

## 头部贴敷式亚低温对 HIBD 新生大鼠脑组织 线粒体 ATP 酶活性的影响

姚笠,程琳,于立君

(哈尔滨医科大学附属第二医院儿内科,黑龙江 哈尔滨 150086)

**[摘要]** 目的 研究头部贴敷式亚低温治疗对缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)新生大鼠的脑组织线粒体 ATP 酶活性的影响,以进一步探讨亚低温对缺氧缺血性脑组织的保护机制。方法 将 84 只 Wistar 新生鼠随机分为 4 组:假手术常温对照组、假手术亚低温对照组、HIBD 模型常温恢复组、HIBD 模型亚低温治疗组。各组动物在 HI 后不同时间点(2, 6, 12 h)断头取脑,提取脑组织线粒体并测定其中  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶和  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性。结果 ①HIBD 常温恢复组及亚低温治疗组在 2, 6, 12 h 时  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性均呈下降趋势,分别为  $3.17 \pm 0.81$ ,  $2.26 \pm 0.53$ ,  $1.31 \pm 0.78$   $\mu\text{mol}/\text{mgPr. h}$  及  $5.25 \pm 0.61$ ,  $4.59 \pm 0.81$ ,  $4.61 \pm 0.62$   $\mu\text{mol}/\text{mgPr. h}$ , 但亚低温治疗各组该酶活性均明显高于相应的常温组( $P < 0.01$ )。②HIBD 常温及亚低温 2 h 组  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶活性较之假手术组无明显改变,6 h、12 h 组该酶活性明显低于假手术组,分别为  $3.76 \pm 0.78$ ,  $3.12 \pm 0.53$   $\mu\text{mol}/\text{mgPr. h}$  及  $5.25 \pm 0.66$ ,  $4.74 \pm 0.80$   $\mu\text{mol}/\text{mg Pr. h}$ , 但亚低温治疗组明显高于相应常温组( $P < 0.01$ )。结论 贴敷式局部亚低温可增加 HIBD 后脑组织线粒体 ATP 酶活性,保护脑组织。 [中国当代儿科杂志, 2007, 9(4):305-307]

**[关键词]** 亚低温; HIBD; 线粒体; ATP 酶; 新生大鼠

**[中图分类号]** R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)04-0305-03

### Effect of cerebral mild hypothermia on cerebral mitochondrial ATPase activity in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

YAO Li, CHENG Lin, YU Li-Jun. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China (Email: yaoli\_1946@163.com)

**Abstract: Objective** To study the effect of cerebral mild hypothermia on cerebral mitochondrial ATPase activities in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage(HIBD). **Methods** Eighty-four seven-day-old Wistar rats were randomly assigned into four groups: sham-operated normothermic, sham-operated mild hypothermic, HIBD normothermic and HIBD mild hypothermic. HIBD was induced by left common carotid artery ligation, followed by 8% hypoxia exposure. At each time interval of 2, 6, and 12 hrs post-hypoxia-ischemia (HI), 7 rats were sacrificed and the brain tissues were sampled for detecting the activities of mitochondrial  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. **Results** The activities of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase decreased significantly in the two HIBD groups compared with those of the two sham-operated groups at 2, 6, and 12 hrs post-HI. The HIBD mild hypothermic group had higher mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activities compared with the HIBD normothermic group at 2, 6, and 12 hrs post-HI ( $5.25 \pm 0.61$   $\mu\text{mol}/\text{mgPr. h}$  vs  $3.17 \pm 0.81$   $\mu\text{mol}/\text{mgPr. h}$ ,  $4.59 \pm 0.81$   $\mu\text{mol}/\text{mgPr. h}$  vs  $2.26 \pm 0.53$   $\mu\text{mol}/\text{mgPr. h}$ ,  $4.61 \pm 0.62$   $\mu\text{mol}/\text{mgPr. h}$  vs  $1.31 \pm 0.78$   $\mu\text{mol}/\text{mgPr. H}$ , respectively) ( $P < 0.01$ ). The activities of mitochondrial  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase decreased significantly in the two HIBD groups compared with those of the two sham-operated groups at 6 and 12 hrs post-HI. A significant difference was observed in the mitochondrial  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase activities between the HIBD mild hypothermic and HIBD normothermic groups at 6 and 12 hrs post-HI ( $5.25 \pm 0.66$   $\mu\text{mol}/\text{mg Pr. h}$  vs  $3.76 \pm 0.78$   $\mu\text{mol}/\text{mgPr. h}$ ,  $4.74 \pm 0.80$   $\mu\text{mol}/\text{mgPr. h}$  vs  $3.12 \pm 0.53$   $\mu\text{mol}/\text{mgPr. h}$ ;  $P < 0.01$ ). **Conclusions** Mild hypothermia following HIBD inhibits the decline in cerebral mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase activities in neonatal rats, thus providing protective effects against HIBD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(4):305-307]

**Key words:** Mild hypothermia; Hypoxic-ischemic brain damage; Mitochondria; ATPase; Neonatal rats

新生儿缺氧缺血性脑损伤(HIBD)是引起新生儿死亡和致残的主要原因之一,其发病机制复杂,目前

临床上尚缺乏有效的治疗方法<sup>[1]</sup>。亚低温治疗是采用人工诱导方法将体温下降 2~6℃,目前已成为

[收稿日期]2007-02-15; [修回日期]2007-03-21

[作者简介]姚笠,女,教授,博士生导师。主攻方向:新生儿缺氧缺血性脑病。

HIBD最有前途的治疗措施之一<sup>[2]</sup>。本实验采用贴敷式局部亚低温对HIBD新生大鼠进行实验性治疗,以观察对脑组织线粒体内 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性的变化,并探讨其机制,为临床治疗提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 7日龄Wistar清洁级大鼠88只,雌雄不限,体重12~18g(出生条件与饲养环境相同),由哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物中心提供。

1.1.2 试剂  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶试剂盒、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶试剂盒,由南京建成生物工程研究所提供。

1.1.3 仪器 HDB-01贴敷式局部亚低温脑保护仪(专利号ZL2004 2 0018692.4),由哈尔滨海德医疗设备开发有限公司研制;SL24型针形点温传感器( $\phi = 1.15 \text{ mm}$ )由上海同济大学研制;低温离心机;电热恒温水槽(DK28A型,上海医用恒温设备厂制造);UV-754型可见分光光度计。

### 1.2 方法

1.2.1 模型制作 参照新生大鼠缺氧缺血脑病模型制作的文献报道<sup>[3]</sup>,7日龄Wistar大鼠乙醚吸入麻醉后,切开颈部皮肤,分离左侧颈总动脉并结扎,缝合伤口,2h后将其放入37℃电热恒温水槽(DK28A型,上海医用恒温设备厂制造)中的缺氧瓶中,给予吸入体积分数为8%氧气和体积分数为92%的氮气2h即制成新生大鼠HIBD模型。对照组为假手术动物,仅分离颈总动脉,不结扎也不缺氧。

1.2.2 分组 分假手术组及HIBD组。各组内大鼠再随机分为3小组。假手术后常温恢复2,6,12h组;假手术后亚低温干预2,6,12h组;HIBD后常温观察2,6,12h组;HIBD后亚低温干预治疗2,6,12h组。分别给予常温或亚低温干预,每个时间点7只大鼠(假手术亚低温干预组和HIBD后亚低温干预组分别额外再各取2只动物做为探针动物,不予取脑,仅用以监测深部脑温,确保颅内温度达到目标温度),分别在相应时间点断头取脑。

1.2.3 亚低温实施及脑温测定 给予贴敷式头部亚低温治疗,设定温度为18℃,颅内缺血区温度为33℃左右。

探针动物用SL24型针形点温传感器在乙醚麻醉下颅左前矢状缝前3mm,人字缝前2mm交点处进针,监测脑温。

1.2.4 线粒体的提取方法 参照Clark等<sup>[4]</sup>的方法,稍加改动,差速离心法提取线粒体:新生大鼠断头取脑,在冰面上迅速分离左侧脑组织,置于0℃生理盐水中洗去血迹,立即放入预冷的分离介质(0.25 mol/L蔗糖,10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 mmol/L  $\text{K}^+ - \text{EDTA}$ )中,手动匀浆10次,制成10%的脑匀浆,800 r/min低温离心10 min(离心机需在使用前降置低温15 min),取上清液以8 200 r/min低温离心10 min,弃上清,沉淀再悬浮于分离介质中,重复离心1次(8 200 r/min,10 min),沉淀即为线粒体,线粒体以9:1(V/W)悬于分离介质中。全部过程在0℃进行,以防止氧化;所用分离介质现用现配,低温存放;线粒体悬液置于-20℃冰箱中,1周内测定指标。

1.2.5 线粒体酶活性的测定 线粒体蛋白定量按Lowry氏<sup>[5]</sup>法测定。分离的线粒体用冰冷的匀浆介质制成混悬液, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性的测定按照ATP酶分解ATP生成无机磷的原理,按照试剂盒说明书测定,ATP酶的活性以每小时每毫克蛋白分解ATP产生1  $\mu\text{mol}$ 无机磷的量为活力单位( $\mu\text{mol}/\text{mgPr} \cdot \text{h}$ )

### 1.3 统计学方法

采用SPSS10.0统计软件进行数据分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。并做单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

## 2 结果

缺氧缺血后2h缺氧缺血组线粒体 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性与假手术组相比无明显差别,而 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性显著减弱( $P < 0.01$ ),缺氧缺血6h,12h时, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性明显减弱, $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性继续减弱,与假手术组比较,差异有显著性(均 $P < 0.01$ )

亚低温治疗2h时,线粒体 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性即明显回升,与缺氧缺血组比较差异有显著性( $P < 0.01$ ), $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性与缺氧缺血时比较无明显变化,亚低温治疗6h,12h时, $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性继续回升,与缺氧缺血组比较均有明显变化( $P < 0.01$ ), $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性也回升,与缺氧缺血时比较有明显变化( $P < 0.01$ )。

假手术亚低温干预后线粒体内 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性与假手术常温组相比均无明显差别,均 $P > 0.05$ 。见表1。

表1 各组大鼠 ATP 酶活性测定结果

( $\mu\text{mol}/\text{mgPr. h}, \bar{x} \pm s$ )

| 组别        | 例数 | Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATP 酶 |                            |                            | Ca <sup>2+</sup> -ATP 酶  |                          |                          |
|-----------|----|--|----------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|           |    | 2 h                                    | 6 h                        | 12 h                       | 2 h                      | 6 h                      | 12 h                     |
| 假手术常温组    | 21 | 6.72 ± 0.53                            | 6.94 ± 0.66                | 6.82 ± 0.77                | 5.84 ± 0.65              | 5.79 ± 0.91              | 5.87 ± 0.79              |
| 假手术亚低温组   | 21 | 6.93 ± 0.51                            | 7.13 ± 0.61                | 6.91 ± 0.54                | 5.93 ± 0.72              | 5.85 ± 0.68              | 6.02 ± 0.69              |
| HIBD 常温组  | 21 | 7.04 ± 0.31                            | 3.76 ± 0.78 <sup>a</sup>   | 3.12 ± 0.53 <sup>a</sup>   | 3.17 ± 0.81 <sup>a</sup> | 2.26 ± 0.53 <sup>a</sup> | 1.31 ± 0.78 <sup>a</sup> |
| HIBD 亚低温组 | 21 | 7.11 ± 0.56                            | 5.25 ± 0.66 <sup>a,b</sup> | 4.74 ± 0.80 <sup>a,b</sup> | 5.25 ± 0.61 <sup>b</sup> | 4.59 ± 0.81 <sup>b</sup> | 4.61 ± 0.62 <sup>b</sup> |

a 与假手术组相比,  $P < 0.01$ ; b 与 HIBD 常温组相比,  $P < 0.01$

### 3 讨论

目前,新生儿缺氧缺血性脑损伤引起的能量代谢障碍的观点已经被广泛接受,Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶及Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶的活性与能量代谢密切相关。脑缺氧缺血后由于线粒体能量代谢障碍,引起ATP生成不足,水平下降,依赖ATP的Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶及Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性下降,一方面导致细胞内Na<sup>+</sup>增高,使线粒体发生肿胀,另一方面,线粒体胞浆内Ca<sup>2+</sup>的重摄取能力下降,导致线粒体内发生Ca<sup>2+</sup>超载,触发了一系列病理反应包括自由基反应,引起线粒体呼吸功能障碍,加重脑损伤,随着损伤时间延长,两种酶活性更趋下降,从而发生不可逆神经元损伤。本实验数据表明,Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶在缺氧缺血后2h即明显下降,并在12h内处于很低水平;而Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶在缺氧缺血后2h并无明显下降,可能与其早期应激反应有关,缺氧缺血后6h、12h该酶活性明显下降。

已有试验表明<sup>[7]</sup>,亚低温可以改善细胞能量代谢,保护缺血缺氧的脑神经组织。对于新生儿缺氧缺血脑病模型的亚低温治疗,临床已经进行了大量的研究,有研究表明<sup>[8,9]</sup>,亚低温可以减轻HIBD脑组织线粒体的损伤,保护脑组织。在本实验中,缺氧缺血后亚低温治疗组Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性在2,6,12h均明显高于缺氧缺血常温组,Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性在亚低温治疗6,12h也明显高于缺氧缺血常温组,说明亚低温对缺氧缺血脑损伤具有脑保护作用。同时,我们设置了假手术常温组和假手术亚低温组两个对照组,结果证实,这两个对照组在各个相应的时间点上,线粒体Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶及Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性差异均无显著性,说明亚低温对正常大鼠脑线粒体Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶及Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性无不利影响。

本实验采用头部贴敷式亚低温仪进行降温,根据传热学原理,传递热量的大小正比于导热系数、散热面积和温度梯度这三者之积。在常规亚低温治疗技术中,由于头皮与制冷部分不能有效接触,主要依赖空气进行传导,而空气的导热系数非常低,大约等

于0.026 w(m.K),而人脑组织一般为0.8 w(m.K)左右。本仪器采用具有高导热系数材料(大于200 w/m.K)作为头皮与制冷部分之间的传热介质,并以计算机控制温度,使脑内温度迅速达到亚低温水平,已有实验证实该方法可以在15~20 min内,使病灶的温度达到亚低温水平<sup>[10]</sup>,在本实验中对新生大鼠颅内温度进行监测,也证实脑温可以降至33℃左右。且采用头部贴敷式亚低温治疗与全身亚低温相比,可以避免后者在治疗过程中可能引起的心率减慢、血压下降、休克、肺部感染、血黏度增加、电解质紊乱等并发症,既保留了脑低温的要求,又同时避免了全身亚低温时的不利因素。本实验在亚低温治疗期间无1例动物出现硬肿、呼吸暂停等,动物吮吸能力及进奶量异常、体重降低亦不明显。

### [参 考 文 献]

- [1] 中华医学会儿科学分会新生儿学组. 新生儿缺氧缺血性脑病诊断标准[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(2): 97-98.
- [2] Shankaran S, Laptook A, Wright LL, Ehrenkranz RA, Donovan EF, Fanaroff AA, et al. Whole body hypothermia for neonatal encephalopathy animal observations as a basis of a randomized, controlled pilot study in term infants [J]. Pediatrics, 2002, 110 (2 Pt 1): 377-385.
- [3] 吴婉芳,徐放生,张莉莉. 建立新生儿缺氧缺血性脑病动物模型[J]. 新生儿科杂志, 1992, 7(6): 265-267.
- [4] Clark JB, Nicklas WJ. The metabolism of rat brain mitochondria [J]. J Biol Chem, 1970, 245(18): 4724-4731.
- [5] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265-275.
- [6] 张源鑫,符云峰,窦淑筠. 大鼠心肌线粒体Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶的制备及活性测定[J]. 生物化学与生物物理进展, 1989, 16(4): 317-319.
- [7] 胡耀辉,郑俩燕. 亚低温对缺血缺氧性脑损伤的保护作用[J]. 国外医学内科学分册, 2003, 30(6): 249-251.
- [8] 于立君,王来栓,邵肖梅,杨毅. 亚低温对急性缺氧缺血新生鼠脑线粒体能量代谢的作用[J]. 中国急救医学, 2003, 23(6): 368-370.
- [9] 王来栓,于立君,邵肖梅. 亚低温减轻新生大鼠缺血缺氧细胞凋亡的作用及机制研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2007, 9(1): 34-41.
- [10] 王德生,刘巍松,丰宏林,王雪峰,冯英俊. 局部亚低温对猪脑部温度梯度的影响[J]. 中华医学杂志, 2001, 81(14): 849-851.

(本文编辑:吉耕中)