

高压氧预处理对大鼠脑梗死后脑水肿的影响及机制研究

卞合涛, 初建峰

摘要 目的 探讨高压氧预处理对大鼠脑梗死后脑水肿的影响及可能机制。方法 选择SD大鼠96只,随机分为假手术组、模型组、高压氧预处理组,每组各32只。采用大脑中动脉线栓法建立大鼠大脑中动脉栓塞模型,在脑缺血后24、72 h进行神经功能评分;在脑缺血后72 h处死动物取出脑组织,检测脑梗死侧脑组织湿重干重比值(W/D),利用TTC染色法计算脑梗死体积,利用Western blot法检测脑梗死侧脑组织白细胞介素1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)蛋白的表达。结果 脑梗死后24 h和72 h,高压氧预处理组与模型组比较,大鼠神经功能评分明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,高压氧预处理组在脑缺血后72 h脑梗死体积、脑水肿明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,高压氧预处理组在脑缺血后72 h IL-1 β 、TNF- α 、MMP-9的表达明显降低($P < 0.05$)。结论 高压氧预处理可能通过抑制IL-1 β 、TNF- α 、MMP-9的表达,保护血脑屏障的完整性,减轻脑梗死后脑水肿。

关键词 脑梗死; 高压氧; 脑水肿; 基质金属蛋白酶9

中图分类号 R 743.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)10-1445-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.011

脑卒中目前已成为人类第二位死因,有发病率高、致残率高和致死率高等特点,其中缺血性脑卒中约占脑卒中的80%。溶栓治疗是目前较为肯定和有效的方法^[1],但溶栓治疗有严格的时间窗限制,仅有少部分患者获益。因此针对缺血性脑卒中的发病机制,选择性地研究新的治疗方法至关重要。脑组织缺血后,缺血区发生一系列炎症反应,加重血脑屏障的破坏,促使脑水肿的形成,导致颅内压升高,严重影响患者的预后。白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)被认为是炎症反应的重要因子。基质

金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)的增加被认为参与了血脑屏障的破坏,加重了脑水肿的形成^[2]。研究^[3]表明高压氧预处理可诱导脑缺血耐受,减少梗死面积,改善神经功能缺损症状,但具体机制不明确。该研究拟观察高压氧预处理对脑梗死后脑水肿的影响及检测脑组织IL-1 β 、TNF- α 、MMP-9的变化,探讨高压氧预处理对脑梗死后脑水肿的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 实验试剂 兔抗大鼠MMP-9、兔抗大鼠IL-1 β 、兔抗大鼠TNF- α (英国Abcam公司);辣根过氧化物酶标记物山羊抗兔IgG抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);高压氧舱(武汉船舶设计院);BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京康为公司)。

1.2 实验动物及分组 健康雄性SD大鼠,重(250 \pm 10)g,由安徽医科大学实验动物中心提供,手术前后动物自由进食和进水,室温保持(24 \pm 1) $^{\circ}$ C。实验前随机将动物分为假手术组($n=32$)、模型组($n=32$)、高压氧预处理组($n=32$)。

1.3 高压氧预处理方法 高压氧预处理组大鼠在大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型前放于高压氧舱内连续预处理5 d。实验前利用高浓度氧洗舱,将大鼠放于高压氧舱内,开始时利用15 min匀速加压至0.1 MPa,高压持续60 min,15 min匀速减压至舱内正常压力,舱内温度保持在(24 \pm 1) $^{\circ}$ C,1次/d,连续5 d。末次高压氧处理后3 h建立MCAO模型。

1.4 MCAO模型建立 采用文献^[4]报道的线栓法建立MCAO模型,大鼠用100 g/L水合氯醛(400 mg/kg)腹腔注射麻醉,仰卧位固定于手术台上,颈部皮肤用碘伏消毒,颈正中中线切口2 cm左右,分离两侧甲状腺,暴露气管右侧与胸锁乳突肌和胸骨舌骨肌间的三角区,游离右侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉,从颈总动脉插入多聚左旋赖氨酸处理过的直径为0.26 mm的线栓,插入深度约为18 mm时产生阻挡感,停止插入。然后结扎、缝合,缺血120 min后轻柔拔出线栓5 mm并固定于皮下。

2016-05-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81301012); 济宁市医药卫生科技项目(编号: 2013jnwk26)

作者单位: 安徽医科大学济宁临床学院(济宁市第一人民医院)神经内科, 济宁 272000

作者简介: 卞合涛,男,硕士,医师;

初建峰,男,硕士,副主任医师,责任作者, E-mail: hetaobian@163.com

1.5 大鼠神经功能评分 采用大鼠神经功能缺损评分^[5] ,在脑梗死后的 24、72 h 对各组大鼠进行神经功能评分 ,包括感觉、运动、反射、平衡等方面进行。

1.6 脑梗死体积检测 大鼠脑梗死 72 h 后完成神经功能评分 断头处死 迅速将取出的脑组织置于 -20 ℃ 冰箱 5 min 后置室温切除嗅球、小脑和低位脑干后 放置于脑槽 切成 5 个厚约 1.5 mm 大脑连续冠状切片。然后迅速将脑片置于 10 ml、含 1% TTC 的 PBS 缓冲溶液中 37 ℃ 恒温避光孵育 30 min。经 TTC 染色后 ,正常组织呈玫瑰红色 ,梗死组织呈白色。取出脑片多聚甲醛溶液固定过夜拍照。应用 IPP 6.0 图像分析系统软件计算脑梗死体积 梗死体积百分比(%) = (正常侧大脑半球体积 - 梗死侧非梗死区大脑半球体积) / 正常侧大脑半球体积 × 100% ,然后 Image J 软件进行图片分析。

1.7 脑水肿检测 脑梗死后 72 h 进行神经功能评分后 ,每组各取 8 只大鼠处死。取缺血侧脑组织称湿重 ,包上锡箔纸 ,放入 100 ℃ 烤箱中烤 48 h ,取出脑组织 ,电子秤测重量 ,记为脑组织干重。按照脑组织含水量监测(干湿重法) : (湿重 - 干重) / 湿重 × 100% 。

1.8 Western blot 法检测脑梗死侧脑组织 IL-1β、TNF-α、MMP-9 的表达变化 脑梗死后 72 h 进行神经功能评分后 ,各实验组分别取 8 只大鼠脑梗死侧脑组织 ,加入适量组织裂解液 ,匀浆后离心 (12 000 r/min、10 min) ,提取蛋白 ,进行蛋白定量。测定总蛋白含量 ,分装后 -20 ℃ 保存。电泳 转膜 ,封闭 加入 IL-1β、TNF-α、MMP-9 一抗 4 ℃ 孵育过夜;漂洗 3 次 ,每次 10 min ,分别加入辣根过氧化物酶标记的二抗;室温孵育 1.5 h ,PBS 漂洗 3 次 ,每次 5 min;以 β-actin 作为内参照 ,采用 ECL 化学发光法显色。最后采用目的蛋白与内参灰度比值作为该目的蛋白的相对表达量。

1.9 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行分析 ,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,多组间比较采用单因素方差分析 ,方差分析后两两比较采用 SNK 检验。

2 结果

2.1 高压氧预处理对 MCAO 模型大鼠神经功能评分的影响 与假手术组比较 ,模型组和高压氧预处理组大鼠神经功能评分均明显降低 ($F = 260.54$, $P < 0.05$) ;高压氧预处理组与模型组比较 ,神经功能评分明显升高 ($P < 0.05$) 。见图 1。

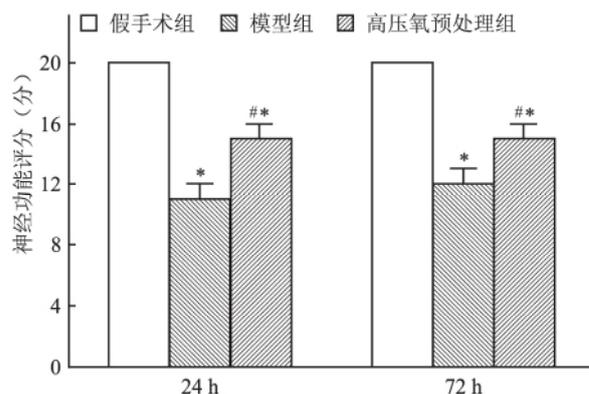


图 1 高压氧预处理对脑缺血大鼠神经功能评分的影响 与同一时间点假手术组比较: * $P < 0.05$; 与同一时间点模型组比较: # $P < 0.05$

2.2 高压氧预处理对 MCAO 模型大鼠脑梗死体积的影响 与假手术组比较 ,模型组和高压氧预处理组大鼠脑梗死体积均明显升高 ($F = 180.78$, $P < 0.05$) ;高压氧预处理组与模型组比较 ,大鼠脑梗死体积明显降低 ($P < 0.05$) 。见图 2。

2.3 高压氧预处理对 MCAO 模型大鼠脑组织含水量的影响 与假手术组比较 ,模型组和高压氧预处理组大鼠脑组织含水量均明显升高 ($F = 126.67$, $P < 0.05$) ;高压氧预处理组与模型组比较 ,大鼠脑组织含水量明显降低 ($P < 0.05$) 。见图 3。

2.4 高压氧预处理对 MCAO 模型大鼠脑组织 IL-1β、TNF-α、MMP-9 蛋白表达的影响 与假手术组比较 ,模型组和高压氧预处理组大鼠脑组织 IL-1β、TNF-α、MMP-9 表达均明显升高 ($F_{IL-1} = 204.06$, $F_{TNF-α} = 235.71$, $F_{MMP-9} = 159.26$, $P < 0.05$) ;高压氧预处理组与模型组比较 ,大鼠脑组织 IL-1β、TNF-α、MMP-9 表达明显降低 ($P < 0.05$) 。见图 4。

3 讨论

高压氧预处理是指在高压的环境下 ,提前给予高浓度的氧气的一种干预方法。研究^[6]证实高压氧可减少梗死后缺血、低氧 ,有神经保护作用。本研究应用高压氧预处理 SD 大鼠 ,建立脑梗死模型后进行神经功能评分 ,结果显示高压氧预处理能明显改善大鼠脑梗死后神经功能评分。TTC 染色结果进一步显示 ,高压氧预处理组脑梗死体积较模型组明显减少 ,这与神经功能评分改变的结果相一致。但高压氧预处理保护神经功能的具体机制仍不明确 ,可能与抗炎、抗凋亡、抑制氧化应激等有关。

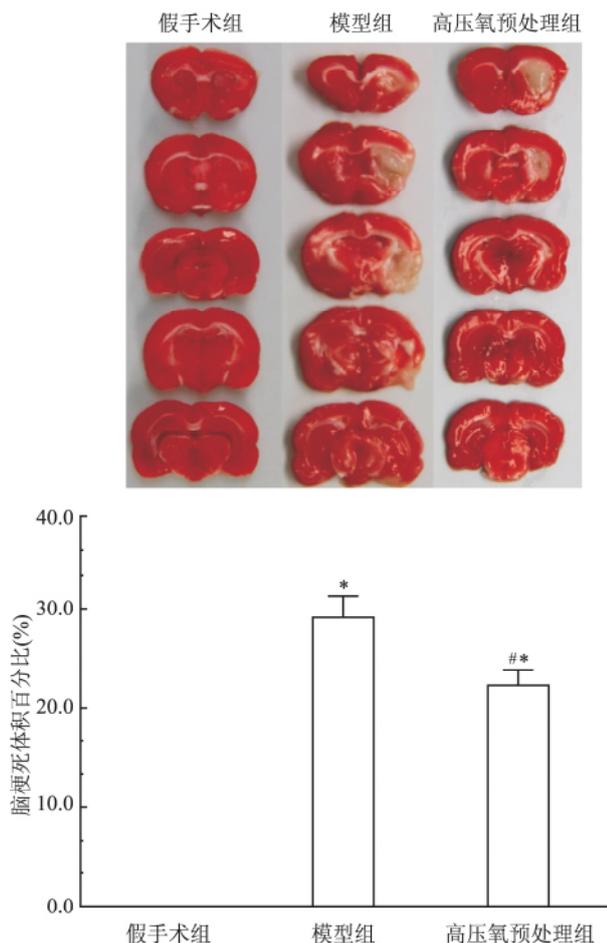


图2 高压氧预处理对脑缺血大鼠脑梗死体积的影响

与同一时间点假手术组比较: * $P < 0.05$; 与同一时间点模型组比较: # $P < 0.05$

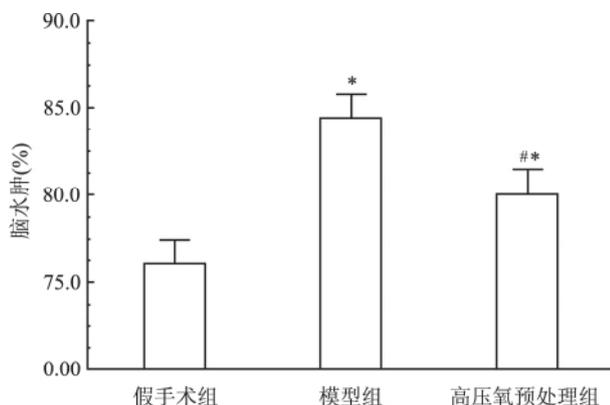


图3 高压氧预处理对脑缺血大鼠脑梗死侧脑水肿的影响

与同一时间点假手术组比较: * $P < 0.05$; 与同一时间点模型组比较: # $P < 0.05$

脑水肿是脑梗死最严重的并发症之一,可分为细胞毒性脑水肿和血管源性脑水肿。脑缺血初期主要表现为细胞毒性脑水肿,随着病情的发展,血管内

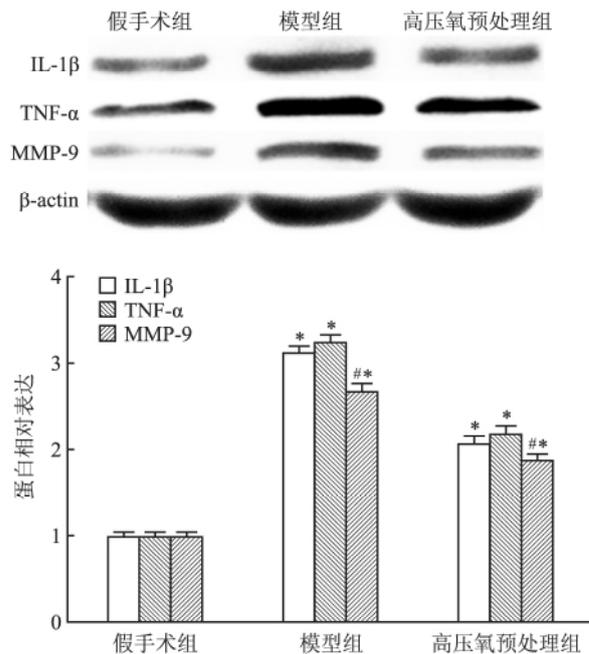


图4 高压氧预处理对脑缺血大鼠脑梗死侧脑组织 IL-1β、TNF-α、MMP-9 蛋白表达的影响

与同一时间点假手术组比较: * $P < 0.05$; 与同一时间点模型组比较: # $P < 0.05$

皮细胞功能失调,血脑屏障破坏,形成血管源性脑水肿。目前临床上对脑梗死后脑水肿的治疗主要集中在脑水肿形成后的治疗,而早期预防治疗的较少。本研究应用高压氧预处理 SD 大鼠制作脑梗死模型,72 h 后利用干湿重法检测脑梗死侧脑水肿,结果显示高压氧预处理可明显减少脑梗死后脑水肿。

脑梗死发生后梗死灶周围产生一系列炎症反应^[7],各种炎症因子得以释放,导致白细胞在缺血区聚集,活化的白细胞可释放大量的氧自由基、蛋白水解酶等物质,此类物质可进一步损伤血管,引起血管通透性升高,加重脑水肿的发生。在炎症级联反应中,IL-1β 和 TNF-α 起重要作用。IL-1β 属于白细胞介素,可通过吸引白细胞,引起炎症介质的释放,促发炎症反应。TNF-α 是肿瘤坏死因子,其可以促进 T 细胞产生各种炎症因子,进而促进炎症反应的发生。研究^[8]显示,在 MCAO 模型中,高压氧预处理可通过抑制炎症因子 IL-1β 和 TNF-α 的表达减轻炎症反应。

MMP 是基质金属蛋白酶类,其是一类锌依赖中性蛋白酶家族,有降解细胞外基质作用^[9]。MMP-9 是 MMP 家族的主要成员,可由血管内皮细胞等多种细胞合成,并以无活性酶原形式分泌。MMP-9 在

脑血管基底膜的降解中起重要作用。脑血管基底膜含有层黏连蛋白、硫酸乙酰肝素等,其大多数是 MMP-9 的底物^[10]。已有研究^[11]利用基因敲除的方法证实 MMP-9 基因缺失可引起血脑屏障的破坏。在正常脑组织内, MMP-9 只有低水平的表达,在炎症反应促发下,由胶质细胞、白细胞、血管内皮细胞等分泌到细胞外间隙,可由氧自由基、血红蛋白降解产物等激活,而降解脑血管基底膜成分,导致血脑屏障通透性增加,加重脑水肿。研究^[12]证实,炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的释放可激活 MMP-9,破坏血脑屏障,促使血管通透性升高。

推测高压氧预处理可以通过抑制炎症介质的释放,降低血脑屏障通透性,减轻脑梗死后的脑水肿。本研究结果表明,大鼠脑梗死后梗死灶周围 IL-1 β 、TNF- α 的水平明显升高,提示脑梗死后其表达明显上调。高压氧预处理组与模型组比较,高压氧预处理明显降低了 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-9 的表达,同时减轻脑梗死后的脑水肿。推测高压氧预处理可能在一定程度上通过抑制 IL-1 β 、TNF- α 的表达,减轻炎症反应,进而抑制 MMP-9 的激活,降低血脑屏障的通透性,减轻了脑水肿。

综上所述,高压氧预处理减轻脑梗死后脑水肿的机制可能与抑制炎症反应有关,本研究为临床上应用高压氧治疗脑梗死后脑水肿提供一定的理论依据。

参考文献

[1] Campbell B C, Meretoja A, Donnan G A, et al. Twenty-year history of the evolution of stroke thrombolysis with intravenous alteplase to reduce long-term disability[J]. *Stroke*, 2015, 46(8): 2341-6.

- [2] Bian H, Hu Q, Ling X, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates hemorrhagic transformation through increasing PPAR γ in hyperglycemic MCAO rats[J]. *Exp Neurol* 2015, 265: 22-9.
- [3] Mu J, Ostrowski R P, Soejima Y, et al. Delayed hyperbaric oxygen therapy induces cell proliferation through stabilization of cAMP responsive element binding protein in the rat model of MCAO-induced ischemic brain injury [J]. *Neurobiol Dis* 2013, 51: 133-43.
- [4] Hu Q, Ma Q, Zhan Y, et al. Isoflurane enhanced hemorrhagic transformation by impairing antioxidant enzymes in hyperglycemic rats with middle cerebral artery occlusion [J]. *Stroke* 2011, 42(6): 1750-6.
- [5] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke* 2001, 32(4): 1005-11.
- [6] 刘北, 李淑云. 高压氧治疗急性脑梗死的临床疗效及其脑保护机制[J]. *山东医药* 2013, 53(41): 62-4.
- [7] 陈海波. 孕酮对脑损伤神经保护作用的研究现状[J]. *安徽医科大学学报* 2011, 46(9): 967-8.
- [8] Soejima Y, Ostrowski R P, Manaenko A, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates hyperglycemia enhanced hemorrhagic transformation after transient MCAO in rats [J]. *Med Gas Res*, 2012, 2(1): 9.
- [9] 陈玉姣, 欧阳晴晴, 王然, 等. 肿瘤坏死因子- α 对骨髓源性肥大细胞表达 MMP-3、MMP-9、IL-17 的影响[J]. *南方医科大学学报* 2015, 35(11): 1633-7.
- [10] Yabluchanskiy A, Ma Y, Jyer R P, et al. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease [J]. *Physiology (Bethesda)* 2013, 28(6): 391-403.
- [11] Gursoy-Ozdemir Y, Qiu J, Matsuoka N, et al. Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9 [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(10): 1447-55.
- [12] Soejima Y, Hu Q, Krafft P R, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates hyperglycemia-enhanced hemorrhagic transformation by inhibiting matrix metalloproteinases in focal cerebral ischemia in rats [J]. *Exp Neurol* 2013, 247: 737-43.

Effect and mechanism for hyperbaric oxygen preconditioning to cerebral edema after infarction

Bian Hetao, Chu Jianfeng

(Dept of Neurology, Jining Clinical College of Anhui Medical University, Jining First People's Hospital, Jining 272000)

Abstract Objective To observe the effect of hyperbaric oxygen preconditioning to cerebral edema and possibility mechanism. **Methods** 96 male rats were randomly divided into sham-operated group, model group and hyperbaric oxygen preconditioning group. Focal cerebral ischemia rat models were established by occluding the middle cerebral artery (MCAO). Neurological grades were tested 24 h, 72 h after ischemia; infarct size was measured by TTC staining; the brain W/D was detected; expressions of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) were detected by Western blot. **Results** As compared with those in the model

SBP1 基因在涎腺肿瘤中的表达及相关性分析

李伟¹, 王银龙¹, 朱友明¹, 陆婧雅¹, 朱丽², 许旭东¹, 汪聪¹

摘要 目的 研究硒结合蛋白 1(SBP1) 在涎腺肿瘤中的表达情况, 明确其与涎腺肿瘤发生、发展、侵袭及转移的关系。方法 收集 15 组涎腺肿瘤及其瘤旁组织, 提取组织内 RNA, 采用实时荧光定量 RT-PCR 法检测组织中 SBP1 的表达。设计及合成 SBP1 的 shRNA 序列, 慢病毒转染 scc-3 细胞, 应用 MTT、细胞划痕实验检测细胞增殖与迁移。结果 SBP1 在涎腺肿瘤中的表达明显低于正常涎腺组织 ($P < 0.05$); 划痕试验和 MTT 检测显示 SBP1 对肿瘤细胞的增殖与迁移起抑制作用。结论 SBP1 在涎腺肿瘤组织中低表达, 具有抑制肿瘤细胞的增殖和迁移能力。可作为涎腺肿瘤的早期诊断和预后判断的早期指标。

关键词 涎腺肿瘤; 硒结合蛋白 1; 增殖; 迁移

中图分类号 R 739.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)10-1449-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.012

涎腺肿瘤约占头颈部肿瘤的 3%~6%, 其肿瘤细胞形态、组织结构和生物学行为具有多样性, 涎腺肿瘤也比较多样及复杂, 临床疗效难以预料^[1]。研究^[2]显示硒元素具有显著抗癌和预防癌症的效果。硒元素在体内是以硒蛋白质的形式存在, 其中, 硒结合蛋白 1(Selenium binding protein 1, SBP1) 被认为是硒元素抑癌作用的重要载体。人硒结合蛋白 1

(SBP1) 位于染色体 1q21-22 上, 是一种特殊的含硒蛋白质, 能够促进肿瘤细胞的凋亡。研究^[3]表明 SBP1 在许多肿瘤组织中表达下调, 这提示其与肿瘤的发生发展可能有关。目前, SBP1 在涎腺肿瘤发生中的作用的相关研究较少。该研究选用人舌鳞状细胞癌 scc-3 细胞系, 检测 SBP1 对其迁移与增殖的影响, 选取 15 组良性涎腺肿瘤和正常涎腺组织, 检测 SBP1 的表达水平。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人舌癌鳞状细胞株 scc-3 由安徽医科大学口腔实验室提供。DMEM 培养基 + 10% 胎牛血清培养。

1.2 标本来源 组织来源: 随机选取 2014 年 5 月~2015 年 5 月安徽医科大学第一附属医院和安徽省口腔医院颌面外科经手术切除、病理证实的涎腺病变组织 15 例, 及手术中切除的病变涎腺组织 10 mm 以外的正常涎腺组织 15 例。所有涎腺肿瘤患者为在院初诊患者, 即之前未做过局部扩大切除手术, 并且术前均未进行过放疗、化疗等治疗, 病例组除涎腺肿瘤外, 无其他系统性疾病。组织处理方法: 将获取的组织样品置于冻存管内, 并用记号笔标记编号。标本存置于液氮罐中保存待用。做好登记组织样品的详细内容, 如组织类型、编号、日期以及患者的基本资料。

1.3 材料与仪器 DMEM 培养基、胰蛋白酶、10% 胎牛血清(美国 HyClyone 公司); 逆转录反应试剂盒、QRT 反应试剂盒(日本 TaKaRa 公司); 质粒提取试剂盒(美国 Axygen 公司); RNA 抽提试剂 TRIzol、细胞裂解液(上海碧云天公司); 构建载体所用的大

2016-06-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31501103); 安徽省自然科学基金(编号: 1508085QC62)

作者单位: ¹安徽医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 合肥 230032

²安徽医科大学第二附属医院儿科, 合肥 230601

作者简介: 李伟, 女, 硕士研究生;

王银龙, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wangylah@sina.com

group, hyperbaric oxygen preconditioning had significantly improved neurological scores at ischemia 24 h and 72 h ($P < 0.05$). After ischemia 72 h, hyperbaric oxygen preconditioning group had significantly reduced brain infarct size and brain water content as compared with the model group ($P < 0.05$). Hyperbaric oxygen preconditioning group had significantly reduced expressions of IL-1 β , TNF- α , MMP-9 as compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Hyperbaric oxygen preconditioning significantly inhibites the expression of IL-1 β , TNF- α , MMP-9 and maintains the integrity of blood brain barrier, thus, reduces the brain water content.

Key words cerebral infarction; hyperbaric oxygen; cerebral edema; MMP-9