

低氧后处理体外干预对缺氧缺血性脑损伤新生鼠的作用

罗鑫刚¹, 邓青青², 肖慧媚¹, 裴 铮¹, 易爱文¹, 常燕群¹

[摘要] **目的:**探讨低氧后处理体外干预对缺氧缺血性脑损伤新生鼠的作用。**方法:**SD 大鼠 204 只,按随机数字表法分为缺氧缺血性脑损伤组(HIBD 组)、假手术组、8% O₂ + 92% N₂ 组(低氧 A 组)和 15% O₂ + 85% N₂ 组(低氧 B 组),各 51 只。比较各组大鼠缺氧诱导因子(HIF)-1 α 表达水平和学习、记忆能力。**结果:**4 组大鼠脑组织 HIF-1 α 表达水平间差异有统计学意义($P < 0.01$),其中以低氧 A 组 HIF-1 α 表达水平最高,其后依次为低氧 B 组、假手术组、HIBD 组($P < 0.01$)。4 组大鼠学习潜伏期、记忆潜伏期、学习错误次数和记忆错误次数间差异均有统计学意义($P < 0.01$),其中假手术组 4 项指标均明显优于其他 3 组($P < 0.01$),而低氧 A、B 组的记忆潜伏期和学习错误次数、记忆错误次数均少于 HIBD 组($P < 0.05 \sim P < 0.01$),低氧 A 组的学习潜伏期亦少于 HIBD 组($P < 0.05$)。**结论:**对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠进行单次低氧后处理体外干预,能够有效促进 HIF-1 α 表达,提升大鼠学习、记忆能力。

[关键词] 脑损伤;缺氧缺血;低氧后处理;学习能力;记忆能力;大鼠

[中图分类号] R 742 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.06.003

Effect of hypoxic post-treatment on neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

LUO Xin-gang¹, DENG Qing-qing², XIAO Hui-mei¹, PEI Zheng¹, YI Ai-wen¹, CHANG Yan-qun¹

(1. Department of Children Neurological Rehabilitation, The Maternal and Child Care Hospital of Guangdong, Guangzhou Guangdong 511400; 2. The Children's Hospital of Hangzhou, Hangzhou Zhejiang 310000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of hypoxic post-treatment on neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage. **Methods:** Two hundred and four SD rats were randomly divided into the HIBD group, sham operation group, 8% O₂ combined with 92% N₂ group (hypoxic group A), and 15% O₂ combined with 85% N₂ group (hypoxic group B) (51 rats each group). The levels of hypoxia inducible factor(HIF)-1 α and learning and memory abilities between four groups were compared. **Results:** The differences of the levels of HIF-1 α in brain tissue between four groups were statistically significant ($P < 0.01$), the level of HIF-1 α expression in hypoxic group A was the highest, which gradually decreased in hypoxia group B, sham operation group, and HIBD group in turn. There were statistical significances in the study latency, memory latency, and number of learning errors and memory errors between four groups ($P < 0.01$), the four indicators in sham operation group were significantly better than those in other three groups ($P < 0.01$), the memory latency and number of learning errors in hypoxia group A and hypoxia group B were significantly less than those in HIBD group ($P < 0.05$ to $P < 0.01$), and the study latency in hypoxia group A was less than that in HIBD group ($P < 0.05$). **Conclusions:** The hypoxic post-treatment in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage can effectively promote the expression of HIF-1 α , and enhance the learning and memory abilities of newborn rats.

[Key words] brain damage; hypoxia-ischemia; hypoxic posttreatment; learning ability; memory ability; rat

单次低氧后处理是指在机体受损后,接受一次适宜的低氧干涉,以激发机体进行代偿性修复为目的的临床治疗^[1]。新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是指围生期窒息而导致的胎儿或者新生儿缺氧缺血性损伤,可进而导致一系列脑部疾病,目前尚无有效的治疗手段。有研究^[2-3]显示,低氧后处理体外干预对成年

[收稿日期] 2017-01-18 [修回日期] 2018-01-03

[基金项目] 广东省科技厅课题(粤科规划字[2013]37号)

[作者单位] 1. 广东省妇幼保健院 儿童神经康复科,广东 广州 511400; 2. 浙江省杭州市儿童医院 儿科,310000

[作者简介] 罗鑫刚(1983-),男,主治医师。

[通信作者] 常燕群,博士,主任医师。E-mail:cyq01@sina.com

[7] 刘亮. 颞肌蒂下颌骨瓣在上颌骨缺损修复中的临床应用研究

[D]. 合肥:安徽医科大学,2012.

[8] 黄子成. 169 例上颌骨切除病人的临床资料分析[D]. 长沙:中南大学,2011.

[9] 农晨,艾俊,沈澄波. 颌面缺损修复的研究进展[J]. 口腔颌面修复学杂志,2015,3(7):186.

[10] 郭亚娟,刘洪臣,孙力. 上颌骨缺损病人修复后咀嚼运动时脑血流变化的对照研究[J]. 南方医科大学学报,2010,12(7):2640.

(本文编辑 姚仁斌)

鼠脑损伤有明显修复作用。但关于低氧后处理体外干预对 HIBD 新生鼠的作用目前尚少有研究。我们模拟新生鼠 HIBD 病因,建立新生鼠 HIBD 模型,探讨单次低氧后处理体外干预对 HIBD 新生鼠的作用。现作报道。

1 资料与方法

1.1 一般资料 新生 SD 大鼠 204 只,均为广东省动物中心雌雄合笼配种所得新生 7~8 d 的 SD 大鼠(合格证号: NO. 440720520),SPF 级,体质量 12~16 g。按照随机数字表法分为 HIBD 组、假手术组、8% O₂ + 92% N₂ 干预组(低氧 A 组)和 15% O₂ + 85% N₂ 干预组(低氧 B 组),各 51 只。4 组大鼠的雌雄构成、日龄、体质量等一般资料均具有可比性。

1.2 方法 依据 RICE 制备法实施 HIBD 建模:无水乙醚麻醉大鼠,仰卧位固定于手术台上,颈部消毒后,采用眼科剪于每只大鼠颈部正中行 0.5 cm 切口;逐层切开皮肤,将皮下组织和经前肌肉群分离至气管处,然后继续分离气管左侧,充分暴露大鼠颈动脉三角,直至见到搏动的颈总动脉;分离大鼠左侧颈总动脉,取 0 号线双重结扎,并在两重结扎线中点处将实验鼠血管剪断,断流成功后立即缝合切口。

建模完成后 2 h,将 HIBD 组、低氧 A 组、低氧 B 组大鼠放入 37 ℃ 水浴的密闭缺氧箱内(容积 10 L),按照 0.5 L/min 流速持续输入氮氧混合气体,氮氧混合比例以 92% N₂ + 8% O₂ 为宜。上述缺氧操作完成后,每只实验鼠仍在箱内休息 15~20 min,然后取出放置窝内。假手术组实施分离左颈总动脉操作,但在分离总动脉后不予缺血缺氧处理。

建模后第 2 天,HIBD 组和假手术组大鼠置于常压缺氧舱内,均给予 21% O₂ + 79% N₂ 混合气体^[4]。低氧 A、B 组大鼠则于低氧舱内进行单次低浓度氧气干预实验,低氧 A 组充入舱内 8% O₂ + 92% N₂ 混合气体,低氧 B 组充入 15% O₂ + 85% N₂ 混合气体^[5]。4 组大鼠不同混合气体的通气时间均为 5 min,气流量均为 1 L/min。

1.3 评价指标 每组随机取 6 只新生大鼠进行免疫组织化学实验,分析各组 HIF-1 α 表达水平,各组剩余 45 只大鼠则在相同饲养条件下喂养,成长至 21 d 时,分别进行跳台实验,评价各组小鼠学习能力、记忆能力^[6]。

(1) 免疫组织化学检测:取大鼠脑组织,4% 多

聚甲醛溶液中固定 1~3 d,逐步放入 15% 和 30% 的蔗糖溶液进行脱水(1~2 d),在脑组织充分沉淀后,取出,冷冻切片处理。取海马齿状回部分脑片,染色处理,一般以每 6 张取 1 张切片的形式进行染色,清洗,加入枸橼酸盐进行抗原修复,加入健康山羊血清,室温下孵育 30 min。孵育后立即加入一抗、二抗,即 HIF-1 α 抗体、IgG 抗体,孵育 90 min,然后行 PBS 溶液清洗,DAB 显色剂进行显色,梯度乙醇脱水处理,显微镜下观察,阳性齿状蛋白细胞呈棕黄色。(2) 跳台试验:4 组大鼠置于反应箱内进行 3~5 min 自由活动,使其熟悉环境;然后将大鼠放于箱内铜栅上,接通 24 V 交流电源,观察每只鼠遇电击后反应情况;正常反应为跳上平台,观察记录 4 组大鼠 5 min 内首次跳至平台时间(即学习潜伏期),并记录 5 min 内大鼠跳下平台次数(即学习错误次数),评价大鼠学习能力。试验 24 h 后,将实验鼠再次置入反应箱内,重复试验,观察其 5 min 内跳下平台时间(即记忆潜伏期)及跳下平台次数(即记忆错误次数),评价大鼠记忆能力。

1.4 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 4 组大鼠脑组织 HIF-1 α 表达水平比较 4 组大鼠脑组织 HIF-1 α 表达水平间差异有统计学意义($P < 0.01$),其中以低氧 A 组 HIF-1 α 表达水平最高,其后依次为低氧 B 组、假手术组、HIBD 组,每 2 组间差异亦均有统计学意义($P < 0.01$)(见表 1)。

表 1 4 组大鼠脑组织 HIF-1 α 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	HIF-1 α	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> _{组间}
HIBD 组	6	20.54 \pm 5.17			
假手术组	6	75.48 \pm 9.93 **	62.64	<0.01	197.642
低氧 A 组	6	131.60 \pm 22.82 ***			
低氧 B 组	6	81.35 \pm 12.02 * ** Δ			

q 检验:与 HIBD 组比较 * * $P < 0.01$;与假手术组比较 ## $P < 0.01$;与低氧 A 组比较 Δ $P < 0.01$

2.2 4 组大鼠学习能力和记忆能力比较 跳台试验结果显示,4 组大鼠学习潜伏期、记忆潜伏期、学习错误次数和记忆错误次数间差异均有统计学意义($P < 0.01$)。其中假手术组 4 项指标均明显优于其他 3 组($P < 0.01$),而低氧 A、B 组的记忆潜伏期和学习错误次数、记忆错误次数均少于 HIBD 组($P < 0.05 \sim P < 0.01$),低氧 A 组的学习潜伏期亦少于 HIBD 组($P < 0.05$)(见表 2)。

表 2 4 组大鼠学习和记忆能力指标比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	学习潜伏期/d	记忆潜伏期/d	学习错误次数	记忆错误次数
HIBD 组	45	69.08 ± 8.11	53.27 ± 15.23	6.87 ± 1.59	6.93 ± 1.93
假手术组	45	24.06 ± 4.34 **	15.13 ± 4.46 **	3.06 ± 1.11 **	2.67 ± 1.04 **
低氧 A 组	45	63.65 ± 8.86 ***	42.86 ± 15.28 ***	5.92 ± 2.27 ***	5.72 ± 2.18 ***
低氧 B 组	45	66.68 ± 16.02 ***	47.93 ± 11.53 ***	5.61 ± 2.42 ***	6.07 ± 2.11 ***
F	—	194.94	83.99	32.28	44.25
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	—	104.937	154.566	3.692	3.503

q 检验:与 HIBD 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与假手术组比较 *** $P < 0.01$

3 讨论

低氧后处理的干预方式有体内和体外干预 2 种,体内干预对脑损伤修复的效果已得到公认,但体内干预均为有创性干预,且在临床实践中难以实现^[7]。有研究^[2-3]证实,低氧后处理体外干预对脑损伤的成年鼠有明显的修复作用,且相较于脑活素,低氧后处理体外干预对于 HIBD 成年鼠的效果更好。基于此,本研究选取低氧后处理体外干预的方式,探讨其对于 HIBD 新生鼠的作用。

近年研究^[8]显示,低氧后处理可诱导 HIF-1 α 的表达和神经干细胞的增殖,有效改善脑损伤,且低氧后处理干预机体脑损伤时,可有效提高机体的学习和记忆能力,还可增强机体的抗焦虑的能力。HIF-1 α 是机体低氧状态时调控基因进行转录以及使细胞内环境恢复稳定状态的核心控制因子,因此,低氧状态下机体脑组织中 HIF-1 α 水平会明显升高。HIF-1 α 不仅可调节控制上百种神经营养因子的基因转录、翻译及表达,还对神经干细胞的增殖、分化具有诱导作用,抑制神经细胞的凋亡,修复已发生损伤的脑组织,提升机体的学习与记忆能力。

氧浓度的改变对组织能量的代谢具有一定影响,适宜的氧浓度是组织正常进行新陈代谢的基本条件,而机体内的各种组织器官对氧浓度的需氧量各不相同。针对低氧研究,不同实验目的所选用的氧浓度也不同,如试管内在细胞水平上研究促神经干细胞的增殖和分化及迁移的最适宜氧浓度为 1% ~ 8%,使用间歇性低氧治疗成年鼠焦虑行为的适宜氧浓度为 8%^[9],而体外干预 HIBD 新生鼠的氧浓度也应存在一个适宜的氧浓度。本研究结果显

示,4 组大鼠脑组织 HIF-1 α 表达水平间差异有统计学意义,其中以低氧 A 组 HIF-1 α 表达水平最高,其后依次为低氧 B 组、假手术组、HIBD 组。跳台试验结果显示,假手术组大鼠学习潜伏期、记忆潜伏期、学习错误次数和记忆错误次数均明显优于其他 3 组,而低氧 A、B 组的记忆潜伏期和学习错误次数、记忆错误次数均少于 HIBD 组,低氧 A 组的学习潜伏期亦少于 HIBD 组。

综上,对于 HIBD 新生鼠,对其行单次低氧后处理体外干预能促进 HIF-1 α 表达,提升大鼠学习、记忆能力,且 8% O₂ + 92% N₂ 的氧浓度优于 15% O₂ + 85% N₂,有待进一步研究证实,以为临床应用奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] 陈惠军. 集落刺激因子干预对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织的保护作用[J]. 现代预防医学, 2014, 41(16): 2997.
- [2] 刘芳, 张芳芳, 王军, 等. 缺氧缺血性脑损伤新生大鼠大脑皮层 TRPM2 的表达变化及参附注射液的干预作用[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(44): 1918.
- [3] RYBNIKOVA EA, VOROB' EV MG, PIVINA SG, *et al.* A comparison of a neuroprotective effects of hypoxic postconditioning and cerebrolysin in the experimental model [J]. J Neurol Psychiatry, 2013, 113(2): 54.
- [4] CERIO F, LARA-CELADOR I, ALVAREZ A, *et al.* Neuroprotective therapies after perinatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. Brain Sci, 2013, 6(3): 191.
- [5] 吴宏伟, 王军, 王伟, 等. 缺氧缺血性脑损伤新生大鼠 Caspase-12 的表达及参附注射液对其的影响[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(34): 5577.
- [6] 于乔, 王瑞妍, 王军, 等. 不规则趋化因子在缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织中的表达及参附注射液干预作用的研究[J]. 中国妇幼保健, 2015, 15(47): 2425.
- [7] KIM JC, SHIM JK, LEE S, *et al.* Effect of combined remote ischemic preconditioning and postconditioning on pulmonary function in valvular heart surgery [J]. Chest, 2012, 142(2): 467.
- [8] LÉCONTE C, LÉGER M, BOULOUARD M, *et al.* Repeated mild hypoxic exposures decrease anxiety-like behavior in the adult mouse together with an increased brain adrenomedullin gene expression [J]. Behav Brain Res, 2012, 230(1): 78.
- [9] 李文迪, 钟敏, 刘友学, 等. 氯化钴后处理对新生鼠缺氧缺血性脑损伤学习记忆的作用[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(7): 630.

(本文编辑 卢玉清)