

大鼠脑损伤后非损伤区域缺氧诱导因子与乳酸的变化研究

刘焱炜¹ 刘绍明^{2△}

(1 石河子大学医学院 新疆 石河子 832002 2 兰州军区乌鲁木齐总医院神经外科 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要 目的:研究大鼠脑损伤后非损伤区域缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)与乳酸的表达变化。方法:取雄性SD大鼠36只,体重200-300g,参照统计学随机数字表将大鼠随机平均分为正常对照组(6只)、假手术组(6只)、造模组(24只),3组造模组分四个时间点12h、72h、1w、2w处死动物(每时间点6只)。使用立体定位仪和液压打击装置靶向打击大脑中动脉造大鼠脑外伤模型。采用免疫组织化学法检测脑外伤后不同时间点损伤邻近区域脑组织中HIF-1 α 蛋白表达及乳酸含量的变化。结果:正常组和假手术组脑组织神经细胞HIF-1 α 表达和乳酸含量无明显变化,而模型组损伤邻近区域HIF-1 α 的表达及乳酸含量的变化规律基本一致,12h时增多,72h时达到高峰,1w表达下降至2w时恢复正常。造模组12h、72h、1w3个亚组与正常对照组比较差异具有统计学意义 $p<0.01$,造模组2w亚组与正常对照组比较差异无统计学意义 $p>0.01$ 。结论:脑外伤后非损伤区域也有缺血、缺氧的改变,可能与脑外伤后的脑萎缩有相关性。

关键词 缺氧诱导因子 乳酸 脑外伤 液压打击模型

中图分类号:R651.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)06-1075-03

The Change of Hypoxia Inducible Factor and Lactic Acid in Non-damaged Regions After Brain Injury

LIU Yao-wei¹, LIU Shao-ming^{2△}

(1 Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang, 832000 China;

2 Department of hepatobiliary Surgery, Urumuqi General Hospital of Lanzhou Military region Urumuqi 830000, China)

ABSTRACT Objective: To study the expression of hypoxia induced factor and Lactate in non damage area of traumatic brain injured rat. **Methods:** 36 male SD rats, weight 200-300g, by statistical random number table, were randomly divided into normal control group (6), sham operation group (6), model group (24), rat of the third group were sacrificed in four time points 12h, 72h, 1w, 2w. The third group is injured with stereotaxic apparatus and hydraulic blow device, targeted blow middle cerebral artery. At different time points examined HIF1- α and Lactate in the area surrounding injured. **Results:** Expression of HIF1- α and lactate in normal group and sham operation group showed no significant change, contrast with the third group, increased in 12h, reached peak in 72h, decreased in 1w and resume to normal in 2w. Groups of 12h, 72h and 1w compared with the control group was statistically significant difference $p<0.01$. **Conclusion:** Non-injury regions after traumatic brain injury have ischemia, hypoxia changes and may be related to brain atrophy after traumatic brain injury are related.

Key words: Hypoxia induced factor; Lactate; Traumatic brain injury; hydraulic blow device

Chinese Library Classification: R651.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)06-1075-03

前言

创伤性颅脑损伤(Traumatic Brain Injury TBI)是临床上常见的疾病,以年轻人和儿童多见,也是造成死亡的重要原因。大量临床资料显示^[1,2],颅脑损伤后脑缺血的发生,与颅脑损伤后脑血管的直接损伤有密切的关系,损伤后1-2个月有脑萎缩症状。因此本课题试图研究脑外伤后脑缺血的变化规律,反映脑缺血的变化,以期对脑外伤后缺血性损害有更深刻的认识。在任何氧浓度降低的情况下,如全身缺氧、脑外伤导致脑缺血,都可能诱导HIF-1 α 及乳酸的快速大量表达^[3],我们通过实验发现:大鼠脑缺血早期两者表达水平显著增高($P<0.05$),于第3

天达到高峰,持续约1周后,开始持续缓慢降低,2周恢复正常。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 取雄性SD大鼠36只,体质量200-300g,购自新疆医科大学。

1.1.2 主要仪器与试剂 脑立体定位仪、液压打击装置、分光比色计、注射器、手电筒、2%戊巴比妥钠、水门汀、磨牙钻、标本包埋机、AO-8205型轮转切片机、多功能光学显微镜、乳酸试剂盒、SP试剂检测盒、DAB显色剂。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 取雄性SD大鼠36只,体质量200-300g,参照统计学随机数字表将大鼠随机平均分为正常对照组(6只)、假手术组(6只)、造模组(24只),3组造模组分四个时间点12h、

作者简介:刘焱炜(1981-),男,硕士研究生。研究方向:颅脑损伤
 $\triangle$ 通讯作者:刘绍明,男,主任医师,博士。

E-mail: liuyaowei210@sina.cn

(收稿日期:2010-11-08 接受日期:2010-11-30)

72h、1w、2w 处死动物(每时间点 6 只)。

1.2.2 建立动物模型 采用大脑中动脉液压靶向打击装置^[4],SD 大鼠称重后,以 2%戊巴比妥钠腹腔麻醉后(40mg/kg 体重)待动物掐尾反射消失后,大鼠取俯卧位固定,备皮,消毒手术视野,消毒范围前至大鼠两眼内眦连线,后至枕骨大孔水平,左右两侧至外耳道上缘。头部正中做一直切口约 4cm,分离肌肉及骨膜,用棉签向两侧分开,暴露冠状缝和人字缝及其间的顶骨。在冠状缝后方 3.6mm,距中线 3.5mm 的左侧颅骨处钻孔,孔径 3mm。保持硬脑膜完整,钻孔后用生理盐水冲洗术区,纱布吸干,安装打击管,以大脑中动脉的分叉部位为目标,打击管与颅骨成约 80 度角,牙托粉密封固定,液压冲击压强为 2.6-3.3 个大气压(atm),时限 21-23ms,打击管连接液压致伤装置打击致伤动物。

1.3 检测指标

每只大鼠尽量保持取材部位相同,免疫组化检测损伤临近区域 HIF-1 α 的表达,将脑组织行固定、脱水、石蜡包埋处理后进行连续切片,片厚约 2-3 μ m,每个蜡块切片 3 张,按试剂盒说明书并结合实验室老师的指导,检测损伤临近区域 HIF-1 α 的

表达,HIF-1 α 表达的阳性细胞在光镜下细胞浆或细胞核呈棕黄色或棕褐色颗粒。阳性细胞计数,在光学显微镜下观察每张切片的每个网格的 HIF-1 α 阳性细胞并计数,每个部位各观察 5 个视野取其均值作为该区域的阳性细胞数。

每只大鼠尽量保持取材部位相同,各标本取 5 μ g,匀浆后,加 1ml 蒸馏水稀释,采用比色法测定乳酸含量。

1.4 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件包对数据进行处理。计量资料数据用表示,行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有显著性。

2 结果

正常组和假手术组脑组织神经细胞 HIF-1 α 表达无明显变化(图 1),而模型组 HIF-1 α 的表达于 12 h 时增多(图 2),72h 时达到高峰(图 3),1w 表达下降(图 4)至 2w 时恢复正常。造模组 12h、72h、1w3 个亚组与正常对照组比较差异具有统计学意义 $p < 0.01$ (表 1),造模组 2w 亚组与正常对照组比较差异无统计学意义 $p > 0.01$ 。乳酸含量变化与 HIF-1 α 表达变化基本一致(表 2)。

表 1 各组间缺氧诱导因子阳性细胞数比较(个, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of number of HIF positive cells in each group

Group	0h	12h	3d	1w	2w
Control group	1.65 $\pm$ 0.17	--	--	--	--
Sham group	1.76 $\pm$ 0.18	--	--	--	--
Operation group	--	19.21 $\pm$ 1.08* [#]	28.69 $\pm$ 2.14* [#]	17.70 $\pm$ 1.05* [#]	2.11 $\pm$ 0.14

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与假手术组比较,# $P < 0.01$

Note: Compared with the control group, * $P < 0.01$; compared with the sham group, # $P < 0.01$

表 2 各组间乳酸含量的比较(mmol/gprot, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of lactic acid levels in all groups

Group	0h	12h	3d	1w	2w
Control group	0.51 $\pm$ 0.04	--	--	--	--
Sham group	0.56 $\pm$ 0.06	--	--	--	--
Operation group	--	2.05 $\pm$ 0.16* [#]	3.16 $\pm$ 0.23* [#]	1.45 $\pm$ 0.12* [#]	0.65 $\pm$ 0.12

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与假手术组比较,# $P < 0.01$

Note: compared with the control group, * $P < 0.01$; compared with the sham group, # $P < 0.01$

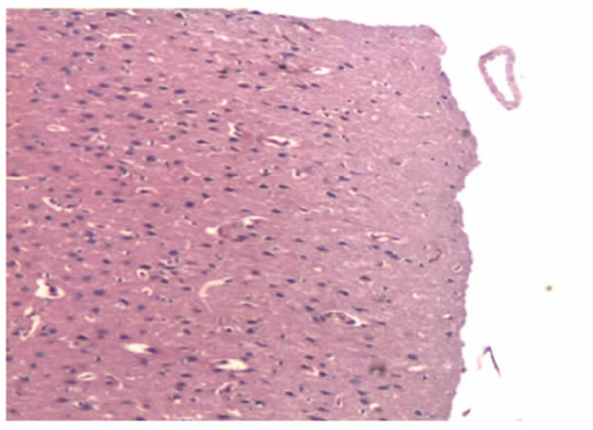


图 1 HE 染色假手术组无明显变化(40 $\times$)

Fig. 1 HE no changes in the sham group(40 $\times$)

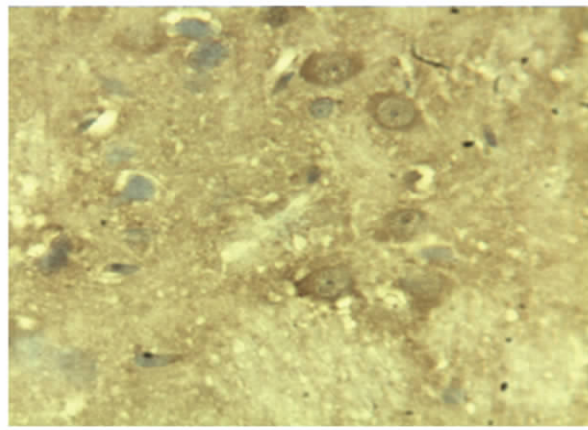


图 2 免疫组化 12h 阳性细胞开始表达(100 $\times$)

Fig. 2 12h immunohistochemical positive cells began to express(100 $\times$)

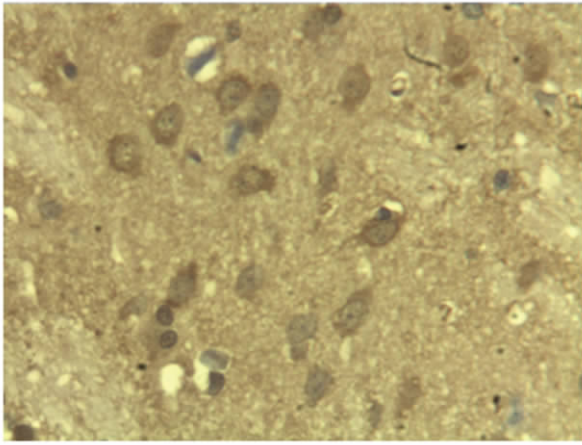


图3 免疫组化 72h 阳性细胞大量表达 (100×)

Fig. 3 A large number of positive cells the expression of 72h (100 ×)

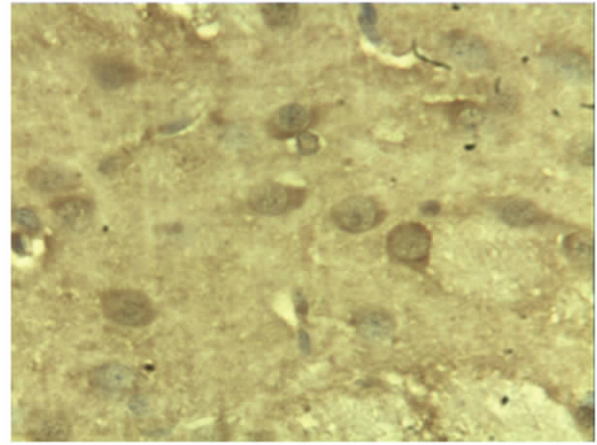


图4 免疫组化 1w 阳性细胞逐渐减少(100×)

Fig. 4 After 1w positive cells decreased gradually

3 讨论

HIF 是缺氧的敏感因子,很大程度上提示了病情的发展及预后^[5]。HIF 既有神经保护的作用^[6,7],又有促神经细胞凋亡的作用^[8-10],它既可以致病,也可以抑制疾病的进一步发展。明确 HIF 在缺血性脑血管病中的双重作用为缺血性脑血管病的治疗提供了新的靶点。HIF 的运用已成为疾病基因治疗新手段,调控 HIF 的影响因子从而达到调节 HIF 的目的,可获得较为满意的临床效果。其中值得注意的是, HIF 与 VEGF 表达的关系十分密切,VEGF 既可增加新生血管的通透性加重脑损伤^[11],也可通过改善血流对脑组织起到保护作用。HIF 可以刺激 VEGF 的分泌^[12],同时 VEGF 通过负反馈影响 HIF 的表达。因此,针对 HIF 的治疗的同时,也应该兼顾针对 VEGF 的治疗,需熟悉两者表达的初始时间、高峰时间、消除时间,水肿高峰期适当加大脱水药物的用量,尽量减低其损伤作用,积极促进期保护作用,可能会产生事半功倍的疗效。但是如何适时地进行干预或诱导,以及干预或诱导药物使用的最佳剂量和使用时间有待于大量临床实验的进一步研究和证实。

同样在缺血、缺氧的情况下,由于组织中氧气含量减少,有氧化还原,糖酵解相对增加,来满足机体的对能量的需求,因此组织中乳酸的含量增加。乳酸是对氧含量变化的敏感指标。适量的乳酸可以提高肌肉对运动刺激的适应,加速运动过程中氧自由基清除,延长运动致疲劳的时间,局部伤口高浓度的乳酸促进血管再生及透明质酸分泌^[13]。但是,大量的乳酸水平升高可影响食欲,由于热量限制进一步引起乳酸水平相对升高,造成恶性循环,导致恐慌和焦虑的产生和酸中毒^[14,15]。

大量实验证明脑损伤区域 HIF1-α 和乳酸大量表达,本实验重点对脑损伤的临近区域进行研究,研究发现 HIF1-α 和乳酸在损伤的临近区域,同样显著表达,并且具有一致性,72 小时达到高峰,1 周后开始下降,此周期变化与脑外伤后脑水肿的变化周期基本一致,进一步说明了两者是对缺氧、缺血变化的敏感指标,就其在损伤临近区域表达的原因还需进一步研究。笔者个人认为可能与大脑中动脉的直接损伤有关,大脑中动脉的供血区域,血量减少导致 HIF1-α 和乳酸的表达。上文

已提到 HIF1-α 和乳酸大量表达对组织产生损伤作用,从而引起细胞坏死,促进细胞凋亡,最终导致脑萎缩。所以临床对脑外伤的治疗应该重视针对 HIF1-α 和乳酸的治疗,最低限度的减轻脑萎缩。另外本实验不足之处,应当采用 TUNEL 染色法分析神经元细胞凋亡,以便更加直观的证明神经元细胞凋亡,还应增加非损伤区域的检测范围,全面的了解整个脑组织是否同样存在缺血缺氧,整个脑组织是否发生脑萎缩。

参考文献(References)

- [1] Bunai Y, Nagai A, Nakamura I, et al. Posttraumatic thrombosis of the middle cerebral artery [J]. *Am J Forensic Med Pathol*, 2008,22(3): 299-302
- [2] Steiger HJ, Aaslid R, Stooss R, et al. Transcranial Doppler monitoring in head injury: relations between type of injury, flow velocities, vasoreactivity, and outcome[J]. *Neurosurgery*, 1999,34:79
- [3] Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux D, et al. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002,22(4):393-400
- [4] 李建,刘绍明,司军强,等.急性闭合性颅脑损伤脑微循环形态学改变的实验研究[J].*农垦医学*, 2008, 1(30):16-17
Li Jian, Liu Shao-ming, Si Jun-qiang, et al. Changes of the brain mantle ultrastructure after fluid percussion brain injury in rats[J]. *Journal of Nongken Medicine*, 2008, 1(30):16-17
- [5] Guillemin K, Krasnow MA. The hypoxic response: huffing and hifing. *Cell*, 1997,89(1):92121
- [6] Helton R, Cui J, Scheel JR, et al. Brain-specific knock-out of hypoxia-inducible factor-1 reduces rather than increases hypoxic-ischemic damage[J]. *J Neurosci*, 2005,25(16):409924107
- [7] Liu R, Suzuki A, Guo Z, et al. Intrinsic and extrinsic erythropoietin enhances neuroprotection against ischemia and reperfusion injury in vitro[J]. *J Neurochem*, 2006,96(4):1101-1110
- [8] Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, et al. Role of HIF-1 alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis[J]. *Nature*, 1998,394(6692):485-490

(下转第 1047 页)

- chromatography[J]. J Chromatogr A, 1996(743): 163-70
- [15] Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses[J]. Mol Immunol, 2000, 37(18): 1141-1149
- [16] Alving CR. Antibodies to lipids and liposomes: immunology and safety[J]. J Liposome Res, 2006, 16(3): 157-166
- [17] Haury M, Grandien A. The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact [J]. Eur J Immunol, 1997, 27(6): 1557-1563
- [18] Alving CR. Antibodies to lipids and liposomes: immunology and safety[J]. J Liposome Res, 2006, 16(3): 157-166.
- [19] Freigang S, Horkko S, Miller E, et al. Immunization of LDL receptor-deficient mice with homologous malondialdehyde-modified and native LDL reduces progression of atherosclerosis by mechanisms other than induction of high titers of antibodies to oxidative neoepitopes[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998, 18(12): 1972-1982
- [20] Shaw PX, Horkko S, Chang MK, et al. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity[J]. J Clin Invest, 2000, 105(12): 1731-1740
- [21] 冯旭阳, 李巍, 王海昌, 等. 抗胆固醇天然抗体的检测与分析[J]. 心脏杂志, 2007, 19(2): 173-175.
Feng Xu-yang, Li Wei, Wang Hai-chang, et al. Detection and analyse of re-cholesterol natural antibody[J]. Chinese Heart Journal, 2007, 19(2): 173-175
- [22] Gounopoulos P, Merki E, Hansen LF, et al. Antibodies to oxidized low density lipoprotein: epidemiological studies and potential clinical applications in cardiovascular disease [J]. Minerva Cardioangiol, 2007,55(6): 821-837
- [23] Binder CJ, Hörkö S, Dewan A, et al. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between Streptococcus pneumoniae and oxidized LDL [J]. Nat Med, 2003, 9(6):736-43
- [24] Hörkö S, Bird DA, Miller E, et al. Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins[J]. J Clin Invest, 1999, 103(1): 117-28

(上接第 1077 页)

- [9] Lucena JF, Herrero J I, Quir oga J, et al. A multidrug resistance 3 gene mutation causing cholelithiasis, cholestasis of pregnancy, and adulthood biliary cirrhosis[J]. Gastr oenterology, 2003,124(4):1037-1042
- [10] Jacquemin E, Cresteil D, Manouvrier S, et al. Heterozygous non-sense mutation of the MDR3 gene in familial intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. Lancet, 1999,353(9148):210-211
- [11] Marti HJ, Bernaudin M, Bellal A, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia[J]. Am J Pathol, 2000,156(3):965-976
- [12] Pichiule P, Agani F, Chavez JC, et al. HIF-1 alpha and VEGF expression after transient global cerebral ischemia [J]. Adv Exp Med Biol, 2003, 530: 611-617
- [13] Karelis A D, Marcil M, Pé ronnnet F, et al. Effect of lactate in fusion on Mwave characteristics and force in the rat plantaris muscle during repeated stimulation in situ[J]. J Appl Physiol, 2004,96(6):2133-2138
- [14] Johnson P, Lowry C, Truitt W, et al. Disruption of GABAergic tone in the dorsomedial hypothalamus attenuates responses in a subset of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus following lactate-induced panic[J]. J Psychopharmacol, 2008,22(6):642-652
- [15] Yates A, Edman J D, Crago M, et al. Eating disorder symptoms in runners, cyclists, and paddlers[J]. Addict Behav, 2003,28(8):1473-1480