文章编号:1000-5404(2009)22-2175-03

论著

高压氧在新生鼠缺氧缺血性脑损伤神经修复中的作用机制

尹晓娟,周冬翠,安育林,罗分平,封志纯 (北京军区总医院附属八一儿童医院新生儿医学中心,北京 100700)

摘 要:目的 探讨高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)在新生鼠缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)神经修复中的作用机制。**方法** 新生7日龄SD乳鼠30只,随机分为HIBD+HBO干预组、HIBD组和正常对照组,每组10只。干预组于建模后予以HBO治疗,连续7 d。采用免疫组化技术检测各组骨形态发生蛋白4(BMP-4)及神经巢蛋白(nestin)在海马的表达;采用原位杂交技术检测各组BMP-4及nestin mRNA在海马的表达;采用TUNEL方法检测各组神经细胞凋亡。**结果** 3组中,干预组BMP-4蛋白在海马的表达最多,HIBD组BMP-4蛋白在海马的表达最少;干预组nestin蛋白在海马的表达最多,HIBD组nestin蛋白在海马的表达最少;干预组BMP-4 mRNA在海马的表达最多,HIBD组BMP-4 mRNA在海马的表达最少;干预组nestin mRNA在海马的表达最多,HIBD组nestin mRNA在海马的表达最少;HIBD组凋亡神经细胞最多,HBO干预组凋亡神经细胞与HIBD组差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** HBO对HIBD具有神经修复作用,其作用机制可能与促进BMP-4及nestin在海马的表达以及抑制神经细胞的凋亡有关。

关键词: 新生鼠;缺氧缺血性脑损伤;高压氧;骨形成蛋白4;神经巢蛋白
中图法分类号: R459.6;R741.02;R743.31 **文献标识码:** A

Function mechanism of HBO in neural repairation of neonatal rats after hypoxic-ischemic brain damage

YIN Xiao-juan, ZHOU Dong-cui, AN Yu-lin, LUO Fen-ping, FENG Zhi-chun (Centre of Neonatology, Bayi Children's Hospital, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 100700, China)

Abstract: Objective To investigate the function mechanism of hyperbaric oxygen (HBO) in neural repairation of neonatal rats after hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** Thirty 7-day-old rats were randomly divided into control group, HIBD group and HIBD+HBO group, with 10 rats in each. Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) and nestin protein in the hippocampus were determined with immunohistochemical method while their messenger ribonucleic acid (mRNA) were determined with *in situ* hybridization. Apoptosis of nerve cells was determined with TUNEL. **Results** Expression of BMP-4 and nestin protein in the hippocampus was the highest in HIBD+HBO group while their expression in HIBD group was lower than that in control group. Expression of BMP-4 and nestin mRNA in the hippocampus was the highest in HIBD+HBO group while their expression in HIBD group was lower than that in control group. Apoptosis of neural cells in HIBD group was the highest among the 3 groups while apoptosis of neural cells in HIBD+HBO group was lower than that in HIBD group ($P<0.01$). **Conclusion** HBO plays a role in nerve reparation, probably by promoting expression of BMP-4 and nestin in the hippocampus and inhibiting apoptosis of neural cells.

Key words: neonatal rat; hypoxic-ischemic brain damage; hyperbaric oxygen; bone morphogenetic protein-4; nestin

缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是指围生期窒息缺氧导致脑的缺氧缺血性损害。临床上出现一系列中枢神经异常的表现,是围生期足月儿脑损伤的最常见原因[1],常可引起脑瘫、癫痫、智力低下等严重后遗症,但目前对HIBD的治疗尚缺乏有效措施。鉴于新生儿HIBD对儿童产生的巨大危害,深入探索该病的发病机制和尝试可能有效的治疗方案已成为实验和临床的重要课题。国外试验及临床研究表明,在新生儿HIBD发生6 h内应用高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗疗效显著,促进远

基金项目:中国博士后基金(20070410505)
Supported by the China Postdoctoral Science Foundation(20070410505)
作者简介:尹晓娟,女,湖南省邵阳市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事新生儿疾病基础与临床方面的研究。电话:(010)84012199, E-mail:yyinxiaojuan@163.com
通信作者:封志纯,电话:(010)66721786, E-mail:zhjfengzc@126.com
收稿日期:2009-06-15;修回日期:2009-07-14

期修复[2-5];国内大量临床研究也表明 HBO 可以降低 HIBD 的伤残率和病死率[6,7]。但 HBO 治疗 HIBD 的疗效及具体作用机制尚未得出一致的结论。本研究通过建立新生鼠 HIBD 模型,以 HBO 作为干预措施,采用免疫组化、原位杂交以及 TUNEL 等主要技术,研究 HBO 对新生鼠 HIBD 起效的作用机制,为临床治疗 HIBD 提供有效的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物、分组及干预措施 新生 7 日龄 SD 乳鼠 30 只,出生体质量 10~12 g,洁净级,由军事医学科学院动物研究所提供。随机分为 3 组(每组 10 只):①正常对照组,0.1 mol/L PBS 臀部肌肉注射,10 μl·g^{-1}·d^{-1},连用 7 d;②HIBD 组,HIBD 模型建立后未采取任何干预措施;③HIBD + HBO 干预组,HIBD 模型建立后 6 h 行 HBO 干预,升压 10 min(0.002 MPa/min),稳压 20 min(0.2 MPa),降压 10 min(0.002 MPa/min),连用 7 d。

1.1.2 主要试剂 羊抗大鼠 BMP-4 多克隆抗体、小鼠抗大鼠 nestin 单克隆抗体、nestin 及 BMP-4 原位杂交试剂盒、细胞凋亡试剂盒、DAB 显色试剂盒、NBF/BCIP 显色试剂盒、SABC 试剂盒购自中杉公司,其他试剂为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 缺血缺氧模型建立,取材、固定及冰冻切片制作 参照文献[8]。新生 7 d SD 乳鼠深部分离左颈总动脉,结扎两端并剪断血管,动物术后 2~3 h,入 37 ℃水浴密闭缺氧箱(容积 10 L),持续充以 8% 浓度氧氮混合气体,气流量 0.5 L/min,维持 2.5 h。正常组不作任何处理,缺血缺氧组既做血管结扎又缺氧 2.5 h。各组动物在处死时相点用乙醚麻醉后开胸暴露心脏,主动脉插管,先用冷生理盐水 20 ml/kg 快速冲洗血液,然后取脑,大体观察脑外形及切面后,立即至 -30 ℃恒冷箱切片机中平衡 2 h 后沿视交叉中点处冠状冰冻切片,切片厚度 15 μm,蒙在预先用多聚赖氨酸处理的玻片上,切片室温干燥后分别做下一步实验。

1.2.2 3 组 BMP-4 及 nestin 蛋白在海马的表达 采用常规 SABC 免疫组化法,DAB 染色后两种蛋白呈黄色,镜下观察并摄片。BMP-4 及 nestin 蛋白定性标准:细胞质染成棕黄色者判为 BMP-4 及 nestin 蛋白表达阳性细胞。

1.2.3 3 组 BMP-4 及 nestin mRNA 在海马的表达 按原位杂交试剂盒操作步骤进行。BMP-4 及 nestin mRNA 存在于细胞质中,NBF/BCIP 显色后细胞质出现蓝色颗粒者判为杂交阳性信号表达。

1.2.4 3 组脑组织凋亡细胞检测 按细胞凋亡试剂盒进行,略加改良。4% 多聚甲醛溶液室温固定冰冻切片 5 μm 30 min;PBS 洗 10 min×3 次;0.3% H_2O_2-甲醇室温 30 min;PBS 洗 10 min×3 次;0.1% TritonX-100 在冰浴中孵育,37 ℃ 30 min;PBS 洗 10 min×3 次;加入 TUNEL 反应混合溶液,37 ℃ 60 min;PBS 洗 10 min×3 次;加入转化剂-POD 37 ℃ 60 min;PBS 洗 10 min×3次;滴加 DAB 底物溶液,室温孵育 5~20 min;PBS 洗 10 min×3 次;光镜下分析。阴性对照:加入 50 μl 0.1 mol/L PBS 代替 TUNEL 反应混合溶液。细胞核染成棕黄色者判为凋亡细胞。在 200 倍显微镜下进行细胞记数,以 100 个小格组成的大网格为 1 个视野。每个样本观察 3 张切片,每张切片随机选择 4 个视野,每小组每个样本共计数 12 个视野的阳性细胞数,然后分别计数 3 组凋亡细胞。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 海马 BMP-4 及 nestin 蛋白表达免疫组化染色结果

BMP-4 及 nestin 蛋白阳性表达呈棕黄色,位于细胞质内。3 组中 HBO 干预组 BMP-4 蛋白在海马的表达最多,HIBD 组 BMP-4 蛋白在海马的表达最少;3 组中 HBO 干预组 nestin 蛋白在海马的表达最多,HIBD 组 nestin 蛋白在海马的表达最少(图 1)。

2.2 不同处死时相点 BMP-4 及 nestin mRNA 表达原位杂交染色结果

BMP-4 及 nestin mRNA 存在于细胞质中,NBF/BCIP 显色后细胞质出现蓝色颗粒者判为杂交阳性信号表达。3 组中 HBO 干预组 BMP-4 mRNA 在海马的表达最多,HIBD 组 BMP-4 mRNA 在海马的表达最少;3 组中 HBO 干预组 nestin mRNA 在海马的表达最多,HIBD 组 nestin mRNA 在海马的表达最少(图 2、3)。

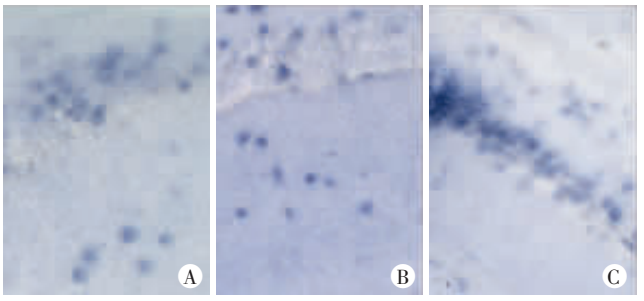
2.3 新生 SD 鼠脑组织凋亡细胞检测结果

3 组中 HIBD 组凋亡神经细胞最多(29.12 ± 0.31),HBO 干预组凋亡神经细胞(18.15 ± 0.43)较正常对照组(8.65 ± 0.01)多,3 组之间差异具有统计学意义($P < 0.01$)。



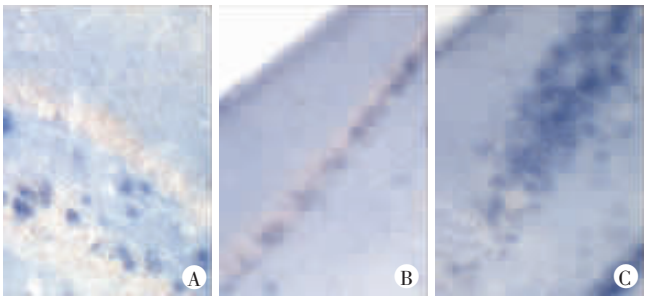
A:正常对照组; B:HIBD 组; C:HIBD + HBO 干预组

图 1 各组海马 nestin 蛋白表达 (SABC × 100)



A:正常对照组; B:HIBD 组; C:HIBD + HBO 干预组

图 2　各组海马 BMP-4 mRNA 表达　(NBF/BCIP 显色 ×100)



A:正常对照组; B:HIBD 组; C: HIBD + HBO 干预组

图 3　各组海马 nestin mRNA 表达　(NBF/BCIP 显色 ×100)

3　讨论

BMP-4 可以诱导神经干细胞(neural stem cells, NCSs)向神经元分化,也可促使其向星型胶质细胞分化。BMP-4 能诱导 NSCs 分化成具有胆碱能特性的细胞,通过独立的信号通路支持儿茶酚胺神经元分化; BMP-4 还能促进中枢神经系统干细胞分化为多种背侧神经系统和神经脊细胞类型以及促进神经胶质分化的产生[9]。NSCs 是具有多种分化潜能的细胞, 脑损伤后 NSCs 可被激活并分化为不同的神经细胞移行到相应部位进行神经重建,在脑损伤的修复中发挥重要作用[10,11]。高压氧可提高血氧分压,增加血氧含量,诱导神经系统对缺氧缺血损伤的耐受[12]。

本研究发现, HIBD 发生 7 d 后 HIBD 组 BMP-4 蛋白在海马的表达较正常对照组减少,而 HBO 干预组较正常对照组增加;HIBD 组 nestin 蛋白在海马的表达较正常对照组减少,而 HBO 干预组较正常对照组增加。同时,HIBD 发生 7 d 后,HIBD 组 BMP-4 mRNA 在海马的表达较正常对照组减少,而 HBO 干预组较正常对照组增加;HIBD 组 nestin mRNA 在海马的表达较正常对照组减少,而 HBO 干预组较正常对照组增加。以上提示, HBO 增加 BMP-4 蛋白和 BMP-4 mRNA 的表达,增加 nestin 蛋白和 nestin mRNA 的表达,BMP-4 及 nestin 参与 HIBD 的神经修复。本研究还发现,HBO 干预组凋亡神经细胞较正常对照组多,较 HIBD 组少,提示 HBO 能减少神经细胞凋亡。所以可以推测,HBO 对 HIBD 的治疗效应可能通过诱导自身神经干细胞的增殖分化及减少神经细胞的凋亡的作用机制而实现,同时通过 BMP-4 控制神经干细胞向神经元及星型胶质细胞分化的平衡。

新生儿缺氧缺血性脑损伤是围生期中的胎儿或新生儿由于各种因素引起的缺氧缺血、脑血流减少或暂停而导致的一种疾病,是新生儿期常见病、多发病,部分有后遗症。目前国内外尚无有效的治疗方法,探讨其可能的发病机制将有利于指导临床治疗。HBO 可能发挥重要作用。HBO 不仅能减少神经细胞凋亡的发生,而且能增加 BMP-4 及 nestin 蛋白、BMP-4 及 nestin mRNA 在海马的表达。

参考文献:

[1] Triulzi F, Parazzini C, Righini A. Patterns of damage in the mature neonatal brain[J]. Pediatr Radiol, 2006, 36(7): 608 - 620.

[2] Badr A E, Yin W, Mychaskiw G, *et al*. Dual effect of HBO on cerebral infarction in MCAO rats [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001, 280(3): R766 - R770.

[3] Calvert J W, Zhou C, Nanda A, *et al*. Effect of hyperbaric oxygen on apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model [J]. J Appl Physiol, 2003, 95(5): 2072 - 2080.

[4] Veltkamp R, Siebing D A, Heiland S, *et al*. Hyperbaric oxygen induces rapid protection against cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2005, 1037(1 - 2): 134 - 138.

[5] Nemoto E M, Betterman K. Basic physiology of hyperbaric oxygen in brain[J]. Neurol Res, 2007, 29(2): 116 - 126.

[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] 胡　电, 古　航, 洪新如, 等. 高压氧对窒息新生儿血中孤啡肽含量的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26(4): 200 - 202.

[8] 尹晓娟, 巨　容, 封志纯. 新生鼠缺氧缺血性脑病动物模型的建立及神经干细胞在缺氧缺血性脑病中的变化规律探讨[J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(8): 572 - 575.

[9] 杨　辉, 刘柏炎, 蔡光先. BMP4 对神经系统发育和分化影响研究进展[J]. 医学研究杂志, 2006, 35(11): 85 - 87.

[10] An Y H, Wan H, Zhang Z S, *et al*. Effect of rat Schwann cell secretion on proliferation and differentiation of human neural stem cells [J]. Biomed Environ Sci, 2003, 16(1): 90 - 94.

[11] Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, *et al*. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors[J]. Cell, 2002, 110(4): 429 - 441.

[12] 卢培刚, 冯　华, 王宪荣, 等. 高压氧预处理对大鼠脊髓损伤后 GFAP 和巢蛋白表达的影响[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2008, 7(2): 149 - 153.

(编辑　汪勤俭)