

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.12.012

HBO 治疗对急性 CO 中毒后海马不同分区神经细胞凋亡的作用研究 *

薛 莉 李金声 李 娅 任 杰 谢小萍 常耀明 王文岚[△]

(第四军医大学航空航天医学系 陕西 西安 710032)

摘要 目的:通过研究高压氧(HBO)治疗急性 CO 中毒大鼠海马不同分区神经细胞凋亡情况,探讨 HBO 治疗急性 CO 中毒的应用及机理。**方法:**利用雄性 SD 大鼠,建立急性 CO 中毒模型。应用免疫组织化学以及免疫荧光的方法,测定在染毒和 CO 中毒 HBO 治疗后 1 d、3 d、7 d、14 d 和 21 d Bcl-2、caspase-3、NeuN、BAX 和 MMP-9 的表达水平的变化。**结果:**海马 CA3 区神经细胞对急性 CO 中毒与 HBO 治疗比 CA1 和 CA2 区更加敏感;急性 CO 中毒后,海马各区神经细胞凋亡程度随 1 d、3 d、7 d、14 d 和 21 d 时间延长而加重;BAX、caspase-3 和 Bcl-2 等凋亡相关因子的表达水平与 MMP-9 的变化趋势一致:在 1 d 开始增多,3 d 达到最大值,7 d 开始减少,14 d 与 21 d 与正常组类似;CO 中毒大鼠进行 HBO 治疗后,海马各区 MMP-9、BAX、caspase-3 和 Bcl-2 的表达水平明显降低;且 HBO 治疗 7 d 后,海马各区这些凋亡相关因子的表达降低最为明显。**结论:**海马 CA3 区神经细胞对急性 CO 中毒及 HBO 治疗敏感;海马神经细胞凋亡可能与神经细胞表达 MMP-9 降解神经细胞周围的基质,表达 BAX、caspase-3 和 Bcl-2 等凋亡相关因子促进凋亡发生有关;HBO 治疗可降低 MMP-9 以及 BAX、caspase-3 和 Bcl-2 等凋亡因子的表达,抑制神经细胞的凋亡;HBO 治疗 7d 对神经细胞凋亡的抑制作用最明显。

关键词:高压氧治疗;急性一氧化碳中毒;基质金属蛋白酶-9;神经细胞凋亡

中图分类号:Q95-3;R595.1;R459.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)12-2245-06

Effects of HBO Therapy on Neuronal Apoptosis of Rat Hippocampus after Acute CO Poisoning *

XUE Li, LI Jin-sheng, LI Ya, REN Jie, XIE Xiao-ping, CHANG Yao-ming, WANG Wen-lan[△]

(Department of Aerospace Medicine, the Fourth Military University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects and mechanism of hyperbaric oxygen (HBO) therapy on neuronal apoptosis in different hippocampal areas after acute carbon monoxide (CO) poisoning. **Methods:** The animal model of acute CO poisoning was established. Then the SD rats were treated with hyperbaric oxygen therapy. Immunohistochemistry and immunofluorescence were used to determine the expression levels of Bcl-2, caspase-3, NeuN, MMP-9 and BAX at 1 d, 3 d, 7 d, 14d and 21 d. **Results:** Neurons of CA3 area were more sensitive than those of CA1 and CA2 after acute CO poisoning and HBO therapy; after acute CO poisoning, the apoptosis of hippocampal neurons was aggravated at 1d, 3d, 7d, 14d and 21d with prolonged days. The expressions of BAX, caspase-3 and Bcl-2 regulating neuronal apoptosis were consistent with the level of MMP-9: it began to increase at 1 d, reached to the maximum at 3d, started to decrease at 7d, and it was similar to the normal control group at 14 d and 21 d; for the CO poisoning rats treated with HBO therapy, the expressions of MMP-9, caspase-3, BAX and Bcl-2 in hippocampus were obviously decreased. On day 7, the inhibitory effect of HBO therapy was the most obvious. **Conclusions:** Neurons of hippocampal area CA3 is more sensitive than CA1 and CA2 for the treatment of acute CO poisoning and HBO; the apoptosis may be related with matrix degradation of MMP-9 and the pro-apoptosis function of BAX, caspase-3 and Bcl-2; HBO therapy can reduce the expressions of MMP-9 and BAX, caspase-3 and Bcl-2, then inhibit neuronal apoptosis.

Key words: HBO therapy; Carbon monoxide poisoning; MMP-9; Neuronal apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R595.1; R459.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)12-2245-06

前言

基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinases-9, MMP-9) 通过对细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分的降解,破坏细胞-基质间相互作用,诱导神经细胞死亡,以及髓鞘脱失,白质损伤^[1]。急性一氧化碳(carbon monoxide, CO)中毒可引起

小鼠海马神经细胞凋亡^[2]。大鼠海马皮层分为 CA1、CA2、CA3 和 CA4 区,CA4 紧邻齿状回,CA1 与下托相连接^[3]。高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)预处理能够通过降低 MMP-2 与 MMP-9 的表达量,减轻神经功能缺损^[5,6]。在我们初步的研究中发现,在急性一氧化碳中毒后,大鼠大脑皮层和海马区的神经细胞都发生了凋亡现象,在海马区的凋亡现象与 MMPs 家族的

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81101466)

作者简介:薛莉(1987-),女,硕士研究生,主要研究方向:脑疾病与航空航天医学, E-mail:chgo001baxia@163.com

△ 通讯作者:王文岚,电话:029-84774822-804, E-mail:kyafwqs@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2014-10-09 接受日期:2014-10-22)

表达有关^[7]。为了更好的研究此种凋亡现象发生的部位和急性一氧化碳中毒后迟发性脑病的发生机理,我们详细研究了急性CO中毒以及HBO治疗后不同时间、海马不同分区的细胞凋亡程度和MMP-9的表达关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和分组 成年健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 90 只,由第四军医大学实验动物中心提供,清洁级,体重(190±10)g,合格证编号为 SCXK(军)2002005。实验期间动物自由进食进水。预饲养 7 d 后,随机分为三组:正常对照组 (Normal control, NC 组,未进行任何处理),急性 CO 中毒组 (Carbon monoxide poisoning, CO 组,分为 1 d、3 d、7 d、14 d、21 d 组)和染毒后 HBO 治疗 (Hyperbaric oxygen therapy, HBO 组,分为 1 d、3 d、7 d、14 d、21 d 组);每组每个时间点 6 只动物。

1.1.2 实验仪器和试剂 上海 DWC450-1150 型动物实验舱; Olympus BX51 双目显微镜;莱卡 CM1900 冰冻切片机;兔抗大鼠 NeuN 多克隆抗体 (Millipore, ABN78);小鼠抗 MMP-9 单克隆抗体 (Millipore, IM37);兔抗 Bcl-2 单克隆抗体 (Millipore, AB1722);小鼠抗 caspase-3 多克隆抗体 (abcam, AB47131);小鼠抗 Bax 单克隆抗体 (Santa cruz, sc7480);生物素化羊抗兔 IgG;生物素化羊抗鼠 IgG;SABC 免疫组化染色试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 急性一氧化碳中毒模型 建立急性 CO 中毒模型 (参照 Stephen 等^[8]的方法)。将清醒大鼠置于动物实验高压氧舱内 (每次 6 只),加入 1000 ppm CO 浓度下染毒 40 min,追加 2000 ppm CO 后继续染毒 20 min (染毒过程中随时观察),20 min 后开舱,通空气。染毒组于染毒后 1 d、3 d、7 d、14 d、21 d 分别取材。

1.2.2 高压氧治疗方案 参照任杰等^[9]的方法对急性 CO 中毒的大鼠进行高压氧治疗,每天治疗 1 次,分别治疗 1 d、3 d、7 d、14 d、21 d。治疗过程:20 min 内表压升至 0.15 MPa,稳压吸氧 1 h,20 min 内减至常压后大鼠出舱。治疗结束后取材。

1.2.3 标本制作和切片 对各组大鼠进行麻醉,腹腔注射戊巴比妥钠 (20 g/L, 60 mg/kg 体重)。暴露胸腔,用生理盐水 (9 g/L, 200 mL) 经左心室灌注冲洗 10 min,再用多聚甲醛 (4%, 300 mL) 缓慢灌注 30 min,剥离取脑。将取出的脑组织浸入多聚甲醛 (4%) 中固定 4-6 h。固定好的材料转入 30% 蔗糖溶液中脱水。冰冻切片,片厚 10 μm, -20℃ 保存。

1.2.4 HE 染色 石蜡切片脱蜡至水洗,其具体步骤为:二甲苯 I 10 min,二甲苯 II 10 min,纯酒精 1 min,80%酒精 1 min,70%酒精 1 min,自来水洗 5 min。而后常规 H-E 染色,具体步骤为:苏木精 3 min,自来水洗 1 min,盐酸酒精分化 20 s,自来水洗 5 min,蒸馏水洗 1 min,伊红 2 min,自来水洗 3 min,85%酒精 30 s,90%酒精 30 s,95%酒精 I 1 min,95%酒精 II 1 min,纯酒精 I 2 min,纯酒精 II 2 min,二甲苯 I 2 min,二甲苯 II 2 min,二甲苯 III 2 min,中性树脂封片。

1.2.5 免疫组织化学染色 检测 1 d、3 d、7 d、14 d、21 d MMP-9、Bcl-2、BAX、caspase-3 的表达变化。免疫组化步骤包括:PBS 漂洗;封闭;加入适当稀释的一抗 (MMP-9 抗体稀释为

1:500, Bcl-2 抗体稀释为 1:3000, caspase-3 抗体稀释为 1:6000, BAX 抗体稀释为 1:1000); 4℃ 冰箱孵育过夜;加生物素化二抗和 ABC 复合物孵育;DAB 加硫酸镍铵显色。

1.2.6 免疫荧光双标染色 检测 1 d、3 d、7 d、14 d、21 d 时间组中 MMP-9 与 NeuN 在海马的表达变化和定位。步骤包括:PBS 漂洗;封闭;同时加入两种适当稀释的一抗 (MMP-9 抗体稀释为 1:500, NeuN 抗体稀释为 1:1000)。

1.2.7 统计学分析 免疫组化染色对每个部位选 6 个高倍视野计数其阳性细胞 (包括 MMP-9、Bcl-2、BAX、caspase-3 染色的阳性细胞)。采用 SPSS17.0 软件包进行统计学处理,计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 海马区神经细胞凋亡程度观察

HE 染色后可以看出:正常组,神经细胞呈圆形或椭圆形,核膜完整,核仁清晰可见,细胞核呈淡蓝色,细胞层厚度正常,细胞排列紧密,形态正常。染毒 (CO 中毒) 组,神经细胞凋亡情况在 7 d 最严重,出现大量变性、坏死的神经元,主要表现为神经元胞体皱缩,细胞周围出现空隙,胞浆呈强烈嗜伊红,核仁深染偏位,甚至发生核固缩,胞质与胞核凝结在一起,界限不清,出现红色细胞或黑色细胞。高压氧治疗 (HBO) 组,在 7 d 恢复明显,随治疗时间延长,治疗效果越好;在 14 d,大部分神经细胞的形态正常。这说明 CO 中毒能够造成神经细胞凋亡, HBO 对 CO 中毒所致的神经细胞凋亡有治疗效果。见图 1。

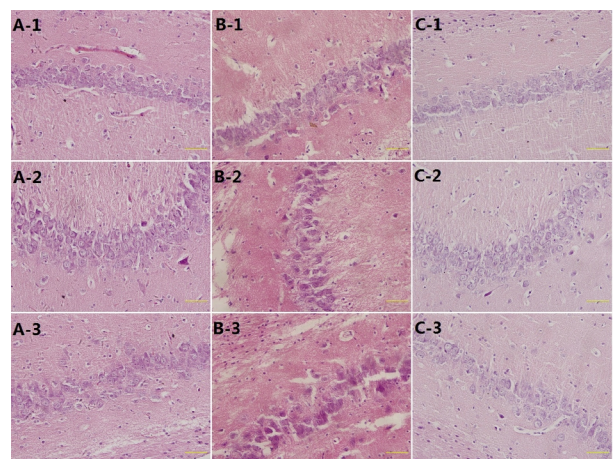


图 1 7d 组大鼠海马不同区 HE 染色 (400×)

Fig.1 H-E staining of CA1, CA2 and CA3 in 7d group rats (400×)

注:A-1 为 NC 组 CA1, A-2 为 NC 组 CA2, A-3 为 NC 组 CA3; B-1 为 CO 组 CA1, B-2 为 CO 组 CA2, B-3 为 CO 组 CA3; C-1 为 HBO 组 CA1, C-2 为 HBO 组 CA2, C-3 为 HBO 组 CA3

Note: A-1, A-2, A-3 represents the CA1, CA2, CA3 in NC group, respectively; B-1, B-2, B-3 represents the CA1, CA2, CA3 in CO group, respectively; C-1, C-2, C-3 represents the CA1, CA2, CA3 in HBO group, respectively.

2.2 正常大鼠海马 CA1、CA2 及 CA3 区 MMP-9 的表达定位

用免疫组化染色观察发现,在正常的大鼠海马 CA1、CA2、CA3 区, MMP-9 表达量都非常小,能够被染色的细胞数目非常少。见图 2。

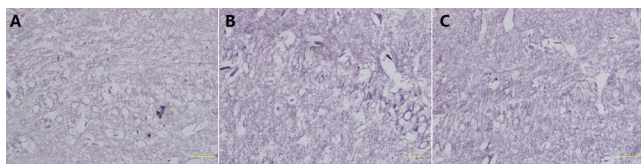


图2 正常大鼠海马 CA1、CA2 和 CA3 区 MMP-9 的表达(400×)

Fig.2 MMP-9 expression of CA1, CA2 and CA3 in normal control rats (400×)

注:A 为 CA1 区,B 为 CA2 区,C 为 CA3 区。

Note: A: CA1; B: CA2; C: CA3.

2.3 急性 CO 中毒和 HBO 治疗前海马 CA1、CA2 及 CA3 区 MMP-9 的表达变化

在 CO 中毒组,从 1 d 就能够看出,在 CA1 和 CA2 部位, MMP-9 表达和凋亡细胞都比正常对照组多,比 CA3 少;在 CA3 区,能够表达更多的 MMP-9,能够被染色的细胞数目比其他两个部位多;MMP-9 的表达随着中毒时间延长而增多,表达

MMP-9 的细胞数目也增多;CA3 区,CO 中毒后 1 d、3 d 和 7 d, MMP-9 的表达均呈现增多,其中 3 d 最多($P<0.05$)(表 1,图 3 A-1, B-1, C-1)。

在 HBO 组,与 CO 组相比,海马每个区的 MMP-9 的表达都降低,尤其以 CA3 区降低明显($P<0.05$)(表 1,图 3 A-2, B-2, C-2)。

推测 CO 中毒后 MMP-9 的表达与神经细胞的活性有关,在 3 d 组,虽然有凋亡现象发生,但不明显,因此表达出了最多的 MMP-9;7 d 组由于 MMP-9 和其他相关因子的作用,降解了神经细胞周围的基质,使得凋亡程度严重,活性已受到严重损伤,不能再表达出更多的 MMP-9;此外,由于 MMP-9 定位在细胞膜上,MMP-9 的作用使得细胞膜破裂,致使神经细胞最终凋亡。也可以看出,高压氧治疗对 MMP-9 的表达有抑制作用,在治疗 1 d 时就有非常明显的效果,尤其是治疗 7 d 时,海马 MMP-9 的表达已几乎与正常一致。见表 1。

表 1 急性 CO 中毒和 HBO 治疗前海马不同分区 MMP-9 的表达比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Table 1 Comparison of expression levels of MMP-9 in CO group and HBO group in CA1, CA2 and CA3($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Group		1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
NC	CA1	5.0± 1.5811	5.2± 1.3038	4.6± 1.1402	5.8± 1.4832	4.8± 0.8367
	CA2	5.8± 1.3038	6.6± 1.1402	6.0± 1.5811	6.6± 1.8166	5.6± 1.6733
	CA3	5.4± 1.1402	5.6± 0.8944	6.2± 1.3038	6.4± 1.6733	5.6± 1.5166
CO	CA1	18.0± 2.2361*	22.4± 2.0736*	10.8± 1.4832*	6.0± 2.2361	4.6± 1.5166
	CA2	14.4± 1.6733*	16.6± 2.3021*	15.8± 1.9235*	5.6± 1.3416	6.2± 1.9235
	CA3	44.2± 4.8683*	61.6± 4.3359*	46.8± 3.9623*	5.2± 1.3038	6.2± 1.4832
HBO	CA1	3.4± 1.1402 [△]	9.6± 2.4083 ^{△#}	5.8± 1.3038 [△]	4.0± 1.5811	5.2± 1.9236
	CA2	14.2± 1.4697 [#]	8.4± 1.6733 ^{△#}	5.0± 1.5811 [△]	5.8± 1.3038	5.4± 1.5166
	CA3	14.4± 1.6733 ^{△#}	12.8± 1.4832 ^{△#}	6.4± 1.6733 [△]	6.4± 0.8944	5.4± 1.6733

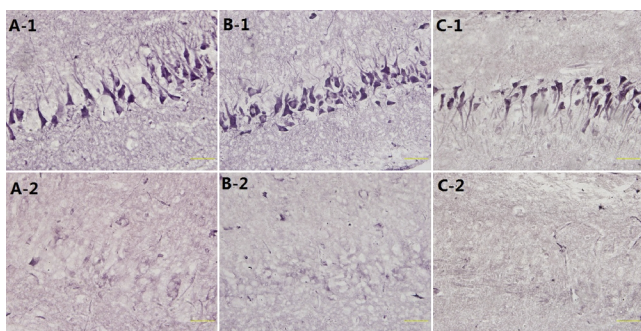
注:与 NC 组比较:* $P<0.05$;与 CO 组比较:[△] $P<0.05$;与 NC 组比较,[#] $P<0.05$ 。Note: Comparison with NC group:* $P<0.05$; Comparison with CO group: [△] $P<0.05$; Comparison with NC group:[#] $P<0.05$.

图3 急性 CO 中毒和 HBO 治疗后 1 d、3 d 和 7 d 大鼠海马 CA3 区 MMP-9 的表达(400×)

Fig.3 MMP-9 expression level of CA3 at 1 d, 3 d and 7 d of CO and HBO groups(400×)

注:A-1 为 CO 中毒 1 d 组,A-2 为 HBO 1 d 组;B-1 为 CO 中毒 3 d 组, B-2 为 HBO 3 d 组;C-1 为 CO 中毒 7 d 组,C-2 为 HBO 7 d 组

Note: A-1, B-1, C-1 represents the 1 d, 3 d and 7 d in CO group, respectively; A-2, B-2, C-2 represents the 1 d, 3 d and 7 d in HBO group, respectively

2.4 海马不同分区 MMP-9 与神经细胞活性变化的关系

用 MMP-9 与 NeuN 免疫荧光双标染色,观察 MMP-9 与神经细胞之间的关系,可以发现:在 CA1 和 CA2 区,无论神经细胞活性怎样,MMP-9 的表达均非常少,与免疫组化结果一致。在 CA3 区,随着时间的延长,CO 中毒后神经细胞凋亡程度越来越严重,MMP-9 的表达在 1 d、3 d 和 7 d 时均很高(图 4 B-1, C-1, D-1);在 14 d 和 21 d 时,可以看到大量神经细胞由于细胞内物质降解,导致染色后出现明显空腔,进而发生细胞死亡(图 4 E-2, F-2),MMP-9 表达非常少(图 4 E-1, F-1),趋势与神经细胞死亡一致。此外,也可以看出 MMP-9 的表达在 3 d 最多,之后越来越少(图 4 A-1, B-1, C-1, D-1, E-1, F-1)。经过 HBO 治疗的大鼠(图 5),CA3 区 MMP-9 的表达均非常少,尤其在 7 d 最明显,几乎与正常大鼠一致,这说明经过 7 d 的 HBO 治疗,对抑制 CO 中毒后神经细胞凋亡有非常明显的效果(图 5)。

2.5 海马不同分区 MMP-9 与 Bcl-2、BAX、caspase-3 的表达变化关系

观察 7 d 组,可以看到:在正常对照组,不论是 CA1 区、CA2 区还是 CA3 区,MMP-9 的表达都非常少,Bcl-2、BAX 和

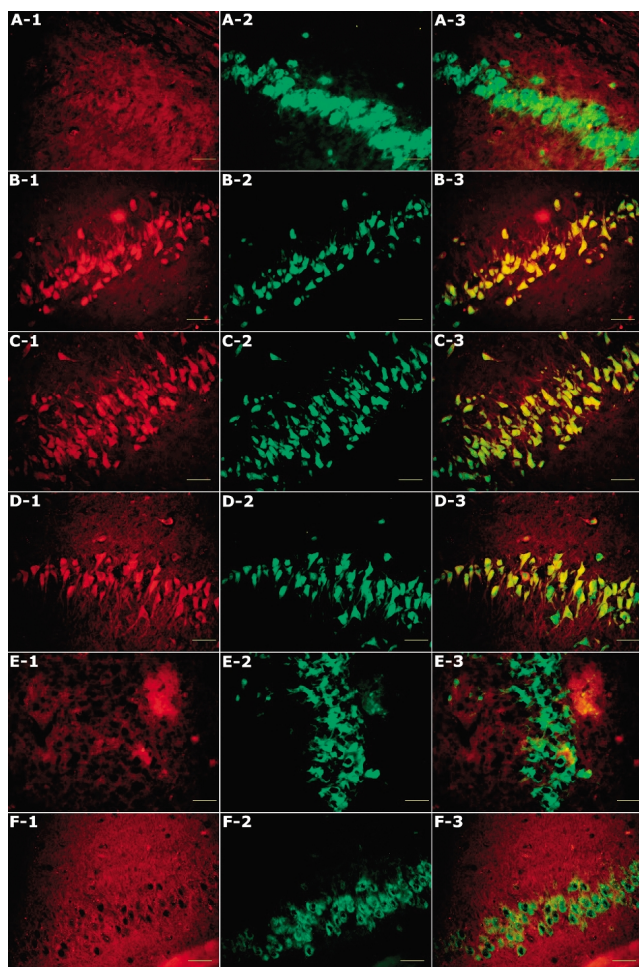


图4 急性CO中毒大鼠海马CA3区MMP-9在不同时间的表达
(400×)

Fig.4 MMP-9 expression level of CA3 at different time points after acute CO poisoning (400×)

注:其中红色为MMP-9,绿色为NeuN,双色为Merge。A为NC组,B为CO中毒1d组,C为CO中毒3d组,D为CO中毒7d组,E为CO中毒14d组,F为CO中毒21d组)。

Note: Red is MMP-9, Green is NeuN, Double colored is Merged. A is NC group; B-F represents the group of 1 d, 3 d, 7 d, 14 d, 21 d, respectively after acute CO poisoning.

caspase-3 表达也非常少,几乎没有(图6 A-1, B-1, C-1; 表2)。

当CO中毒后,CA1区和CA2区,Bcl-2和caspase-3表达与正常对照组无显著差异;BAX表达增多明显,与正常对照组有显著差异($P<0.05$);MMP-9表达增多明显,与正常对照组有显著差异($P<0.05$)。在CA3区,与正常对照组相比,MMP-9、Bcl-2、BAX和caspase-3表达均增多明显,与正常对照组相比均有显著差异($P<0.05$)(图6 A-2, B-2, C-2; 表1, 表2)。可以看出CO中毒后,CA3区神经细胞比CA1和CA2区更敏感;CO中毒能够造成海马神经细胞凋亡发生。

对CO中毒大鼠进行HBO治疗后,CA1区和CA2区,与CO中毒组比较Bcl-2和caspase-3表达有所降低,但差异没有统计学意义($P>0.05$);BAX降低明显,与CO中毒组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。在CA3区,MMP-9表达比CO中毒组降低明显($P<0.05$),最后几乎与正常对照组无差别($P>0.05$);

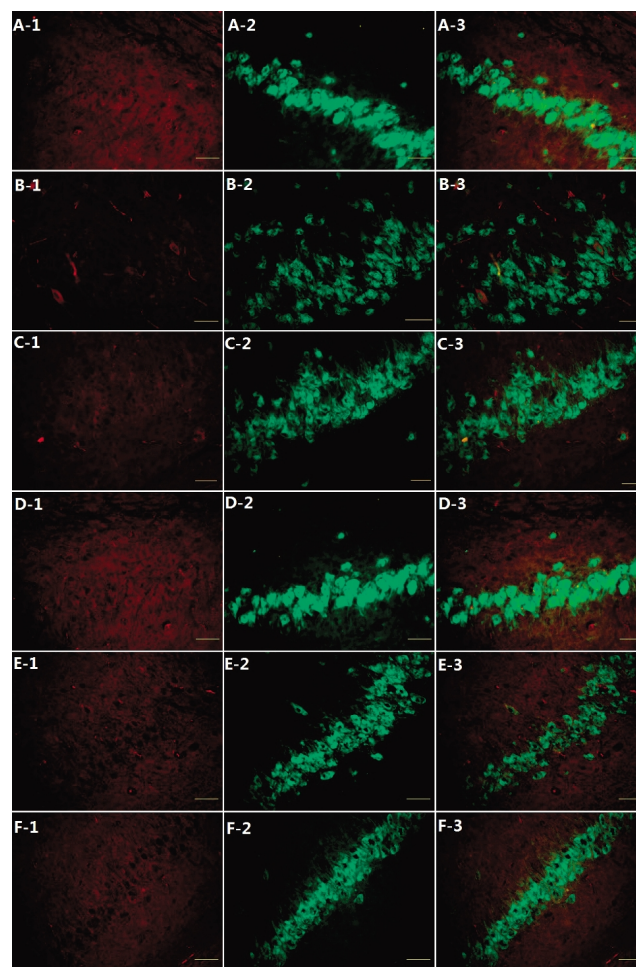


图5 HBO治疗后大鼠海马CA3区MMP-9在不同时间的表达(400×)

Fig.5 MMP-9 expression level of CA3 at different time points in HBO group(400×)

注:其中红色为MMP-9,绿色为NeuN,双色为Merge。A为NC组,B为HBO治疗1d组,C为HBO治疗3d组,D为HBO治疗7d组,E为HBO治疗14d组,F为HBO治疗21d组)

Note: Red is MMP-9, Green is NeuN, Double colored is Merged. A is normal control group; B-F represents the group of 1 d, 3 d, 7 d, 14 d, 21 d, respectively after HBO therapy

Bcl-2、BAX和caspase-3表达比CO中毒组降低明显,有显著差异($P<0.05$),与正常对照组无显著差异($P>0.05$)(图6 A-3, B-3, C-3; 表2)。可以看出经过7d的高压氧治疗后,对抑制神经细胞凋亡的产生有非常明显的效果。

3 讨论

在中枢神经系统中,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)保持中枢神经系统结构的完整性,参与细胞增殖、分化和迁移等过程,处于产生和降解的动态平衡。已有研究表明,细胞外基质在脑创伤的急性期被破坏,在恢复期重塑^[10]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)通过对ECM成分的降解,影响了ECM降解与重组的动态平衡^[11]。MMP-9是基质金属蛋白酶家族重要的成员之一,与MMP-2同属于明胶酶,能够降解IV型胶原^[10]。MMP-9敲除的小鼠能够抵抗创伤性的脑损伤,以

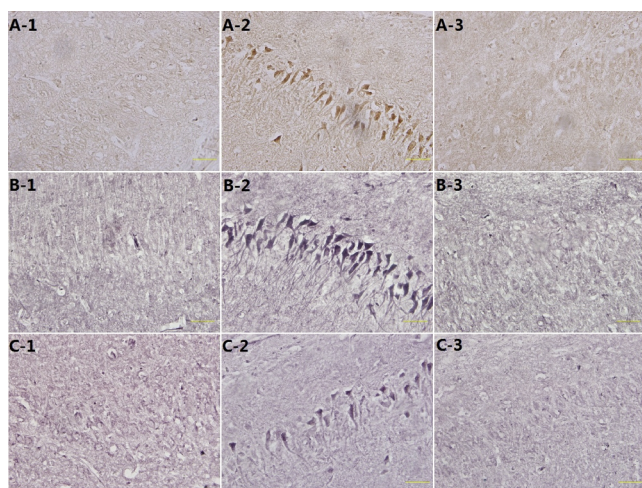


图 6 不同组大鼠海马 CA3 区 BAX、Bcl-2 和 caspase-3 的表达(400×)
Fig. 6 Expressions of BAX, Bcl-2, caspase-3 of CA3 in different groups (400×)

注:其中 A-1 为 NC 组 Bcl-2 表达,A-2 为 CO 组 Bcl-2 表达,A-3 为 HBO 组 Bcl-2 表达。B-1 为 NC 组 BAX 表达,B-2 为 CO 组 BAX 表达,B-3 为 HBO 组 BAX 表达。C-1 为 NC 组 caspase-3 表达,C-2 为 CO 组 caspase-3 表达,C-3 为 HBO 组 caspase-3 表达
Note: A-1, A-2, A-3 represents the expression of Bcl-2 in normal control, CO poisoning and HBO group, respectively; B-1, B-2, B-3 represents the expression of BAX in normal control, CO poisoning and HBO group, respectively; C-1, C-2, C-3 represents the expression of caspase-3 in normal control, CO poisoning and HBO group, respectively.

及中枢和周围神经系统的脑局部缺血^[12]。TIMPs 对脑损伤后神经细胞凋亡有抑制作用,能够使大鼠弥漫性轴索损伤后海马区脑组织中的 MMP-9 表达下降^[13]。有大量实验证明,永久或短暂性脑缺血后,病变区 MMP-2 与 MMP-9 表达增加,同时有 ECM 中的片蛋白、纤维连接蛋白与 IV 型胶原的消失、毛细血管通透性增加,注射 Evans 蓝可见外溢^[14-16]。缺血后 3~4 h 缺血区 MMP-9 表达开始增加,12 h 明显增高,4~5 d 达到高峰,一直持续到缺血后 15 d 表达恢复至基础水平^[17,18]。

已有研究表明,急性 CO 中毒可引起小鼠大脑皮质、海马、纹状体等部位脑细胞凋亡,凋亡情况在中毒 3 天后明显增加,5~7 天达到高峰,14 天后恢复正常^[3,19]。神经行为学研究和免疫组织荧光染色发现,在全脑缺血后 72 小时,神经细胞凋亡增加^[20]。核磁共振发现,神经细胞凋亡的发生机制可能与神经细胞脱髓鞘改变有关^[21],髓磷脂碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)是髓鞘的主要成分,是 MMP-9 的作用底物^[22],MMP-9 特异性的降解 MBP,对其他髓鞘蛋白 PLP 和 DM20 无降解作用,在 MMP-9 敲除的基因鼠脑缺血后 MBP 降解显著的减少^[23]。脑创伤后 MMP-9 活性升高,可降解 MBP,以致髓鞘脱失,白质损伤,脑功能损害^[24]。Yoshiteru 等^[25]对高压氧预处理 5d 的大鼠,使用 50 % 的葡萄糖进行急性高血糖诱导后缺血再灌注,结果发现高压氧预处理能够通过降低 HIF-1 α 、MMP-2 与 MMP-9 的表达量,减轻高血糖造成的神经功能缺损,心肌梗塞量和出血量。Ostrowski 等^[26]研究发现,高压氧预处理能够减少全脑缺血后的神经细胞死亡。

从以上结果可以看出,现阶段对大鼠脑创伤后神经细胞损伤的研究处于起步阶段。在急性 CO 中毒后,大鼠海马详细分区神经细胞凋亡的研究尚不明确;HBO 治疗对急性 CO 中毒后海马神经细胞的调节作用研究也不清楚。因此,本研究基于以上研究结果,对急性 CO 中毒以及 HBO 治疗后,大鼠海马各区神经细胞的情况与基质之间的相互作用进行了比较深入的研究。可以得出以下结果:

第一,急性 CO 中毒后,神经细胞的变化在 CA3 区比 CA1 和 CA2 区明显,无论是 Bcl-2、caspase-3、BAX,还是 MMP-9、NeuN,在海马 CA1 和 CA2 区的表达变化都不明显,而在 CA3 区表达变化非常明显,HBO 治疗对 CA3 区也有更明显的效果。因此推测:海马 CA3 区神经细胞对急性 CO 中毒与高压氧治疗反应比 CA1 和 CA2 区更加敏感。

第二,荧光染色可以看出急性 CO 中毒后,神经细胞形态随 1 d、3 d、7 d、14 d 和 21 d 时间延长,越来越不清晰,细胞活性越来越低。在 14 d、21 d,神经细胞形成空腔,细胞膜形态模糊。因此推测:急性 CO 中毒后,海马各区神经细胞随 1 d、3 d、

表 2 大鼠 7d 组海马 CA1、CA2 和 CA3 区 Bcl-2、BAX、caspase-3 的表达变化关系($\bar{x} \pm s$, n=6)

Table 2 Comparison of expression levels of Bcl-2, BAX and caspase-3 of CA1, CA2 and CA3 in 7d group ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Group		NC	CO	HBO
Bcl-2	CA1	3.0 $\pm$ 0.7071	3.8 $\pm$ 1.3038	3.0 $\pm$ 1.0000
	CA2	1.8 $\pm$ 0.8367	4.2 $\pm$ 1.6431	3.0 $\pm$ 1.4142
	CA3	2.2 $\pm$ 1.3038	42.8 $\pm$ 2.1679*	2.0 $\pm$ 0.7071 Δ
BAX	CA1	2.6 $\pm$ 1.1402	12.8 $\pm$ 2.5884*	9.2 $\pm$ 1.3038 $\Delta\#$
	CA2	3.2 $\pm$ 1.3038	13.2 $\pm$ 1.4832*	6.8 $\pm$ 1.4832 $\Delta\#$
	CA3	1.8 $\pm$ 0.8367	70.4 $\pm$ 2.3022*	5.2 $\pm$ 0.8367 $\Delta\#$
Caspase-3	CA1	5.6 $\pm$ 1.1402	8.6 $\pm$ 1.1402	6.4 $\pm$ 1.1402
	CA2	7.4 $\pm$ 1.1402	8.6 $\pm$ 1.1402	6.2 $\pm$ 1.3038
	CA3	3.8 $\pm$ 0.8367	26.6 $\pm$ 1.8166*	5.4 $\pm$ 1.1402 Δ

注:与 NC 组比较,* P<0.05;与 CO 组比较, Δ P<0.05;与 NC 组比较,# P<0.05。

Note: Compared with NC group: * P<0.05; Compared with CO group: Δ P<0.05; Compared with NC group: # P<0.05.

7 d、14 d 和 21 d 时间延长,凋亡程度加重。

第三,急性 CO 中毒后,海马各区尤其是 CA3 区,MMP-9 的表达在 1 d 就出现,在 3 d 达到高峰,7 d 开始降低,至 14 d 和 21 d 降低到更低的水平。同时,可以看到 caspase-3、BAX、Bcl-2 的表达趋势与 MMP-9 一致,在 3 d 达到高峰,7 d 开始降低,至 14 d 和 21 d 降低到更低的水平。这种降低与神经细胞的活性相关。前期的研究结果显示:在急性 CO 中毒后,MMP-9 表达除了总体增高外,胞质内非激活型 pro-MMP-9 向胞膜上激活型 MMP-9 转化,降解细胞基质,造成神经细胞脱髓鞘,最终导致神经细胞凋亡^[7]。因此推测:在前期(如 1 d、3 d、7 d 时)神经细胞活性较好,细胞能够表达较多的 MMP-9 (包括非激活型 pro-MMP-9 向胞膜上激活型 MMP-9),有更多的 MMP-9 锚定在细胞膜上;后期神经细胞周围基质降解,凋亡发生,细胞膜降解,神经细胞活性因此降低直至消失;神经细胞凋亡程度严重后,细胞已不能维持原本的功能,也就不能表达更多的蛋白,如 MMP-9、caspase-3、BAX、Bcl-2 等。

第四,经过 HBO 治疗后,与 CO 中毒组相比,同一时间组的神经细胞空腔出现更少,细胞染色活性更好。因此推测:HBO 治疗能够减轻 CO 中毒后神经细胞凋亡发生。

第五,经过 HBO 治疗后,与 CO 中毒组相比,细胞凋亡相关蛋白,如 MMP-9、caspase-3、BAX、Bcl-2 等的表达降低非常明显,尤其以 CA3 区最明显。与 CO 中毒组相比,随 HBO 治疗时间由 1 d、3 d、7 d 延长至 14 d、21 d,这些蛋白的表达水平也随之降低;在 HBO 治疗 1 d 和 3 d 时,各蛋白表达明显比 CO 组低,但仍比正常对照组高,在治疗 7 d 时,这些蛋白的表达水平已与正常对照组水平相差不多。因此推测:HBO 对急性 CO 中毒后的治疗,可能是通过抑制凋亡相关蛋白 MMP-9、caspase-3、BAX、Bcl-2 等的表达,进而抑制神经细胞的凋亡。同时,HBO 治疗 7 d 时对急性 CO 中毒后海马神经细胞凋亡的治疗效果最明显。

综合实验结果可以看出,海马 CA3 区神经细胞对急性 CO 中毒与高压氧治疗反应比 CA1 和 CA2 区更加敏感;急性 CO 中毒后,海马各区神经细胞随 1 d、3 d、7 d、14 d 和 21 d 时间延长,凋亡程度加重;caspase-3、BAX 和 Bcl-2 等凋亡相关因子调节神经细胞凋亡的发生;MMP-9 的表达水平与神经细胞凋亡程度有关;HBO 治疗能够减轻 CO 中毒后神经细胞凋亡发生,这种作用可能是通过抑制凋亡相关蛋白 MMP-9、caspase-3、BAX、Bcl-2 等的表达,进而抑制神经细胞的凋亡。同时,HBO 治疗 7 d 时对急性 CO 中毒后海马神经细胞凋亡的治疗效果最明显。

参考文献(References)

- [1] Dornbos D, 3rd, Ding Y. Mechanisms of neuronal damage and neuroprotection underlying ischemia/reperfusion injury after physical exercise[J]. *Curr Drug Targets*, 2012, 13(2): 247-262
- [2] Hill JW, Poddar R, Thompson JF, et al. Intracellular matrix metalloproteinases promote DNA damage and apoptosis induced by oxygen-glucose deprivation in neurons [J]. *Neuroscience*, 2012, 220 (18): 277-290
- [3] Piantadosi CA, Zhang J, Levin ED, et al. Apoptosis and delayed neuronal damage after carbon monoxide poisoning in the rat [J]. *Exp Neurol*, 1997, 147(1): 103-114
- [4] 罗焕敏. 海马结构 - 从形态、功能到可塑性、衰老性变化[J]. *神经解剖学杂志*, 1996, 12(2): 177-184
- [5] Luo Huan-min. Structure analyzing of hippocampus-changes from statue, function to plasticity and debilitating [J]. *Journal of Neurotomy*, 1996, 12(2): 177-184
- [5] Veltkamp R, Bieber K, Wagner S, et al. Hyperbaric oxygen reduces basal lamina degradation after transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *Brain Res*, 2006, 1076(1): 231-237
- [6] Soejima Y, Hu Q, Krafft PR, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates hyperglycemia-enhanced hemorrhagic transformation by inhibiting matrix metalloproteinases in focal cerebral ischemia in rats [J]. *Exp Neurol*, 2013, 247(11): 737-743
- [7] 薛莉,王文岚,岳荣,等. MMP-9 在高压氧治疗急性一氧化碳中毒脑损伤中的作用[J]. *中国急救医学*, 2013, 33(10): 933-937
- [7] Xue Li, Wang Wen-lan, Yue Rong, et al. Effective learning of MMP-9 in the hyperbaric oxygen therapy of brain injury after acute carbon monoxide poisoning [J]. *Chinese Journal of Emergency Medicine*, 2013, 33(10): 933-937
- [8] Thom SR, Bhopale VM, Fisher D, et al. Delayed neuropathology after carbon monoxide poisoning is immune-mediated [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(37): 13660-13665
- [9] 任杰,常耀明,李金声,等. 高压氧促进大鼠弥漫性轴突损伤后学习记忆功能恢复的实验研究 [J]. *第四军医大学学报*, 2002, 23(12): 1145-1149
- [9] Ren Jie, Chang Yao-ming, Li Jin-sheng, et al. Effect of hyperbaric oxygen improving learning and memory for rats with diffuse axonal injury[J]. *Journal of Forth Military Medical University*, 2002, 23(12): 1145-1149
- [10] Lo EH, Wang X, Cuzner ML. Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases[J]. *J Neurosci Res*, 2002, 69(1): 1-9
- [11] Lee JH, Piao MS, Choi JY, et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 and matrix metalloproteinases-2 and -9 in cutaneous squamous cell carcinoma: active role of inflammation and tissue remodeling in carcinogenesis[J]. *Ann Dermatol*, 2013, 25(2): 145-151
- [12] Wang X, Jung J, Asahi M, et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on morphological and motor outcomes after traumatic brain injury[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(18): 7037-7042
- [13] Tejima E, Guo S, Murata Y, et al. Neuroprotective effects of overexpressing tissue inhibitor of metalloproteinase TIMP-1 [J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(11): 1935-1941
- [14] 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
- [15] Zhang H, Chang M, Hansen CN, et al. Role of matrix metalloproteinases and therapeutic benefits of their inhibition in spinal cord injury[J]. *Neurotherapeutics*, 2011, 8(2): 206-220
- [16] Brezillon S, Pietraszek K, Maquart FX, et al. Lumican effects in the control of tumour progression and their links with metalloproteinases and integrins[J]. *FEBS J*, 2013, 280(10): 2369-2381

- Braz Oral Res, 2009, 23(3): 296-301
- [7] 张晓蓉,王小燕,闫亮.窝沟封闭术联合氟保护漆在预防儿童龋齿中的疗效观察[J].重庆医学, 2013, 42(18): 2125-2126
- Zhang Xiao-rong, Wang Xiao-yan, Yan Liang. Effects of pit and fissure sealant joint fluor protector on the prevention of childhood caries[J]. Chongqing medical, 2013, 42(18): 2125-2126
- [8] 招顺秀,李业荣,许碧晖.多乐氟预防固定正畸矫治中牙釉质脱矿的临床研究[J].广东牙病防治, 2013, 21(08): 441-443
- Zhao Shun-xiu, Li Ye-rong, Xu Bi-hui. Effect of Duraphat in prevention of enamel demineralization in orthodontic treatment with fixed appliances [J]. Journal of Dental Prevention and Treatment, 2013, 21(08): 441-443
- [9] Pessan JP, Pin MLG, Martinhon CCR, et al. Analysis of fingernails and urine as biomarkers of fluoride exposure from dentifrice and varnish in 4-to 7-year-old children[J]. Caries Res, 2005, 39(5): 363-370
- [10] Olympio KP, Cardoso VE, Bijella MF. et al. Urinary fluoride output in children following the use of a dual-fluoride varnish formulation [J]. Appl Oral Sci, 2009, 17(3): 179-183
- [11] 胡德渝.口腔预防医学[M].第6版.北京:人民卫生出版社,2012:96
- Hu De-yu. Oral Preventive Medicine [M]. 6th edition. Bei Jing: People's Health Publishing House, 2012: 96
- [12] Bell ME, Largent EJ, Ludwig TG, et al. The supply of fluorine to man. In: Fluorides and human health [R]. Geneva: World Health Organization, 1970, 59: 17-74
- [13] Franco AM, Saldarriaga A, Martignon S, et al. Fluoride intake and fractional urinary fluoride excretion of Colombian preschool children [J]. Community Dent Health, 2005, 22(4): 272-278
- [14] Maguire A, Zohouri FV, Hindmarch PN, et al. Fluoride intake and urinary excretion in 6- to 7-year-old children living in optimally, sub-optimally and non-fluoridated areas [J]. Community Dent Oral Epidemiol, 2007, 35(6): 479-488
- [15] Villa A, Anabalon M, Zohouri V, et al. Relationships between fluoride intake, urinary fluoride excretion and fluoride retention in children and adults: an analysis of available data [J]. Caries Res, 2010, 44(1): 60-68
- [16] F. V. Zohoori, R. Walls, L. Teasdale, et al. Fractional urinary fluoride excretion of 6 - 7-year-old children attending schools in low-fluoride and naturally fluoridated areas in the UK [J]. British Journal of Nutrition, 2013, 109(10): 1903-1909
- [17] 吴晨,徐东升,赵玉梅. Duraphat varnish 对乳牙釉质氟含量的影响. 上海口腔医学, 2011, 20(2): 159-163
- Wu Chen, Xu Dong-sheng, Zhao Yu-mei. The influence of Duraphat varnish on enamel fluoride content of Primary teeth [J]. Shanghai Journal of Stomatology, 2011, 20(2): 159-163
- [18] Seppä L. Effects of a sodium fluoride solution and a varnish with different fluoride concentrations on enamel remineralization in vitro [J]. Scand J Dent Res, 1988, 96(4): 304-309
- [19] Seppä L, Tolonen T. Caries preventive effect of fluoride varnish applications performed two or four times a year [J]. Scand J Dent Res, 1990, 98(2): 102-105
- [20] 武洁,朱维建,王兢兢,等.不同浓度氟化钠涂膜预防乳牙龋齿两年临床研究[J].中国医学工程, 2012, 20(11): 11-13
- Wu Jie, Zhu Wei-jian, Wang Jing-jing, et al. Efficiency of sodium fluoride varnish with difference fluoride concentrations caries-preventive for preschool-children: a 2-year clinical trial [J]. China Medical Engineering, 2012, 20(11): 11-13
- [21] 丁平. 尿氟浓度与饮水含氟量的关系 [J]. 青海医药杂志, 1996, (1): 48
- Ding Ping. Relationship urine fluoride concentration and fluoride content of drinking water [J]. Qinghai Medical Journal, 1996, (1): 48
- [22] G.M. Whitford. Intake and metabolism of fluoride [J]. Adv Dent Res, 1994, 8(1): 5-14
- [23] Mazze RI, Calverly RK, Smith NT, et al. Inorganic fluoride nephrotoxicity: prolonged enflurane and halothane anesthesia in volunteers [J]. Anesthesiology, 1977, 46(4): 265-271

(上接第 2250 页)

- [17] Hashimoto H, Takeuchi T, Komatsu K, et al. Structural basis for matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)-selective inhibitory action of beta-amyloid precursor protein-derived inhibitor [J]. J Biol Chem, 2011, 286(38): 33236-33243
- [18] Justicia C, Panes J, Sole S, et al. Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23(12): 1430-1440
- [19] Wang C, Ye Z, Zheng J, et al. Targeting reactive oxygen species by edaravone inhalation in a rat hyperoxic lung injury model: role of inflammasome [J]. Undersea Hyperb Med, 2013, 40(6): 505-511
- [20] Ostrowski RP, Jadhav V, Chen W, et al. Reduced matrix metalloproteinase-9 activity and cell death after global ischemia in the brain preconditioned with hyperbaric oxygen [J]. Acta Neurochir Suppl, 2010, 106(10): 47-49
- [21] Kim JH, Chang KH, Song IC, et al. Delayed encephalopathy of acute carbon monoxide intoxication: diffusivity of cerebral white matter lesions [J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2003, 24(8): 1592-1597
- [22] Ide T, Kamijo Y. Myelin basic protein in cerebrospinal fluid: a predictive marker of delayed encephalopathy from carbon monoxide poisoning [J]. Am J Emerg Med, 2008, 26(8): 908-912
- [23] Kobayashi H, Chattopadhyay S, Kato K, et al. MMPs initiate Schwann cell-mediated MBP degradation and mechanical nociception after nerve damage [J]. Mol Cell Neurosci, 2008, 39(4): 619-627
- [24] Shiryayev SA, Savinov AY, Cieplak P, et al. Matrix metalloproteinase proteolysis of the myelin basic protein isoforms is a source of immunogenic peptides in autoimmune multiple sclerosis [J]. PLoS One, 2009, 4(3): e4952
- [25] Zhao H, Zhang Q, Xue Y, et al. Effects of hyperbaric oxygen on the expression of claudins after cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. Exp Brain Res, 2011, 212(1): 109-117