

· 实验研究 ·

高压氧治疗对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤模型 神经细胞胞浆 Bcl-2 Bax 和细胞色素 C 表达的影响

刘玲, 杨于嘉, 宋健辉, 刘杰波

(中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 探讨新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)模型脑组织神经细胞凋亡抑制蛋白 Bcl-2、促凋亡蛋白 Bax 的表达和胞浆线粒体细胞色素 C(CytC)水平的关系及高压氧(HBO)对其的影响。方法 新生7日龄健康SD大鼠随机分为4组:空白对照组($n=34$),假手术组($n=33$,分离左颈总动脉后不结扎直接缝合皮肤),HIBD组($n=30$,分离并结扎左颈总动脉联合8%低氧暴露2h),HBO组($n=33$,HIBD后行HBO治疗(2个绝对大气压,1h/d,连续7d))。免疫组织化学法检测脑组织神经细胞 Bcl-2 和 Bax 的表达,Western-blot 检测神经细胞胞浆线粒体 CytC 的水平。结果 HBO 组 Bcl-2 阳性细胞较 HIBD 组明显增多,阳性表达率分别为 64% 和 47% ($P<0.05$),但较空白对照组(82%)和假手术组(79%)低, (P 均 <0.05);HBO 组 Bax 免疫阳性细胞表达率(67%)与 HIBD 组(77%)比较差异无显著性($P>0.05$),但明显高于空白对照组(15%)和假手术组(36%), ($P<0.01$ 和 $P<0.05$)。空白对照组和假手术组神经细胞胞浆仅有弱阳性的 Cyt C 表达,HIBD 组胞浆 Cyt C 的表达最强,HBO 组的表达较 HIBD 组减轻。结论 HBO 治疗可能通过诱导脑组织神经细胞 Bcl-2 蛋白的表达,减轻线粒体 CytC 的释放,从而减轻缺氧缺血性脑损伤后神经细胞的凋亡。

[中国当代儿科杂志,2005,7(4):333-336]

[关键词] 高压氧; 缺氧缺血,脑; Bcl-2 蛋白; Bax 蛋白; 细胞色素 C; 大鼠,新生

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)04-0333-04

Effect of hyperbaric oxygenation therapy on the expression of Bcl-2, Bax and cytochrome C in nerve cells of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

Ling LIU, Yu-Jia YANG, Jian-Hui SONG, Jie-Bo LIU. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Yang Y-J, Email:yyj@cjcp.org)

Abstract: Objective This study examined the expression of Bcl-2, Bax and cytochrome C (Cyt C) in nerve cells and the effect of hyperbaric oxygenation (HBO) therapy on the expression levels in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** Seven-day-old SD rats weighing 12-14 g were randomly assigned into four groups: Normal group ($n=34$), Sham-operated group ($n=33$), of which the left common carotid artery of the rats was isolated but not ligated, HIBD group ($n=30$) in which the rats were subjected to left common carotid artery ligation followed by 2 hrs of hypoxia (8% O_2) and HBO treated group ($n=33$). HBO treatment was administered by placing the pups in a chamber after HIBD (2 atmosphere absolute for 1 hr per day for 7 days) in the HBO treated group. The expression of Bcl-2 and Bax in nerve cells of the brain was determined by immunohistochemistry and Cyt C expression was determined by Western blot analysis. **Results** The expression rate of Bcl-2 protein in the HBO treated group was obviously higher than that in the HIBD group (64% vs 47%, $P<0.05$), although it was lower than in the Normal group (82%) and the Sham-operated group (79%) (both $P<0.05$). The expression rate of Bax protein in the HIBD group (77%) was significantly higher than that in the Normal group (15%, $P<0.01$) and the Sham-operated group (36%, $P<0.05$). HBO treatment did not result in a decreased expression of Bax protein. Cyt C was weakly expressed in nerve cells of the Normal and the Sham-operated groups, but was strongly expressed in the HIBD group. HBO treatment significantly decreased the Cyt C expression. **Conclusions** HBO treatment can induce the expression of Bcl-2 protein and decrease the release of Cyt C from mitochondria, thereby protects the nerve cells from apoptosis after HIBD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(4):333-336]

Key words: Hyperbaric oxygenation; Hypoxia-ischemia, brain; Bcl-2 protein; Bax protein; Cytochromes C; Rats, newborn

[收稿日期]2005-03-29; [修回日期]2005-06-07

[作者简介]刘玲(1963-),女,博士,副主任医师。主攻方向:新生儿脑损伤。现在贵州省贵阳市妇幼保健院工作,邮编 550003。

[通讯作者]杨于嘉,湖南长沙中南大学湘雅医院儿科,邮编 410008。

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是由于脑缺氧缺血导致的神经细胞的坏死和凋亡所致。近年来随着细胞凋亡调控研究的不断深入,线粒体内的细胞色素 C (cytochrome C, CytC)在凋亡调控中的作用已引起学者的广泛关注^[1~4]。虽然目前对高压氧(hyperbaric oxygenation, HBO)在新生儿临床的应用仍存在争议,但国内外的一些文献及我科所进行的系列研究表明高压氧治疗可减轻缺氧缺血后脑组织损伤和神经细胞的凋亡^[5~9],为探讨其保护机制,本实验选用新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)模型,根据前期实验得出的最佳压力^[10],用2个绝对大气压(ATA)的HBO治疗,观察HBO对新生大鼠HIBD模型脑组织神经细胞胞浆Bcl-2、Bax和Cyt C表达的影响。

1 对象与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器设备 自制常压缺氧舱,30 cm×40 cm×50 cm的有机玻璃舱,两侧各有1直径1 cm的小孔与外界相通,一侧通氮氧混合气,另一侧接测氧仪,舱底铺有钠石灰以吸收CO₂及湿气;CY-12C型便携式数字测氧仪,测氧范围0~100%(杭州电化分析仪器厂);YLC 0.5/1A型婴儿高压氧舱(中国船舶工业总公司第701研究所);电转移槽(Biorad公司);DYY-III-8B稳压稳流型电泳仪(北京市六一仪表厂);Eagle Eye II凝胶成像分析系统(USA)。

1.1.2 主要试剂 Bcl-2和Bax兔抗鼠抗体(浓缩型),羊抗鼠IgG抗体,DAB显色试剂盒,硝酸纤维素(NC)膜由武汉博士德生物工程有限公司提供;细胞色素C兔抗鼠抗体,碱性磷酸酶标记的小鼠抗兔抗体由上海生物工程有限责任公司提供(进口分装)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及分组 新生7日龄健康Sprague-Dawley大鼠(符合国家二级实验动物标准)共130只,雌雄不限,体重12~14 g,由中南大学湘雅医学院动物部提供。按随机数字编号随机分为空白对照组($n=34$),假手术组(分离左颈总动脉后直接缝合皮肤, $n=33$),HIBD组(模型制作采用经典的Rice法^[11],分离并结扎左颈总动脉联合8%低氧暴露2 h, $n=30$),HBO组(HIBD后行HBO治疗,1 h/d,连续7 d, $n=33$)。

1.2.2 脑组织石蜡切片的制备 大鼠观察至规定时间后处死,断头取脑,并立即将脑组织保存于4%多聚甲醛液固定。将固定后的鼠脑以视交叉和乳头体中部为切面行冠状切片,常规脱水及石蜡包埋,石蜡切片机切片,片厚4 μm 。

1.2.3 免疫组织化学检测 Bcl-2和Bax蛋白的表达 按武汉博士德公司免疫组织化学试剂盒说明书进行检测。

1.2.4 Bcl-2及Bax免疫强度判定和计数 在400倍高倍显微镜下随机观察5个视野,每个视野计数100个细胞,以阳性细胞百分率和染色强度为判定标准。标本无阳性细胞或阳性细胞率<10%为阴性(-);标本阳性细胞呈淡棕黄色,或阳性细胞率介于10%~40%为弱阳性(+);阳性细胞率介于40%~80%,染色强度中等,为阳性(++);标本阳性细胞呈深棕黄色且阳性细胞率大于80%,为强阳性(+++)。

1.2.5 Cyt C的提取和Western-blot检测 Cyt C参考分子克隆实验指南和相关文献方法^[12],NC膜图象结果用图象处理仪进行密度面积分析。

1.2.6 统计学分析 实验数据输入Excel 7.0软件,用SAS 6.12版软件分析,数据及条带密度面积结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数比较用 t 检验,两组率的比较用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 脑组织神经细胞Bcl-2蛋白的表达

在正常新生大鼠脑的神经细胞可见较多的Bcl-2阳性细胞,镜下Bcl-2免疫阳性细胞呈黄色,在胞浆内呈颗粒状、条索状分布,与细胞器分布部位相同,核膜有时也着色;假手术组Bcl-2免疫阳性细胞表达较正常组减少,差异无显著性;HIBD组Bcl-2蛋白仅为弱阳性表达;HBO组Bcl-2阳性细胞较HIBD组明显增多($P<0.05$),但较空白对照组和假手术组低(P 均 <0.05),各组表达情况见表1。

表1 脑组织神经细胞Bcl-2蛋白的表达

分组	n	- ~ ±	+ ~ ++	阳性率%
空白对照组	34	6	28	82
假手术组	33	7	26	79
HIBD组	30	16	14	47
HBO组	33	12	21	64 ^{a,b,c}

a与HIBD组比较 $P<0.05$,b与空白对照组比较 $P<0.05$,c与假手术组比较 $P<0.05$

2.2 脑组织神经细胞 Bax 蛋白的表达

Bax 蛋白免疫阳性细胞也呈黄色,也位于细胞浆内,染色呈颗粒状或条索状。在正常新生大鼠脑的神经细胞 Bax 表达较弱,偶见弱阳性细胞;假手术组可见少许的免疫阳性细胞;HIBD 组 Bax 免疫阳性细胞明显增多,呈强阳性;HBO 组 Bax 免疫阳性细胞较 HIBD 组下降,但差异无显著性 ($P > 0.05$)。HBO 组 Bax 免疫阳性细胞高于空白对照组和假手术组 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),各组表达情况见表 2。

表 2 各组大鼠脑组织神经细胞 Bax 蛋白的表达

分组	n	- ~ ±	+ ~ ++	阳性率%
空白对照组	34	29	5	15
假手术组	33	21	12	36
HIBD 组	30	7	23	77
HBO 组	33	11	22	67 ^{a,b,c}

a 与 HIBD 组比较 $P > 0.05$, b 与空白对照组比较 $P < 0.01$, c 与假手术组比较 $P < 0.05$

2.3 Western-blot 检测大鼠脑组织神经细胞胞浆 Cyt C 的表达

空白对照组神经细胞胞浆仅有弱阳性的 Cyt C 表达,假手术组 Cyt C 的表达较空白对照组稍强,HIBD 组胞浆 Cyt C 的表达最强,HBO 组的表达较 HIBD 组减轻。见表 3。

表 3 Western-blot 检测各组大鼠脑组织神经细胞胞浆 Cyt C 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

分组	密度面积值($\bar{x} \pm s$)
空白对照组	1
假手术组	1.31 ± 0.023
HIBD 组	2.47 ± 0.016
HBO 组	1.55 ± 0.012 ^a

每张 NC 膜上条带以图象处理仪量化后,以空白对照组条带值为参照值,其他条带值除以该参照值再进行统计学分析。a 与 HIBD 组比较 $P < 0.05$ 。

3 讨论

新生儿 HIE 是由于围产期缺氧缺血使神经细胞的能量代谢发生障碍,其病理生理变化主要是神经细胞的水肿、兴奋性氨基酸的释放和氧自由基的产生增加最终引发了神经细胞的坏死和凋亡。目前大量的研究已证实细胞凋亡是新生儿 HIE 选择性神经细胞丢失的一种主要形式^[13]。而凋亡的发生受一些相关基因的调控,其中 Bcl-2 是凋亡抑制基

因,Bcl-2 基因家族的成员 Bax 的作用与 Bcl-2 相反,是促凋亡基因,Bcl-2 和 Bax 的比例,决定细胞受到凋亡刺激信号后是存活还是凋亡,如 Bcl-2 蛋白表达占优势时细胞存活,而 Bax 蛋白表达占优势时细胞凋亡^[14,15]。HBO 是指机体在高于 1 个大气压环境中所呼吸的与环境等压的纯氧^[16],它能使机体的血氧含量增高,血氧分压增加,血氧的弥散能力增强,HBO 治疗能改善机体对氧的摄取和利用,改善脑的缺氧和微循环,减轻脑损伤和促进损伤后神经细胞的修复。本实验结果表明:HIBD 后神经细胞 Bcl-2 蛋白仅为弱阳性表达,而 Bax 表达呈强阳性;HBO 治疗后神经细胞 Bcl-2 蛋白的表达较 HIBD 组明显增多,差异有显著性,但仍低于空白对照组和假手术组,Bax 表达在 HBO 组较 HIBD 组下降,但差异无显著性,且高于空白对照组和假手术组,实验结果提示 HBO 治疗可在一定程度上减轻缺氧缺血性脑损伤,机制可能与 HBO 诱导了神经细胞 Bcl-2 蛋白的表达增加有关。

Cyt C 是呼吸链电子传递中必需的一类色素蛋白,定位于线粒体内膜上,由核基因编码,在胞浆核糖体中翻译生成 Cyt C 前体并转移入线粒体内,与亚铁血红素基团共价结合形成完整结合状态的 Cyt C^[17],Cyt C 除参与细胞有氧呼吸活动外,在激活和诱导细胞凋亡方面起着重要作用^[18]。有研究将 Cyt C 分别注入不同类型细胞中,发现 Cyt C 可诱导细胞凋亡,从胞浆中去除 Cyt C 或在胞浆中加入蔗糖固定线粒体,可减轻凋亡,重新加入 Cyt C 则又可恢复其诱导凋亡的活性,在细胞凋亡时,胞浆内 Cyt C 的浓度升高而线粒体内 Cyt C 浓度相应降低^[19~21]。我科系列研究也发现 HBO 治疗可减轻神经细胞线粒体超微结构的损伤,表现在 HBO 组神经细胞线粒体的数量较 HIBD 组多,线粒体的结构较 HIBD 组完整^[22]。本实验 Western-blot 检测结果 HIBD 组神经细胞胞浆 Cyt C 的表达较空白对照组和假手术明显增加,HBO 治疗后表达降低,因而推测 HBO 对缺氧缺血性脑损伤的抗凋亡机制可能与其改善了脑组织的能量代谢,诱导了神经细胞抗凋亡基因 Bcl-2 的表达,稳定了线粒体的结构,抑制了线粒体通透性转换孔(MPT)的开放,阻止了 Cyt C 从线粒体释放入胞浆有关。综上结果分析表明:HBO 治疗对减轻缺氧缺血性导致的神经细胞的凋亡可能有着积极的作用,合理的 HBO 治疗在一定程度上可减轻缺氧缺血导致的脑组织损伤。

[参 考 文 献]

- [1] Dhar-Mascareno M, Carcamo JM, Golde DW. Hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C[J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38(10):1311-1322.
- [2] Nutt LK, Gogvadze V, Uthaisang W, Mirmikjoo B, McConkey DJ, Orrenius S. Indirect Effects of Bax and Bak Initiate the Mitochondrial Alterations that Lead to Cytochrome c Release During Arsenic Trioxide-Induced Apoptosis[J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(4).
- [3] Thees S, Hubbard GB, Winckler J, Schultz C, Rami A. Specific alteration of the Bax/Bcl 2 ratio and cytochrome c without execution of apoptosis in the hippocampus of aged baboons[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2005, 23(1):1-9.
- [4] Zhou LL, Zhou LY, Luo KQ, Chang DC. Smac/DIABLO and cytochrome c are released from mitochondria through a similar mechanism during UV-induced apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2005, 10(2):289-299.
- [5] Calvert JW, Yin W, Patel M, Badr A, Mychaskiw G, Parent AD. Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia-ischemia in a neonatal rat model[J]. *Brain Res*, 2002, 951(1):1-8.
- [6] Rockswold SB, Rockswold GL, Vargo JM, Erickson CA, Sutton RL, Bergman TA, et al. Effects of hyperbaric oxygenation therapy on cerebral metabolism and intracranial pressure in severely brain injured patients[J]. *J Neurosurg*, 2001, 94(3):403-411.
- [7] 周建光, 刘景昌, 方以群. 高压氧对脑缺血再灌注海马 CA1 区神经元凋亡作用的研究[J]. *中国应用生理学杂志*, 2001, 17(1):82-84.
- [8] 薄涛, 韩玉昆, 舒航. 高压氧治疗实验性新生猪缺氧缺血性脑损伤的研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2001, 3(4):352-354.
- [9] 余小河, 杨于嘉, 王霞, 钟乐. 高压氧对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2004, 12(6):466-469.
- [10] 刘丽旭, 杨于嘉. 高压氧治疗新生大鼠缺氧缺血性脑损伤量效及时效关系[J]. *中国当代儿科杂志*, 2001, 8(4):355-358.
- [11] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2):131-141.
- [12] Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(3):1259-1263.
- [13] Beilharz EJ, Williams CE, Dragunow M, Sirimanne ES, Gluckman PD. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1995, 29(1):1-14.
- [14] Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne VL, Culhane AC, et al. Apoptosis: molecular regulation of cell death[J]. *Eur J Biochem*, 1996, 236(1):1-26.
- [15] Korsmeyer SJ. Regulators of cell death[J]. *Trends Genet*, 1995, 11(3):101-105.
- [16] 李温仁, 倪国坛. 高压氧医学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998, 3.
- [17] Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked[J]. *Science*, 1997, 275(5303):1129-1132.
- [18] Gadaleta P, Perfetti X, Mersich S, Coulombie F. Early activation of the mitochondrial apoptotic pathway in Vesicular Stomatitis virus-infected cells[J]. *Virus Res*, 2005, 109(1):65-69.
- [19] Zhivotovsky B, Orrenius S, Brustugun OT, Doskeland SO. Injected cytochrome c induces apoptosis[J]. *Nature*, 1998, 391(6666):449-450.
- [20] Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c[J]. *Cell*, 1996, 86(1):147-157.
- [21] Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis[J]. *Science*, 1997, 275(5303):1132-1136.
- [22] 刘玲, 杨于嘉, 彭隆祥, 徐锡萍, 宋健辉. 高压氧对新生鼠 HIBD 模型神经元线粒体的保护作用[J]. *小儿急救医学*, 2004, 11(6):363-365.

(本文编辑:王霞)