

不同压力高压氧对实验性脑出血大鼠出血灶周围水肿及水通道蛋白4表达的影响

陈玉燕¹ 李红玲^{2,3} 牛蕾蕾¹ 张会萍²

摘要

目的:观察不同压力高压氧对实验性脑出血大鼠出血灶周围水肿及水通道蛋白-4(AQP4)表达的影响。

方法:应用胶原酶诱导法建立大鼠脑出血模型,将90只雄性脑出血SD大鼠随机分为对照组(18只)、常压氧(1.0ATA)治疗组(18只)和高压氧治疗组(54只),高压氧治疗组再按不同的高压氧治疗压力分为1.8ATA组、2.0ATA组、2.2ATA组3个亚组,每组18只,按不同治疗压力1次/d,对照组为脑出血模型组,不进行HBO/常压氧治疗,各组分别于第1、3、5天断头取脑,每个时间点各6只。干湿比重法测定脑组织的水含量,免疫组织化学染色法测定AQP4的表达。

结果:脑组织水含量:①常压氧治疗组较脑出血对照组减少,于各时间点比较差异均无显著性意义($P>0.05$);②高压氧治疗各组较常压氧组及对照组水肿减轻明显,于第1天时2.0ATA组与常压氧组及对照组比较差异有显著性意义($P<0.05$);于第3、5天时高压氧治疗各组与常压氧组及对照组比较均有显著性意义($P<0.05$),但2.0ATA组较1.8ATA组及2.2ATA组减轻明显($P<0.05$)。AQP4表达:①常压氧治疗组较脑出血对照组表达减少,但于各时间点比较差异均无显著性意义($P>0.05$);②高压氧治疗各组较常压氧治疗组及脑出血对照组表达减少,于各时间点比较均有显著性意义($P<0.05$),但于3d、5d时2.0ATA组较1.8ATA组及2.2ATA组表达减少更明显($P<0.05$)。

结论:HBO治疗可减少出血灶周围脑组织水含量及AQP4表达,其中2.0ATA治疗压力优于1.8ATA及2.2ATA。

关键词 高压氧;脑出血;脑水肿;水通道蛋白-4

中图分类号:R459.6;R743.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2013)---

Effects of different atmosphere absolute hyperbaric oxygen on perihematomal edema and expression of aquaporin-4 in rats with intracerebral hemorrhage/CHEN Yuyan, LI Hongling, NIU Leilei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28():

Abstract

Objective:To study the effects of different atmosphere absolute(ATA) hyperbaric oxygen(HBO) on perihematomal edema and expression of aquaporin-4 in rats with intracerebral hemorrhage(ICH).

Method:The collagenase-induced method was used to set up the rat models. A total of 90 male SD rats with experimental ICH were randomly divided as control group (n=18), ICH with normal baric(1.0ATA) oxygen treatment group(n=18) and ICH with HBO therapy group(n=54). The rats in the HBO therapy group were again divided as ICH with 1.8ATA HBO therapy subgroup, ICH with 2.0ATA HBO therapy subgroup and ICH with 2.2ATA HBO therapy subgroup, with 18 rats in each. The oxygen treatment was administered by using 90% oxygen at different ATA in a steady pressure for 60min, once daily. Rats were sacrificed by decapitation at the time points of 1d, 3d, 5d. Each time point had 6 rats. The water content of brain tissue was measured by dry-wet method, the expression of AQP4 was detected by immunohistochemical staining.

Result:The brain water content and AQP4 level in the perihematomal area in 1.0ATA oxygen treatment group

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.期数.文章编号(如:001)

1 河北医科大学第二医院,石家庄市,050000; 2 河北医科大学第二医院康复高压氧科; 3 通讯作者
作者简介:陈玉燕,女,硕士研究生; 收稿日期:2013-01-05

showed no significant difference as compared with that in control group at day 1,3 and 5 post-ICH($P>0.05$).HBO therapy significantly reduced the brain water content and AQP4 level in the perihematomal area compared with control group and 1.0ATA oxygen treatment group at day 1, 3 and 5 post-ICH($P<0.05$),however,the effect of HBO with 2.0ATA was superior to that 1.8ATA and 2.2ATA at days3 and 5 post-ICH($P<0.05$) .

Conclusion:HBO therapy can decrease the brain water content and AQP4 level in the perihematomal area.The effect of HBO with 2.0ATA was superior to that 1.8ATA and 2.2ATA.

Author's address The Second Hospital, Hebei Medical University,Shijiazhuang,050000

Key word hyperbaric oxygen; intracerebral hemorrhage; brain edema; aquaporin-4

脑水肿是脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)后最主要的继发性病理生理改变,有效治疗脑水肿是减轻脑继发性损害、保护和促进神经功能恢复的重要措施^[1]。近年来国内外学者对HBO治疗脑出血进行了较为广泛的研究,并且证实HBO有明确的疗效,但对其作用机制尚不清楚^[2]。水通道蛋白-4(aquaporin-4, AQP4)是美国科学家Agre教授于1994年分离发现的^[3]。AQP4是脑组织中的主要水通道蛋白,丰富表达在毛细血管、血管周围及软脑膜所直接接触的胶质细胞上。近年研究表明AQP4与脑水肿密切相关^[4]。但是在不同压力HBO作用下,出血灶周围脑组织的水含量及AQP4的表达情况目前尚不明了。关于高压氧是否通过抑制AQP4的表达来减轻脑水肿也鲜有报道。本研究的目的是通过建立大鼠脑出血模型,观察不同压力高压氧治疗对出血周围脑组织的水含量及AQP4表达的影响,探索高压氧治疗脑出血的最佳治疗压力,并探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 主要器材及试剂

大鼠脑立体定向仪(美国STOELTING公司)、高压氧舱(烟台冰轮高压氧舱有限公司YC3200/22VII)、尖头改锥(自制)、VII型胶原酶(美国Sigma公司)、兔抗大鼠多克隆AQP-4抗体(武汉博士德生物工程有限公司)、免疫组化试剂盒及DAB显色试剂盒(河北世纪康为生物工程有限公司)、医用光学显微镜及BX41显微照相机(日本OLYMPUS公司)。

1.2 实验动物与分组

成年健康雄性SD大鼠90只(河北省实验动物中心+1106019)(模型未成功者已除外),体重300—350g,由河北医科大学动物实验中心提供,分笼饲养

于河北医科大学第二医院神经病学实验室动物房内,以标准饲料喂养并饮用自来水。90只脑出血大鼠随机分为对照组(ICH组):仅为脑出血模型,不作任何处理(18只)、常压氧治疗组(ICH+1.0ATA组)(18只)和高压氧治疗组(54只),高压氧治疗组再按不同的高压氧治疗压力分为ICH+1.8ATA组、ICH+2.0ATA组、ICH+2.2ATA组3个亚组,每组18只。各组分别于相应处理后1d、3d、5d断头取脑,每个时间点各6只。制模成功后24h按不同治疗压力1次/d,常压氧治疗组与高压氧治疗组除治疗压力不同外,其余均在同一实验条件下吸浓度约为90%的氧气,对照组不进行HBO/常压氧治疗。

1.3 大鼠脑出血模型的制备

依据参考文献^[5-6]采用胶原酶VII定位注射诱发大鼠尾壳核脑出血模型。大鼠称重后,10%水合氯醛(0.4ml/100g)腹腔内注射麻醉,保证手术操作期间大鼠有自主呼吸,俯卧固定于立体定位仪上,使前后囟位于同一水平。头顶常规备皮消毒,于颅正中矢状切开约1.5cm,盐水棉球擦拭使前囟清晰暴露。依照立体定位图谱进行定位,于前囟后1mm、矢状线右侧3mm处(尾壳核定位处)以尖头改锥于颅骨上钻一直径约1mm的小孔,深达骨膜。将含有0.6U胶原酶VII/3 μ l生理盐水微量注射器垂直固定于立体定位仪上,使针头与小孔在同一直线上,进针约6mm,然后缓慢匀速推注5min,留针10min,缓慢出针5min,共20min。骨蜡封住颅孔,缝合皮肤切口,再次消毒创处,置于空笼内待大鼠苏醒。

在动物模型制备后,24h后观察大鼠行为学变化,按LongaFZ评分法^[7]评分:0分,无体征;1分,不能完全伸展对侧肢体(左侧);2分,对侧肢体瘫痪,向对侧转圈,有追尾现象;3分,不能站立倒向对侧;4分,意识障碍。2分以上认为造模成功。

1.4 高压氧治疗

按照参考文献^[8],高压氧治疗组大鼠于术后24h评分造模成功后进舱治疗。将动物置入特制木箱(为便于观察动物,上盖为玻璃)中,箱底设供氧管入口,对角箱底设出气口。将木箱置于舱内,压力根据分组而定,加压30min,于压力稳压前5min采用直排式给氧,流量为10L/min(实验前曾测试给氧5min后在出气口测得氧浓度为90%左右)开始供氧,稳压吸氧60min,之后停止供氧,开始匀速加减压(速率约为0.01Mpa/min),减压时间30min,1次/d。实验者通过观察窗可观察舱内动物行为。常压氧治疗组不予加压,余与高压氧治疗组实验条件相同。对照组不进行HBO/常压氧治疗。

1.5 脑组织水含量测定

采用干湿比重法测定出血灶周围脑组织含水量:去除额极后,取病变侧2mm厚脑组织,①将脑组织放入事先称重的锡纸(A)中,然后立即称重,将其重量用(B)表示,B-A即是脑组织湿重;②将脑组织用锡纸包裹,放入烤箱内120℃烘干8h后取出,恢复到室温称重(C),用C-A即是其干重。③将数据代入公式:脑组织含水量=(脑组织湿重-脑组织干重)/湿重×100%,用字母表示为:(B-C)/(B-A)×100%。

1.6 AQP4的测定

各组大鼠于出血后相应时间点采用摘眼球处死动物法断头取脑,经脑表面穿刺点冠状切开标本,取穿刺点后3mm厚脑组织制备石蜡切片,采用免疫组化法观察AQP4的表达,阳性细胞为细胞膜或细胞浆呈棕黄色。采用Image Pro Plus 6.0全自动图像分析系统,测每高倍镜(10×40倍)视野内AQP4的吸光度,每只大鼠选择3张脑组织切片,每张切片选3—5个视野,计算各组的平均光密度值OD。

1.7 统计学分析

实验结果用SPSS13.0统计软件进行分析处理。计量资料所有数据以均数±标准差表示, $P < 0.05$ 即认为有显著性意义,应用ANOVA对多组计量资料间均数进行方差分析。

2 结果

2.1 大鼠脑组织水含量的变化

脑出血后大鼠的脑组织水含量在出血后3d达

到峰值,至出血后5d有所下降。常压氧治疗组较脑出血对照组减少,但于各时间点比较差异均无显著性意义($P > 0.05$)。各高压氧治疗组较常压氧治疗组及脑出血对照组相比含水量减少,于第1天时2.0ATA组与常压氧治疗组及脑出血对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$);于第3、5天时各高压氧治疗组与常压氧治疗组及脑出血对照组比较均有显著性意义($P < 0.05$),但2.0ATA组较1.8ATA组及2.2ATA组减少明显,且比较有显著性意义($P < 0.05$),见表1,图1—2。

表1 不同时间点脑组织水含量的比较 ($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

组别	第1天	第3天	第5天
ICH	81.28 ± 2.21 ^①	85.84 ± 1.72 ^①	83.42 ± 1.54 ^①
ICH+1.0ATA	81.20 ± 2.13 ^②	85.74 ± 1.72 ^②	83.24 ± 1.51 ^②
ICH+1.8ATA	79.72 ± 1.70	83.56 ± 2.32 ^③	81.30 ± 1.86 ^③
ICH+2.0ATA	78.80 ± 1.56 ^④	81.44 ± 1.73 ^④	79.20 ± 1.76 ^④
ICH+2.2ATA	79.64 ± 1.81	83.68 ± 2.43 ^⑤	81.26 ± 1.69 ^⑤

③④⑤与①②比较, $P < 0.05$;④与③⑤比较, $P < 0.05$

表2 不同组别AQP4表达OD值的比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	第1天	第3天	第5天
ICH	0.228 ± 0.024 ^①	0.304 ± 0.018 ^①	0.254 ± 0.011 ^①
ICH+1.0ATA	0.222 ± 0.027 ^②	0.300 ± 0.016 ^②	0.250 ± 0.016 ^②
ICH+1.8ATA	0.184 ± 0.021	0.264 ± 0.017 ^③	0.212 ± 0.013 ^③
ICH+2.0ATA	0.174 ± 0.021 ^④	0.226 ± 0.021 ^④	0.180 ± 0.022 ^④
ICH+2.2ATA	0.186 ± 0.021	0.262 ± 0.024 ^⑤	0.214 ± 0.021 ^⑤

注:每时间点n=6;③④⑤与①②比较, $P < 0.05$;④与③⑤比较, $P < 0.05$

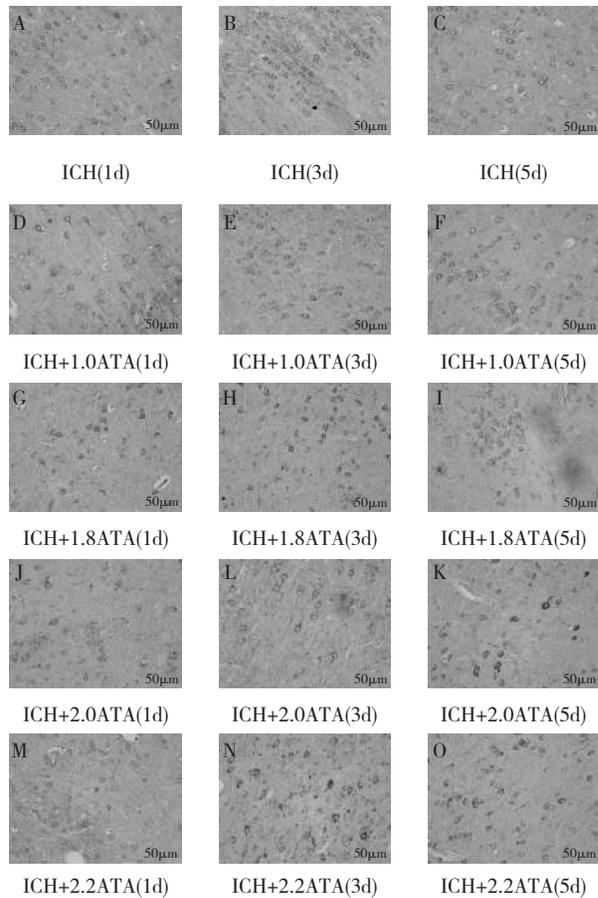
2.2 大鼠脑组织AQP4表达的变化

脑出血后大鼠的脑组织AQP4表达在出血后第3天达到峰值,至出血后第5天有所下降。常压氧治疗组较脑出血对照组表达减少,但于各时间点比较差异均无显著性意义($P > 0.05$)。各高压氧治疗组较常压氧治疗组及脑出血对照组表达减少,于各时间点比较均有显著性意义($P < 0.05$),但于第3、5天时2.0ATA组较1.8ATA组及2.2ATA组减少明显,且比较有显著性意义($P < 0.05$)。见表2。

3 讨论

脑水肿是脑出血后神经元经受第2次打击的中心环节及继发性脑损伤的标志,通过恶化脑组织的血供和神经细胞内环境紊乱等加重神经细胞损伤,其产生和发展是导致ICH病情恶化的关键因素^[9]。有研究表明,ICH早期(24h内)脑水肿为细胞能量代

图1 AQP4表达免疫组化图片



A-C、D-F、G-I、J-L、M-O 分别对应对照组、常压氧治疗组、1.8ATA 高压氧治疗组、2.0ATA 高压氧治疗组、2.2ATA 高压氧治疗组的 1d、3d、5d。

谢障碍导致的细胞毒性脑水肿,而后期(24h后)则是血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)破坏所致的血管源性脑水肿,在 ICH 后病情的发展与转归中发挥着重要作用^[10]。因此脑水肿的防治是临床上脑出血治疗的重点。

AQP 是近 10 年来发现的一组膜通道蛋白,广泛存在于各种生物的细胞膜上,介导水分子的跨膜转运,调节 BBB 对水分子、K⁺的通透和神经细胞外间隙的大小^[11]。脑组织中的 AQP 主要为 AQP4。AQP4 蛋白丰富表达在毛细血管周围及软脑膜所直接接触的胶质细胞上,与脑水肿密切相关^[4]。Venero JL 及 Warth A 等^[12-13]研究发现 AQP4 在脉络丛上皮细胞、脑室周围室管膜细胞、软脑膜的表达同脑脊液的重吸收部位相一致以及其在脑组织细胞膜上的分布同 K⁺通道的极性分布相一致,可推断出 AQP-4 在大脑

中是脑脊液同细胞之间水转运的结构基础,具有维持细胞内外水、钾离子浓度平衡,参与渗透压调节的作用,是影响中枢神经系统水、电解质平衡的关键因素,从而也为进一步研究其与脑水肿的关系提供了理论依据^[14]。

高压氧作为治疗脑血管病的一种有效手段,关于其作用机制有较为广泛而深入的研究。陈晓明和邵春芬等^[15]研究发现高压氧在脑梗死的治疗中可通过清除自由基、解除血管痉挛、促进有效侧支循环的建立等减轻梗死后再灌注损伤以及使部分处于可逆状态的脑细胞恢复功能。廉晓宇和姜海涛等^[16-17]还发现高压氧治疗可通过缓解蛛网膜下腔出血后脑血管的痉挛程度及减轻血脑屏障的损伤而改善受损的脑功能,起到脑保护的作用。脑水肿为脑血管病引起脑损害的重要环节,研究表明^[15]高压氧预处理可能通过下调 AQP-4 的表达减轻脑水肿,从而起到增强对脑出血的耐受和神经保护作用。国内有学位论文报道称高压氧可通过抑制 AQP-4 的表达减轻蛛网膜下腔出血和颅脑损伤后继发的脑水肿,但对脑出血后脑组织中 AQP-4 的表达有无影响目前尚不明确。

HBO 作为脑卒中患者综合治疗方法之一,在缺血性脑卒中的研究中的疗效已得到肯定^[18],但在出血性脑卒中研究方面,以临床研究为多,基础研究方面较为少见。在本实验中观察到:①各组脑组织水含量和 AQP4 表达在出血后 3d 达到峰值,至出血后 5d 有所下降,有较好的一致性。进一步验证了 AQP4 与脑出血后脑水肿的形成密切相关。②常压氧治疗组脑组织水含量及 AQP4 表达较对照组减少,于各时间点比较差异均无显著性意义 ($P>0.05$),说明常压氧治疗虽然可以在一定程度上减轻出血灶周围水肿,但其疗效不如高压氧治疗确切;而高压氧治疗各组较常压氧治疗组及对照组的脑组织水含量及 AQP4 表达均有明显减少,其中于出血后第 3 天和第 5 天最为明显 ($P<0.05$);高压氧治疗可通过增加氧在脑组织内的弥散距离、提高血氧分压、促进侧支循环建立以及减少脑血流量、降低颅内压等途径使水肿组织的氧供及血流灌注得到显著改善,阻断脑出血后脑缺氧-脑水肿-脑缺氧的恶性循环,从而降低出血灶周围脑组织的水含量^[19-20];另外,高压氧治

疗还可通过提高有氧代谢、降低组织酸中毒而改善脑的内环境,使 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶的活性增高,降低血管的通透性,减轻脑水肿。高压氧治疗组AQP4表达的减少使得其改变BBB结构与功能破坏的作用降低,从而减轻BBB破坏所致的血管源性脑水肿。以上说明高压氧治疗可减轻出血灶周围脑水肿,并且其机制与降低出血灶周围AQP4的表达有关。③高压氧干预后1d高压氧治疗各组之间脑组织水含量及AQP4的表达差异无显著性意义($P>0.05$);干预后3d、5d时,2.0ATA组较1.8ATA组及2.2ATA组表达明显减少($P<0.05$);而1.8ATA组与2.2ATA组之间差异无显著性意义($P>0.05$)。以上说明2.0ATA组优于1.8ATA组及2.2ATA组。Ohta等^[21](1984年)测量了健康志愿者在高压氧环境下的脑血流量发现氧压为2.0ATA时,脑血流量随动脉氧分压增高而逐渐减少,当氧压高于2.0ATA时脑血流量又重新呈增加趋势。1.8ATA组压力较低,虽然优于常压氧治疗,但是未达到最好的治疗效果,说明HBO治疗脑出血时,氧分压过低达不到应有的治疗效果。而2.2ATA组治疗压力较高,可能因为抑制脑对糖的摄取,影响糖代谢^[22];脑血流量也可能重新增加而诱发脑出血;增加血浆解离氧的含量,影响脑细胞代谢等原因使其治疗效果下降;临床上可见到,脑水肿清除后的患者在大于2.0ATA压力治疗时,出现头痛加重、手术减压窗处的张力增高,脑组织膨出明显,当压力降至2.0ATA后,上述情况好转。因此,建议脑出血伴脑水肿的患者在HBO治疗时,其压力不应大于2.0ATA^[21]。关于高压氧治疗脑出血起效的时间,一般认为高压氧治疗2—3d能明显见效^[22],与本研究结果一致。但有关高压氧治疗脑出血的最佳时机和疗程还有待于进一步研究。

本实验结果表明高压氧治疗对减轻出血性脑卒中血肿周围脑水肿有明确疗效,其可能机制与降低出血灶周围脑组织AQP4的表达有关,并且提示2.0ATA的治疗压力优于1.8ATA、2.2ATA,为临床高压氧治疗脑出血提供一定的理论证据。

参考文献

- [1] Staykov D, Wagner I, Volbers B, et al. Natural course of perihemorrhagic edema after intracerebral hemorrhage[J]. Stroke, 2011, 42(9): 2625—2629.
- [2] Qin Z, Xi G, Keep RF, et al. Hyperbaric oxygen for experimental intra-cerebral hemorrhage[J]. Acta Neurochir Suppl, 2008, 105: 113—117.
- [3] Jung JS, Bhat RV, Preston GM, et al. Molecular characterization of aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(26): 13052—13056.
- [4] Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, et al. Increased brain edema in AQP4-null mice in an experimental model of subarachnoid hemorrhage[J]. Neuro-science, 2010, 167(1): 60—67.
- [5] 李红玲. 胶原酶诱导的脑出血大鼠模型及其行为学改变[J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(11): 977—979.
- [6] 张磊. 采用Ⅶ型胶原酶构建大鼠脑出血模型[J]. 江汉大学学报(自然科学版), 2009, 37(2): 82—84.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20: 84—91.
- [8] 徐春江. 不同压力高压氧对脑创伤大鼠顶叶皮质神经超微结构的影响[J]. 中国全科医学, 2008, 11(8A): 1358—1360.
- [9] 陆晖, 肖俊锋. 脑出血后继发血管源性脑水肿的机制研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5(5): 427—429.
- [10] Lee KR, Kawai N, Kim S, et al. Mechanisms of edema formation after ICH: Effects of thrombin on cerebral bloodflow, blood-brain permeability and cell survival in a rat model[J]. Neurosurg, 1997, 86(2): 272—278.
- [11] Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, et al. Aquaporins in brain: distribution, physiology and pathophysiology[J]. Cerebral Blood Flow Methab, 2002, 22(4): 367—378.
- [12] Venero JL, Vizuete ML, Machado A, et al. Aquaporins in the central nervous system[J]. Prog Neurobiol, 2001, 63(3): 321—336.
- [13] Warth A, Mittelbronn M, Wolburg H. Redistribution of the water channel protein aquaporin-4 and the K^+ channel protein Kir 4.1 differs in low and high-grade human brain tumors[J]. Acta Neuropathol, 2005, 109(4): 418—426.
- [14] 李红玲, 房金勇, 纪庆红. 高压氧预处理对实验性脑出血大鼠出血灶周围水肿及水通道蛋白-4表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2012, 27(3): 211—215.
- [15] 陈晓明, 张志强. 高压氧治疗缺血性脑血管病机制的研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(8): 766.
- [16] 廉晓宇, 李英夫, 李显伟. 高压氧对蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的影响[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2009, 14(3): 129—131.
- [17] 姜海涛, 朱莽, 谢江涛. 高压氧对蛛网膜下腔出血后血脑屏障通透性的影响及其可能机制的研究[C]. 中华医学会神经外科学学术会议论文汇编, 2011.
- [18] 吕云利, 刘吉耀, 姚向荣. 高压氧治疗急性脑梗死临床疗效分析[J]. 中国误诊学杂志, 2011, 11(15): 3627—3628.
- [19] 孙乃中, 吴杨, 程晋成, 等. 高压氧对脑出血患者微循环动力学的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27(6): 352.
- [20] Niklas A, Brock D, Schober R, et al. Continuous measurements of cerebral tissue oxygen pressure during hyperbaric oxygenation (HBO) effects on brain edema and necrosis after severe brain trauma in rabbits[J]. Neurol Sci, 2004, 219(1-2): 77—82.
- [21] 吴嗣洪, 刘玉龙. 医用高压氧规范管理与实践[J]. 科学出版社, 2010, 3: 232.
- [22] 李红玲, 刘艳萍, 张会萍. 脑出血的高压氧治疗[J]. 中国康复医学杂志, 2010, 25(9): 909—912.