

. 实验研究 .

高压氧促进小鼠脊髓损伤后功能恢复

廖小俊 李 兰 陈亚星 文泽贤

【摘要】目的 探讨高压氧(HBO)治疗小鼠脊髓损伤的效果及机制。方法 将雌性ICR小鼠45只随机分为3组:假手术组(n=15)、模型组(n=15)、HBO组(n=15)。应用血管夹损伤脊髓组织制作脊髓损伤模型。模型组造模后常规护理,HBO组行HBO治疗。造模后1、7、28 d采用BMS评分评估小鼠后肢运动功能;造模后7 d,采用免疫印迹法检测损伤脊髓组织Nrf2蛋白表达情况,采用免疫荧光染色观察细胞核Nrf2移位情况。结果 假手术组BMS评分均为9分。造模后1 d,模型组和HBO组BMS评分均为0分,后肢完全瘫痪。造模7 d,模型组BMS评分仍为0分;HBO组MBS评分明显高于模型组($P<0.05$),但明显低于假手术组($P<0.05$);造模后28 d,模型组和HBO组BMS评分均明显提高($P<0.05$),HBO组提高更明显($P<0.05$)。造模后7 d,免疫荧光染色显示,假手术组没有发现Nrf2核移位,模型组可见少量Nrf2核移位,HBO组Nrf2核移位明显增多;免疫印迹法结果显示,模型组和HBO组Nrf2表达水平明显增高($P<0.05$),HBO组增高更明显($P<0.05$)。结论 HBO治疗可显著促进小鼠脊髓损伤后神经功能恢复,机制可能与促进Nrf2表达及核移位有关。

【关键词】脊髓损伤;高压氧治疗;Nrf2;小鼠

【文章编号】1009-153X(2021)01-0035-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 651.2; Q 786

Hyperbaric oxygen therapy promotes functional rehabilitation of mice after spinal cord injury

LIAO Xiao-jun¹, LI Lan², CHEN Ya-xin², WEN Ze-xian². 1. Department of Neurosurgery, The 941st Hospital of Joint Logistics Force, PLA, Xining 810007, China; 2. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Army Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】Objective To explore the effect of hyperbaric oxygen (HBO) therapy on the spinal cord injury (SCI) in mice. Methods Forty-five female ICR mice were randomly divided into 3 groups: sham operation group (n=15), injury group (n=15), and HBO group (n=15). The spinal cord tissue was injured by the vascular clip to make the SCI model. The injury group received routine care after injury, and the HBO group received HBO therapy. BMS score was used to evaluate the motor function of mice hind limbs 1, 7, and 28 days after injury. Seven day after injury, the expression of Nrf2 protein in the injured spinal cord tissues was detected by Western blotting, and the shift of nuclear Nrf2 was observed by immunofluorescence staining. Results Seven days after injury, the MBS score of the HBO group was significantly higher than that of the injury group ($P<0.05$), but it was significantly lower than that of the sham operation group ($P<0.05$). Twenty-eight days after injury, the BMS scores in the injury and HBO groups significantly increased ($P<0.05$), and the BMS score in the HBO group was significantly higher than that in the injury group ($P<0.05$). Seven days after injury, immunofluorescence staining showed that there was no nuclear translocation of Nrf2 in the sham operation group, a small amount of nuclear translocation of Nrf2 in the injury group, and significant increase in the nuclear translocation of Nrf2 in the HBO group. The expression level of Nrf2 was significantly higher in the HBO group than the injury group ($P<0.05$), which was significantly higher than the sham operation group ($P<0.05$). Conclusion HBO therapy can significantly promote the recovery of nerve function after SCI in mice, which may be related to the promotion of Nrf2 expression and nuclear translocation.

【Key words】Spinal cord injury; Hyperbaric oxygen therapy; Mouse; Nrf2

脊髓损伤包括原发性和继发性损伤,原发性损伤不可逆,治疗重点在继发性损伤^[1]。高压氧治疗(hyperbaric oxygen, HBO)可减少脊髓损伤后继发性损伤^[2],机制主要有减轻炎症反应、抑制神经元凋亡、

减轻脊髓水肿、促进血管再生、促进轴突再生等^[3]。Nrf2具有神经保护作用,是否参与HBO治疗脊髓损伤的机制,目前尚不清楚。本研究拟采用小鼠脊髓损伤模型,分析HBO治疗对小鼠脊髓损伤后Nrf2的影响,进一步探讨HBO治疗脊髓损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 45只成年雌性ICR小鼠[购于北京华阜康生物科技股份有限公司,体质量(24±2)

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2021.01.012
作者单位:810007 西宁,解放军联勤保障部队第941医院神经外科(廖小俊);400038 重庆,陆军军医大学第一附属医院神经外科(李兰、陈亚星、文泽贤)

g)按随机数字表法分为 3 组假手术组(A 组,n=15)、模型组(B 组,n=15)、HBO 组(C 组,n=15)。

1.2 动物模型建立 腹腔注射 4%水合氯醛(10 ml/kg)麻醉小鼠,以 T11 棘突为中心,在背部正中做长约 2 cm 切口,依次切开皮肤、皮下组织,切开椎旁肌向两侧分离,显露 T9~L1 椎体棘突及椎板。小鼠左侧第 13 肋骨脊柱发出部位为 T12 与 L1 交界处,以此判定 T11 脊椎位置。咬除 T11 椎体棘突及背侧椎板,血管夹从左右两侧将 T11 节段脊髓压迫至 0.2 mm^[4],持续 15 s,保持脊膜完整,止血、缝合各层组织。假手术组只打开椎板,不损伤脊膜及脊髓。术后置于暖光灯下复苏,苏醒后 BMS 评分 0 分判断为建模成功。术后分笼饲养,每天挤压膀胱协助排尿 2 次。

1.3 HBO 治疗方法及管理 将 HBO 组小鼠置于动物实验高压氧仓,加压 10 min 使仓内压力达到 0.2 Mpa,仓内氧浓度达到 95%以上,稳压吸氧 40 min^[5],每日 1 次,共 7 d。造模后护理:每日按压膀胱排尿 2 次,间隔 12 h,直至小鼠排便功能基本恢复。

1.4 小鼠后肢运动功能评分 造模后 1、7、28 d 采用 BMS 评分法^[6]评估小鼠后肢运动功能恢复情况,每组 5 只。将小鼠置于直径 100 cm、高 30 cm 的塑料盆持续观察,按评分标准相应判分,0 分表示后肢完全瘫痪,9 分表示运动功能正常。

1.5 免疫荧光染色 造模后 7 d 取损伤部位脊髓组织及假手术组相应部位脊髓组织行免疫荧光染色,每组 5 只。以 4%多聚甲醛溶液灌注固定后,分离脊髓组织,4%多聚甲醛溶液 4 ℃后固定 24 h,30%蔗糖溶液脱水过夜,取出脊髓组织,以损伤部位为中心,前后各留取 5 mm,剪去多余脊髓,冰冻切片,厚度 14 μm。将切片于 50 ℃烤箱中烘烤 1 h,PBS 漂洗,4%多聚甲醛浸泡,1% Triton X-100 通透细胞膜,10%正常山羊血清封闭,滴加兔抗 Nrf2 多克隆抗体(1:200,美国 Abcam 公司)4℃孵育过夜,滴加 Cy3 标记山羊抗兔 IgG 抗体(1:200,美国 Beyotime 公司)37 ℃孵育 2 h,DAPI 染色,抗荧光淬灭剂封片,激光共聚焦显微镜观察结果。

1.6 免疫印迹法检测细胞核 Nrf2 蛋白表达 造模 7 d,取损伤部位脊髓组织及假手术组相应部位脊髓组织,每组 5 只。小鼠麻醉后快速取出脊髓组织,以损伤部位为中心,前后各留取 5 mm,剪去多余脊髓。将脊髓标本以细胞核蛋白抽提试剂盒抽提蛋白,BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测浓度,浓度调定一致后等体积上样,SDS-PAGE 电泳分离蛋白,湿转到 PVDF 膜,封闭 1 h,一抗 4 ℃孵育过夜(Nrf2,1:500);

二抗孵育 2 h,化学发光液显影,用 Image Lab 软件分析各条带相对值。

1.7 统计学方法 应用 SPSS 20.0 软件分析;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行单因素方差分析;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠后肢功能评分比较 假手术组各时间点 BMS 评分均为 9 分,后肢运动功能无明显异常。造模后 1 d,模型组和 HBO 组 BMS 评分均为 0 分,后肢完全瘫痪。造模 7 d,模型组 BMS 评分仍为 0 分;HBO 组 MBS 评分明显高于模型组($P<0.05$,表 1),明显低于假手术组($P<0.05$,表 1);提示后肢功能有所恢复。造模后 28 d,模型组和 HBO 组 BMS 评分均明显提高($P<0.05$,表 1),HBO 组提高更明显($P<0.05$,表 1)。

表 1 各组小鼠 BMS 评分比较(分)

组别	造模后 1 d	造模后 7 d	造模后 28 d
假手术组	9.00±0.00	9.00±0.00	9.00±0.00
对照组	0.00±0.00 [#]	0.00±0.00 [#]	2.15±0.48 ^{##}
HBO 组	0.00±0.00 [#]	0.81±0.38 ^{##}	3.42±0.51 ^{###}

注:与对照组相应值比,* $P<0.05$;与假手术组相应值比,# $P<0.05$;与造模后 1 d 相应值比,& $P<0.05$

2.2 免疫荧光染色结果 免疫荧光染色显示细胞核为蓝色,Nrf2 为红色。激光共聚焦显微镜观察,各组细胞核染色无差别,假手术组 Nrf2 染色较弱,模型组 Nrf2 染色明显增强,可见脊髓损伤后 Nrf2 表达增加。蓝色细胞核与红色荧光重叠表示 Nrf2 发生核移位,假手术组未见明显 Nrf2 核移位,HBO 组与模型组均可见部分细胞核蓝色荧光与红色荧光重叠,存在 Nrf2 核移位;而且,HBO 组红色荧光更强,发生 Nrf2 核移位更多,可见 HBO 明显促进 Nrf2 的表达及核移位。见图 1。

2.3 细胞核 Nrf2 蛋白表达变化 HBO 组及模型组 Nrf2 表达量均较假手术组明显增加($P<0.05$,图 2),而且 HBO 组细胞核 Nrf2 表达量明显高于模型组($P<0.05$,图 2)。这说明脊髓损伤后 Nrf2 被激活发生核移位发挥生物学功能,HBO 干预可进一步促进 Nrf2 核移位。

3 讨论

脊髓损伤后原发性损伤已不可逆转,积极干预继发性损伤是提高疗效的关键。继发性损伤的机制主要有炎症反应、氧化应激、钙超载、自由基形成等

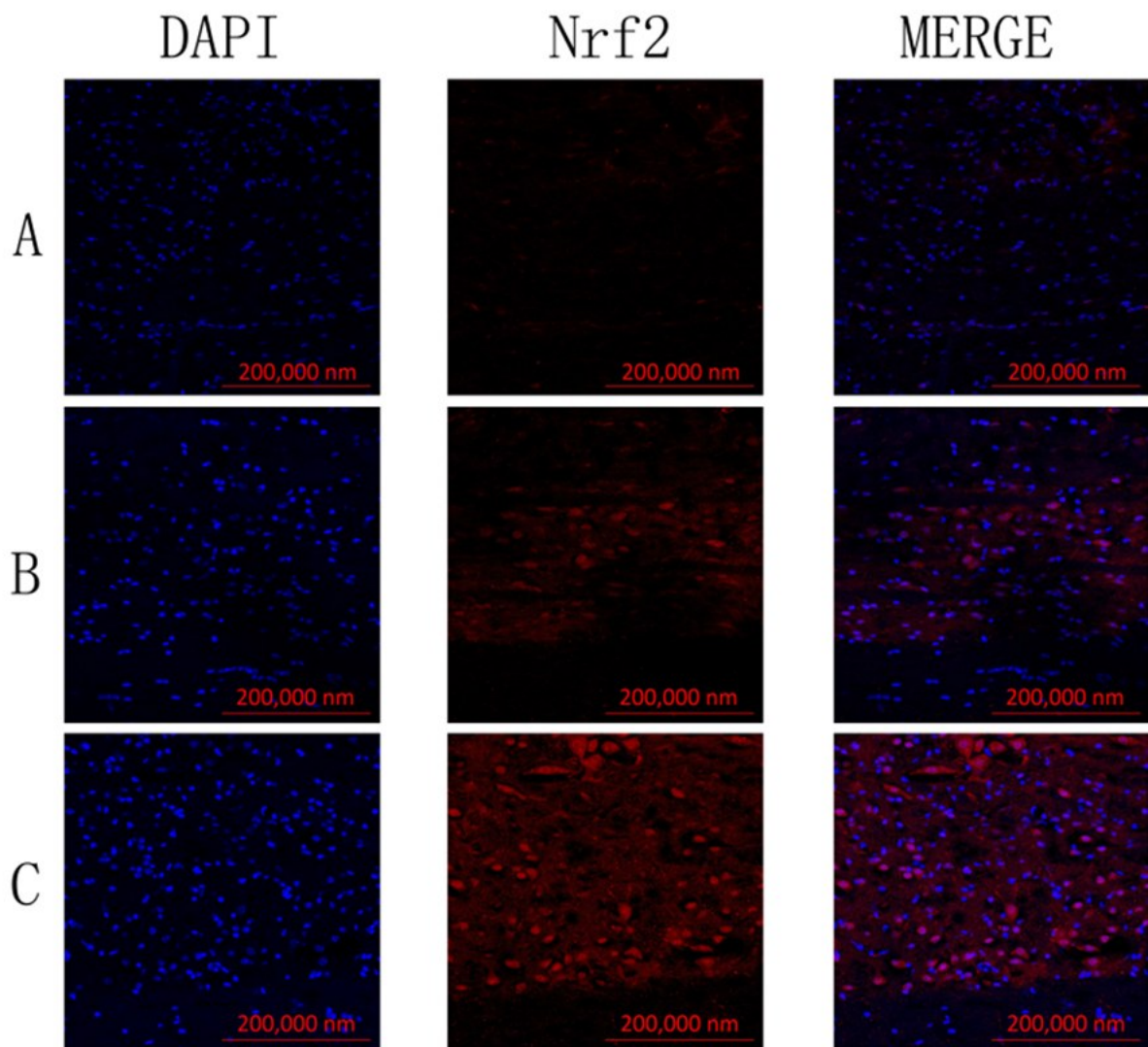


图1 小鼠脊髓损伤后损伤脊髓组织 Nrf2 免疫荧光染色情况
A. 假手术组;B. 模型组;C. HBO 组

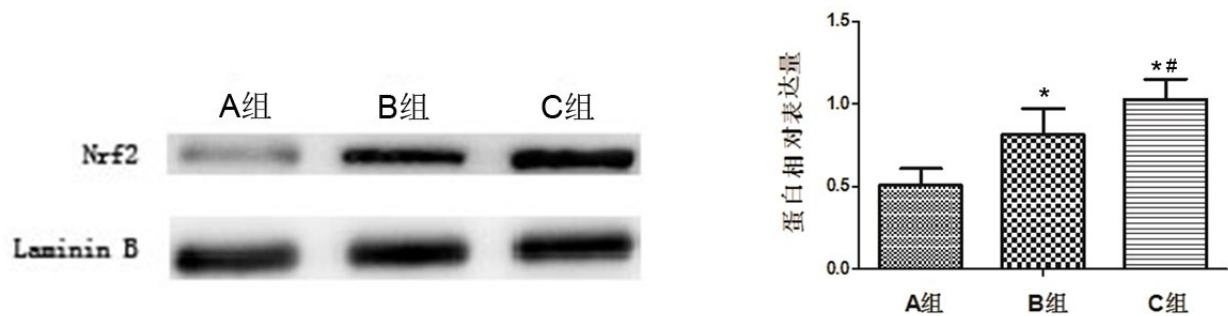


图2 高压氧治疗对脊髓损伤小鼠损伤脊髓组织 Nrf2 表达的影响
A 组. 假手术组;B 组. 模型组;C 组. HBO 组;与假手术组比,* $P<0.05$;与模型组比,# $P<0.05$

^[7]。HBO 治疗减轻神经继发性损伤包含多种机制：抑制白细胞介素-1、肿瘤坏死因子- α 、基质金属蛋白酶-2、基质金属蛋白酶-9、核转录因子- κ B 等炎症因子表达^[8]，减轻炎症反应；抑制 Caspase-3 表达，减少脊髓神经元凋亡^[9]；促进血管内皮生长因子表达，发挥神经保护作用^[10]；促进脊髓损伤后轴突再生、损

伤区域血管重建、减轻脊髓水肿^[11]。

Nrf2 是一种细胞保护性转录因子，生理状态下，与细胞骨架相关蛋白 keap1 结合，存在于细胞浆中，无活性、易降解。当细胞受到自由基、化学性物质刺激时，keap1 被磷酸化或者 Nrf2 直接被磷酸化，Nrf2 与 keap1 解离进入细胞核，与抗氧化反应元件(anti-

oxidative response element, ARE) 启动子区域结合, 调控 ARE 下游抗氧化酶及解毒酶表达, 发挥抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗凋亡、清除自由基等作用^[12]。另外, Nrf2 具有抑制炎症反应、减轻膜性结构氧化性损伤、保护血脑屏障、减轻脑水肿等神经保护作用^[13]。

本研究结果表明, 小鼠脊髓损伤后 HBO 治疗明显促进后肢运动功能恢复。这与既往文献报道一致^[14]。本文免疫荧光染色可见 HBO 组 Nrf2 核移位明显增加, 免疫印迹法检测发现 HBO 组细胞核 Nrf2 蛋白含量明显增高。这与既往文献报道相符^[15]。

总之, HBO 治疗显著促进小鼠脊髓损伤后神经功能恢复, 机制可能与促进 Nrf2 表达及核移位有关。

【参考文献】

[1] 刘 明, 杭春华, 蔡智基, 等. Necrostatin-1 在小鼠脊髓损伤后继发性损伤中的作用[J]. 中国临床神经外科杂志, 2018, 23(6): 419-422.

[2] 孙 晴, 鲍剑峰, 安玉兰, 等. 高压氧及骨科综合治疗高原地区创伤性不完全脊髓损伤: 开放性随机对照临床试验[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(20): 3269-3274.

[3] 孙文志, 鲁世保. 高压氧治疗脊髓损伤机制的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2014, 24(12): 1116-1119.

[4] 廖小俊, 袁继超, 朱海涛, 等. 莱菔硫烷对小鼠脊髓损伤后后肢功能的作用[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(10): 1066-1072.

[5] 刘 颖, 张淑珍, 朱晓红, 等. 高压氧治疗对创伤性脑损伤大鼠认知功能的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32(11): 1214-1219.

[6] 李 兰, 赵天智, 夏永智, 等. C5a 受体拮抗剂对小鼠脊髓损伤后后肢功能的影响及作用机制[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(8): 763-766.

[7] 李国亮, 邸 方, 杨亚东. 香芹酚对大鼠急性脊髓损伤的保护作用[J]. 中国临床神经外科杂志, 2016, 21(9): 549-

552.

[8] Sun L, Zhao L, Li P, *et al.* Effect of hyperbaric oxygen therapy on HMGB1/NF- κ B expression and prognosis of acute spinal cord injury: a randomized clinical trial [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 692: 47-52.

[9] Long Y, Liang F, Gao C, *et al.* Hyperbaric oxygen therapy reduces apoptosis after spinal cord injury in rats [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(11): 4073-4081.

[10] Liu X, Zhou Y, Wang Z, *et al.* Effect of VEGF and CX43 on the promotion of neurological recovery by hyperbaric oxygen treatment in spinal cord-injured rats [J]. *Spine J*, 2014, 14(1): 119-127.

[11] 沈丹彤, 古 菁, 叶水林, 等. 不同疗程高压氧治疗脊髓损伤的临床观察[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(9): 1472-1475, 1494.

[12] 姚 娟, 吴平安, 李 芸, 等. Keap1-Nrf2-ARE 信号通路及其激活剂的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(10): 1342-1346.

[13] Wang J, Jiang C, Zhang K, *et al.* Melatonin receptor activation provides cerebral protection after traumatic brain injury by mitigating oxidative stress and inflammation via the Nrf2 signaling pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 131: 345-355.

[14] 应新旺, 陈晓龙, 谷鹏鹏, 等. 高压氧对大鼠脊髓损伤后蛋白激酶 R 样内质网激酶表达和运动功能的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2018, 24(12): 1393-1397.

[15] Meng XE, Zhang Y, Li N, *et al.* Effects of hyperbaric oxygen on the Nrf2 signaling pathway in secondary injury following traumatic brain injury [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(1): gmr6933.

[16] 王玉敏, 成 龙, 崔其福, 等. 莱菔硫烷通过调控 Nrf2/ARE 通路的神经保护作用研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(17): 1445-1449.

(2020-02-03 收稿, 2020-07-25 修)

(上接第 34 页)

[6] Ma J, Mi C, Wang KS, *et al.* Zincfingerprotein91(ZFP91) activates HIF-1 α via NF- κ B/p65 to promote proliferation and tumorigenesis of colon cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(24): 36551-36562.

[7] Jin X, Jin H RJ, Jung HS, *et al.* An atypical E3 ligase zinc finger protein 91 stabilizes and activates NF- κ B inducing

kinase via Lys63-linked ubiquitination [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(40): 30539-30547.

[8] Unoki M, Okutsu J, Nakamura Y. Identification of a novel human gene, ZFP91 involved in acute myelogenous leukemia [J]. *Int J Oncol*, 2003, 22(6): 1217-1223.

(2020-01-29 收稿, 2020-08-22 修回)