论著

文章编号:1000-5404(2009)18-1770-04

高压氧对胆红素脑病新生鼠海马神经细胞凋亡和学习记忆的影响

谷献芳,华子瑜 (重庆医科大学附属儿童医院新生儿内科,重庆 400014)

摘 要:目的 探讨高压氧对胆红素脑病新生大鼠的海马神经细胞凋亡和学习记忆的影响,明确高压氧是否对胆红素的神经毒性有保护作用。**方法** 5日龄SD大鼠145只,雌雄不限,完全随机法分为3组:生理盐水对照组、胆红素脑病模型组、高压氧干预组。分别于小脑延髓池内注射生理盐水或等量10 mg/ml胆红素溶液,免疫组化法和免疫荧光法分别检测各组海马神经元细胞色素C和Caspase-3表达的动态变化,TUNEL法检测细胞凋亡,水迷宫实验测试学习记忆能力。**结果** 高压氧干预后海马神经细胞在各时间点,细胞色素C和Caspase-3表达均明显低于模型组,高于对照组($P<0.05$);高压氧干预组TUNEL阳性细胞率(27.2±1.8)%明显少于模型组(37.6±6.6)%($P<0.05$);水迷宫实验:高压氧干预组在各时间点找到安全平台的潜伏期均明显短于模型组($P<0.05$),穿越平台次数是模型组的8倍。**结论** 高压氧治疗可能通过抑制线粒体途径中细胞色素C和Caspase-3的表达抑制神经细胞凋亡,减轻胆红素对海马神经元的毒性,从而减轻胆红素相关性脑损伤所致的学习记忆障碍。

关键词: 高压氧;胆红素脑病;细胞色素C;Caspase-3;海马神经元
中图法分类号: R338.26;R459.6;R722.170.6 **文献标识码:** A

Hyperbaric oxygenation attenuates hippocampal neuron apoptosis and cognitive impairment in newborn rats with bilirubin encephalopathy

GU Xian-fang, HUA Zi-yu (Department of Internal Medicine for Neonates, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of the hyperbaric oxygenation therapy on the apoptosis of the hippocampal neuron and the impairment of cognitive function of the newborn rats suffering from bilirubin encephalopathy. **Methods** One hundred and forty-five five-day-old SD rats of both sex were randomly divided into 3 groups, control group, bilirubin encephalopathy group and hyperbaric oxygenation treated group. Bilirubin (10 mg/ml) was injected into the cerebellomedullary cistern to establish experiment model, and normal sodium was injected for control. The expression of cytochrome C and Caspase-3 in the hippocampus neurons were detected by immunohistochemistry and immunofluorescence, respectively, at the time of 6 h, 1, 3, 5 d and 7 d after intra-cisternal injection. Neuronal apoptosis was checked by TUNEL method. The cognitive function was tested by Morris experiment. **Results** The expressions of the cytochrome C and Caspase-3 in hyperbaric oxygenation treated group were lower than those in bilirubin encephalopathy group, but higher than control group at above-mentioned time points ($P<0.05$). The TUNEL positive cell rate in hyperbaric oxygenation treated group [(27.2±1.8)%] was lower than that in bilirubin encephalopathy group [(37.6±6.6)%] ($P<0.05$). In Morris experiment, the rats of hyperbaric oxygenation treated group were easier to find the safe platform than those of bilirubin encephalopathy group, and the frequency of crossing the safe platform were eight times higher to bilirubin encephalopathy group ($P<0.05$). **Conclusion** By reducing the expressions of cytochrome C and Caspase-3,

作者简介: 谷献芳,女,河南省开封市人,硕士,医师,主要从事新生儿黄疸方面的研究。E-mail:xianfanggu@sina.com.cn
通信作者: 华子瑜,E-mail:ziyu_h@yahoo.com.cn
收稿日期: 2008-12-09;**修回日期:** 2009-02-17

hyperbaric oxygenation therapy inhibits bilirubin-induced hippocampal neuron apoptosis. Thus, it improves cognitive function of the neonatal rats suffering from bilirubin encephalopathy.

Key words: hyperbaric oxygenation; bilirubin encephalopathy; cytochrome C; Caspase-3; hippocampal neurons

胆红素脑病是新生儿病理性黄疸的严重并发症[1]。研究表明,胆红素可能通过影响线粒体的通透性而释放细胞色素 C,再作用于半胱氨酸蛋白酶(Caspase),产生一系列瀑布式级联放大反应,从而可导致神经细胞凋亡的发生[2-4]。迄今为止,胆红素脑病以预防为主,国内外尚无特效治疗。近年来,高压氧用于治疗多种脑损伤,临床效果明显。它通过收缩脑血管减轻脑水肿,提高机体血氧含量,增加血氧分压,增强血氧弥散能力,由此改善机体对氧的摄取和利用,改善大脑微循环等以保护大脑[5]。同时,高压氧还能改善肝肾功能,有效抑制内源性毒性产物的损害,对脑起保护作用[5-7]。Weaver 等[8]证实,高压氧可以减轻脑损伤引起的学习记忆障碍。海马是大脑边缘系统的重要组成部分,与学习和记忆功能关系密切[9]。本实验选取海马作为研究对象,通过高压氧干预新生鼠胆红素脑病模型,明确高压氧对胆红素脑病动物海马神经元的影响及可能机制。

1　材料与方法

1.1　动物与分组

145 只 5 日龄的 SD 大鼠[购自重庆医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(渝)20020001],体质量 7 ~ 14 g,雌雄不限,完全随机法分成 3 组:生理盐水对照组(n = 45)、胆红素脑病模型组(n = 45)、高压氧干预组(n = 55),每组大鼠分为 6 h、1、3、5、7 d 5 个时间点(每个时间点 8 只),另外,高压氧干预组在 12 h、2 d 时间点还各有 5 只。水迷宫实验中 3 组均为 5 只(实验过程中操作失败和死亡的动物不计数在内)。

1.2　动物模型制备

经小脑延髓池注射胆红素溶液制作胆红素脑病动物模型[10]。对照组和模型组处于常压空气环境中,分别于 6 h、1、3、5、7 d 相应时间点迅速断头取脑固定于 4% 多聚甲醛中。高压氧干预组:注射胆红素溶液后 2 h,将动物模型置于高压氧舱内,纯氧洗舱 10 min,升压 20 min 至舱内压力为 2.0 ATA,稳压吸氧 60 min,减压 20 min;各亚组在高压氧干预后相应时间点留取脑组织标本。在连续高压氧干预 8 次后,放回母鼠笼内饲养至 28 d 与对照组和模型组同时做水迷宫实验。

1.3　方法

1.3.1　S-P 法检测海马神经细胞细胞色素 C 的表达　　免疫组织化学试剂盒购于北京中杉公司。具体操作按说明书进行,以细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性细胞。每张切片在 10 × 40 倍显微镜下随机选 5 个视野计算光密度值,求其均值。

1.3.2　免疫荧光化学方法检测海马神经细胞 Caspase-3 的表达　　免疫荧光化学试剂盒(FITC 标记)购于北京中杉公司。具体操作按说明书进行,以细胞质内见绿色荧光物质表达为阳性细胞。每张切片在 10 × 40 倍显微镜下随机选 5 个视野计算灰度值,求其均值。

1.3.3　原位末端标记法检测海马神经细胞凋亡　　TUNEL 试剂盒购于德国 Roche 公司。具体操作按试剂盒说明书进行,结果判断以阳性和阴性对照为参照,细胞核呈棕黄色或棕褐色为阳性细胞。根据阳性细胞分布情况,每张切片在 10 × 40 倍显微镜下观察海马神经细胞,随机选取 5 个视野计数细胞总数及阳性细胞数,计算阳性率,求其均值。

1.3.4　Morris 水迷宫测试　　参考文献[11]方法,如在 60 s 内未找到安全平台,则潜伏期值记为 60 s。每只大鼠每天测 1 次,共测试 8 d,前 3 d 为学习阶段,第 4 ~ 7 天进行定位航行能力测试,第 8 天通过记录大鼠在 120 s 内穿越平台的次数进行空间探索能力测试。

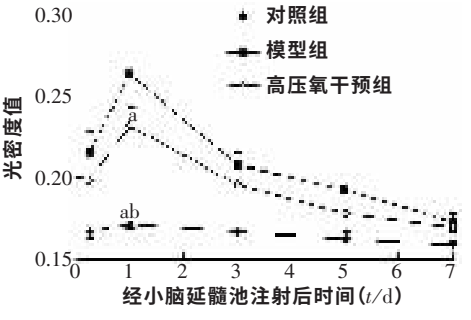
1.4　统计学处理

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 8.2 统计软件进行方差分析。

2　结果

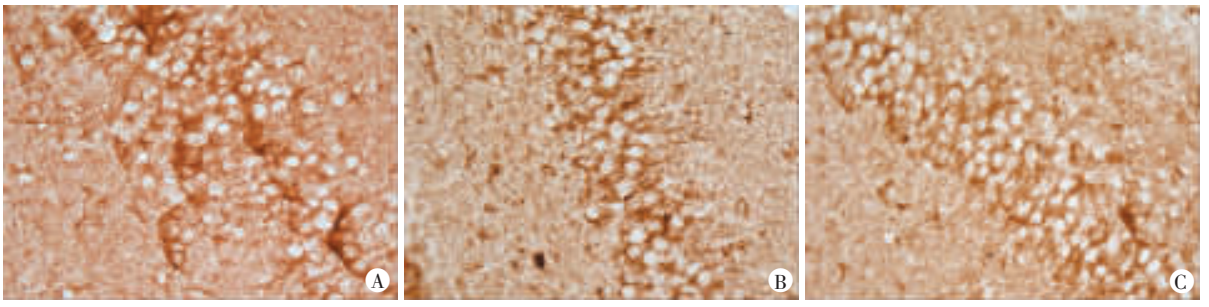
2.1　免疫组织化学方法检测海马神经细胞细胞色素 C 的表达

对照组各时间点细胞色素 C 低表达($P > 0.05$);模型组6 h 细胞色素 C 的表达明显,1 d 时达高峰,以后逐渐回降;高压氧干预组表达趋势和模型组相似,6 h 至 5 d 均明显低于同一时间点模型组($P < 0.05$),高于对照组($P < 0.05$),7 d 时和模型组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1、2。



a: $P < 0.05$,与模型组比较; b: $P < 0.05$,与高压氧干预组比较

图 1　免疫组化法检测不同时点各组新生大鼠海马神经细胞细胞色素 C 的表达

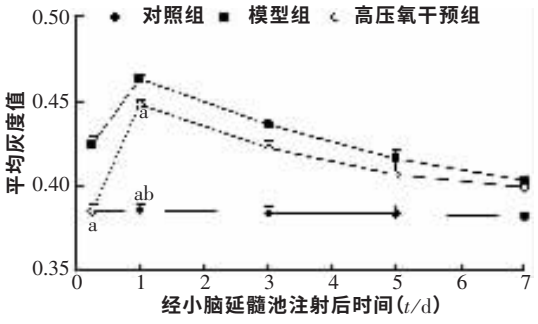


A:模型组;B:高压氧干预组;C:对照组

图2　免疫组织化学方法检测经小脑延髓池注射后1 d CA3区海马神经元细胞质中细胞色素C的表达　(S-P×400)

2.2　免疫荧光方法检测海马神经细胞Caspase-3的表达

对照组各时间点Caspase-3低表达($P>0.05$);模型组6 h Caspase-3表达明显,1 d时达高峰,以后逐渐回降;高压氧干预组在6 h表达与对照组相同,均明显低于模型组($P<0.05$),其余时间点高压氧干预组与模型组呈相似趋势,3组间比较差异有统计学意义($P<0.05$),7 d时高压氧干预组和模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图3、4。



a: $P<0.05$,与模型组比较; b: $P<0.05$,与高压氧干预组比较

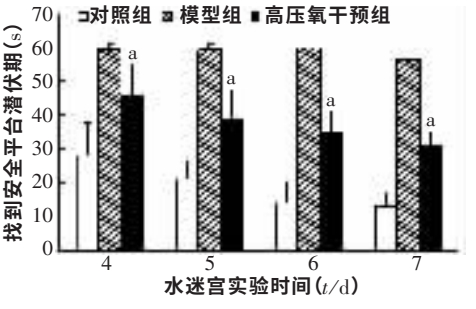
图3　免疫荧光法检测各组新生大鼠不同时间点海马神经细胞Caspase-3的表达

2.3　TUNEL法检测海马神经细胞凋亡

高压氧干预组6 h TUNEL阳性率为(17.8±3.6)%,1 d时达高峰[(27.2±1.8)%],以后逐渐回降,72 h时降至(21.8±1.9)%。1 d时,对照组、模型组和高压氧干预组TUNEL阳性率差异有统计学意义($P<0.05$),分别为(7.6±2.1)%、(37.6±6.6)%、(27.2±1.8)%。

2.4　水迷宫实验结果

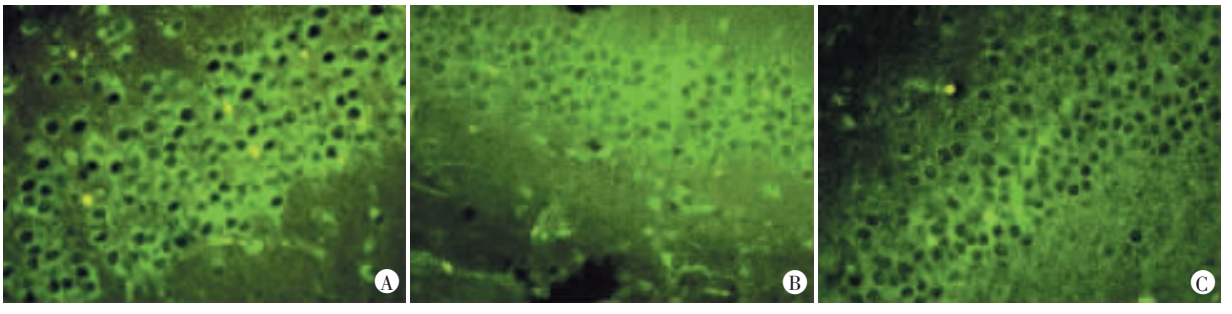
2.4.1　定位航行实验测试结果　在定位航行能力测试中,模型组搜索安全平台的潜伏期各时间点差异无统计学意义($P>0.05$),而对照组和高压氧干预组潜伏期随实验天数的增加均逐渐缩短,高压氧干预组在各时间点的潜伏期较模型组明显缩短($P<0.05$,图5)。



a: $P<0.05$,与模型组比较

图5　水迷宫实验3组动物在4个时间点找到安全平台的潜伏期比较

2.4.2　空间探索实验测试结果　对照组在安全平台所在象限的搜寻时间最长,穿越平台次数最多;模型组在安全平台所在象限的搜寻时间及其百分比较对照组和高压氧干预组明显降低($P<0.05$),穿越平台次数也少于对照组和模型组(表1)。



A:模型组;B:高压氧干预组;C:对照组

图4　免疫荧光法检测经小脑延髓池注射后6 h CA3区海马神经元Caspase-3的表达　(×400)

表 1　3 组大鼠在安全平台所在象限的游泳时间和穿过平台次数的比较

组别	游泳时间(s)	游泳时间百分比(%)	穿越平台次数
对照组	41.68 ± 16.25	34.74	21
模型组	18.05 ± 6.51[a]	14.00	2
高压氧干预组	32.79 ± 20.87[b]	27.33	16

a:$P<0.05$,与对照组比较; b:$P<0.05$,与模型组比较

3　讨论

本实验发现高压氧干预组进食、活动较模型组好,成活率(85%)高于模型组(60%),光镜下海马神经细胞凋亡和坏死减少,提示高压氧对新生鼠海马神经元有一定的保护作用。前期研究证实,胆红素可引起海马神经细胞凋亡,且在起病后 1 d 达凋亡高峰[10]。本实验发现,高压氧治疗不能延迟胆红素引起的海马神经细胞凋亡高峰出现,但可以降低凋亡高峰值,提示高压氧可部分对抗胆红素对海马神经元的毒性。高压氧干预组在同一时间点细胞色素 C 的表达明显低于模型组($P<0.05$),提示高压氧对胆红素脑病模型的抗凋亡机制可能与稳定线粒体结构、抑制线粒体通透性转换孔的开放、阻止细胞色素 C 从线粒体释放入细胞质有关。但是,高压氧干预组细胞色素 C 表达仍明显高于同一时间点对照组($P<0.05$),说明高压氧对抗胆红素引起脑损伤的保护作用有限。3 组 Caspase-3 的表达随时间动态变化,表明 Caspase-3 参与胆红素诱导的神经细胞凋亡,且作为下游凋亡效应因子起关键作用;高压氧可能通过抑制 Caspase-3 的表达和激活,减轻胆红素对海马神经细胞的毒性。

水迷宫实验结果提示,高压氧可以减轻胆红素引起的学习记忆障碍。解剖发现,模型组脑软化明显,脑实质基本消失,提示胆红素对脑组织的毒性作用很强,严重影响大鼠的学习记忆能力。高压氧干预组大鼠尚可保留有小部分脑实质,说明高压氧治疗对抗胆红素神经毒性的作用有限,只能使小部分脑实质得以保留,但是脑的代偿能力很强,残存的部分脑组织足以明显改善胆红素脑病动物的学习记忆能力。

综上所述,高压氧治疗对胆红素引起的神经损伤有一定的效果,抑制细胞凋亡可能是其机制之一。但是单纯的高压氧治疗效果有限,并不能完全阻止胆红素诱导的神经细胞凋亡和学习记忆障碍。从病理机制与高压氧的防治作用推断,高压氧治疗的越早[12],胆红素引起的脑损伤和脑水肿会越轻。本研究初步肯定了高压氧对胆红素脑病的疗效,但有关高压氧何时干预效果较好、用何种压力更合适及疗程还需要进一步的探索。

(致谢:感谢重庆医科大学儿科研究所的张晓平老师、动物实验中心黄道超老师在实验过程中给予的耐心指导和热心帮助。感谢第三军医大学微生物学教研室饶贤才教授在文章修改中给予的积极建议和帮助!)

参考文献:

[1] AAP-Subcommittee on Neonatal Hyperbilirubinemia. Neonatal jaundice and kernicterus[J]. Pediatrics, 2001, 108(3): 763 – 765.

[2] Rodrigues C M, Sola S, Castro R E, *et al*. Perturbation of membrane dynamics in nerve cells as an early event during bilirubin-induced apoptosis[J]. J Lipid Res, 2002, 43(6): 885 – 894.

[3] Natoni A, Kass G E, Carter M J, *et al*. The mitochondrial pathway of apoptosis is triggered during feline calicivirus infection[J]. J Gen Virol, 2006, 87(Pt 2): 357 – 361.

[4] Yuan J. Divergence from a dedicated cellular suicide mechanism: exploring the evolution of cell death[J]. Mol Cell, 2006, 23 (1): 1 – 12.

[5] 吴钟琪. 高压氧在儿科及产科的应用[M]. 北京: 人民军医出版社, 2004: 98 – 99.

[6] 方　琦, 陈贵阳, 赵革灵, 等. 早期高压氧综合治疗小儿急性偏瘫[J]. 小儿急救医学, 2002, 9 (1): 29.

[7] 李温仁, 倪国坛. 高压氧医学[M]. 上海: 海科学技术出版社, 1998: 378.

[8] Weaver L K, Valentine K J, Hopkins R O. Carbon monoxide poisoning: risk factors for cognitive sequelae and the role of hyperbaric oxygen [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176(5): 491 – 497.

[9] Rossato J I, Bevilaqua L R, Myskiw J C, *et al*. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory[J]. Learn Mem, 2007, 14(1): 36 – 46.

[10] 胡　影, 田巧红, 华子瑜, 等. 小脑延髓池注射胆红素溶液建立新生大鼠胆红素脑病模型的评价[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(2): 177 – 181, 244.

[11] Morris R. Developments of water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. J Neurosci Methods,1984,11(1): 47 – 60.

[12] 肖平田. 提高高压氧治疗时机与剂量意识, 加强其时效与量效研究[J]. 医学临床研究, 2004, 21(6): 577 – 580.

(编辑　龙　亮)