

高压氧对急性有机磷中毒大鼠 氧自由基及海马 HIF-1 α mRNA 的影响

杨 勇¹, 杨金连², 谢智慧²

(1. 湖北医药学院附属东风医院综合医疗科, 湖北 十堰 442008;

2. 遵义医学院附属医院高压氧科, 贵州 遵义 563003)

【摘要】 目的 探讨高压氧(HBO)对急性有机磷中毒脑损伤的保护机制。方法 健康雄性SD大鼠60只,随机分为正常对照组、中毒组、常规治疗组和高压氧治疗组,正常对照组6只,其余3组各18只,建立大鼠急性有机磷中毒脑损伤模型。中毒组、常规治疗组和高压氧治疗组分别于建模后1、3、7h(每个时间点6只)下腔静脉采血检测丙二醛(MDA)的含量和超氧化物歧化酶(SOD)的活性,荧光定量PCR检测海马组织HIF-1 α mRNA的表达。结果 与中毒组比较,高压氧治疗组的海马组织HIF-1 α mRNA的表达和血清MDA含量逐渐下降($P<0.05$),而血清SOD活性逐渐升高($P<0.05$)。结论 高压氧对急性有机磷中毒性脑损伤的保护机制与抗氧化损伤和抑制HIF-1 α 的表达有关,且高压氧干预越早越好。

【关键词】 急性有机磷中毒;脑损伤;缺氧诱导因子-1 α ;丙二醛;超氧化物歧化酶;高压氧

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2015)03-0319-03

Effect of hyperbaric oxygen on hypoxia inducible factor-1 α mRNA in hippocampus and oxygen free radicals after acute organophosphate poisoning. YANG Yong¹, YANG Jing-lian², XIE Zhi-hui². 1. Department of Integrated Medicine, Dongfeng Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 442008, Hubei, CHINA; 2. Department of Hyperbaric Oxygenation, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of hyperbaric oxygen (HBO) on brain injury caused by acute organophosphate poisoning. **Methods** Sixty healthy male SD rats were randomly divided into four groups: control group ($n=6$), poisoning group ($n=18$), routine group ($n=18$) and hyperbaric oxygen group ($n=18$). All rats were sacrificed 1 h, 3 h, 7 h after model establishment (six rats at each time point), and the blood samples were taken from inferior caval vein, followed by the measurement of malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activity. The quantitative real time PCR was used to detect the expression of HIF-1 α mRNA in the hippocampus. **Results** After the treatment of hyperbaric oxygen, the expression of HIF-1 α mRNA and serum MDA content were significantly lower than that of both in the poisoning group ($P<0.05$). Meanwhile, the serum SOD activity was significantly higher ($P<0.05$). **Conclusion** The mechanism of hyperbaric oxygen intervention against AOPP-induced brain injury may be the antioxidation and the inhibition of HIF-1 α expression. The best efficacy will be achieved by the intervention immediately after the brain injury.

【Key words】 Acute organophosphorus poisoning; Brain injury; Hypoxia inducible factor-1 α ; Malondialdehyde; Superoxide dismutase; Hyperbaric oxygen

急性有机磷农药中毒(AOPP)引起的中枢神经系统损伤表现为不同程度的惊厥、抽搐、意识障碍,其发病机制尚不完全清楚,且无特效治疗药物^[1]。HBO在颅脑外伤、一氧化碳中毒性脑病、缺血缺氧性脑病等脑损伤的治疗中已取得了显著的临床效果^[2-5],故本研究旨在通过大鼠急性有机磷中毒脑损伤模型,观察高压氧(HBO)对大鼠血清氧自由基和海马中缺氧诱导因子-1 mRNA表达的影响,探讨HBO对急性有机

磷中毒性脑损伤的保护机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 雄性健康SD大鼠60只,体重(290 \pm 20)g,购自第三军医大学实验动物中心。随机分为正常对照组、中毒组、常规治疗组和高压氧治疗组,正常对照组6只,其余三组各18只。中毒组、常规治疗组和高压氧治疗组分3个时间点(建模后1、3、7h)进行标本采集和检测,每个时间点各6只。

基金项目:贵州省科技厅资助项目(编号:20092185)

通讯作者:谢智慧。E-mail: xiezhihui71@126.com

1.2 急性有机磷中毒脑损伤模型的建立和 HBO 治疗 取 77.5% 敌敌畏乳油 0.516 g, 溶于 100 ml 蒸馏水, 配置 0.4% 敌敌畏溶液 (4 mg/ml)。参考相关文献并结合前期预实验^[6-7], 采用颈背部皮下累计注射法, 每次敌敌畏用量 4 mg/kg, 待大鼠抽搐停止后再予同等剂量皮下注射, 一共注射 5 次, 保证大鼠不间断抽搐 3 h, 即造模完成。动物出现惊厥样抽搐、共济失调或翻正反射消失即判断为脑损伤。中毒组不予任何治疗, 常规治疗组立即予长托宁 0.12 mg/kg、氯解磷定 30 mg/kg 肌肉注射, 高压氧治疗组在常规治疗后, 立即将大鼠置于动物用实验高压氧舱内, 进行高压氧治疗一次。具体方法如下^[8], 加压 5 min 至 0.12 Mpa (1.2 ATA), 同时纯氧洗舱, 之后在 5 min 内使舱内压升至 0.2 Mpa (2 ATA), 稳压吸氧 40 min, 减压 10 min, 舱内氧浓度保持在 95% 以上。

1.3 标本采集 各组于建模完成后 1、3、7 h 处死大鼠。腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉 (0.3 ml/100 g), 固定并暴露腹腔, 下腔静脉取血, 离心分离血清, 用于 MDA、SOD 的检测; 断头取脑, 在冰上迅速分离海马组织, 放入去酶冻存管中, 置入 -80℃ 冰箱供提取总 RNA。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 脑组织 HIF-1 α mRNA 的表达 采用荧光定量 PCR 检测, 按说明书操作主要步骤如下: ①总 RNA 提取; ②反转录; ③荧光定量 PCR, HIF-1 α 上游引物 5'-CCAGATTCAAGATCAGCCAGCA-3', 下游引物 5'-GCTGTCCACATCAAAGCAGTACTCA-3', 扩增产物长度 100 bp。④基因相对定量=2^{- $\Delta\Delta$ CT}, 计算出各样本 HIF-1 α mRNA 的相对表达量。

1.4.2 血清 SOD 活性的检测 采用黄嘌呤氧化法, 严格按照试剂盒说明书操作。

1.4.3 血清 MDA 含量的检测 采用硫代巴比妥酸比色法, 按照试剂盒说明书操作。

1.5 统计学方法 应用软件 SPSS19.0 软件进行数据统计分析, 实验数据中的计量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组产间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 法, 以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠海马 HIF-1 α mRNA 的相对表达量 海马 HIF-1 α 实时荧光定量 PCR 结果表明: 中毒组各时间点 mRNA 表达明显高于正常对照组 ($P<0.05$); 常规治疗组 1 h、3 h mRNA 表达高于正常对照组 ($P<0.05$); 常规治疗组各时间点与中毒组各时间点比较, mRNA

表达均降低 ($P<0.05$); 高压氧治疗组各时间点与中毒组各时间点比较, mRNA 表达均明显降低 ($P<0.05$), 与常规治疗组比较, 1、3 h mRNA 表达降低 ($P<0.05$), 见表 1。

表 1 各组大鼠海马 HIF-1 α mRNA 相对表达量的变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	1 mRNA	3 h mRNA	7 h mRNA
正常对照组	0.99 \pm 0.12		
中毒组	1.63 \pm 0.14 ^a	2.15 \pm 0.19 ^a	1.92 \pm 0.13 ^a
常规治疗组	1.37 \pm 0.20 ^{a,b}	1.16 \pm 0.15 ^{a,b}	1.07 \pm 0.16 ^b
高压氧治疗组	1.10 \pm 0.09 ^{b,c}	1.05 \pm 0.10 ^{b,c}	0.95 \pm 0.07 ^b
F 值	4.974	6.138	5.871

注: ^a与正常对照组比较, $P<0.05$; 同一时间点, ^b与中毒组比较, $P<0.05$; ^c与常规治疗组比较, $P<0.05$ 。

2.2 血清中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的变化 与正常对照组比较, 中毒组 SOD 活性依次下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与中毒组比较, 常规治疗组和高压氧治疗组 SOD 活性依次升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与常规治疗组比较, 高压氧治疗组 SOD 活性依次升高, 1 h 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 3 h、7 h 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 2。

表 2 各组大鼠血清中 SOD 活性的变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	1 h (U/ml)	3 h (U/ml)	7 h (U/ml)
正常对照组	171.22 \pm 10.12		
中毒组	119.48 \pm 15.05 ^a	102.66 \pm 14.13 ^a	99.26 \pm 14.84 ^a
常规治疗组	135.84 \pm 17.10 ^{ab}	148.26 \pm 20.13 ^{ab}	160.19 \pm 19.07 ^b
高压氧治疗组	151.74 \pm 16.14 ^{abc}	157.40 \pm 17.13 ^b	166.12 \pm 0.08 ^b
F 值	5.837	5.097	6.819

注: ^a与正常对照组比较, $P<0.05$; 同一时间点, ^b与中毒组比较, $P<0.05$; ^c与常规治疗组比较, $P<0.05$ 。

2.3 血清中丙二醛 (MDA) 含量的变化 与正常对照组比较, 中毒组 MDA 含量依次增高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与中毒组比较, 常规治疗组和高压氧治疗组 MDA 含量依次降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与常规治疗组比较, 高压氧治疗组 MDA 含量依次降低, 1 h、3 h 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 7 h 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 3。

表 3 各组大鼠血清中 MDA 含量的变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	1 h (nmol/ml)	3 h (nmol/ml)	7 h (nmol/ml)
正常对照组	6.09 \pm 0.12		
中毒组	9.48 \pm 0.05 ^a	11.56 \pm 0.13 ^a	12.26 \pm 0.14 ^a
常规治疗组	8.84 \pm 0.10 ^{ab}	8.26 \pm 0.13 ^{ab}	6.19 \pm 0.07 ^b
高压氧治疗组	7.74 \pm 0.14 ^{abc}	7.40 \pm 0.13 ^{abc}	6.12 \pm 0.08 ^b
F 值	4.053	5.308	7.015

注: ^a与正常对照组比较, $P<0.05$; 同一时间点, ^b与中毒组比较, $P<0.05$; ^c与常规治疗组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

缺氧诱导因子-1 (HIF-1)是目前所知的最重要的缺氧感受因子,是一个调节低氧时机体反应的关键基因^[9]。在不同细胞、不同缺氧时期和不同缺氧程度时,HIF-1 α 的功能也不尽相同的,既可发挥神经保护作用,也可导致神经毒性损伤^[10]。还有研究亦表明,低氧可导致血管通透性升高,可引起血管源性水肿,并可引起 HIF-1 α 的表达水平升高^[11]。因此,HIF-1 α 可以作为脑组织缺氧缺血的标志物。

缺血缺氧是急性有机磷中毒性脑损伤的发病机制之一^[12]。本实验研究发现,与正常对照组比较中毒性脑损伤后海马 HIF-1 α mRNA 的表达均明显增高,并呈现一定的规律。损伤后 1 h 即出现表达增加,3 h 达高峰,随着有机磷毒性的减弱和缺氧改善、复氧开始,通过泛素-蛋白酶体通路降解,7 h 就发现其已经开始下降,但仍高于正常对照组。因损伤区海马是对缺血缺氧较敏感的组织,HIF-1 α mRNA 表达的增高,表明急性有机磷中毒性脑损伤发生与缺血缺氧有关。给予 HBO 治疗后,HIF-1 α mRNA 在 1 h 就明显下降,低于中毒组及常规治疗组,3 h、7 h 时间点继续下降。实验结果与相关的文献报道亦相符^[13],HBO 能通过增加缺血缺氧组织的氧含量,使得缺氧诱导的 HIF-1 α 表达明显下调,起到脑保护作用,且越早应用疗效越好。

MDA 是脂质过氧化损伤的最终代谢产物,SOD 被认为是清除超氧阴离子自由基的主要抗氧化剂^[14],检测两者在血清中的变化,可间接反映氧自由基的释放与清除情况。本研究发现,急性有机磷中毒时血清中 MDA 含量逐渐增多,同时 SOD 活性逐渐下降,表明机体发生了氧化应激反应,导致抗氧化酶大量被消耗,超过机体的清除能力,造成组织损害,且神经细胞更易受损^[15]。高压氧治疗组中毒大鼠血清 MDA 含量下降、SOD 活性升高,表明 HBO 治疗能增强机体抗氧化能力,降低神经细胞受氧自由基攻击的损伤程度。

综上所述,HIF-1 α 参与了急性有机磷中毒性脑损伤的病理生理过程,HBO 能通过改善脑组织缺血缺氧,使得缺氧诱导的 HIF-1 α mRNA 表达明显下调,并上调抗氧化酶的表达,清除氧自由基,减轻神经细胞水肿,从而发挥脑保护作用,且越早干预效果越好。

参考文献

- [1] Zhu H, O'Brien JJ, O'Callaghan JP, et al. Nerve agent exposure elicits site-specific changes in protein phosphorylation in mouse brain [J]. *Brain Research*, 2010, 1342: 11-23.
- [2] Lou M, Zhang H, Wang J, et al. Hyperbaric oxygen treatment attenuated the decrease in regional glucose metabolism of rats subjected to focal cerebral ischemia: a high resolution positron emission tomography study [J]. *Neuroscience*, 2007, 146(2): 555-561.
- [3] Lim SW, Wang CC, Wang YH, et al. Microglial activation induced by traumatic brain injury is suppressed by postinjury treatment with hyperbaric oxygen therapy [J]. *Journal of Surgical Research*, 2013, 184(2): 1076-1084.
- [4] 曹义战,李志立,仲月霞,等.高压氧治疗急性一氧化碳中毒迟发性脑病的疗效观察[J].*中华急诊医学杂志*, 2009, 17(4): 412-415.
- [5] 周建光,季玉峰,刘长云,等.高压氧对脑缺血再灌注海马神经元 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响[J].*中国临床康复*, 2013, 7(16): 2278-2279.
- [6] 崔文玉,张雁芳,潘志远,等.宾赛克嗪拮抗 M 和 N 胆碱受体的特征及其抗胆碱酯酶抑制剂的毒性效应[J].*中国药理学通报*, 2012, 27(7): 915-921.
- [7] Baille V, Clarke PGH, Brochier G, et al. Soman-induced convulsions: the neuropathology revisited [J]. *Toxicology*, 2010, 215(1): 1-24.
- [8] 谢智慧,陈宗平,曹瑞,等.高压氧干预对大鼠肾缺血再灌注损伤肾组织低氧诱导因子-1 α mRNA 表达的影响[J].*中华物理医学与康复杂志*, 2010, 32(3): 182-185.
- [9] Ergorul C, Ray A, Huang W, et al. Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and some HIF-1 target genes are elevated in experimental glaucoma [J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2010, 42(2): 183-191.
- [10] Vangeison G, Carr D, Federoff HJ, et al. The good, the bad, and the cell type-specific roles of hypoxia inducible factor-1 α in neurons and astrocytes [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2008, 28(8): 1988-1993.
- [11] Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level [J]. *Physiology*, 2004, 19(4): 176-182.
- [12] 孙建平,何汉群,张爱莲.有机磷农药中毒的神经系统损害[J].*中华急诊医学杂志*, 2007, 16(6): 666-668.
- [13] 王光胜,张克忠,王元伟,等.高压氧对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其对低氧诱导因子-1 的影响[J].*中风与神经疾病杂志*, 2010, 27(4): 360-362.
- [14] 王静,汪青松,黄海丽,等.依达拉联合高压氧对 CO 中毒迟发性脑病小鼠血清 MDA 水平, SOD 活性及海马神经元凋亡的影响[J].*安徽医科大学学报*, 2012, 47(4): 383-387.
- [15] Román GC, Erkinjuntti T, Wallin A, et al. Subcortical ischaemic vascular dementia [J]. *The Lancet Neurology*, 2012, 1(7): 426-436.

(收稿日期:2014-09-09)