

· 实验研究 ·

高碳酸血症对严重低氧缺血大鼠脑损伤的影响

杨万超 刘翔 陈剑峰 周强 张学忠 李文志

【摘要】目的 研究高碳酸血症对严重低氧缺血大鼠脑损伤的影响及其机制。**方法** 雄性 SD 大鼠 48 只,随机分为假手术组(S组)、低氧缺血组(HI组)和高碳酸血症组(HP组),每组 16 只。S 组暴露左侧颈总动脉但不结扎,1 h 后机械通气,维持 PaO₂ 和 PaCO₂ 在正常水平 3 h。制作低氧缺血模型,HI 组吸入 11%~13%O₂ 并维持 PaO₂ 30~49 mm Hg;HP 组在 HI 组的基础上吸入 11%~13% O₂-8%CO₂-N₂ 混合气维持 PaO₂ 30~49 mm Hg,PaCO₂ 60~80 mm Hg。机械通气 3 h 后处死大鼠,观察脑组织水肿及病理改变,采用 TUNEL 法检测皮质神经元凋亡,应用 FITC-dextran 检测血脑屏障通透性的变化,免疫荧光法检测皮质水通道蛋白 4(AQP4)及缺血区皮质内皮细胞的标记物(RECA-1)的表达,Western blot 法检测 AQP4 的蛋白含量变化。**结果** 与 S 组比较,HI 组和 HP 组血脑屏障通透性明显升高,脑含水量明显增加($P < 0.05$);与 HI 组比较,HP 组脑含水量明显增加($P < 0.05$),脑组织损伤加重,TUNEL 染色阳性细胞数明显增加($P < 0.05$),脑皮质 AQP4 蛋白含量明显升高,RECA-1 荧光强度明显降低,断离现象明显增多,血脑屏障通透性明显增加($P < 0.05$)。**结论** 高碳酸血症加重了严重的低氧缺血性脑损伤,其机制可能与脑皮质 AQP4 蛋白表达的增加和血脑屏障的破坏有关。

【关键词】 高碳酸血症;低氧;缺血;血脑屏障;水通道蛋白 4

Effect of hypercapnia on blood brain barrier in rats with severe hypoxic-ischemic brain injury YANG Wanchao, LIU Xiang, CHEN Jianfeng, ZHOU Qiang, ZHANG Xuezhong, LI Wenzhi. Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China
Corresponding author: LI Wenzhi, Email: wenzhili9@126.com

【Abstract】Objective To investigate the effect of hypercapnia on hypoxic-ischemic brain injury in rats. **Methods** Forty-eight adult male SD rats were randomly divided into three groups: sham group (group S), hypoxic ischemic group (group HI) and hypercapnia group (group HP), $n = 16$ in each group. Levine's model was used to cause hypoxic-ischemic brain injury. In group S, the left common carotid artery was separated without ligation for 1 h, then ventilation with air maintaining the normal levels of PaO₂ and PaCO₂ for 3 h. In group HI, the left common carotid artery was separated and ligated for 1 h, PaO₂ was maintained at 30-49 mm Hg by ventilating with low concentration (11%-13%) O₂ for 3 hours. Based on group HI, PaCO₂ in group HP was maintain at 60-80 mm Hg by inhalation of mixture gas containing (11%-13%) O₂-8%CO₂-N₂ for 3 hours. FITC-dextran was used to measure the permeability of blood-brain barrier, TUNEL staining were used to observe the changes in the structure of the cerebral cortex. The expressions of aquaporin AQP4 and RECA-1 in cerebral cortex were detected by immunofluorescence and western blot. **Results** The level of brain water content, permeability of blood brain barrier and AQP4 expression were significantly increased in group HP as compared with group S and group HI ($P < 0.05$). The histopathologic damage, as well as neuronal apoptotic index were aggravated in group HP as compared with group HI ($P < 0.05$). **Conclusion** Hypercapnia may aggravate the brain damage during severe hypoxic-ischemic brain injury. This may associate with the increased expression AQP4 and the damage of blood-brain barrier.

【Key words】 Hypercapnia; Hypoxia; Ischemia; Blood-brain barrier; AQP4

基金项目:国家自然科学基金(81171076,81400989);黑龙江省青年科学基金项目(QC2011C004)

作者单位:150086 哈尔滨医科大学附属第二医院麻醉科(杨万超、陈剑峰、周强、张学忠、李文志);中山大学附属第六医院麻醉科(刘翔)

通信作者:李文志,Email:wenzhili9@126.com

缺氧是许多病理过程(中风、缺血、脑创伤等)发展的重要因素之一。大约有 20% 的脑缺血患者存在低氧血症,其与神经系统的不良预后密切相关。因此,低氧缺血性脑损伤是导致患者围术期死

亡的主要原因之一^[1]。目前,低氧缺血性脑损伤的机制研究主要集中在脑实质的损伤上,针对血脑屏障的研究逐渐受到关注^[2]。低氧和缺血均能损伤血脑屏障的完整性,增加脑微血管的通透性,进而增加血管源性脑水肿的发生^[2]。高碳酸血症对中枢神经系统功能的影响一直是众多学者关注的焦点。虽然前期的实验研究表明适度的高碳酸血症(PaCO₂ 60~100 mm Hg)对脑缺血-再灌注损伤的大鼠具有一定的脑保护作用^[3,4],但对严重低氧缺血性脑损伤的作用仍有争议。为进一步明确高碳酸血症的安全性和有效性,本实验探索了高碳酸血症对急性低氧缺血大鼠血脑屏障结构和功能的影响及其作用机制。

材料与方 法

试剂及仪器 兔抗大鼠 AQP4 多克隆抗体(Santa, SC-20812),小鼠抗大鼠 Endothelial Cell antibody [RECA-1]单克隆抗体(ab9774),DAPI 染色剂(AR1176)、DAB 显色剂(SA2023),FITC-Dextran(Sigma, 46944)。

动物选择及分组 成年雄性 Wistar 大鼠 48 只,体重 250~300 g[哈尔滨医科大学实验动物学部提供,许可证号:SCXK(黑)2013-001],术前禁食 12 h。随机分为三组:假手术组(S 组)、低氧缺血组(HI 组)和高碳酸血症组(HP 组),每组 16 只。

模型制备 参照文献^[5]的方法,结扎大鼠左侧颈总动脉,吸入 11%~13% O₂ 建立 Levine 脑低氧缺血模型。大鼠经腹腔注射 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉后,经气管插管,保留自主呼吸。暴露左侧颈总动脉,穿线备用。分离左侧股动脉、股静脉并置管,其中股动脉置管用于采集血液和监测生理指标;股静脉置管则用于给药、补液等。S 组暴露左侧颈总动脉但不结扎,1 h 后机械通气,维持 PaO₂ 和 PaCO₂ 在正常水平 3 h;HI 组结扎左侧颈总动脉,缺血 1 h 后机械通气,吸入 11%~13% O₂,20 min 内使 PaO₂ 降低至 30~49 mm Hg,PaCO₂ 正常水平,维持 3 h;HP 组在缺血后,吸入 11%~13% O₂-8%CO₂-N₂ 的混合气,20 min 内使 PaO₂ 降至 30~49 mm Hg,PaCO₂ 60~80 mm Hg,维持 3 h。术中维持直肠温 37~38℃。

血脑屏障通透性 每组各取 5 只大鼠,机械通气结束前 10 min,对结扎侧颈总动脉置管,注射 2 mg/ml 的 FITC-dextran (10 kDa) 0.5 ml。然后给大鼠颅内灌注生理盐水以消除血管内的 FITC-dex-

tran。大脑迅速剥除并分离大脑皮层。组织在 50%三氯乙酸中匀浆,10 000 r/min 离心,收集上清。荧光强度通过全自动酶免工作站(TECAN Infinite M200, Männedorf, Switzerland)在 96 孔板进行检测。将 S 组分别与 HI 组和 HP 组的荧光强度差值作为示踪剂的渗漏值,数据以渗漏值占 S 组荧光强度值的百分比显示。

脑含水量 每组各取 5 只大鼠通气处理后取脑组织,分离脑皮质并放入干燥的培养皿中,用电子天平分别测定标本的湿重及在电热恒温干燥箱中 80℃干燥 48 h 后的干重,计算含水量。脑含水量=(湿重-干重)/湿重×100%。

脑组织病理学观察 每组各取 3 只大鼠,深麻醉下依次以生理盐水和 4%多聚甲醛灌注固定。断头取脑,于视交叉后 2、3 mm 取脑组织 4 mm,置于 10%中性福尔马林中 4℃固定 24 h,常规石蜡包埋,连续冠状切片(3 μm)。取脑组织切片行苏木素-伊红(HE)染色,低倍镜下(×100)取相同皮质形状的切片视为脑组织同一平面,于高倍镜下观察神经元细胞损伤(×400)。

皮质神经元凋亡检测 脑组织切片脱蜡、水化、消化冲洗后,加 50 μl TUNEL 反应混合液,37℃孵育 60 min, PBS 冲洗,加 50 μl 转化剂-POD 液 37℃孵育 30 min, PBS 冲洗, DAB 染色 10 min, PBS 冲洗,光镜观察,苏木素复染,常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。用不加 TUNEL 反应液和 不加转化液的切片作为阴性对照。在装有目镜网格测微尺(130 μm×130 μm)的 400 倍视野下观察皮质区神经元细胞,细胞核中出现棕黄色颗粒者为凋亡细胞。分别计数每例切片皮质区中 6 个网格内的总凋亡神经元数和总神经元数,将二者的比值作为皮质区的凋亡神经元计数。

脑血管内皮 RECA-1 和脑皮质水通道蛋白 4 (AQP4) 的表达 每组各取 3 只大鼠,脑组织标本用 OCT 包埋后,切成 4 μm 厚的冰冻切片,浸洗封闭后滴加兔抗鼠 AQP4 一抗(AQP4 稀释度 1:100)及鼠抗鼠(RECA-1 稀释度 1:10~1:20)混合 4℃过夜,复温后分别滴加与一抗同一来源的二抗荧光显色(RECA-1 绿色、AQP4 红色),以 DAPI(5 μg/ml)染核 5 min,激光共聚焦扫描成像(×60 倍)。

脑皮质 AQP4 蛋白检测 脑皮质 AQP4 蛋白的含量取 -80℃冻存脑组织,液氮中研磨提取蛋白,超声裂解,4℃下 20 000 r/min 离心 20 min,蛋白分析仪测定蛋白浓度。蛋白样品用 10%的 SDS-

PAGE 胶进行电泳分离,上样,电泳,转膜,分别以抗 AQP4 和 GAPDH 的一抗 4℃ 孵育过夜,次日复温后用 TBS-T 洗膜 10 min×3 次,用相应的二抗室温孵育 1 h, TBS-T 洗膜 10 min×3 次,加入化学发光剂后暗室曝光,得到条带。以 GAPDH 为内参,用凝胶成像分析系统采集分析 AQP4 条带的积分光密度值,其与相应的 GAPDH 条带的积分光密度值之比作为 AQP4 蛋白的含量。

统计分析 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析。正态分布计量资料以均数±标准($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量数据方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

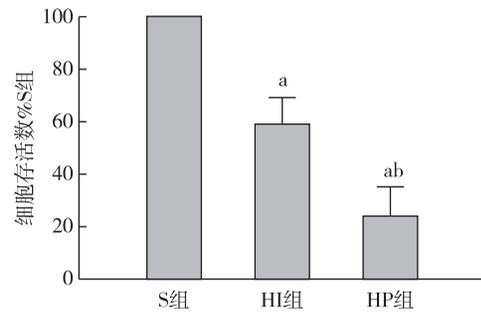
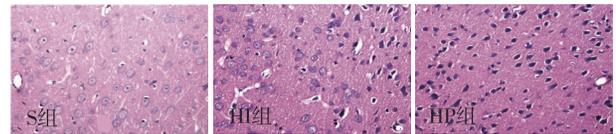
结 果

脑含水量与血脑屏障通透性 HI 组和 HP 组脑含水量明显多于 S 组($P < 0.05$);HP 组脑含水量明显多于 HI 组($P < 0.05$)。HI 组和 HP 组大鼠双侧大脑的血脑屏障通透性明显高于 S 组($P < 0.05$);HP 组双侧大脑的血脑屏障通透性明显多于 HI 组($P < 0.05$)(表 1)。

脑组织病理改变 光镜下脑组织 HE 染色可见,S 组皮质细胞排列整齐密集,胞质丰富,胞核完整;HI 组与 HP 组血管周围间隙增宽,胶质细胞肿胀,神经元萎缩或肿胀形成,核固缩,部分神经元嗜酸性染色;HP 组较 HI 组病理改变加重。HI 组和 HP 组结扎侧脑皮质神经元存活百分比明显低于 S 组($P < 0.01$),HP 组神经元存活百分比明显低于 HI 组($P < 0.05$)(图 1)。

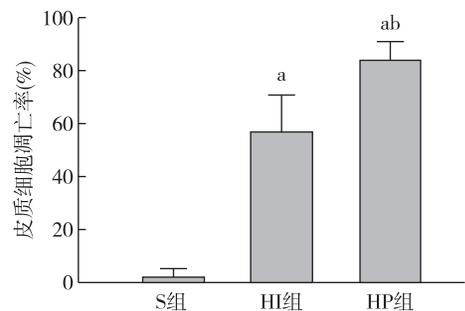
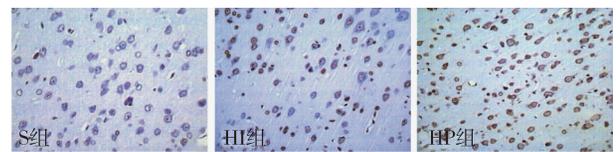
脑皮质神经元凋亡 HI 组和 HP 组凋亡率明显高于 S 组($P < 0.01$);HP 组 TUNEL 阳性细胞计数明显多于 HI 组($P < 0.05$)(图 2)。

脑皮质血管内皮标记物 RECA-1 的表达 S 组大鼠左侧皮质区 RECA-1 表达的荧光强度高于 HI



注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 HI 组比较,^b $P < 0.05$

图 1 三组大鼠脑组织的病理改变(HE 染色,×400)



注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 HI 组比较,^b $P < 0.05$

图 2 三组大鼠皮质神经元凋亡率的比较(%)

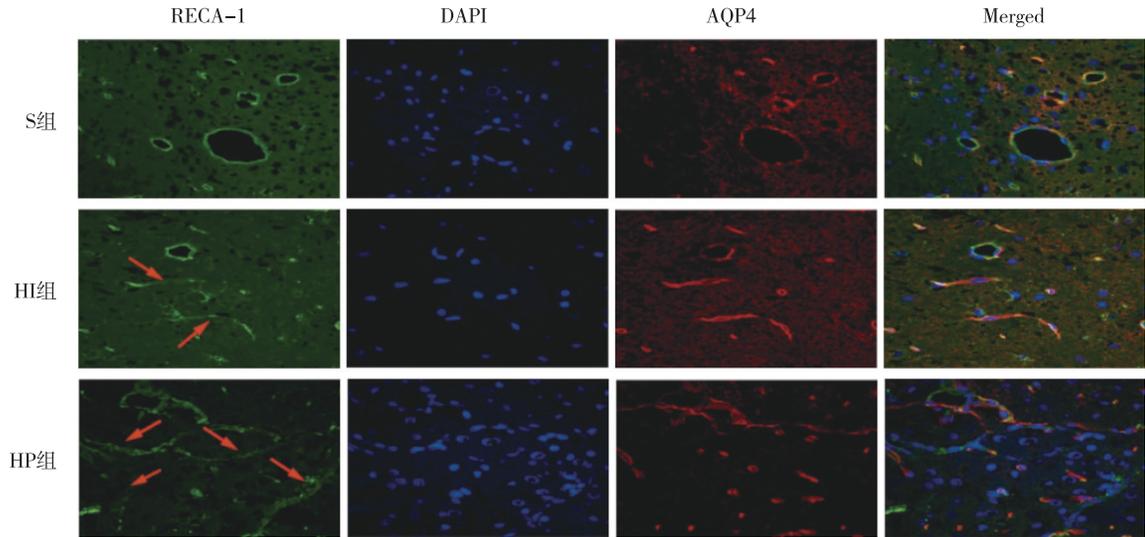
组和 HP 组,RECA-1 表达的形态完整、规则。在相同视野下,HI 组大鼠脑微血管内皮不完整且有明显断离;HP 组血管内皮屏障遭到明显破坏、表达不完整及不规则,断离现象多于 HI 组(图 3)。

脑皮质 AQP4 蛋白的表达 S 组脑皮质 AQP4

表 1 三组大鼠脑含水量和血脑屏障通透性的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	脑含水量	血脑屏障通透性	
			左脑	右脑
S 组	5	73.23±3.74	100.0±6.4	100.0±4.2
HI 组	5	77.83±2.81 ^a	24.3±8.3 ^a	30.2±8.8 ^a
HP 组	5	87.39±2.96 ^{ab}	78.5±6.2 ^{ab}	62.2±11.1 ^{ab}

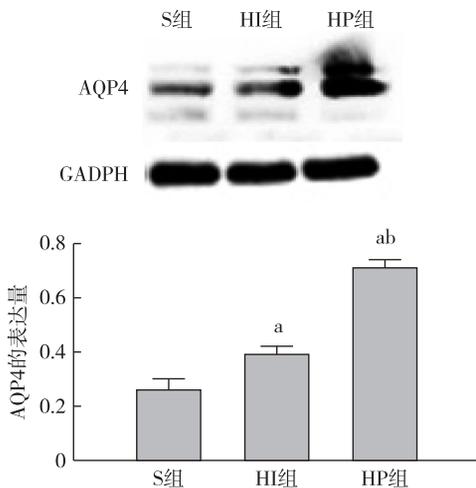
注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;HI 组比较,^b $P < 0.05$



注:箭头所示 RECA-1 在血管内皮表达不完整及离断现象

图 3 三组大鼠血管内皮 RECA-1 和脑皮质 AQP4 免疫荧光表达 (×60)

弱阳性表达, HI 组 AQP4 表达明显增加, 主要在脑微血管周围的星形胶质细胞上表达。HI 组和 HP 组脑皮质 AQP4 蛋白含量明显高于 S 组 ($P < 0.05$); HP 组脑皮质 AQP4 蛋白含量明显高于 HI 组 ($P < 0.05$) (图 3, 4)。



注:与 S 组比较, ^a $P < 0.05$ 与 HI 组比较, ^b $P < 0.05$

图 4 三组大鼠脑皮质 AQP4 蛋白含量的比较

讨 论

缺氧是脑缺血卒中的危险因素及伴发症状, 持续低氧会导致神经元功能受损、增加脑血管通透性、引起脑水肿及脑组织损伤^[6]。而血-脑屏障是维持中枢神经系统内环境稳定的结构基础, 其结构与功能变化也是缺血性脑血管疾病病理生理变化的

核心过程^[7]。本实验结果显示高碳酸血症 (PaCO₂ 60~100 mm Hg) 对严重的低氧缺血性脑损伤并没有保护作用, 反而会加重损伤。导致这个结果的原因是多方面的: 高碳酸血症对心肌有一定的抑制作用, 而严重低氧缺血时, 心脏功能本身受到抑制, 吸入外源性的 CO₂ 会进一步加重机体酸碱平衡的紊乱, 进一步抑制心律和泵血功能, 使脑组织血供减少^[8]; 高碳酸血症加重局部代谢紊乱。虽然有研究表明 CO₂ 作用于脑微血管内皮细胞, 可以通过一氧化氮合成酶诱导产生一氧化氮等机制起到扩张脑血管、改善脑血流的重要作用, 但是在严重的低氧缺血状态下, 局部代谢性酸中毒会加重^[9]。

AQP4 蛋白在辅助血脑屏障的水通道功能上起到重要作用。因此, AQP4 蛋白表达的上调可能是导致脑水肿的一个重要分子机制^[10]。以往的文献证实, 血脑屏障两侧的 AQP4 蛋白与反应性神经胶质增多有关^[11]。Yu 等^[12]报道, 在低 O₂ (9~11%) 和高 CO₂ (5~6%) 环境下, AQP4 蛋白含量明显升高。前期的研究结果显示, 高碳酸血症对脑缺血-再灌注损伤有改善作用, 当维持 PaCO₂ 在 60~100 mm Hg 时, 脑含水量随 PaCO₂ 的升高呈现逐渐递减的趋势, 其机制可能是高碳酸血症抑制 AQP4 蛋白的表达, 进而缓解了缺血-再灌注后脑水肿的程度^[4, 13]。而在本实验中显示, 当 PaO₂ < 50 mm Hg 时, 高碳酸血症促使大鼠 AQP4 蛋白的表达上调, 使脑含水量增多从而加重脑水肿的程度。

FITC-Dextran 是一种检测血-脑屏障受损情况的示踪剂,正常情况下不能通过血-脑屏障,当脑血管内皮细胞(RECA-1 的表达)受损时, FITC-Dextran 可以通过受损的部位进入脑组织。通过检测脑组织中 FITC-Dextran 的量可以达到定量屏障损伤程度的目的。本实验结果显示严重的低氧缺血($\text{PaO}_2 < 50 \text{ mm Hg}$)可导致脑缺血大鼠血脑屏障的破坏,而高碳酸血症有协同破坏作用,进一步加重了脑组织水肿及损伤程度。高碳酸血症只在轻度($\text{PaO}_2 > 50 \text{ mm Hg}$)的低氧缺血脑损伤情况下起到脑保护的作用^[14],由此可见,高碳酸血症是一把双刃剑,对脑缺血损伤的保护作用是有限度的^[15]。不同的低氧及高碳酸血症的程度均可影响其对脑缺血损伤的效果。

综上所述,高碳酸血症对严重的低氧缺血性脑损伤并无保护作用,而且会加重损伤,其作用机制可能与血脑屏障的破坏及 AQP4 蛋白的表达增加有关。

参 考 文 献

- [1] Ehrenfeld JM, Funk LM, Van Schalkwyk J, et al. The incidence of hypoxemia during surgery: evidence from two institutions. *Can J Anaesth*, 2010, 57(10): 888-897.
- [2] Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis*, 2008, 32(2): 200-219.
- [3] 周强, 曹博, 李文志, 等. 允许性高碳酸血症对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响. *中华麻醉学杂志*, 2007, 27(11): 1025-1029.
- [4] Zhou Q, Cao B, Niu L, et al. Effects of permissive hypercapnia on transient global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Anesthesiology*, 2010, 112(2): 288-297.
- [5] Vannucci RC, Brucklacher RM, Vannucci SJ. Effect of carbon dioxide on cerebral metabolism during hypoxia-ischemia in the immature rat. *Pediatr Res*, 1997, 42(1): 24-29.
- [6] Juránek I, Baciak L. Cerebral hypoxia-ischemia; focus on the use of magnetic resonance imaging and spectroscopy in research on animals. *Neurochem Int*, 2009, 54(8): 471-480.
- [7] Kaurzz C, Ling EA. Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. *Curr Neurovasc Res*, 2008, 5(1): 71-81.
- [8] Beaudin AE, Brugniaux JV, Vöhringer M, et al. Cerebral and myocardial blood flow responses to hypercapnia and hypoxia in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(4): H1678-H1686.
- [9] Hare GM, Kavanagh BP, Mazer CD, et al. Hypercapnia increases cerebral tissue oxygen tension in anesthetized rats. *Can J Anaesth*, 2003, 50(10): 1061-1068.
- [10] Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol*, 2007, 22(6): 778-84.
- [11] Stavale LM, Soares ES, Mendonca MC, et al. Temporal relationship between aquaporin-4 and glial fibrillary acidic protein in cerebellum of neonate and adult rats administered a BBB disrupting spider venom. *Toxicon*, 2013, 66: 37-46.
- [12] Yu LS, Fan YY, Ye G, et al. Curcumin alleviates brain edema by lowering AQP-4 expression levels in a rat model of hypoxia-hypercapnia-induced brain damage. *Exp Ther Med*, 2016, 11(3): 709-716.
- [13] Tao T, Liu Y, Zhang J, et al. Therapeutic hypercapnia improves functional recovery and attenuates injury via antiapoptotic mechanisms in a rat focal cerebral ischemia/reperfusion model. *Brain Research*, 2013, 153(3): 52-62.
- [14] Yang W, Zhang X, Wang N, et al. Effects of acute systemic hypoxia and hypercapnia on brain damage in a rat model of hypoxia-ischemia. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0167359.
- [15] Brambrink A, Orfanakis A. "Therapeutic hypercapnia" after ischemic brain injury: is there a potential for neuroprotection? *Anesthesiology*, 2010, 112(2): 274-276.

(收稿日期: 2017-02-21)