBOP＋MCAO 组和 HHP＋MCAO 组两组间差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 1。

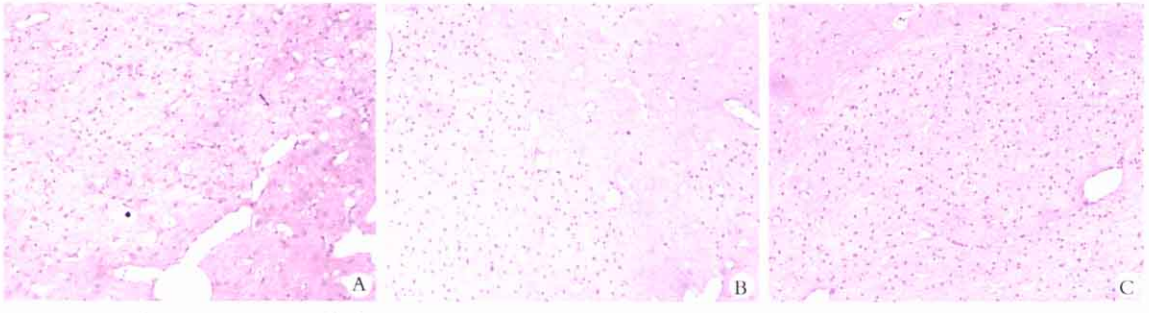
表 1　MCAO 后行为学评分比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	第 1 天	第 3 天	第 10 天	第 20 天
单纯 MCAO 组	3.91 ± 0.14	3.42 ± 0.47	2.03 ± 0.56	1.97 ± 0.35
HBOP＋MCAO 组	3.58 ± 0.27[a]	2.85 ± 0.69[a]	1.63 ± 0.81[a]	1.55 ± 1.12[a]
HHP＋MCAO 组	3.47 ± 0.46[a]	2.78 ± 0.70[a]	1.59 ± 1.02[a]	1.41 ± 0.82[a]

a：$P<0.05$，与单纯 MCAO 组比较

2.2　光镜观察

单纯 MCAO 组可见缺血区脑组织染色苍白，10 d 时梗死灶脑组织崩解成无结构的细颗粒状物，很少能看到细胞成分，神经纤维网呈空泡化；HBOP＋MCAO 组和 HHP＋MCAO 组可见胶质细胞增生，梗死灶边界较清楚（图 1）。



A：单纯 MCAO 组；B：HBOP＋MCAO 组；C：HHP＋MCAO 组

图 1　MCAO 后第 10 天时梗死灶边缘区神经元光镜观察（HE×20）

2.3 脑梗死灶体积

MCAO 后第 1 天时，3 组梗死灶体积无显著性差异（$P>0.05$），MCAO 后第 3、10、20 天时 HBOP + MCAO 组和 HHP + MCAO 组梗死灶体积明显小于单纯 MCAO 组（$P<0.05$），但 HBOP + MCAO 组和 HHP + MCAO 组间差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表 2。

表 2 MCAO 后不同时相点梗死灶体积的比较（mm^3，$\bar{x}\pm s$）

组别	第 1 天	第 3 天	第 10 天	第 20 天
单纯 MCAO 组	297.4 ± 24.1	375.6 ± 15.6	257.5 ± 9.4	231.5 ± 13.9
HBOP + MCAO 组	292.2 ± 19.3	332.0 ± 17.6[a]	202.2 ± 12.2[a]	195.3 ± 14.3[a]
HHP + MCAO 组	293.5 ± 18.7[a]	324.2 ± 15.4[a]	208.4 ± 12.1[a]	201.9 ± 9.9[a]

a：$P<0.05$，与单纯 MCAO 组比较

3 讨论

3.1 动物模型的可比性

家兔颅内主要供血动脉为颈内动脉，颅内外血管没有吻合网，颅内血管分支间的端-端吻合发达程度与人类类似，大脑中动脉主干阻断后，侧支循环代偿供血的影响很小，有利于梗死灶重复、稳定的建立。本实验均选取体质量 2.0 ~ 2.5 kg，3 ~ 4 月龄的雄性家兔，排除雌性家兔存在雌激素对实验结果的影响[6]。采用改良 Bederson 法[5] 经眶后入颅制作家兔大脑中动脉闭塞模型，预实验中曾行 DSA 造影证实大脑中动脉完全阻断。我们认为本模型对颅骨破坏小，较少影响邻近脑组织，失血少，术后感染少，病死率低，并且在直视下操作闭塞大脑中动脉，可靠性强。

3.2 预适应对家兔 MCAO 后脑梗死灶的影响

梗死灶体积测定是一种可靠的半定量测量局部细胞死亡数量的方法，目前的研究通常都以脑梗死灶体积来反映脑缺血损伤程度[7]。Wada 等[2] 于 1996 年证实高压氧预适应可使沙土鼠产生脑缺血耐受现象，他们把实验动物分成 HBOP 组和对照组，结果显示缺血再灌注后的第 7 天 HBOP 组海马 CA1 区的神经元数量明显比对照组多。Miljkovic-Lolic 等[7] 将雄性 SD 大鼠分为 HBOP 组和对照组，然后 MCAO 24 h，发现 HBOP 组的梗死灶体积（占半球体积的 27%）比对照组（占半球体积的 39%）明显减小。Miller 等[8] 报道，2 h 的缺氧预适应也可使其后缺血再灌注 48 h 的大脑中动脉梗死灶面积减少 46% ~ 64%。有研究者于 1977 年在狒狒 MCAO 模型中发现，缺血坏死区周围皮质局部脑血流量降至 15 ml/(100 g · min) 时，自主细胞活动消失，而细胞间隙 K^+ 浓度突然升高，神经细胞死亡，由此提出了坏死核心区（infarcted core，IC）和缺血半暗带（ischemia penumbra，IP）的概念，并进行了多方面研究，最终得到了病理生理、生理生化、局部脑血流及能量代谢等验证，证实缺血核心区是不可逆损害，而细胞功能停止但结构完整的半暗带区是可挽救区[9]。1998 年，Hakim 等[10] 从临床干预治疗的角度将半暗带定义为“潜在的可逆性缺血组织”。Chen 等[11] 报道，缺血预适应后的大鼠 MCAO 间隔 45 min，缺血再灌注作为预适应，分别在第 1、2、3、5、7、14 天行 MCAO 100 min，3 d 后观察到预适应后第 2、3、5 天组的脑组织 HSP70 表达明显增加，同时脑梗死灶体积明显减小，且梗死灶内神经元和胶质细胞中 HSP70 mRNA 和蛋白只有少量表达，但在梗死灶周边区即缺血半暗带区，神经元和胶质细胞有广泛的 HSP70 mRNA 和蛋白的表达；提示脑组织产生了缺血耐受主要是与半暗带有关。本实验结果表明，HBOP + MCAO 组和 HHP + MCAO 组动物的行为学评分明显高于单纯 MCAO 组；HBOP + MCAO 组、HHP + MCAO 组在家兔 MCAO 后的脑梗死灶体积和单纯 MCAO 组比较，HBOP + MCAO 组、HHP + MCAO 组从第 3 天开始明显缩小；梗死灶边缘区的病理表现提示 MCAO 后第 10 天时，HBOP + MCAO 组和 HHP + MCAO 组细胞成分明显多于单纯 MCAO 组。本实验从神经行为学、梗死灶体积及组织病理学 3 个层次均证明高压氧、低压缺氧预适应均能对家兔 MCAO 产生缺血耐受，对缺血性脑损伤有保护作用。但最佳的预适应方案及两种预适应具体的分子机制尚有待进一步研究。

3.3 两种预适应方法的比较

本研究表明，HBOP + MCAO 组和 HHP + MCAO 组在家兔 MCAO 后不同时间的行为学评分和脑梗死灶体积的相互比较中无明显差异，提示 HBOP 和 HHP 均有一定的神经保护作用。Wada 等[3] 的研究提示 HBOP 诱导的神经元缺血耐受可能和 HSP-72 的作用有关，还发现 HBOP 诱导的大鼠脑缺血耐受可能与 Bcl-2 的表达和锰过氧化物歧化酶的产生有关，而用低氧（8%）预处理新生大鼠 3、24 h 后予以缺血处理，发现低氧预处理后检测不到 HSP-72。Bergeron 等[1] 报道在新生大鼠中低氧预处理所诱导的脑保护作用与 HIF-1α 的全脑表达增加有关。虽然目前 HBOP 或 HHP 脑缺血耐受机制仍不清楚，且不同的预适应引起脑缺血耐受的机制可能不同，但越来越多的研究表明，两者的机制存在一定的相关性。Kim 等[12] 发现高压氧预适应组的过氧化氢酶的活性和过氧化氢酶基因的表达都比对照组高，而应用了过氧化氢酶抑制剂后，高压氧预适应缩小心肌梗死灶面积的作用消失，提示高压氧作用效应的机制可能与过氧化氢酶的作用有关。Nie 等[13] 研究发现在脊髓缺血再灌注损伤实验中，高压氧预适应组的过氧化氢酶和超氧化物歧化酶的活性都比对照组有明显提高，而在应用了过氧化氢酶抑制剂或氧自由基清除剂后，高压氧预适应所诱导

的脊髓缺血耐受作用明显减弱，进一步表明了过氧化氢酶和氧自由基在高压氧预适应中的作用。Rauca 等[14]对成年雄性 Wistar 大鼠作低氧预适应（9% O_2，91% N_2）1 h 发现，低氧预适应可阻止戊四氮的致痫作用，而用自由基清除剂 PBN 能阻止这种低氧预适应的保护作用。以上研究均提示氧自由基及其内源性清除酶系统参与了 HBOP 和 HHP 致脑缺血耐受的形成和发展，而且自由基可诱导 HIF-1α 表达上调，HIF-1α 的上调促进其下游基因的转录可提高低氧的耐受能力[1]。这也是 HBOP 和 HHP 的神经保护作用无明显差异的可能原因之一。HBOP 或 HHP 脑缺血具体耐受机制有待进一步研究。Wada 等[2]发现，采用 100% O_2，2 个大气压，每次 1 h，隔天 1 次，连续 3 次或 5 次的高压氧预适应能诱导大鼠脑缺血耐受，而采用 100% O_2，2 个大气压，每次 1 h，总共 1 次和 100% O_2，3 个大气压，每次 1 h，每天 1 次，连续 10 次的高压氧预适应却不能诱导大鼠脑缺血耐受。提示不同 HBOP 或 HHP 的强度和时间可能有不同的脑保护效果，其量效关系准备进行下一步研究。因低压氧舱不如高压氧舱普及，且低压氧舱是模拟高原低压缺氧状况，使用时有一定风险，因此我们认为高压氧的应用更安全方便，不存在伦理问题，高压氧预适应更值得在临床推广。

参考文献：

[1] Bergeron M, Gidday J M, Yu A Y, *et al*. Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain [J]. Ann Neurol, 2000, 48(3): 285 - 296.

[2] Wada K, Ito M, Miyazawa T, *et al*. Repeated hyperbaric oxygen induces ischemic tolerance in gerbil hippocampus[J]. Brain Res, 1996, 740(1 - 2): 15 - 20.

[3] 胡胜利，金清东，刘　智，等. 高压氧预适应对大鼠高原颅脑损伤的影响[J]. 军事医学科学院院刊, 2006, 30(6): 541 - 543, 561.

[4] 张礼均，胥全宏，邓聪颖，等. 高原大鼠实验性开放性颅脑创伤模型的建立[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(22): 2272 - 2275.

[5] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, *et al*. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472 - 476.

[6] 卞杰勇，王宇卉，张世明，等. 雌激素对大鼠局灶性脑缺血的保护作用[J]. 苏州大学学报：医学版, 2003, 23(4): 399 - 401.

[7] 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[J]. Brain Res, 2003, 971(1): 90 - 94.

[8] Miller B A, Perez R S, Shah A R, *et al*. Cerebral protection by hypoxic preconditioning in a murine model of focal ischemia-reperfusion [J]. Neuroreport, 2001, 12(8): 1663 - 1669.

[9] 芦鹏飞，吴　江. 缺血半暗带的影像学判定[J]. 中风与神经疾病杂志, 2006, 23(6): 748 - 750.

[10] Hakim A M. Ischemic penumbra: the therapeutic window[J]. Neurology, 1998, 51(3 Suppl 3): S44 - S46.

[11] Chen J, Graham S H, Zhu R L, *et al*. Stress proteins and tolerance to focal cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1996, 16(4): 566 - 577.

[12] Kim C H, Choi H, Chun Y S, *et al*. Hyperbaric oxygenation pretreatment induces catalase and reduces infarct size in ischemic rat myocardium[J]. Pflugers Arch, 2001, 442(4): 519 - 525.

[13] Nie H, Xiong L, Lao N, *et al*. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against spinal cord ischemia by upregulation of antioxidant enzymes in rabbits[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(5): 666 - 674.

[14] Rauca C, Zerbe R, Jantze H, *et al*. The importance of free hydroxyl radicals to hypoxia preconditioning[J]. Brain Res, 2000, 868(1): 147 - 149.

（编辑　郭建秀）

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是：凡是可以使用阿拉伯数字，而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字：

1　公历世纪、年代、年、月、日和时刻　　例如：公元前 5 世纪、20 世纪 90 年代、1995 年 6 月 8 日 14 时 30 分。

表示年份要写全称，1995 年不能写成 95 年或 95 年；1953 - 1958 年不能写成 1953 - 58 年。年月日可以写成 1995-06-08。时刻用“:”分隔的形式。如：13 时 45 分 8 秒可以写成 13:45:08。

2　计数和计量（整数、小数、分数、百分数、均数）包括序数、编号　　4 位和 4 位以上的数字采用三位分节法，不用“千分撇”，节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙（如 2,431 改为 2 431）。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节，也不加千分撇。尾数“0”多，5 位以上的数字，可以用“万”“亿”表示，但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示，例如 3 579 000 可写成 357.9 万但不能写成 3 百 57 万千或 357 万 9 千。

本刊编辑部