文章编号:1000-5404(2013)10-0977-04

论著

高压氧预适应的小鼠缺血脑保护作用及对P2X7受体表达的影响

邹永杰,黄宇星,李雨泓,陈渝杰,傅楚华,崔高宇,冯 华 (400038 重庆,第三军医大学西南医院神经外科,全军神经外科研究所,全军神经创伤防治重点实验室)

[摘要] **目的** 研究高压氧预适应(hyperbaric oxygen preconditioning, HBOP)对小鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)的保护作用及对其脑内P2X7受体(P2X7R)表达的影响。**方法** 将72只雄性C57BL/6小鼠分为:假手术组(sham)、高压氧预适应假手术组(HBOP + sham)、单纯MCAO组(MCAO)、高压氧预适应MCAO组(HBOP + MCAO)。通过线栓法建立小鼠MCAO模型,术后24 h采用Longa法对小鼠进行神经功能学评分,氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法判断脑梗死情况,TUNEL法观察神经细胞凋亡情况,实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法观察P2X7受体mRNA的表达。**结果** MCAO建模后24 h,HBOP + MCAO组神经功能学评分明显低于MCAO组(2.33 ± 0.44 *vs* 2.89 ± 0.59, $P<0.05$);HBOP + MCAO组脑梗死范围明显小于MCAO组[(44.08 ± 8.46)% *vs* (63.00 ± 5.25)%, $P<0.05$];HBOP + MCAO组凋亡阳性细胞数和P2X7R mRNA表达水平也明显低于MCAO组($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 高压氧预适应可以减轻实验性MCAO小鼠的神经功能学损害,缩小梗死灶体积,减少细胞凋亡,具有明确的脑保护作用,其保护作用可能与延缓MCAO后P2X7R的表达升高有关。

[关键词] 高压氧预适应;大脑中动脉闭塞;P2X7受体;神经保护
[中图法分类号] R394.1;R459.6;R743.31 [文献标志码] A

Effects of hyperbaric oxygen preconditioning on expression of P2X7 receptor and its neuroprotection for cerebral ischemia in mice

Zou Yongjie, Huang Yuxing, Li Yuhong, Chen Yujie, Fu Chuhua, Cui Gaoyu, Feng Hua (Department of Neurosurgery, Institute of Neurosurgery, Key Laboratory of Neurotrauma Prevention and Treatment, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the neuroprotective effect of hyperbaric oxygen preconditioning (HBOP), and the effect of HBOP on the expression of P2X7 receptor in mouse middle cerebral artery occlusion (MCAO). **Methods** Total 72 C57BL/6 mice were divided into 4 groups: sham-operated group, HBOP + sham-operated group, MCAO group and HBOP + MCAO group. The MCAO model was established by suture occluded method. The neurological deficits and infarct volumes were detected at 24 h after MCAO in mice. The apoptotic cells were detected by using the terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling(TUNEL). The expression of P2X7 receptor mRNA was determined by RT-QPCR. **Results** Compared with MCAO group, the scores of neurological deficits were reduced obviously in HBOP + MCAO group ($P<0.05$); compared with the MCAO group, the rate of infarct volumes decreased significantly in HBOP + MCAO group ($P<0.05$); compared with MCAO group, the apoptotic cells were significantly diluted in HBOP + MCAO group ($P<0.05$); compared with MCAO group, the expression of P2X7 receptor mRNA was reduced in HBOP + MCAO group ($P<0.01$). **Conclusion** The results suggest that the HBOP have a absolutely neuroprotective effect, it can attenuate the injury of the experimental MCAO model, reduce the infarct volume and dilute the apoptosis, and the neuroprotective effect maybe concerned with the delayed of P2X7 receptor's expression after MCAO.

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30973100);国家自然科学基金青年科学基金(81000532)
[通信作者] 冯 华,E-mail:fenghua8888@yahoo.com.cn
崔高宇,E-mail:cgaoyu@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130201.1715.005.html(2013-02-01)

[**Key words**] hyperbaric oxygen preconditioning; middle cerebral artery occlusion; P2X7 receptor; neuroprotection

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30973100) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China(81000532). Corresponding author: Feng Hua, E-mail: fenghua8888@yahoo.com.cn; Cui Gaoyu, E-mail: cgaoyu@sina.com

脑缺血是神经外科术后常见的并发症,在神经外科手术中发生率极高。研究[1]表明,低压氧预适应及缺血预适应对于缺血性脑损伤有保护作用,但该两种预适应方法均为损伤因素,其临床应用受限。高压氧预适应(hyperbaric oxygen preconditioning, HBOP)由于其明显的安全性和伦理学优势,在外科手术等方面得到了广泛的应用。研究[2]表明,HBOP能诱导海马神经元对脑缺血的耐受程度,具有脑保护作用,但其作用机制仍不明确。近年来的研究[3-6]发现,P2X7R在缺血性脑损伤中扮演了重要角色,而且我们前期研究[7]发现高压氧能调节P2X7R的表达水平。因此,本研究利用小鼠的大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,观察HBOP对实验性MCAO的神经保护作用并初步探讨P2X7R在其中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级健康雄性C57BL/6小鼠72只,体质量22~25 g(第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供),分为假手术组(sham)、高压氧预适应假手术组(HBOP + sham)、单纯MCAO组(MCAO)、高压氧预适应MCAO组(HBOP + MCAO)4个组,每组18只。

1.2 实验方法

1.2.1 高压氧预适应方法 按照本课题组已建立的方法[7]进行高压氧预适应。将C57小鼠置于高压氧舱内(烟台冰轮氧舱厂生产),舱内温度22~25 ℃,密闭舱门,以输入氧流量5 L/min洗舱10 min,使舱内氧浓度>98%;关闭排气阀,调整进气流量,使舱内压力于15 min内加压至2.5个大气压(0.15 MPa),稳压120 min;稳压结束后匀速减压15 min至常压;1次/d,共5 d。

1.2.2 MCAO动物模型制备 在文献[8]的基础上建立改良的线栓法小鼠MCAO模型:实验动物术前12 h禁食,自由饮水。1%戊巴比妥钠50 mg/kg腹腔注射麻醉后,仰卧位固定,取颈部正中切口分离并显露颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉。先分别在颈总动脉和颈内动脉近心端用3/0丝线结扎,再在颈外动脉远心端用6/0丝线结扎,并在其近心端预留6/0结扎线,在颈外动脉结扎线与预留线之间用显微剪刀剪一小口,向内送入栓线送至颈总动脉内,结扎预留丝线,松开颈总动脉及颈内动脉结扎线后,将栓线回抽并送入颈内动脉颅内段直至遇到阻力,进线深度约距颈总动脉分叉处0.8~0.9 cm,手术时间为10~15 min。sham组、HBOP + sham组小鼠建模过程同MCAO组,但栓线插入约0.5 cm后抽出。HBOP + MCAO组于最后1次预适应后24 h建模。

1.2.3 神经功能学评分 MCAO建模后24 h,采用Longa法[9]对小鼠进行评分:0分,无神经损伤;1分,提尾时对侧前肢内收屈曲,不能完全伸展(轻度神经损伤);2分,爬行时向对侧旋转,划圈(中度神经损伤);3分,站立时向对侧倾倒(重度神经损伤);4分,无自主活动伴意识障碍。

1.2.4 脑梗死率测定 MCAO建模后24 h,每组取6只小鼠,1%戊巴比妥钠深度麻醉后断头取脑,于-20 ℃速冻20 min后,切成1 mm厚片,将切片置于2%的2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑(TTC,Sigma公司)磷酸盐缓冲液中,37 ℃避光孵育10 min后,于10%中性甲醛中固定12 h。将甲醛固定好的切片通过数码相机拍照采集后,用Image Pro Plus 6.0对所得结果进行分析,根据Swanson等[10]的方法测得梗死率:梗死率=(正常侧体积-梗死侧正常体积)/正常侧体积×100%。

1.2.5 原位末端标记技术法(TUNEL)检测细胞凋亡 MCAO建模后24 h,灌注取脑,石蜡包埋后,常规组织切片。按照Roche公司操作说明进行简单流程:脱蜡→3% H_2O_2甲醇溶液封闭10 min→20 μg/mL的蛋白酶K通透15 min→20%胎牛血清+3% BSA封闭30 min→滴加rTdT反应混合液,并在37 ℃暗湿盒内孵育1 h→滴加转化剂-POD(converter-POD),孵育30 min→DAB显色、苏木精复染。

1.2.6 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测P2X7R mRNA表达 MCAO建模后24 h,每组各取6个样本,检测P2X7R的mRNA表达水平。P2X7R上游引物:5′-CCTTCGTCCCCGGCTACAA-3′,下游引物:5′-GTGCCGAAAACCAGGATGTC-3′,大小为127 bp;选取β-actin为内参,上游引物:5′-ACCCCGTGCTGCTGACCGAG-3′,下游引物:5′-TCCCGGCCAGCCAGGTCCA-3′,大小为249 bp。20 μL的反应扩增体系:cDNA 2.0 μL、P2X7R上下游引物各0.5 μL、SYBR Green Reatime PCR Master Mix 10 μL、ddH_2O 7.0 μL。反应程序:94 ℃预变性5 min,94 ℃变性30 s,57 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s共30个循环;最后72 ℃延伸10 min。每个样品各平行3次。数据经$2^{-\Delta\Delta Ct}$处理后行相对表达量分析。

1.3 统计学分析

所有数据以$\bar{x} \pm s$表示,应用SPSS 17.0统计软件,组间差异行单因素方差分析。

2 结果

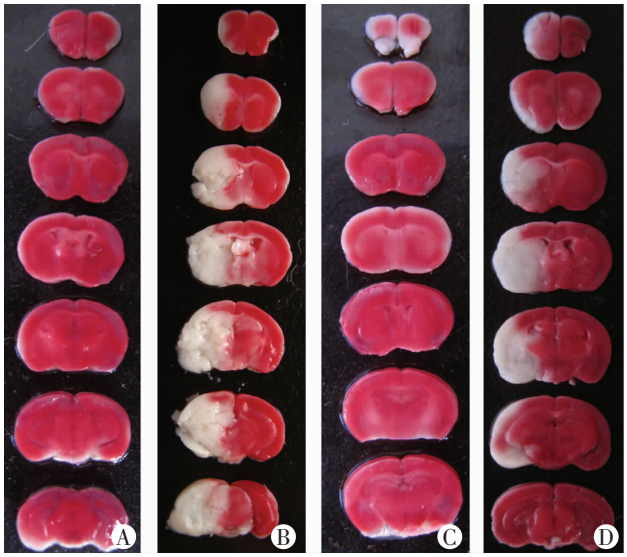
2.1 神经功能学评分

sham组及HBOP + sham组小鼠神经功能均无缺损,神经功

能学评分为 0 分。MCAO 组 24 h 后神经功能评分为(2.89 ± 0.59)分,HBOP + MCAO 组 24 h 后神经功能评分为(2.33 ± 0.44)分,HBOP + MCAO 组评分明显低于 MCAO 组(P < 0.05)。

2.2 脑梗死范围测定

sham 组及 HBOP + sham 组小鼠未见梗死灶。MCAO 组 24 h后梗死率为(63.00 ± 5.25)%,HBOP + MCAO 组 24 h 后梗死率为(44.08 ± 8.46)%。HBOP + MCAO 组梗死率明显低于 MCAO 组(P < 0.05,图 1)。

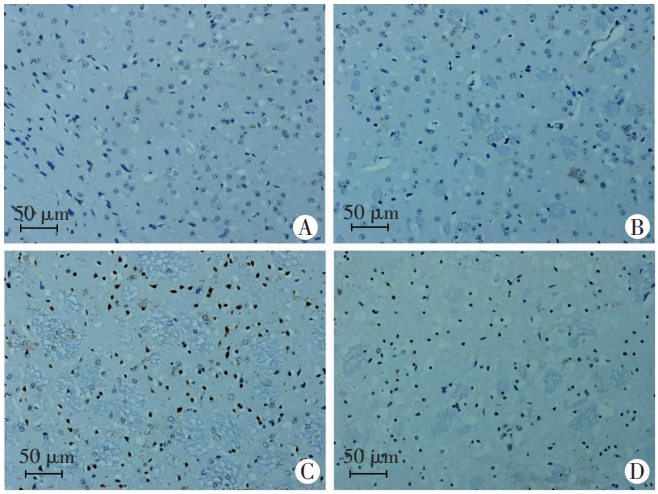


A:sham 组;B:MCAO 组;C:HBOP + sham 组;D:HBOP + MCAO 组

图 1 TTC 染色法观察脑梗死范围

2.3 神经细胞凋亡情况

sham 组和 HBOP + sham 组的凋亡指数较低,分别为(2.25 ± 0.32)%和(1.97 ± 0.19)%,MCAO 组的凋亡指数为(52.48 ± 9.49)%,而 HBOP + MCAO 组的凋亡指数为(39.71 ± 8.86)%,HBOP + MCAO 组的凋亡指数显著低于 MCAO 组(P < 0.05,图 2)。



A:sham 组;B:HBOP + sham 组;C:MCAO 组;D:HBOP + MCAO 组

图 2 MCAO 建模后 24 h 各组小鼠神经细胞凋亡情况 (TUNEL)

2.4 RT-qPCR 检测 P2X7 受体 mRNA 的表达

HBOP + sham 组的 P2X7 受体 mRNA 相对表达水平(1.35 ± 0.12)高于 sham 组(1.00 ± 0.08)(P < 0.05),在 MCAO 后,HBOP + sham 组和 HBOP + MCAO 组(1.34 ± 0.16)24 h 的 P2X7 受体 mRNA 表达水平变化不大,MCAO 组 24 h 的 P2X7 受体 mRNA 相对表达水平(1.69 ± 0.19)高于 sham 组(P < 0.01),而 HBOP + MCAO 组 24 h 的 P2X7 受体 mRNA 相对表达水平显著低于 MCAO 组(P < 0.01)。

3 讨论

自 1996 年 Wada 等[2]发现 HBOP 对脑缺血有保护作用以来,由于其临床应用上的安全性及伦理学优势,得到了越来越多的关注。研究表明,HBOP 能明显增强心脏[11]、肾脏[12]、肝脏[13]及脊髓[14]等器官对缺血的耐受程度,这对于外科的术中缺血防治及战创伤救治有重要意义。

在本实验中,我们采用小鼠线栓法制作永久性 MCAO 模型,该模型不需要开颅,产生的缺血范围可靠,稳定性强,重复性高,动物损伤小,存活时间长,是局灶性脑缺血标准的动物模型[15]。并且,该模型与短暂性缺血模型相比,能有效减少由于线栓回抽引起的蛛网膜下腔出血和脑室内出血概率、避免缺血再灌注损伤等因素的影响[16],更符合临床卒中患者的病理生理过程,有利于确定 HBOP 对脑缺血损伤的作用。我们研究发现,HBOP 能明显减轻小鼠 MCAO 后的神经功能学损伤,缩小梗死体积,减少神经细胞的凋亡,具有明显的脑保护作用,这与我科前期大鼠永久性缺血模型的研究结果[17]相符。虽然早期也有文献报道,HBOP 对永久性缺血没有明显的保护作用[18],但我们认为这可能与其采用的 HBOP 模式、不同实验动物种类对脑缺血的耐受程度以及 MCAO 模型制作方法等原因有关。

P2X7R 是 P2X 受体中独特的一个亚类,为双功能受体,它受低浓度激动剂刺激可以形成非选择性内向阳离子通道,而高浓度激动剂长时间或反复刺激会形成能透过相对分子质量达 900 的大分子的质膜孔道,导致细胞死亡。P2X7R 在神经系统内广泛存在,小胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、海马神经元细胞等均有 P2X7R 的表达。我们在实验过程中发现,HBOP 可以上调小鼠正常脑组织内 P2X7R 的表达水平,而在 MCAO 建模后,HBOP + MCAO 组小鼠脑组织内 P2X7 受体表达情况明显低于 MCAO 组,这可能与 HBOP 的脑保护作用有关。相关研究[19]表明,P2X7R

在缺血性脑损伤中处于较上游的调节位点,通过调节递质释放、炎症反应、细胞凋亡和增殖等在缺血性脑损伤中起重要作用。Chu 等[3]研究发现,P2X7R 抑制剂能减少活化的小胶质细胞和星形胶质细胞释放的炎症因子 IL-1β、TNF-α 及 IL-6 的表达,从而减少海马 CA1 区的神经元死亡、减少细胞凋亡,促进空间记忆能力的恢复。Jun 等[4]研究发现,ATP 能通过刺激 P2X7R 引起神经元 SN4741 的细胞体积增大,诱导细胞坏死,应用 P2X7R 的抑制剂能减轻神经元氧糖剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)及短暂性脑缺血所引起的损伤[5]。Melani 等[6]研究发现,小胶质细胞上表达的 P2X7R 参与了梗死灶周围的组织损伤,应用 P2X7R 抑制剂后可以明显改善神经功能损伤,缩小梗死体积,起到神经保护作用。此外,Domercq 等[20]研究发现,P2X7R 在脑缺血后也会对少突胶质细胞产生损害。因此,我们认为 HBOP 对脑缺血的保护作用,可能是通过延缓小鼠 MCAO 后 P2X7R 的表达升高起作用。

总之,HBOP 对小鼠实验性 MCAO 模型的脑保护作用明确,其通过延缓 MCAO 后 P2X7R 的表达升高可能是其神经保护作用的重要机制,这提示神经外科手术患者在术前进行 HBOP 可以有效防止术中缺血带来的脑水肿等损伤,对 HBOP 的临床应用提供了重要的理论基础。但是本实验还存在一定的局限性,虽然提出 HBOP 对 P2X7R 表达的影响可能是脑保护作用的机制,但由于脑内多种细胞内 P2X7R 有表达,具体通过调节哪种细胞内的 P2X7 起作用需要在以后的实验研究中进一步探讨。

参考文献:

[1] Rehman H, Connor H D, Ramshesh V K, *et al*. Ischemic preconditioning prevents free radical production and mitochondrial depolarization in small-for-size rat liver grafts[J]. Transplantation, 2008, 85(9): 1322 - 1331.

[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] Chu K, Yin B, Wang J, *et al*. Inhibition of P2X7 receptor ameliorates transient global cerebral ischemia/reperfusion injury via modulating inflammatory responses in the rat hippocampus[J]. J Neuroinflammation, 2012, 9: 69.

[4] Jun D J, Kim J, Jung S Y, *et al*. Extracellular ATP mediates necrotic cell swelling in SN4741 dopaminergic neurons through P2X7 receptors[J]. J Biol Chem, 2007, 282(52): 37350 - 37358.

[5] Arbeloa J, Perez-Samartin A, Gottlieb M, *et al*. P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia[J]. Neurobiol Dis, 2012, 45(3): 954 - 961.

[6] Melani A, Amadio S, Gianfriddo M, *et al*. P2X7 receptor modulation on microglial cells and reduction of brain infarct caused by middle cerebral artery occlusion in rat[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(7): 974 - 982.

[7] 卢培刚, 冯华, 王宪荣, 等. 高压氧和低压缺氧预处理对大鼠脊髓损伤后 P2X7 受体表达的影响[J]. 中国临床神经外科杂志, 2008, 13(5): 288 - 291.

[8] Yang Y F, Chen Z, Hu S L, *et al*. Interleukin-1 receptor associated kinases-1/4 inhibition protects against acute hypoxia/ischemia-induced neuronal injury *in vivo* and *in vitro*[J]. Neuroscience, 2011, 196: 25 - 34.

[9] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84 - 91.

[10] Swanson R A, Morton M T, Tsao-Wu G, *et al*. A semiautomated method for measuring brain infarct volume[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1990, 10(2): 290 - 293.

[11] Li Y, Dong H, Chen M, *et al*. Preconditioning with repeated hyperbaric oxygen induces myocardial and cerebral protection in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a prospective, randomized, controlled clinical trial[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2011, 25(6): 908 - 916.

[12] He X, Xu X, Fan M, *et al*. Preconditioning with hyperbaric oxygen induces tolerance against renal ischemia-reperfusion injury *via* increased expression of heme oxygenase-1[J]. J Surg Res, 2011, 170(2): e271 - e277.

[13] Liu Y, Sun X J, Liu J, *et al*. Heme oxygenase-1 could mediate the protective effects of hyperbaric oxygen preconditioning against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011, 38(10): 675 - 682.

[14] Lu P G, Hu S L, Hu R, *et al*. Functional recovery in rat spinal cord injury induced by hyperbaric oxygen preconditioning[J]. Neurol Res, 2012, 34(10): 944 - 951.

[15] 邹永杰, 崔高宇, 冯华. 脑缺血动物模型的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2012, 39(5): 423 - 426.

[16] Mao Y, Yang G Y, Zhou L F, *et al*. Focal cerebral ischemia in the mouse: description of a model and effects of permanent and temporary occlusion[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1999, 63(2): 366 - 370.

[17] 黄宇星, 胡胜利, 邹永杰, 等. 高压氧预适应对大鼠大脑中动脉闭塞后骨桥蛋白表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(1): 15 - 19.

[18] Xiong L, Zhu Z, Dong H, *et al*. Hyperbaric oxygen preconditioning induces neuroprotection against ischemia in transient not permanent middle cerebral artery occlusion rat model[J]. Chin Med J (Engl), 2000, 113(9): 836 - 839.

[19] 王丽雁, 蔡文琴, 陈鹏慧. P2X7 受体在 OPCs 缺氧缺血性损伤中作用的初步研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(21): 2895 - 2897.

[20] Domercq M, Perez-Samartin A, Aparicio D, *et al*. P2X7 receptors mediate ischemic damage to oligodendrocytes[J]. Glia, 2010, 58(6): 730 - 740.

(**收稿**:2012-12-21;**修回**:2013-01-30)

(编辑 王小宴)