

·论著·

不同复苏氧浓度对宫内窘迫胎鼠脑细胞
内外钙的影响

农绍汉¹, 谢衍铭¹, 黄小穗²

(广东省人民医院 1. 新生儿科; 2. 血液流变学室, 广东 * 广州 510080)

[摘要] 目的 探讨窒息时复苏氧浓度与复苏效果的关系, 找出较佳复苏氧浓度, 改善窒息新生儿预后。
方法 将56只胎龄为20 d的SD大鼠胎鼠随机分为5组, 即假手术组(对照组)11只, 空气复苏组(复苏组)10只, 给予不同浓度氧和在不同时间内复苏的O_{x1}组14只, O_{x2}组11只和O_{x3}组10只。监测各组胎鼠脑细胞内外钙、钠、钾含量的变化。
结果 复苏组与O_{x1}组(氧浓度92.8%)的脑细胞内游离钙离子浓度分别为(552.08 ± 93.50) nmol/L和(520.61 ± 79.08) nmol/L, 两者相近(P > 0.05), 但均明显高于对照组(315.27 ± 86.88) nmol/L (P < 0.01)。应用65%氧复苏时, 在窒息缺氧前(O_{x2}组)和在窒息缺氧的同时(O_{x3}组)复苏者, 其脑细胞内游离钙离子浓度分别为(441.46 ± 47.93) nmol/L和(452.93 ± 36.38) nmol/L, 虽仍高于对照组, 但明显低于空气复苏组(P < 0.01)和O_{x1}组(P < 0.05)。各组脑组织总钙、钠、钾含量基本上差异无显著性(P > 0.05)。
结论 不同氧浓度复苏, 其效果不一样; 应用92.8%氧或空气复苏, 其复苏效果相似, 提示临床上可考虑应用空气代替纯氧对窒息新生儿进行复苏; 采用65%氧复苏, 其复苏效果可能较纯氧或空气复苏更佳。

[关键词] 复苏氧浓度; 钙; 脑损害; 宫内窘迫; 胎鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)04-0363-04

Cerebral intra-and extra-cellular calcium concentrations in asphyxiated
rat fetuses resuscitated with oxygen of different concentrations

NONG Shao-Han, XIE Yan-Ming, HUANG Xiao-Sui

Department of Pediatrics, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of resuscitation using oxygen of three concentrations on changes of cerebral intra-and extra-cellular calcium, sodium and potassium in asphyxiated fetal rats. **Methods** Fifty-six fetal rats of twenty-day gestational age were randomly divided into five groups: sham operation (control, n = 11), room-air resuscitation (n = 10), and oxygen-resuscitated group I, (n = 14, 11, and 10 respectively) of different oxygen-inhaled concentrations and different oxygen timings. The fetal rats in the latter four groups suffered from ischemia and hypoxia in-uteri resulting from interruption of placental circulation. After recirculation, intra- and extra-cellular concentrations of calcium, sodium, and potassium in the brains were measured in each group. **Results** Intracellular free calcium concentrations of fetal rat brains in the room-air resuscitation group and the oxygen-resuscitated group I (oxygen-inhaled concentration was 92.8%) were (552.08 ± 93.50) nmol/L and (520.61 ± 79.08) nmol/L respectively. They were similar and both significantly higher than those in the control (315.27 ± 86.88) nmol/L (P < 0.01). After resuscitation with 65% oxygen, no matter whether it started before (group) or at the beginning of hypoxia (group), their intracellular free calcium concentrations [(441.46 ± 47.93) nmol/L and (452.93 ± 36.38) nmol/L respectively] were significantly lower than those in the room-air resuscitation group (P < 0.01) and group I (P < 0.05), though still higher than those in the control. There was generally no difference in the total concentrations of calcium, sodium, or potassium among all groups. **Conclusion** Resuscitation with oxygen of different concentrations produced different results: Resuscitation with 92.8% oxygen or room air had a similar effect on the parameters measured,

[收稿日期] 2001-04-02; [修回日期] 2001-07-08
[基金项目] 广东省重点科技项目(编号:2KM05604S)
[作者简介] 农绍汉(1966-),男,硕士,主治医师。

indicating that resuscitation of asphyxiated neonates using pure oxygen might not be superior to that using room air; With lower cerebral intracellular calcium concentrations, resuscitation with 65 % oxygen might produce a better outcome compared with that using pure oxygen or room air.

Key words: Oxygen supplementation; Calcium; Brain damage; Asphyxia in uterus; Rat fetus

全世界每年均有大量的窒息新生儿出生,而窒息复苏的关键是畅通气道,建立有效的呼吸。长期以来,窒息时均采用纯氧复苏,但近年来这种做法已受到越来越多的质疑:窒息时纯氧复苏的效果可能并不优于空气复苏^[1~3]。为此,本研究利用宫内窘迫胎鼠模型,应用3种不同氧浓度进行复苏,直接观察胎鼠脑细胞及脑组织钙、钠、钾含量的变化,探讨窒息时复苏氧浓度与复苏效果的关系,找出较佳复苏氧浓度,改善窒息新生儿的预后。

1 材料与方法

1.1 对象

选用20 d胎龄SD大鼠胎鼠56只,随机分为5组:即假手术组(对照组)11只;制成宫内窘迫模型而给予空气复苏者作为空气复苏组(复苏组)10只;给予不同浓度氧和在不同时间内复苏者分别为Ox₁组14只,Ox₂组11只和Ox₃组10只。

1.2 方法

1.2.1 宫内窘迫胎鼠模型的制作 用戊巴比妥钠腹腔麻醉母鼠后,正中切开其腹腔,暴露子宫角,分离出进入胎盘的每条分支血管,用无创性血管夹钳夹此分支血管15 min,然后松开血管夹,恢复血流,制成宫内窘迫胎鼠模型^[4]。

1.2.2 不同氧浓度复苏的影响 对照组在分离出进入胎盘的分支血管后不进行钳夹,直接对胎鼠断头处死;复苏组在制成宫内窘迫模型前后,母鼠均吸入空气,于再灌注30 min时对胎鼠断头处死;Ox₁组在制成宫内窘迫模型前30 min,开始对母鼠吸入浓度为92.8 %的O₂(流量4.5 L/min),然后制成宫内窘迫胎鼠模型,于再灌注30 min时对胎鼠断头处

死;Ox₂组处理方法同Ox₁组,唯母鼠吸入O₂浓度为65 %(流量1.5 L/min);对Ox₃组,在对进入每个胎盘的分支血管进行钳夹的同时,开始对母鼠给予65 %浓度氧吸入(流量1.5 L/min),余处理方法同Ox₁组。各组胎鼠断头处死后均取脑检测细胞内外钙、钠、钾含量。

1.2.3 实验方法 脑细胞胞浆游离钙离子浓度([Ca²⁺]_i)测定:用Ca²⁺荧光指示剂Fura-2AM法测定^[5];脑组织总钙(TCa²⁺),总钠(TNa⁺),总钾(TK⁺)测定:用原子吸收分光光谱法测定。

1.3 统计分析

数据取 $\bar{x} \pm s$,用美国SPSS统计包进行方差分析及相关分析。经F检验差异有显著意义者,做两两比较;差异不显著者,进行t检验。(方差不齐时用t'检验)。

2 结果

2.1 不同复苏氧浓度的影响

存在缺血缺氧的空气复苏组与两组氧疗组,其脑细胞内游离钙离子浓度均明显高于对照组($P < 0.01$)。在窒息缺氧前30 min给予92.8 %浓度O₂吸入,其脑细胞内游离钙离子浓度仍明显高于对照组($P > 0.01$),与空气复苏组相当;但在窒息缺氧前30 min给予65 %浓度O₂吸入后,其脑细胞内游离钙离子浓度虽仍高于对照组,但明显低于空气复苏组($P < 0.01$)和92.8 %浓度O₂复苏组($P < 0.05$),同时其脑组织总钠含量也低于空气复苏组,差异有显著性意义($P < 0.05$)。其余各组间脑组织钙、钠、钾含量差异均无显著性($P > 0.05$)。见表1。

表1 不同氧浓度复苏对胎鼠脑的影响

Table 1 Effects of resuscitation with different oxygen concentrations on fetal rat brains ($\bar{x} \pm s$)					
组别	n	[Ca ²⁺] _i (nmol/L)	TCa ²⁺ (mmol/kg)	TNa ⁺ (mmol/kg)	TK ⁺ (mmol/kg)
对照组	11	315.27 ±86.88	38.42 ±17.16	559.12 ±96.53	698.28 ±118.24
空气复苏组	10	552.08 ±93.50 ^a	30.62 ±13.75	640.66 ±155.02	742.92 ±197.16
Ox ₁	14	520.61 ±79.08 ^a	40.73 ±23.06	582.43 ±186.77	755.38 ±107.39
Ox ₂	11	441.46 ±47.93 ^{a,c,d}	29.41 ±14.11	483.33 ±150.23 ^b	629.94 ±202.42
F值		20.067 ^e	1.157	1.915	1.441

注: a * "与对照组比较 $P < 0.01$; b * "与空气复苏组比较 $P < 0.05$; c * "与空气复苏组比较 $P < 0.01$; d * "与Ox₁组比较 $P < 0.05$; e * "各组间比较 $P < 0.01$

2.2 不同时间给氧的影响

与空气复苏组比较,无论是在窒息缺氧前还是在窒息缺氧的同时,给予 65 %浓度氧吸入均可以明显

降低其脑细胞内游离钙离子浓度($P < 0.01$),但窒息缺氧前与窒息缺氧同时给氧复苏时,两组的脑组织钙、钠、钾含量差异均无显著性($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 不同时间给氧对胎鼠脑的影响

Table 2 Effects of resuscitation with oxygen of different administration timings on fetal rat brains ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	[Ca ²⁺] _i (nmol/L)	TCa ²⁺ (mmol/ kg 干脑)	TNa ⁺ (mmol/ kg 干脑)	TK ⁺ (mmol/ kg 干脑)
空气复苏组	10	552.08 ±93.50	30.62 ±13.75	640.66 ±155.02	742.92 ±197.16
Ox ₂	11	441.46 ±47.93 ^b	29.41 ±14.11	483.33 ±150.23 ^a	629.94 ±202.42
Ox ₃	10	452.93 ±36.38 ^b	31.01 ±10.95	579.19 ±155.50	744.05 ±170.49
F 值		9.32 ^c	0.043	2.815	1.255

注: a * "与空气复苏组比较 $P < 0.05$;b * "与空气复苏组比较 $P < 0.01$;c * "各组间比较 $P < 0.01$

2.3 各组胎鼠脑钙、钠、钾含量的相关关系

通过回归相关分析发现,对照组脑细胞[Ca²⁺]_i与脑组织总钠含量呈显著负相关($r = - 0.6178$, $P < 0.05$),除 Ox₁ 组外,各组脑组织总钠含量与总钾含量呈显著正相关($r = 0.6556 \sim 0.8493$, P 值均 < 0.05),在空气复苏组、Ox₃ 组脑组织总钙含量与总钾含量呈显著正相关($r = 0.8563$ 和 0.6686 , $P < 0.05$),Ox₁ 组与 Ox₃ 组脑组织总钙含量还与总钠含量呈显著正相关(前者 $r = 0.6438$,后者 $r = 0.6966$, P 值均 < 0.05)。

3 讨论

新生儿窒息是一个全球性的严重问题,其发生率很高,西方发达国家为 1 %,在我国更是高达 3.5 %~ 9.5 %,每年均有大量的窒息新生儿需要进行复苏,而复苏效果的好坏直接关系到新生儿的成活率和神经系统后遗症发生率。大量的研究已经证明^[5],缺血缺氧及外伤等病理因素可引起细胞内钙超载。本研究亦发现,缺血缺氧后,胎鼠脑细胞内游离钙离子浓度明显升高。细胞内发生钙超载后,通过一系列改变,可引起线粒体功能抑制,膜磷脂降解及蛋白质分解,导致细胞死亡。因此,脑细胞内钙超载可作为脑损害的主要指标之一。长期的临床实践已经证明,口对口人工呼吸是一种有效的窒息复苏方法,其吸入氧浓度约为 17 %。但在过去的半个多世纪中,人们想当然地认为病人在经过一段时间的窒息缺氧后,复苏时吸入 100 % 的氧气,进行额外的氧补充,可能对病人更为有利。故而窒息时纯氧复苏逐渐占了主导地位。

然而,在 60 年代末期,人们发现了氧自由基,开始逐渐认识到氧自由基的作用。在 80 年代初期,确

立了氧反常或再灌注损伤理论。窒息复苏需要氧的参与,但氧自由基的产生与组织氧浓度呈正相关关系,氧浓度越高,产生的氧自由基就越多。人们开始考虑窒息复苏时氧浓度的问题,反思在新生儿窒息复苏时,空气复苏是否与纯氧复苏一样有效。

1992 年 Rootwelt 等^[1]首次应用缺氧缺血性脑病新生猪(日龄 2 ~ 5 d)模型进行了这方面的研究,当循环血压低于 20 mmHg 或心率少于 80 次/ min 时,应用空气或 100 % 氧气复苏,结果表明,两组新生猪的平均动脉压、心率、剩余碱、pH 值及血浆次黄嘌呤恢复至正常的速度一样,4 d 后对猪脑进行形态学检查亦未发现任何差异;其后陆续的动物研究表明^[6,7],空气复苏组的心输出量,脑血流量,脑血管阻力,各脏器的局部血流,以及血压与血气情况恢复到正常水平的速度与纯氧复苏组并无明显差异。相反,有研究表明纯氧复苏组脑皮质次黄嘌呤恢复到正常的速度更慢^[2],Na⁺,K⁺-ATP 酶活性恢复更慢^[8],脑皮质氧自由基^[9]和一氧化氮^[10]产生更多,髓鞘损害更重^[11]。纯氧复苏虽可较快获得高血氧张力,但并未能更快降低窒息后的肺血管阻力,与空气复苏组比较,两者的降低速度和降低形式完全一样。

直接对窒息新生儿进行研究^[4],所得到的结果与动物实验相似。应用空气或纯氧进行窒息复苏,两者的复苏效果基本一样,但对于某些指标,如成活率、神经系统状况,纯氧复苏组却有可能差于空气复苏组。

本研究发现,92.8 % 浓度氧复苏组胎鼠脑细胞内游离钙离子浓度与空气复苏组相当,说明应用 92.8 % 浓度氧或空气进行窒息复苏,其复苏效果相似,与国外结果一致。提示临床上可应用空气代替纯氧对窒息新生儿进行复苏,尤其是在农村中没有

氧气供应时。

本研究还在国内外首次发现,当采用65%的氧气进行复苏时,无论是在窒息缺氧前还是在窒息缺氧的同时,均可以明显降低其脑细胞内游离钙离子浓度,提示复苏时吸入65%左右的氧气,其复苏效果可能较纯氧或空气复苏更佳,表明不同氧浓度复苏,其效果可能不一样。但何种复苏氧浓度最能改善窒息复苏效果,提高生存质量,尚有待对窒息时复苏氧浓度与复苏效果的关系进行进一步的研究。

本研究同时还发现,各组胎鼠脑细胞内外钙、钠、钾含量间存在一定的相关关系,提示脑细胞内外钙、钠、钾间可能存在某种联系,有待进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Rootwelt T, Loberg EM, Moen A, et al. Hypoxemia and reoxygenation with 21 % or 100 % oxygen in newborn pigs: Changes in blood pressure, base deficit, and hypoxanthine and brain morphology [J]. *Pediatr Res*, 1992, 32(1): 107 - 113.
- [2] Feet BA, Yu X, Rootwelt T, et al. Effects of hypoxemia and reoxygenation with 21 % or 100 % O₂ in newborn piglets. Extracellular hypoxanthine in cerebral cortex and femoral muscle [J]. *Crit Care Med*, 1997, 25(8): 1384 - 1391.
- [3] Saugstad OD, Rootwelt T, Aalen O. Resuscitation of asphyxiated newborn infants with room air or oxygen: An international controlled trial. The Resair 2 Study [J]. *Pediatrics*, 1998, 102(1): E1.

- [4] 农绍汉,谢衍铭,侯富林. 胎儿宫内窘迫动物模型的建立 [J]. *广东医学*, 1998, 19(6): 410 - 411.
- [5] 农绍汉,李着算,冯泽康,等. 缺氧缺血性脑病新生鼠补钙前后脑细胞、红细胞内外钙的变化 [J]. *中华儿科杂志*, 1995, 33(6): 342 - 343.
- [6] Rootwelt T, Odden JP, Hall C, et al. Regional blood flow during severe hypoxemia and resuscitation with 21 % or 100 % oxygen in newborn pigs [J]. *J Perinat Med*, 1996, 24(3): 227 - 236.
- [7] Poulsen JP, Oyasaeter S, Saugstad OD. Hypoxanthine, xanthine, and uric acid in newborn pigs during hypoxemia followed by resuscitation with room air or 100 % oxygen [J]. *Crit Care Med*, 1993, 21(7): 1058 - 1065.
- [8] Goplerud JM, Kim S, Delivoria-Papadopoulos M. The effect of post-asphyxial reoxygenation with 21 % VS 100 % oxygen on Na⁺, K⁺-ATPase activity in striatum of newborn piglets [J]. *Brain Res*, 1995, 696(1 - 2): 161 - 164.
- [9] Andersen CB, Hoffman DJ, Du C, et al. Effect of reoxygenation with 21 % or 100 % oxygen on free radical formation following hypoxia in the cerebral cortex of newborn piglets [J]. *Pediatr Res*, 1997, 41(4 part2): 30A.
- [10] Kutzsche S, Kirkeby OJ, Rise IR, et al. Effects of hypoxia and reoxygenation with 21 % and 100 % - oxygen on cerebral nitric oxide concentration and microcirculation in newborn piglets [J]. *Biol Neonate*, 1999, 76(3): 153 - 167.
- [11] Mickel HS, Kempfski O, Feuerstein G, et al. Prominent white matter lesions develop in Mongolian gerbils treated with 100 % normobaric oxygen after global brain ischemia [J]. *Acta Neuropathol*, 1990, 79(5): 465 - 472.

(本文编辑:曹励之)

(上接第351页)

4 HO 的非酶性作用

以前的研究认为 HO 只存在于滑面内质网附属的微粒体部分,但近来的研究证实在细胞核部分也有 HO 的存在,提示 HO 可能起着信号表达的作用。其实,我们最近的研究已发现 HO-2 转染到 NIH 3T3 细胞(这种细胞的 HO-1 启动子标记有虫荧光素酶报道基因)能增加 HO-1 的基因表达,显然,这种结果是由于 HO-2 蛋白本身的存在阻断了它对 HO-1 调节结果的改变所致。其他人在研究中也发现 HO-2 能通过蛋白激酶 C 途径发生磷酸化反应,提示 HO-2 起着信号表达作用^[27]。而且,HO-1 和

HO-2 蛋白在细胞内相互作用,在 HO-1 基因中有与 HO-1/ HO-2 蛋白复合物的结合位点。因此,HO-1 可能参与其自身的基因转录过程。HO-1 使血红素降解,但在没有血红素的情况下,组织内仍有相当数量的 HO-1 存在。在血红素不存在时,可能有一种能使 HO-1 上调的途径,这种途径在无应激状态下,容许组织表达 HO-1。另有研究表明 HO-1 可能参与其它基因的调节,如超氧化物歧化酶^[28],这也提示 HO-1 起着信号表达分子的作用。HO 最初只认为是一种代谢酶,目前已认识到 HO-1 在氧应激、炎症、免疫、细胞调节和信号转导方面是一种重要的分子。

(参考文献略)

(谢岷 译,杨于嘉 校 英文原文见本期 442 页)