

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.21.009

不同介入时间和不同疗程高压氧治疗对脑出血模型大鼠动物学行为及促血管新生因子表达的影响*

权 瑜¹ 王举波¹ 程格庆¹ 李 娜¹ 李小冬¹ 屈 佩¹ 王茂德^{2△}

(1 西安交通大学第二附属医院神经外科 陕西 西安 710004; 2 西安交通大学第一附属医院神经外科 陕西 西安 710061)

摘要 目的:探讨不同介入时间和不同疗程高压氧治疗对脑出血大鼠动物学行为及促血管新生因子表达的影响。**方法:**240 只 SD 大鼠随机分为假手术组、脑出血组、高压氧组,每组各 80 只。采用胶原酶诱导建立脑出血大鼠模型,建模成功后根据高压氧介入时间分为 6 h 介入组、1 d 介入组、2 d 介入组、3 d 介入组等亚组。分别治疗 1 周、2 周、3 周、4 周,采用 Longa 评分法、平衡木评分法、Berderson 评分法评估大鼠动物学行为,采用 qRT-PCR 检测大鼠脑组织血管内皮生长因子(VEGF)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) mRNA 表达。**结果:**不同介入时间、不同疗程,脑出血组、高压氧组脑出血大鼠动物学行为评分、脑组织 VEGF mRNA 与 HIF-1 α mRNA 表达均高于假手术组($P<0.05$)。治疗 1 周、2 周、3 周、4 周,不同介入时间高压氧组脑出血大鼠动物学行为评分低于脑出血组,脑组织 VEGF mRNA、HIF-1 α mRNA 表达高于脑出血组($P<0.05$)。高压氧介入时间越早,治疗疗程越长,脑出血大鼠动物学行为评分越低,脑组织 VEGF mRNA、HIF-1 α mRNA 表达越高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**高压氧治疗能够改善脑出血大鼠动物学行为、促进促血管新生因子表达,且以脑出血后 6 h 介入、疗程 4 周效果最佳。

关键词:脑出血;高压氧治疗;动物学行为;促血管新生因子

中图分类号:R-33;R743.3;R459.6 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2021)21-4045-06

Effects of Different Intervention Time and Course of Hyperbaric Oxygen Therapy on Animal Behavior and the Expression of Angiogenic Factors in Rats with Cerebral Angiogenesis*

QUAN Yu¹, WANG Ju-bo¹, CHENG Ge-qing¹, LI Na¹, LI Xiao-dong¹, QU Pei¹, WANG Mao-de^{2△}

(1 Department of neurosurgery, the 2nd Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China;

2 Department of neurosurgery, the 1st Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of different intervention time and different courses of hyperbaric oxygen therapy on animal behavior and the expression of angiogenic factors in rats with cerebral angiogenesis. **Methods:** 240 SD rats were randomly divided into sham operation group, cerebral hemorrhage group and hyperbaric oxygen group with 80 rats in each group. The rat model of cerebral angiogenesis was established by collagenase induction. After successful modeling, according to the time of hyperbaric oxygen intervention, the rats were divided into several subgroups of 6-hour intervention group, 1-day intervention group, 2-day intervention group and 3-day intervention group. 1 week, 2 weeks, 3 weeks, 4 weeks after treatment, Longa score, Balance beam score and Berderson score were used to evaluate animal behavior of the rats, qRT-PCR was used to detect the mRNA expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) in rats' brain. **Results:** With different intervention time and different course of treatment, the animal behavior score, VEGF mRNA and HIF-1 α mRNA expression in brain tissue of rats in cerebral hemorrhage group and hyperbaric oxygen group were higher than those in sham operation group ($P<0.05$). After treatment for 1 week, 2 weeks, 3 weeks and 4 weeks, the animal behavior score of rats with cerebral hemorrhage in hyperbaric oxygen group with different intervention time was lower than that in cerebral hemorrhage group, and the expression of VEGF mRNA and HIF-1 α mRNA in brain tissue was higher than that in cerebral hemorrhage group ($P<0.05$). The earlier the time of hyperbaric oxygen intervention, the longer the course of treatment, the lower the score of animal behavior, and the higher the expression of VEGF mRNA and HIF-1 α mRNA in brain tissue of rats with cerebral hemorrhage($P<0.05$). **Conclusion:** Hyperbaric oxygen therapy can improve the animal behavior and promote the expression of angiogenic factors in rats with cerebral angiogenesis. When the hyperbaric oxygen therapy was started 6 hours after cerebral angiogenesis and the course of treatment was 4 weeks, the treatment effect was the best.

Key words: Cerebral angiogenesis; Hyperbaric oxygen therapy; Animal behavior; Angiogenic factors

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R743.3; R459.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)21-4045-06

* 基金项目:陕西省自然科学基金研究计划(2017JC2-09)

作者简介:权瑜(1982-),男,硕士,主治医师,主要研究方向:脑胶质瘤, E-mail: quanyu_888@yeah.net

△ 通讯作者:王茂德(1964-),男,博士,主任医师,主要研究方向:脑胶质瘤, E-mail: maodewang@163.com

(收稿日期:2021-04-07 接受日期:2021-04-30)

前言

自发性脑出血是临床常见急危重脑血管疾病,脑水肿是其主要继发性病理生理改变,不仅可导致脑组织缺血缺氧性损伤,也是患者预后不良的主要原因。高压氧治疗是指将患者置入高压氧舱中、使其吸入纯氧以治疗缺氧性疾病的方法,能够有效减轻脑出血患者脑水肿程度,促进神经功能恢复^[1,2]。然而,高压氧介入治疗的时间、压力、疗程等尚无统一标准,一定程度影响了其在自发性脑出血患者中的应用^[3,4]。

相关研究表明,脑出血患者均伴有脑组织微循环障碍,促进缺血缺氧区新生血管形成是治疗脑出血的一个“靶点”^[5,6]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)均为促血管新生因子,是判断脑出血预后的关键指标^[7,8]。然而,高压氧是否通过促进血管新生发挥治疗效果,目前尚缺乏足够的文献报道。因此,本研究通过建立大鼠脑出血模型,以探讨高压氧最佳的介入治疗时间及疗程,同时对其可能作用机制进行分析并报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 兔抗 VEGF 多克隆抗体、兔抗 HIF-1 α 多克隆抗体(美国 Santa Cruz Bio 公司),VII型胶原酶(辽宁味邦生物制药有限公司),PCR 引物(上海博亚生物技术有限公司)。

1.1.2 实验动物 健康雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠,8-10 周龄,体质量 250-300 g。饲养条件:架式分笼饲养,12 h/12 h 明暗交替环境,温度 20-22℃,湿度 50%-60%。购于医学动物中心,许可证号:SCXK(陕)2018-001。本次研究经伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 分组 240 只 SD 大鼠随机分为假手术组(80 只)、脑出血组(80 只)、高压氧组(80 只)。高压氧组根据高压氧治疗介入时间分为 6 h 介入组、1 d 介入组、2 d 介入组、3 d 介入组等四个亚组,每亚组各 20 只。各亚组分别于治疗 1 周、2 周、3 周、4 周后,各取 5 只进行试验。假手术组、脑出血组分组方法同高压氧组。

1.2.2 实验性脑出血模型制备 参照文献资料^[9],采用胶原酶 VII 定位注射诱发大鼠尾壳核脑出血模型。大鼠称重后,腹腔注射 10%水合氯醛(0.4 mL/100 g)麻醉,常规消毒,俯卧固定于脑立体定位仪上。颅正中矢状切开 1.5 cm,清晰暴露前囟,根据脑立体定位图谱,于前囟后 1 mm、矢状线右侧 3 mm 钻直径约 1 mm 孔。将 0.4 U 胶原酶 VII 缓慢推注大鼠脑组织(推注 5 min、留针 10 min、退针 5 min),骨蜡封闭颅孔,缝合皮肤,消毒创处。假手术组相同方法注入等体积生理盐水。制模 12 h 后采用 Longa^[10] 评分观察大鼠行为变化,分值 0-4 分,2 分以上判断为造模成功。

1.2.3 高压氧治疗 高压氧组根据介入治疗时间进行高压氧治疗:大鼠置于特制木箱中送入高压氧舱内;温度 22-24℃,10 L/min 氧流量纯氧洗舱 5 min,关闭舱门;5-8 L/min 氧流量加压 15 min,舱内压力至 0.2 MPa(绝对压 2 ATA),稳压吸氧 60 min;吸氧结束后 15 min 匀速降至常压。脑出血组、假手术组同样置于高压氧舱中,常压下吸空气。1 次/d,连续治疗 1 周、2 周、3

周、4 周等不同疗程。

1.3 观察指标

1.3.1 动物学行为评分 治疗 1 周、2 周、3 周、4 周后,分别采用 Longa 评分法^[10]、平衡木评分法^[11]、Berderson 评分法^[12]评估大鼠神经功能、平衡能力、关节活动情况。其中 Longa 评分 0-4 分,平衡术评分 0-5 分,Berderson 评分 0-3 分,总分 0-12 分,分值越高说明动物行为学越差。

1.3.2 脑组织促血管新生因子 治疗 1 周、2 周、3 周、4 周,麻醉后采用心脏放血法处死大鼠,迅速断头开颅取脑,取血肿周围基底节脑髓质 100 mg。qRT-PCR 法提取 RNA。引物系列:VEGF,上游 TAGACCTCTCACCGGAAAGAC,下游 CACGAATCCCAGAAACAAAAC;HIF-1 α ,上游 TGTCTCCAT-TACCTGCCTCTG,下游 GATTCTTCGCTTCTGTGTCTTCA。VEGF(目的基因)PCR 循环参数:94℃预变性(2 min),94℃变性(30 s)、60℃退火(30 s)、72℃延伸(30 s),40 个循环。HIF-1 α (目的基因)PCR 循环参数:94℃预变性(2 min)、94℃变性(30 s)、63℃退火(30 s)、72℃延伸(30 s),40 个循环。获取分析 CT 值,计算样本 $2^{-\Delta\Delta CT}$,相对内参标准进行比较^[13]。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,动物学行为评分、促血管新生因子等计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用成组 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析、组间两两比较采用 LSD-t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物行为学

不同介入时间、不同疗程,脑出血组、高压氧组脑出血大鼠动物学行为评分均高于假手术组($P > 0.05$);治疗 1 周、2 周、3 周、4 周,不同介入时间高压氧组脑出血大鼠动物学行为评分均低于脑出血组($P < 0.05$);介入时间越早、治疗时间越长,高压氧组脑出血大鼠动物学行为评分越低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1、图 1。

2.2 促血管新生因子

不同介入时间、不同疗程,脑出血组、高压氧组脑出血大鼠脑组织 VEGF mRNA、HIF-1 α mRNA 表达均高于假手术组($P < 0.05$);治疗 1 周、2 周、3 周、4 周,不同介入时间高压氧组脑出血大鼠脑组织 VEGF mRNA、HIF-1 α mRNA 表达均高于脑出血组($P < 0.05$);介入时间越早,治疗时间越长,高压氧组脑出血大鼠 VEGF mRNA、HIF-1 α mRNA 表达水平越高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2、图 2、表 3、图 3。

3 讨论

自发性脑出血是一种非外伤性脑实质内出血,脑出血后血肿的占位性压迫及周围细胞释放血管活性物质均会诱导缺血缺氧性脑组织损伤,而继发性缺氧会加重出血灶周围脑组织水肿程度。脑水肿是脑出血后神经元经受 2 次打击的中心环节,也是继发性脑损伤的标志^[14]。防治或减轻脑水肿的发生是治疗脑出血的关键。高压氧能够提高血氧含量与血氧分压,改善缺血脑组织缺氧状态,拮抗脑细胞凋亡^[15]。也能改善血脑屏障通透性,阻断脑缺氧-脑水肿循环,减轻脑水肿^[16]。有文献研究认

为, 高压氧可通过纠正钙超载等途径降解血管活性物质的释放, 抑制神经毒性与氧化损伤, 促进神经功能恢复, 矫正脑出血后行为学改变^[17,18]。本文研究发现, 高压氧组脑出血大鼠动物学

行为评分低于脑出血组, 与王凤波等^[19]文献报道基本相似, 提示高压氧可以改善脑出血后的脑功能状态。

表 1 不同介入时间及不同疗程各组大鼠动物行为学评分比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of behavioral scores of rats in different intervention time and course of treatment($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	1 week	2 week	3 week	4 week
Sham operation group					
6-hour intervention group	5	0.60± 0.55	0.60± 0.55	0.40± 0.55	0.40± 0.55
1-day intervention group	5	0.60± 0.55	0.80± 0.45	0.80± 0.45	0.60± 0.55
2-day intervention group	5	0.60± 0.55	0.80± 0.45	0.40± 0.55	0.60± 0.55
3-day intervention group	5	0.60± 0.55	0.60± 0.55	0.40± 0.55	0.80± 0.45
Cerebral hemorrhage group					
6-hour intervention group	5	5.20± 0.45 ¹⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾	4.20± 0.45 ¹⁾³⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾	3.20± 0.45 ¹⁾³⁾⁴⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾	2.20± 0.45 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾
1-day intervention group	5	6.20± 0.45 ¹⁾⁷⁾⁸⁾	5.40± 0.55 ¹⁾³⁾⁷⁾⁸⁾	4.40± 0.55 ¹⁾³⁾⁴⁾⁷⁾⁸⁾	3.40± 0.55 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾⁸⁾
2-day intervention group	5	7.20± 0.45 ¹⁾⁸⁾	6.20± 0.45 ¹⁾³⁾⁸⁾	5.40± 0.55 ¹⁾³⁾⁴⁾⁸⁾	4.40± 0.55 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁸⁾
3-day intervention group	5	8.20± 0.45 ¹⁾	7.40± 0.55 ¹⁾³⁾	6.40± 0.55 ¹⁾³⁾⁴⁾	5.20± 0.45 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾
Hyperbaric oxygen group					
6-hour intervention group	5	4.20± 0.45 ¹⁾²⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾	3.20± 0.45 ¹⁾²⁾³⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾	2.20± 0.45 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾	1.40± 0.55 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾
1-day intervention group	5	5.20± 0.45 ¹⁾²⁾⁷⁾⁸⁾	4.20± 0.45 ¹⁾²⁾³⁾⁷⁾⁸⁾	3.20± 0.45 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁷⁾⁸⁾	2.40± 0.55 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾⁸⁾
2-day intervention group	5	6.20± 0.45 ¹⁾²⁾⁸⁾	5.20± 0.45 ¹⁾²⁾³⁾⁸⁾	4.20± 0.45 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁸⁾	3.40± 0.55 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁸⁾
3-day intervention group	5	7.20± 0.45 ¹⁾²⁾	6.40± 0.55 ¹⁾²⁾³⁾	5.40± 0.55 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	4.20± 0.45 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾

Note: ¹⁾, compared with the same subgroup of intervention time in sham operation group, $P<0.05$; ²⁾, compared with the same subgroup of intervention time in cerebral hemorrhage group, $P<0.05$; ³⁾, compared with rats treated for 1 week in the same group, $P<0.05$; ⁴⁾, compared with rats treated for 2 weeks in the same group, $P<0.05$; ⁵⁾, compared with rats treated for 3 weeks in the same group, $P<0.05$; ⁶⁾, compared with 1-day intervention group, $P<0.05$; ⁷⁾, compared with 2-day intervention group, $P<0.05$; ⁸⁾, compared with 3-day intervention group, $P<0.05$.

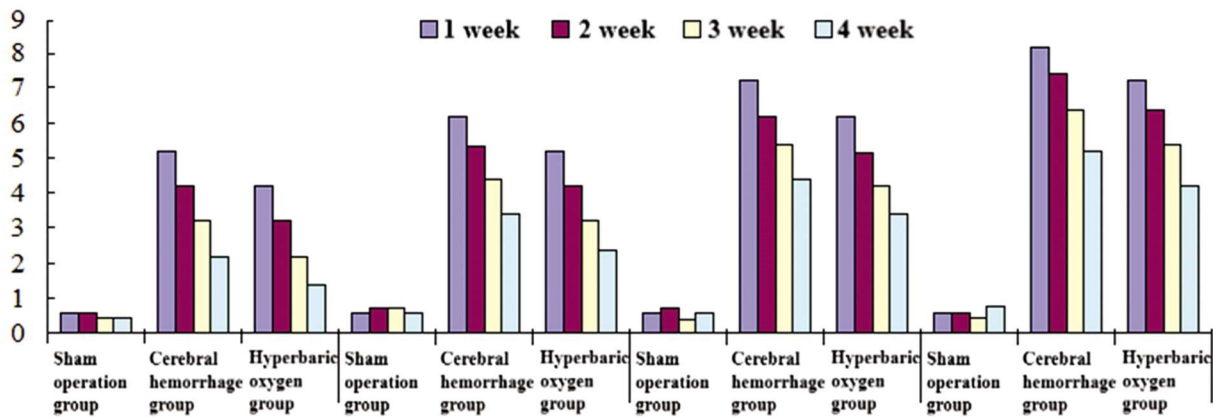


图 1 不同介入时间及不同疗程各组大鼠动物行为学评分柱状图

Fig.1 Histograms of behavioral scores of rats in different intervention time and course of treatment

表 2 不同介入时间及不同疗程各组大鼠脑组织 VEGF mRNA 表达情况比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of VEGF mRNA expression in brain tissue of rats in different intervention time and course of treatment($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	1 week	2 week	3 week	4 week
Sham operation group					
6-hour intervention group	5	0.038± 0.011	0.038± 0.013	0.040± 0.011	0.040± 0.013
1-day intervention group	5	0.036± 0.015	0.036± 0.012	0.037± 0.012	0.038± 0.015
2-day intervention group	5	0.035± 0.012	0.036± 0.016	0.035± 0.014	0.036± 0.012
3-day intervention group	5	0.035± 0.012	0.035± 0.015	0.036± 0.016	0.036± 0.022

Cerebral hemorrhage group						
6-hour intervention group	5	0.611± 0.008 ¹⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾	0.565± 0.007 ¹⁽³⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾	0.472± 0.005 ¹⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾	0.438± 0.007 ¹⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾	
1-day intervention group	5	0.585± 0.007 ¹⁽⁷⁾⁽⁸⁾	0.532± 0.011 ¹⁽³⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾	0.453± 0.008 ¹⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾	0.426± 0.007 ¹⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾	
2-day intervention group	5	0.565± 0.007 ¹⁽⁸⁾	0.514± 0.012 ¹⁽³⁾⁽⁸⁾	0.434± 0.006 ¹⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁸⁾	0.415± 0.008 ¹⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁸⁾	
3-day intervention group	5	0.541± 0.011 ¹⁾	0.499± 0.004 ¹⁽³⁾	0.420± 0.005 ¹⁽³⁾⁽⁴⁾	0.401± 0.006 ¹⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾	
Hyperbaric oxygen group						
6-hour intervention group	5	0.725± 0.012 ¹⁽²⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾	0.743± 0.008 ¹⁽²⁾⁽³⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾	0.784± 0.011 ¹⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾	0.865± 0.009 ¹⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾	
1-day intervention group	5	0.696± 0.012 ¹⁽²⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾	0.721± 0.015 ¹⁽²⁾⁽³⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾	0.761± 0.010 ¹⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾	0.834± 0.011 ¹⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾	
2-day intervention group	5	0.623± 0.014 ¹⁽²⁾⁽⁸⁾	0.668± 0.014 ¹⁽²⁾⁽³⁾⁽⁸⁾	0.736± 0.012 ¹⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁸⁾	0.785± 0.018 ¹⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁸⁾	
3-day intervention group	5	0.602± 0.009 ¹⁽²⁾	0.630± 0.012 ¹⁽²⁾⁽³⁾	0.678± 0.017 ¹⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾	0.704± 0.014 ¹⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾	

Note: ¹⁾, compared with the same subgroup of intervention time in sham operation group, $P<0.05$; ²⁾, compared with the same subgroup of intervention time in cerebral hemorrhage group, $P<0.05$; ³⁾, compared with rats treated for 1 week in the same group, $P<0.05$; ⁴⁾, compared with rats treated for 2 weeks in the same group, $P<0.05$; ⁵⁾, compared with rats treated for 3 weeks in the same group, $P<0.05$; ⁶⁾, compared with 1-day intervention group, $P<0.05$; ⁷⁾, compared with 2-day intervention group, $P<0.05$; ⁸⁾, compared with 3-day intervention group, $P<0.05$.

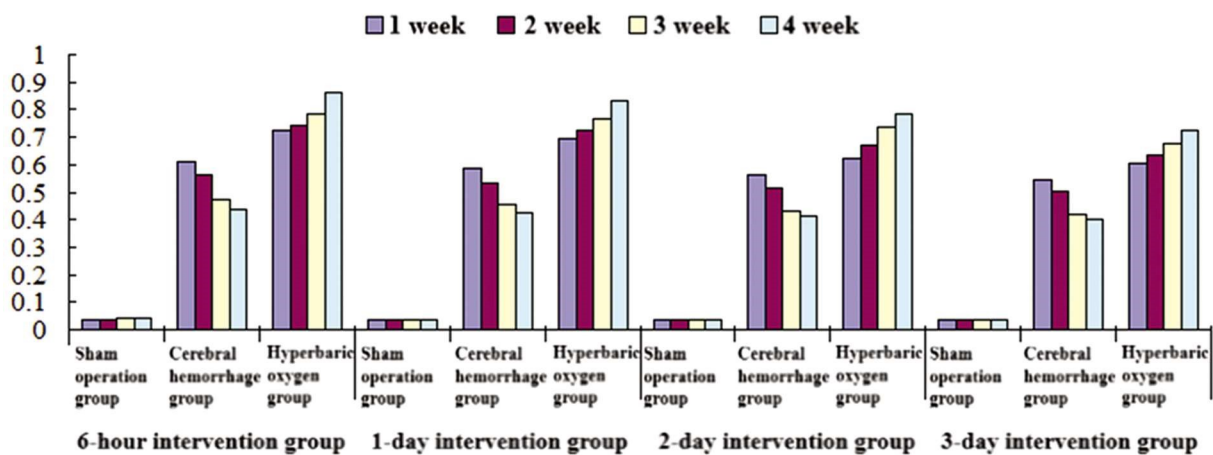


图 2 不同介入时间及不同疗程各组大鼠脑组织 VEGF mRNA 表达情况柱状图

Fig.2 Histograms of VEGF mRNA expression in brain tissue of rats in different intervention time and course of treatment

脑出血脑水肿因发生机制不同分为细胞毒性脑水肿、血管源性脑水肿,其中细胞毒性脑水肿为早期(24 h 内)细胞能量代谢障碍所致,血管源性脑水肿为后期(24 h 后)血管屏障结构发生改变所致^[20]。另外,由于缺血半影区脑组织形成致死性损伤也仅为 3-4 h(即治疗时间窗),因此,早期给予高压氧治疗能够拮抗脑出血后病灶周围炎性因子、自由基等诱导的细胞毒性反应,进而阻断脑屏障通透性增加导致的有害物质侵入所致血管源性脑水肿形成^[21,22]。有研究认为,早期脑水肿体积增大将加重神经功能缺损严重程度,短期治疗(疗程短)难以纠正神经功能缺损,需要通过时间累积效应发挥治疗效果^[23]。彭小岭等^[24]研究报道,高压氧早期治疗组(3 h、6 h)治疗 10 d、20 d、30 d 后,大鼠神经功能评分均低于晚期治疗组(1 d、2 d、3 d)的相对对应疗程组,且治疗时间越长,脑出血大鼠神经功能改善程度越好。本研究中,以高压氧介入时间(6 h、1 d、2 d、3 d)、高压氧治疗疗程(1 周、2 周、3 周、4 周)进行分组,通过比较各亚组动物学行为评分所得研究结论也支持上述文献观点,说明高压氧治疗效果与介入治疗时间、治疗疗程有关。

血管新生是血管内皮细胞通过原位增殖逐渐形成新血管的过程,新生血管的形成能够增加组织供血供氧,拮抗缺血缺

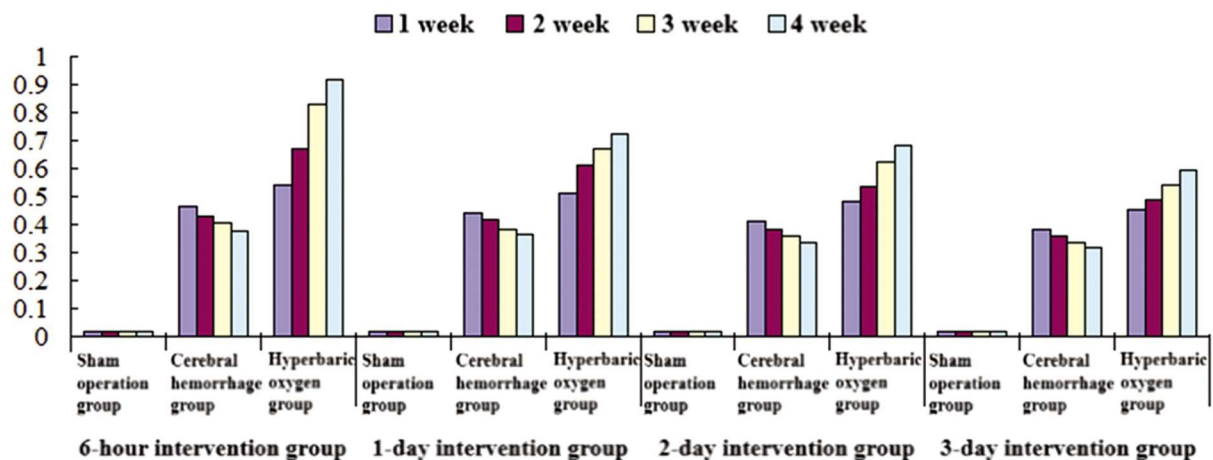
氧性损伤^[25]。VEGF 作为广泛存在于脑内的二聚糖蛋白,可通过促进内皮细胞增殖、毛细血管增生、重建侧支循环等多种方式改善脑组织缺血缺氧状态,营养神经元和胶质细胞,促进神经功能恢复^[26]。HIF-1 α 是血管发育缺氧调节的转录调节元件,也是在低氧环境中调控细胞信息传递的关键基因,低氧环境下可通过诱导异二聚体结合 DNA 蛋白分子,诱导 VEGF 转录活性,参与血管新生重建过程,消除组织水肿^[27]。高压氧能够改善损伤组织氧供,改善组织缺氧状态,启动细胞与血管修复机制,促进损伤组织血管新生,建立侧支循环,改善脑损伤组织神经功能^[28]。本研究中,高压氧组不同介入时间脑出血大鼠脑组织 VEGF mRNA、HIF-1 α mRNA 表达均高于脑出血组,说明高压氧治疗能够提高促血管新生基因蛋白含量,继而增加新生血管数目、促进神经细胞增殖与再生,并进一步恢复脑出血受损神经功能,矫正脑出血后动物学行为。另外研究还发现,介入治疗时间越早(3 d-6 h),疗程越长(1 周-4 周),脑出血大鼠脑组织 VEGF mRNA、HIF-1 α mRNA 表达增加越明显。提示我们,在使用高压氧治疗脑出血时,应尽可能早期启动治疗,并给予足够的治疗时间。

本研究结果表明,早期介入、长疗程高压氧治疗有助于改

表 3 不同介入时间及不同疗程各组大鼠脑组织 HIF-1 α mRNA 表达情况比较($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of HIF-1 α mRNA expression in brain tissue of rats in different intervention time and course of treatment($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	1 week	2 week	3 week	4 week
Sham operation group					
6-hour intervention group	5	0.017 $\pm$ 0.007	0.016 $\pm$ 0.008	0.015 $\pm$ 0.005	0.015 $\pm$ 0.004
1-day intervention group	5	0.017 $\pm$ 0.008	0.017 $\pm$ 0.005	0.016 $\pm$ 0.007	0.015 $\pm$ 0.006
2-day intervention group	5	0.018 $\pm$ 0.005	0.016 $\pm$ 0.010	0.017 $\pm$ 0.006	0.016 $\pm$ 0.008
3-day intervention group	5	0.018 $\pm$ 0.007	0.017 $\pm$ 0.006	0.016 $\pm$ 0.010	0.016 $\pm$ 0.009
Cerebral hemorrhage group					
6-hour intervention group	5	0.463 $\pm$ 0.013 ¹⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾	0.433 $\pm$ 0.010 ¹⁾³⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾	0.403 $\pm$ 0.011 ¹⁾³⁾⁴⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾	0.378 $\pm$ 0.015 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾
1-day intervention group	5	0.443 $\pm$ 0.010 ¹⁾⁷⁾⁸⁾	0.415 $\pm$ 0.011 ¹⁾³⁾⁷⁾⁸⁾	0.384 $\pm$ 0.010 ¹⁾³⁾⁴⁾⁷⁾⁸⁾	0.358 $\pm$ 0.008 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾⁸⁾
2-day intervention group	5	0.416 $\pm$ 0.012 ¹⁾⁸⁾	0.382 $\pm$ 0.012 ¹⁾³⁾⁸⁾	0.357 $\pm$ 0.016 ¹⁾³⁾⁴⁾⁸⁾	0.331 $\pm$ 0.008 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁸⁾
3-day intervention group	5	0.389 $\pm$ 0.008 ¹⁾	0.361 $\pm$ 0.010 ¹⁾³⁾	0.335 $\pm$ 0.009 ¹⁾³⁾⁴⁾	0.315 $\pm$ 0.007 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾
Hyperbaric oxygen group					
6-hour intervention group	5	0.550 $\pm$ 0.021 ¹⁾²⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾	0.676 $\pm$ 0.039 ¹⁾²⁾³⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾	0.840 $\pm$ 0.045 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾	0.915 $\pm$ 0.034 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾
1-day intervention group	5	0.516 $\pm$ 0.014 ¹⁾²⁾⁷⁾⁸⁾	0.622 $\pm$ 0.016 ¹⁾²⁾³⁾⁷⁾⁸⁾	0.679 $\pm$ 0.027 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁷⁾⁸⁾	0.726 $\pm$ 0.016 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾⁸⁾
2-day intervention group	5	0.487 $\pm$ 0.020 ¹⁾²⁾⁸⁾	0.537 $\pm$ 0.019 ¹⁾²⁾³⁾⁸⁾	0.633 $\pm$ 0.019 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁸⁾	0.693 $\pm$ 0.022 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁸⁾
3-day intervention group	5	0.454 $\pm$ 0.014 ¹⁾²⁾	0.489 $\pm$ 0.015 ¹⁾²⁾³⁾	0.544 $\pm$ 0.021 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.599 $\pm$ 0.025 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾

Note: ¹⁾, compared with the same subgroup of intervention time in sham operation group, $P < 0.05$; ²⁾, compared with the same subgroup of intervention time in cerebral hemorrhage group, $P < 0.05$; ³⁾, compared with rats treated for 1 week in the same group, $P < 0.05$; ⁴⁾, compared with rats treated for 2 weeks in the same group, $P < 0.05$; ⁵⁾, compared with rats treated for 3 weeks in the same group, $P < 0.05$; ⁶⁾, compared with 1-day intervention group, $P < 0.05$; ⁷⁾, compared with 2-day intervention group, $P < 0.05$; ⁸⁾, compared with 3-day intervention group, $P < 0.05$.

图 3 不同介入时间及不同疗程各组大鼠脑组织 HIF-1 α mRNA 表达情况柱状图Fig. 3 Histograms of HIF-1 α mRNA expression in brain tissue of rats in different intervention time and course of treatment

善脑出血大鼠动物学行为,可能与促进促血管新生因子 VEGF、HIF-1 α 表达等因素有关。需要指出的是,本研究中,高压氧治疗介入时间、治疗疗程设置较少,且未进行血管新生因子、动物学行为改变与介入时间、治疗疗程的相关性分析,并且样本量有限;同时高压氧通过何种路径、机制等影响血管新生因子,本研究也尚未深入探索。因此,均有待后续进一步深入研究。

参考文献(References)

- [1] 陶海泉,王振宇,杨立庄,等. 高压氧治疗对高血压性脑出血患者血清神经元特异性烯醇化酶、转化生长因子 β 1、血管内皮功能及免疫功能的影响[J]. 国际免疫学杂志, 2017, 40(4): 391-395
- [2] Wang M, Cheng L, Chen ZL, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage by regulating microglia polarization in rats [J]. CNS Neurosci Ther, 2019, 25(10): 1126-1133
- [3] 王晶,李红玲,谢冬玲,等. 不同疗程高压氧治疗对脑出血大鼠血肿周围 Bax 和 Bcl-2 表达的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2020, 42(1): 72-74
- [4] 牛蕾蕾,徐薇,赵龙,等. 不同介入时间高压氧治疗脑出血大鼠出血灶 GAP-43 表达的影响 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2020, 28(5): 284-289
- [5] Girard R, Zeineddine HA, Koskimäki J, et al. Plasma biomarkers of inflammation and angiogenesis predict cerebral cavernous malformation symptomatic hemorrhage or lesional growth [J]. Circ Res, 2018, 122(12): 1716-1721

- [6] 石磊, 彭翔, 赵炎, 等. 硫化氢对大鼠脑血肿周围血管新生及神经功能恢复的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(24): 6058-6060
- [7] 马红梅, 赵春水, 郝彦超. 脑出血患者血清一氧化氮、血管内皮生长因子及低氧诱导因子-1 α 水平与病理特征和预后的关系[J]. 广东医学, 2019, 40(24): 3428-3432
- [8] Nakano F, Kawakita F, Liu L, et al. Anti-vasospastic effects of epidermal growth factor receptor inhibitors after subarachnoid hemorrhage in mice[J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(7): 4730-4740
- [9] 陈玉燕, 李红玲, 牛蕾蕾, 等. 不同压力高压氧对实验性脑出血大鼠出血灶周围水肿及水通道蛋白4表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2013, 28(5): 413-417
- [10] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91
- [11] Altumbabic M, Peeling J, Del Bigio MR, et al. Intracerebral hemorrhage in the rat: effects of hematoma aspiration [J]. Stroke, 1998, 29(9): 1917-1923
- [12] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476
- [13] 李俊玲, 高世海, 马妹花, 等. 亚低温对脑出血大鼠血肿周围神经营养因子和血管新生的影响[J]. 解剖学杂志, 2016, 39(6): 689-693
- [14] Grunwald Z, Beslow LA, Urdy S, et al. Perihematomal edema expansion rates and patient outcomes in deep and lobar intracerebral hemorrhage[J]. Neurocrit Care, 2017, 26(2): 205-212
- [15] 姚向荣, 吕云利, 尤红, 等. 高压氧对高血压脑出血微创术后血清一氧化氮、血浆内皮素1及临床疗效的影响研究[J]. 中国全科医学, 2019, 22(26): 3184-3190
- [16] 秦逸辉, 邹健, 李毅, 等. 高压氧联合神经节苷脂对高血压脑出血患者术后的影响[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(10): 1944-1947, 1935
- [17] Ostrowski RP, Stepień K, Pucko E, et al. The efficacy of hyperbaric oxygen in hemorrhagic stroke: experimental and clinical implications [J]. Arch Med Sci, 2017, 13(5): 1217-1223
- [18] 张其兵, 石锋, 张芳芳, 等. 电针刺激联合高压氧治疗对高血压脑出血患者神经功能及认知能力的影响[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2020, 27(2): 188-191
- [19] 王风波, 符茜, 李宏涛. 高压氧联合电针对脑出血大鼠认知功能及行为学的影响[J]. 西南国防医药, 2019, 29(12): 1187-1190
- [20] Helbok R, Schiefecker AJ, Friberg C, et al. Spreading depolarizations in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage: Association with perihematomal edema progression [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2017, 37(5): 1871-1882
- [21] 牛蕾蕾, 李红玲, 陈玉燕, 等. 不同时间窗高压氧治疗对脑出血大鼠出血灶周围 HIF-1 α 表达的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2019, 41(11): 871-873
- [22] Xu Q, Fan SB, Wan YL, et al. The potential long-term neurological improvement of early hyperbaric oxygen therapy on hemorrhagic stroke in the diabetics[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2018, 138: 75-80
- [23] Wang XJ, Chen Y, Wang ZF, et al. Clinical research of early hyperbaric oxygen therapy on patients with hypertensive cerebral hemorrhage after craniotomy[J]. Turk Neurosurg, 2020, 30(3): 361-365
- [24] 彭小岭, 曾宪容, 潘福琼, 等. 不同介入时间和不同疗程高压氧治疗对脑出血大鼠神经功能的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2018, 40(5): 321-324
- [25] Chen H, Xiao H, Gan H, et al. Hypoxia-inducible factor 2 α exerts neuroprotective effects by promoting angiogenesis via the VEGF/Notch pathway after intracerebral hemorrhage injury in rats[J]. Neuroscience, 2020, 448: 206-218
- [26] 彭羽, 林赞, 侯晓林, 等. 亚低温治疗对脑出血模型大鼠动物行为学的影响及其机制[J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(9): 1359-1364
- [27] Zhou J, Liu T, Guo H, et al. Lactate potentiates angiogenesis and neurogenesis in experimental intracerebral hemorrhage[J]. Exp Mol Med, 2018, 50(7): 1-12
- [28] 李严, 冉敏, 闫赋琴, 等. 高压氧对脑出血再灌注患者血管内皮生长因子及细胞黏附因子-1表达的影响[J]. 解放军医药杂志, 2016, 28(8): 85-88

(上接第 4005 页)

- [18] Plundrich NJ, Bansode RR, Foegeding EA, et al. Protein-bound Vaccinium fruit polyphenols decrease IgE binding to peanut allergens and RBL-2H3 mast cell degranulation in vitro[J]. Food Funct, 2017, 8(4): 1611-1621
- [19] 金良韵, 陈欣月, 杜尊赋, 等. 一种体外培养神经元原位包埋电镜样品的制作方法[J]. 电子显微学报, 2020, 39(3): 334-336
- [20] Bellozi PM, Lima IV, Doria JG, et al. Neuroprotective effects of the anticancer drug NVP-BE235 (dactolisib) on amyloid- β 1-42 induced neurotoxicity and memory impairment [J]. Sci Rep, 2016, 6: 25226
- [21] Sand E, Themner-Persson A, Ekblad E. Mast cells reduce survival of myenteric neurons in culture [J]. Neuropharmacology, 2009, 56(2): 1522-1530
- [22] 李一鹏, 杨凯, 刘英富, 等. 接种密度对大鼠海马神经元产出量的影响[J]. 生物技术通讯, 2016, 27(6): 838-841, 883
- [23] 高超, 杜贵琴, 许永劫, 等. 海马神经元原代细胞培养方法的改良[J]. 贵州医科大学学报, 2020, 45(8): 894-898
- [24] D'Andrea MR, Howanski RJ, Saller CF. MAP-2 IHC detection: a marker of antigenicity in CNS tissue[J]. Biotech Histochem, 2017, 92(5): 363-373
- [25] Ran Ch, Chen X. Probing the coding logic of thermosensation using spinal cord calcium imaging[J]. Exp Neurol, 2019, 318: 42-49
- [26] McKenzie M, Lim SC, Duchon MR. Simultaneous Measurement of Mitochondrial Calcium and Mitochondrial Membrane Potential in Live Cells by Fluorescent Microscopy [J]. J Vis Exp. 2017, (119): 55166
- [27] Liu Z, Sheng J, Peng G. TGF- β 1 Regulation of P-JNK and L-Type Calcium Channel Cav1.2 in Cortical Neurons [J]. J Mol Neurosci, 2018, 64(3): 374-384