

· 基础研究 ·

亚硒酸钠联合高压氧对创伤性颅脑损伤大鼠模型治疗作用的机制研究

邓崇第¹, 马懿¹, 李建国¹, 凌丽¹, 刘洋¹, 吕忠容²

(遵义医学院附属医院:1. 急诊科;2. 手术室, 贵州遵义 563003)

摘要:目的 探讨亚硒酸钠联合高压氧对颅脑损伤大鼠模型治疗作用的机制。方法 30 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组(脑损伤组)、联合组(亚硒酸钠联合高压氧处理组)。然后建立大鼠闭合性颅脑损伤模型,以 NSS 评分将损伤程度统一为中度颅脑损伤程度。有高压氧的组别伤后 0.5、24.0、48.0 h 做高压氧治疗,各组均以 72 h 统一留取标本,组织匀浆检测 MDA、SOD 以及 GSH 的含量;提取组织总 RNA,real-time PCR 检测 bcl-2 以及 caspase-3 mRNA 的表达;免疫组化检测皮质区和海马区的 caspase-3 表达及分布。结果 (1)与正常组相比,模型组 MDA 含量大量增加($P<0.05$),SOD 及 GSH 的含量均显著降低($P<0.05$);与模型组相比联合组的大鼠 MDA 含量均显著下降,SOD 和 GSH 含量均显著升高($P<0.05$)。(2)与正常组相比,模型组 bcl-2 的 mRNA 表达明显降低($P<0.05$),而 caspase-3 的 mRNA 则显著增加($P<0.05$);与模型组相比,联合组的大鼠均提高了 bcl-2 的 mRNA 表达($P<0.05$),降低了 caspase-3 的 mRNA 的表达($P<0.05$)。免疫组化结果也显示在皮质区和海马区联合组的大鼠显著减少了 caspase-3 的阳性表达。结论 亚硒酸钠联合高压氧治疗创伤性颅脑损伤(TBI)是通过降低氧自由基的生成,增加自由基清除剂的产生和凋亡抑制因子 bcl-2 的表达以及抑制细胞凋亡蛋白 caspase-3 的表达而实现的。

关键词: 颅脑损伤;高压氧;硒;活性氧;凋亡基因

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.11.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)11-1254-03

The mechanism of sodium selenite and hyperbaric oxygen on the therapeutic effect of traumatic brain injury rats modelDeng Chongdi¹, Ma Yi¹, Li Jianguo¹, Ling Li¹, Liu Yang¹, Lv Zhongrong²

(1. Department of Emergency; 2. Operation Room, Affiliated Hospital of Zunyi

Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

Abstract: Objective To study the mechanisms of sodium selenite in combination with hyperbaric oxygen treatment of traumatic brain injury in rats. **Methods** 30 male SD rats were randomly divided into normal control group, model group (brain injury group), sodium selenite combined with hyperbaric oxygen treatment group. Then the establishment of rat model of closed head injury, injury severity score in NSS will be unified as a moderate degree of traumatic brain injury. Hyperbaric oxygen group rats received hyperbaric oxygen therapy in 0.5, 24.0, 48.0 hours after injury. All the rats were sacrificed after 72 hours, then detected the content of MDA, SOD and GSH in tissue homogenate; extracted of total RNA, real-time PCR analysed the expression of the bcl-2 and caspase-3 mRNA expression; immunohistochemical methods to detect the Caspase-3 expression and distribution in cortex and hippocampus. **Results** (1) Compared to the normal control group, content of MDA in model group increased significantly ($P<0.05$), SOD and GSH contents were significantly decreased ($P<0.05$), compared to the model group, MDA contents were significantly decreased, SOD and GSH contents were significantly elevated in the combined group ($P<0.05$). (2) compared to the normal group, model group, bcl-2 mRNA expression were significantly decreased and caspase-3 mRNA expression were significantly increased ($P<0.05$), compared to the model group, the rats in combined group were improved in bcl-2 mRNA expression, reduction of caspase-3 mRNA expression. Immunohistochemical results also showed that in the cortex and hippocampus, the positive expression of caspase-3 were significantly reduced ($P<0.05$), in combined group rats. **Conclusion** Sodium selenite combined with hyperbaric oxygen treat of TBI in rats are through the generation of oxygen free radical scavengers of free radicals, increase production and apoptosis inhibitory factor bcl-2 expression and inhibition of apoptosis protein caspase-3 expression pathways.

Key words: craniocerebral trauma; hyperbaric oxygenation; selenium; reactive oxygen species; apoptosis gene

创伤性颅脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 并发症、合并症多, 伤残率、病死率高的突出特征^[1], 其原发性的损伤、通常导致不可逆转的大脑组织损害, 继发性损伤可导致脑缺血、功能衰竭, 炎症, 氧化应激, 神经元死亡^[2]。因此, 预防和治疗继发性脑损伤脑外伤是 TBI 治疗的一个主要方面^[3]。作者前期的研究表明, 高压氧联合硒制剂亚硒酸钠治疗大鼠 TBI 疗效显著, 可以显著降低 TBI 大鼠的脑含水量, 减少神经细胞凋亡, 改善 TBI 大鼠的病理情况, 且效果优于单用其中的任何一种^[1]。但是对其具体的作用机制还不清楚, 但是有研究表明, 硒元素和高压氧可以抑制氧化应激反应, 而作者前期的结

果也表明亚硒酸钠联合高压氧可以显著抑制细胞凋亡, 作者认为亚硒酸钠联合高压氧可能是通过硒元素与高压氧的共同作用抑制 TBI 后的氧化应激反应以及抑制凋亡基因的表达而产生保护作用的, 本次实验即对此假说进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 亚硒酸钠购于合肥博美生物科技有限公司; caspase-3 免疫组化试剂盒购于北京北方伟业生物公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG, 以及 caspase-3 一抗均购于 Santa Cruz 公司; TRIZOL 购于 Sigma-Aldrich 公司。EDTA 抗原修复液购于福州迈新生物技术有限公司; BCA 蛋

白质定量试剂盒、二抗工作液、DAB 显色液、RIPA 裂解液以及 DEPC 水均购自碧云天生物技术研究; primer mix 购于日本 TOYOBO 公司; MDA 检测试剂盒、SOD 检测试剂盒、GSH 检测试剂盒等均购于南京建成生物工程研究所, GAPDH、bcl-2 和 caspase-3 基因的引物均由上海鼎国生物合成。其他化学试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验动物 健康成年雄性 SD 大鼠 30 只, 体质量 280~320 g, 由第三军医大学大坪医院动物中心提供, SPF 级。生产许可证号: SCXK(渝)2007-0005。喂养标准饲料喂养和饮用纯净水, 使用动物专用洁净垫料, 恒温 20~25 ℃。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型的建立及处理 将 SD 大鼠随机分为 3 组, 分别为正常组、模型组(脑损伤组)和联合组(用亚硒酸钠联合高压氧干预组), 每组 10 只。模型组仅建立颅脑创伤模型, 采用改良 Feeney 法制作颅脑创伤模型^[4], 将实验大鼠提前 3 d 单独喂养, 术前禁食 12 h, 不禁水, 称体质量。选取俯卧位将实验大鼠固定于打击平面上。按照文献报道的不开颅骨致中度脑损伤的方法, 用前端直径 1.5 cm、末端直径 3.0 cm 的 100 g 祛码于 1 m 高处坠落, 以前端为打击面准确将落击点定位于大鼠头部双耳前缘与眼后缘的正中连线上, 造成中度的闭合性颅脑损伤。撞击后, 大鼠出现短暂的四肢抽搐、呼吸暂停数秒, 或者鼻腔出血、小便失禁等各种症状表现。打击致伤后 0.5、1.0 h 分别进行神经功能缺损评分(NSS), 筛选处于中度损伤评分范围的大鼠。正常组不做任何处理。创伤模型制成后将大鼠放回笼中, 给予正常饮食。用亚硒酸钠联合高压氧干预组大鼠在造模前 1 个月将亚硒酸钠按 0.8 mmol/L 的浓度添加入饮用水中进行喂食, 另外, 在建模后 1、24、48 h 的时候进行高压氧治疗: 入舱后 5 min 加压至 0.02 MPa(1.2ATA), 同时纯氧洗舱, 之后加压 5 min 至 0.1 MPa(2ATA)。稳压吸氧 40 min, 减压 10 min, 舱内氧浓度保持在 95% 以上, 直至建立模型后 72 h。

1.3.2 动物组织的处理 各组大鼠在使用各自的实验方案治疗 72 h 后, 各鼠断头处死, 取出脑, 一部分按 100 mg 组织 0.5 mL 液体的比例使用 RIPA 裂解液匀浆, 用于检测 MDA、SOD 及 GSH 含量; 一部分按 100 mg 组织 0.5 mL 液体的比例用 Trizol 匀浆, 提取总 RNA; 另取皮质及海马 CA1 区组织进行免疫组化实验。

1.3.3 指标检测 使用 RIPA 裂解液匀浆后, 使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量, 再按照 MDA、SOD 以及 GSH 的说明书进行含量的测定。使用 Trizol 匀浆组织提取总 RNA、经异丙醇沉淀及乙醇洗脱后, 在微量分光光度计定量, A₂₆₀/A₂₈₀ 在 2 左右可以作为实验样品使用。使用 DEPC 水溶解, 到 BIO-RAD PCR 仪进行逆转录反应, 收集逆转录得到 cDNA, 在罗氏的 real-time PCR 仪进行实时荧光定量 PCR 反应。各种基因的引物分别为: GAPDH, sense: ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC, antisense: TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA; bcl-2, sense: CTG GTG GAC AAC ATC GCT CTG, antisense: GGT CTG CTG ACC TCA CTT GTG; caspase-3, sense: GCA CTG GAA TGT CAG CTC GCA A, antisense: GCC ACC TTC CGG TTA ACA CGA G。各种基因的相对表达量为 bcl-2 以及 caspase-3 分别与 GAPDH 表达量相比得出的相对值。

免疫组化检测 caspase-3 蛋白水平的表达: 切片常规脱蜡至水, 0.01 mmol/L PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 3% 甲醇-过氧化氢溶液室温下孵育 20 min, 蒸馏水清洗 3 次, 每次 5 min, 0.1

mmol/L 枸橼酸缓冲液微波炉内热修复, 98 ℃ 维持 30 min, 冷却至室温, 10% 山羊血清, 37 ℃ 温箱湿盒内孵育 30 min, 滤纸吸去多余血清, 加一抗(兔抗 1:100)湿盒过夜, 0.01 mmol/L PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 滴加生物素化二抗(山羊抗兔)工作液, 37 ℃ 温箱湿盒内孵育 30 min, 0.01 mmol/L PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液, 37 ℃ 温箱湿盒内孵育 30 min, 0.01M PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, DAB 显色 2~5 min, 自来水充分冲洗, 终止显色, 梯度乙醇脱水: 70%、80%、90% 乙醇各 5 min, 95% 乙醇 10 min, 100% 乙醇 I、II 各 15 min, 二甲苯 I、II、III 各 15 min 透明, 中性树胶封片固定。阴性对照: 用 0.01 mmol/L PBS 替代一抗, 其余步骤同上结果判定: 以 caspase-3 蛋白的阳性表达定位于神经细胞的胞核及细胞质, 呈棕黄色。采用 Olympus 倒置光学显微镜对 caspase-3 蛋白的阳性表达细胞进行观察。

2 结果

2.1 MDA、SOD 以及 GSH 含量 模型组的 MDA 含量与正常组相比显著升高(P<0.05), 而 SOD 和 GSH 的含量则显著降低(P<0.05), 在联合应用高压氧和亚硒酸钠治疗以后 MDA 含量显著降低(P<0.05), SOD 和 GSH 的含量则显著升高(P<0.05), 见表 1。

表 1 高压氧联合亚硒酸钠对 TBI 大鼠 MDA、SOD、GSH 含量的影响(̄x±s, n=10)

组别	含量(/mg 组织蛋白)		
	MDA(nmol)	SOD(U)	GSH(μg)
正常组	1.12±0.12	0.82±0.10	3.20±0.87
模型组	2.09±0.34*	0.29±0.09*	1.51±1.02*
联合组	1.28±0.22#	0.61±0.12#	2.89±1.13#

*: P<0.05, 与正常组比较; #: P<0.05, 与模型组比较。

2.2 bcl-2 和 caspase-3 mRNA 的表达 bcl-2 的在模型组的表达与正常组相比显著减少(P<0.05), 联合组大鼠的表达与模型组相比则显著增加(P<0.05); 于正常组相比, 模型组大鼠 caspase-3 mRNA 的表达显著增加(P<0.05), 而与模型组相比联合组则显著降低了 caspase-3 mRNA 的表达(P<0.05), 见图 1。

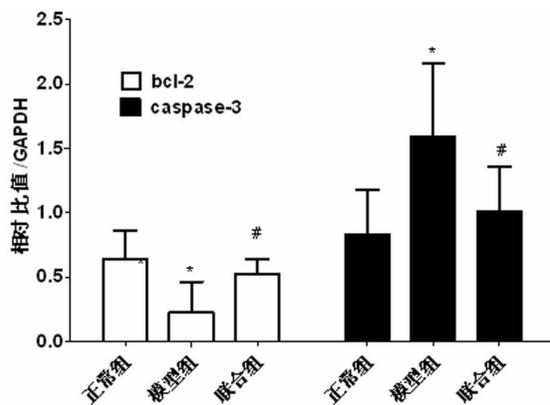
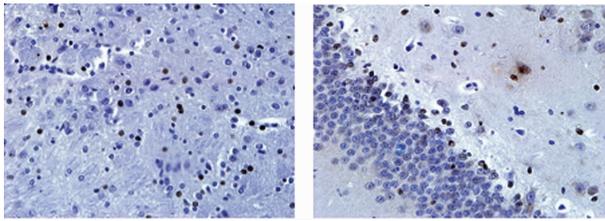


图 1 各组大鼠脑组织 bcl-2 和 caspase-3 mRNA 的表达

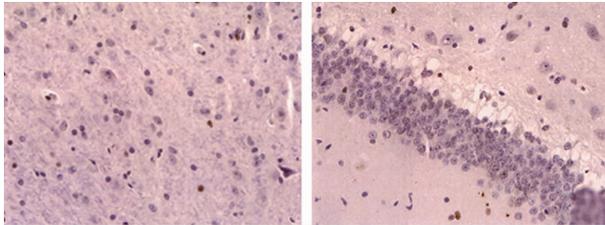
2.3 caspase-3 蛋白的表达结果 caspase-3 蛋白的阳性表达定位于神经细胞的胞核及细胞质, 呈棕黄色。正常组仅见到极少数的 caspase-3 阳性细胞。而在模型组, 无论是在大脑皮质区域, 还是在海马组织都出现了大量 caspase-3 阳性细胞。联合治疗组在上述两个观察区域的阳性细胞数表达则明显减少

(图 2~4)。



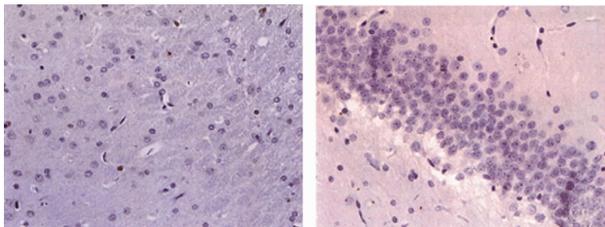
左图(皮质区):较多 caspase-3 阳性细胞,分布广泛散在;右图(海马 CA1):caspase-3 阳性细胞,在近皮质区一侧分布较多。

图 2 模型组免疫组化结果(×400)



左图(皮质区):caspase-3 阳性细胞稀疏可见,较模型组明显减少;右图(海马 CA1):caspase-3 阳性细胞少见,较模型组明显减少。

图 3 联合组免疫组化结果(×400)



左图(皮质区):caspase-3 阳性偶尔可见;右图(海马 CA1):未见明显 caspase-3 阳性细胞。

图 4 正常组免疫组化结果(×400)

3 讨论

氧化应激是许多疾病如糖尿病、TBI 后常见的反应^[5],作者研究表明,在 TBI 大鼠脑内 SOD、GSH 的含量显著降低,MDA 含量显著升高,而联合治疗组则可以增加 SOD、GSH 的含量,降低 MDA 含量,表明其作用机制之一就是清除氧自由基,增加自由基清除剂的产生。

细胞凋亡是指细胞程序性的死亡^[6],在脑损伤后在引起细胞坏死的基础上,也同时伴有细胞凋亡因子的大量表达,而过度的凋亡必然损伤受伤个体神经网络的活动^[7]。bcl-2 基因是在研究淋巴瘤时发现的,它作为一种生存基因,对细胞凋亡具有重要的调节作用^[8]。有研究发现,bcl-2 基因在 TBI 的症状早期就能够观察到,而且随着 TBI 的发生,细胞凋亡性死亡逐渐增多,其表达会进一步下降。过量表达 Bcl-2 蛋白的转基因小鼠产生 TBI 以后,其大脑皮层损伤程度以及其他部分神经功能的损伤都明显减弱^[9]。caspase-3 在细胞凋亡中起着不可替代的作用,是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,可切断 DNA 修复蛋白和细胞骨架蛋白等,从而使 DNA 断裂,引起细胞凋亡^[10]。TBI 后 caspase-3 等细胞凋亡表达增强,活性水平也相应地增加。作者的实验结果也显示 TBI 后 bcl-2 mRNA 表达显著降低,caspase-3 的 mRNA 表达和受体的组织分布显著增加,诱导了细胞的凋亡,而联合应用高压氧和亚硒酸钠则可以显著升高 bcl-2 的表达,降低 caspase-3 的表达,减少了脑细胞的凋亡,从而减少了脑损伤。

硒元素是一种具有抗氧化作用的非金属元素,在作者前期的研究中已经证实 TBI 前单独使用亚硒酸钠也会产生对 TBI 大鼠的保护作用,但是和高压氧一样,二者的单独应用效果均低于亚硒酸钠联合高压氧。TBI 属于一种急性的损伤,本次研究中的前期给予亚硒酸钠的方法在临床上是不可行的。由于作者的研究是首次探讨硒元素在 TBI 中的保护作用,所以作者需要的是体内的硒元素达到一定的治疗浓度,而亚硒酸钠单次少量口服不会使血液的硒浓度大量升高,而大量口服亚硒酸钠会产生一定的毒副作用,因此作者通过在饮食中加入低剂量的亚硒酸钠,以使血液硒的水平达到合适的浓度,作者希望出现合适的硒制剂联合高压氧来治疗 TBI。

综上所述,在已经证实高压氧和亚硒酸钠联合应用治疗 TBI 疗效显著以后,本次研究的结果进一步表明,高压氧和亚硒酸钠联合应用治疗 TBI 的作用机制主要有两个方面,一方面是降低氧自由基的生成,增加自由基清除剂 SOD 和 GSH 的水平达到减少神经损伤的效应;另一方面,其抑制细胞凋亡的机制是因为其可以显著升高凋亡抑制基因 bcl-2 的表达,并降低凋亡基因 caspase-3 的表达,从而抑制神经细胞的凋亡。

参考文献:

- [1] 马懿. 亚硒酸钠联合高压氧对颅脑损伤模型鼠细胞凋亡与病理形态的影响[D]. 贵州遵义,遵义医学院,2010.
- [2] Colantonio A, Mcvittie D, Lewko J, et al. Traumatic brain injuries in the construction industry[J]. *Brain Inj*, 2009, 23(11):873-878.
- [3] Lamy M, Baumgartner D, Willinger R, et al. Study of mild traumatic brain injuries using experiments and finite element modeling[J]. *Ann Adv Automot Med*, 2011, 55:125-135.
- [4] Takhounts EG, Ridella SA, Hasija V, et al. Investigation of traumatic brain injuries using the next generation of simulated injury monitor (SIMon) finite element head model[J]. *Stapp Car Crash J*, 2008, 52:1-31.
- [5] 张红, 胡长军, 陆卫平. 吡格列酮对糖尿病大鼠氧化应激和肾组织基质积聚的影响[J]. *重庆医学*, 2012, 41(4):349-351.
- [6] 聂晶, 杜亮, 陆远富, 等. 天麻素对脑缺血再灌注损伤大鼠神经细胞凋亡的抑制作用[J]. *重庆医学*, 2012, 41(18):1841-1842.
- [7] Ludwig A, Tenhaken R. Defence gene expression in soybean is linked to the status of the cell death program[J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 44(2):209-218.
- [8] 吴至凤, 温恩懿, 赵聪敏, 等. 针刺对发育期脑损伤大鼠脑组织细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J]. *重庆医学*, 2010, 39(21):2898-2903.
- [9] Emir M, Ozisik K, Cagli K, et al. Effect of erythropoietin on bcl-2 gene expression in rat cardiac myocytes after traumatic brain injury[J]. *Transplant Proc*, 2004, 36(10):2935-2938.
- [10] Abrahamson EE, Ikonovic MD, Ciallella JR, et al. Caspase inhibition therapy abolishes brain trauma-induced increases in Abeta peptide: implications for clinical outcome[J]. *Exp Neurol*, 2006, 197(2):437-450.