

## HBO 对内皮素-1 诱导的大鼠局灶性脑缺血模型的疗效观察

顾国军, 黄振兴, 陶凯忠, 刘 昀, 陶恒沂, 彭兆云, 孙学军\*  
(第二军医大学海军医学系潜水医学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的:利用内皮素-1(endothelin-1, ET-1)建立一种操作简单、稳定性和重复性好的大鼠局灶性脑缺血再灌注模型并观察高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗的效果。方法:动物麻醉后,将 3 μl ET-1(60 pmol/μl)注射到大鼠大脑中动脉附近,建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。ET-1 + HBO 组大鼠术后 1 h 给予 HBO[100% O<sub>2</sub>, 2.5 atmosphere absolute(ATA), 2 h]治疗;ET-1 组不予治疗。所有动物在术后 4、8 和 24 h 进行神经学评分,24 h 断头取脑,测定左右半球脑含水量,进行 TTC 和 H-E 染色。结果:ET-1 诱导的大鼠局灶性脑缺血模型成功率较高(20/24),梗死体积稳定,重复性好。经 HBO 治疗后,ET-1 + HBO 组与 ET-1 组相比,4、8 和 24 h 的神经学评分均明显改善(4 h 和 8 h 有  $P < 0.05$ , 24 h 有  $P < 0.01$ ),脑含水量显著降低( $P < 0.01$ ),梗死体积显著缩小( $P < 0.05$ ),H-E 染色示脑损伤明显减轻。结论:ET-1 诱导的大鼠局灶性脑缺血模型是研究人类脑缺血疾病较理想的实验动物模型,HBO 治疗能明显减轻缺血性脑损伤。

[关键词] 高压氧;脑缺血;内皮素-1;模型;动物

[中图分类号] R 743 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)10-1134-04

### Effect of hyperbaric oxygen on an endothelin-1-induced focal cerebral ischemic model in rats

GU Guo-jun, HUANG Zhen-xing, TAO Kai-zhong, LIU Yun, TAO Heng-yi, PENG Zhao-yun, SUN Xue-jun\* (Department of Diving Medicine, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Objective: To establish a focal cerebral ischemia/reperfusion (FCI/R) model with endothelin-1 (ET-1) in rats and to observe the effectiveness of hyperbaric oxygen (HBO) in treatment of this model. Methods: Three μl ET-1 (60 pmol per μl) was injected into the site adjacent to rat middle cerebral artery (MCA) under anesthesia to induce FCI/R model. HBO (100% O<sub>2</sub>, 2.5 ATA for 2 h) was applied at 1 h after ET-1 injection in ET-1 + HBO group; rats in FCI/R model group received no treatment. Neurological scores were determined at 4 h, 8 h, and 24 h after injection. Animals were all killed at 24 h to harvest brain tissues for water content assessment and TTC, H-E staining. Results: ET-1 had a high successful rate in inducing FCI/R model in rats, with stable infarction area and good repeatability. Animals in ET-1 + HBO group had better neurological outcomes than controls at all the 3 time points ( $P < 0.05$  at 4 h and 8 h,  $P < 0.01$  at 24 h). HBO treatment significantly decreased the brain water content ( $P < 0.01$ ), reduced the infarction areas ( $P < 0.05$ ), and obviously alleviated the cerebral lesions as showed by H-E staining. Conclusion: The ET-1-induced FCI/R model provides an ideal model for studying human cerebral ischemia diseases. HBO (100% O<sub>2</sub>, 2.5 ATA for 2 h) treatment administrated 1 h after focal cerebral ischemia can improve the neurological outcomes of the model animals, reduce the infarction areas, and alleviate ischemic brain lesion.

[KEY WORDS] hyperbaric oxygen; focal cerebral ischemia; endothelin-1; models, animal

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(10): 1134-1137]

缺血性脑血管病是临床上常见的一类疾病,其致残率和死亡率均较高。因此建立成功率高、梗死部位恒定、重复性好的实验动物模型,是研究其病理生理机制及防治措施的重要手段。Sharkey 等<sup>[1]</sup>在 1993 年最先应用内皮素-1(endothelin-1, ET-1)建立大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)动物模型,此法在国外应用较广泛,但国内报道较少<sup>[2]</sup>。另外,许多研究显示,早期应用高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗能减轻脑缺血性损伤,具有神经保护作用。本实验在大鼠脑缺血后 1 h 给予 HBO[100% O<sub>2</sub>, 2.5 绝对大气压(ATA), 2 h]治疗,观察 HBO 在该 MCAO 模型中是否具有神

经保护作用,并初步探讨 HBO 治疗脑缺血性疾病的作用机制。

### 1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 立体定向器(江湾型 C), 250-500 透明动物舱(上海 701 所杨园医用氧舱厂)。ET-1(Sigma 公司,用 0.9% 生理盐水稀释至 60

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30500579)。Supported by General Program of National Natural Science Foundation of China (30500579)。

[作者简介] 顾国军,硕士生。

\* Corresponding author. E-mail: sunxjk@hotmail.com

pmol/ $\mu$ l),氯化2,3,5-三苯基四氮唑(TTC,国药集团化学试剂有限公司;用0.2 mol/L磷酸缓冲液稀释至2%,pH 7.4),其他试剂均为分析纯。

1.2 实验动物及分组 雄性SD大鼠29只,体重280~320 g(第二军医大学实验动物中心提供),随机分成3组:(1)Sham组( $n=5$ ):注射生理盐水;(2)ET-1组( $n=12$ ):注射ET-1;(3)ET-1+HBO组( $n=12$ ):注射ET-1并在1 h后给予HBO治疗。大鼠用2%戊巴比妥腹腔麻醉(40 mg/kg),俯卧位固定于脑立体定向器上,下以保温床垫维持肛温在(37.5 $\pm$ 0.5),在颅顶沿正中中线做一长约1.5 cm的切口,暴露颅骨,以前囟为标志,向前0.9 mm,向左旁开5.2 mm,向下8.7 mm植入ET-1导管(图1)。ET-1组和ET-1+HBO组将3  $\mu$ l ET-1(60 pmol/ $\mu$ l)以0.6  $\mu$ l/min的速率注射到MCA附近,留针5 min,缓慢拔针;Sham组以3  $\mu$ l的生理盐水代替ET-1。ET-1+HBO组大鼠术后1 h放入高压氧舱内,纯氧洗舱10 min,并用新鲜钠石灰颗粒吸收CO<sub>2</sub>。以0.5 ATA/min匀速加压至2.5 ATA,1 h后以0.25 ATA/min匀速减压至常压并出舱活动,10 min后重复治疗1次。总治疗时间为2 h。其他组均在同时段模拟进出舱活动。

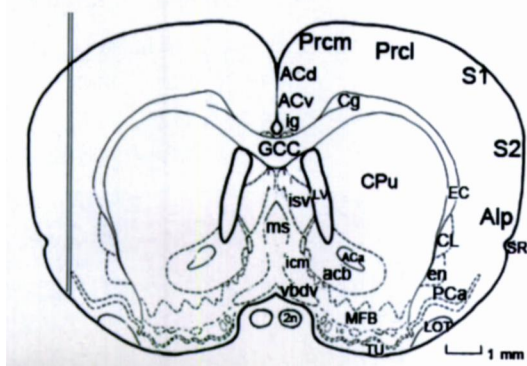


图1 ET-1注射的组织学定位(前囟,+0.9 mm)

Fig 1 Histological location of ET-1 injection (Bregma +0.9 mm)

ACa: Anterior commissural nucleus; acb: Accumbens nucleus; Acd: Anterior cingulate cortex (dorsal part); Acv: Anterior cingulate cortex (ventral part); Alp: Posterior agranular insular area; Cg: Cingulum; Cl: Claustrum; CPu: caudate putamen; EC: External capsule; en: Endopiriform nucleus; GCC: Genu of the corpus callosum; ig: Indusium griseum; icm: Islands magna of Calleja; LOT: Lateral olfactory tract; lsv: Lateral septal nucleus; LV: Lateral ventricle; MFB: Medical forebrain bundle; ms: Medial septal nucleus; PCa: Anterior part of prepiriform cortex; Prcl: Lateral precentral area; Prcm: Medical precentral area; S1: Sensorimotor; S2: Sensorimotor cortex; SR: Rhinal sulcus; TU: Olfactory tubercle; 2n: Optic nerve

1.3 神经学评分 参照 Ohlsson<sup>[3]</sup>和 Garcia等<sup>[4]</sup>描述的神经学评分方法并加以改进,评分于术后4、8、24 h进行。评分标准(总分15分):(1)平衡木试验:将大鼠放在一根长84 cm,宽2.4 cm的木条上,看其能否走过去。0分:顺利走过;1分:能走过去,偶尔打滑;2分:能走过去,超过50%的步子打滑;3分:能走过去,但患侧后肢不起作用;4分:在行走时掉下来;5分:能呆在上面,但不能走;6分:不能呆,掉下来。(2)抓绳试验:让大鼠前肢抓住一直径2 mm的钢绳。0分:抓住5 s以上,并有后肢攀上绳子;1分:能抓住5 s,但后肢不能攀上绳子;2分:能抓住3~4 s;3分:仅能抓住0~2 s。(3)提尾行走试验:轻提大鼠尾巴末端,使后肢离地行走。0分:双前肢对称伸展,沿直线协调行走;1分:右前肢较左前肢伸展少,稍向右倾行走;2分:右前肢稍有伸展,行走时向右打转;3分:无法行走。(4)提尾悬空试验:轻提大鼠尾巴末端,使其悬空。0分:四肢协调伸展;1分:右侧肢体较左侧伸展少或慢;2分:右侧肢体很少伸展;3分:右侧肢体不伸展。

1.4 脑含水量测定 术后24 h快速断头取脑,除去嗅球、脑干及小脑,分别取左右脑半球样本称量,然后放入105℃的烤箱内48 h后再次称量。脑含水量=[(湿重-干重)/湿重]×100%。

1.5 TTC染色 术后24 h动物深度麻醉,经升主动脉灌注0.9%生理盐水150 ml,断头取脑,将脑组织置于0℃的冰生理盐水中10 min,由前极向后每隔2 mm作冠状切片,置于2% TTC磷酸缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.4)中,37℃避光孵育30 min,正常组织染成红色,梗死组织染成白色。染色后4%多聚甲醛溶液固定24 h,数码相机拍照,利用Image J软件分析计算梗死体积百分比。

1.6 H-E染色 术后24 h动物深度麻醉后,经升主动脉先灌注0.9%生理盐水150 ml,再灌注4%多聚甲醛200 ml,用4%多聚甲醛后固定48 h,20  $\mu$ l冠状切片,常规H-E染色,显微镜下观察损伤情况。

1.7 统计学处理 实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示,统计学处理采用SPSS 11.0 for windows软件包进行t检验和单因素方差分析。

## 2 结果

2.1 模型成功率 麻醉醒后出现明显神经学症状(不能伸展右侧前肢,向右侧旋转或倾倒,意识丧失等)且神经学评分在6分以上视为模型成功,本研究中模型成功率为83.3%。ET-1组有1只麻醉清醒

前死亡, HBO 组有 1 只麻醉清醒后神经学评分低于 6 分, 两组各有 1 只出现麻醉清醒后不停向左侧翻滚抽搐的症状, 此 4 只视为模型不成功。

2.2 神经学评分 ET-1 组和 ET-1 + HBO 组在 4、8、24 h 的评分均较 Sham 组高 ( $P < 0.01$ ), 而 ET-1 + HBO 组在 4 h ( $P < 0.01$ )、8 h ( $P < 0.05$ )、24 h ( $P < 0.05$ ) 的评分均较 ET-1 组明显降低 (表 1)。

表 1 缺血后再灌注不同时间点的神经学评分

Tab 1 Neurological scores of different time points after ischemia-reperfusion

| Group      | N  | Time after ischemia-reperfusion (t/h) |             |                |
|------------|----|---------------------------------------|-------------|----------------|
|            |    | 4                                     | 8           | 24             |
| Sham       | 5  | 1.6 ± 0.5                             | 1.2 ± 0.4   | 0.4 ± 0.5      |
| ET-1       | 10 | 12.0 ± 2.1                            | 10.0 ± 1.8  | 8.7 ± 1.8      |
| ET-1 + HBO | 10 | 10.1 ± 1.7                            | * 7.7 ± 1.6 | * 6.4 ± 1.1 ** |

$P < 0.01$  vs sham group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs ET-1 group

2.3 脑含水量 左脑: ET-1 组为 (81.04 ± 0.34)%, ET-1 + HBO 组为 (79.58 ± 0.45)%, 均明显高于较 Sham 组 (78.48 ± 0.21)%, ( $P < 0.01$ ), 而 ET-1 + HBO 组较 ET-1 组显著降低 ( $P < 0.01$ ); 右脑: ET-1 组为 (78.79 ± 0.37)%, ET-1 + HBO 组为 (78.67 ± 0.22)%, 与 Sham 组 (78.56 ± 0.28)% 相比无统计学意义。

2.4 TTC 染色 Sham 组无梗死区。ET-1 组和 ET-1 + HBO 组的平均脑梗死体积分别为 (23.14 ± 2.3)% 和 (13.24 ± 4.32)% ( $P < 0.05$ , 图 2)。

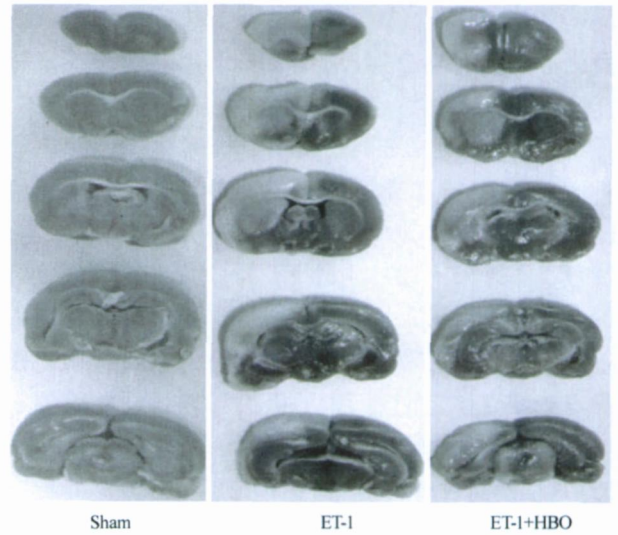


图 2 各组 TTC 染色结果

Fig 2 TTC staining

TTC staining was negative in normal rats (Sham). Positive staining (white color) was observed in rats undergone middle cerebral artery occlusion and reperfusion (ET-1) at 24 h. HBO treatment initiated at 1 h after MCAO markedly reduced infarction areas (ET-1 + HBO)

2.5 H-E 染色 Sham 组未见明显的脑组织损伤; ET-1 组脑组织缺血区染色浅, 缺血区与正常组织分界较清楚, 形成梗死灶, 梗死灶内可见明显的组织结构疏松, 神经纤维网空泡化, 大量神经元丢失; ET-1 + HBO 组脑损伤较 ET-1 组明显减轻, 神经纤维空泡化和神经元丢失均较 ET-1 组明显减少 (图 3)。

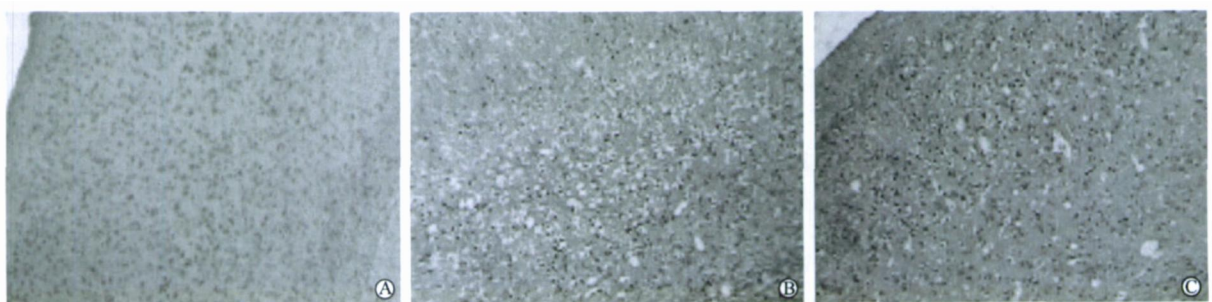


图 3 各组 H-E 染色结果

Fig 3 H-E staining results of all groups (x50)

Brain slides at hippocampal level show normal cortical neuron morphology in Sham animals (A). Marked neuron loss is detected by H-E staining 24 h after ET-1 application (B). HBO treatment 1 h after ET-1 application greatly prevented neuron loss (C)

### 3 讨论

本实验重点研究了 ET-1 诱导的大鼠局灶性 MCAO 模型的建立方法和相关指标的评估。与其他的 MCAO 模型相比, 此模型具有许多优点: (1) 操作简便, 创伤小, 无术后并发症, 减轻了手术因素对

模型的影响。(2) 纯种大鼠颅骨类型比较恒定, 颅骨标志与脑结构之间的关系也比较恒定, 定位准确, 模型成功率高 (本研究中为 83.3%), 稳定性和重现性好。(3) 在缺血的同时就开始再灌注, 并且是逐步的, 与部分人类脑卒中发生过程相似<sup>[5]</sup>。(4) 能在动物意识清醒时诱发脑卒中<sup>[1]</sup>。

自 20 世纪 60 年代初至今, HBO 在临床上已经用于治疗多种神经系统的疾病<sup>[6]</sup>; 许多临床和动物实验研究显示 HBO 对脑梗死具有肯定的疗效。本研究通过观察行为学评分、脑水肿程度、脑梗死体积和病理学观察发现, 经过 HBO 治疗后, ET-1 + HBO 组与 ET-1 组相比, 脑水肿程度、行为学评分和病理损伤均明显改善, 也证实 HBO (100% O<sub>2</sub>, 2 ATA, 2 h) 治疗对 ET-1 诱导的脑缺血损伤具有神经保护作用。另外, 考虑到连续 2 h 的 HBO 治疗可能出现氧的毒性作用, 我们的治疗方案也有所改进, 实行治疗 1 h 后出舱活动 10 min 再治疗 1 h 的方案, 治疗过程中没有一只动物出现氧惊厥等氧中毒症状。

HBO 治疗缺血性脑血管病的机制尚未完全清楚, 各种研究发现, HBO 可能通过以下几种机制起神经保护作用: (1) HBO 通过提高氧张力、增加血液和组织的氧含量、提高血氧的弥散距离来促进缺氧脑区血液循环的恢复。Tyson 等<sup>[7]</sup>提出 MCAO 后, 在额顶叶皮质缺血中心周围存在着称作“缺血半暗带 (penumbra)”的区域, 这些区域可能还得到大脑前动脉和大脑后动脉的供给, 因此 MCAO 后仍有一定血流供应。在这些区域中的神经元虽然电活动终止, 功能失活, 但仍能维持跨膜离子平衡和结构上的完整, 能存活一段时间, 若能及时恢复血供, 有可能被挽救回来。而 HBO 的主要作用之一就是能提高缺血半暗带的供氧量<sup>[8]</sup>, 因此这可能是 HBO 具有神经保护作用的主要因素之一。(2) HBO 可以改善梗死区脑的代谢。研究发现, HBO 能使缺血脑组织的葡萄糖、丙酮酸盐和谷氨酸盐水平降至对照水平 (即阻塞前水平), 清除纹状体的代谢产物<sup>[9]</sup>, 下调环氧合酶-2 (COX-2)<sup>[10]</sup>, 减少纹状体多巴胺 (DA) 的释放<sup>[8]</sup>, 这些研究提示 HBO 的神经保护作用可能与其能改善缺血脑组织的代谢有关。(3) HBO 能改善血脑屏障的通透性, 减轻脑水肿<sup>[11]</sup>, 从而发挥神经保护作用。(4) HBO 能减轻梗死区炎症反应。中性粒细胞在局灶性脑缺血过程中介导炎症反应已经被证明<sup>[12]</sup>, 缺血再灌注过程中的中性粒细胞黏附、集聚所产生的流变学效应可加重组织损伤。HBO 能减轻由于 PMN 的激活和浸润导致的炎症反应介导的继发性脑损伤<sup>[13]</sup>, 具体机制未明, 可能是 HBO 提高 SOD 活性, 减少了中性粒细胞和血管内皮自由基的过量产生, 从而抑制了中性粒细胞和血管内皮的黏附<sup>[14]</sup>。(5) HBO 能抑制缺血脑组织的神经元凋亡<sup>[15]</sup>, 这也是 HBO 减轻缺血性脑损伤的重要机制之一。

## [参考文献]

- [1] Sharkey J, Ritchie IM, Kelly PA. Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1993, 13:865-871.
- [2] 梅和珊, 苏素文, 王永利, 等. Endothelin-1 诱导的大鼠局灶性脑缺血再灌注模型[J]. *中国药理学通报*, 2004, 20:114-117.
- [3] Ohlsson AL, Johansson BB. Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats[J]. *Stroke*, 1995, 26:644-649.
- [4] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Stroke*, 1995, 26:627-635.
- [5] Biernaskie J, Corbett D, Peeling J, et al. A serial MR study of cerebral blood flow changes and lesion development following endothelin-1-induced ischemia in rats[J]. *Magn Reson Med*, 2001, 46:827-830.
- [6] Zhang JH, Lo T, Mychaskiw G, et al. Mechanisms of hyperbaric oxygen and neuroprotection in stroke[J]. *Pathophysiology*, 2005, 12:63-77.
- [7] Tyson GW, Teasdale GM, Graham DI, et al. Focal cerebral ischemia in the rat: topography of hemodynamic and histopathological changes[J]. *Ann Neurol*, 1984, 15:559-567.
- [8] Yang ZJ, Camporesi C, Yang X, et al. Hyperbaric oxygenation mitigates focal cerebral injury and reduces striatal dopamine release in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion[J]. *Eur J Appl Physiol*, 2002, 87:101-107.
- [9] Badr AE, Yin W, Mychaskiw G, et al. Effect of hyperbaric oxygen on striatal metabolites: a microdialysis study in awake freely moving rats after MCA occlusion[J]. *Brain Res*, 2001, 916(1-2):85-90.
- [10] Yin W, Badr AE, Mychaskiw G, et al. Down regulation of COX-2 is involved in hyperbaric oxygen treatment in a rat transient focal cerebral ischemia model[J]. *Brain Res*, 2002, 926(1-2):165-171.
- [11] Mink RB, Dutka AJ. Hyperbaric oxygen after global cerebral ischemia in rabbits reduces brain vascular permeability and blood flow[J]. *Stroke*, 1995, 26:2307-2312.
- [12] Frijns CJ, Kappelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease [J]. *Stroke*, 2002, 33:2115-2122.
- [13] Miljkovic-Lolic M, Silbergleit R, Fiskum G, et al. Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen treatment in experimental focal cerebral ischemia are associated with reduced brain leukocyte myeloperoxidase activity[J]. *Brain Res*, 2003, 971:90-94.
- [14] Kaelin CM, Im MJ, Myers RA, et al. The effects of hyperbaric oxygen on free flaps in rats[J]. *Arch Surg*, 1990, 125:607-609.
- [15] Yin D, Zhou C, Kusaka I, et al. Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23:855-864.

[收稿日期] 2006-01-06

[修回日期] 2006-09-21

[本文编辑] 尹 茶