

缺氧预处理通过缺氧诱导因子-1 α /基质细胞衍生因子-1通路对大鼠血液学相关指标的影响

孙娟^{1*} 陈敬威¹ 杨艺¹ 林涛¹ 牟雅琳²
赵秀丽¹ 曾国熙¹ 张艳^{3*}

(1.青海大学附属医院神经内科, 西宁 810001; 2.青海大学附属医院影像中心, 西宁 810001;
3.北京大学医学部基础医学院人体解剖学与组织学胚胎学系, 北京 100083)

[摘要] **目的** 探讨缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)/基质细胞衍生因子-1(SDF-1)通路对缺氧预处理大鼠模型的作用。**方法** 76只成年雄性SD大鼠,通过在低压氧舱(海拔5000 m)和西宁市(海拔2260 m)饲养建立缺氧预处理动物模型,随机分为6组:对照组(Ctrl组),高海拔缺氧预处理1 d组(HHP-1d),高海拔缺氧预处理4 d组(HHP-4d)、高海拔缺氧预处理15 d组(HHP-15d),高海拔缺氧预处理30 d组(HHP-30d),中海拔缺氧预处理组(MHP),其中Ctrl组、HHP-4d组、HHP-30d组与MHP组利用7.0 T小动物MRI,T2加权像(T2WI)观察颅内结构及基底动脉直径,连续性自旋动脉标记(ASL)观察海马区及脑干区脑血流,检测各组大鼠血常规,ELISA检测各组大鼠血清HIF-1 α 和SDF-1浓度及血浆血小板活化因子(PAF)及P-选择素(SELP)浓度。**结果** 缺氧预处理条件下,颅内结构未见明显异常;基底动脉直径增宽,但无统计学意义;脑干区及海马区脑血流量明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),红细胞及白细胞升高,血小板下降,差异具有统计学意义($P<0.05$),其中MHP组红细胞和血小板接近Ctrl组;缺氧预处理组HIF-1 α 浓度明显升高,SDF-1浓度(除HHP-1d组外)明显升高,HHP-1d、HHP-15d组PAF,SELP浓度明显升高,HHP-4d、HHP-30d组PAF浓度明显下降,HHP-4d组SELP浓度明显下降,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 缺氧预处理可通过HIF-1 α /SDF-1通路增加机体氧储备量及免疫防御力,提高脑储备能力并发挥脑保护作用,其中以中海拔(海拔2260 m)饲养30 d预处理效果最佳。

[关键词] 缺氧诱导因子-1 α ;基质细胞衍生因子-1;缺氧预处理;血常规;7.0 T小动物磁共振成像;大鼠
[中图分类号] R743.3 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.16098/j.issn.0529-1356.2023.05.002

Effects of hypoxia preconditioning on hematology-related indexes through hypoxia inducible factor-1 α /stromal cell-derived factor-1 pathway in rats

SUN Juan^{1*}, CHEN Jing-wei¹, YANG Yi¹, LIN Tao¹, MOU Ya-lin², ZHAO Xiu-li¹, ZENG Guo-xi¹, ZHANG Yan^{3*}
(1.Department of Neurology, Qinghai University Affiliated Hospital, Xining 810001, China; 2.Department of Imaging Center, Qinghai University Affiliated Hospital, Xining 810001, China; 3.Department of Human Anatomy and Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China)

[Abstract] **Objective** To study the role of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α)/stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) pathway in high altitude hypoxia preconditioning in rat. **Methods** Seventy-six adult male SD rats, which through fed in low-pressure oxygen chamber (altitude 5000 m) and Xining (altitude 2260 m) to establish the rat model of hypoxia preconditioning. Rats randomly divided into 6 groups: control group (Ctrl), high altitude hypoxic preconditioning 1 day group (HHP-1d), high altitude hypoxic preconditioning 4 days group (HHP-4d), high altitude hypoxic preconditioning 15 days group (HHP-15d), high altitude hypoxic preconditioning 30 days group (HHP-30d), medium altitude hypoxic preconditioning group (MHP). 7.0 T small animal MRI was used to observe the intracranial structure, diameter of basilar artery and cerebral blood flow in the hippocampus and brainstem regions by the sequences of T2 weighted images (T2WI)

[收稿日期] 2022-04-21 **[修回日期]** 2022-05-07
[基金项目] 青海省自然科学基金青年项目(2020-ZJ-948Q)
[作者简介] 孙娟(1987—),女(汉族),甘肃省定西市人,副主任医师,博士。
*通讯作者(To whom correspondence should be addressed)
E-mail: sunjuan_128@163.com Tel:0971(3921581)
E-mail: zhang_yan@bjmu.edu.cn Tel:010(82802969)

and arterial spin labeling (ASL) in the groups of Ctrl, HHP-4d, HHP-30d and MHP. In each group, blood routine was tested, the concentrations of HIF-1 α , SDF-1 in serum, platelet activating factor (PAF) and P-selectin (SELP) in plasma were detected by the method of ELISA. **Results** In the hypoxia preconditioning groups, intracranial structure and diameter of basilar artery had no significant difference, while cerebral blood flow in the regions of brainstem and hippocampus increased significantly ($P<0.05$). Meanwhile, red blood cell and white blood cell increased significantly, while platelet decreased significantly in the groups of hypoxia preconditioning ($P<0.05$). Red blood cell and platelet in MHP group were closer to Ctrl group. The concentrations of HIF-1 α and SDF-1 (except HHP-1d group) increased significantly in hypoxia preconditioning groups ($P<0.05$). The concentrations of PAF and SELP increased significantly in HHP-1d and HHP-15d groups. The concentration of PAF decreased significantly in the HHP-4d and HHP-30d groups, and SELP decreased significantly in HHP-4d group ($P<0.05$). **Conclusion** Hypoxia preconditioning can increase oxygen storage and immune defense capacity, improve brain reserve capacity and play the effect of brain protection through HIF-1 α /SDF-1 pathway. The best effect preconditioning was feed at medium altitude (altitude 2260 m) for 30 days.

[Key words] Hypoxia inducible factor-1 α ; Stromal cell-derived factor-1; Hypoxia preconditioning; Routine blood; 7.0 T small animal magnetic resonance imaging; Rat

缺氧预处理(hypoxic preconditioning, HPC)是指组织受到1次或多次短暂性适度缺氧刺激后,触发机体的内源性保护机制,使机体对接下来发生的致死性应激产生防御和保护作用。有文献报道,HPC(低压氧舱模拟海拔5000 m)能缓解大鼠大脑中动脉闭塞模型后缺血性脑损伤^[1,2]。另有研究发现,低氧条件下,人体红细胞增生,血液黏稠度增加,使得内源性及外源性凝血途径被激活,血液处于高凝状态,同时血红蛋白(hemoglobin, HGB)含量增加,血细胞比容增高,进一步导致血液高凝状态^[3],进而诱发了脑血管病的发生。亦有研究报道,在急性高原脑出血死亡病例的尸检中发现,大脑表面、白质、小脑、脑桥、延髓等处均有广泛点状出血^[4]。低氧环境不仅影响神经系统,对血液、心血管、呼吸系统等亦有影响。

低氧环境对血液系统的影响,主要表现在红细胞(red blood cell, RBC)计数、白细胞(white blood cell, WBC)计数、血小板(platelet, PLT)计数及HGB含量上^[5]。张云等^[6]发现,急进海拔4300 m第1天及第3天,人体内RBC无明显变化,但1月后RBC显著升高。有研究报道,在2800 m、3500 m及4000 m海拔地区外周血WBC无显著差异^[7]。但是肖军等^[5]发现,急进海拔3800 m后,淋巴细胞及单核细胞升高。另有研究报道,短期低氧会导致PLT升高,长期则以下降更为常见^[8-10]。

缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)是人体对缺氧反应的主要开关,是一种氧敏感的转录激活因子,在缺氧条件下调节多种因子的转录和表达。有研究表明,HIF-1 α 是缺血、缺氧组织中基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)表达的重要转录因子^[11,12]。SDF-1对T淋巴细胞、前B淋巴细胞、单核细胞、多形核中性粒细胞等有趋化作用,在造血细胞生成,血管形

成,心脏和神经组织的形成,血小板的聚集、塑形及黏附于胶原等过程中发挥作用^[13]。Richmond等^[14]证实,低氧可通过HIFs使促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)基因转录表达增加,进而增加RBC的数量^[15,16]。有研究报道,人从平原进入高原2个月后,P-选择素(P-selectin, SELP)和血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)表达显著升高,进而导致血小板活化使血栓形成^[10]。有研究显示,SDF-1/趋化因子受体4(CXC chemokine receptor 4, CXCR4)轴调节血小板能量代谢和激活,在血小板中高度表达并参与血栓形成^[17]。而SELP是介导血小板与白细胞相互作用的重要分子,可促进白细胞向血小板滚动、迁移、黏附,引起炎症级联反应。另有研究报道,建立脑缺血模型后,缺氧预处理能通过HIF-1 α /AMP依赖的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)/热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70)通路发挥脑保护作用^[18]。

综上所述,我们通过建立缺氧预处理大鼠模型,通过化验血常规观察血细胞,通过小动物MRI观察大鼠颅内结构及基底动脉(basilar artery, BA)血管直径以及脑血流量,同时检测HIF-1 α /SDF-1通路及其下游PAF、SELP因子的表达,为缺氧预处理脑保护机制的精准研究及高原低氧脑损伤防治开辟新途径。

材料和方法

1. 实验动物及分组

76只成年SD大鼠,雄性,体重180~200 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,SPF级,动物许可证号:SCXK(京)2019-0008。

进入高原时采取阶梯性适应的方式可避免急性高原病的发生。因此,本课题组采用西宁市饲养7 d低氧习服(acclimatization to hypoxia)处理后,将SD大鼠放入低压氧舱饲养。文献报道,通过低压氧舱

模拟海拔 5000 m 分别饲养 3、10、14、20 d 可建立 HPC 动物模型,并发现中度海拔地区(海拔 2000~3000 m)是人类低氧预处理的理想场地,可通过在中海拔地区饲养动物 30 d 建立 HPC 模型^[1,2,19]。因此,我们通过低压氧舱(模拟海拔 5000 m)建立高海拔 HPC 动物模型,在西宁市(海拔 2260 m)饲养建立中海拔 HPC 模型。

SD 大鼠随机分为 6 组:对照组(Ctrl 组, $n=10$),高海拔缺氧预处理 1 d 组(HHP-1d, $n=10$),高海拔缺氧预处理 4 d 组(HHP-4d, $n=10$),高海拔缺氧预处理 15 d 组(HHP-15d, $n=10$),高海拔缺氧预处理 30 d 组(HHP-30d, $n=10$)以及中海拔缺氧预处理组(MHP, $n=10$)。对照组 SD 大鼠从北京市(海拔 43.5 m)空运到青海省西宁市(海拔 2260 m)当天,高海拔缺氧预处理组 SD 大鼠到达西宁市后饲养 7 d 置于低压模拟舱内分别饲养 1 d、4 d、15 d 和 30 d,中海拔缺氧预处理 SD 大鼠,从北京空运至西宁市后在西宁市饲养 30 d,各组 SD 大鼠经腹主动脉取血化验血常规,并制备血清、血浆检测 HIF-1 α 、SDF-1、PAF 和 SELP 浓度,同时选取 Ctrl、HHP-4d、HHP-30d 及 MHP 组(每组 $n=4$),通过 7.0 T 小动物 MRI 观察 T2WI、ASL。

2. 实验方法

2.1 缺氧预处理大鼠动物模型制作:部分大鼠通过实验动物低压模拟舱建立低氧预处理大鼠动物模型,SD 大鼠饲养于低压模拟舱,模拟海拔 5000 m 高原环境,氧分压 78 mmHg,氧浓度 19.6%,温度 23.3℃,湿度 31.8%,二氧化碳 300 mg/L,实验动物在低压模拟舱内分别饲养 1 d、4 d、15 d、30 d。另一部分大鼠通过在青海省西宁市(海拔 2260 m)饲养 30 d 建立缺氧预处理动物模型。

2.2 小动物 MRI:采用 7.0 T 小动物 MRI (7.0-Tesla Bruker Pharma scanner,青海省包虫病研究重点实验室)进行 MRI 扫描,使用定制的大鼠脑部线圈(home-made surface coil)进行各序列扫描。T2 加权像(T2 weighted images, T2WI)采用快速自旋回波序列,重复时间 2.5 s,回波时间 33 ms,分辨率 0.136 mm,18 个 1 mm 层厚,平均 4 次。

脑血流量(cerebral blood flow, CBF)使用连续性自旋动脉标记(arterial spin labeling, ASL)序列测定,ASL 不需要注射造影剂,利用放置于颈部的线圈,将颈总动脉流经的血液作为自由弥散的内源性标记,利用翻转恢复脉冲序列标记动脉血中的质子,标记过的质子随血流进入大脑后,与组织中未被标记的质子混合,引起局部组织 T1 的变化,将所得图像与未标记时的图像相减可得灌注图像,也被称为大脑血流灌注 MRI。分辨率 0.3 mm,重复时间 4 s,

回波时间 16 ms,重复采集 30 次。所有图像均由两位有经验的影像科医师独立采集,每只大鼠的采集标准保持一致,取同一层面进行分析

2.3 血常规:各组 SD 大鼠采用 2%异氟烷气体麻醉(瑞沃德-R520IE 小动物麻醉机)后,经腹主动脉取血,置于抗凝管,使用兽用全自动血液细胞分析仪(高原医学中心,BC-5000 Vet,深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)进行全血细胞数据分析。

2.4 HIF-1 α 、SDF-1、PAF 和 SELP 浓度检测:促凝管及抗凝管内血标本经 3500 r/min 离心 10 min,吸取上清液,分别制备血清及血浆及组浆。采用大鼠 HIF-1 α ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,E-EL-R0513c)、大鼠 SDF-1/趋化因子(C-X-C 基元)配体 12[chemokine (C-X-C motif) ligand 12,CXCL12] ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,E-EL-R3027)、大鼠 PAF ELISA 试剂盒(江苏艾苏莱生物科技有限公司,JL10165)、大鼠 SELP ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,E-EL-R0828c),分别检测血清 HIF-1 α 和 SDF-1 浓度,和血浆 PAF 及 SELP 浓度。根据试剂盒说明书检测上述因子。

3. 统计学处理

采用 Sigma Plot 10.0 统计学软件分析实验数据,数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(ANOVA)进行组间比较, $P<0.05$ 时表示差异具有统计学意义。

结 果

1. MRI 结果

1.1 T2WI 结果:各组大鼠 T2WI 结果见图 1, HHP-4d 组、HHP-30d 组、MHP 组与 Ctrl 组比较,大脑组织差异无显著性(图 1A),小脑、脑干组织差异无显著性(图 1B),基底动脉血管直径增宽,但差异无统计学意义(图 1C)。提示,缺氧预处理后,活体状态下观察各组大鼠颅内组织未见明显异常,但血管直径略有增宽,但差异无统计学意义。

1.2 ASL 结果:各组大鼠 ASL 结果见图 2, HHP-4d 组、HHP-30d 组、MHP 组与 Ctrl 组比较,海马区、脑干区脑血流量明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。提示,缺氧预处理后,颅内脑血流量明显升高。

2. 血常规

各组大鼠血常规结果见表 1。白细胞:HHP-1d 组、HHP-4d 组、HHP-15d 组、HHP-30d 组及 MHP 组与 Ctrl 组比较,WBC、中性粒细胞计数(neutrophil count, Neu #)、单核细胞计数(monocyte count, Mon#)、中性粒细胞百分比(percentage of neutrophils, Neu%)、单核细胞百分比(percentage of

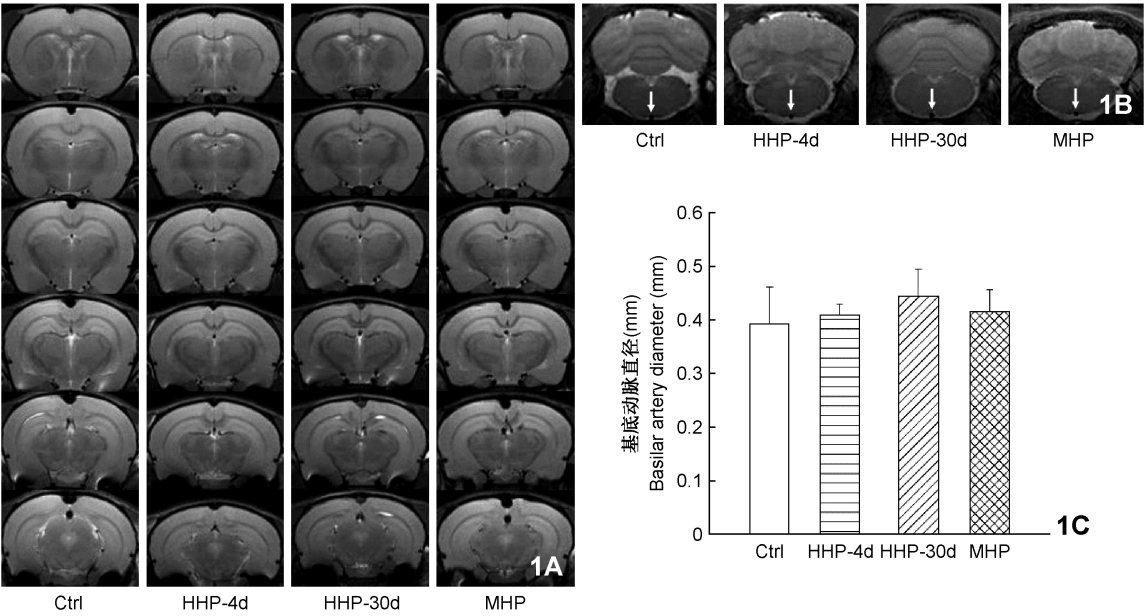


图1 T2加权像 A.大脑;B.小脑、脑干,箭头所指为基底动脉;C.基底动脉直径

Fig.1 T2 weighted images A, Cerebrum; B, Cerebellum and brain stem, arrows indicate basilar artery; C, Diameter of basilar artery

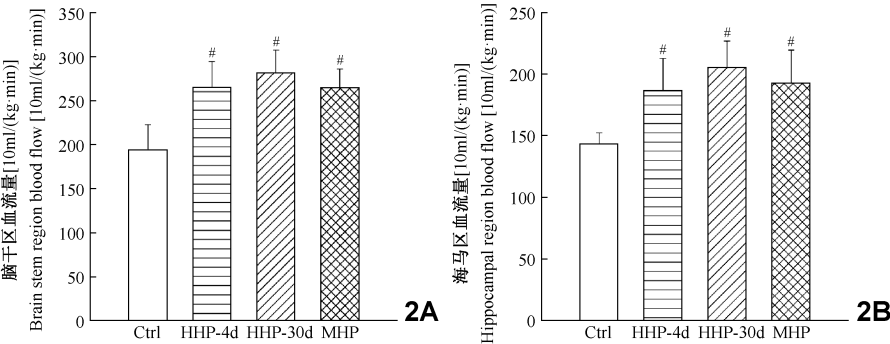


图2 动脉自旋标记 A.脑干区脑血流;B.海马区脑血流;与Ctrl组比较, # $P<0.05$

Fig.2 Arterial spin labeling A, Brain stem region blood flow; B, Hippocampal region blood flow; Compared with the Ctrl group, # $P<0.05$

表1 血常规 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Routine blood ($\bar{x}\pm s, n=10$)

	Ctrl	HHP-1d	HHP-4d	HHP-15d	HHP-30d	MHP
WBC (10 ⁹ /L)	0.94 ± 0.06	2.57 ± 0.31 [#]	1.63 ± 0.19 [#]	2.12 ± 0.38 [#]	3.34 ± 0.43 [#]	1.62 ± 0.30 [#]
Neu#(10 ⁹ /L)	0.10 ± 0.02	0.49 ± 0.05 [#]	0.31 ± 0.07 [#]	0.37 ± 0.04 [#]	0.52 ± 0.05 [#]	0.37 ± 0.05 [#]
Lym#(10 ⁹ /L)	0.86 ± 0.11	1.83 ± 0.31 [#]	1.07 ± 0.19	1.33 ± 0.26 [#]	2.67 ± 0.36 [#]	1.34 ± 0.27 [#]
Mon#(10 ⁹ /L)	0.029 ± 0.009	0.139 ± 0.027 [#]	0.105 ± 0.021 [#]	0.130 ± 0.026 [#]	0.190 ± 0.003 [#]	0.097 ± 0.023 [#]
Neu% (%)	12.04 ± 2.20	21.56 ± 3.07 [#]	21.6 ± 3.51 [#]	17.37 ± 2.42 [#]	19.33 ± 2.14 [#]	22.39 ± 2.56 [#]
Lym% (%)	85.65 ± 4.53	71.79 ± 6.02 [#]	73.22 ± 7.32 [#]	75.59 ± 6.16 [#]	75.82 ± 4.17 [#]	72.13 ± 6.25 [#]
Mon% (%)	2.96 ± 0.32	6.44 ± 0.68 [#]	5.74 ± 0.48 [#]	6.87 ± 0.59 [#]	5.30 ± 0.49 [#]	6.78 ± 0.61 [#]
RBC (10 ¹² /L)	5.73 ± 0.35	7.95 ± 0.39 [#]	7.75 ± 0.68 [#]	9.20 ± 0.43 [#]	9.89 ± 0.42 [#]	6.71 ± 0.20 [#]
HGB (g/L)	83.92 ± 8.88	122.91 ± 4.81 [#]	127.00 ± 8.78 [#]	151.85 ± 7.74 [#]	159.67 ± 6.84 [#]	106.20 ± 2.82 [#]
HCT (%)	31.96 ± 3.32	44.11 ± 1.89 [#]	45.88 ± 2.32 [#]	53.23 ± 2.18 [#]	55.91 ± 2.43 [#]	38.04 ± 1.16 [#]
MCV (fl)	58.20 ± 1.56	56.04 ± 2.13 [#]	59.18 ± 1.80	58.16 ± 1.57	56.93 ± 1.40	57.31 ± 1.11
MCH(pg)	15.19 ± 0.54	15.63 ± 0.56	16.69 ± 0.44 [#]	16.53 ± 0.43 [#]	16.27 ± 0.38 [#]	15.99 ± 0.36 [#]
MCHC(g/L)	258.63 ± 4.72	278.93 ± 3.43 [#]	281.95 ± 3.24 [#]	284.36 ± 4.25 [#]	285.67 ± 2.74 [#]	279.00 ± 2.77 [#]
RDW-CV (%)	12.68 ± 0.46	12.88 ± 0.54	15.26 ± 0.70 [#]	14.89 ± 0.98 [#]	13.94 ± 0.47 [#]	13.34 ± 0.48 [#]
RDW-SD(fl)	32.53 ± 1.20	32.18 ± 2.19	39.78 ± 2.35 [#]	38.06 ± 3.15 [#]	34.72 ± 1.38 [#]	33.67 ± 1.48
PLT(10 ⁹ /L)	1187.39 ± 87.22	955.00 ± 93.01 [#]	787.24 ± 84.45 [#]	696.25 ± 94.32 [#]	590.08 ± 66.41 [#]	893.33 ± 44.73 [#]
MPV (fl)	5.81 ± 0.22	6.49 ± 0.36 [#]	6.53 ± 0.24 [#]	6.54 ± 0.30 [#]	6.79 ± 0.33 [#]	6.17 ± 0.28 [#]
PDW	15.45 ± 0.16	15.49 ± 0.17	15.57 ± 0.14	15.69 ± 0.20 [#]	15.76 ± 0.24 [#]	15.30 ± 0.16 [#]
PCT (%)	0.66 ± 0.05	0.58 ± 0.07 [#]	0.51 ± 0.06 [#]	0.45 ± 0.07 [#]	0.40 ± 0.05 [#]	0.55 ± 0.02 [#]

与Ctrl组比较, # $P<0.05$
Compared with the Ctrl group, # $P<0.05$

monocytes, Mon%) 明显升高, 淋巴细胞百分比 (percentage of lymphocyte, Lym%) 明显下降, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); HHP-1d 组、HHP-4d 组、HHP-15d 组、HHP-30d 组及 MHP 组与 Ctrl 组比较, 淋巴细胞计数 (lymphocyte count, Lym#) 升高, 其中 HHP-1d 组、HHP-15d 组、HHP-30d 组及 MHP 组差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。红细胞: HHP-1d 组、HHP-4d 组、HHP-15d 组、HHP-30d 组及 MHP 组与 Ctrl 组比较, RBC、血红蛋白 (hemoglobin, HGB)、红细胞压积 (hematocrit, HCT)、平均血红蛋白浓度 (mean hemoglobin concentration, MCHC) 明显升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); HHP-1d 组、HHP-15d 组、HHP-30d 组及 MHP 组与 Ctrl 组比较, 平均红细胞体积 (mean red blood cell volume, MCV) 下降, 其中 HHP-1d 组差异具有统计学意义 ($P<0.05$), HHP-4d 组与 Ctrl 组比较, MCV 上升, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); HHP-1d 组、HHP-4d 组、HHP-15d 组、HHP-30d 组及 MHP 组与 Ctrl 组比较, MCHC、红细胞分布宽度变异系数 (variation coefficient of red blood cell distribution width, RDW-CV) 升高, 其中 HHP-4d 组、HHP-15d 组、HHP-30d 组及 MHP 组差异具有统计学意义 ($P<0.05$); HHP-4d 组、HHP-15d 组、HHP-30d 及 MHP 组与 Ctrl 组比较, 红细胞分布宽

度标准差 (standard deviation of red blood cell distribution width, RDW-SD) 升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$), HHP-1d 组与 Ctrl 组比较 RDW-SD 下降, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。血小板: HHP-1d 组、HHP-4d 组、HHP-15d 组、HHP-30d 组及 MHP 组与 Ctrl 组比较, PLT、血小板压积 (platelet hematocrit, PCT) 下降, 平均血小板体积 (mean platelet volume, MPV) 升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); HHP-1d 组、HHP-4d 组、HHP-15d 组、HHP-30d 组及 MHP 组与 Ctrl 组比较, 血小板分布宽度 (platelet distribution width, PDW) 升高, 其中 HHP-15d 组、HHP-30d 组及 MHP 组差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。提示, 缺氧预处理后, 红细胞、白细胞明显升高, 血小板明显下降, 差异有统计学意义。

3. HIF-1α、SDF-1、PAF 及 SELP 浓度

各组大鼠血清中 HIF-1α、SDF-1 浓度, 血浆中 PAF、SELP 浓度结果见图 3。HHP-1d 组、HHP-4d 组、HHP-15d 组、HHP-30d 组及 MHP 组与 Ctrl 组比较, HIF-1α 浓度升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$), SDF-1 浓度升高, 其中 HHP-4d 组、HHP-15d 组、HHP-30d 组及 MHP 组差异具有统计学意义 ($P<0.05$); HHP-1d 组、HHP-15d 组及 MHP 组与 Ctrl 组比较, PAF 浓度升高, 其中 HHP-1d 组、HHP-15d 组差

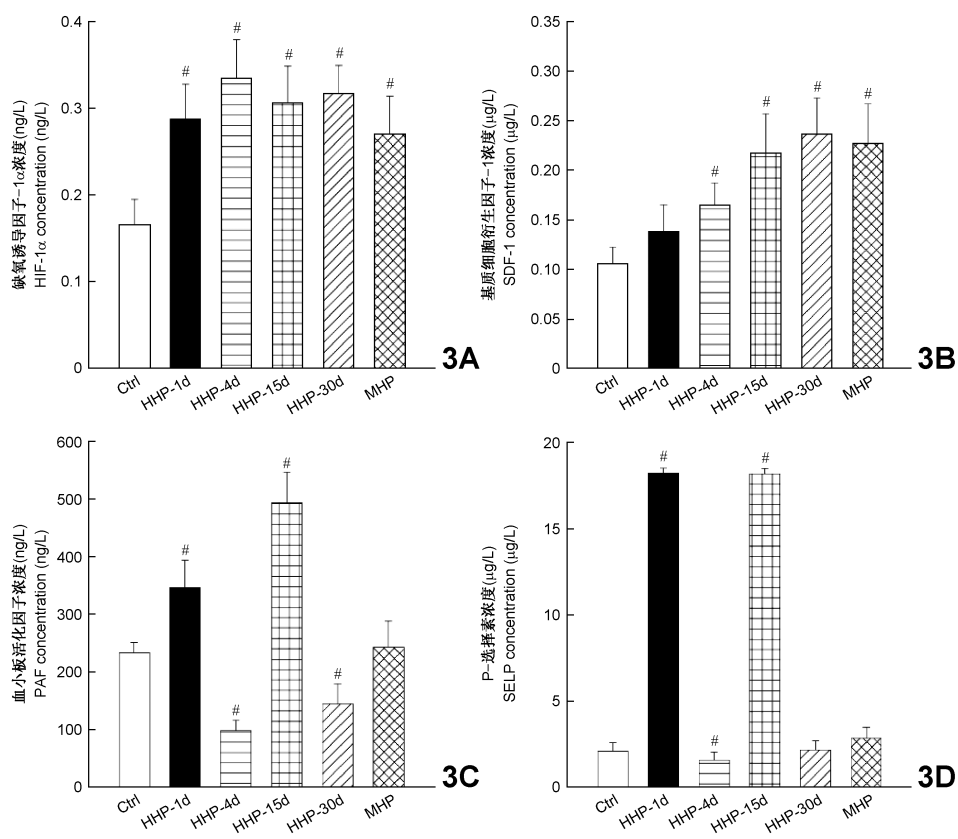


图3 HIF-1α、SDF-1、PAF、SELP 的浓度;与 Ctrl 组比较, # $P<0.05$
Fig.3 The concentrations of HIF-1α, SDF-1, PAF, SELP
Compared with the Ctrl group, # $P<0.05$

异具有统计学意义($P < 0.05$), HHP-4d 组、HHP-30d 组与 Ctrl 组比较, PAF 浓度下降, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); HHP-1d 组、HHP-15d 组、HHP-30d 组及 MHP 组与 Ctrl 组比较, SELP 浓度升高, 其中 HHP-1d 组、HHP-15d 组差异具有统计学意义($P < 0.05$), HHP-4d 组与 Ctrl 组比较, SELP 浓度下降, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。提示, 缺氧预处理后, HIF-1 α 、SDF-1 浓度明显升高, HHP-1d 组、HHP-15d 组 PAF、SELP 浓度明显升高, 而 HHP-4d 组、HHP-30d 组 PAF 浓度下降, HHP-4d 组 SELP 浓度明显下降。

讨 论

Murry 等^[20]在研究犬心肌缺血模型中发现, 机体组织受到 1 次或多次短暂性、非致死性缺氧刺激后, 能够触发机体的内源性保护, 使机体对其后发生的严重缺氧或其它致死性应激产生防御和保护作用, 首次提出了 HPC 的概念。有研究表明, HPC 减轻大鼠缺氧脑损伤的可能机制是 HPC 调动机体内源性保护机制, 对机体氧化应激、炎症反应、细胞凋亡、缺血缺氧引起的兴奋性毒性等产生积极的适应性反应^[1]。然而另有研究发现, 低氧条件下血液处于高凝状态诱发了脑血管病的发生^[3]; 亦有研究报道, 在急性高原脑出血死亡病例的尸检中发现, 大脑表面、白质、小脑、脑桥、延髓等处均有广泛点状出血^[4]。缺氧预处理条件下, 对血液系统及脑组织的影响鲜见报道。本实验通过 7.0 小动物 MRI 观察颅内结构及脑血流, 了解缺氧预处理条件下颅内情况, 同时通过血常规了解血细胞变化, 并进一步探讨其机制。

有研究表明, 急进高原脑血流在经历数分钟降低后迅速增加, 且 1~2 d 后达到高峰, 此后随着缺氧时间延长, 脑血流量逐渐下降, 并接近于平原水平^[4]。然而, 本课题组通过 7.0 T 小动物 MRI 观察各组大鼠颅内组织及海马区、脑干区脑血流量, 结果发现, 缺氧预处理后大鼠大脑、小脑、脑干组织未见明显异常, 基底动脉直径略增宽, 但差异无统计学意义, 海马区及脑干区脑血流明显升高。提示, 缺氧预处理可通过增加脑血流量及大血管直径, 进而启动侧枝循环和代谢储备, 以维持正常脑血流来保护脑组织免受缺血缺氧的损伤。

低氧对血液系统的影响, 主要表现在 RBC、WBC、PLT 及 HGB 上^[5]。本课题通过化验各组大鼠血常规发现, 缺氧预处理后, RBC、HGB、HCT、MCHC 明显上升, MCH、DW-CV、RDW-SD 明显升高(除 HHP-1d 组); WBC、Neu#、Mon#、Neu%、Mon%明显升高, Lym#升高(除 HHP-4d 组); PLT、PCT 明显

下降, MPV 明显升高, PDW 升高(除 HHP-1d、HHP-4d 组)。结果提示, 缺氧预处理后, 大鼠机体通过增加红细胞增加机体携氧能力, 进而减轻缺氧症状, 通过增加白细胞, 增加机体免疫力, 然而红细胞增加, 导致血液黏稠度增加, 增加血栓形成风险, 同时血小板下降, 两者导致脑血管病的发病率增加, 而 MHP 组红细胞、血小板更接近 Ctrl 组, 白细胞更接近 HHP-4d 组和 HHP-15 d 组, 提示中位海拔(海拔 2260 m)饲养 30 d 不但能增加机体氧储备能力及免疫力, 同时可降低血栓形成及出血风险, 进而降低脑血管病的发生。

HIF-1 是 1988 年 Goldberg 等^[21]在 EPO 基因的调节相关研究中发现的, 是一种氧敏感的转录激活因子, 在缺氧条件下调节多种因子的转录和表达, 如: 缺氧适应、红细胞生成、血管生成、氧化应激、炎症反应等。有研究表明, HIF-1 α 是缺血、缺氧组织中 SDF-1 表达的重要转录因子^[11, 12], SDF-1 在造血细胞生成、血管形成、心脏和神经组织的形成、血小板的聚集、塑形及黏附于胶原等过程中发挥作用^[13]。另有研究显示, SDF-1/CXCR4 轴调节血小板能量代谢和激活, 在血小板中高度表达并参与血栓形成^[17], 而 SELP 是介导血小板与白细胞相互作用的重要分子, 可促进白细胞向血小板滚动、迁移、黏附, 引起炎症级联反应。本课题组通过检测血清中 HIF-1 α 、SDF-1 浓度及血浆中 PAF 及 SELP 浓度进而探讨缺氧预处理是否通过 HIF-1 α /SDF-1 通路调整血细胞变化。结果提示, 缺氧预处理组 HIF-1 α 、SDF-1 浓度升高, 且化验血常规提示, 红细胞、白细胞明显升高, 血小板明显下降, 且变化趋势与 HIF-1 α 、SDF-1 浓度基本一致。提示, 缺氧预处理后可通过 HIF-1 α /SDF-1 通路调整血细胞变化, 进而适应低氧环境, 而血小板数量及功能与血栓形成相关, SELP 和 PAF 表达与血小板活化使血栓形成有关。血浆中 PAF 和 SELP 浓度提示, HHP-1d 组和 HHP-15d 组 PLT 明显下降, 但 PAF、SELP 浓度明显升高, 考虑此期间血栓形成风险较高, 而 HHP-4d 组和 HHP-30d 组 PLT 明显下降, PAF、SELP 浓度明显下降, 提示此期间出血风险较高; MHP 组与 Ctrl 组比较, PAF 和 SELP 浓度差异无显著性, 提示中位海拔(海拔 2260 m)饲养 30 d 可使红细胞、白细胞升高, 血小板降低, 但血小板功能未见明显异常, 进而增加机体氧储备力和抵抗力, 但不增加脑血管病的发病率。

文献报道, 低压氧舱模拟海拔 5000 m 建立 HPC 动物模型, 可缓解大鼠大脑中动脉闭塞模型后缺血性脑损伤^[1, 2, 19]。但本课题组发现, 低压氧舱 5000 m 海拔建立缺氧预处理模型, 脑血流量增加,

基底动脉直径增宽,可启动侧支循环和代谢储备,保护脑组织免受缺血、缺氧的损伤,同时红细胞、白细胞升高,增加机体氧储备量、免疫防御力,提高脑储备能力,然而血小板下降,HHP-1d 组、HHP-15d 组血浆中 PAF、SELP 浓度明显升高,血栓形成风险较高,而 HHP-4d 组和 HHP-30d 组 PAF、SELP 浓度明显下降,出血风险较高,提示低压氧舱 5000 m 海拔缺氧预处理,虽可保护脑组织免受缺血、缺氧的损伤,同时可增加机体氧储备量、免疫防御力,但脑血管病发生率亦相应升高;然而中位海拔(海拔 2260 m)饲养 30 d 组,即可增加脑血流,亦可轻微升高红细胞、白细胞,降低血小板,同时血浆中 PAF、SELP 浓度未见明显变化,进而增加机体氧储备量、免疫防御力,增加脑储备力,且不增加脑血管病发生率。血清中 HIF-1 α 、SDF-1 浓度结果提示,缺氧预处理后,HIF-1 α 、SDF-1 浓度明显上升,且低氧组此结果成时间依赖性,提示缺氧预处理调整血细胞变化可能是通过 HIF-1 α /SDF-1 通路。

综上所述,缺氧预处理可通过 HIF-1 α /SDF-1 通路升高大鼠红细胞、白细胞,降低血小板,增加大鼠脑血流量,进而增加机体氧储备量、免疫防御力,提高脑储备能力;于中位海拔(海拔 2260 m)饲养 30 d 为最佳缺氧预处理条件。

参 考 文 献

[1] Huang L, Wu S, Li H, et al. Hypoxic preconditioning relieved ischemic cerebral injury by promoting immunomodulation and microglia polarization after middle cerebral artery occlusion in rats [J]. Brain Res, 2019, 1723:146388.

[2] Huang L, Wan Y, Dang Z, et al Hypoxic preconditioning ameliorated neuronal injury after middle cerebral artery occlusion by promoting neurogenesis[J]. Brain Behav, 2020, 10(10):e01804.

[3] Wu ShZh. Plateau cerebrovascular disease —— an area of neurology worth watching[J]. Chinese Journal of Stroke, 2007, 2(12): 965-968. (in Chinese)
吴世政. 高原脑血管病——一个值得关注的神经病学领域[J]. 中国卒中杂志, 2007, 2(12): 965-968.

[4] Ge RL. High Altitude Medicine [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2015: 113-117. (in Chinese)
格日力. 高原医学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2015: 113-117.

[5] Xiao J, Li XW, Lei HF, et al. Effects of high altitude environment on human peripheral blood cell [J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2017, 30(8): 870-872. (in Chinese)
肖军, 李小薇, 雷慧芬, 等. 高原环境对外周血细胞的影响 [J]. 中国输血杂志, 2017, 30(8): 870-872.

[6] Zhang Y, Xu H, Tang WG, et al. Observed the influence of different time and placement time on blood routine of soldiers in acue plateau [J]. People's Military Surgeon, 2012, 55(12): 1158-1159. (in Chinese)
张云, 徐红, 唐伟革, 等. 不同时间节点及放置时间对急进高原官兵血常规的影响观察[J]. 人民军医, 2012, 55(12): 1158-1159.

[7] Lin J, Zhao J, Qin J, et al. Analysis of complete blood of soldiers after rush into plateau[J]. Journal of Preventive Medicine People's Liberation Army, 2016, 34(6): 809-811. (in Chinese)

林静, 赵晋, 秦晋, 等. 急进高原人群的血常规指标分析[J]. 解放军预防医学杂志, 2016, 34(6): 809-811.

[8] Mantysaari M, Jouts-Korhonen L, Siimes MA, et al. Unaltered blood coagulation and platelet function in healthy subjects exposed to acute hypoxia[J]. Aviat Space Environ Med, 2011, 82(7): 699-703.

[9] Ke JB, Li JB, Zhang JH, et al. Influence of acute high altitude exposure and short-term acclimation on platelet-associated parameters in healthy young man [J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2018, 43(3): 251-256. (in Chinese)
柯景彬, 李佳蓓, 张继航, 等. 急性高原暴露及短期习服对青年男性血小板相关参数的影响[J]. 解放军医学杂志, 2018, 43(3): 251-256.

[10] Shang C, Wuren T, Ga Q, et al. The human platelet transcriptome and proteome is altered and pro-thrombotic functional responses are increased during prolonged hypoxia exposure at high altitude[J]. Platelets, 2020, 31(1):33-42.

[11] Youn SW, Lee SW, Lee J, et al. COMP-Ang1 stimulates HIF-1 α -mediated SDF-1 overexpression and recovers ischemic injury through BM-derived progenitor cell recruitment [J]. Blood, 2011, 117(16): 4376-4386.

[12] Lerman OZ, Greives MR, Singh SP, et al. Low-dose radiation augments vasculogenesis signaling through HIF-1-dependent and-independent SDF-1 induction[J]. Blood, 2010, 116(18): 3669-76-86.

[13] Zhang JL, Zhang ZhJ, Su DH. The role of SDF-1 and Slit in neuronal amd leukocyte migration [J]. Journal of Fujian Medical University, 2005, 39(1): 106-108, 111. (in Chinese)
张佳林, 张志坚, 苏东辉. SDF-1 和 Slit 在神经细胞和白细胞迁移中的作用[J]. 福建医科大学学报, 2005, 39(1): 106-108, 111.

[14] Richmond TD, Chohan M, Barber DL. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin [J]. Trends Cell Biol, 2005, 15(3): 146-155.

[15] Xu Q, Zhang C, Zhang D, et al. Analysis of the erythropoietin of a Tibetan Plateau schizothoracine fish (Gymnocypris dobula) reveals enhanced cytoprotection function in hypoxic environments[J]. BMC Evol Biol, 2016, 16: 11.

[16] Painschab MS, Malpartida GE, Dávila-Roman VG, et al. Association between serum concentrations of hypoxia inducible factor responsive proteins and excessive erythrocytosis in high altitude Peru[J]. High Alt Med Biol, 2015, 16(1): 26-33.

[17] Li Y, Feng Z, Zhu L, et al. Deletion of SDF-1 or CXCR4 regulates platelet activation linked to glucose metabolism and mitochondrial respiratory reserve [J]. Platelets, 2022, 33(4):536-542.

[18] Xia M, Ding Q, Zhang Z, et al. Remote limb ischemic preconditioning protects rats against cerebral ischemia via HIF-1 α /AMPK/HSP70 pathway [J]. Cell Mol Neurobiol, 2017, 37(6): 1105-1114.

[19] Li JJ, Wu ShZh, Xue MZh, et al. Relationship of TRPC3 with cerebral infarction after hypoxia preconditioning in rats[J].Journal of Zhengzhou University (Medical Sciences), 2020, 6(55): 806-810. (in Chinese)
李婧静, 吴世政, 薛孟周, 等. 经典瞬时受体电位通道 3 与缺氧预处理大鼠脑梗死的关系 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2020, 6(55): 806-810.

[20] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. Circulation, 1986, 74(5): 1124-1136.

[21] Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein[J]. Science, 1988, 242(4884): 1412-1415.

(编辑 张立克)