

· 实验研究 ·

低温对小鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用

王小阳, 朱长连, 徐发林, 程秀永, 邱林, 胡生海

(郑州大学第三附属医院儿科, 河南 郑州 450052)

[摘要] 目的 低温对脑损伤的保护作用与抑制细胞凋亡有关并取决于低温开始的时间与脑的发育成熟程度, 该研究探讨不同年龄阶段的小鼠在缺氧缺血性脑损伤过程中温度的改变对脑损伤的影响。方法 结扎7日龄(P7)和21日龄(P21) C57/BL6小鼠左侧颈总动脉后分别在34℃和36℃恒温箱吸入10%氧气50 min制成脑缺氧缺血(HI)模型, 在HI后24 h及7 d取脑进行免疫组化染色和Western蛋白印迹测定。结果 常温组(36℃)在HI后7 d HI侧大脑多个部位可见明显损伤, 其中P7小鼠大脑皮层可见液化空洞, 而P21小鼠大脑皮层成层状梗塞。低温组(34℃)在HI后7 d, P7小鼠未见明显的皮层梗塞, 海马仍可见明显萎缩, 但神经病理学积分在低温组均明显低于常温组($P < 0.01$); P21小鼠除皮层损伤较常温组明显减轻外($P < 0.01$), 其他部位损伤如海马、纹状体和丘脑与常温组无明显差别。免疫组化染色显示P7小鼠HI后24 h大脑皮层活性半胱天冬酶-3, 凋亡诱导因子(AIF)的阳性细胞数每高倍视野在低温组分别是: 7.0 ± 5.6 和 3.7 ± 6.2 , 明显低于常温组的 51.5 ± 23.2 和 31.8 ± 22.4 ($P < 0.01$), 而在海马CA1区活性半胱天冬酶-3和AIF的阳性细胞数在低温组与常温组之间无明显差别。Western蛋白印迹显示HI后激活的Akt表达明显减少, 低温干预能减少激活的Akt下降($P < 0.05$)。结论 低温对缺氧缺血性脑损伤的保护作用与脑发育的成熟程度有关, 对未成熟脑损伤的保护作用优于对成熟脑损伤的脑保护作用。

[中国当代儿科杂志, 2006, 8(4): 315-318]

[关键词] 脑缺血; 脑缺氧; 低温; 细胞死亡; 小鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)04-0315-04

Neuroprotective effect of hypothermia on hypoxic-ischemic brain injury in mice

WANG Xiao-Yang, ZHU Chang-Lian, XU Fa-Lin, CHENG Xiu-Yong, QIU Lin, HU Sheng-Hai. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email: wxy3126@hotmail.com)

Abstract: Objective The study was to investigate the effect of different temperatures during hypoxia on brain injury in mice of different ages. **Methods** Newborn C57/BL6 mice at 7 days or 21 days of life were subjected to left carotid artery ligation followed by exposure with 10% oxygen. The mice were kept in a incubator with a predetermined, constant temperature, either 34℃ (Hypothermia group) or 36℃ (Normothermia group). Brain injury was evaluated 7 days after hypoxia-ischemia (HI). Active caspase-3 and apoptosis-inducing factor (AIF) expressions in the brain tissue were detected by immunohistochemistry and Western Blot was used to evaluate the phosphor-Akt (P-Akt) expression in the brain tissue at 24 hrs post-HI. **Results** Brain injuries, including the cortex, hippocampus, striatum and thalamus injuries, occurred in the Normothermia group at 7 days post-HI. The brain cortex showed cystic cavitation in the postnatal day (P) 7 pups mice and laminar infarct of the brain cortex was observed in P21 mice. In the Hypothermia group, the P7 mice did not present with laminar infarct of the cortex and had lower scores of neuropathological lesions in cortex, hippocampus, striatum and thalamus than P7 mice from the Normothermia group ($P < 0.01$); the cortex injuries were significantly relieved but the injuries of hippocampus, striatum and thalamus in P21 mice were similar to those from the Normothermia group. Active caspase-3 (7.0 ± 5.6) and AIF positive cells (3.7 ± 6.2) in the cortex of P7 mice from the Hypothermia group were significantly lower than those of the Normothermia group (51.5 ± 23.2 and 31.8 ± 22.4) at 24 hrs post-HI ($P < 0.01$). Western Blot showed the P-Akt expression was obviously decreased in the ipsilateral hemisphere to the occlusion compared with that of the contralateral hemisphere after HI in the Normothermia group ($P < 0.05$), while in the Hypothermia group the P-Akt expression was not significantly different between the two hemispheres. **Conclusions** Hypothermia has protective effects against HI insults. The protection was more pronounced for the immature brain than the mature brain.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(3): 315-318]

Key words: Cerebral ischemia; Cerebral hypoxia; Hypothermia; Cell death; Mice

[收稿日期] 2005-11-30; [修回日期] 2006-02-09

[基金项目] 国家自然科学基金(30470598)及河南省重大科技攻关项目(0122032100)资助。

[作者简介] 王小阳, 女, 博士, 教授。主攻方向: 新生儿脑损伤的基础与临床研究。

低温干预已被证明对多种脑损伤模型有神经保护作用,并且其疗效与低温开始的时间、低温深度及持续时间有关,临床已证明有确切疗效^[1-5]。低温对脑损伤的保护作用机制涉及多个方面,如能量代谢和细胞凋亡等^[3],但在不同的年龄发育阶段神经细胞死亡的机制不同^[6],因此,低温对不同年龄动物脑损伤后的保护作用可能不同。围产期窒息导致的缺氧缺血(HI)性脑损伤是新生儿死亡和儿童永久性神经功能障碍的主要原因之一,目前的新生儿窒息复苏方案仍强调保暖,这有可能加重窒息新生儿的脑损伤程度^[7,8]。本研究采用临床上常见的窒息脑损伤的动物模型,探讨缺氧时温度的变化对不同年龄脑损伤程度的影响,为临床进行窒息复苏及缺氧缺血性脑损伤的防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 缺氧缺血模型的制备及低温干预方案

7日龄(P7)C57/BL6小鼠共53只(分常温组、低温组和对照组)和21日龄(P21)的C57/BL6小鼠共14只(分常温组和低温组),氟烷吸入麻醉,分离并结扎左颈总动脉,局部切口进行浸润麻醉,缝合皮肤伤口后放回到母鼠笼恢复60 min,而后将新生小鼠放入充有湿化含氧气为10%的氮氧混合气的34℃或者36℃恒温箱50 min即制成脑缺氧缺血模型^[9]。根据研究目的不同,对照组及实验动物分别在缺氧缺血后的24 h或7 d处死取脑组织进行相关检查,详细分组见表1。

表1 实验动物分组情况 (只)

分组	脑损伤积分		免疫组化	蛋白印迹
	P7	P21	P7	P7
对照组	—	—	—	6
常温组	16	6	6	6
低温组	7	8	6	6

1.2 标本的制备

常温组和低温组动物分别于HI后24 h及7 d用鲁米那钠腹腔注射麻醉,经左心室灌注5%副醛-磷酸盐缓冲液,快速取脑并在灌注缓冲液中4℃浸润固定24 h,经过等级乙醇和二甲苯脱水后,进行石蜡包埋,冠状切片厚度为5 μm,缺氧缺血后7 d的脑组织用于微管相关蛋白2(MAP-2)免疫组化染色,进行脑损伤积分,缺氧缺血后24 h的脑组织进行活性半胱天冬酶-3(caspase 3)及凋亡诱导因子(AIF)免疫组化染色。

进行蛋白印迹检测的小鼠,断头取脑,快速分离左右大脑半球,按1:10加入匀浆缓冲液后(15 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM DTT, 320 mM 蔗糖, 1 mM MgCl₂, 3 mM EDTA-K, 2.5 μm 环孢菌素 A, 0.5% 蛋白酶抑制剂复合物)超声匀浆,经测定蛋白含量后用于Western蛋白印迹检测。

1.3 免疫组化染色

组织切片经过固定及脱石蜡处理,并经枸橼酸盐缓冲液煮沸进行抗原修复,以二抗的正常血清阻断非特异性反应,与抗MAP-2单克隆抗体(Sigma, 2 mg/mL)或AIF山羊多抗(Santa Cruz, 1.3 mg/mL)或兔活性caspase 3多抗(Santa Cruz, 10 mg/mL)室温孵育60 min, PBS洗涤后与生物素标记马抗鼠二抗(Vector, 2 mg/mL)或马抗山羊二抗(6 mg/mL)或山羊抗兔二抗(6 mg/mL)室温孵育60 min, 3% H₂O₂阻内源性过氧化物酶5 min,显色用ABC试剂盒(Vector)^[10]。

1.4 脑损伤积分

组织切片MAP-2染色后采用神经病理半定量积分法,将皮层损伤分为0~4级,0级没有可见的损伤,4级梗塞包括皮层的大部分。海马、纹状体和丘脑损伤分为萎缩(0~3级)和可见的细胞损伤/梗塞(0~3级)。以上4个区域总的积分是0~22分^[10]。

1.5 Akt蛋白印迹

脑组织匀浆样本用10%~20% Tris-Glycine 胶电泳分离蛋白后转移到硝基纤维膜上。用5%的脱脂牛奶室温作用1 h,以1×TBS-T洗涤后,与P-Akt及Akt(磷酸化的Akt,或者活化的Akt)兔多克隆抗体室温作用1 h, TBS-T洗涤后与过氧化物酶标记的羊抗兔二抗室温孵育30 min, TBS-T洗涤后在显色底物液中显色5 min,采用LAS1000 CCD曝光系统(Fujifilm)检测特异性条带并对条带进行半定量^[11]。

1.6 细胞计数

定量分析caspase 3、AIF阳性细胞,海马CA1区每高倍视野下阳性细胞数,大脑皮层计数3个高倍视野下(40×10)阳性细胞数计算平均值。

1.7 统计分析

数据采用均数±标准差表示,所有数据用Stat-View软件处理。阳性细胞计数在两组间比较采用Mann-Whitney检验;脑损伤各指标在两组间的比较及半定量分析P-Akt的变化采用t检验, P<0.05为差异有显著性。

2 结果

2.1 低温对不同年龄小鼠脑损伤的影响

常温组 P7 小鼠显示多部位的梗塞灶, 皮层出现液化空洞及萎缩, 低温组动物大脑皮层未见明显梗塞灶, 但海马可见明显萎缩。常温组 P21 小鼠在 HI 后大脑可见多部位梗塞灶, 皮层梗塞灶成层状分布, 未见空洞的形成, 与 P7 小鼠脑梗塞明显不同, 低温组皮层未见明显的梗塞, 但海马和纹状体损伤减轻不明显 (图 1)。低温对脑损伤的影响存在明显的部位差别, 其中对大脑皮层的保护作用最为明显, P7 小鼠大脑皮层未见明显脑损伤, 而对海马虽有保护作用, 但海马萎缩仍比较明显。低温对 P21 小鼠大脑的影响不如对 P7 小鼠大脑的影响, 仅对大脑皮层有明显的保护作用 (图 1, 表 2)。

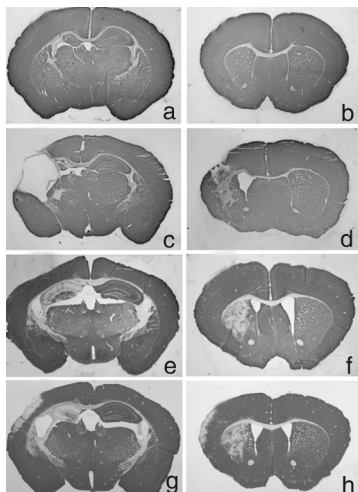


图 1 缺氧缺血后 7 天海马及纹状体层面 MAP-2 染色。7 日龄 (a~d) 及 21 日龄 (e~h) 小鼠在低温组 (a, b, e, f) 和常温组 (c, d, g, h) 的海马 (a, c, e, f) 及纹状体层面 (b, d, f, h) MAP 染色。7 日龄小鼠在低温组皮层未见明显损伤, 而 21 日龄小鼠在低温组除皮层损伤明显减轻外, 其他部位与常温组相比无明显差别。

表 2 低温对不同年龄小鼠脑损伤积分的影响

	P7		P21	
	34℃ (n=7)	36℃ (n=16)	34℃ (n=8)	36℃ (n=6)
皮层	0.00 ± 0.00 ^a	2.52 ± 1.29	0.14 ± 0.38 ^b	2.25 ± 1.12
纹状体	0.29 ± 0.76 ^a	4.20 ± 1.25	3.00 ± 0.60	3.43 ± 0.34
丘脑	0.14 ± 0.38 ^a	2.66 ± 0.73	0.43 ± 0.79	1.25 ± 1.50
海马	0.71 ± 1.25 ^a	4.61 ± 1.32	2.27 ± 0.35	3.18 ± 1.29
合计	1.14 ± 1.95 ^a	13.90 ± 4.01	5.84 ± 1.58 ^c	10.10 ± 3.97

a P7 低温组与常温组比较, 均 $P < 0.01$; b P21 低温组与常温组比较, $P < 0.01$; c $P < 0.05$

2.2 低温对 caspase 3 激活及 AIF 核转移的影响

AIF 存在于正常神经细胞的胞浆中, 在 HI 后即释放到胞浆并转移到核表现为 AIF 阳性。HI 后

24 h 大脑皮层 AIF 核阳性的细胞数低温组明显低于常温组 ($P < 0.01$), 而海马 CA1 区 AIF 阳性的细胞在低温与常温组之间未见明显差别。大脑皮层活性 caspase 3 阳性细胞数在低温组明显低于常温组 ($P < 0.01$), 在海马 CA1 区两组之间的阳性细胞数也无明显差别 (表 3)。

表 3 低温对细胞死亡信号传导的影响

	caspase 3		AIF	
	34℃ (n=6)	36℃ (n=6)	34℃ (n=6)	36℃ (n=6)
大脑皮层	7.0 ± 5.6 ^a	51.5 ± 23.2	3.7 ± 6.2 ^a	31.8 ± 22.4
海马 CA1	23.3 ± 12.3	23.7 ± 8.9	13.5 ± 4.1	15.5 ± 2.7

a 低温组与常温组比较, $P < 0.01$

2.3 低温对 Akt 激活的影响

正常脑组织中有 Akt 激活, 但在 HI 后激活明显减少, 对 P-Akt 进行半定量分析发现, 在常温组缺氧缺血侧与对侧相比 Akt 的激活存在明显差别 ($P < 0.05$), 而在低温组两侧相比减少不明显 (图 2)。

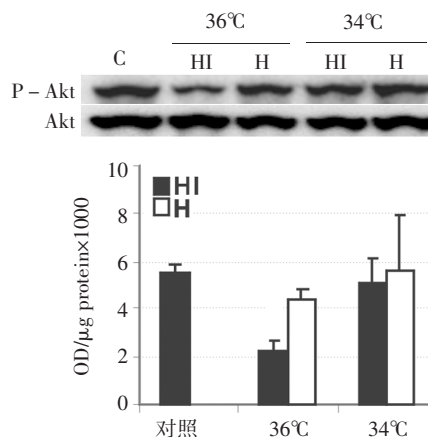


图 2 低温对 P-Akt 激活的影响。上图为 P-Akt 和 Akt 蛋白印迹 (C 为正常对照, HI 为缺氧缺血损伤侧, H 为对照侧)。下图为 P-Akt 蛋白印迹半定量的直方图, P-Akt 在 HI 后明显下降, 而总 Akt 水平无明显改变。

3 讨论

温度对缺氧缺血性脑损伤的影响已经被动物和临床研究证实^[1,2,8,12], 缺血后进行的低温干预能明显减轻缺氧缺血性脑损伤, 而温度升高却能增加脑损伤^[7]。有研究显示, 温度变化越早对脑损伤的影响就越大, 在缺血开始时进行低温甚至能够达到完全保护不发生脑损伤^[13]。7 日龄缺氧缺血脑损伤模型是被广泛采用研究新生儿窒息的动物模型, 也是一种缺血再灌注模型, 缺氧时的温度就是脑缺血的温度, 类似新生儿窒息时的环境温度。新生儿体

温调节中枢发育不完善,体温随环境温度而改变,因此,在新生儿窒息复苏时常采用红外线辐射保暖等措施以维持新生儿体温在 36.5℃ 左右,有关保暖对窒息新生儿的影响尚未见详细研究的报道。

我们先前的研究发现^[6]不同年龄的动物在缺氧缺血后神经细胞死亡的机制存在明显差别,P5 和 P9 未成熟脑在缺氧缺血后的细胞死亡以凋亡为主。为了探讨温度的变化对大脑不同发育阶段神经细胞死亡和脑损伤的影响,本研究采用出生后 7 日龄(相当于胎龄 34 周早产儿脑的成熟度)和 21 日龄(相当于学龄期儿童脑的成熟度)的小鼠为研究对象探讨脑损伤对温度的敏感性,为临床的低温治疗提供参考。本研究中将缺氧温度由常规的 36℃ 降低至 34℃,发现 34℃ 低温组的脑损伤程度明显减轻,其中以 P7 未成熟脑的损伤程度减轻最明显,提示低温对脑损伤的保护作用与脑的成熟程度有关,对新生儿脑损伤的保护作用优于儿童或者成人。在大脑各部位中,对皮层保护作用明显优于其他部位,对细胞死亡的相关指标进行免疫组化染色显示低温对海马 CA1 区的神经细胞死亡与常温组相比无明显差别,可能与大脑各部温度下降程度不同有关或者是低温对细胞死亡有延迟的效果^[14]。

对缺氧缺血后神经细胞死亡进行形态学研究发现,凋亡在缺氧缺血引起的神经细胞死亡中起重要作用^[10]。目前研究发现缺氧缺血后神经细胞凋亡包括半胱天冬酶依赖(caspase 途径)和半胱天冬酶非依赖(AIF 途径)的两条途径,在本研究中低温能明显抑制缺氧缺血后半胱天冬酶 3 的激活,并能稳定线粒体膜,抑制 AIF 的释放及跨膜核转移,降低 AIF 的阳性细胞数,对导致凋亡的两条途径均有明显的抑制作用。由于半胱天冬酶-3 在未成熟脑中的含量明显高于成熟脑^[6],提示抑制半胱天冬酶能够在未成熟脑损伤的保护作用中起重要作用,可能与本研究中低温对未成熟脑的保护作用优于成熟脑有关。

磷酸化的 Akt 通过灭活凋亡信号传导途径的细胞因子而抑制凋亡,促进细胞的存活^[15]。缺氧缺血后 Akt 的激活受到抑制,可能是导致细胞死亡的原因之一。低温干预组 Akt 的灭活受到明显抑制,并且对脑损伤有明显的保护作用,提示维持一定水平 Akt 的激活对未成熟脑缺氧缺血性脑损伤有保护作用。但其他研究报道缺血后进行低温干预能抑制 Akt 的激活,可能干扰低温的脑保护作用^[16]。但是,有关低温对 Akt 的激活的影响尚有待进一步探讨。

本研究发现缺氧温度对 HI 脑损伤有明显影响并

且与脑的发育程度有关,低温对未成熟脑损伤的保护作用最明显,本结果对指导新生儿窒息复苏及其合并缺氧缺血性脑病的防治有重要的临床指导价值。

[参 考 文 献]

- [1] Compagnoni G, Pogliani L, Lista G, Castoldi F, Fontana P, Mosca F. Hypothermia reduces neurological damage in asphyxiated newborn infants[J]. *Biol Neonate*, 2002, 82(4): 222-227.
- [2] Battin MR, Dezoete JA, Gunn TR, Gluckman PD, Gunn AJ. Neurodevelopmental outcome of infants treated with head cooling and mild hypothermia after perinatal asphyxia[J]. *Pediatrics*, 2001, 107(3): 480-484.
- [3] Krieger DW, Yenari MA. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke. What do laboratory studies teach us? [J]. *Stroke*, 2004, 35(6): 1482-1489.
- [4] Bernard SA, Buist M. Induced hypothermia in critical care medicine: a review[J]. *Crit Care Med*, 2003, 31(7): 2041-2051.
- [5] 于立君,王来栓,邵肖梅,杨毅. 亚低温对新生鼠缺氧缺血脑损伤能量代谢的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2003, 5(3): 192-196.
- [6] Zhu C, Wang X, Xu F, Bahr BA, Shibata M, Uchiyama Y, et al. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(2): 162-176.
- [7] Yager JY, Armstrong EA, Jaharus C, Saucier DM, Wirrell EC. Preventing hyperthermia decreases brain damage following neonatal hypoxic-ischemic seizures [J]. *Brain Res*, 2004, 1011(1): 48-57.
- [8] Zhu C, Wang X, Xu F, Qiu L, Cheng X, Simbruner G, et al. Intracerebral mild hypothermia prevents neuronal cell death and tissue loss after neonatal cerebral hypoxia-ischemia [J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 23(2): 387-393.
- [9] Zhu C, Wang X, Cheng X, Qiu L, Xu F, Simbruner G, et al. Post-ischemic hypothermia-induced tissue protection and diminished apoptosis after neonatal cerebral hypoxia-ischemia [J]. *Brain Res*, 2004, 996(1): 67-75.
- [10] Zhu C, Wang X, Hagberg H, Blomgren K. Correlation between caspase-3 activation and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral hypoxia-ischemia [J]. *J Neurochem*, 2000, 75(2): 819-829.
- [11] Wang X, Zhu C, Wang X, Hagberg H, Korhonen L, Sandberg M, et al. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) protein protects against pathological caspase activation and tissue loss after neonatal hypoxia-ischemia [J]. *Neurobiol Dis*, 2004, 16(1): 179-189.
- [12] Bona E, Hagberg H, Loberg EM, Bagenholm R, Thoresen M. Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia-ischemia: short-and long-term outcome [J]. *Pediatr Res*, 1998, 43(6): 738-745.
- [13] Pabellio NG, Tracy SJ, Keller RW Jr. Protective effect of brief intra- and delayed postischemic hypothermia in a transient focal ischemia model in the neonatal rat [J]. *Brain Res*, 2004, 995(1): 29-38.
- [14] Van Leeuwen GM, Hand JW, Lagendijk JJ, Azzopardi DV, Edwards AD. Numerical modeling of temperature distributions within the neonatal head [J]. *Pediatr Res*, 2000, 48(3): 351-356.
- [15] Dudek H, Datta SR, Franke TF, Brinbaum MJ, Yao R, Cooper GM, et al. Regulation of neuronal survival by serine-threonine protein kinase Akt [J]. *Science*, 1997, 275(5300): 661-665.
- [16] Tomimatsu T, Fukuda H, Endo M, Watanabe N, Mu J, Kohzaki M, et al. Effect of hypothermia on neonatal hypoxic-ischemic brain injury in the rat: phosphorylation of Akt, activation of caspase-3-like protease [J]. *Neurosci Lett*, 2001, 312(1): 21-24.

(本文编辑:吉耕中)