

· 论 著 ·

高压氧治疗对脊髓损伤后大鼠神经细胞凋亡及行为学评分的影响

王晓红¹, 邵彬¹, 王琴¹, 李宁^{2△}

(1. 广州军区武汉总医院康复理疗科, 武汉 430070; 2. 第三军医大学新桥医院高压氧治疗中心, 重庆 400037)

摘要:目的 观察高压氧治疗对脊髓损伤后 SD 大鼠的神经细胞凋亡及行为学评分的影响。方法 雄性 SD 大鼠 48 只, 随机分为高压氧治疗组、对照组及伪手术组, 每组各 16 只大鼠 ($n=16$), 每组又分为 4 个时间点, 分别为脊髓损伤后 6、12、24 h 和 72 h, 其中每个时间点高压氧治疗组大鼠 4 只, 对照组 4 只和伪手术鼠 4 只。高压氧组和对照组采用脊髓横切法造成脊髓损伤模型, 高压氧治疗组大鼠在每个时间点给予高压氧治疗后即处死, 对照组和伪手术组在伤后相应时间点处死。用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法标记凋亡细胞, 用改良的 TARLOV 评分评估大鼠后肢运动功能。观察比较各时间点的凋亡指数和改良的 TARLOV 评分的差异。结果 伪手术组未见凋亡阳性细胞; 凋亡细胞在伤后 6 h 即出现在脊髓组织中, 24 h 与 72 h 凋亡细胞数显著增加; 与对照组相比, 高压氧治疗组的 TUNEL 阳性细胞显著减少 ($P<0.05$); 同时, 高压氧组大鼠改良的 TARLOV 评分显著高于对照组 ($P<0.05$)。结论 高压氧治疗能够显著减少脊髓损伤后大鼠神经细胞凋亡并改善大鼠后肢运动功能, 对脊髓损伤后的神经细胞具有很好的保护作用。

关键词: 高压氧; 脊髓损伤; 凋亡; 改良的 TARLOV 评分

中图分类号: R459.6; R365.744

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)08-0935-02

Effects of hyperbaric oxygen on apoptosis of nerve cells and motor function after spinal cord injury

WANG Xiao-hong¹, SHAO Bin¹, WANG Qin¹, et al.

(1. Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China; 2. Center of HBO, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate effects on hyperbaric oxygen (HBO) on apoptosis of nerve cells and motor function after spinal cord injury. **Methods** 48 SD male rats were randomly divided into three groups: hyperbaric oxygen group ($n=16$), control ($n=16$) and sham-operate group ($n=16$). Rats sacrificed at 6 hours, 12 hours, 24 hours and 72 hours post injury, among which rats in HBO group were received HBO therapy before killing at each time point. Apoptosis index and improved Tarlov's score were calculated at each time point. **Results** No apoptotic cell appeared in sham group. The apoptosis cell could be observed at 6 hours post-injury, and elevated from 24 to 72 hours. Compared to HBO group, the TUNEL-positive cells were significantly higher in the control group ($P<0.05$). Improved Tarlov's score was lower in control group than that of HBO group ($P<0.05$). **Conclusion** HBO therapy can reduce and protect nerve cell from apoptosis after spinal cord injury in rats and improve their motor function.

Key words: hyperbaric oxygen; spinal cord injury; apoptosis; improved Tarlov's score

高压氧用于治疗脊髓损伤具有显著的临床效果, 其作用机制尚在讨论中。有研究表明, 高压氧可以改善脊髓损伤患者的临床结局^[1-4]。本文的目的在于进一步明确高压氧治疗对脊髓损伤后大鼠神经细胞凋亡的影响及行为学评分的改善。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 雄性 SD 大鼠 48 只, 体质量 150~190 g, 普通级, 购自广州军区武汉总医院医学实验中心。大鼠随机分为高压氧组 16 只, 对照组 16 只, 伪手术 (sham-operate) 组 16 只; 每组又分为 4 个时间点, 分别为脊髓损伤后 6、12、24 h 和 72 h, 其中每个时间点高压氧治疗大鼠 4 只、对照鼠 4 只和伪手术鼠 4 只。饲养温度为 20~23 °C, 湿度为 50%~60%, 大鼠可以在笼中自由饮食水。

1.2 动物模型的建立 采用脊髓横切法, 称取大鼠体质量后, 水合氯醛溶液按 4 mL/kg 给予腹腔内注射麻醉, 然后用电子剃毛器剃去大鼠背部毛发, 按 T₁₂ 为中心显露直径约为 0.5 cm 的圆形无菌区, 作为脊髓损伤区。将大鼠固定在鼠台上, 以 T₁₂ 棘突为中心背部正中纵行切口, 长约 3 cm, 显露脊柱后, 在 T_{11~12} 之间用血管钳小心咬除棘突和双侧椎板, 露出白色的脊髓后, 用眼科剪或手术刀切断脊髓, 然后依层次缝合。照模成功的标志是大鼠的双下肢出现回缩性扑动、尾巴呈痉挛性摆

动。伪手术组大鼠只给予椎板切除, 不横切脊髓。所有大鼠术后给予青霉素抗感染治疗。

1.3 高压氧处理 所有大鼠于手术后 1 h 进舱, 先用纯氧充分洗舱, 使舱内氧浓度大于 95%, 再以 0.012 5 Mpa/min 的速率加压至 0.2 Mpa。在高压下停留 60 min, 其间用纯氧通风 10 min。停留毕, 匀速减压至常压。对照组及伪手术组大鼠亦置于高压氧舱内, 模拟除压力、氧浓度以外的其他过程和环境条件。术后 6 h, 分别处死该时间点实验大鼠并取材; 剩下大鼠按各时间点, 即 12、24 h 及 72 h 均接受上述处理后依次处死并取材。

1.4 取材 大鼠处死前给予 10% 水合氯醛溶液麻醉后开胸暴露心脏, 心脏灌注冰生理盐水至流出液为清亮后给予 4% 的多聚甲醛溶液继续灌注, 灌注完成后取出受损脊髓节段头端 3 mm, 尾端 3 mm 的脊髓组织, 放入同灌注液中, 置入 4 °C 冰箱过夜。乙醇脱水石蜡包埋并切片, 切片为头端 5 μm、尾端 5 μm 各一张。

1.5 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法 (Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUDP-biotin nick end-labeling, TUNEL) 标记凋亡细胞 TUNEL 试剂盒由德国 Roche 公司提供, 实验步骤按试剂盒说明书进行; 用光学

△ 通讯作者, 电话: 023-68755640; E-mail: lining@tmmu.edu.cn.

表 1 两组在各个时间点下调亡指数比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	6 h	12 h	24 h	72 h
对照组	16	19.40±1.34	25.73±2.57	48.83±2.69	52.47±4.73
高压氧组	16	18.87±2.63	23.42±0.18*	29.37±4.11**	41.09±3.07**

与对照组比较,* : P<0.05; ** : P<0.01。

显微镜观察凋亡细胞(共计 200~500 个细胞)并拍照。高倍视野下(×400)计算凋亡指数,凋亡指数是指每张 TUNEL 阳性切片选取 5 个阳性细胞数(细胞核中有棕黄色颗粒者)最多的,根据公式:凋亡指数=凋亡细胞核数/总细胞核数。

1.6 改良的 TARLOV 评分(空地行走评分) 各组大鼠处死前均进行改良的 TARLOV 评分,比较各组间分值差异。

1.7 统计学方法 应用统计软件 SPSS13.0 进行统计分析, P<0.05 表示差异有统计学意义;先对数据进行正态性检验(one-sample kolmogorov-smirnov test),均满足正态性检验,计量数据描述采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,先进行两因素方差分析,再进行两个独立样本 t 检验和单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用 Tukey 法。

2 结 果

伪手术组大鼠各时间点脊髓组织中未见凋亡细胞,改良的 TARLOV 评分 5 分。TUNEL 阳性细胞在脊髓损伤后 6 h 即出现在高压氧组和对照组的脊髓组织中,24 h 与 72 h 凋亡细胞数显著增加;与对照组相比,高压氧治疗组的 TUNEL 阳性细胞在 12,24 h 及 72 h 显著减少,差异具有统计学意义(P<0.05),见图 1、表 1。

脊髓损伤后 6 h,高压氧组和对照组改良的 TARLOV 评分均为 0 分;伤后 12 h,高压氧组分值显著高于对照组,差异具有统计学意义(P<0.05);伤后 24 h 及 72 h,高压氧组改良的 TARLOV 评分分值明显高于对照组(P<0.01),见表 2。

表 2 两组在各个时间点下改良的 TARLOV 评分比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	6 h	12 h	24 h	72 h
对照组	16	0	0.37±0.02	0.98±0.76	2.04±0.90
高压氧组	16	0	1.09±0.15#	1.83±0.47##	2.87±0.31##

与对照组比较,# : P<0.05;## : P<0.01。

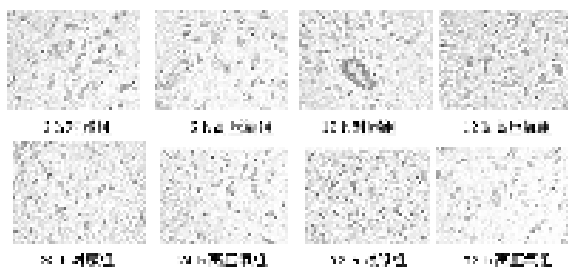


图 1 TUNEL 阳性细胞表达(原位末端标记法,×400)

3 讨 论

脊髓损伤造成损伤平面以下的功能障碍及丧失。脊髓损伤后中枢神经细胞发生一系列细胞和分子事件,包括炎症反应、坏死和凋亡。除了损伤部位的原发性损伤外,近来越来越多的研究表明,继发性损伤在急性脊髓损伤后扮演了重要角色,而凋亡是引起脊髓继发性损伤的主要机制。凋亡是细胞主动的程序性死亡,其特征是核染色质浓缩,细胞核萎缩和(或)

DNA 裂解。脊髓损伤后,细胞凋亡发生的部位主要在白质,引起了轴突 Wallerian 退变,其中主要的凋亡细胞是神经元细胞和少突胶质细胞,凋亡导致大范围少突胶质细胞的丢失甚至可以发生在离原发性损伤部位较远的节段^[5-7]。目前,对于脊髓损伤的研究热点之一在于如何预防和逆转脊髓损伤后继发性损伤,尽可能保留受损脊髓残存的结构和功能。越来越多的研究证明,神经细胞的凋亡在脊髓损伤后的继发性损伤机制中扮演了重要的角色。

高压氧作为一种有效的治疗手段用于中枢神经系统损伤的治疗,取得了肯定的临床疗效,包括脑卒中、创伤性颅脑损伤以及脊髓损伤的患者,但是其作用机制尚处于研究阶段。国内有学者报道,高压氧可以降低大鼠缺血缺氧性脑损伤后神经细胞的凋亡及其关键酶 Caspase-3 的表达;也有学者报道了高压氧除了能够减少脊髓损伤后神经细胞的凋亡,还可以显著升高脊髓组织中兴奋性氨基酸 EAA(Glut)的水平以及神经生长相关蛋白 GAP-43 的表达。

通过研究高压氧对于脊髓损伤后大鼠神经细胞凋亡的影响,高压氧能够显著减少神经细胞的凋亡,对脊髓损伤后的脊髓组织具有保护作用,而且高压氧治疗具有剂量累加效应,随着治疗次数的增加,高压氧组的凋亡细胞比对照组显著减少(P<0.001)。同时,本文使用改良的 TARLOV 评分对脊髓损伤后大鼠的后肢功能进行评价,发现高压氧治疗可以显著改善脊髓损伤后大鼠后肢的运动功能。

参考文献:

- [1] 俞友皆,黄莘莘.早期高压氧治疗对不完全性颈髓损伤患者神经功能恢复的影响[J].实用医学杂志,2008,24(9):1559.
- [2] 郭根平,张谦,杨玲玲.早期高压氧治疗对脊髓损伤患者功能恢复的影响[J].中国康复理论与实践,2005,11(9):758.
- [3] 臧谋圣,方健,吴健,等.高压氧早期治疗颈脊髓不完全损伤疗效观察[J].颈腰痛杂志,2005,26(6):451.
- [4] 印卫锋,郭风劲,陈安民.高压氧治疗胸腰椎骨折合并脊髓损伤[J].中国康复,2004,19(5):292.
- [5] Fehlings MG, Casha S, Yu WR. FAS deficiency reduces apoptosis, spares axons and improves function after spinal cord injury[J]. Exp Neurol,2005,196:390.
- [6] Demjen D, Klussmann S, Kleber S, et al. Neutralization of CD95 ligand promotes regeneration and functional recovery after spinal cord injury[J]. Nat Med,2004,10:389.
- [7] Takagi T, Takayasu M, Mizuno M, et al. Caspase activation in neuronal and glial apoptosis following spinal cord injury in mice[J]. Neurol Med Chir,2003,43:20.

(收稿日期:2009-08-25 修回日期:2009-10-25)