

·论著·

缺氧缺血脑损伤时新生大鼠脑皮质 神经细胞能量代谢的改变

李书娟,毛健

(中国医科大学第二临床学院新生儿科,辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 近年来的一些研究表明,线粒体能量代谢异常是新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)发病机制的重要环节之一。该实验研究新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)时脑皮质神经细胞内磷酸肌酸(PCr)、ATP和总腺苷酸池(ATP+ADP+AMP)的变化。方法 7日龄Wistar大鼠随机分为假手术对照组($n=6$)和HIBD组($n=60$)。HIBD组新生鼠分别于缺氧缺血(HI)后0,2,4,6,8,10,12,24,48h和72h断头(每个时间点6只),取左侧顶枕部脑皮质;假手术对照组新生鼠于假手术后4h断头。用高效液相色谱方法检测脑皮质高能磷酸物质的含量。结果 HIBD组新生鼠HI后0h PCr,ATP和ATP+ADP+AMP即低于正常对照组($P<0.01$ 或 0.05),并于缺氧缺血后0~6h出现第1次低谷,分别为对照组的51%,71%,50%。缺氧缺血后8~12h分别恢复到对照组的92%,83%和83%,与对照组比较差异无显著性($P>0.05$);以后又下降到低于正常对照组($P<0.01$),并于缺氧缺血后24~48h下降到第2次低谷,分别为对照组的58%,61%和32%。结论 新生大鼠HIBD后24~48h皮质神经细胞出现第2次能量代谢衰竭,能量代谢变化可作为判断缺氧缺血性脑损伤干预手段是否有效的观察指标。

[中国当代儿科杂志,2004,6(2):101-104]

[关键词] 脑缺氧缺血;能量代谢;大鼠,新生

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2004)02-0101-04

Changes of energy metabolism in the cortical neurons of newborn rats with cerebral hypoxia-ischemia

ShuJuan LI, Jian MAO. Department of Neonatology, Second Clinical Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Email:Jian64728@ahoo.com.cn)

Abstract: Energy metabolism of mitochondria plays an important role in hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). This study aims to investigate the changes of energy metabolism following hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) in cortical neurons of newborn rats. **Methods** Seven-day-old Wistar rats were randomly assigned into a Sham-operation control group ($n=6$) and a Cerebral hypoxia ischemia (HI) group. The HI group was divided into 10 subgroups of 6 animals, sacrificed respectively at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 and 72 hrs after HI. The rats in the Shamoperation control group were sacrificed at 4 hrs post-operatively. The concentrations of PCr, ATP, ADP and AMP in cortical neurons were measured with high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** The concentrations of PCr, ATP and ATP+ADP+AMP decreased immediately after HI and reached a nadir 0-6 hrs after HI (51%, 71% and 50% of controls, respectively), returning almost to normal values by 8-12 hrs after HI. Twelve hrs after HI the values again decreased reaching a second nadir by 24-48 hrs post-HI (58%, 61%, 33% of controls, respectively; $P<0.05$). **Conclusions** There is a secondary decrease in high-energy phosphates 24-48 hrs after cerebral HI in newborn rats. Changes of energy metabolism may serve as indicators in evaluating the efficacy of intervention for HIBD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(2):101-104]

Key words: Cerebral hypoxia ischemia; Energy metabolism; Rat, newborn

[收稿日期] 2003-08-26; [修回日期] 2003-11-26

[作者简介] 李书娟(1966-),女,硕士,副主任医师。主攻方向:新生儿疾病。现在辽宁省辽阳市辽化职工医院儿科,邮编:111003。

[通讯作者] 毛健,辽宁省沈阳市三好街36号中国医科大学第二临床学院儿科新生儿病房,邮编:110004。

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是引起新生儿死亡和儿童永久性神经系统功能障碍的主要原因之一,新生儿HIE的发病机制尚不十分清楚。近年来的一些研究表明,线粒体在HIE的发病过程中起着关键性的作用^[1],线粒体的主要功能为能量代谢,经过氧化、磷酸化、电子传递系统生成ATP,为各种生命活动提供能源。Reynolds等^[2,3]应用磁共振波谱学(magnetic resonance spectroscopy, MRS)研究报导了围生期窒息的新生儿脑组织能量代谢紊乱的特点,阐述了磷酸肌酸/无机磷酸(phosphocreatine/inorganicphosphate, PCr/Pi)的比值在生后8 h~12 h开始出现第二次下降,同时伴有乳酸浓度的升高^[4,5],细胞内pH值正常或轻微升高^[6,7],而且发现伴有明显二次能量代谢衰竭的患儿脑发育速度减慢^[8,9]。由于动物模型和制作方法不同,能量代谢衰竭的时间和程度报导不一。国外多采用新生猪缺氧缺血脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)模型研究缺氧缺血(hypoxia ischemia, HI)后脑细胞能量代谢规律。国内关于新生儿和(或)新生动物HI后能量代谢变化的研究报导甚少。本实验应用新生鼠HIBD模型,检测HI后0 h~72 h 10个不同时间点的皮质神经细胞内PCr、ATP、总腺苷酸池(ATP + ADP + AMP)含量的动态变化,旨在按照HI后脑组织能量代谢的变化规律寻找HIBD干预手段实施的时间窗。

1 材料与方法

1.1 新生大鼠HIBD模型的制备

生后7日龄Wistar大鼠,由中国医科大学第二临床学院动物实验中心提供,体重11~18 g,雌雄不限,共72只。将正常鼠称体重、编号和随机分组。动物模型60只(HIBD组),假手术6只(对照组),在模型制作过程中死亡6只。模型组新生大鼠乙醚吸入麻醉后取仰卧位,四肢固定于手术板上,颈正中切口,游离左侧颈总动脉,用0~4号线结扎,缝合切口,放回原饲养环境中2~4 h后置于由氧气和空气调节的混合气体中,用测氧仪监控常压缺氧舱,维持舱内温度(36±1),氧浓度8%,缺氧持续时间为1.5 h,缺氧后将鼠放回原笼内。假手术组新生大鼠乙醚吸入麻醉后取仰卧位,四肢固定于手术板上,颈正中切口,游离左侧颈总动脉后缝合切口,放回原饲养环境中恢复4 h。

1.2 标本留取

假手术对照组(n=6)于假手术后恢复4 h处

死,HIBD模型组新生鼠分别于HI后0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、24 h、48 h和72 h处死,每个时间点随机处死6只。断头处死后,剥离左侧顶枕部大脑皮质,迅速置于-196℃液氮中,24 h后移至-80℃冰箱中保存。

1.3 皮质神经细胞内PCr、ATP、ADP及AMP的检测

1.3.1 仪器与试剂 美国Waters公司高效液相色谱仪。美国杜邦公司Super T21型高速离心机、PCr、ATP、ADP、AMP标准品(美国Sigma公司);四丁基磷酸钠离子对试剂(IPR-A)(天津化学试剂二厂);甲醇(色谱纯,北京益利精细化学品公司);高氯酸、磷酸二氢钾、磷酸二氢胺、碳酸钾均为分析纯。制备PCr、ATP、ADP、AMP标准溶液:准确称取PCr、ATP、ADP、AMP标准品,用双蒸水配成浓度为1 mmol/L的标准储备液,于4℃的冰箱中保存(最长为1个月),使用时再用水稀释成不同浓度的标准工作液。

1.3.2 色谱条件 PCr色谱条件:色谱柱:Nova-pak C18柱,5 μm,(3.9×150 mm,Waters公司);流动相:A液:20 mM pH 5.8的KH₂PO₄溶液(内含2.9 mM IPRA) 600 ml 350 ml水 50 ml甲醇;B液:20 mM pH 5.8的KH₂PO₄溶液(内含2.9 mM IPRA) 600 ml 180 ml水 220 ml甲醇。上述A、B液经0.45 μm滤膜过滤、脱气,流速:1.2 ml/min进行梯度洗脱;检测波长215 nm。ATP、ADP、AMP色谱条件:色谱柱:Nova-pak C18柱,5 μm,(3.9×150 mm,Waters公司);流动相30 mM NH₄H₂PO₄用3M氨水调pH为5.3,流速:0.9 mL/min,检测波长254 nm,仪器灵敏度0.005 AUFS。

1.3.3 检测方法 将脑组织标本从-80℃冰箱中取出称重,每份标本重500~700 mg,按1:20加入0.5 M高氯酸,在4℃下用组织匀浆器进行匀浆,然后离心(9 000 r/min)12 min,取上清液,6 N K₂CO₃调pH 7.0,离心(6 000 r/min)5 min,取上清液20 ml进样,用高效液相色谱法进行检测。

1.4 统计学处理

应用SPSS 10.0统计软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数的比较采用单因素方差分析和q检验。

2 结果

2.1 HIBD组新生鼠皮质神经细胞PCr含量变化

HIBD组新生鼠皮质神经细胞PCr含量于HI后立即下降,6 h下降到低谷,明显低于对照组(P

<0.01),为对照组的51%;以后逐渐上升。于HI后10h恢复到正常对照组的92%,与对照组比较差异无显著性($P>0.05$);HI12h后再次下降到低于正常对照组($P<0.01$),并继续下降,于24h出现第二次低谷,为对照组的58%,以后逐渐上升,但HI后48hPCr含量仍低于正常对照组($P<0.01$),HI后72h与对照组比较,差异无显著性($P>0.05$)。见表1。

2.2 HIBD组新生鼠皮质神经细胞ATP含量变化

HIBD组新生鼠皮质神经细胞ATP含量于HI后0h即低于对照组($P<0.01$),第一次低谷降至对照组的71%;HI后4h逐渐上升,但仍低于对照组($P<0.05$ 或 0.01),12h恢复到正常对照组的83%,与对照组比较差异无显著性($P>0.05$);HI24h后再次下降到低于正常对照组($P<0.01$);于48h出现第二次低谷,为对照组的61%,以后逐渐上升,HI后72h仍低于正常对照组($P<0.01$),见

表1。
2.3 HIBD组新生鼠皮质神经细胞ADP和AMP含量变化

HIBD组新生鼠皮质神经细胞ADP含量于HI48h低于对照组($P<0.01$),余各时间点与对照组比较,差异无显著性;AMP含量于HI各时间点均低于正常对照组($P<0.05$ 或 0.01)。见表1。

2.4 HIBD组新生鼠皮质神经细胞ATP+ADP+AMP含量变化

HIBD组新生鼠皮质神经细胞ATP+ADP+AMP于HI后0h为正常对照组的50%,明显低于对照组($P<0.01$);以后逐渐上升,于HI后8h恢复到对照组的83%,与对照组比较差异无显著性($P>0.05$);HI10h后再次下降到低于正常对照组($P<0.01$),并于HI后48h出现第二次低谷,为对照组的33%,HI后72h仍低于对照组($P<0.01$)。见表1。

表1 对照组和HIBD组不同时间点皮质神经细胞能量物质浓度的变化

Table 1 Concentrations of PCr, ATP, ADP, AMP and ATP + ADP + AMP in cortical neurons of rats in the HIBD group and the Control group ($\bar{x} \pm s$, mmol/kg)

分组	n	PCr	ATP	ADP	AMP	ATP + ADP + AMP
对照组	6	2.1698 ±0.2334	0.5782 ±0.0728	0.9191 ±0.1709	1.5814 ±0.2186	3.0788 ±0.2174
HIBD组						
HI 0 h	6	1.4115 ±0.2148 ^a	0.4344 ±0.0494 ^a	0.7631 ±0.3568	0.5463 ±0.0590 ^a	1.5437 ±0.4034 ^a
HI 2 h	6	1.2969 ±0.2021 ^a	0.4126 ±0.0677 ^a	1.0124 ±0.2526	0.7204 ±0.2124 ^a	2.1454 ±0.3336 ^a
HI 4 h	6	1.1305 ±0.0766 ^a	0.4175 ±0.0258 ^a	0.9997 ±0.0669	0.4433 ±0.0509 ^a	1.8604 ±0.1277 ^a
HI 6 h	6	1.1018 ±0.1853 ^a	0.4275 ±0.0258 ^a	1.0197 ±0.0669	0.4601 ±0.0528 ^a	1.9073 ±0.1317 ^a
HI 8 h	6	1.3467 ±0.1765 ^a	0.4385 ±0.0278 ^a	0.8494 ±0.0860	1.2655 ±0.1619 ^b	2.5534 ±0.2160
HI 10 h	6	1.9946 ±0.1643	0.4729 ±0.0500 ^b	0.9388 ±0.0923	0.2043 ±0.0698 ^a	1.6159 ±0.1715 ^a
HI 12 h	6	1.4305 ±0.0506 ^a	0.4802 ±0.0515	1.0044 ±0.1195	0.3183 ±0.2595 ^a	1.8029 ±0.2216 ^a
HI 24 h	6	1.2597 ±0.1728 ^a	0.3955 ±0.0559 ^a	0.7899 ±0.3019	0.3501 ±0.1288 ^a	1.5354 ±0.4638 ^a
HI 48 h	6	1.6786 ±0.1022 ^a	0.3533 ±0.0843 ^a	0.3920 ±0.1872 ^a	0.2571 ±0.0842 ^a	1.0024 ±0.3270 ^a
HI 72 h	6	1.8868 ±0.0892	0.4437 ±0.0407 ^a	0.9503 ±0.1253	0.5011 ±0.0799 ^a	1.8951 ±0.1366 ^a

注: a 与正常对照组比较 $P<0.01$; b 与正常对照组比较 $P<0.05$

3 讨论

衡量线粒体功能的指标有很多^[10],包括线粒体合成ATP的能力、线粒体呼吸控制比(respiratory control ratio, RCR)、组成呼吸连的酶和辅酶的活性和含量。本实验通过检测细胞内PCr、ATP、ATP+ADP+AMP浓度,观察线粒体能量代谢功能在HI后的改变。关于HI后线粒体损伤的机制尚不十分

清楚,其早期损伤可能与兴奋性氨基酸受体激活有关。有研究表明即使细胞内ATP下降到很低水平甚至检测不出来,线粒体能量代谢功能也能部分恢复。线粒体在HI后3h~8h重新开始合成ATP,PCr,总腺苷酸池也能部分恢复或恢复到正常水平,但在HI后8h~12h线粒体功能又开始第二次下降^[3,4]。关于第二次能量代谢衰竭发生的时间各文献报导不一,可能与动物模型制作不同有关。Puka-Sundvall等^[11]研究HI后线粒体RCR的变化过程

与 Caspase-3 激活情况,发现 RCR 第二次下降出现在再灌注后 24 h,同时伴有神经细胞丢失和 Caspase 大量激活,表明线粒体参与 HI 后迟发性的神经细胞损伤,同时线粒体和神经细胞进入不可逆的损伤阶段。本实验结果为 HI 后出现 PCr、ATP 和 ATP + ADP + AMP 的下降,在 HI 后 8 h ~ 12 h 部分恢复,HI 后 24 h ~ 48 h 又开始第二次下降,比第一次下降更显著。表明 HIBD 新生大鼠 HI 后皮质神经细胞内这些高能磷酸物质存在两次下降。关于第二次能量代谢衰竭的发病机制目前仍不明确,有研究认为其与脑缺氧缺血后再灌注有关^[12]。

HIBD 后存在第二次能量代谢衰竭的观点具有重要的意义。Thoresen 等^[13]报导了新生猪在 HIBD 后采取中度低温治疗 12 h,能够阻止迟发性的 ATP 减少,而且明显减少神经元丢失的数量,日本 Shibasaki 等^[14]于 2001 年采用荧光检测法检测宫内缺氧缺血新生大鼠皮质神经细胞内 ATP、ADP 和 AMP 含量,并应用免疫抑制剂 FK506 阻止 ATP、ADP 和 AMP 的下降,证明了 FK506 具有脑保护作用,因此能量代谢变化可作为判断 HIBD 程度和 HIBD 干预手段是否有效的观察指标。根据本实验结果,新生大鼠 HIBD 干预手段实施的最佳时间窗是否为线粒体能量代谢功能部分恢复、第二次能量代谢衰竭之前,即 HI 后 8 h ~ 12 h 之内有待于进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, et al. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death [J]. *J Cell Biol*, 2002, 158(3): 507 - 517.
- [2] Hope PL, Costello AM, Cady EB, Delpy DT, Tofts PS, Chu A, et al. Cerebral energy metabolism studied with phosphorus NMR spectroscopy in normal and birth-asphyxiated infants [J]. *Lancet*, 1984, 2(8399): 366 - 370.
- [3] Martin E, Buchli R, Ritter S, Schmid R, Largo RH, Boltshauser E, et al. Diagnostic and prognostic value of cerebral 31P magnetic resonance spectroscopy in neonates with perinatal asphyxia [J]. *Pediatr Res*, 1996, 40(5): 749 - 758.
- [4] Hanrahan D, Sargentoni J, Azzopardi D, Manji K, Cowan F, Rutherford MA, et al. Cerebral metabolism within 18 hours of birth asphyxia: a proton magnetic resonance spectroscopy study [J]. *Pediatr Res*, 1996, 39(4): 584 - 590.
- [5] Hanrahan JD, Cox JJ, Edwards AD, Cowan FM, Sargentoni J, Bell JD, et al. Persistent increases in cerebral lactate concentration after birth asphyxia [J]. *Pediatric Res*, 1998, 44(3): 304 - 311.
- [6] Azzopardi D, Watt JS, Cady EB, Delpy DT, Baudin J, Stewart AL, et al. Prognosis of newborn infants with hypoxic-ischemic brain injury assessed by phosphorus magnetic resonance spectroscopy [J]. *Pediatr Res*, 1989, 25(5): 445 - 451.
- [7] Hope PL, Cady EB, Chu A, Delpy DT, Gardiner RM, Reynolds EOR. Brain metabolism and intracellular pH during ischaemia and hypoxia: an in vivo P and H nuclear magnetic resonance study in the lamb [J]. *J Neurochem*, 1987, 49: 75 - 82.
- [8] Roth SC, Edwards AD, Cady EB, Delpy DT, Wyatt JS, Azzopardi D, et al. Relation between cerebral oxidative metabolism following birth asphyxia and neurodevelopmental outcome and brain growth at one year [J]. *Dev Med Child Neurol*, 1992, 34(4): 285 - 295.
- [9] Roth SC, Baudin J, Cady EB, Johal K, Townsend JP, Wyatt JS, et al. Relation of deranged neonatal cerebral oxidative metabolism with neurodevelopmental outcome and head circumference at 4 years [J]. *Dev Med Child Neurol*, 1997, 39(11): 718 - 725.
- [10] Zhang HX, Du GH, Zhang JT. Ischemic pre-conditioning preserves brain mitochondrial functions during the middle cerebral artery occlusion in rat [J]. *Neurol Res*, 2003, 25(5): 471 - 476.
- [11] Puka-Sundvall M, Wallin C, Gilland E, Hallin U, Wang X, Sandberg M, et al. Impairment of mitochondrial respiration after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: relationship to activation of caspase-3 and neuronal injury [J]. *Dev Brain Res*, 2000, 125(1 - 2): 43 - 50.
- [12] Lust WD, Taylor C, Pundik S, Selman WR, Ratcheson RA. Ischemic cell death: dynamics of delayed secondary energy failure during reperfusion following focal ischemia [J]. *Metab Brain Dis*, 2002, 17(2): 113 - 121.
- [13] Thoresen M, Penrice J, Lorek A, Cady E, Wylezinska M, Kirkbride V, et al. Mild hypothermia following severe transient hypoxia-ischaemia ameliorates delayed cerebral energy failure in the newborn piglet [J]. *Pediatr Res*, 1995, 37(5): 667 - 670.
- [14] Shibasaki Y, Nakai A, Koshino T, Yokoyama K. Effect of the immunosuppressant drug FK506 on neonatal cerebral mitochondrial function and energy metabolism after transient intrauterine ischemia in rats [J]. *Brain Res*, 2001, 892(2): 351 - 358.

(本文编辑:谢岷)