

高压氧对成年大鼠脑梗死灶体积和基质金属蛋白酶的影响

潘钰 张朝东

[摘要] 目的 探讨高压氧(HBO)对成年大鼠持续性局灶脑缺血梗死灶体积的影响及其可能的作用机制。方法 应用血管内细丝线栓堵大脑中动脉(MCA)制作持续性脑缺血大鼠模型,用 HBO(2.0 ATA)治疗后,观察 MCA 缺血后 6 h、24 h、48 h、72 h、120 h 和 10 d 各组大鼠脑梗死灶体积、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) MMP-2 和 MMP-9 的变化。结果 与缺血组相比, HBO 组大鼠 120 h 和 10 d 梗死灶体积减小,缺血 48—120 h MMP-9 蛋白表达减少, MMP-2 蛋白表达无明显变化。结论 HBO 能减小脑梗死灶体积,其作用可能与 HBO 下调 MMP-9 蛋白表达有关。

[关键词] 高压氧;局灶性脑缺血;基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)

Effect of hyperbaric oxygen on infarct volume and matrix metalloproteinase after permanent focal cerebral ischemia in adult rats PAN Yu, ZHANG Chao-dong. Faculty of Rehabilitation of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100068, China

[Abstract] Objective To investigate the effect of hyperbaric oxygen (HBO) on infarct volume and relevant mechanism after permanent focal cerebral ischemia in adult rats. Methods Rat model of focal cerebral ischemia induced by intraluminal filament occlusion of middle cerebral artery (MCA) was used. HBO (2.0 ATA) was applied to HBO group. Infarct volume, matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and MMP-9 were detected at 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 120 h and 10 d after ischemia. Results The infarct volume obviously decreased at 120 h and 10 d and expression of MMP-9 lowered at 48—120 h in HBO groups. There was no significant change in MMP-2. Conclusion HBO can reduce infarct volume after cerebral ischemia, which may be related to downregulation of MMP-9 levels.

[Key words] hyperbaric oxygen (HBO); focal cerebral ischemia; matrix metalloproteinase (MMP)

中图分类号: R459.6 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2004)12-0726-03

[本文著录格式] 潘钰,张朝东.高压氧对成年大鼠脑梗死灶体积和基质金属蛋白酶的影响[J].中国康复理论与实践,2004,10(12):726—728.

局灶性脑缺血引起的组织缺氧是神经元直接或间接死亡的主要原因^[1]。因此,提高局部梗死组织氧的供给,一直被认为是具有潜力的治疗方法^[1]。研究表明,高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)能有效增加血浆中的氧含量,减小梗死灶体积,减轻神经系统症状,改善预后^[1,2]。但 HBO 治疗脑缺血的确切机制尚不清楚。近年来人们发现,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)与脑血管病关系密切,其中 MMP-2 和 MMP-9 是 MMP 家族的重要成员,参与缺血性脑血管病的血脑屏障(blood brain barrier, BBB)开放和血管源性脑水肿形成^[3]。国内有学者报道, HBO 有降低脑梗死再灌注小鼠 MMP-9 活性和 BBB 通透性的作用^[4]。本研究采用血管内细丝线栓堵大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)制成大鼠持续性局灶脑缺血模型,采用组织病理学和免疫组织化学方法,观察经 HBO 治疗后,脑梗死灶体积及 MMP-2、MMP-9 蛋白的变化,探讨 HBO 对持续性局灶脑缺血梗死灶的影响及其可能的作用机制。

1 材料与方法

作者单位:1. 100068 北京市,首都医科大学康复医学院(潘钰);2. 110001 辽宁沈阳市,中国医科大学第一临床学院神经内科(张朝东)。
作者介绍:潘钰(1973-),女,辽宁沈阳市人,博士研究生,主治医师,主要研究方向:神经康复及脑血管病康复。

1.1 实验材料

1.1.1 动物及分组 健康雄性 SD 大鼠 70 只,4—5 月龄,体重 180—220 g,随机分为 4 组:正常对照组(n=5);假手术组(n=5);缺血组(n=30);HBO 组(n=30)。后两组又分别分成 6 h、24 h、48 h、72 h、120 h 和 10 d 等时间点,每个时间点 5 只。

1.1.2 主要试剂 兔抗 MMP-2、MMP-9 多克隆抗体(天津博士德公司产品);过氧化物酶标记链霉卵白素-亲和素 SP 试剂盒(北京中山生物技术公司产品);枸橼酸钠缓冲液、DAB(天津博士德公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠持续性局灶脑缺血模型制作 按照 Nagasawa 等报道的方法加以改进^[5]。假手术组只分离颈总及颈外动脉,不插入尼龙线。选择苏醒后行走向右旋转或右侧肢体瘫痪的大鼠为栓堵成功鼠进行实验,否则视为栓堵失败,弃之不用。栓堵成功的大鼠按规定时间断头取脑。

1.2.2 HBO 治疗 HBO 组大鼠缺血后 2 h 送入单人高压氧舱。先用纯氧充分洗舱 10 min,使舱内 O₂ 浓度 > 90%,加压至 0.20 MPa(速率 0.0125 MPa/min),停留 60 min,期间用纯氧通风 10 min。停留毕,以 20 min 匀速减压至常压后出舱,每天进行 1 次。

1.2.3 病理标本制作 正常对照组大鼠在实验开始、假手术组大鼠在术后 24 h、缺血组和 HBO 组大鼠分别在缺血后 6 h、24 h、48 h、72 h、120 h 和 10 d 常规取

材。

沿冠状位将大鼠脑切成 3 mm 厚的组织块,用 0.1 M PBS 洗 3 次,快速脱水,低温石蜡包埋。取有大体病变的组织块从额侧开始切取冠状组织片,切片厚度 6 μm。每个组织片每隔 200 μm 连续取 3 张,分别做常规 HE 染色、MMP-2 和 MMP-9 蛋白免疫组化及阴性对照染色。每个组织块取 5 组。

1.2.4 梗死灶体积定量 梗死灶确定:以 HE 染色显示的脑组织坏死区为梗死灶。梗死灶计算:常规 HE 染色切片用 Leica Q570 图像分析系统检测,计算每张冠状切片上梗死灶的面积。每个组织块梗死灶体积按下列公式计算: $V = t_1(A_1 + A_2)/2 + t_2(A_2 + A_3)/2 + \dots + t_{n-1}(A_{n-1} + A_n)/2$ (注: V = 体积; t = 两相邻冠状面的间距; A = 每一冠状面上梗死灶面积; n = 冠状面序列号)。分别将每个鼠脑标本的所有含梗死灶组织块的梗死灶体积相加,做为该标本的梗死灶体积值。

1.2.5 MMP-2、MMP-9 蛋白免疫组化检测 石蜡切

表 1 脑缺血梗死灶体积 (mm³, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 6 h | 24 h | 48 h | 72 h | 120 h | 10 d |
|-------|-------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------------------|-------------------------|
| HBO 组 | 96.2 ± 4.9 | 124.7 ± 6.9 | 126.5 ± 6.4 | 128.4 ± 7.2 | 96.9 ± 5.8 ^a | 74.2 ± 4.9 ^a |
| 缺血组 | 102.1 ± 5.8 | 133.3 ± 9.5 ^b | 137.5 ± 8.4 | 138.7 ± 8.1 | 115.6 ± 7.4 | 92.6 ± 5.4 ^c |

注:a:与缺血组比较, $P < 0.01$;b:与 6 h 比较, $P < 0.01$;c:与 120 h 比较, $P < 0.01$ 。

2.2 MMP-2、MMP-9 蛋白免疫组化检测 正常对照组和假手术组可见较少量 MMP-2 免疫组化阳性细胞表达,无 MMP-9 免疫组化阳性细胞。缺血组脑缺血 6 h 在缺血区边缘可见部分 MMP-2、MMP-9 免疫组化阳性细胞,MMP-2 蛋白的表达在 24 h 增多,120 h 达高峰,10 d 时减少;MMP-9 蛋白在 48 h 达高峰,维持至 120 h 仍有较高表达,10 d 时减少。微血管周围也可见阳性细胞。阳性细胞以胞浆染色为主。对照组 HE 染色显示,MMP-2、MMP-9 阳性细胞为神经细胞、小胶质细胞及内皮细胞。HBO 组与缺血组相比,MMP-9 免疫组化阳性细胞在 48—120 h 各时间点减少,差异有显著性意义($P < 0.05$);MMP-2 免疫组化阳性细胞无明显变化($P > 0.05$),见表 2。

表 2 脑梗死后 MMP-2、MMP-9 阳性细胞密度比较

| 项目 | 组别 | 6 h | 24 h | 48 h | 72 h | 120 h | 10 d |
|-------|-------|----------|--------|---------------------|---------------------|---------------------|--------|
| MMP-2 | HBO 组 | 11 ± 3.4 | 21 ± 5 | 30 ± 8 | 38 ± 7 | 47 ± 9 | 25 ± 4 |
| | 缺血组 | 14 ± 4 | 28 ± 7 | 37 ± 9 | 45 ± 11 | 57 ± 12 | 32 ± 8 |
| MMP-9 | HBO 组 | 20 ± 4 | 27 ± 6 | 36 ± 9 ^a | 30 ± 6 ^a | 26 ± 7 ^a | 15 ± 5 |
| | 缺血组 | 26 ± 4 | 40 ± 6 | 59 ± 12 | 50 ± 10 | 42 ± 8 | 21 ± 3 |

注:a:与缺血组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

HBO 自 20 世纪 60 年代开始应用于临床,被认为是治疗脑部疾病的一种有效的非损伤性方法。HBO 能有效增加氧的弥散能力,增大氧有效弥散范围,促进血管生成和侧枝循环建立,活化缺血半暗带内的无效细胞^[2]。Mink 等研究发现,免全脑缺血后,HBO 能提

片采用 SP 法进行免疫组织化学染色。在 40 倍物镜下,于每张切片梗死灶边缘区取相互不重叠的 8 个视野,计数其中的 MMP-2、MMP-9 免疫阳性细胞,每组大鼠所有切片阳性细胞数的($\bar{x} \pm s$)作为该组动物梗死灶边缘区 MMP-2、MMP-9 免疫组化阳性细胞值,以阳性细胞数/10 × 40 视野表示。

1.2.6 统计学处理 所有结果应用 SPSS 软件进行统计学处理,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 脑梗死灶体积 持续性局灶脑缺血 6 h HE 染色光镜下见 MCA 供血区的皮层和皮层下白质染色浅,细胞核固缩,神经纤维网呈空泡化,缺血边界较清楚,形成梗死灶。24 h 的梗死灶体积明显 > 6 h($P < 0.01$),梗死灶基本固定;24—120 h 的梗死灶体积无显著变化;10 d 的梗死灶体积明显 < 120 h($P < 0.01$)。HBO 组 120 h 和 10 d 的梗死灶体积缩小,与缺血组有非常显著性差异($P < 0.01$),见表 1。

高血脑屏障的完整性,使脑血流量下降,减轻脑水肿^[6]。在局灶脑缺血和全脑缺血模型中,HBO 使梗死灶体积缩小,降低死亡率^[7-8]。本研究就 HBO 对大鼠持续性局灶脑缺血梗死灶体积的影响进行观察,发现与缺血组相比,HBO 组缺血 120 h—10 d 时的梗死灶体积缩小,提示脑缺血早期暴露于 HBO 可减小持续性局灶脑缺血梗死灶体积,减轻缺血损伤程度。但 HBO 对脑缺血神经系统保护作用的确切机制尚不十分清楚。

脑水肿和 BBB 通透性增高是缺血性脑损伤的重要表现之一。脑缺血可引起基底膜通透性和结构的变化,这种变化被认为是局灶性脑缺血所致 BBB 破坏、产生血管源性脑水肿的重要原因^[9]。近几年随着对 MMP 研究的深入,人们发现脑缺血及再灌注后 MMP 表达增加。MMP 是一组含 Zn²⁺ 的能降解细胞外间质的蛋白酶,在基底膜降解中起着主要作用,尤其是 MMP-2 和 MMP-9 的表达增加与脑微血管通透性、BBB 通透性、BBB 崩溃、炎性细胞侵入和脑水肿密切相关。MMP-2 分子量 72 KD,活性分子量 66 KD;MMP-9 分子量 92 KD,活性分子量 83 KD。纤溶酶原激活物活化 MMP-9 前体,膜型 MMP 在细胞表面活化 MMP-2 前体。活化的 MMP 一旦形成并释放到细胞外,会破坏细胞外间质的大多数成分,而基底膜的破坏加重了脑水肿和出血的危险。Fujimura 在局灶性脑缺血再灌

注小鼠模型中发现,活化 MMP-9 的早期出现导致 BBB 破坏和血管源性脑水肿^[3]。本研究显示,持续性局灶性脑缺血 6 h 缺血区及缺血边缘区即有部分 MMP-2 和 MMP-9 阳性细胞表达。MMP-9 在缺血后 48 h 达高峰,持续至 120 h,10 d 时减少;MMP-2 缺血后 24 h 开始增加,120 h 达高峰,10 d 时减少。Romanic 报道,大鼠局灶性脑缺血后 12 h MMP-9 明显增加,24 h 达高峰,持续至第 5 d,15 d 时表达消失;MMP-2 缺血后 24 h 明显增加,5 d 达高峰^[10]。国内学者报道,局灶性脑缺血 7 d MMP-2 开始减少。本研究结果与文献报道相似,不同之处在于 MMP-9 出现高峰推迟至 48 h,推测可能与缺血模型及损伤程度不同有关。

MMP 可在不同细胞表达。Fujimura 发现在正常星形胶质细胞中有 MMP-2 表达,缺血再灌注早期增加,并参与 BBB 的开放起始,缺血 5 d 和 21 d 有第二次增加,缺血区周边的细胞和坏死区残存的血管 MMP-2 染色强阳性;正常脑中无 MMP-9,缺血 24 h 血管和浸润的中性白细胞上可见 MMP-9 表达^[3]。Planas 发现,MMP-9 在神经元胞体、神经胶质细胞和内皮细胞表达,MMP-2 则在活化的小胶质细胞或星形胶质细胞中表达^[11]。而 Rosenberg 等将 MMP-9 定位在内皮细胞、嗜中性粒细胞和神经元上,MMP-2 定位在缺血区周围活化的星形胶质细胞中^[12]。本研究发现,MMP-2 和 MMP-9 阳性颗粒在神经细胞、小胶质细胞及少量内皮细胞均有表达,提示 MMP-2 和 MMP-9 与脑缺血后 BBB 通透性改变及血管发生损伤后组织修复等过程有关。

有研究表明,脑缺血再灌注后 MMP-9 表达增加与脑梗死面积密切相关。Gidday 等研究发现,MMP-9 基因敲除裸鼠脑梗死灶体积减小 34%,用 MMP-9 抑制剂治疗的 CD-1 小鼠脑梗死灶体积减小 28%^[13]。Romanic 等也发现,选择性 MMP-9 抑制剂能使大鼠脑梗死灶体积减小 30%^[10],提示抑制 MMP 的活性可能成为治疗缺血性脑血管病的途径。国内有学者报道,应用 HBO 可降低脑缺血再灌注损伤小鼠 MMP-9 活性,从而降低 BBB 的通透性^[4]。HBO 治疗大鼠持续性局灶性脑缺血使脑梗死灶体积减小是否与影响 MMP 有关,少见报道。本研究发现,HBO 组 MMP-9 免疫组化阳性细胞在 48—120 h 各时间点减少,但 MMP-2 免疫组化阳性细胞无明显变化。结合 HBO 组 120 h 和 10 d 梗死灶体积减小,推测 HBO 可能通过抑制 MMP-9 活化和维持血脑屏障完整性,抑制炎症反应,减轻脑水肿并减小梗死灶体积。

HBO 抑制持续性脑缺血大鼠 MMP-9 蛋白表达的

机制尚不清楚。MMP 的活性在转录、酶原活化和蛋白水解酶活性抑制三个水平上受到调节,受白细胞介素 1(interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、表皮生长因子、转化生长因子 β 、血管内皮生长因子等多种因素调节,HBO 抑制持续性脑缺血大鼠 MMP-9 蛋白表达是否与影响这些因素有关,有待于进一步探讨。

总之,全面了解 HBO 对 MMP 及其调节基因的作用,将为 HBO 的临床应用提供有利的理论依据。

[参考文献]

- [1] Veltkamp R, Warner DS, Domoki F, et al. Hyperbaric oxygen decreases infarct size and behavioral deficit after transient focal cerebral ischemia in rats[J]. Brain Res, 2000, 853: 68—73.
- [2] Neubauer RA, Gottlieb SF. Stroke treatment[J]. Lancet, 1991, 337(8757): 1601.
- [3] Fujimura M, Gasche Y, Morita-Fujimura Y, et al. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion[J]. Brain Res, 1999, 842(1): 92.
- [4] 刘华,廖维靖,杨万同,等.缺血性脑损伤基质金属蛋白酶-9 的表达与梗死面积研究[J].中国康复理论与实践,2003,9(10): 600—601.
- [5] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke, 1989, 20: 1037—1043.
- [6] 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.
- [7] 李金声,郭守一,刘立,等.高压氧对大鼠急性局灶性脑缺血再灌注损伤的影响[J].中华航海医学杂志,1999,6(2): 70—74.
- [8] Krakovsky M, Rogatsky G, Zarchin N. Effect of hyperbaric oxygen therapy on survival after global cerebral ischemia in rats[J]. Surg Neurol, 1998, 49(4): 412—416.
- [9] Hamann GF, Okaca Y, Del Zoppo GJ. Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1996, 16: 1373—1378.
- [10] Romanic AM, White RF, Arleth AJ, et al. Matrix metalloproteinase express increase after cerebral focal ischemia in rats: Inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size[J]. Stroke, 1998, 29(8): 1020—1030.
- [11] Planas AM, Sole S, Justicia C. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia[J]. Neurobiol Dis, 2001, 8(5): 834—846.
- [12] Rosenberg GA, Cunningham LA, Wallace J, et al. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures[J]. Brain Res, 2001, 893(1-2): 104—112.
- [13] Gidday JM, Gasche Y, Shah AR, et al. Reduction in cerebral vasogenic edema and infarct volume in MMP-9 null mice and following MMP-9 inhibition[J]. Society Neuroscience Abstracts, 2000, 26(1-2): 287. (收稿日期:2004-06-03)