

· 基础研究 ·

早期不同压力高压氧对中重型颅脑创伤大鼠的神经功能及 IL-1 β 、IL-10 和 SOD 表达的影响

齐亚南, 潘树义, 郭大志

[摘要] **目的** 比较早期不同压力高压氧对中重型颅脑创伤大鼠的神经功能及白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-10 和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)表达的影响。**方法** 将75只250~300g成年雄性SD大鼠随机分为5组,分别为:①创伤性脑损伤组(trumatic brain injury, TBI组),利用PCI3000精确颅脑撞击仪采用控制性皮质撞击方法建立大鼠中重型TBI模型;②假手术组(sham组),仅将颅骨开窗,不予头部打击;③1.5绝对大气压高压氧处理组(1.5 atmosphere absolute, 1.5 ATA组),在TBI组的基础上给予1.5 ATA的高压氧处理;④2.5绝对大气压高压氧处理组(2.5 ATA组),在TBI组的基础上给予2.5 ATA的高压氧处理;⑤空白对照组。所有大鼠分别在术后第1天(D1)、第3天(D3)、第7天(D7)进行颅脑损伤神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS),采用ELISA检测大鼠血清和脑组织内IL-1 β 、IL-10、SOD的表达情况。**结果** ①在D1, TBI组、1.5 ATA组和2.5 ATA组大鼠mNSS评分均显著高于sham组($P < 0.05$);在D3和D7, 2.5 ATA、1.5 ATA组mNSS评分逐渐降低,均低于TBI组($P < 0.05$), 1.5 ATA组与2.5 ATA组无显著差异($P > 0.05$);②在D1, TBI组、1.5 ATA组和2.5 ATA组大鼠血清和脑组织IL-1 β 含量均较sham组明显升高($P < 0.05$);在D3和D7, 1.5 ATA组和2.5 ATA组大鼠血清和脑组织IL-1 β 含量较TBI组均降低($P < 0.05$), 1.5 ATA组与2.5 ATA组比较无差异($P > 0.05$);③在D1, TBI组、1.5 ATA组和2.5 ATA组大鼠血清和脑组织IL-10含量较sham组均升高($P < 0.05$);在D3和D7, 1.5 ATA组和2.5 ATA组大鼠血清和脑组织IL-10含量较TBI组高($P < 0.05$),但1.5 ATA组大鼠的脑组织IL-10含量在D3和D7均高于2.5 ATA组,血清IL-10含量仅在D7时高于2.5 ATA组($P < 0.05$);④在D1和D3, TBI组、1.5 ATA组和2.5 ATA组大鼠血清和脑组织SOD含量与sham组无明显区别($P > 0.05$),在D7, 1.5 ATA组大鼠血清和脑组织SOD含量显著高于2.5 ATA组($P < 0.05$)。**结论** 早期高低不同压力高压氧治疗均可促进中重型创伤性脑损伤大鼠的神经损伤恢复,减轻神经炎症和氧化损伤,但“低压力”高压氧的抗炎和抗氧化的能力优于“高压”高压氧。

[关键词] 创伤性脑损伤;高压氧;神经炎症;氧化损伤;神经损伤

[中图分类号] R651.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-3097(2020)06-0321-05

doi: 10.3969/j.issn.2095-3097.2020.06.001

Effects of early different pressure hyperbaric oxygen on neurological function and expression of IL-1 β , IL-10 and SOD in rats with moderate and severe traumatic brain injury in rats

QI Yanan^{1,2}, PAN Shuyi², GUO Dazhi²

(1. Cangzhou Central Hospital, Cangzhou Hebei 061000, China; 2. Department of Hyperbaric Oxygen, the Sixth Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China)

[Abstract] **Objective** To compare the effects of different pressure hyperbaric oxygen on the recovery of neurological function and the expression of interleukin (IL)-1 β 、IL-10 and superoxide dismutase (SOD) in rats with moderate and severe craniocerebral trauma. **Methods** Seventy-five male adult Sprague-Dawle rats weighted 250~300 g, were randomly divided into five groups: ① Traumatic brain injury group (TBI group): Rats were hit by with PCI3000 accurate brain impactor using controlled cortical impact method to establish the moderate and severe TBI model; ② Sham operation group (sham group): Only open the skull, no head strike; ③ 1.5 atmospheric absolute pressure hyperbaric oxygen treatment group (1.5 ATA group): Rats were given 1.5 ATA hyperbaric oxygen treatment after TBI; ④ 2.5 atmospheric absolute pressure hyperbaric oxygen treatment group:

[基金项目] 全军医学科技青年培育计划(16QNP018);军事医学创新工程(16CXZ003);后勤科研重点项目(BHJ16J021)

[作者单位] 061000 河北 沧州,沧州市中心医院(齐亚南);100048 北京,中国人民解放军总医院第六医学中心高压氧科(齐亚南,潘树义,郭大志)

[通讯作者] 郭大志, E-mail: guodazhi@1983@163.com

Rats were given 2.5 ATA hyperbaric oxygen treatment after TBI; ⑤ Control group: no any treatment. All rats were evaluated by modified neurological severity score (mNSS) on day 1 (D1), day 3 (D3), and day 7 (D7) after TBI respectively. The serum and brain tissue were also collected to detect the expression of IL-1 β , IL-10 and SOD by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** ① on D1, the mNSS score in TBI group, 1.5 ATA group and 2.5 ATA group was significantly higher than in sham group ($P < 0.05$); on D3 and D7, the mNSS scores in the 2.5 ATA and 1.5 ATA groups gradually decreased and were lower than in TBI group ($P < 0.05$), but there was no significant difference between 1.5 ATA and 2.5 ATA ($P > 0.05$). ② on D1, the level of IL-1 β in serum and brain tissues in TBI, 1.5 ATA and 2.5 ATA group was significantly higher than in sham group ($P < 0.05$); on D3 and D7, the level of IL-1 β in 1.5 ATA and 2.5 ATA group was lower than that in TBI group ($P < 0.05$), but there was no difference between 1.5 ATA and 2.5 ATA group ($P > 0.05$); ③ on D1, the level of IL-10 in serum and brain tissues in TBI, 1.5 ATA and 2.5 ATA group was higher than in sham group ($P < 0.05$); on D3 and D7, the level of IL-10 in serum and brain tissues in 1.5 ATA group and 2.5 ATA group was higher than in TBI group ($P < 0.05$), and in brain tissues, the level of IL-10 in 1.5 ATA group was higher than 2.5 ATA group on D3 and D7, but in serum, the level of IL-10 in 1.5 ATA group was higher than 2.5 ATA group only on D7 ($P < 0.05$); ④ on D1 and D3, the level of SOD in serum and brain tissue in TBI, 1.5 ATA and 2.5 ATA group was not significantly different from that of sham group ($P > 0.05$), while on D7 the level of SOD in serum and brain tissue in 1.5 ATA group was significantly higher than in 2.5 ATA group ($P < 0.05$). **Conclusion** Early different pressure hyperbaric oxygen therapy can promote the recovery of neural function, reduce the neuroinflammation and oxidative stress reaction in rats with moderate and severe TBI. However, "Low pressure" hyperbaric oxygen has better anti-inflammatory and anti-oxidant capabilities than "high pressure".

[**Key words**] Traumatic brain injury (TBI); Hyperbaric oxygen; Neuroinflammation; Oxidative damage; Nerve damage

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是外科急症之一,特别是中重型 TBI,病死率高,预后差。TBI 的病理生理过程包括原发性脑损伤和继发性脑损伤,其中继发性脑损伤是影响预后的最重要因素,神经炎症和氧化损伤是继发性脑损伤致病的最主要因素。高压氧 (hyperbaric oxygen, HBO) 能迅速有效的改善脑组织的缺氧状态,具有减轻脑水肿、减轻炎症、促进神经再生等作用,在 TBI 的治疗中有广泛应用。因此本实验拟使用 PCI3000 精确颅脑撞击仪 (深圳瑞沃德科技公司),采用控制性皮质撞击 (cortical impact injury, CCI) 方法建立中重型 TBI 大鼠模型,分别给予 1.5 绝对大气压 (atmosphere absolute, ATA) 和 2.5 ATA 高压氧处理,比较两种不同压力高压氧对中重型颅脑创伤大鼠的神经功能及白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 、IL-10 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康清洁级成年雄性 SD 大鼠 [北京科宇动物养殖中心, SCXK (京) 2006-008], 体质量 250~300 g, 共计 75 只分为 5 组。①

TBI 组 ($n = 15$): 建立 TBI 模型成功且术后第 1 天 (D1) 改良神经功能缺损评分 (modified neurological severity score, mNSS) 7~18 分; ② 假手术组 (sham 组, $n = 15$): 仅将颅骨开窗, 不予头部打击; ③ 1.5 ATA 组 ($n = 15$): 在 TBI 组的基础上给予 1.5 ATA 治疗; ④ 2.5 ATA 组 ($n = 15$): 在 TBI 组的基础上给予 2.5 ATA 治疗; (5) 空白对照组 ($n = 15$): 不给予处理, 正常饲养。预实验结果表明 sham 组与空白对照组各观察指标无显著性差异。

1.2 TBI 模型建立 利用 PCI3000 精确颅脑撞击仪参照 CCI 方法建立模型^[1]。术前大鼠均禁食禁水 6~8 h。大鼠用小动物麻醉机 (异氟烷) 麻醉后, 俯卧位将大鼠头颅固定于脑立体定向仪上, 调节仪器确保头颅保持水平。备皮消毒后, 沿颅顶正中剪开头皮, 分离骨膜, 暴露颅骨, 用脑立体定位仪确定打击位置 (前囟后 3.5 mm, 中线偏左 3 mm), 钻约 5 mm 的骨窗, 保持硬脑膜完整。打击深度 6 mm, 打击速度 4 m/s, 停留时间 500 ms, 撞击杆撞击大鼠硬脑膜。完成打击后, 骨蜡封闭骨窗, 缝合头皮, 碘伏消毒伤口。

1.3 高压氧治疗方案 大鼠颅脑创伤模型成功后,

高压氧组大鼠分别在术后 D1 进行 1.5 ATA 和 2.5 ATA 高压氧治疗,1/d(每次加压 5 min,稳压吸氧 60 min,减压 5 min),连续 7 d。

1.4 模型评价方法 在术后 D1、第3天(D3)、第7天(D7)进行 mNSS 评分^[2]。评判标准:1~6分为轻型颅脑损伤;7~12分为中型颅脑损伤;13~18分为重型颅脑损伤。术后 D1 选择 mNSS 评分为 7~18分大鼠为中重型 TBI 模型。

1.5 血清 IL-1 β 、IL-10、SOD 的含量测定 分别在术后 D1、D3、D7 采集各组大鼠的尾静脉血,采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清 IL-1 β 、IL-10、SOD 的含量。

1.6 脑组织 IL-1 β 、IL-10、SOD 的含量测定 分别在术后 D1、D3、D7 处死各组大鼠,提取损伤侧海马处的脑组织,采用酶联免疫吸附法检测 IL-1 β 、IL-10 和 SOD。

1.7 统计学处理 用 GraphPad Prism 6.0 和 SPSS 19.0 软件分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 LSD-t,多组间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 不同压力高压氧对大鼠 mNSS 评分的影响

在 D1,TBI 组、1.5 ATA 组和 2.5 ATA 组 mNSS 评分均高于 sham 组($P<0.05$),但 3 组间差异无统计学意义($P>0.05$);在 D3 和 D7,1.5 ATA 组和 2.5 ATA 组 mNSS 评分均低于 TBI 组,差异有统计学意义($P<0.05$),1.5 ATA 组和 2.5 ATA 组 mNSS 评分比较差异无统计学意义($P>0.05$),图 1。

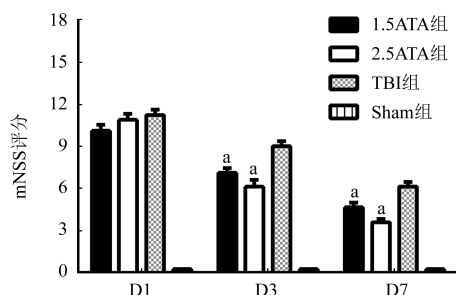


图1 各组大鼠不同时间神经功能缺损评分统计(* $P<0.05$)

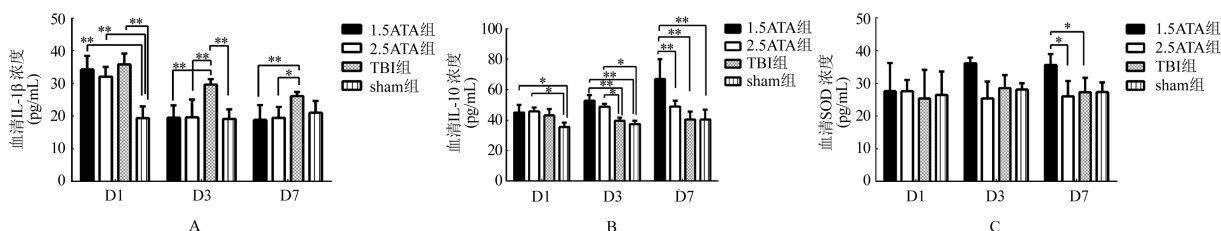


图2 血清 IL-1 β 、IL-10 和 SOD 含量(* $P<0.05$; ** $P<0.01$)

2.2 不同压力高压氧对血清 IL-1 β 、IL-10 和 SOD 含量的影响 在 D1,TBI 组、1.5 ATA 组和 2.5 ATA 组血清 IL-1 β 含量较 sham 组均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);在 D3 和 D7,1.5 ATA 组和 2.5 ATA 组 IL-1 β 含量较 TBI 组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),但 1.5 ATA 与 2.5 ATA 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),图 2A。在 D1,TBI 组、1.5 ATA 组和 2.5 ATA 组血清 IL-10 含量较 sham 组均升高,差异有统计学意义($P<0.05$);在 D3 和 D7,1.5 ATA 组和 2.5 ATA 组 IL-10 含量较 TBI 组明显升高($P<0.05$),1.5 ATA 组 IL-10 含量比 2.5 ATA 组升高更显著,差异有统计学意义($P<0.05$),图 2B。在 D1 和 D3,TBI 组、1.5 ATA 组和 2.5 ATA 组血清 SOD 含量与 sham 组比较差异无统计学意义($P>0.05$);在 D7,1.5 ATA 组血清 SOD 含量较 TBI 组明显升高,1.5 ATA 组 SOD 含量比 2.5 ATA 组升高更显著,差异有统计学意义($P<0.05$),图 2C。

2.3 不同压力高压氧对脑组织内 IL-1 β 、IL-10 和 SOD 含量的影响 在 D1,TBI 组、1.5 ATA 组和 2.5 ATA 组脑组织 IL-1 β 含量较 sham 组均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);在 D3 和 D7,1.5 ATA 组和 2.5 ATA 组 IL-1 β 含量较 TBI 组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),但 1.5 ATA 与 2.5 ATA 组比较无统计学意义($P>0.05$),图 3A。在 D1,TBI 组、1.5 ATA 组和 2.5 ATA 组 IL-10 含量较 sham 组均升高,差异有统计学意义($P<0.05$);在 D3 和 D7,1.5 ATA 组和 2.5 ATA 组 IL-10 含量较 TBI 组明显升高,1.5 ATA 组 IL-10 含量比 2.5 ATA 组升高更显著,差异有统计学意义($P<0.05$),图 3B。在 D1 和 D3,TBI 组、1.5 ATA 组和 2.5 ATA 组 SOD 含量较 sham 组无明显区别($P>0.05$);在 D7,1.5 ATA 组脑组织 SOD 含量较 TBI 组明显升高,1.5 ATA 组 SOD 含量比 2.5 ATA 组升高更显著,差异有统计学意义($P<0.05$),图 3C。

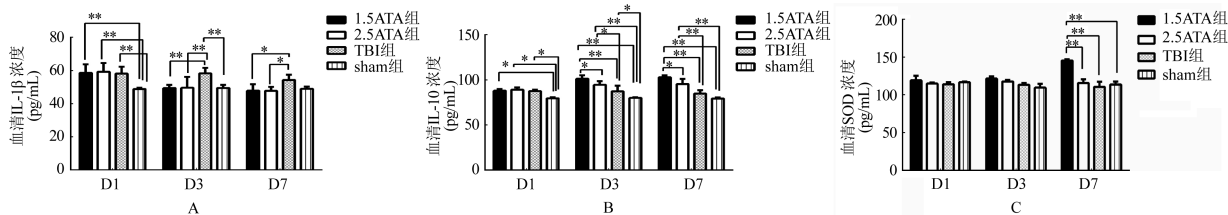


图3 脑组织内 IL-1β、IL-10、SOD 含量(* P<0.05; ** P<0.01)

3 讨论

3.1 炎症反应在创伤性脑损伤发生发展中的作用和变化规律 大量临床和基础研究表明,炎症反应和氧化损伤在创伤性脑损伤的发生、发展和预后中起到关键作用^[3-4]。IL-1β 是一种促炎因子,能够刺激粘附分子的表达,增加白细胞在内皮细胞的粘附,使白细胞聚集在缺血灶周围,从而加重继发性脑损伤及神经细胞凋亡,此外,IL-1β 又能激活巨噬细胞和星形细胞,诱导神经细胞凋亡^[5]。Ni 等^[6]证实, TBI 大鼠与 sham 组、假手术组相比较,数小时内脑内 IL-1β 的含量明显升高。给予骨髓间充质干细胞治疗后, TBI 组大鼠的 IL-1β 含量及 mNSS 评分均降低。本研究发现,中重型创伤性脑损伤大鼠血清和脑组织 IL-1β 的含量显著升高,早期高压氧治疗可显著降低 IL-1β 的含量,提示高压氧可降低促炎因子水平,减轻神经炎症损伤,但高压与低压力高压氧治疗效果并无显著性差异。

生物体内往往存在“自我平衡”机制,有促炎因子必有抗炎因子。IL-10 便是体内抗炎因子的代表,主要来源于单核巨噬细胞和 T 辅助细胞,通过抑制多种炎症因子的活化和炎症因子的产生而降低炎症反应^[7]。Yuan 等^[8]研究发现,既往收治的颅脑创伤患者在入院 48 h 内 IL-1β、IL-10 的含量均明显升高,且有研究发现在大鼠实验中验证得出,颅脑创伤组大鼠 IL-1β、IL-10 含量均高于 sham 组。这提示炎症反应和抗炎过程是一对“双生子”,始终贯穿于 TBI 的发生发展过程中。本研究发现,中重型创伤性脑损伤大鼠血清和脑组织 IL-10 的含量显著升高,早期高压氧治疗可进一步促进 IL-10 含量升高,提示高压氧不但具有抗炎作用,还可以增加机体自身抵抗炎症损伤能力。此外,本研究发现低压力高压氧的“抗炎”效果更好。

血清 SOD 是生物体内重要的抗氧化酶,是清除自由基的首要物质,能够催化超氧阴离子等自由基发生歧化反应,维持机体内氧自由基的动态平

衡^[9]。SOD 可提高机体抗氧化水平,降低氧化物的含量,减轻脑损伤周围脑组织的氧化应激反应,促进脑损伤的恢复。Chen 等^[10]研究显示, TBI 后 6 h 氧化应激即可显著增加,大鼠血清中 SOD 含量先下降、后升高,表明氧化应激反应是 TBI 脑损伤的重要机制之一。本研究进一步探讨高低两种压力高压氧治疗对氧化损伤的作用效果发现,早期高压氧治疗可显著增加中重型创伤性脑损伤大鼠血清和脑组织中 SOD 含量升高,且 1.5 ATA 组大鼠 SOD 含量比 2.5 ATA 组升高更显著,提示早期高压氧治疗不仅不会增加氧化损伤,反而具有增加机体抗氧化应激能力,且低压力高压氧效果更优。

3.2 高压氧压力在神经损伤中的作用 大量研究表明高压氧对脑损伤具有积极的治疗作用及效果^[11]。但是,尚不清楚哪种高压氧治疗压力更有利于降低神经细胞的炎症反应,更有利于促进脑损伤的恢复。Cui 等^[12]对现有的动物实验进行 Meta 分析发现,给予脑损伤大鼠 3.0 ATA 高压氧治疗与 2.0 ATA 高压氧治疗,均可减轻脑水肿情况,但并无明显差别。研究发现,给予脑损伤大鼠 2.5 ATA、3.0 ATA 高压氧治疗后,梗塞面积及血流均明显改善^[13-14]。上述研究提示,高压力的高压氧对减轻脑水肿、改善损伤区域血供和氧供效果更好。此外, Harch 等^[15]发现给予脑损伤大鼠 1.5 ATA 高压氧治疗后,大鼠在水迷宫实验中学习成绩显著提高。Kusuda 等^[16]研究发现,给予帕金森病模型大鼠 1.3 ATA 高压氧治疗后,高压氧组大鼠在旋转木马和平衡木试验中评分均优于对照组。以上文献报道说明,低压力的高压氧治疗在促进神经损伤方面也有着一定的疗效。因此,未来有必要进一步研究高压氧压力在治疗不同类型神经损伤中的作用和机制。

本研究结果发现,早期高低不同压力高压氧治疗均可促进中重型创伤性脑损伤大鼠的神经损伤恢复,减轻神经炎症和氧化损伤,“低压力”高压氧的抗炎和抗氧化的能力优于“高压力”高压氧,从经济

性和安全性角度考虑,低压力高压氧在中重型创伤性脑损伤的治疗中更值得临床推广。但是,本研究尚存在以下不足:(1)本实验采用啮齿类动物大鼠作为研究对象,其自身神经损伤修复能力比灵长类(人)强,减少了不同处理组效果的差异性;(2)炎症反应往往发生于创伤性脑损伤的数分钟到数小时内,本研究是比较不同压力高压氧治疗后1 d、3 d和7 d的IL-1 β 、IL-10、SOD表达情况,其可能不是炎症反应的关键作用时间。将来需要更进一步的动物和临床研究。

【参考文献】

- [1] Tran HT, Laferla FM, Holtzman DM, et al. Controlled cortical impact traumatic brain injury in 3xTg-AD mice causes acute intra-axonal amyloid- β accumulation and independently accelerates the development of tau abnormalities[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(26):9513-9525.
- [2] Wen Z, Xu X, Xu L, et al. Optimization of behavioural tests for the prediction of outcomes in mouse models of focal middle cerebral artery occlusion [J]. *Brain Res*, 2017, 1665:88-94.
- [3] Vlodavsky E, Palzur E, Soustiel JF. Hyperbaric oxygen therapy reduces neuroinflammation and expression of matrix metalloproteinase-9 in the rat model of traumatic brain injury[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2006, 32(1):40-50.
- [4] Loane DJ, Kumar A, Stoica BA, et al. Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: association with chronic microglial activation [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2014, 73(1):14-29.
- [5] Wang J, Doré S. Inflammation after intracerebral hemorrhage[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(5):894-908.
- [6] Ni Haoqi, Yang Su, Siaw-Debrah Felix, et al. Exosomes derived from bone mesenchymal stem cells ameliorate early inflammatory responses following traumatic brain injury [J]. *Frontiers in neuroscience*, 2019, 13:A14.
- [7] Vagnozzi R, Tavazzi B, Signoretti S, et al. Temporal window of metabolic brain vulnerability to concussions: mitochondrial-related impairment-part I [J]. *Neurosurgery*, 2007, 61(2):379-388.
- [8] Yuan J, Zhang J, Cao J, et al. Geniposide alleviates traumatic brain injury in rats via anti-inflammatory effect and MAPK/NF- κ B inhibition [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(4):511-520.
- [9] Wang IJ, Karmaus WJ. Oxidative stress-related genetic variants may modify associations of phthalate exposures with asthma [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 14(2):162.
- [10] Chen J, Chen W, Han K, et al. Effect of oxidative stress in rostral ventrolateral medulla on sympathetic hyperactivity after traumatic brain injury [J]. *Eur J Neurosci*, 2019, 50(2):1972-1980.
- [11] Tal S, Hadanny A, Sasson E, et al. Hyperbaric Oxygen Therapy Can Induce Angiogenesis and Regeneration of Nerve Fibers in Traumatic Brain Injury Patients [J]. *Front Hum Neurosci*, 2017, 11:508.
- [12] Cui HJ, He HY, Yang AL, et al. Hyperbaric oxygen for experimental intracerebral haemorrhage: Systematic review and stratified meta-analysis [J]. *Brain Inj*, 2017, 31(4):456-465.
- [13] Lin PY, Sung PH, Chung SY, et al. Hyperbaric oxygen therapy enhanced circulating levels of endothelial progenitor cells and angiogenesis biomarkers, blood flow, in ischemic areas in patients with peripheral arterial occlusive disease [J]. *J Clin Med*, 2018, 7(12):548.
- [14] Yin D, Zhou C, Kusaka I, et al. Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(7):855-864.
- [15] Harch PG, Kriedt C, Meter KW, et al. Hyperbaric oxygen therapy improves spatial learning and memory in a rat model of chronic traumatic brain injury [J]. *Brain Res*, 2007, 1174:120-129.
- [16] Kusuda Y, Takemura A, Nakano M, et al. Mild hyperbaric oxygen inhibits the decrease of dopaminergic neurons in the substantia nigra of mice with MPTP-induced Parkinson's disease [J]. *Neurosci Res*, 2018, 132:58-62.

(收稿日期:2019-12-20 本文编辑:李记文)