

· 基础研究 ·

高压氧对大鼠创伤性脑损伤神经元凋亡及其凋亡相关因子的影响

姚焱鹏¹ 张新定^{1,2} 韩彦明¹ 杨文桢¹ 霍龙伟¹

摘要

目的:探讨高压氧对创伤性颅脑损伤后神经细胞凋亡及凋亡相关因子 Caspase-3 和 Bcl-2 表达的影响。

方法:成年健康雄性 Wistar 大鼠 66 只,随机分为高压氧治疗组(HBOT)、损伤对照组和假手术组,应用自由落体法建立中度颅脑损伤的大鼠模型,采用原位末端标记法(TUNEL)染色检测脑挫伤灶周围半影区的细胞凋亡情况,用免疫组化法检测 Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白的表达。

结果:HBOT 组与损伤对照组相比,凋亡细胞数和 Caspase-3 阳性表达均有不同水平降低,Bcl-2 表达升高,差异有显著性 ($P<0.01$)。假手术组各指标均为阴性。

结论:HBO 对创伤性脑损伤后神经细胞凋亡的发生有抑制作用,其抑制神经细胞凋亡的机制可能与 HBOT 对促凋亡蛋白 Caspase-3 的抑制和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的促进作用有关。

关键词 高压氧;颅脑损伤;细胞凋亡;Caspase-3;Bcl-2

中图分类号:R459.6,R651.15 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2011)-02-0148-05

The effects of hyperbaric oxygen therapy on neuron apoptosis and apoptosis-related genes after traumatic brain injury in rats/YAO Yanpeng,ZHANG Xinding,HAN Yanming, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(2): 148—152

Abstract

Objective: To investigate the relationship between the therapeutic effects of hyperbaric oxygenation (HBO) on focal brain contusion and its impacts on apoptosis and Caspase-3 and Bcl-2 of apoptosis related genes after traumatic brain injury in rats.

Method: Sixty-six adult healthy male Wistar rats were randomly divided into hyperbaric oxygen treatment(HBOT) group, injury control group and sham-operated group. Application of free-fall method was employed to establish the rat model of moderate traumatic brain injury. Apoptosis of neuron cells were evaluated with TUNEL technique. The cerebral expressions of Caspase-3 and Bcl-2 were analyzed with immunohistochemical technique.

Result: In traumatic penumbra area the apoptosis rates of neuronal cells in HBOT group were significantly lower than those in injury control group($P<0.01$). The expression of Caspase-3 in traumatic penumbra area enhanced quite obviously, following trauma; the expression of Caspase-3 in control group was obviously lower than that in HBOT group ($P<0.01$). However, expression of Bcl-2 in traumatic penumbra area enhanced quite obviously. The expression of Bcl-2 in HBOT group was obviously better than that in control groups($P<0.01$).

Conclusion: The effect of HBO is closely correlated with apoptosis and apoptosis related genes after traumatic brain injury, and apoptosis inhibition by HBO might be an important mechanism for the treatment of focal brain contusion after traumatic brain injury.

Author's address Department of Neurosurgery,Second Clinical Hospital of Lanzhou University, Lanzhou,730000

Key word hyperbaric oxygenation;brain injury;apoptosis;Caspase-3; Bcl-2

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.02.014

1 兰州大学第二临床医学院,730000; 2 通讯作者

作者简介:姚焱鹏,男,硕士研究生; 收稿日期:2010-01-18

创伤性颅脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 后继发性脑损伤 (secondary brain injury, SBI) 是造成患者死亡和致残的重要原因,也是临床提高疗效的重要切入点和许多学者研究的热点。近年来的研究证实细胞凋亡参与了脑损伤后继发性病理生理演变的全过程^[1]。高压氧 (hyperbaric oxygenation, HBO) 对颅脑外伤后继发性脑损伤的疗效已得到广泛认可^[2]。本文通过观察大鼠脑创伤后高压氧治疗 (hyperbaric oxygenation treatment, HBOT) 对神经细胞凋亡及凋亡相关因子半胱天冬蛋白酶 (Caspase-3) 和 Bcl-2 表达的影响,探讨高压氧治疗作用的分子机制,为高压氧在临床治疗创伤性颅脑损伤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

取 66 只成年健康雄性 Wistar 大鼠,200—250g,由甘肃省中医学院动物中心提供。随机分为 3 组,假手术组 (n=6)、HBOT 组 (n=30)、损伤对照组 (n=30),后两组依时间窗分为 12h、24h、48h、72h 和 120h 各 5 组,每组各 6 只,共 11 组。

1.2 颅脑损伤模型的制作

戊巴比妥钠 (50mg/kg) 腹腔内注射麻醉后,在大鼠右侧颅顶部 (中线右侧 2mm,冠状缝后 2mm) 用牙科钻开一直径为 5mm 的骨窗,保持硬膜完整,使用自制自由落体打击装置,参照文献^[3]略加改进,自由落体脑挫裂伤模型造成右顶叶较为一致的脑挫裂伤,冲击物重 30g,自由落体高度 20cm,骨蜡封闭骨窗,缝合头皮置笼饲养。

1.3 干预措施

1.3.1 假手术组只行开颅,不予打击,开颅后骨蜡封闭骨窗,缝合头皮即置笼饲养,24h 后处死取材。

1.3.2 损伤对照组造模成功后即置笼饲养,不给予任何干预措施。

1.3.3 HBOT 组使用 SYC 800 高压氧动物试验舱 (青岛市平度高压氧舱设备厂)。实验前给纯氧 3—5min 洗舱,测得舱内氧浓度 >96.6%、CO₂ 浓度 <0.05% 以上。将 HBOT 组大鼠置入舱内,舱内压力 0.2MPa,采用直排式给氧,流量 5L/min,舱内温度控制在 23—25℃,稳压吸氧 30min (持续纯氧通风),约 0.01MPa/min 匀速加减压至常压后出舱 (过程中持续

供氧),12h/次,每天进出舱时间固定。

1.4 大鼠神经运动功能评分

参考文献^[4]方法略加修正,分别于伤后各时间段行神经运动功能评分。评分方法:①在 45°、30°和 15°斜坡站立 5s,依次分为正常、轻度不能、中度不能,15°以下者为重度不能。②通过 3cm、2cm 和 1cm 宽杆,评分如前。③提尾后外伤对侧前肢的反屈动作,测量反屈度,以 90°、60°、30°为基础,评分如前。④自发运动时的转圈行为,达 180°为正常,120°为轻度不能,60°为中度不能,60°以下者为重度不能。对动物在以上每种动作按完成任务的能力评分:正常 4 分,轻度不能 3 分,中度不能 2 分,重度不能 1 分。

1.5 取材及检测

1.5.1 取材:HBOT 组和对照组动物分别于脑外伤后 12h、24h、48h、72h、120h 各时间点处死取材,假手术组 24h 处死取材,石蜡包埋^[4]。

1.5.2 石蜡切片,常规 HE 染色,结果于 10×10 倍光学显微镜下观察。

1.5.3 TUNEL 染色检测神经细胞凋亡 按过氧化物酶原位凋亡试剂盒所示方法 (TUNEL 凋亡检测试剂盒由武汉博士德公司提供),免疫过氧化物酶染色,甲基绿复染。在 10×40 镜下取 5 个视野,借助实验细胞计数器对创伤侧皮质周围半隐区内神经细胞计数,阳性细胞显示为棕色或棕黑色,计算各视野内阳性细胞数占该视野内总细胞数的百分率后,求出平均值。为避免细胞计数中主观因素对实验结果的影响,我们采取双盲法经 3 人分别计数后求平均值而得出实验数据。

1.5.4 免疫组织化学染色检测 Caspase-3 和 Bcl-2 按免疫组化试剂盒说明书染色 (试剂盒由武汉博士德公司提供)。封片后光镜下观察并阳性细胞计数计算阳性细胞百分率,计数方法同 TUNEL。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计软件,组间比较采用方差分析进行显著性检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 HE 染色观察结果

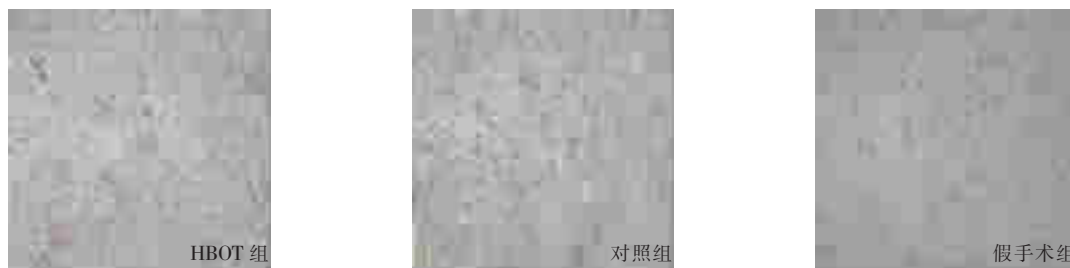
于 10×10 镜下观察,HBOT 组和对照组均可见皮质挫伤,损伤还累及基底核、海马等部位。伤后

12h,挫伤灶及周围神经细胞皱缩,胞核固缩,尼氏体消失,胞浆嗜伊红增强,胶质细胞肿胀,核固缩,碎裂或溶解,可见到空泡细胞,还可见炎性细胞浸润,以中性粒细胞为主。伤后 24h 挫伤灶及其周围可见神经细胞减少,空泡细胞增多,胶质细胞增多。伤后

48h 损伤区脑组织出现软化、坏死、各细胞数减少。伤后 72h 见挫伤灶内神经细胞明显减少,并可见胶质细胞增生。病理形态在高倍镜下,HBOT 组与对照组相比无明显差异,二者与假手术组相比改变明显(见图 1)。

图 1 各组伤后 24h HE 染色情况

(10×40)



2.2 TUNEL 染色检测神经细胞凋亡结果

TUNEL 法染色凋亡细胞,胞核着色,呈棕黄色或棕黑色,胞浆不着色,细胞膜较完整,当细胞出现核固缩时,细胞体内可见致密浓染的棕黑色、棕黄色团块及少量碎块,正常神经细胞不着色(图 2)。伤侧皮质挫伤灶周围的半影区,对照组在伤后 12h 即出现凋亡细胞,着色较淡,伤后 24h 达到峰值,着色加深,凋亡百分率为(26.33±1.64)%。伤后 72h 至 120h 凋亡细胞依然维持在较高的水平,这与远隔部位和假手术组呈阴性染色形成明显对比。值得关注的是半影区凋亡细胞数和染色深度随损伤时间延长而逐渐增加。HBOT 组凋亡细胞百分率随时间变化的规律与对照组相似,但明显减少,其峰值半影区为(18.38±2.83)%。伤后 72h 至 120h 凋亡细胞数减少更为明显,与对照组相比差异有显著性意义 ($P < 0.01$),见表 1。

2.3 免疫组织化学染色结果

2.3.1 Caspase-3 的阳性表达细胞为棕黄色,细胞胞核着色,胞浆不着色(图 3)。

在皮质挫伤灶的周围半影区 Caspase-3 蛋白表达的阳性细胞百分率:对照组在伤后 12h 出现阳性细胞,至伤后 24h 阳性细胞数量达到峰值为(27.13±1.54)%。伤后 72h 至 120h 阳性细胞有所下降。HBOT 组阳性细胞百分率随时间变化的规律与对照组相似,但明显减少,在挫伤灶的周围半影区其峰值为(19.76±2.62)%、伤后 72h 至 120h 阳性细胞数减少更为明显,与对照组相比差异

有显著性意义($P < 0.01$),见表 1。

2.3.2 Bcl-2 的阳性表达细胞为棕黄色,胞核、胞浆均可着色(图 4)。

在皮质挫伤灶的周围半影区 Bcl-2 蛋白表达的阳性细胞百分率:对照组阳性细胞百分率随时间变化的规律与 Caspase-3 蛋白表达相似,伤后 24h 达峰值为(21.44±1.36)%。不同的是 HBOT 组阳性细胞百分率随吸氧次数增多而升高,伤后 24h 达峰值为(28.36±1.20)%、与对照组相比差异有显著性意义($P < 0.01$),见表 1。

2.4 大鼠神经运动功能评分

正常对照组评分定为 16 分。伤后各时间段,HBOT 组与对照组相比差异有显著性($P < 0.01$);120h 时各组评分有所增加,但 HBOT 组评分仍高于对照组($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨论

凋亡是一个保守的细胞死亡机制,是多细胞体稳态和正常发展所必需的。然而促凋亡蛋白过度的表达,抗凋亡蛋白的缺失同样涉及很多人类疾病,包括冠心病、心衰、自身免疫性疾病等^[15-16]。除此之外细胞凋亡也参与了颅脑损伤后脑的继发损害的病理生理过程^[7-8]。一些细胞内凋亡的信息通路已被证实,包括死亡受体途径和线粒体途径^[9-10]。凋亡的诱导最终集中在活化凋亡执行因子 Caspase-3 上,随后 Caspase-3 切割一些酶最终导致细胞凋亡^[11-12]。Bcl-2 蛋白位于细胞器的上游,控制着下游 Caspase

表1 各组伤侧皮质神经细胞凋亡、Caspase-3和Bcl-2阳性细胞百分比

($\bar{x}\pm s, \%$)

组别/检测指标	12h	24h	48h	72h	120h
HBOT组 (n=6)					
神经细胞凋亡	13.15±1.34 ^①	18.38±2.83 ^②	14.31±1.23 ^②	8.14±1.21 ^②	6.17±1.75 ^①
Caspase-3	15.67±0.77 ^①	19.76±2.62 ^②	16.09±2.48 ^②	14.67±2.15 ^①	12.55±0.56 ^①
Bcl-2	17.13±2.36	28.36±1.20 ^②	27.24±2.31 ^②	23.41±2.35 ^②	15.33±1.76 ^①
对照组 (n=6)					
神经细胞凋亡	15.06±2.36	26.33±1.64	20.11±3.17	15.72±3.32	8.42±1.12
Caspase-3	18.47±1.07	27.13±1.54	23.34±3.16	17.23±2.71	14.62±0.71
Bcl-2	16.35±1.12	21.44±1.36	17.28±1.35	15.50±2.63	13.44±1.23
假手术组 (n=6)					
神经细胞凋亡	-	1.45±0.24	-	-	-
Caspase-3	-	2.96±0.33	-	-	-
Bcl-2	-	1.58±1.21	-	-	-

HBOT治疗组与对照组比较:①P<0.05;②P<0.01

表2 伤后不同取材时间各组大鼠神经运动功能评分

组别	例数	12h	24h	48h	72h	120h
HBOT组	6	8.66±1.13	10.83±2.33 ^①	12.33±1.53 ^①	13.23±2.53 ^②	14.13±1.26 ^②
对照组	6	7.16±1.25	8.50±1.78	10.83±1.14	11.66±2.12	11.83±2.11
假手术组	6	16.00±0.00	16.00±0.00	-	-	-

HBOT治疗组与脑损伤组比较:①P<0.05;②P<0.01

图2 两组伤后24h凋亡细胞

TUNEL法染色(10×40)



HBOT组

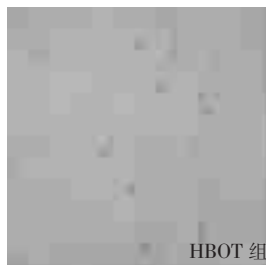


对照组

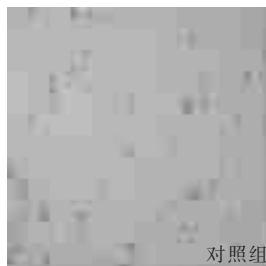
HBOT组伤后24h凋亡细胞表达抑制,对照组伤后24h凋亡细胞表达明显

图3 两组伤后24h Caspase-3

免疫组化染色(10×40)



HBOT组



对照组

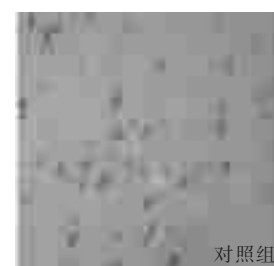
HBOT组伤后24h Caspase-3阳性表达减弱,对照组伤后24h表达增强

图4 两组伤后24h Bcl-2

免疫组化染色(10×40)



HBOT组



对照组

对照组伤后24h Bcl-2表达较弱,HBOT组伤后24h表达明显

的活化,在线粒体途径中,Bcl-2蛋白是抗凋亡的关键成员^[13-14]。有文献报道通过干预可以抑制细胞凋亡,国外已有学者证实药物干预可以特异性抑制脑外伤后神经细胞的凋亡,这些治疗手段多通过影响不同基因和蛋白质的表达而发挥作用^[5,15-16]。临床上,我们发现HBOT对脑外伤患者神经功能恢复的治疗作用明显^[17-19]。

我们制作了TBI的大鼠模型,并给予了HBOT治

疗。应用TUNEL凋亡细胞检测技术检测了神经细胞的凋亡情况。实验结果表明,凋亡细胞多分布于挫伤灶周围的半影区内,在脑外伤后24h达高峰,损伤对照组有26.33%±1.64%的神经细胞出现了凋亡特征,HBOT组出现凋亡特征的细胞为18.38%±2.83%,两组凋亡细胞均于伤后120h明显下降。由此我们认为当发生脑创伤后,由机械力直接导致创伤灶的血管床破坏、局部脑组织水肿等原因造成局部脑缺血、缺

氧,进而启动了线粒体介导的凋亡途径,最终导致了神经细胞的凋亡。而随着损伤时间的延长,脑水肿减轻、侧支供血逐步建立,使损伤区供血、供氧恢复,进而阻断了诱导细胞凋亡的途径,因此凋亡细胞数在高峰期后逐渐下降,至伤后 120h 下降明显。在 HBO 治疗组,凋亡细胞数目明显低于相应损伤的对照组。这提示我们,HBO 治疗可以抑制颅脑外伤后的细胞凋亡。其原因可能是 HBO 治疗能提高血氧浓度,增加氧的弥散力,降低毛细血管通透性,促进血流速度,减少血小板聚集,降低血液黏滞度,增加脑组织对氧的利用,增强神经细胞对葡萄糖的利用,维持脑细胞的能量代谢,从而纠正脑缺氧,稳定细胞膜,最终减少诱导细胞凋亡的因子,降低神经细胞凋亡数目。我们还应用免疫组织化学染色检测了 Caspase-3 和 Bcl-2 的表达,结果表明,脑外伤后 Caspase-3 和 Bcl-2 的表达在挫伤灶旁明显增强,其分布及阳性细胞数目表达高峰期时间与细胞凋亡发生的部位和时间相符合。由于 Caspase-3 蛋白的启动是细胞凋亡的必需环节,而 Bcl-2 蛋白位于细胞器的上游,控制着下游 Caspase-3 的活化,因此我们推测通过提高神经细胞代谢,提供蛋白合成所必需的能量,是 HBO 抑制 Caspase-3 活化、促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达从而抑制神经细胞凋亡的重要机制之一。还有学者证实^[20-21],HBO 可以抑制颅脑外伤后的脂质过氧化反应,并能减少氧自由基的产生,稳定线粒体膜,减少细胞色素 C 的释放。我们认为,这也是 Bcl-2 抑制细胞凋亡的机制之一。另外,我们还进行了大鼠神经运动功能评分,结果表明,HBOT 组各期的神经功能评分均高于损伤对照组。结合以上实验结果,我们认为 HBO 对 TBI 的治疗作用与其对神经细胞凋亡的抑制作用是密不可分的。

以上研究结果可以看出,HBO 对 TBI 后部分的神经细胞凋亡有抑制作用,对 TBI 后的临床恢复及改善预后可能是有益的。

参考文献

[1] Dressler J, Vemuganti R. Apoptosis and gene expression after TBI[J]. *Legal Medicine*, 2009, 11:54—55.
[2] Vlodaysky E, Palzur E, Feinsod M, et al. Evaluation of the apoptosis-related proteins of the BCL-2 family in the traumatic penumbra area of the rat model of cerebral contusion, treated

by hyperbaric oxygen therapy: a quantitative immunohistochemical study[J]. *Acta Neuropathol*, 2005, 110(2):120—126.
[3] 刘媛,王莉,曾琳,等.一种改良的创伤性脑损伤模型的建立[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2008, 13(007):416—419.
[4] Yakovlev AG, Knoblach SM, Fan L, et al. Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury[J]. *J Neurosci*, 1997, 17(19):7415—7424.
[5] Hetz C, Vitte PA, Bombrun A, et al. Bax channel inhibitors prevent mitochondrion-mediated apoptosis and protect neurons in a model of global brain ischemia [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(52):42960—42970.
[6] Zhang X, Chen Y, Jenkins LW, et al. Bench-to bedside review: Apoptosis/programmed cell death triggered by traumatic brain injury[J]. *Crit care*, 2005, 9(1):66—75.
[7] Slemmer JE, Zhu C, Landshamer S, et al. Causal role of apoptosis-inducing factor for neuronal cell death following traumatic brain injury [J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(6):1795—1805.
[8] Dressler J, Hanisch U, Kuhlisch E, et al. Neuronal and glial apoptosis in human traumatic brain injury [J]. *Int J Legal Med*, 2007, 121(5):365—375.
[9] Tamm C, Sabri F, Ceccatelli S. Mitochondrial-mediated apoptosis in neural stem cells exposed to manganese[J]. *Toxicol Sci*, 2008, 101(2):310—320.
[10] Siesjo Bk, Siesjo P. Mechanisms of secondary brain injury[J]. *Eur J Anaesthesiol*, 1996, 13(3):247—268.
[11] Cheng G, Wei L, Zhi-Dan S, et al. Atorvastatin ameliorates cerebral vasospasm and early brain injury after subarachnoid hemorrhage and inhibits caspase-dependent apoptosis pathway [J]. *BMC Neurosci*, 2009, 10:7.
[12] Ray SK, Karmakar S, Nowak MW, et al. Inhibition of calpain and caspase-3 prevented apoptosis and preserved electrophysiological properties of voltage-gated and ligand-gated ion channels in rat primary cortical neurons exposed to glutamate[J]. *Neuroscience*, 2006, 139(2):577—595.
[13] Tehranian R, Rose ME, Vagni V, et al. Disruption of Bax protein prevents neuronal cell death but produces cognitive impairment in mice following traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2008, 25(7):755—767.
[14] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival[J]. *Science*, 1998, 281(5381):1322—1326.
[15] 李浩,刘开祥,俸军林,等.丹参酮 II A 对鼠脑缺血再灌注损伤 Bcl-2 和 caspase-3 表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(008):691—693.
[16] 李红玲,王金星,赵然,等.运动训练对出血性脑损伤细胞凋亡基因 caspase-3 及其蛋白表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(007):601—604.
[17] Chen J, Chen YH. Effects of hyperbaric oxygen on intrauterine hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats[J]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2009, 11(5): 380—383.
[18] 胡胜利.高压氧预适应对大鼠高原颅脑损伤影响的实验研究[J]. *第三军医大学*, 2007:1—64.
[19] 杜玉琴,许芬.高压氧早期治疗重型颅脑损伤的临床观察[J]. *中国康复医学杂志*, 2009, (008):760—761.
[20] Aimaretti G, Ambrosio MR, Di Somma C, et al. Traumatic brain injury and subarachnoid haemorrhage are conditions at high risk for hypopituitarism: screening study at 3 months after the brain injury [J]. *Clin Endocrinol*, 2004, 61(3):320—326.
[21] 王强,王湘渝,张香菊,等.高压氧对大鼠颅脑创伤后脑水肿和脂质过氧化产物丙二醛的影响 [J]. *中国临床康复*, 2005, 9(041):147—149.