

- holic stroke model of rat[J]. *Neurosci Lett* 2000 285(2):19-22.
- 3 Golanov EV, Liu F, Reis DJ. Stimulation of cerebellum protects hippocampal neurons from global ischemia[J]. *Neuroreport* 1998 9(5):819-24.
 - 4 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke* 1989 20:84-91.
 - 5 Galea E, Reis DJ, Feinstein DL. Cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from rat astrocytes[J]. *J Neurosci Res* 1994 37(3):406-14.
 - 6 刘雁, 高曲文, 彭凯润, 等. 用定量 RT-PCR 方法检测. 脑梗死半影区内凋亡相关基因的表达[J]. *中国老年学杂志* 2006 26(6):790-3.
 - 7 Galea E, Golanov EV, Feinstein DL *et al*. Cerebellar stimulation reduces inducible nitric oxide synthase expression and protects brain from ischemia[J]. *Am J Physiol* 1998 274(6 Pt 2):H2035-45.
 - 8 Golanov EV, Christensen JD, Reis DJ. Role of potassium channels in the central neurogenic neuroprotection elicited by cerebellar stimulation in rat[J]. *Brain Res* 1999 842(2):496-500.
 - 9 Zhou P, Qian L, Zhou T *et al*. Mitochondria are involved in the neurogenic neuroprotection conferred by stimulation of cerebellar fastigial nucleus[J]. *J Neurochem* 2005 95(1):221-9.
- [2007-04-06 收稿 2007-05-20 修回]
(编辑 章木)

不同时间窗高压氧对脑缺血-再灌注大鼠模型学习记忆功能的影响

陈浩 毕竹梅¹ 崔宁¹ 刘捍东¹ 吉中国¹ (山东大学医学院, 山东 济南 250012)

【摘要】目的 观察不同时间窗高压氧治疗(HBOT)对脑缺血-再灌注(L/R)损伤后学习记忆功能的影响,探讨其可能的机制。方法 制备大鼠可逆性大脑中动脉阻塞脑损伤模型。分别于再灌注后6及24h起始HBOT,观察空间学习记忆功能,计算梗死百分比,免疫组化检测鼠脑iNOS、ChAT及Bcl-2、Bax表达阳性神经元。结果 与缺血对照组比较,早期治疗组大鼠学习记忆功能显著改善,脑梗死比率显著缩小($P < 0.01$);海马CA1区ChAT阳性神经元增多,iNOS表达减少,且Bcl-2表达增多(均 $P < 0.01$),Bax阳性神经元数无明显变化。晚期治疗组显示与早期治疗组改变相似,但iNOS、Bax表达无明显差异。结论 早期或延迟HBOT均可改善大鼠脑L/R损伤引起的学习记忆功能不良,显示有神经保护作用。

【关键词】 大脑中动脉阻塞 缺血-再灌注损伤 高压氧 学习记忆功能

【中图分类号】 R743.33 R459.6 【文献标识码】 A 【文章编号】 1005-9202(2007)15-1447-03

The effect of hyperbaric oxygenation therapy at different time windows on learning memory function in rats with ischemia-reperfusion brain injury

CHEN Hao, BI Zhu-Mei, CUI Ning, *et al*.

Medical College of Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of hyperbaric oxygen therapy (HBOT) at different time windows on learning and memory function of model rats with ischemia-reperfusion (IR) injury and to explore its possible neural protective mechanism. **Methods** Focal cerebral IR injury rats model was induced by reversible middle cerebral artery occlusion (MCAO). HBOT was administered at 6 or 24 hours after reperfusion respectively to observe the spatial learning and memory abilities and measure the infarct volume ratio and positive neurons of iNOS, ChAT, Bcl-2, Bax proteins in hippocampal CA1 region by immunohistochemistry. **Results** The learning and memory abilities improved and the brain infarct volume ratio diminished markedly ($P < 0.01$), the positive neurons of ChAT increased, iNOS expressions decreased and Bcl-2 positive neurons increased significantly (all $P < 0.01$), but Bax expression had no obvious changes in hippocampal CA1 region in the early HBOT group comparing to those in ischemia-control group. Similar changes occurred in delayed HBOT group, but the number of reaction positive neurons of iNOS and Bax had no significant difference. **Conclusions** Both earlier and delayed HBOT could play neural protective effect against transient MCAO induced long-term brain morphological and histological deficits and spatial learning and memory dysfunction.

【Key words】 Middle cerebral artery occlusion (MCAO); Reperfusion injury; Hyperbaric oxygen; Learning and memory

急性缺血性卒中后很多患者遗留学习记忆障碍^[1]。高压氧治疗(hyperbaric oxygen therapy, HBOT)因能有效提高血氧含量和血氧弥散距离,改善微循环,被广泛应用于缺血性脑卒中的临床治疗^[2]。实验动物研究^[3,4]肯定了缺血-再灌注(L/R)

损伤6h内行HBOT可以显著改善神经评分并缩小梗死范围,但对于延迟HBOT(DHBOT),由于疗程、方法不同,其疗效尚存争议。Yin^[5]等提示延迟但反复高压氧治疗有效。该观点与临床所见对急性脑梗死患者常需较长时间高压氧治疗一致。因此,DHBOT的治疗效果及作用机制需要进一步研究。本实验利用暂时性大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠模型,采用近似于临床应用的HBOT方法,评价局灶性脑梗死发生后早期HBOT(EHBOT)及DHBOT对大鼠远期学习记忆功能的影响。

¹ 山东省立医院

通讯作者:吉中国(1954-),男,主任医师,教授,硕士生导师,主要从事脑血管病的病因、发病机制及老年神经病学研究。

作者简介:陈浩(1976-),男,主治医师,主要从事高压氧医疗和科研工作。
万方数据

1 材料与方 法

1.1 动物与分组 成年雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重 240 ~ 290 g,由山东大学医学院实验动物中心提供。随机分为 4 组,每组 10 只:EHBOT 组、DHBOT 组、假手术组(sham 组)、缺血对照 组(I/R 损伤后无治疗)。

1.2 大鼠 MCAO 模型的建立 大鼠经麻醉,参考 Zea Longa 线 栓法^[6]制备大鼠大脑中动脉 I/R 模型。用备好的改良尼龙线 栓子栓塞右侧脑中动脉。栓塞 2 h 后部分抽出尼龙线,形成再 灌注。假手术组仅分离动脉后缝合,不予插入尼龙线。

1.3 神经功能评分 分别于造模后和处死前,对各组大鼠采 用 Zea Longa 分制评分:无神经功能缺损计 0 分;梗死对侧前爪 内收、伸直障碍计 1 分;向偏瘫侧转圈者计 2 分;行走时向偏瘫 侧倾倒计 3 分;意识丧失、不能行走计 4 分。由 3 名工作人员 分别评分,计算平均值。

1.4 高压氧治疗 采用烟台宏远制纯氧动物实验舱,每次治 疗以纯氧加压 10 min,于 2.5 ATA 稳压 1 h,减压 15 min。EH- BOT 组于再灌后 6 h,DHBOT 组于再灌后 24 h 行高压氧治疗, 每日 1 次,两组各治疗 10 d。

1.5 Morris 水迷宫实验 迷宫为直径 130 cm,高 50 cm 的圆 形水池,放置有隐蔽平台,水面高于平台 2 cm。实验时水温 24℃。每天上午 8:30 ~ 11:00 进行实验。HBOT 疗程结束后所 有大鼠自由游泳 2 min 熟悉环境,次日开始测试,实验 10 d。测 试内容:①定位航行实验:池壁标记 4 个入水点,分处各象限, 记录大鼠从 4 个入水点入水后找到并四肢爬上平台的时间,即 逃避潜伏期(escape latency, EL)。②空间探索实验:第 10 天撤 除平台,摄像记录大鼠从同一入水点入水后在 120 s 内游泳轨 迹,并统计通过原平台点次数。

1.6 脑梗死灶百分比检测 水迷宫实验结束后,每组随机取 大鼠 5 只,经过量麻醉后断头取脑,经速冻 20 min 后,从视交叉 向后连续冠状切片,片厚 2 mm。将脑片放入 2% TTC(2,3,5-氯 化三苯基四氮唑)溶液,37℃ 温箱中染色 30 min,15 min 翻面, 甲醛固定 24 h 后,见正常脑组织呈红色,梗死灶则为白色。用 数码相机拍照,OSIRIS 图像处理软件计算各脑片右侧半脑梗死 灶百分比(梗死面积/总面积),计算平均值。

1.7 海马区 ChAT、iNOS 和 Bcl-2、Bax 的免疫组化测定 各组 剩余大鼠经过量麻醉后用 4% 多聚甲醛固定液心脏灌注固定, 断头取脑,常规技术石蜡包埋,制成 5 μm 厚连续切片,兔抗鼠 ChAT、NOS₂ 抗体和兔抗鼠 Bcl-2、Bax 抗体及生物化羊抗兔 IgG 二抗均购自武汉博士德生物技术公司。采用 SP 法免疫组化染 色,对照组以 PBS 代替一抗,其余步骤相同。具体操作依试剂 盒说明书进行。分别于高倍镜下选择梗死侧海马区互不重叠 视野进行观察,细胞浆中显示棕黄色颗粒的为相应免疫反应阳 性神经元,分别进行免疫阳性神经元计数。

1.8 统计学分析 所有数据采用 SPSS 13.0 软件进行统计分 析,各组数据表示为 $\bar{x} \pm s$,神经功能评分采用配对 *t* 检验,其他 采用 ANOVA + LSD 检验进行组间两两比较。

2 结 果

2.1 大鼠神经功能评分 见表 1。

表 1 各组大鼠神经功能评分($\bar{x} \pm s$)

组别	n	治疗前(造模后)	处死前
EHBOT	10	3.10 ± 0.88	2.50 ± 0.71 ¹⁾
DHBOT	10	3.20 ± 0.79	2.70 ± 0.67 ²⁾
假手术组	10	0	0
缺血对照组	10	3.20 ± 0.79	2.90 ± 0.57 ³⁾

与治疗前比较:1) *P* = 0.024, 2) *P* = 0.015;与造模后比较:3) *P* = 0.0081

2.2 水迷宫实验检测结果

2.2.1 定位航行实验 治疗组反映学习能力的逃避潜伏期 (EL)缩短,第 5 天 EL 时间统计结果显示:与缺血对照组平均 EL(70.2 ± 28.8)s 比较,EHBOT 组平均 EL(34.9 ± 20.6)s 显 著缩短(*P* = 0.002),DHBOT 组(40.4 ± 19.1)s 亦显著缩短 (*P* = 0.008)。且该趋势持续到第 10 天。

2.2.2 空间探索实验 撤除平台后,寻找平台的方式反映动 物记忆能力。结果证明,假手术组为探索式,具有以原平台为 假想目标的明显目的性。早期及延迟 HBOT 组均显示有与假 手术组相似表现。而缺血对照组则呈无目的的随机式轨迹。 通过原平台点的次数测试结果:EHBOT 组(5.60 ± 1.17)s 与缺 血对照组(2.00 ± 0.94)s 比较, *P* = 0.000;DHBOT 组(5.30 ± 1.16)s 与缺血对照组(2.00 ± 0.94)s 比较, *P* = 0.000。

2.3 梗死灶百分比 假手术组无缺血梗死区。EHBOT 组 (15.6 ± 4.4)% 较缺血对照组(26.2 ± 5.2)% 显著减小(*P* = 0.000);DHBOT 组(16.3 ± 3.8)% 梗死百分比均较缺血对照 组亦明显减小(*P* = 0.000)。

2.4 ChAT 阳性细胞计数 分别选择海马区 5 个视野,在 150 倍光镜下计数 ChAT 免疫反应阳性着色细胞,取平均值。EH- BOT 组(98.2 ± 9.0)个与缺血对照组(51.6 ± 7.3)个比较阳性 细胞数显著增高(*P* = 0.000),DHBOT 组(94.6 ± 8.9)个 ChAT 阳性细胞计数均较缺血对照组亦明显增高(*P* = 0.000)。

2.5 iNOS 阳性神经元计数 取 5 张切片在 400 倍光镜下,计 数海马区的棕黄着色 iNOS 阳性神经元,取均值。EHBOT 组 (19.5 ± 5.0)个/mm² 与缺血对照组(38.1 ± 5.0)个/mm² 比较 显著降低(*P* = 0.000)。DHBOT 组(35.6 ± 5.1)个/mm² 与缺血 对照组对比则无显著性差异(*P* = 0.274)。

2.6 Bcl-2、Bax 阳性神经元计数 各取五张切片,在 400 倍光 镜下计数海马区免疫反应阳性细胞,取均值,见表 2。

表 2 Bcl-2、Bax 阳性神经元计数(个/mm², $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bcl-2 表达阳性	Bax 表达阳性
EHBOT 组	10	65.7 ± 7.1 ¹⁾	13.1 ± 3.2 ³⁾
DHBOT 组	10	44.1 ± 8.9 ²⁾	14.7 ± 3.1 ⁴⁾
假手术组	10	18.4 ± 5.6	13.5 ± 2.9
缺血对照组	10	13.8 ± 4.5	15.7 ± 3.2

与缺血对照组比较:1) *P* = 0.00, 2) *P* = 0.00, 3) *P* = 0.078, 4) *P* = 0.0486

3 讨论

引起缺血性卒中的根本原因是病理性的局部血液供氧不足及营养物质缺乏。脑 I/R 损伤诱发的各种病理生理性改变可诱导神经细胞发生凋亡,这可能是引起学习记忆障碍的重要原因。有资料表明,I/R 实验动物中,脑神经细胞的凋亡与坏死同时存在,而缺血周边区的海马对短暂的缺血缺氧更加敏感,海马神经元的凋亡占主导地位。研究证明,神经细胞凋亡机制很复杂,包括 caspase 蛋白酶家族的激活,谷氨酸介导的胞内 Ca^{2+} 升高,NO 等增加,凋亡相关基因表达改变等^[7]。上述作用均得到广泛重视及研究。凋亡相关 Bcl-2 基因产物的功能是通过阻断细胞凋亡促进细胞存活,可在缺血过程中广泛表达,Bcl-2 可通过与 PKC 相互作用,改变死亡信号转导过程,抑制凋亡,保护神经细胞。而 Bax 蛋白则可协助线粒体细胞色素 C 的释放使 caspase 活化促进凋亡进程。Bcl-2 还可与 Bax 形成异二聚体以拮抗 Bax 的作用而抑制凋亡。故 Bcl-2/Bax 表达的比率决定其对细胞凋亡的作用。

有研究证明,大鼠经学习训练后,皮层海马乙酰胆碱和乙酰胆碱转移酶升高^[8]。脑 I/R 继发的病理改变可导致神经元损伤加重,称为迟发性神经元坏死(delayed neuronal death, DND),多见于海马 CA1 区域,并显示有 ChAT 活性降低^[9]。提示海马胆碱能神经元损伤可能是 MCAO 后认知功能受损的形态学基础^[10]。

诱导型一氧化氮合酶(iNOS)亚型主要分布于巨噬细胞、血管内皮细胞、神经元、小胶质细胞和星型细胞等,正常活性很低,缺血、缺氧等刺激可诱导 iNOS mRNA 的表达,经 iNOS 催化过量、持续产生的 NO 才可对缺血脑组织造成伤害,并在迟发性进行性神经元损伤中发挥重要作用^[11]。应用 iNOS 抑制剂氨基胍阻断 NO 的脑损伤作用,可使缺血半暗带得到保护,减少梗死面积,证明 iNOS 在缺血性脑损伤中可起重要作用^[12]。

脑缺血后及时提供足够的氧对恢复脑组织功能有关键作用,高压氧是目前临床治疗缺血性脑梗死的常用方法。目前认为 HBOT 对脑 I/R 有多方面的保护机制^[13,14]。HBOT 治疗缺血性梗死的应用基于存在缺血半暗带的神经元,改善这些细胞的有效氧供可以刺激他们恢复正常功能^[15]。

本实验结果显示,大鼠经 MCAO 损伤后学习记忆功能降低,脑梗死体积显著增加,海马 CA₁ 区乙酰胆碱转移酶活性减少,iNOS 表达增加,且存活蛋白 Bcl-2 减低。与上述脑功能损伤的病理特征有一致表现。而在大鼠 MCAO 后 6 h 内与 24 h 内不同时间窗,经分别予以接近临床实际治疗方案的 HBOT 后,观察到两种治疗方案均使大鼠空间记忆能力改善。HBOT 使动物海马 CA1 区 ChAT 阳性细胞增多,iNOS 阳性细胞数减少,抗凋亡基因 Bcl-2 表达显著增多,而 Bax 基因表达则无明显差异,推测 HBOT 改善实验大鼠空间记忆能力的机制可能包括通过改善缺血神经元的氧供,缓解损伤引起的神经细胞凋亡,减少了对 ChAT 神经元损害等。而反复的 DHBOT 亦有减轻凋亡的作用,可能存在如刺激骨髓干细胞进入外周^[16]等其他机制促进了实验动物学习记忆能力的提高,值得进一步研究探讨。临床实践中脑梗死后的溶栓治疗表现近似于动物实验

性 I/R 过程。本实验结果也为临床缺血性脑梗死的 HBOT 提供了有意义的实验证据。

4 参考文献

- 1 Tatemichi TK, Desmond DW, Mayeux R, et al. Dementia after stroke: baseline frequency, risks, and clinical features in a hospitalized cohort [J]. *Neurology*, 1992, 42: 1185-6.
- 2 Gill AL, Bell CNA. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes [J]. *Q J Med*, 2004, 97: 385-95.
- 3 Lou M, Eschenfelder CC, Herdegen T, et al. Therapeutic window for use of hyperbaric oxygenation in focal transient ischemia in rats [J]. *Stroke*, 2004, 35(2): 578-83.
- 4 Liu XH, Zhao YL, Ma QM, et al. Optimal therapeutic window of hyperbaric oxygenation in neonatal rat with hypoxic-ischemic brain damage [J]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2006, 44(3): 177-81.
- 5 Yin D, Zhang JH. Delayed and multiple hyperbaric oxygen treatments expand therapeutic window in rat focal cerebral ischemic model [J]. *Neurocrit Care*, 2005, 2(2): 206-11.
- 6 Longa EZ, Weinstein PR, Carson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- 7 薛慎伍. 缺血性脑血管病的研究进展 [M]. 济南: 黄河出版社, 2002: 215-21.
- 8 张中启, 罗质璞. 学习记忆的胆碱能机制与去甲肾上腺素能和 5-羟色胺能介导系统的关系 [J]. *中国药理学通报*, 1994, 2: 81-3.
- 9 宋振玉, 刘耕陶. 当代药理学 [M]. 北京: 中国协和医科大学北京医科大学联合出版社, 1997: 200.
- 10 Tamura A, Graham DI, McCulloch J, et al. Focal cerebral ischaemia in the rat: I. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion [J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 1981, 1(1): 53-60.
- 11 Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: regulation subserves function [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1995, 196: 1-4.
- 12 Iadecola C, Zhang F, Casey R, et al. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 1996, 27(8): 1373-80.
- 13 Veltkamp R, Siebing DA, Sun L, et al. Hyperbaric oxygen reduces blood-brain barrier damage and edema after transient focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2005, 36(8): 1679-83.
- 14 Veltkamp R, Bieber K, Wagner S, et al. Hyperbaric oxygen reduces basal lamina degradation after transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *Brain Res*, 2006, 1076(1): 231-7.
- 15 Carson S, McDonagh M, Russman B, et al. Hyperbaric oxygen therapy for stroke: a systematic review of the evidence [J]. *Clin Rehabil*, 2005, 19(8): 819-33.
- 16 Thom SR, Bhopale VM, Velazquez OC, et al. Stem cell mobilization by hyperbaric oxygen [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290(4): H1378-86.

[2007-03-26 收稿 2007-06-25 修回]

(编辑 章木)