

论著·实验研究

高压氧对宫内缺氧缺血性脑损伤新生大鼠的影响

陈晶,陈燕惠

(福建医科大学附属协和医院儿科,福建 福州 350001)

[摘要] 目的 高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)的机制尚未明了,其在HIBD中的应用也一直存有争议。该课题试图从神经细胞存活数目和中枢神经电生理传导速度两个角度探讨HBO对宫内HIBD新生大鼠脑损伤的修复作用。**方法** 建立HIBD新生大鼠动物模型,随机分为HIBD组、HIBD+HBO组、单纯HBO组和对照组4组,每组10只。HBO组大鼠于术后24 h应用0.02 MPa的高压氧治疗,1 h/d,持续14 d。于大鼠4周龄时采用脑干听觉诱发电位(BAEP)、苏木精-伊红染色、尼氏染色观察大鼠脑功能和脑组织病理学变化。**结果** 经HBO治疗后,BAEP结果显示,HIBD+HBO组的II、IV波潜伏期(PL)及I~IV波峰间期(IPL)均短于HIBD组($P<0.05$);苏木精-伊红染色见对照组海马无异常,HIBD+HBO组海马轻度异常,HIBD组海马明显异常。神经元尼氏染色计数显示,HIBD+HBO组海马存活神经元数目较HIBD组多($P<0.05$),单纯HBO组存活神经元数目较对照组多($P<0.05$)。**结论** 早期高压氧疗可通过提高突触传递效率,影响中枢神经电生理传导速度和减少神经元死亡而促进宫内HIBD新生大鼠损伤脑的修复。

[中国当代儿科杂志,2009,11(5):380-384]

[关键词] 缺氧缺血性脑损伤;高压氧;脑干听觉诱发电位;神经细胞死亡;新生大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)05-0380-05

Effects of hyperbaric oxygen on intrauterine hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats

CHEN Jing, CHEN Yan-Hui. Department of Pediatrics, Union Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China (Chen Y-H, Email: yanhui_0655@126.com)

Abstract: Objective The application and the efficacy of hyperbaric oxygen (HBO) in hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) remain controversial. This study aimed to explore the effects of HBO on brain functional outcome and possible repair mechanisms in neonatal rats with intrauterine HIBD in aspects of the number of survived neurons and the central nervous electrophysiological conduction velocity. **Methods** A rat model of intrauterine HIBD was prepared. Subjects were divided into four groups at random: HIBD, HBO-treated HIBD group, normal control and HBO-treated normal control. After 24 hrs of the operation, the two HBO-treated groups received HBO treatment (0.02 MPa, 1 hr/d) for 14 days. When the rats were 4 weeks old, the electrophysiological changes in the central nervous system (CNS) were observed by brainstem auditory evoked potential (BAEP) for assessing brain function. Hematoxylin and eosin (HE) staining and Nissl's staining were employed to observe the pathological change and the number of neurons in the hippocampus. **Results** The peak latency of waves II and IV and the interpeak latency of waves I-IV in the HBO-treated HIBD group were shortened compared with those in the untreated HIBD group ($P<0.05$). HE staining displayed that the pathological injuries in the hippocampus were alleviated in the HBO-treated HIBD group when compared with the untreated HIBD group. Nissl's staining showed that survived neurons in the HBO-treated HIBD group were more than the untreated HIBD group ($P<0.05$). The HBO-treated control group showed increased survived neurons compared with the untreated control group ($P<0.05$). **Conclusions** Early HBO treatment might improve brain functional outcome through increasing synaptic transmission efficiency, improving central nervous electrophysiological conduction velocity and reducing neuron death in neonatal rats with intrauterine HIBD. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(5):380-384]

Key words: Hypoxic-ischemic brain damage; Hyperbaric oxygen; Brainstem auditory evoked potential; Neuron death; Neonatal rats

围生期缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是围生期窒息所致的严重并发

症,是导致儿童神经系统伤残最常见的原因之一,存活者常遗留脑性瘫痪、癫痫、智力低下等严重的后遗

[收稿日期]2008-10-17;[修回日期]2008-11-22

[作者简介]陈晶,女,硕士,医师。主攻方向:儿童神经系统疾病。

[通讯作者]陈燕惠,女,教授,福建医科大学附属协和医院儿科,邮编:350001。

症。高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)作为一种对HIBD的临床治疗手段已有几十年的历史,然而,有关HBO治疗HIBD的机制尚未明了,其在HIBD中的应用也一直存有争议^[1]。神经细胞死亡和突触传递效率的降低被视为HIBD神经功能障碍的基础^[2,3],本研究试图从上述两个角度探讨HBO对宫内HIBD新生大鼠损伤脑恢复的影响,以揭示HBO促进脑损伤修复的机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备

参照Bjelke等^[4]的“延迟剖宫”法建立宫内HIBD动物模型。选取孕21 d的Sprague-Dawley(SD)雌性大鼠15只(体重为300~350 g)。乙醚吸入麻醉后剖腹结扎一侧子宫角血管,切下该子宫放入37℃水浴中15 min后,立即行剖宫产术,取出胎鼠作为HIBD模型(HIBD组),根据HIBD脑损伤评价标准,最后进入实验的HIBD大鼠均达到了中至重度脑损伤的水平^[5]。另一侧子宫的血管不予结扎,立即剖宫取出胎鼠作为对照组。以上新生鼠均由术前1 d自然分娩的母鼠哺育。制模大鼠出现类似惊厥等表现,病理变化符合典型HIBD,参照陈惠金等^[6]的方法对脑组织进行病理评分,HIBD脑损伤病理分度与临床分度相符。HIBD组和对照组大鼠各取20只进入实验。HIBD组根据体重、HIBD的程度随机分组,分为HIBD组、HIBD+HBO组;对照组根据随机表法进行随机分组,分为单纯HBO组、对照组。最后,编入统计分为HIBD组、HIBD+HBO组、单纯HBO组和对照组各10只。

1.2 HBO治疗方法

按照实验设计要求,HIBD+HBO组、单纯HBO组大鼠分别于术后24 h放入高压氧舱(YLC 0.5/1A型婴儿高压氧舱,中国船舶工业总公司701所研制)内,用压力为0.02 MPa、体积分数为100%高压氧进行治疗,首先用纯氧进行洗舱,然后开始用纯氧加压,加压时间约为15 min,达到目标压力0.02 MPa后,在该压力下维持30 min,开始减压,减压时间约为15 min。总过程约1 h,1次/d,持续14 d^[7,8]。

1.3 脑干听觉诱发电位(BAEP)检测

大鼠4周龄时于屏蔽室内用神经电生理诊断仪(NDI-400F型,上海)记录大鼠诱发电位。动物于10%水合氯醛麻醉下取俯卧位,记录电极置于颅顶区CZ点,参考电极置于左侧耳根部,接地电极置于双眼正中处,全部电极用银针,固定于皮下。左耳给

予96 dB,9.4 Hz,脉冲宽度100 μ s的短声刺激,声源距外耳孔5 cm处,带通范围100~3 000 Hz,每次叠加2 000次,分析时间10 ms,灵敏度2 μ v,测量I, II, III, IV波峰绝对潜伏期(peak latency, PL)与I~II, II~IV, I~IV波峰间潜伏期(interpeak latency, IPL)^[9]。

1.4 脑病理形态学观察

动物标本取材:神经电生理测试结束后,腹腔注射麻醉大鼠,以40 mL/L多聚甲醛(4℃, pH值9.5)心脏灌注约1.5 h,取出海马于10%甲醛外固定过夜。苏木精-伊红/尼氏染色:常规脱水、石蜡包埋、经过丘脑水平连续冠状切片(厚度为4~6 μ m)。脱蜡水化,苏木精-伊红染色;1%甲苯胺蓝尼氏染色及神经元计数^[10,11]:每组随机选取10只大鼠的海马切片,在光学显微镜下观察海马神经元,以锥体神经元染色界限清晰为标准,计数海马CA1区存活的神元数目($\times 400$),每个动物连续计数3张相邻切片,取平均值。

1.5 统计学处理

数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS 13.0统计软件对数据进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,首先检验方差齐性,组间采用 q 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 BAEP检测结果

HIBD+HBO组大鼠II, IV波潜伏期(PL)及I~IV波峰间期(IPL)明显短于HIBD组,差异有显著性($P < 0.05$);HIBD+HBO组与对照组各波PL及IPL差异无显著性($P > 0.05$),但IV波PL及II~IV, I~IV波IPL较单纯HBO组明显延长($P < 0.05$);单纯HBO组大鼠的IV波PL及II~IV, I~IV波IPL明显短于对照组($P < 0.05$), (表1)。

2.2 脑组织病理改变

2.2.1 病理形态学改变 苏木精-伊红染色和尼氏染色观察,可见对照组大鼠海马结构清晰,细胞形态正常,布局有序,神经元无损伤缺失,胞体、胞核清晰,核仁清楚,尼氏体密集,均匀分布于核周。HIBD组细胞丢失明显,锥体细胞层结构紊乱,可见散在的体积缩小、胞质浓缩,核固缩或细胞核消失的死亡细胞及胶质细胞增生。HIBD+HBO组海马各区尽管也有少量神经元丢失及胶质增生,但大多数细胞形态较正常,细胞层数无明显减少,排列较整齐,胞浆呈蓝色,为尼氏体阳性反应(图1,2)。

2.2.2 神经元尼氏染色计数 HIBD组存活神经

元数目与对照组相比明显减少($P<0.01$),而 HIBD + HBO 组存活神经元数目尽管仍少于对照组($P<0.05$),但较 HIBD 组存活神经元数目明显增多($P<0.05$)。本研究还发现,HBO 对正常大鼠存活神经元也有促进作用,表现在单纯 HBO 组存活神经元数目高于对照组($P<0.05$),(表 2)。

表 1 各组大鼠 BAEP 波 PL 及 IPL 的比较 ($\bar{x}\pm s$)

分组	鼠数	PL				IPL		
		I	II	III	IV	I ~ II	II ~ IV	I ~ IV
对照组	10	1.05 ± 0.02	1.91 ± 0.06	2.93 ± 0.20	3.70 ± 0.08	0.86 ± 0.05	1.79 ± 0.04	2.65 ± 0.07
HIBD 组	10	1.08 ± 0.07 ^a	2.02 ± 0.11 ^a	2.99 ± 0.17	3.86 ± 0.11 ^a	0.94 ± 0.14	1.84 ± 0.09 ^a	2.78 ± 0.12 ^a
HBO 组	10	1.03 ± 0.03	1.88 ± 0.06	2.84 ± 0.25	3.58 ± 0.16 ^b	0.84 ± 0.05	1.70 ± 0.11 ^b	2.55 ± 0.13 ^b
HIBD + HBO 组	10	1.05 ± 0.03	1.94 ± 0.06 ^c	2.94 ± 0.19	3.73 ± 0.07 ^{a,c}	0.88 ± 0.05	1.80 ± 0.07 ^a	2.68 ± 0.07 ^{a,c}

a:与 HBO 组比较, $P<0.05$; b:与对照组比较, $P<0.05$; c:与 HIBD 组比较, $P<0.05$

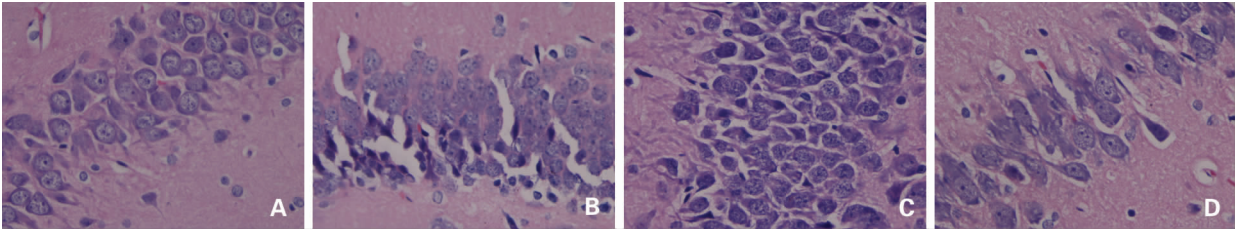


图 1 四组 28 日龄大鼠海马病理切片图 苏木精-伊红染色(×400)。A:对照组海马结构清晰,细胞形态正常,布局有序,神经元无损伤缺失,胞体、胞核清晰,核仁清楚;B:HIBD 组细胞丢失明显,锥体细胞层结构紊乱,可见散在的体积缩小、胞质浓缩,核固缩或细胞核消失的死亡细胞及胶质细胞增生;C:单纯 HBO 组结构清晰,形态正常;D:HIBD + HBO 组海马各区尽管也有少量神经元丢失及胶质增生,但大多数细胞形态较正常,细胞层数无明显减少,排列较整齐。

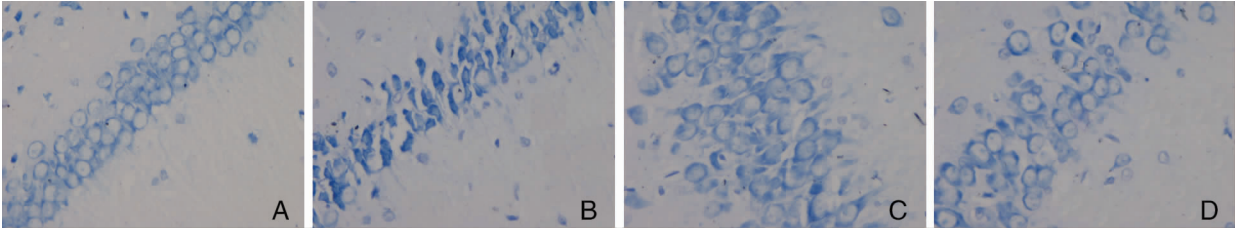


图 2 四组 28 日龄大鼠海马病理切片图 尼氏染色结果(×400)。A:对照组海马结构清晰,细胞形态正常,布局有序,神经元无损伤缺失,胞体、胞核清晰,核仁清楚,尼氏体密集,均匀分布于核周;B:HIBD 组细胞丢失明显,锥体细胞层结构紊乱,可见散在的体积缩小、胞质浓缩,核固缩或细胞核消失的死亡细胞及胶质细胞增生;C:单纯 HBO 组结构清晰,形态正常;D:HIBD + HBO 组海马各区尽管也有少量神经元丢失及胶质增生,但大多数细胞形态较正常,细胞层数无明显减少,排列较整齐,胞浆呈蓝色,为尼氏体阳性反应。

表 2 四组大鼠海马 CA1 区存活神经元尼氏染色结果比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	存活神经元数
对照组	10	169 ± 12.64
HIBD 组	10	92 ± 6.51 ^a
HBO 组	10	219 ± 8.10 ^a
HIBD + HBO 组	10	122 ± 10.52 ^{a,b}

a:与对照组比较, $P<0.05$; b:与 HIBD 组比较, $P<0.05$

3 讨论

由于 HBO 能明显地增加机体对氧的摄取和利

用,使血氧含量增加,血氧分压增高,氧弥散能力增强,从而改善全身的缺氧状况,因而 HBO 被用于临床治疗各种缺氧性疾病,但在新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)的治疗中 HBO 应用是否有确切疗效仍然存在争议。

BAEP 是声刺激在听神经和脑干听觉传导通路不同部位所引起的生物电活动,可用来检测大鼠脑功能发育程度,有助于动态观察中枢神经系统神经突触传递效率^[12]。本研究发现,HIBD 大鼠 BAEP 的 PL 及 IPL 均明显延长,提示 HIBD 可显著降低中枢神经系统突触传递效率。海马是学习记忆的关键

部位,尼氏体是神经元内合成蛋白质的主要部位,尼氏染色显示缺氧缺血后海马 CA1 区神经元尼氏体呈选择性丢失,出现神经元变性、死亡现象,提示神经细胞死亡可能是中枢神经系统突触传导效率降低的生物学基础。经 HBO 治疗后,HIBD + HBO 组大鼠 BAEP 的 II,IV 波 PL 及 I ~ IV 波 IPL 明显短于 HIBD 组($P < 0.05$),与此同时,尼氏染色结果亦显示,HBO 治疗后 HIBD 组海马 CA1 区死亡神经元数目减少($P < 0.05$),这一结果进一步验证了 HBO 可通过促进损伤神经细胞的修复和减少 HIBD 所致的神经细胞变性、死亡,促进中枢神经系统突触传递效率,而改善脑功能。

临床上 HBO 治疗 HIBD 疗效报道不一,有研究认为 HBO 可能通过增加脑源性神经营养因子的水平,抑制 P38 的激活,阻止细胞凋亡,而改善脑功能^[13]。但也有研究提示,长期的 HBO 暴露可使幼鼠海马毛细血管扩张和神经元超微结构损伤,且随暴露时间的延长,神经元的存活率下降^[14]。造成临床疗效差异的原因可能与 HBO 治疗时机选择有关,已有不少的实验研究显示,HIBD 虽然会造成急性期神经元的死亡,但是,其在缺血再灌注期发生的选择性迟发性神经元死亡即凋亡才是导致许多神经系统后遗症的重要原因。研究表明,未成熟脑较成熟脑在缺氧损伤后更易发生凋亡,凋亡的持续时间可长达数周,且经适当干预可逆转凋亡的病理过程,改善预后^[15]。本实验结果显示 HBO 有良好促进 HIBD 脑修复的作用,可能与本研究 HBO 干预时机早,在 HIBD 后 24 h 即开始有关。出生后正常未成熟脑在发育过程中也存在着神经细胞选择性死亡,本研究提示 HBO 对神经细胞的保护可能为非选择性的,其对正常发育的未成熟脑神经细胞的凋亡也有抑制作用,并可促进神经突触传递效率,显示在单纯 HBO 组存活神经元数目高于对照组($P < 0.05$),BAEP 的 IV 波 PL 及 II ~ IV、I ~ IV 波 IPL 明显短于对照组($P < 0.05$),这一结果与王晓莉等^[16]之前的研究结果相一致,认为 HBO 可以通过活化 Wnt 信号途径而促进内源性神经干细胞的增殖和分化。但这一作用的临床意义尚有待于进一步研究。

本实验结果提示,HBO 对 HIBD 大鼠的海马 CA1 区有保护作用,在一定程度上能阻止 HIBD 神经细胞的死亡,使 HIBD 大鼠的神经突触传递效率得到不同程度的改善,但其机制尚不清楚,且 HBO 在新生早期应用有无高压、高氧所致的副反应也值得进一步研究^[1,17,18]。

[参 考 文 献]

- [1] 刘美娜,庄思齐,张红宇,覃肇源,李晓瑜. 早期高压氧治疗对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠的远期保护作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(3):216-220.
- [2] Li YH, Gong PL. Neuroprotective effects of dauricine against apoptosis induced by transient focal cerebral ischaemia in rats via a mitochondrial pathway[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007, 34(3):177-184.
- [3] Xiao N, Li S, Zhang X, Chen S. Effect of ephedrine on neuronal plasticity of hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats[J]. Neurosci Lett, 2008, 1435(2):99-102.
- [4] Bjelke B, Andersson K, Ogren SO, Bolme P. Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission[J]. Brain Res, 1991, 543(1):1-9.
- [5] Pazaiti A, Soubasi V, Spandou E, Karkavelas G, Georgiou T, Karalis P, et al. Evaluation of long-lasting sensorimotor consequences following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats: the neuroprotective role of MgSO₄ [J]. Neonatology, 2008, 95(1):33-40.
- [6] 陈惠金,张忠德,周建德,周泽汉,吴圣楣. 脑缺氧缺血性损伤新生大鼠的脑形态学研究及病理量化评分[J]. 上海医学, 2000, 23(11):682-684.
- [7] Hou H, Grinberg O, Williams B, Grinberg S, Yu H, Alvarenga DL, et al. The effect of oxygen therapy on brain damage and cerebral pO₂ in transient focal cerebral ischemia in the rat[J]. Physiol Meas, 2007, 28(8):963-976.
- [8] Li Z, Liu W, Kang Z, Lv S, Han C, Yun L, et al. Mechanism of hyperbaric oxygen preconditioning in neonatal hypoxia-ischemia rat model[J]. Brain Res, 2008, 1196:151-156.
- [9] 吴敬杰,刘敏,闫红涛,关重,王晔,李斌,等. 闭合性颅脑损伤后大鼠 BAEP 及脑损伤的动态变化[J]. 法医学杂志, 2006, 22(5):324-327.
- [10] Culling FA 著,孔庆雷译. 组织病理学与组织化学技术手册[M]. 北京:中国科技出版社, 1982, 92-102.
- [11] 王平宇. 大白鼠中枢神经系统解剖学基础[M]. 北京:人民卫生出版社, 1986, 465-475.
- [12] 潘映辐. 临床诱发电位学[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社, 2000, 258-293.
- [13] Ostrowski RP, Graupner G, Titova E, Zhang J, Chiu J, Dach N, et al. The hyperbaric oxygen preconditioning-induced brain protection is mediated by a reduction of early apoptosis after transient global cerebral ischemia[J]. Neurobiol Dis, 2008, 29(1):1-13.
- [14] 巨容,封志纯. 高压氧对缺氧缺血性脑损伤的保护作用及机制研究概述[J]. 中国新生儿科杂志, 2007, 22(3):186-188.
- [15] 陈敏榕,陈惠燕,陈达光,陈敏. 早期干预对缺氧缺血性脑损伤大鼠学习记忆能力及神经元凋亡的影响[J]. 福建医科大学学报, 2004, 38(3):285-287.
- [16] 王晓莉,杨于嘉,王庆红,谢岷,余小河,刘沉涛,等. 高压氧促 HIBD 新生大鼠内源性神经干细胞增殖过程中 Wnt-3 蛋白的变化[J]. 中国当代儿科杂志, 2007, 9(3):241-246.
- [17] 王晓莉,杨于嘉,王庆红,余小河,谢岷,刘沉涛,等. 不同时间窗高压氧治疗对 HIBD 新生大鼠白质损伤的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2007, 9(4):308-312.
- [18] 周北燕,卢光进,黄彦清,叶贞志,韩玉昆. 不同压力高压氧治疗对新生儿 HIE 疗效观察[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(2):133-135.

(本文编辑:吉耕中)