

· 论 著 ·

高压氧预处理对老龄大鼠全脑缺血再灌注损伤后神经可塑性的影响*

邹磊, 刘丹彦, 殷薇, 宋云

(重庆医科大学附属第一医院麻醉科 400016)

摘要:目的 研究高压氧预处理对老龄大鼠全脑缺血再灌注损伤时轴突生长抑制因子(Nogo) mRNA、Nogo-A 蛋白表达的影响,探讨其影响神经可塑性的机制。方法 将 42 只雄性 SD 大鼠分为 4 组:对照组(C 组, $n=6$)、高压氧组(H 组, $n=12$)、脑缺血再灌注损伤组(I/R 组, $n=12$)、高压氧预处理+脑缺血再灌注损伤组(HOP 组, $n=12$)。H 组和 HOP 组每天置于高压氧舱内 1 h,氧压为 0.2 MPa,连续 5 d,最后 1 次高压氧处理后 24 h 时 I/R 组和 HOP 组采用改良 Pulsinelli 四血管闭塞法制备大鼠全脑缺血再灌注损伤模型,全脑缺血 10 min,再灌注 24 h 时 H 组、I/R 组和 HOP 组随机取 6 只大鼠断头取脑,分离大脑皮质,采用实时荧光定量 PCR 法检测 Nogo mRNA 的表达水平,免疫印迹法检测 Nogo-A 蛋白的表达水平。各组大鼠分别行横断位及冠状位 T1WI、T2WI 扫描。结果 C 组、H 组大脑未见明显缺血梗死灶,缺血组双侧皮质区可见明显弧形缺血梗死区,HOP 组双侧皮质区可见弧形缺血梗死区,面积较 I/R 组小。与 C 组比较,Nogo mRNA 及 Nogo-A 蛋白表达上调($P<0.05$);与 I/R 组比较,Nogo mRNA 及 Nogo-A 蛋白表达下调($P<0.05$)。结论 高压氧预处理通过抑制大脑皮质 Nogo mRNA 及 Nogo-A 蛋白表达上调,提高神经可塑性,能减少老龄大鼠急性全脑缺血后超急性期大脑皮质缺血梗死面积。

关键词: 高压氧;缺血预处理;老龄;轴突生长抑制因子;轴突生长抑制因子受体 A

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.17.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)17-2113-03

Effect of hyperbaric oxygen preconditioning on expression of neuroplasticity after acute global cerebral ischemia-reperfusion in aged rats*

Zou Lei, Liu Danyan, Yin Wei, Song Yun

(Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of hyperbaric oxygen preconditioning (HOP) on expression of Nogo mRNA, Nogo-A and Ng R protein in the cerebral cortex after acute global cerebral ischemia-reperfusion (I/R) in aged rats and to study its mechanism affecting neuroplasticity. Methods Forty-two aged male SD rats were randomly divided into 4 groups: control group (C group, $n=6$), hyperbaric oxygen group (H group, $n=12$), cerebral I/R injury group (I/R group, $n=12$) and HOP group ($n=12$). The H group and the HOP group were placed in the hyperbaric oxygen cabin for 1 h per day with a oxygen pressure of 0.2 Mpa for successive 5 d, at 24 h after last time of hyperbaric oxygen preconditioning the I/R group and the HOP group adopted the modified Pulsinelli vessel occlusion method for preparing the rat I/R injury model, with global cerebral ischemia for 10 min and reperfusion for 24 h, each 6 rats were randomly taken from the the H group, I/R group and HOP group and their heads were cut off for taking the brain and isolating the cerebral cortex. The real time fluorescence quantification PCR was adopted to detect the expression level of Nogo mRNA and the Nogo-A protein level was detected by Western blot. The rats in various groups were performed the T1WI and T2WI scanning in the transection position and the coronal positions. Results There were no obvious ischemic brain infarction in the normal control group and the H group, the arc-shaped bilateral cortex ischemic infarct area was clearly seen in the ischemic group, the ischemic infarct area was also seen in the HOP ischemia group, but its area was smaller than which in the ischemic group. Compared with the C group, the expression of Nogo mRNA and the Nogo-A protein in the HOP group was up-regulated ($P<0.05$); compared with the I/R group, the expression of Nogo mRNA and the Nogo-A protein was down-regulated ($P<0.05$). Conclusion HOP increases the neuroplasticity and can reduce the cerebral ischemic infarction area in the exceed acute stage of rat acute global cerebral ischemia by inhibiting Nogo mRNA in the cerebral cortex and up-regulating the Nogo-A protein expression.

Key words: hyperbaric oxygenation; ischemic preconditioning; aged; Nogo; Nogo-A

研究表明,高压氧预处理可改善脑缺血再灌注损伤后大鼠的神经功能,但其机制尚不清楚^[1-2]。缺血再灌注损伤后神经功能降低与神经再生修复能力降低有关,而轴突生长抑制因子(Nogo) mRNA 编码的 Nogo-A 蛋白被认为是迄今发现最强的神经再生抑制物,其表达增强,损伤神经的再生修复能力降低^[3-4]。因此本实验拟研究高压氧预处理对老龄大鼠全脑缺血

再灌注损伤时 Nogo mRNA、Nogo-A 蛋白表达的影响以及从形态学上观察脑组织损伤情况,以探讨其改善神经功能的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠 42 只,月龄 14 个月,体质量 480~530 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。分为 4 组:

* 基金项目:重庆市卫生局科研基金资助项目(2008-2-09);卫生部国家临床重点专科[财社(2011)170 号];重庆市医学重点学科[渝卫科教(2007)2 号]。作者简介:邹磊(1982-),硕士,住院医师,主要从事围术期器官功能保护的相关研究。

对照组(C组, $n=6$)、高压氧组(H组, $n=12$)、脑缺血再灌注损伤组(I/R组, $n=12$)和高压氧预处理+脑缺血再灌注损伤组(HOP组, $n=12$)。H组和HOP组大鼠放入单个鼠笼置于YLC 0.5/1A型婴儿高压氧舱(武汉船舶设计研究所),密闭舱门,调整进气与排气阀门,维持外界环境大气压,氧流量约5 L/min洗舱5 min,关闭排气阀,调整进气阀使舱内压力在10 min内匀速上升至0.2 MPa,稳压1 h,关闭进气阀打开排气阀,为预防减压病以0.01 MPa/min速率匀速减压至0.15 MPa,维持5 min后再匀速减压至外界环境大气压。连续5 d,最后1次高压氧处理后24 h时I/R组和HOP组采用改良Pulsinelli四血管闭塞法制备大鼠脑缺血再灌注损伤模型。

1.2 方法

1.2.1 建立模型方法

参照文献[5]采用改良Pulsinelli四血管闭塞法制备大鼠脑缺血再灌注损伤模型。将大鼠用10%的水合氯醛(3 mL/kg)腹腔麻醉后,固定于单臂脑立体定位仪(Stoelting公司,美国)上,开颅,沿大鼠枕骨大孔向下,向两侧分离肌肉和筋膜,充分暴露第一颈椎侧翼小孔,显微镜直视下采用直径0.5 mm电凝针灼断双侧椎动脉,造成永久性闭塞,然后缝合切口,24 h后再次麻醉大鼠,取仰卧位固定于自制手术台上,颈前切口游离双侧颈总动脉,无创动脉夹夹闭10 min后松开行再灌注。逐层缝合肌肉、皮肤,充分消毒。手术过程中用日光灯(100 W)照射,维持大鼠体温。大鼠自主呼吸存在,双侧瞳孔散大,对光反射消失,脑电图显示呈等电位直线为模型制备成功。

1.2.2 影像学检查

C组、H组麻醉后,I/R组、HOP组在建立急性全脑缺血模型1 h后进行影像学检查。大鼠取仰卧位于固定板,3英寸环形表面线圈置于固定板上。先行3平面定位扫描,然后分别行横断位及冠状位T1WI、T2WI扫描。T1WI:SE序列,TR=300 ms,TE=10.0 ms,层厚3 mm,间隔1 mm,FOV 8 cm×8 cm,矩阵256×224。T2WI:FRFSE序列,TR=3 600 ms,TE=123.8 ms,层厚3 mm,间隔1 mm,FOV 8 cm×6 cm,矩阵256×224。4组大鼠均按照上述方法进行MRI检查,观察梗死面积。

1.2.3 Nogo mRNA检测

H组、I/R组和HOP组于再灌注24 h时随机取6只大鼠,用10%的水合氯醛(3 mL/kg)腹腔麻醉后,快速断头开颅取全脑组织,在蒸馏水制成的冰面上分离大脑皮质,用锡铂纸标记包裹后置于液氮中过夜,然后保存于-70℃超低温冰箱中待用。C组大鼠水迷宫实验后采集标本。按照试剂盒(北京天根生化科技公司)操作说明提取RNA,Premier 5.0软件设计并合成目的基因及管家基因的上下游引物。Nogo-A mRNA上游引物:5'-GCT CTG GAG CTG

TCC TTC ACA GTT-3',下游引物:5'-AGT CTT CTC TGT TAT AAT TTG GG-3',扩增产物300 bp;以Rat GAPDH为内参,上游引物:5'-TCA CCA CCG TGG AGA ACG C-3',下游引物:5'-GCT AAG CAG TTG GTA GTT CA-3',扩增产物229 bp。首先进行常规一步法RT-PCR,将其产物作为母液做10个梯度稀释,取浓度最低的7个稀释样本运用Bio-Rad CFX96荧光定量PCR仪进行扩增,得到相对标准曲线。再从变性到延伸整个过程共40个循环,每个样本均重复3次。反应完毕行融解曲线及凝胶电泳分析以明确目的扩增片段及产物的特异性,最后得到相对标准曲线、融解曲线和样本的相对定量拷贝数,所得数据由Bio-Rad CFX96荧光定量PCR仪自带数据分析软件进行分析。

1.2.4 Nogo-A蛋白检测

Western blot法采用北京博奥森公司辣根过氧化物酶标记羊抗兔Nogo-A。取冻存脑组织用生理盐水匀浆后,加入1 mL蛋白裂解液,于4℃低温12 000 r/min离心(离心半径8 cm)15 min,取上清液,测定蛋白质的浓度并调整为1~2 μg/μL,进行蛋白质的凝胶电泳。整个过程严格按照说明书进行,用凝胶图像处理系统分析目标条带的相对分子质量和净光密度值。

1.4 统计学处理

采用SPSS13.0统计学软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Nogo mRNA与Nogo-A蛋白表达

与C组比较,I/R组和HOP组Nogo mRNA及Nogo-A蛋白表达上调($P < 0.05$);与I/R组比较,H组和HOP组Nogo mRNA及Nogo-A蛋白表达下调($P < 0.05$),见表1。

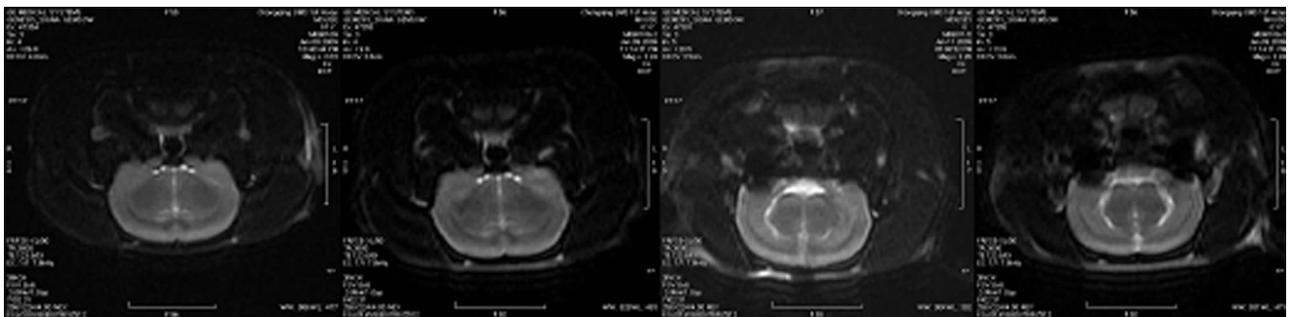
表1 各组大鼠脑组织 Nogo mRNA、Nogo-A 蛋白表达的比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

项目	C组	H组	I/R组	HOP组
Nogo mRNA	1.00±0.18	1.15±0.25 ^b	2.83±0.35 ^a	1.87±0.23 ^{ab}
Nogo-A 蛋白	11.10±1.20	11.00±2.00 ^b	19.50±2.80 ^a	14.30±2.10 ^{ab}

^a: $P < 0.05$,与C组比较;^b: $P < 0.05$,与I/R组比较。

2.2 影像学结果

C组、H组大脑未见明显缺血梗死灶;I/R组双侧皮质区可见明显弧形缺血梗死区,T1WI呈低信号;T2WI呈明显高信号,HOP组双侧皮质区也可见弧形缺血梗死区,面积较I/R组小,T1WI呈等低信号,T2WI呈略高信号,见图1。



A: C组; B: H组; C: I/R组; D: HOP组。

图1 4组大鼠大脑皮质MRI检查结果

3 讨 论

本研究采用改良 Pulsinelli 四血管闭塞法建立全脑缺血模型^[5],成功地模拟了临床上休克、心功能不全、脑血管严重狭窄或阻塞合并血液低灌注引起的脑血流循环障碍,以及由此造成的不同程度脑组织急性缺血缺氧损伤。本实验选择阻断双侧颈动脉的时间为 10 min,能造成中等程度脑缺血损害而又不致于使所建立模型死亡率升高。参照文献^[6]及预实验结果,本实验选择连续 5 d 高压氧预处理(每天置于高压氧舱内 1 h,氧压为 0.2 MPa)的方法进行研究。

通过本研究 MRI 检查发现,给予连续高压氧预适应能减少建模后老龄大鼠大脑皮质超急性期缺血梗死面积,从形态学上证明高压氧预适应有脑保护作用。脑缺血预适应是指对脑组织采用各种措施,如一次或多次短暂性缺血再灌注后,诱导组织产生内源性保护机制,即机体对短暂性缺血的适应性反应,能增加组织细胞对再次缺血的耐受性^[7]。研究表明,预处理能激发脑组织产生自身内源性保护物质如神经营养因子和腺苷受体激动剂^[8],增加神经源中热休克蛋白的表达等多种途径^[9],从而产生脑保护作用。

研究表明,脑缺血再灌注损伤后神经可塑性的下降是影响神经功能恢复的主要因素^[10],而脑组织 Nogo mRNA 表达上调,使其编码的蛋白表达增加可导致神经再生修复能力降^[4]。正常情况下 Nogo mRNA 及 Nogo-A 蛋白主要在脑皮质、海马等部位中等强度表达,在急性损伤(如缺血缺氧、脑挫伤等)后表达上调^[11]。而大脑皮质对缺血最为敏感,因此,有研究推测脑缺血损伤后脑皮质 Nogo-A 表达上调,导致神经可塑性降低,再生修复能力降低^[12-14]。本研究发现,I/R 组 Nogo mRNA 及 Nogo-A 蛋白表达上调,同时大脑缺血梗死面积增大。

有报道表明,缺血再灌注损伤后进行高压氧处理可下调 Nogo-A 表达,促进损伤神经再生修复^[15]。本研究结果显示,与 C 组比较,I/R 组和 HOP 组脑皮质 Nogo mRNA 及 Nogo-A 蛋白表达上调,提示高压氧预处理同样可能通过抑制脑皮质 Nogo mRNA 及 Nogo-A 蛋白表达上调,改善脑缺血再灌注损伤后老龄大鼠大脑的修复能力。本研究结果还提示,C 组和 H 组脑皮质 Nogo mRNA 和 Nogo-A 蛋白表达差异无统计学意义,提示单纯高压氧虽然是一种非生理状态的刺激,但对老龄大鼠脑的正常功能无影响。

综上所述,高压氧预处理通过抑制大脑皮质 Nogo-A 蛋白过度表达,提高神经可塑性,增加再生修复能力,从而减轻缺血再灌注损伤时脑梗死程度。

参考文献:

[1] Rosenthal RE, Silbergleit R, Hof PR, et al. Hyperbaric oxygen reduces neuronal death and improves neurological outcome after canine cardiac arrest[J]. *Stroke*, 2003, 34(5):1311-1316.

[2] Li J, Liu W, Ding S, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against brain ischemia-reperfusion injury by upregulation of antioxidant enzymes in rats[J]. *Brain Res*, 2008(1210):223-229.

[3] Chen Y, Sun FY. Age-related decrease of striatal neurogenesis is associated with apoptosis of neural precursors and newborn neurons in rat brain after ischemia[J]. *Brain Res*, 2007, 29(8):9-19.

[4] Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1[J]. *Nature*, 2000, 403(6768):434-439.

[5] Toda S, Ikeda Y, Teramoto A, et al. Highly reproducible rat model of reversible forebrain ischemia; modified four-vessel occlusion model and its metabolic feature[J]. *Acta Neurochir*, 2002, 144(12):1297-1304.

[6] Ostrowski RP, Graupner G, Titova E, 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.

[7] Kapinya KJ. Ischemic tolerance in the brain[J]. *Acta Physiol Hung*, 2005, 92(1):67-92.

[8] Lee TH, Yang JT, Ko YS, et al. Influence of ischemic preconditioning on levels of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and their high-affinity receptors in hippocampus following forebrain ischemia[J]. *Brain Res*, 2008(1187):1-11.

[9] Selimoglu O, Ugurlucan M, Basaran M, et al. Efficacy of remote ischaemic preconditioning for spinal cord protection against ischaemic injury: association with heat shock protein expression[J]. *Folia Neuropathologica*, 2008, 46(3):204-212.

[10] Zhan H, Tada T, Nakazato F, et al. Spatial learning transiently disturbed by intraventricular administration of ouabain[J]. *Neurol Res*, 2004, 26(1):35-40.

[11] 王玉珠, 张均田. 认知功能和神经可塑性——调节神经可塑性是人参皂苷 Rg1 改善认知功能的基本机制[J]. *医药导报*, 2007, 26(7):702-708.

[12] Wang H, Yao Y, Jiang X, et al. Expression of Nogo-A and NgR in the developing rat brain after hypoxia-ischemia[J]. *Brain Res*, 2006, 1114(1):212-220.

[13] Lee JK, Kim JE, Sivula M, et al. Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(27):6209-6217.

[14] 尹义臣, 陈卓铭, 杜志宏. 卒中后认知功能康复与神经可塑性[J]. *中国康复医学杂志*, 2005, 21(15):471-474.

[15] Zhou C, Li Y, Nanda A, et al. HBO suppresses Nogo-A, Ng-R, or RhoA expression in the cerebral cortex after global ischemia[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 309(2):368-376.