

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00238

· 论 著 ·

氢气饱和生理盐水对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

刘颖^{1,2}, 孙强², 张威³, 蔡健美³, 李润平^{2*}, 吕世军^{1*}

- 1. 潍坊医学院病理学教研室, 潍坊 261042
- 2. 第二军医大学海医系潜水医学教研室, 上海 200433
- 3. 第二军医大学长海医院神经内科, 上海 200433

[摘要] **目的** 研究氢气饱和生理盐水对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及作用机制。**方法** 采用大鼠大脑中动脉栓塞模型(MCAO), 24 h后断头取脑, 用 TTC 染色法检测脑组织梗死体积, 干湿法测定脑组织含水量, 尼氏染色观察大鼠大脑皮质细胞损伤程度, ELISA 法测定脑组织内 IL-1 β 、TNF- α 含量。**结果** 与对照组相比, 氢饱和生理盐水组能够减少 MCAO 脑梗死体积、减轻皮质区水肿、增加神经元尼氏小体, 明显减少脑组织 IL-1 β 和 TNF- α 含量 ($P < 0.05$)。**结论** 氢气饱和生理盐水能减轻脑组织缺血再灌注损伤程度, 其机制可能与其抑制炎症反应有关。

[关键词] 氢气饱和生理盐水; 脑缺血; 再灌注损伤

[中图分类号] R 743 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)03-0238-04

Protective effect of saturated hydrogen saline against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

LIU Ying^{1,2}, SUN Qiang², ZHANG Wei³, CAI Jian-mei³, LI Run-ping^{2*}, LÜ Shi-jun^{1*}

- 1. Department of Pathology, Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong, China
- 2. Department of Diving Medicine, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
- 3. Department of Neurology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To study the protective effect of saturated hydrogen saline against cerebral ischemia-reperfusion injury and the related mechanism. **Methods** Rat middle cerebral artery occlusion (MCAO) models were established by thread ligation of the middle cerebral artery. The rats were sacrificed 24 h later. The cerebral infarction volume was determined by TTC staining, the water content in brain tissue by dry-wet weight method, the degree of cerebral cells by Nissl staining, and the levels of IL-1 β and TNF- α in the ischemic cerebral tissues by ELISA. **Results** Compared with control group, hydrogen saline decreased the brain water content and cerebral infarction volume, and increased the quantity of nissel's body in the cortex; meanwhile, it also significantly decreased the concentrations of IL-1 β and TNF- α in brain tissue ($P < 0.05$). **Conclusion** Hydrogen saline can alleviate the cerebral ischemia-reperfusion injury, probably by inhibiting the inflammation response.

[Key words] saturated hydrogen saline; brain ischemia; reperfusion injury

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(3):238-241]

缺血性脑血管病是患者致死、致残的最主要疾病之一, 缺血再灌注损伤是缺血性脑血管病最重要的病理生理过程。研究表明, 氧化应激和炎症是缺血再灌注损伤产生的重要因素^[1]。脑缺血再灌注损伤后, 神经胶质细胞、内皮细胞和炎症细胞激活并释放大量活性氧和炎症因子, 炎症反应与氧化损伤相互促进, 共同造成组织损伤^[2-3]。

最近日本学者 Ohsawa 等^[4-5]发现, 氢气能特异

性中和羟自由基和过氧亚硝基阴离子, 能治疗动物脑组织和肝脏缺血再灌注损伤, 这引起了人们的关注^[6-8]。我们前期研究也发现, 呼吸 2% 氢气对新生大鼠大脑缺血缺氧有明显保护作用^[9]。此后进一步证明腹腔注射氢气饱和生理盐水对新生大鼠缺血缺氧同样有保护作用^[10]。本实验采用经典的线栓法制作大鼠大脑中动脉阻塞脑缺血再灌注模型, 研究氢气饱和生理盐水治疗脑缺血再灌注损伤的作用及抗

[收稿日期] 2009-10-21 [接受日期] 2010-01-11

[基金项目] 国家自然科学基金(30971199), 军队“十一五”科技攻关课题(08G066)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30971199) and Project of the “11th Five-Year Plan” for Tackling Scientific Program of PLA(08G066)。

[作者简介] 刘颖, 硕士生。E-mail: lucia07008@163.com

* 通讯作者 (Corresponding authors). Tel: 0536-8462035, E-mail: sjlu@wfmcc.edu.cn; Tel: 021-81871144, E-mail: smartrpli@hotmail.com

炎症机制。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂 健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,体质量 250~280 g,由中国科学院上海分院实验动物中心提供。动物中心许可证号: scxk(沪) 2007-0005。氢气购于上海基量标准气体有限公司。氢气饱和生理盐水的制备:在 0.5 MPa 压力下加压暴露 4 h,将纯氢气溶解于正常生理盐水中达到饱和水平,4℃贮存。氯化 2,3,5-三苯基四氮唑(TTC)购自美国 Sigma 公司。考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒、IL-1 β 试剂盒、TNF- α 试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 分组与给药方法 SD 大鼠 72 只,随机分为假手术组、模型组、氢气治疗组,每组 24 只。其中 8 只行 TTC 染色,8 只行组织切片 Nissl 染色,8 只行脑组织匀浆制备测 IL-1 β 、TNF- α 。氢气治疗组大鼠于再灌注的同时腹腔注射给药,每 100 g 体质量 1 ml。假手术组、模型组腹腔注射等体积生理盐水。

1.3 脑缺血再灌注模型的建立 手术方法参照 Zea-Longa 等^[13]线栓法加以改良。10%水合氯醛(每 100 g 0.3 ml)腹腔内注射麻醉后,大鼠自主呼吸,手术过程中必要时追加麻醉药物。一个温度传感器插入颞肌下用来监测颅骨膜温度,手术过程中用加热毯保持颅骨膜温度在 37~38.7℃。尾动脉插入套管针,持续监测血压和血糖、血气等指标。大鼠取仰卧位固定在手术台上,取右侧颈旁正中切口,钝性分离皮下组织,暴露并游离出颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉,将颈外动脉主干缝扎,然后将颈总动脉近心端结扎,颈内动脉用微动脉夹夹闭。在颈总动脉的近颈外动脉起始部剪一小口,将准备好经过处理的碳素线头端插入颈内动脉,松开微动脉夹,将尼龙线缓缓上推,直至大脑中动脉开口处,约为 (1.8 \pm 0.5) cm。此时可感到栓线稍有阻力。在切口稍上方结扎,逐层缝合切口。栓线与皮肤外留 5 mm 左右。缺血 90 min 后拔除尼龙线,造成缺血再灌注损伤模型。待大鼠完全清醒后送回动物房饲养、观察。采用 Longa 评分标准,评分在 1~3 分的大鼠认为模型制作成功,纳入实验分组;将出血较多,提前死亡,取脑时发现蛛网膜下隙出血的大鼠剔除。假手术组栓线不插入颈内动脉颅内段,其余同上。

1.4 脑组织含水量测定 术后 24 h 快速断头取脑,分别取右脑半球,在精确电子秤上称质量,然后

放入 105℃的烤箱内 48 h。48 h 后,样本再次称质量。脑含水量用 Ellis 公式计算:脑含水量=[(湿质量-干质量)/湿质量] \times 100%。

1.5 TTC 染色 术后 24 h 用 10%水合氯醛每 100 g 0.45 ml 腹腔注射麻醉后断头取脑。将脑组织于 -20℃中 15 min 内取出,切去额端 1 mm,由前向后每隔 2 mm 作冠状切片,共切 5 片。置于 1%TTC 磷酸缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.4)中,37℃避光孵育,每隔 15 min 翻面,共孵育 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 Nissl 染色 石蜡切片常规脱蜡入水,甲苯胺蓝染液预热至 50℃,染 5 min,ddH₂O 漂洗 5 min,95%乙醇分化(镜下控制分化程度),ddH₂O 漂洗,37℃烘干,中性树胶封片。

1.7 IL-1 β 和 TNF- α 含量检测 术后 24 h 断头取脑,将右侧(患侧)大脑匀浆取上清,用 ELISA 法检测脑组织中 IL-1 β 、TNF- α 含量。具体操作按照说明书进行。

1.8 统计学处理 染色切片经德国 Leica 系统照相,所得计量数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学分析应用 SPSS 11.0 软件,两两间比较采用 SNK- q (Student-Newman-Keuls)检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑水肿情况 与假手术组(77.69 \pm 0.60)%相比,模型组缺血再灌注侧(右侧)脑组织含水量(84.05 \pm 0.96)%显著增加($P < 0.01$)。氢气生理盐水治疗组(78.82 \pm 1.09)%与模型组相比显著减少($P < 0.05$);但仍高于假手术组($P < 0.05$)。结果表明,氢气生理盐水组可显著减轻缺血侧脑半球脑水肿。

2.2 TTC 染色 缺血再灌注后 24 h,模型组缺血侧脑组织有明显梗死(23.99 \pm 3.59)%,氢气生理盐水组梗死体积(7.27 \pm 3.57)%明显减少($P < 0.01$),见图 1。结果表明,氢气生理盐水治疗可减少大鼠脑缺血再灌注损伤后脑梗死。

2.3 Nissl 染色 Nissl 染色结果显示,假手术组神经元胞体较大、胞质蓝染、核圆呈空泡状,胶质细胞呈细小蓝色颗粒状。模型组神经元萎缩深染、细胞间隙增宽、部分神经元消失,坏死区胶质细胞增生明显。氢气生理盐水治疗组正常神经元数目明显多于模型组,神经元胞质内尼氏体增多,见图 2。

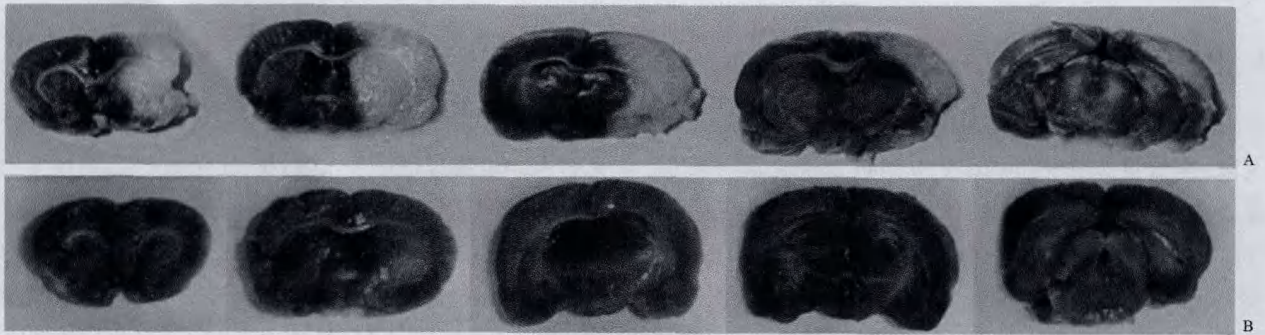


图1 各组 TTC 染色结果

Fig 1 Effect of hydrogen saline on TTC staining at 24 hour after middle cerebral artery occlusion

A: Control group; B: Hydrogen saline group

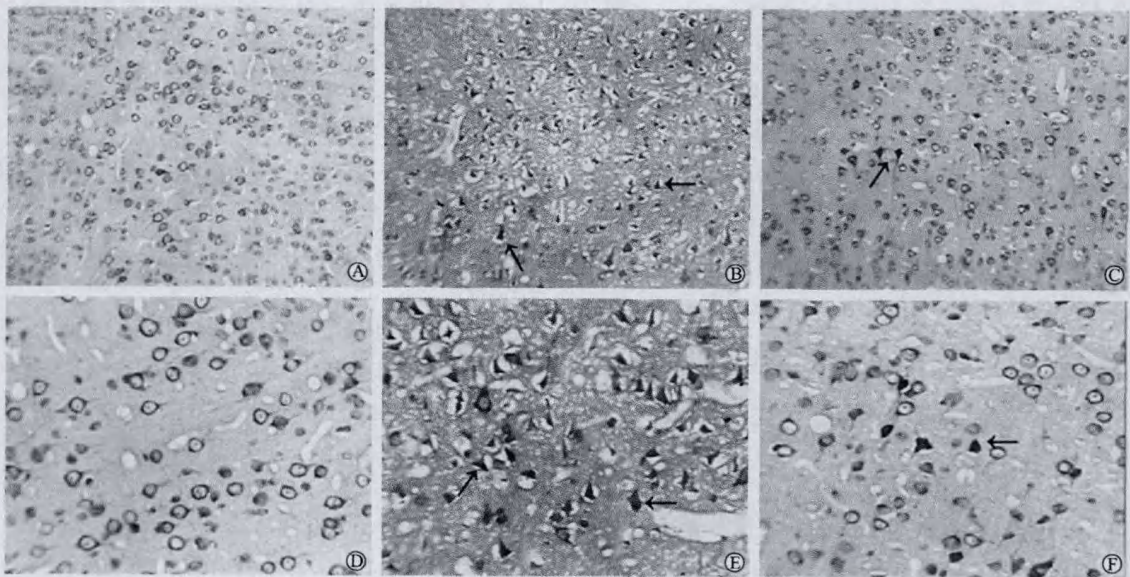


图2 各组 Nissl 染色结果

Fig 2 Nissl staining results

A, D; Sham group; B, E; Control group; C, F; Hydrogen saline group. Compared with hydrogen saline group (C, D), more neurons in MCAO group (B, E) were shrunk with intercellular space enlarged and had deep color staining (arrow spot). Original magnification: $\times 100$ (A-C); $\times 200$ (D-F)

2.4 氫水对 MCAO 大鼠脑组织 IL-1 β 和 TNF- α 含量的影响 假手术组、模型组和氫水治疗组 IL-1 β 含量分别为 (18.05 \pm 5.26)、(46.89 \pm 6.12)、(25.70 \pm 1.7) pg/mg。TNF- α 含量在假手术组是 (7.32 \pm 1.67) pg/mg, 模型组是 (30.41 \pm 7.39) pg/mg, 氫水治疗组是 (9.72 \pm 1.44) pg/mg。氫水治疗组与模型组和假手术组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

缺血性脑血管病的治疗原则是及时恢复血流, 临床上可通过溶栓等治疗手段及时恢复缺血区血液供应, 但随着血流的恢复, 反而产生更严重的创伤,

也就是缺血再灌注损伤。缺血再灌注损伤的发生机制比较复杂, 目前认为, 自由基增多、炎症反应、神经元兴奋毒性、钙超载、内皮细胞损伤、细胞凋亡增加等多种因素均参与缺血再灌注损伤, 在这些因素中, 缺血再灌注后脑组织内过度的炎症反应越来越受到重视。针对缺血再灌注损伤, 目前仍缺乏特别有效的治疗手段。

Ohsawa 等^[4]发现, 呼吸 2% 的氫气能有效改善大鼠缺血后脑梗死体积, 并抑制小胶质细胞增生。Fukuda 等^[5]发现呼吸氫气对肝脏的缺血再灌注损伤有保护作用。Hayashida 等^[10]实验证明, 呼吸氫气可以改善心脏的缺血再灌注损伤。我们^[12]采用腹腔注射氫气饱和生理盐水, 发现氫气可治疗新生大

鼠缺血缺氧损伤^[11],此外氢气饱和生理盐水对心脏的缺血再灌注损伤的保护作用类似 Hayashida 等^[10]的研究结果。考虑到腹腔注射生理盐水比呼吸氢气更加安全、方便,本实验旨在研究腹腔注射氢气饱和生理盐水是否同呼吸氢气一样,对大鼠缺血再灌注损伤有治疗作用,实验结果与我们的预期一致。

脑水肿是脑缺血的特征性表现,其发生机制可能与脑缺血再灌注过程中,内皮细胞间隙紧密连接疏松开放,通透性增高;细胞膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性下降,细胞内钠离子潴留;或是缺血再灌注引起大量自由基生成,造成生物膜损伤。采用干湿重法,本研究发现模型组脑组织含水量明显高于假手术组,应用氢气治疗后,缺血侧脑组织含水量显著低于模型组,提示氢气可有效治疗脑水肿。研究还发现,氢气治疗后脑梗死体积明显减小,形态学发现脑组织结构清晰、尼氏体明显增多。结果表明,氢饱和生理盐水对脑缺血再灌注损伤具有治疗作用。

参与炎症反应的细胞因子非常多,目前认为, $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 是参与损伤的重要代表。脑缺血再灌注可诱导 $\text{TNF-}\alpha$ 表达,在缺血脑损伤早期 $\text{TNF-}\alpha$ 由神经细胞,晚期由单核/巨噬细胞分泌。 $\text{TNF-}\alpha$ 通过与细胞表面受体结合启动细胞凋亡和死亡,也可促进炎症反应。 $\text{IL-1}\beta$ 主要来源于星形胶质细胞、少突胶质细胞、神经元和血管内皮细胞。此外小胶质细胞和外周入侵的巨噬细胞可分泌 $\text{IL-1}\beta$ 。 $\text{IL-1}\beta$ 大量释放后,可通过诱导黏附分子表达,促使大量中性粒细胞进入中枢神经系统,导致过度炎症;可激活内皮细胞产生多种活性物质,导致脑缺血加重;促进脑内兴奋性氨基酸和自由基等神经毒性物质的产生和释放引起组织损伤。这种炎症反应产生以及对组织造成损伤的机制可能与大脑缺血再灌注后会产生大量的自由基有关,大脑缺血再灌注后产生的氧自由基和其他信使激活内皮细胞和胶质细胞等,产生炎症反应,释放细胞因子、黏附分子,吸引白细胞贴壁并进入脑实质,炎症本身也产生大量的自由基,形成恶性循环。氧自由基可损伤 DNA,进而和其他机制最终导致细胞凋亡。Buchholz 等^[14]发现,呼吸氢气可明显减弱肠移植后肺组织中中性粒细胞的募集反应。另有实验发现,氢气饱和生理盐水可明显减少肠缺血再灌注后肺组织中 $\text{IL-1}\beta$ 和 $\text{TNF-}\alpha$ 含量^[13]。本研究发现,氢气饱和生理盐水可使缺血侧脑组织中 $\text{IL-1}\beta$ 和 $\text{TNF-}\alpha$ 含量明显下降,说明氢气饱和生理盐水具有对抗脑缺血后炎症反应的作用,这可能是氢气饱和生理盐水治疗脑缺血再灌注损伤的重要原因。

总之,氢气饱和生理盐水可减少缺血再灌注损伤

后的脑组织水肿,减少脑组织梗死体积,降低 $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 的含量,对缺血脑组织具有明显的保护作用。

[参考文献]

- [1] Zhang N, Komine-Kobayashi M, Tanaka R, Liu M, Mizuno Y, Urabe T. Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain [J]. *Stroke*, 2005, 36: 2220-2225.
- [2] Warren J S. Interleukins and tumor necrosis factor in inflammation [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 1990, 28: 37-59.
- [3] 张予阳, 刘岩, 付守延. 脑缺血与炎症反应[J]. *中国药理学通报*, 2006, 22: 5-9.
- [4] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals [J]. *Nat Med*, 2007, 13: 688-694.
- [5] Fukuda K I, Asoh S, Ishikawa M, Yamamoto Y, Ohsawa I, Ohta S. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361: 670-674.
- [6] Wood K C, Gladwin M T. The hydrogen highway to reperfusion therapy [J]. *Nat Med*, 2007, 13: 673-674.
- [7] Singhal A B, Lo E H. Advances in emerging nondrug therapies for acute stroke [J]. *Stroke*, 2008, 39: 289-291.
- [8] 孙学军, Zhang J H. 氢——一种内源性抗氧化剂[J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29: 233-235.
Sun X J, Zhang J H. Hydrogen — an endogenous antioxidant in the body [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2008, 29: 233-235.
- [9] Cai J, Kang Z, Liu W W, Luo X, Qiang S, Zhang J H, et al. Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 441: 167-172.
- [10] Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, et al. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373: 30-35.
- [11] Cai J, Kang Z, Liu K, Liu W, Li R, Zhang J H, et al. Neuroprotective effects of hydrogen saline in neonatal hypoxia-ischemia rat model [J]. *Brain Res*, 2009, 1256: 129-137.
- [12] Sun Q, Kang Z, Cai J, Liu W, Liu Y, Zhang J H, et al. Hydrogen-rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009, 234: 1212-1219.
- [13] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [14] Buchholz B M, Kaczorowski D J, Sugimoto R, Yang R, Wang Y, Billiar T R, et al. Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury [J]. *Am J Transplant*, 2008, 8: 2015-2024.
- [15] Mao Y F, Zheng X F, Cai J M, You X M, Deng X M, Zhang J H, et al. Hydrogen-rich saline reduces lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 381: 602-605.