

论著 · 实验研究

增加高压氧疗程对治疗时间窗延迟的新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用

王庆红, 杨于嘉, 湛崇峰, 姚跃, 李萌

(中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008)

[摘要] **目的** 探讨多疗程的高压氧(HBO)治疗对96 h时间窗的缺氧缺血性脑损伤(HIBD)新生大鼠的保护作用。**方法** 7日龄 Sprague-Dawley 大鼠88只,随机分为正常对照组(CON)、HIBD组和HBO组。HBO组根据HBO治疗时间窗的不同分为2H、48H和96H组,即分别于HIBD后2、48和96 h给予HBO;各亚组又根据治疗疗程分成1疗程组(HBO-1)、2疗程(HBO-2)和3疗程组(HBO-3)。HBO组(压力为2 ATA)每天给予HBO 1次,连续7 d为一疗程,休息3 d后进入下一疗程。各组待96H组的3疗程亚组完成全部疗程后,即鼠龄38 d(HIBD后31 d)时一同处死。采用TUNEL染色检测大脑皮层和海马CA1区神经细胞凋亡;并采用NSE免疫组化方法检测各组皮层神经元数量。**结果** ① HIBD组凋亡细胞数量明显高于CON组,同时NSE阳性细胞明显少于CON组($P<0.01$)。② 随着治疗时间窗的延迟,单疗程HBO对凋亡的抑制作用及对神经元的保护作用逐渐减弱。③ 在48H和96H HBO组,HBO对神经细胞凋亡的抑制作用及对神经细胞的保护作用随着疗程的增加而逐渐增强;但2H HBO组经过一疗程HBO治疗后,凋亡细胞数量已经减少至CON组水平,而且NSE阳性细胞数量增加也接近CON组,随着疗程增加不再有明显变化。**结论** ① HIBD后2 h给予一疗程的HBO治疗即可明显抑制神经细胞的凋亡及保护神经元;② 增加疗程可增强治疗窗延迟的HBO对神经细胞凋亡的抑制与对神经元的保护作用。

[中国当代儿科杂志,2009,11(6):464-470]

[关键词] 高压氧;缺氧缺血性脑损伤;疗程;新生大鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)06-0464-07

Protective effects of delayed multiple course hyperbaric oxygen treatment against hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats

WANG Qing-Hong, YANG Yu-Jia, CHEN Chong-Feng, YAO Yue, LI Meng. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Yang Y-J, Email: yyjcjcp@163.com)

Abstract: Objective To study the protective effects of multiple course hyperbaric oxygen (HBO) treatment against hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) in neonatal rats when HBO treatment is delayed (96 hrs after the HIBD event). **Methods** Eighty-eight 7-day-old Sprague-Dawley rat pups were randomly assigned to control, HIBD and HBO groups. The HBO group was subdivided into cohorts receiving treatment 2 h, 48 h and 96 h, respectively, after HIBD was induced. The three subgroups comprising different therapeutic windows were further randomly assigned to receive 1, 2 or 3 courses of HBO treatment ("HBO-1, -2 and -3 sub-groups"). HBO was administered once daily (2 ATA), a course lasting for seven days. There was an interval of three days between the courses. All pups were sacrificed at the end of HBO treatment (31 days after HIBD). TUNEL staining was used for testing neuronal apoptosis in the cortex and the CA1 of the hippocampus, and NSE staining was used to ascertain cortical neuronal population. **Results** ① There were significantly more TUNEL positive cells in the HIBD group than in the control group; NSE positive cells were significantly lower than in controls ($P<0.01$). ② With the more delayed therapeutic window, the effects of apoptosis inhibition and neuronal protection of a single course of HBO were gradually reduced. ③ With increasing courses of HBO treatment, the effects of apoptosis inhibition and neuronal protection of HBO increased gradually in rats receiving treatment 48 and 96 hrs after HIBD. In the HBO group receiving treatment 2 hrs after HIBD, the number of apoptotic cells and NSE positive cells were close to that of the control group after one course of HBO treatment. **Conclusions** One course of HBO administered within 2 hrs after HIBD can effectively inhibit neuron apoptosis and protect neurons. The effects of apoptosis inhibition and neuron protection of HBO can be increased through increasing the number of HBO treatment courses in neonatal rats with HIBD even if initiation of treatment is delayed after HIBD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (6):464-470]

Key words: Hyperbaric oxygen; Hypoxic ischemic brain damage; Treatment course; Neonatal rats

[收稿日期]2009-03-10;[修回日期]2009-04-09
[基金项目]国家自然科学基金(项目编号:30672240)。
[作者简介]王庆红,女,博士研究生,副主任医师。主攻方向:新生儿疾病。
[通讯作者]杨于嘉,男,教授,中南大学湘雅医院儿科,邮编:410008。

缺氧缺血性脑病(HIE)是儿童脑瘫、精神发育迟滞、学习障碍和癫痫的常见原因^[1]。发病机制比较复杂,细胞坏死和细胞凋亡是缺氧缺血性脑损伤(HIBD)时脑细胞死亡的两种主要形式,其中凋亡主要发生在急性期过后以及缺血半影区,是HIBD后迟发性细胞损伤的主要方式^[2~4]。

目前认为高压氧(HBO)治疗HIBD有较好的疗效,可减轻脑损伤程度,促进脑功能重建^[5~9]。但是HBO治疗的时间窗对于损伤脑组织的恢复和重塑很重要,大量的动物研究发现HBO治疗新生大鼠的最佳时间窗为HIBD后6~24 h,时间窗延长则效果不佳^[10~12]。

临床工作中,部分病情较重的HIE患儿由于生命体征不稳定,不能早期进行HBO治疗,一般要在生后5 d,甚至更晚才能开始治疗。这样,治疗时间窗的延迟可能会给HIE患儿的预后带来一定的影响。那么,在HBO治疗时间窗延迟的情况下,增加HBO的疗程,延长HBO治疗的时间是否能减轻神经细胞凋亡,有助于弥补由于延误HBO治疗而对神经系统造成的损伤呢?目前国内外尚无这方面的文献报道。本研究就治疗时间窗延迟时增加HBO疗程对神经细胞凋亡的影响进行研究,希望能对临床工作提供有力依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康7日龄Sprague-Dawley(SD)大鼠88只(清洁级),由中南大学实验动物中心提供,雌雄不限,体重11.8~15.6 g,平均 13.2 ± 1.5 g。采用完全随机设计分为11组($n=8$),即正常对照组(CON),HIBD组,HBO组(条件:压力为2 ATA,稳压1 h,每天1次,连续7 d为一疗程,休息3 d后进入下一疗程)。HBO组在HIBD模型制作后根据不同治疗时间窗,分为2 h HBO组(2H,在HIBD后2 h开始给予HBO)、48 h HBO组(48H,HIBD后48 h给予HBO)及96 h HBO组(96H,HIBD后96 h给予HBO)3个亚组;各亚组又根据不同疗程分成1疗程组(HBO-1)、2疗程(HBO-2)和3疗程组(HBO-3)。对照组不做任何处理。采用Rice-Vannucci法制成HIBD模型^[13]:乙醚吸入麻醉后分离左侧颈总动脉,双线结扎从中剪断后再置于8%低氧舱缺氧2 h。各组在HBO疗程完成后置于空气中喂养,待96H组的3疗程亚组完成全部疗程后,即鼠龄38 d(HIBD后31 d)时一同处死。

1.2 标本采集

各组大鼠在HIBD后31 d时处死。用10%水合氯醛麻醉,麻醉成功后,打开胸腔,剪开右心耳,于心尖部插管,注入100 mL生理盐水,待流出液清亮后,再注入4%多聚甲醛100 mL灌注固定,断头取脑,于前凶中点处予美蓝标记,并在大脑皮层表面用美蓝标记左侧大脑半球后,4%多聚甲醛固定24 h后石蜡包埋、固定、脱水后,切片机在前凶前1.0 mm至-0.8 mm开始冠状位连续切片,片厚4 μ m,行TUNEL法检测各组脑组织神经细胞凋亡。并采用NSE免疫组化方法检测各组神经元数量。

1.3 TUNEL法检测大鼠神经细胞凋亡

玻片预先用多聚赖氨酸进行处理。切片常规脱蜡至水。用新鲜配制3% H_2O_2 ,室温处理10 min。蒸馏水洗2 min $\times$ 3次。加0.01 M TBS 1:200新鲜稀释Proteinase K 37 $^{\circ}$ C消化10 min,0.01 TBS洗2 min $\times$ 3次。标本片加标记缓冲液(labeling buffer)20 μ L/片,以保持切片湿润。按每张切片取TDT和DIG-d-UTP各1 μ L,加入18 μ L标记缓冲液中,混匀。甩去切片上多余液体后加标记液,20 μ L/片。置样品于湿盒中,37 $^{\circ}$ C标记2 h。0.01 M TBS洗2 min $\times$ 3次。加封闭液50 μ L/片,室温30 min,甩掉封闭液。用抗体稀释液1:100稀释生物素化抗地高辛抗体(取1 mL抗体稀释液加生物素化抗地高辛抗体10 μ L),混匀后50 μ L/片加至标本片上,置样品于湿盒中,37 $^{\circ}$ C反应30 min,0.01 M TBS洗2 min $\times$ 3次。用抗体稀释液1:100稀释SABC;取1 mL抗体稀释液加SABC 10 μ L,混匀后50 μ L/片加至切片,37 $^{\circ}$ C反应30 min,0.01 M TBS洗5 min $\times$ 4次。取1 mL蒸馏水,分别加入DAB试剂盒中A,B,C试剂各一滴,混匀后加至标本片上,显色10~30 min左右,水洗,用苏木素轻度复染,0.01 M TBS洗,蒸馏水洗。脱水,透明,中性树胶封片后显微镜观察,凋亡细胞染色呈棕黄色。

1.4 NSE免疫荧光染色检测神经元数量

石蜡切片脱蜡至水,用蒸馏水冲洗两遍,加入0.01 M 枸橼酸盐缓冲液(pH=6.0)中,微波炉92~98 $^{\circ}$ C修复抗原5~10 min,自然冷却到室温后,再抗原修复一次,取出冷却至室温,磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤后,加入2 M HCl 37 $^{\circ}$ C,30 min,0.04%胃蛋白酶室温下6 min,待DNA变性后,5% BSA血清37 $^{\circ}$ C封闭1 h,加入兔抗大鼠NSE抗体(1:200,博士德),37 $^{\circ}$ C孵育30 min,4 $^{\circ}$ C冰箱过夜,0.01 M PBS冲洗,10 min $\times$ 3次,滴加FITC标记的山羊抗兔IgG(1:100,北京中杉试剂公司),避光条件下37 $^{\circ}$ C孵

育 60 min,0.1% TBS(0.01 M PBS +0.1% TritonX-100)冲洗 3 次,每次 10 min 滴加甘油缓冲液封片,4℃ 冰箱避光保存,激光扫描共聚焦显微镜下观察,每只大鼠取 4~5 个非连续的脑片计数,并计算NSE 阳性细胞数平均值。

1.5 统计学分析

所有计量数据用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,全部资料采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析,组间比较采用 *q* 检验,*P* < 0.05 认为具有显著性意义。

2 结果

2.1 HBO 治疗对大脑皮层和海马 CA1 区神经细胞凋亡的影响

2.1.1 不同时间窗单疗程 HBO 对皮层神经细胞凋亡的影响

HBO 治疗一疗程后,2H 组皮层凋亡

细胞数量接近 CON 组(*P* > 0.05)。随着时间窗延长,皮层凋亡细胞逐渐增多,其中 96H 组皮层凋亡细胞数量明显高于 2H 和 48H 组(*P* < 0.01);提示 HBO 对 HIBD 大鼠皮层神经细胞凋亡的抑制作用随着时间窗的延长而逐渐减弱(图 1~2)。

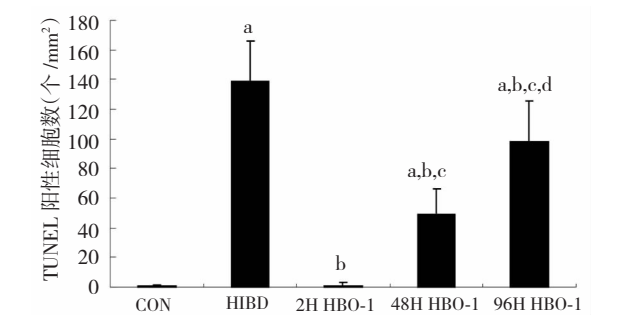


图 1 HIBD 后各时间窗单疗程 HBO 各组皮层 TUNEL 染色 a;与 CON 组比较,*P* < 0.01; b;与 HIBD 组比较,*P* < 0.01; c;与 2H HBO-1 组比较,*P* < 0.01; d;与 48H HBO-1 组比较,*P* < 0.01

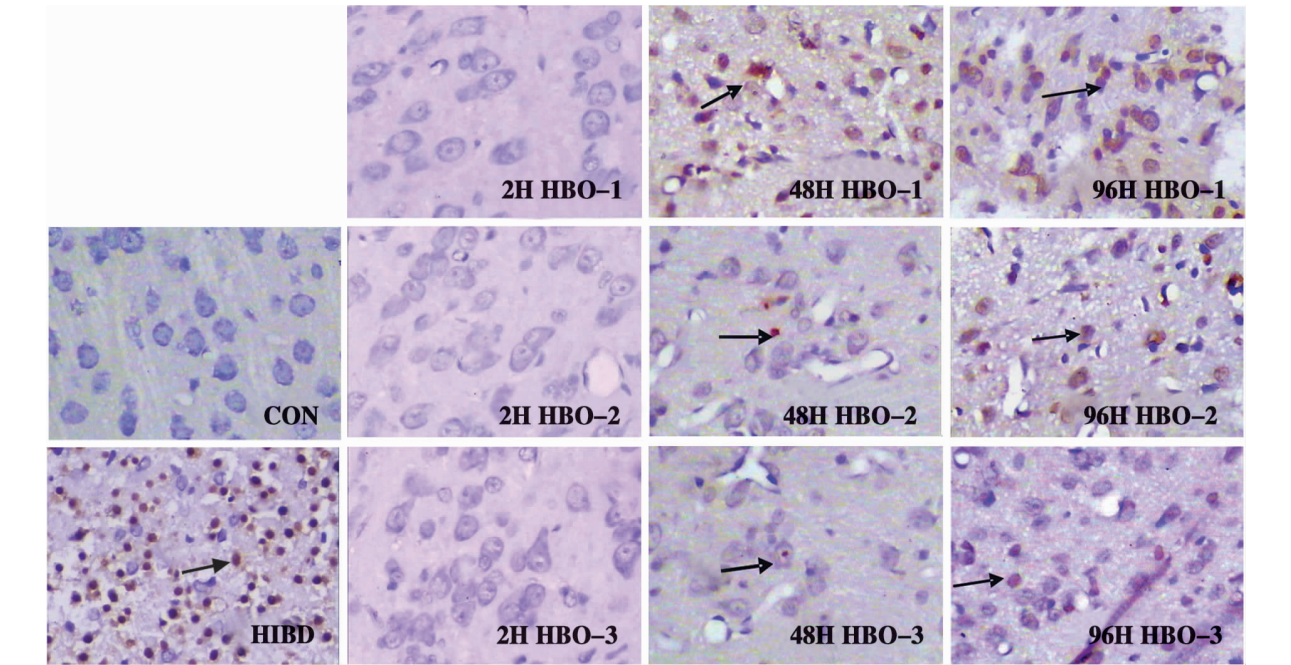


图 2 HIBD 后各时间窗不同疗程 HBO 各组皮层 TUNEL 染色(×400) CON 组无阳性细胞;HIBD 组可见大量棕色的凋亡阳性细胞。2H HBO-1 亚组几乎无凋亡细胞;48H HBO-1 和 96H HBO-1 亚组可见较多棕色的凋亡细胞,其中 96H HBO-1 每组凋亡细胞明显多于 48H HBO-1 组。2H 组中各疗程组均几乎无凋亡细胞;48H 组中随着疗程增加,凋亡细胞明显减少,其中 HBO-2 和 HBO-3 亚组则仅见散在几个凋亡细胞;96H 组中均可见较多棕色的凋亡细胞,但随着疗程的增加,凋亡细胞逐渐减少。

2.1.2 不同时间窗单疗程 HBO 对海马 CA1 区神经细胞凋亡的影响

HBO 治疗一疗程后,2H 组海马 CA1 区凋亡细胞数量接近 CON 组(*P* > 0.05)。随着时间窗延长,海马 CA1 区凋亡细胞逐渐增多,其中 96H 组皮层凋亡细胞数量明显高于 2H 和 48H 组(*P* < 0.01);提示 HBO 对 HIBD 大鼠海马 CA1 区神经细胞凋亡的抑制作用随着时间窗的延长

而逐渐减弱(图 3~4)。

2.1.3 HIBD 后各时间窗不同疗程 HBO 治疗对大脑皮层神经细胞凋亡的影响

HIBD 组皮层可见大量棕色的凋亡细胞;2H 组各亚组之间以及与 CON 组之间皮层凋亡细胞数量无显著差别;48H 组中 HBO-1 亚组凋亡细胞数量高于 CON 组,但明显较 HIBD 组少(*P* < 0.01),HBO-2 和 HBO-3 两个亚

组的凋亡细胞数量则明显少于 HBO-1 亚组,与 CON 组差异无显著性,而且 HBO-2 和 HBO-3 两个亚组之间差别也无显著性意义,说明在 HIBD 后48 h 给予 HBO 治疗,增加疗程也可有效抑制神经元凋亡。96H 组中各亚组的凋亡细胞数量虽然较 CON 组明显增多($P < 0.01$),但仍少于 HIBD 组($P < 0.01$),而且随着 HBO 疗程的增加,凋亡细胞逐渐减少,HBO-2 和 HBO-3 两个亚组的凋亡细胞数量则明显少于 HBO-1 亚组($P < 0.01$),HBO-2 和 HBO-3 两个亚组之间差异也无显著性意义。说明在 HIBD 后 96 h 开始 HBO 治疗,增加疗程可减轻凋亡的严重程度(图 2,图 5)。

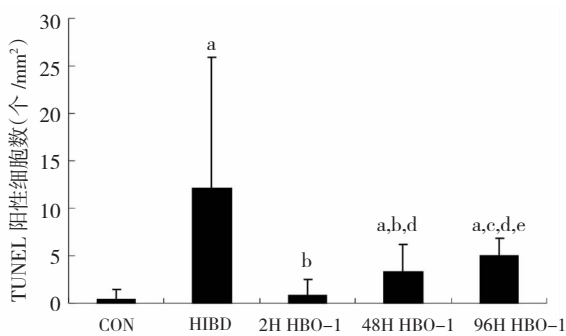


图 3 HIBD 后各时间窗单疗程 HBO 各组海马 CA1 区 TUNEL 染色 a:与 CON 组比较, $P < 0.01$; b:与 HIBD 组比较, $P < 0.01$; c:与 HIBD 组比较, $P < 0.05$; d:与 2H HBO-1 组比较, $P < 0.01$; e:与 48H HBO-1 组比较, $P < 0.01$

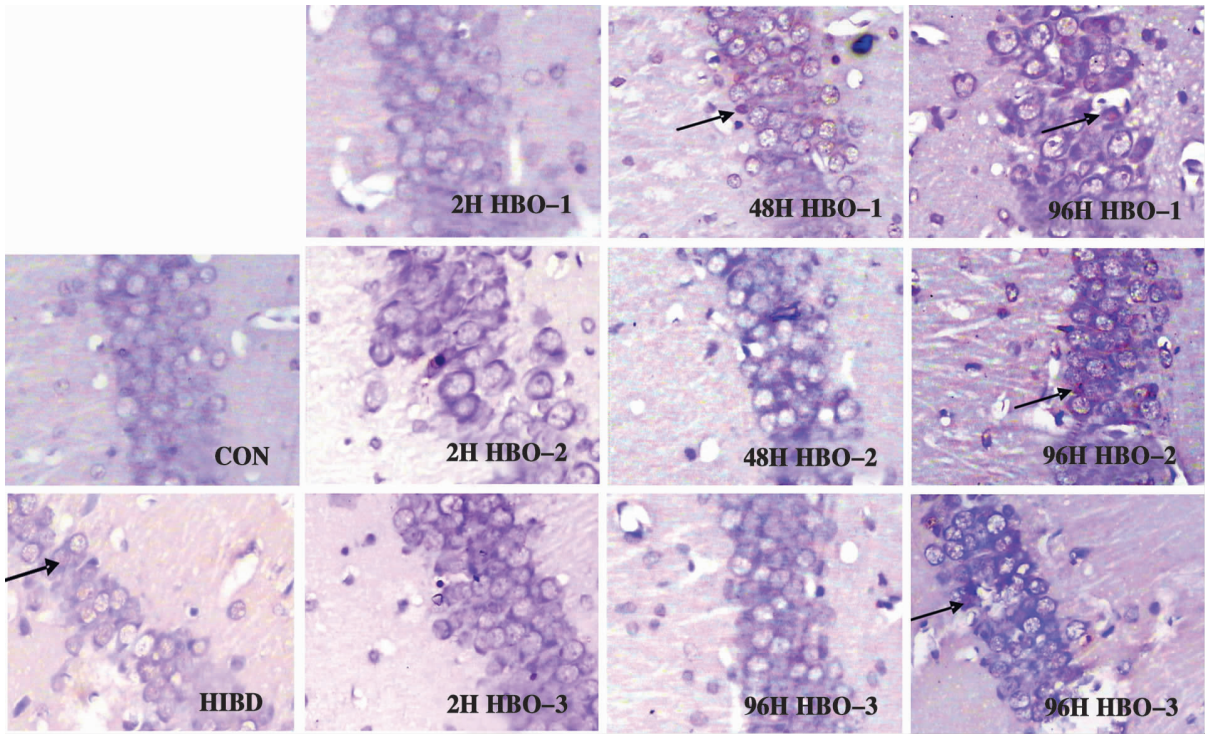


图 4 HIBD 后各时间窗不同疗程 HBO 各组海马 CA1 区 TUNEL 染色($\times 400$) CON 组无阳性细胞;HIBD 组可见较多棕色凋亡阳性细胞。2H HBO-1 亚组几乎无凋亡细胞,48H HBO-1 和 96H HBO-1 亚组均可见少量棕色的凋亡细胞。2H 组中各疗程亚组几乎无凋亡细胞;48H 组中 HBO-1 亚组可见少量阳性细胞,而 HBO-2 和 HBO-3 亚组则几乎无凋亡细胞;96H 组中 HBO-1 亚组可见少量阳性细胞,但随着疗程的增加,凋亡细胞逐渐减少。

2.1.4 HIBD 后各时间窗不同疗程 HBO 治疗对海马 CA1 区神经细胞凋亡的影响 HIBD 组海马 CA1 区的凋亡细胞较 CON 组明显增多($P < 0.01$);2H 各亚组海马 CA1 区凋亡细胞明显低于 HIBD 组($P < 0.01$),与 CON 组差别无显著意义,而且 2H 各亚组之间差别无显著性,提示 HIBD 后 2 h 开始给予 HBO 治疗可抑制海马凋亡的发生。48H 各亚组凋亡细胞虽然高于 CON 组,但明显低于 HIBD 组,而且 HBO-2 和 HBO-3 两个亚组的凋亡细胞明显低于 HBO-1 亚组,差别有显著意义($P < 0.05$),但 HBO-2

和 HBO-3 两个亚组之间差别无显著性意义。说明在 HIBD 后 48 h 给予 HBO 治疗,增加疗程也可有效抑制神经元凋亡。96H 组中 HBO-1 组的凋亡细胞数量虽然较 HIBD 组少,但差别无显著性意义。而随着 HBO 疗程的增加,凋亡细胞明显减少,HBO-2 和 HBO-3 亚组的凋亡细胞明显低于 HBO-1 组和 HIBD 组($P < 0.05$),但仍高于 CON 组($P < 0.05$)。提示在 HIBD 后 96 h 开始 HBO 治疗,增加疗程可明显减轻凋亡的程度(图 4,图 6)。

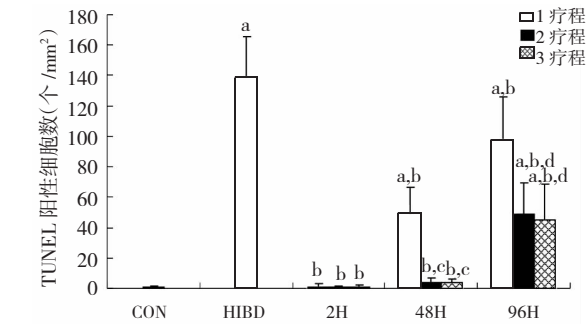


图5 HIBD 各时间窗不同疗程 HBO 各组皮层 TUNEL 染色 a:与 CON 组比较, $P<0.01$; b:与 HIBD 组比较, $P<0.01$; c:与 48H HBO-1 组比较, $P<0.01$; d:与 96H HBO-1 组比较, $P<0.01$

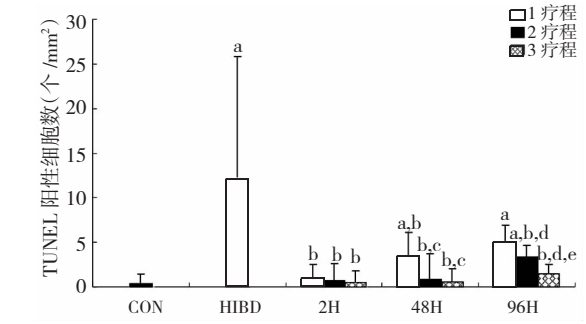


图6 HIBD 各时间窗不同疗程 HBO 各组海马 CA1 区 TUNEL 染色 a:与 CON 组比较, $P<0.01$; b:与 HIBD 组比较, $P<0.01$; c:与 48H HBO-1 组比较, $P<0.05$; d:与 96H HBO-1 组比较, $P<0.05$; e:与 CON 组比较, $P<0.05$

2.2 HIBD 后各时间窗不同疗程 HBO 治疗各组皮层 NSE 染色结果

2.2.1 各时间窗单疗程 HBO 各组皮层 NSE 染色结果 HIBD 组皮层 NSE 阳性细胞明显低于 CON 组($P<0.01$)。2H HBO-1 组 NSE 阳性细胞明显增加,显著高于 HIBD 组,与 CON 组差异无显著性;48H HBO-1 和 96H HBO-1 组的 NSE 阳性细胞数与 HIBD 组差异无显著性,且随着时间窗的延长而逐渐减少(图 7~8)。

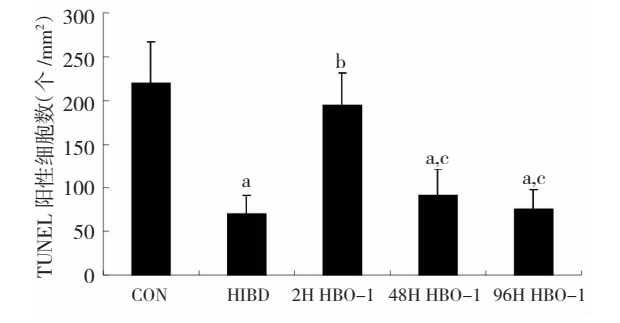


图7 HIBD 后各时间窗单疗程 HBO 各组皮层 NSE 染色 a:与 CON 组比较, $P<0.01$; b:与 HIBD 组比较, $P<0.01$; c:与 2H HBO-1 组比较, $P<0.01$

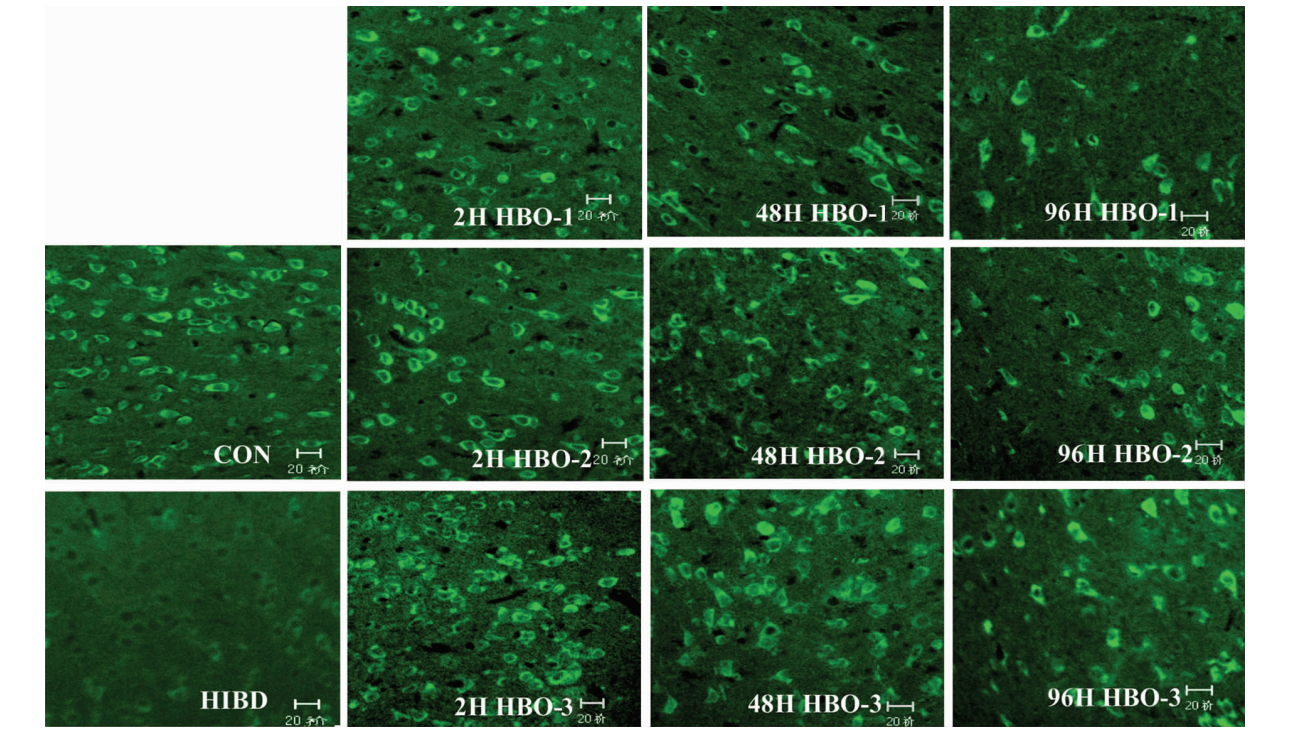


图8 HIBD 后各时间窗不同疗程 HBO 各组皮层 NSE 染色($\times 400$) CON 组可见大量 NSE 阳性细胞;HIBD 组阳性细胞数量明显减少。2H HBO-1 亚组可见较多 NSE 阳性细胞,48H HBO-1 和 96H HBO-1 亚组的阳性细胞数明显减少。2H 组中各疗程组的 NSE 阳性细胞数量较多,与 CON 组差异无显著性;48H 和 96H 组中 HBO-1 亚组 NSE 阳性细胞数量明显减少,HBO-2 和 HBO-3 亚组的 NSE 阳性细胞数量逐渐增多。

2.2.2 各时间窗不同疗程 HBO 治疗各组皮层 NSE 染色结果 2H 组三个亚组的 NSE 阳性细胞数量明显高于 HIBD 组($P < 0.01$),与 CON 组差异无显著性,而且随着 HBO 疗程增加,NSE 阳性细胞数量无明显变化;48H 组 NSE 阳性细胞随着疗程增加逐渐增多,其中 HBO-2 和 HBO-3 亚组高于 HBO-1 亚组和 HIBD 组($P < 0.01$),但 HBO-2 与 HBO-3 亚组之间差异无显著性;96H 组随着 HBO 疗程的增加,NSE 阳性细胞数量逐渐增加,HBO-3 亚组明显高于 HIBD、HBO-1 和 HBO-2 亚组。提示在时间窗延长的情况下,增加 HBO 疗程对皮层神经细胞的保护作用也逐渐增加(图 8~9)。

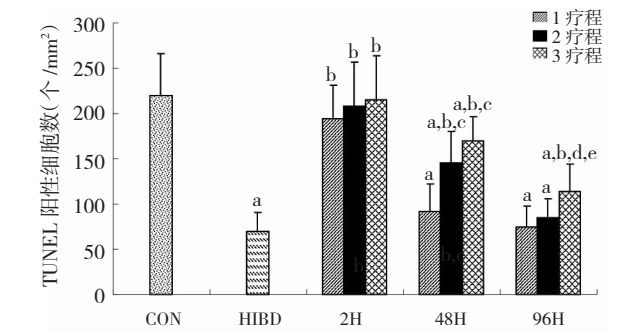


图9 HIBD 后各时间窗不同疗程 HBO 各组皮层 NSE 染色 a: 与 CON 组比较, $P < 0.01$; b: 与 HIBD 组比较, $P < 0.01$; c: 与 48H HBO-1 亚组比较, $P < 0.01$; d: 与 96H HBO-1 亚组比较, $P < 0.01$; e: 与 96H HBO-2 亚组比较, $P < 0.05$

3 讨论

新生儿 HIE 是围生期最常见的脑损伤的原因,也是引起儿童脑病、精神损害、惊厥和持续性运动障碍的主要原因。由于围生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死亡。HIBD 时脑细胞死亡有两种形式,即细胞坏死和细胞凋亡。在缺氧导致的损伤中,凋亡占很大的比例,且持续时间较长,是加重脑损伤的一个重要因素^[14]。有资料显示,动物在 HIBD 后 24 h 内即可发生早期的脑损伤,并导致后期的脑萎缩。而 HBO 可抑制或减轻神经元凋亡的发生。Calvert 等^[9]观察了 HIBD 后 24 h 内皮层凋亡的变化,发现 7 日龄的 SD 大鼠 HIBD 损伤后 6 h 脑组织中即可出现凋亡细胞,而且凋亡细胞的数量呈时间依从性,18~24 h 凋亡达高峰。而在 HIBD 后 1 h 即给予单次 HBO(3 ATA,1 h)治疗,则各个时间点的凋亡细胞明显减少,说明在 HIBD 后早期给予 HBO 治疗可有效抑制凋亡的发

生,对神经细胞有保护作用。本实验发现 HIBD 后 2 h 开始给予单个疗程 HBO 治疗可完全阻止神经细胞凋亡的发生,而增加疗程对这一作用并无增强;HIBD 后 48~96 h 开始给予 HBO 治疗,凋亡细胞明显增多,且随着时间窗的延长,凋亡情况越严重。

神经细胞凋亡是 HIBD 过程中神经细胞死亡的重要形式,关于其发生机制目前已有较多的研究。资料显示,神经细胞的凋亡与相关基因表达有关,又受到许多因素的调节,其中 Bcl-2、HIF-1a 和 caspase 等因子起着重要的作用^[15~17]。HBO 可提高脑损伤部位的 Bcl-2 蛋白的表达,增加 Bcl-2/Bax 比例,保护线粒体膜的完整性而发挥抗凋亡的作用^[18]。HIBD 后脑组织中的 caspase-3 和 caspase-9 的表达明显增加,而在 HIBD 前给予 HBO 预处理,则脑损伤部位的 caspase-3 和 caspase-9 的表达明显减少,同时凋亡细胞也明显减少,提示 HBO 预处理也可减轻凋亡的程度,对脑组织有保护作用^[3]。缺氧诱导因子-1a 可通过激活 caspase-9 和 caspase-3 途径,结合肿瘤抑制因子 p53 后,引起凋亡的发生。缺血后 6 h 即在海马和皮层有 HIF-1a 的增高,48~96 h 达高峰,同时出现 p53, caspase-9 和 caspase-3 的增高。而 HBO 可减少这些因子的表达,并减少细胞死亡^[19]。

在临床上,部分 HIE 患儿由于病情危重,生命体征不平稳,尚不能尽早给予 HBO 治疗,其接受 HBO 治疗的时间就会比较晚。那么在治疗时间窗延长的情况下,多疗程、长时间的 HBO 治疗效果如何? 目前还没有此方面的动物实验报道。另外,在一个疗程的 HBO 治疗完成后,神经细胞是否还会继续发生凋亡? 目前也还没有这方面的报道。因此我们的实验从临床实际情况出发,在时间窗延迟的情况下通过增加 HBO 疗程的方式,观察不同疗程 HBO 对 HIBD 后神经损伤的影响。

本实验发现,在 48H 和 96H 组中,单疗程亚组的凋亡细胞明显多于二、三疗程组,说明神经细胞的凋亡是一个持续时间较长的过程,虽然在 HIBD 后 48 和 96 h 给予单疗程 HBO 干预,这种干预作用也只是暂时性的,一旦停止 HBO 治疗,神经细胞还是会继续发生损伤凋亡。于是我们在 HIBD 后 48 和 96 h 开始给予多疗程的 HBO 疗程,发现 48 h 组在增加 HBO 疗程后,凋亡细胞明显减少至接近正常组,说明 HIBD 后 48 h 给予多个疗程的 HBO 治疗可有效抑制后期神经细胞的凋亡。在 HIBD 后 96 h 开始给予 HBO 治疗,HBO 一疗程亚组的神经元凋亡细胞数量接近 HIBD 组,而二、三疗程亚组的凋亡

细胞虽然也较多,但较一疗程亚组和 HIBD 组明显减少。说明在 HIBD 后 96 h 开始 HBO 治疗,增加 HBO 的疗程可以减轻后期神经细胞凋亡的严重程度。

神经元特异性烯醇化酶(NSE)是神经细胞能量代谢过程中参与糖酵解过程的关键酶,是神经元的特异性标记物。本实验发现,HIBD 组大鼠的大脑皮层中NSE阳性细胞数量明显减少,HIBD后48~96 h开始给予不同疗程的HBO治疗后,随着HBO疗程的增加,NSE阳性细胞数量逐渐增加,神经元破坏减少,这也说明在HIBD后治疗窗延迟的情况下,多疗程的HBO有助于增强神经元细胞对脑缺血缺氧损伤的耐受性。

总之,本研究发现HIBD后2 h给予一疗程的HBO治疗即可明显抑制神经细胞的凋亡及保护神经元;随着开始治疗的时间窗的延迟,HBO的保护作用逐渐减弱,但是,通过增加疗程可增强对神经细胞凋亡的抑制与对神经元的保护作用。

[参 考 文 献]

[1] Triulzi F, Parazzini C, Righini A. Patterns of damage in the mature neonatal brain[J]. *Pediatr Radiol*, 2006, 36(7):608-620.

[2] 刘玲,杨于嘉,宋健辉,刘杰波. 高压氧治疗对新生大鼠缺血缺氧血行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[J]. *中国当代儿科杂志*, 2005, 7(4):333-336.

[3] Raghupathi R, Graham DI, McIntosh TK. Apoptosis after traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2000, 17(10):927-938.

[4] Nakajima W, Ishida A, Lange MS, Gabrielson KL, Wilson MA, Martin LJ, et al. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(21):7994-8004.

[5] Springer JE, Nottingham SA, Mcewen ML. Caspase-3 apoptotic signaling following injury to the central nervous system[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2001, 39(4):299-307.

[6] Hayashi T, Iwai M, Ikeda T, Jin G, Deguchi K, Nagotani S, et al. Neural precursor cells division and migration in neonatal rat brain after ischemic/hypoxic injury[J]. *Brain Res*, 2005, 1038(1):41-49.

[7] Yun L, Changman Z, John WC, Austin RTC, John HZ. Multiple effects of hyperbaric oxygen on the express of HIF-1a and apoptotic

gene in a global ischemia-hypotension rat model [J]. *Exp Neurol*, 2005, 191(2005):198-210.

[8] Lou M, Chen Y, Ding M, Eschenfelder CC, Deuschl G. Involvement of the mito-chondrial ATP-sensitive potassium channel in the neuro-protective effect of hyperbaric oxygenation after cerebral ischemia[J]. *Brain Res Bull*, 2006, 69(2):109-116.

[9] Calvert JW, Zhou C, Nanda A, Zhang JH. Effect of hyperbaric oxygen on apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model [J]. *J Appl Physiol*, 2003, 95(5):2072-2080.

[10] 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新生大鼠脑白质损伤的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2007, 9(4):308-312.

[11] 刘晓红,赵永利,马巧梅,周熙惠,王燕. 高压氧干预新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的时间窗研究[J]. *中华儿科杂志*, 2006, 44(3):177-181.

[12] 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.

[13] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat [J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2):131-141.

[14] Yin D, Zhou C, Kusaka I, Calvert JW, Parent AD, Nanda A, et al. Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(7):855-864.

[15] Zhao H, Yenari MA, Cheng D, Sapolsky RM, Steinberg GK. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity [J]. *J Neurochem*, 2003, 85(4):1026-1036.

[16] Ferrer I, Friguls B, Dalfo E, Justicia C, Planas AM. Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2003, 29(5):472-481.

[17] Lossi L, Tamagno I, Merighi A. Molecular morphology of neuronal apoptosis: analysis of caspase-3 activation during postnatal development of mouse cerebellar cortex[J]. *J Mol Histol*, 2004, 35(6):621-629.

[18] 刘小红,赵永利,徐曼,王燕,李明,周熙惠,等. 高压氧对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠神经细胞凋亡以及凋亡诱导因子核转移的抑制作用[J]. *中国儿童保健杂志*, 2006, 14(6):599-562.

[19] Li Y, Zhou C, Calvert JW, Colohan AR, Zhang JH. Multiple effects of hyperbaric oxygen on the expression of HIF-1 alpha and apoptotic genes in a global ischemia-hypotension rat model [J]. *Exp Neurol*, 2005, 191(1):198-210.

(本文编辑:邓芳明)