DOI: 10.3969/j.issn.1000-9760.2022.03.009　　· 基础医学 ·

高压氧对大鼠脑动脉粥样硬化炎症及氧化应激的影响*

苏　龙　肖立运　张　磊　刘朝来
（济宁市第一人民医院，济宁 272011）

摘　要　目的　探究高压氧（hyperbaric oxygen，HBO）对大鼠脑动脉粥样硬化炎症和氧化应激水平的影响。**方法**　SD 大鼠随机分为对照组、模型组和 HBO 组，每组 10 只。模型组和 HBO 组采取高脂饮食联合 L-NAME 喂养构建脑动粥样大鼠模型，HBO 组脑动脉粥样模型构建成功后采取高氧舱处理，对照组给予常规饲养。HBO 组采取高压氧舱处理后，收集各组大鼠脑组织和血清，检测血脂、脑组织中炎症及氧化应激水平。**结果**　与对照组相比，模型组大鼠脑组织细胞排列相对混乱，部分细胞核出现破裂，并伴随较多炎性细胞浸润；HBO 组大鼠脑组织炎性细胞浸润数量较模型组明显变少。HBO 组大鼠血清 TG、TC、TNF-α、IL-1β、IL-6 及 MDA 水平分别为（1.14±0.5）mmol/L、（3.95±1.1）mmol/L、（1.87±0.6）μg/L、（206.73±30.6）pg/mL、（104.51±12.2）pg/mL 和（25.75±6.2）mmol/L，较模型组降低，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；HBO 组 HDL-C、IL-10、SOD 及 GSH-Px 的含量分别为（0.65±0.2）mmol/L、（47.98±14.9）pg/mL、（379.50±82.5）U/mL 和（790.69±93.0）U/mL，较模型组升高，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。**结论**　HBO 能够降低脑动脉粥样硬化大鼠的血脂水平，提高抗氧化应激能力，从而减轻炎症反应。

关键词　高压氧；脑动脉粥样硬化；炎症反应；氧化应激
中图分类号：R743.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1000-9760(2022)06-192-04

Effects of hyperbaric oxygen on cerebral atherosclerotic inflammation and oxidative stress in rats

SU Long, XIAO Liyun, ZHANG Lei, LIU Chaolai
(*Jining No.* 1 *People's Hospital, Jining* 272011, *China*)

Abstract: ***Objective***　To investigate the effect of hyperbaric oxygen (HBO) on cerebral atherosclerosis (AS) inflammation and oxidative stress in rats. ***Methods***　SD rats were randomly divided into control group, model group and HBO group, with 10 rats in each group. The model group and the HBO group were fed a high-fat diet combined with L-NAMEto establish a cerebral atherosclerotic rat model; the HBO group was treated with hyperbaric oxygen chamber after the successful establishment of the cerebral atherosclerotic model, and the control group was given routine feeding. After the HBO group was treated with hyperbaric oxygen chamber, the brain tissue and serum of the rats in each group were collected, and the levels of blood lipids, inflammation and oxidative stress in the brain tissue were detected. ***Results***　Compared with the control group, the arrangement of cells in the brain tissue of the rats in the model group was relatively disordered, and some cell nuclei were ruptured, accompanied by more inflammatory cell infiltration; the number of inflammatory cell infiltration in the brain tissue of the rats in the HBO group was significantly lower than that in the model group. The serum levels of TG, TC, TNF-α, IL-1β, IL-6 and MDA in the HBO group were (1.14±0.5) mmol/L, (3.95±1.1) mmol/L, (1.87±0.6) μg/L, respectively. L, (206.73±30.6) pg/mL, (104.51±12.2) pg/mL and (25.75±6.2) mmol/L, which were lower than those in the model group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); The contents of HDL-C, IL-10, SOD and GSH-Px in the HBO group were (0.65±0.2) mmol/L, (47.98±14.9) pg/mL, (379.50±82.5) U/mL and (790.69±93.0) U/mL, respectively. Compared with the model group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). ***Conclusion***　HBO can re-

*［基金项目］山东省医药卫生项目基金（202003070583）

duce the blood lipid level in rats with cerebral atherosclerosis, improve the ability to resist oxidative stress, and reduce the inflammatory response.

Keywords: Hyperbaric oxygen; Cerebral atherosclerosis; Oxidative stress; Inflammatory response

脑动脉粥样硬化是一种主要发生于大脑动脉的常见疾病,由多种因素所致,比如氧自由基、脂质沉积和长期高血压等。氧化应激和炎症贯穿脑动脉粥样硬化整个过程,并且血管组织释放多种细胞因子诱发的炎症和组织损伤[1-2]。多发生在前循环及后循环大血管,比如大脑前动脉、基底动脉、大脑中动脉、大脑后动脉等[3]。若不及时诊治,会导致患者出现不同程度的神经功能障碍,引起生活质量下降,严重可导致生命危险。高压氧可增加血氧含量,促进氧分子扩散,促进受损细胞的代谢,改善和保护神经功能。目前关于高压氧辅助治疗脑动脉硬化症的有效性和安全性尚未完全明确,尚需进一步探索。本实验通过构建大鼠脑动脉粥样硬化模型,探讨 HBO 在调节脑动脉粥样硬化大鼠模型中作用及其机理,为临床下一步开展治疗提供依据。

1　材料与方法

1.1　动物及分组

6 周龄雄性 SD 大鼠,购自维通利华实验动物技术有限公司。随机分为 3 组,对照组、模型组和 HBO 组,每组 10 只。模型组和 HBO 组采取高脂饮食联合 L-NAME 喂养构建脑动脉粥样大鼠模型,HBO 组脑动脉粥样模型构建成功后采取高压舱处理,对照组给予常规饲养。本研究通过济宁市第一人民医院伦理委员会的批准。

1.2　方法

1.2.1　模型制备　本研究采用高脂饲料饲养的方法建立脑动脉粥样硬化模型[4]:给予大鼠 1%的胆固醇饮食,共计 12 周。前 2 周于大鼠饮用水中添加 L-NAME,浓度为 3mg/ml,共计 600mg。

1.2.2　高压氧处理　将 HBO 组大鼠置于动物高压舱内,纯氧加压至 0.02MPa,清舱 10min,随后匀速加压至 0.25MPa,压力稳定时间为 90 min,随后 15 min 匀速减压,出舱。将大鼠每天置于高压氧舱内 1 次,共 30 次。同时,为了排除 HBO 外的因素对该实验造成干扰,其他组别中的大鼠要被放到同等压力的空气。

1.2.3　脑组织和血清标本收集　HBO 结束后,取每组 5 只大鼠,将其麻醉,主动脉处取血,并将血液以 2000r/min 的速度离心 10min,获得血清做下一步分析。

1.2.4　脑动脉病理学观察　将每个组别中剩余的 5 只大鼠在禁食和禁水 12h 后经颈椎脱臼法处死,判断大鼠无心跳和呼吸时提取脑动脉,经多聚甲醛固定,石蜡包埋后切片将其制作为 5μm 厚度的脑动脉切片,随后对切片进行 HE 染色,染色后由病理专业人员评估脑动脉组织中的病理学改变情况。

1.2.5　血脂水平检测　应用全自动生化仪对上述收集的血清样本中的甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)及高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)的含量进行测定。动脉硬化指数(AI) = (TC−HDL-C)/HDL-C。

1.2.6　炎症因子测定　应用酶联免疫吸附测定实验(购自美国艾博抗生物公司)并按照试剂盒说明书对各组血清样本中的炎症因子,如 TNF-α、IL-1β、IL-6 及 IL-10 的含量进行检测。

1.2.7　氧化应激反应检测　应用紫外可见分光光度计并按照相应试剂盒说明书(南京建成生物工程研究所)对各组血清样本中的超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)含量进行检测。

1.3　统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析方法进行组间比较组间两两比较,用 Bonferroni 检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

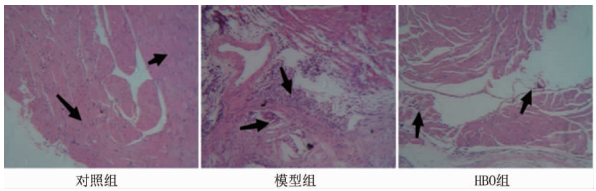
2.1　HBO 对大鼠血脂水平的影响

模型组大鼠 TC、TG、LDL−C 升高,HDL−C 降低,同时大鼠动脉粥样硬化指数也升高,说明成功构建了动脉粥样硬化大鼠模型[4]。

对照组大鼠脑组织中未出现炎性细胞聚集和水肿的现象,而模型组大鼠脑组织细胞排列相对混乱,部分细胞核出现破裂,并伴随较多炎性细胞浸润。经 HBO 治疗后,脑组织炎性细胞浸润数量明显变少。见图 1。

与对照组相比,模型组大鼠的血清 TG 和 TC 含量及 AI 值升高,而 HDL-C 含量降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,HBO 组大

鼠血清标本中的 TG 和 TC 含量及 AI 值降低，而 HDL-C 含量升高，($P<0.05$)。见表 1。



注：黑色箭头，炎性细胞浸润

图 1　各组大鼠脑组织病理学改变(HE×200)

表 1　各组大鼠血清中 TG、TC、HDL-L 及 AI 水平

组别	n	TG/(mmol/L)	TC/(mmol/L)	HDL-C/(mmol/L)	AI
对照组	5	0.82±0.2	1.42±0.3	0.83±0.1	2.01±0.9
模型组	5	1.94±0.3*	8.41±1.4*	0.51±0.1*	8.15±1.2*
HBO 组	5	1.14±0.5#	3.95±1.1#	0.65±0.2#	3.60±1.1#
F		4.27	7.01	2.10	10.20
P		<0.001	<0.001	0.038	<0.001

注：与对照组相比；* $P<0.05$，与模型组相比，#$P<0.05$

2.2　HBO 对大鼠炎症反应的影响

与对照组相比，模型组大鼠的血清样本中促炎因子 TNF-α、IL-1β 及 IL-6 含量升高，而抗炎因子 IL-10 含量降低；与模型组相比，HBO 组 TNF-α、IL-1β 及 IL-6 含量降低，而 IL-10 含量升高，差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2　各组大鼠血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 及 IL-10 水平

组别	n	TNF-α/(μg/L)	IL-1β/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	IL-10/(pg/mL)
对照组	5	1.43±0.6	113.89±28.9	54.60±12.4	66.89±15.9
模型组	5	2.65±0.7*	285.60±31.4*	136.72±13.1*	25.78±15.2*
HBO 组	5	1.87±0.6#	206.73±30.6#	104.51±12.2#	47.98±14.9#
F		2.22	3.20	3.51	4.05
P		0.028	0.004	<0.001	<0.001

注：与较对照组相比，* $P<0.05$；与模型组相比，#$P<0.05$

2.3　HBO 对大鼠氧化应激的影响

与对照组相比，模型组大鼠血清 SOD 及 GSH-Px 水平降低，MDA 升高；经 HBO 处理后，大鼠血清样本中的 SOD 和 GSH-Px 水平升高，MDA 含量降低，与模型组相比，差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3　各组大鼠血清中 SOD、GSH-Px 及 MDA 的测定

组别	n	SOD/(U/mL)	GSH-Px/(U/mL)	MDA/(mmol/L)
对照组	5	425.89±82.3	959.84±90.3	10.73±2.1
模型组	5	269.65±83.0*	650.70±91.5*	38.53±5.8*
HBO 组	5	379.50±82.5#	790.69±93.0#	25.75±6.2#
F		26.95	17.27	5.36
P		<0.001	<0.001	<0.001

注：与对照组相比，* $P<0.05$；与模型组相比，#$P<0.05$

3　讨论

脑动脉粥样硬化可导致出血性脑卒中、缺血性脑卒中、痴呆症脑血管等疾病发生，是各种脑血管疾病的发病原因之一。脑动脉粥样硬化机制复杂，与多种因素有关，大量研究支持抗氧化应激能力下降和多种因素导致了炎性反应是动脉粥样硬化发生发展的核心机制[5-8]。血管内皮细胞炎症反应在 AS 的发生发展中起着至关重要作用。氧化应激能力下降会进一步导致大脑动脉内皮细胞发生一系列生理、病理改变[9]，血脂水平紊乱，尤其是氧化的低密度胆固醇(OX-LDL)为代表的脂质进入血管内膜形成脂质条纹，血管平滑肌细胞中的炎症细胞，尤其是巨噬细胞吞噬大量的 OX-LDL 等脂质转换成泡沫样细胞，最终引起成纤维斑块形成，发生 AS，或使 AS 进一步加重。

血脂紊乱、抗氧化应激能力下降，以及炎症反应共同作用可加重对大脑动脉内皮细胞损伤，促进了大脑动脉粥样硬化发生发展。目前临床治疗非常有限，大多采用改善脑循环、调脂、抗栓等治疗，缺乏显著的有效性。因此，选择一种积极有效的治疗方法是当前迫切需要解决的问题。

HBO 可增加血氧含量，促进氧分子扩散，促进受损细胞的代谢，改善和保护神经功能。本文结果显示，HBO 处理明显改善了模型大鼠的血脂异常状态。经 HBO 治疗后，大鼠血脂水平明显改善，动脉粥样硬化指数也明显降低，这与国内外研究结果一致[10-12]。HDL-C 主要负责将胆固醇和胆固醇酯从组织和细胞中转移到肝脏部位并将其代谢成胆汁酸，因此，HDL-C 通过减少血液和外周组织中的胆固醇水平，进而达到抑制动脉粥样硬化斑块的形成。并且，通过调控脂蛋白间的相互作用。TG 同样在调节脂质代谢过程中发挥关键性的作用，血清中高水平的 TC 和 TG 和低水平的 HDL-C 是动脉粥样硬化发生的危险因素[7]。本文结果显示 HBO 治疗能够明显改善高脂饮食和 L-NAME 喂养诱导的 TG、TC、AI 升高，以及低水平的 HDL-C，说明 HBO 治疗能够有效恢复动脉粥样小鼠的血脂水平，这与国内外大量研究相一致[13-14]。

此外，胆固醇水平升高可促进胆固醇池的升高，进而诱导细胞膜物理特征发生变化，促进了线粒体细胞膜上的活性氧的泄漏或诱导 NADPH 氧化酶的激活，最终造成脂质和蛋白发生氧化。而过度氧化的脂质会造成磷脂双分子层的完整性遭到

破坏,造成细胞膜结合受体和酶的活性丧失,造成细胞由通透性增加而死亡[10]。我们实验发现 HBO 治疗可以有效地降低胆固醇水平。

除此之外,氧化应激是动脉粥样硬化发生的重要机制之一,大量氧自由基聚集造成了内皮细胞功能损伤。正常情况下,机体内存在一定水平的抗氧化酶,这些抗氧化酶能够及时清除过量的氧自由基,从而维持平衡状态。SOD、GSH-Px 是主要抗氧化酶,其活性降低可以促使氧自由基大量聚集;MDA 是机体内过氧化反应的产物,其水平升高标志着氧化应激水平升高[15]。本文显示 HBO 治疗能够有效地降低脑动脉粥样硬化大鼠血清中 MDA 的含量,同时提高 SOD 和 GSH-Px 的水平,表明 HBO 具有抗动脉粥样硬化大鼠氧化应激的作用。

动脉粥样硬化作为一种炎症性的病理生理变化,炎症在其病理进程中扮演重要角色[16]。促炎因子,如 TNF-α、IL-1β 及 IL-6 的持续过度释放能造成炎症级联反应的一步步激活。本文结果显示,HBO 处理能减少模型大鼠血清促炎症因子 TNF-α、IL-1β 及 IL-6 的分泌,而促进抗炎因子 IL-10 分泌的提高。说明 HBO 同样具有抗动脉粥样硬化大鼠炎性反应的作用。

综上所述,本研究初步提示,HBO 可改善脑动脉粥样动物模型的血脂异常状态,抑制氧化应激和炎症反应。其具体的作用机制还需要我们在以后的实验中进行具体探究。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

[1] Banerjee C, Chimowitz MI. Stroke caused by atherosclerosis of the major intracranial arteries[J]. Circ Res, 2017, 120(3): 502-513. DOI: 10. 1161/CIRCRESAHA. 116. 308441.

[2] Chandra A, Stone CR, Li WA, et al. The cerebral circulation and cerebrovascular disease II: Pathogenesis of cerebrovascular disease[J]. Brain Circ, 2017, 3(2): 57-65. DOI: 10. 4103/bc. bc_11_17.

[3] 蒋丝丽,罗华. 大脑中动脉粥样硬化性狭窄与脑白质病变的相关性研究[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2018, 25(6): 43-48. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-2963. 2018. 06. 009.

[4] Guan L, Geng X, Shen J, et al. PM2. 5 inhalation induces intracranial atherosclerosis which may be ameliorated by omega 3 fatty acids[J]. Oncotarget, 2018, 9(3): 3765-3778. DOI: 10. 18632/oncotarget. 23347.

[5] Holmstedt CA, Turan TN, Chimowitz MI. Atherosclerotic intracranial arterial stenosis: risk factors, diagnosis, and treatment[J]. Lancet Neurol, 2013, 12(11): 1106-1114. DOI: 10. 1016/S1474-4422(13)70195-9.

[6] Chen Q, Reis SE, Kammerer C, et al. Association of anti-oxidized LDL and candidate genes with severity of coronary stenosis in the women's ischemia syndrome evaluation study[J]. J Lipid Res, 2011, 52(4): 801-807. DOI: 10. 1194/jlr. M012963.

[7] Aladaileh SH, Saghir SAM, Murugesu K, et al. Antihyperlipidemic and antioxidant effects of averrhoa carambola extract in high-fat diet-fed rats[J]. Biomedicines, 2019, 7(3). DOI: 10. 3390/biomedicines7030072

[8] 邵迴龙,杨庆宝,范真真,等. 高压氧对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2015(3): 192-195. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1009-6906. 2015. 03. 007

[9] 赵伟,王倩,王立新,等. 高压氧增强西红花苷对小鼠动脉粥样硬化的治疗作用[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2019, 26(4): 354-356. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1009-6906. 2019. 04. 001-23

[10] Smathers RL, Galligan JJ, Stewart BJ, et al. Overview of lipid peroxidation products and hepatic protein modification in alcoholic liver disease[J]. Chem Biol Interact, 2011, 192(1-2): 107-112. DOI: 10. 1016/j. cbi. 2011. 02. 021

[11] 孙晨昆,宋少清,张维祥. 高压氧对胰腺炎大鼠氧化应激及炎症反应的影响[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2019, 26(4): 311-314. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1009-6906. 2019. 04. 001

[12] 刘岱,杨虎银. 高压氧对重型颅脑损伤患者血清炎性因子、氧化应激、内皮素及颅内压的影响[J]. 海南医学院学报, 2017(5): 651-654. DOI: 10. 13210/j. cnki. jhmu. 20161223. 001

[13] 徐文苑,黄经纬,徐仁佣,等. 急性动脉硬化性脑梗死患者颅内动脉狭窄的危险因素分析[J]. 中国临床神经科学, 2016, 24(2): 186-193.

[14] Santovito D, Weber C. Atherosclerosis revisited from a clinical perspective: still an inflammatory disease?[J]. Thromb Haemost, 2017, 117(2): 231-237. DOI: 10. 1055/s-0037-1613256

[15] Gowdak LHW. Atherosclerosis, inflammation, and genetics and you thought it was just LDL-cholesterol[J]. Arq Bras Cardiol, 2020, 114(2): 273-274. DOI: 10. 36660/abc. 20200038

[16] Teodoro BG, Natali AJ, Fernandes SAT, et al. Improvements of atherosclerosis and hepatic oxidative stress are independent of exercise intensity in LDLr-/-mice[J]. J Atheroscler Thromb, 2018, 19(10): 904-911. DOI: 10. 5551/jat. 11569.

(收稿日期　2022-04-08)
(本文编辑:石俊强)