

论著·临床研究

头部亚低温对新生儿缺氧缺血性脑病半胱氨酸蛋白酶-3 和白介素-18 的影响

刘翠青 夏耀方 袁玉肖 李莉 邱向利

(河北省儿童医院新生儿科,河北 石家庄 050031)

[摘要] 目的 探讨选择性头部亚低温治疗新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)和白介素-18(IL-18)的变化,以了解头部亚低温治疗HIE的神经保护机制。方法 33例中、重度HIE患儿随机分为亚低温治疗组($n=16$)和常规治疗组($n=17$)。应用ELISA法检测0 h、24 h、48 h、72 h和5 d的外周血清中caspase-3和IL-18的浓度。结果 亚低温组在治疗后24 h及48 h血浆caspase-3浓度分别为 3.8 ± 1.9 和 2.6 ± 1.2 ng/mL,明显低于常规组的 6.1 ± 2.3 和 7.2 ± 3.1 ng/mL, $P < 0.01$ 。亚低温组血浆IL-18浓度在治疗后24 h、48 h及72 h亦出现明显下降,分别为 119 ± 30 、 76 ± 33 和 71 ± 40 ng/mL,与常规组的 138 ± 28 、 156 ± 60 和 182 ± 54 ng/mL相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 应用头部亚低温治疗可抑制患儿血清中caspase-3和IL-18浓度的过度升高,揭示了头部亚低温治疗HIE的部分神经保护机制。 [中国当代儿科杂志,2010,12(9):690-692]

[关键词] 亚低温;缺氧缺血性脑病;半胱氨酸蛋白酶-3;白介素-18;新生儿

[中图分类号] R722.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)09-0690-03

Effects of selective head cooling with mild hypothermia on serum levels of caspase-3 and IL-18 in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy

LIU Cui-Qing, XIA Yao-Fang, YUAN Yu-Xiao, LI Li, QIU Xiang-Li. Department of Neonatology, Children's Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050031, China (Email: cuiqingliu@yahoo.com)

Abstract: Objective The study examined the changes of serum caspase-3 and IL-8 levels following selective head cooling with mild hypothermia (SHC) treatment in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) in order to explore the mechanism of neuroprotection of SHC against HIE. **Methods** Thirty-three neonates with moderate or severe HIE were randomly assigned to two groups; SHC treatment ($n=16$) and conventional treatment ($n=17$). Serum levels of caspase-3 and IL-18 were measured using ELISA before treatment and 24 hrs, 48 hrs, 72 hrs and 5 days after treatment. **Results** Serum caspase-3 levels in the SHC group decreased 24 and 48 hrs after treatment (3.8 ± 1.9 and 2.6 ± 1.2 ng/mL, respectively) compared with 6.1 ± 2.3 ng/mL at 24 hrs and 7.2 ± 3.1 ng/mL at 48 hrs in the conventional treatment group ($P < 0.05$). Serum IL-18 levels in the SHC group decreased 24 hrs, 48 hrs and 72 hrs after treatment (119 ± 30 , 76 ± 33 and 71 ± 40 ng/mL, respectively) compared with those in the conventional treatment group (138 ± 28 ng/mL at 24 hrs, 156 ± 60 ng/mL at 48 hrs and 182 ± 54 ng/mL at 72 hrs; $P < 0.01$). **Conclusions** SHC treatment can inhibit the release of caspase-3 and the expression of IL-18 in neonates with moderate or severe HIE. This may contribute to the neuroprotection of SHC against HIE. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(9):690-692]

Key words: Mild hypothermia; Hypoxic-ischemic encephalopathy; Caspase-3; IL-18; Neonate

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是造成新生儿期脑损伤的常见疾病,尤其是中重度HIE致残率很高,部分可发生永久性神经功能障碍。近年来,大量的动物实验表明亚低温(mild hypothermia)疗法是围产期缺氧缺血性脑损伤最有前途的治疗方法之一^[1]。亚低温疗法已应用于成人临床,对脑外伤和脑梗塞治疗具有

较好的应用前景。目前新生儿仅有少量小规模的临床研究报道。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)和白介素-18(IL-18)分别在缺氧缺血性脑损伤细胞凋亡和过激的炎症反应的发病机制有着重要的意义,因此本研究选择了这两项指标,观察其在头部亚低温治疗HIE中的浓度变化,已进一步了解亚低温治疗HIE的神经保护机制。

[收稿日期]2010-01-15;[修回日期]2010-02-25

[基金项目]河北省科学技术研究与发展计划项目(07276101D-146)。

[作者简介]刘翠青,女,硕士,主任医师,教授。

1 对象与方法

1.1 病例选择

2007年9月至2008年12月入住河北省儿童医院新生儿科重症监护病房,诊断为中、重度HIE患儿33例,将患儿随机分为亚低温治疗组(亚低温组)和常规治疗组(常规组)。亚低温组16例,其中男12例,女4例,胎龄平均(39.9±0.7)周,体重(3.3±0.6)kg;常规组17例,其中男11例,女6例,胎龄平均(39.1±2.9)周,体重(3.4±0.7)kg。两组患儿在性别、胎龄和出生体重上差异无统计学意义。所有入选患儿家长均知情同意并填写知情同意书,治疗方案经河北省儿童医院医学伦理委员会批准。

1.2 纳入及排除标准

(1)符合2004年11月中华医学会儿科学分会新生儿学组于长沙修订的新儿缺氧缺血性脑病诊断标准^[2]。(2)排除标准:严重先天性疾病(先天畸形、先天性代谢异常);其他颅内损伤(严重颅内出血、颅骨骨折);肺出血及出血倾向;严重贫血(Hb<120 g/L)。

存在以下任何一种情况,立即终止亚低温治疗:(1)低血压(收缩压<50 mmHg,或平均压<40 mmHg)经扩容、多巴胺等治疗无效者;(2)严重心律失常;(3)存在出血倾向;(4)出现硬肿;(5)家属自动放弃治疗。

1.3 方法

1.3.1 治疗方法 亚低温组除给予常规治疗(同常规组)外,于生后6 h内进行选择性头部亚低温,亚低温治疗仪为太原市解放军7604工厂提供(型号为YYT-1B型)。将降温帽包裹患儿头部,松紧适宜,将降温仪中皮肤温度探头固定在前额正中,开启降温仪,水温控制在6~13℃,体表皮肤温度为(33.5±0.5)℃,肛温(34.0±0.5)℃,持续72 h。应用多功能床旁监护仪检测皮肤和直肠温度。低温治疗结束后,采用远红外辐射复温,复温速度0.5℃/h,在6 h内使皮温、肛温恢复至≥36℃。常

规组给予常规治疗(如维持正常的血压和动脉血气,维持酸碱平衡以及限制入液量,控制惊厥及降颅压及营养支持,必要时给予呼吸支持治疗)。

1.3.2 标本采集和保存 亚低温组以亚低温治疗开始为起点,常规组以入院时间为起点开始计时,分别在0 h、24 h、48 h、72 h、5 d采外周静脉血2 mL,3 500 r/min离心5 min。收集血清置-70℃保存。

1.3.3 Caspase-3和IL-18浓度的测定 用酶联免疫吸附法(ELISA法)测定,试剂盒由美国Adlitteram Diagnostic Laboratories Inc提供。

1.4 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行数据处理。对计量数据进行正态性检验和方差齐性检验,服从正态分布和方差齐性的数据,采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;计数数据组间比较采用卡方检验。两组患儿各时间点caspase-3和IL-18的变化采用方差分析,对数据进行正态性及球对称性检验,不满足球对称性条件时,使用Greenhouse-Geisser(G-G)法的球对称系数进行校正。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组间各时间点的caspase-3变化

常规组caspase-3浓度在治疗24 h升高,并在48 h达高峰,72 h下降,5 d趋于稳定,各时间点之间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。亚低温组caspase-3浓度在治疗24 h即下降,48 h明显下降,24 h和48 h亚低温组明显低于常规组,差异有统计学意义。72 h及5 d时两组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

2.2 两组间各时间点的IL-18浓度变化

常规组IL-18浓度在治疗24 h、48 h、72 h逐渐升高,并在72 h达高峰,5 d下降并趋于稳定,各时间点之间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。亚低温组IL-18浓度在治疗24 h后开始下降,48 h明显下降并趋于稳定($P<0.05$)。24 h、48 h及72 h亚低温组IL-18浓度明显低于常规组($P<0.01$)。治疗后5 d时两组相比差异无统计学意义。见表1。

表1 两组间及各时间点caspase-3及IL-18浓度值比较 [$(\bar{x} \pm s)$, ng/mL]

组别	例数	caspase-3					IL-18				
		0 h	24 h	48 h	72 h	5 d	0 h	24 h	48 h	72 h	5 d
常规组	17	5.6±1.6	6.1±2.3 ^a	7.2±3. ^a	4.4±1.2 ^a	2.4±1.3 ^a	118±33	138±28 ^a	156±60 ^a	182±54 ^a	73±22 ^a
亚低温组	16	5.9±1.2	3.8±1.9 ^a	2.6±1.2 ^a	2.6±1.4 ^a	2.9±1.3 ^a	113±22	119±30 ^a	76±33 ^a	71±40 ^a	64±19 ^a
t值		1.81	8.95	15.11	1.68	1.47	0.15	8.56	13.22	10.30	1.02
P值		>0.05	<0.01	<0.01	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05

a:与组内0 h比较, $P<0.05$

3 讨论

在缺氧缺血性脑损伤中,迟发性神经细胞的死亡形式是凋亡。在凋亡的过程中,caspase-3 处于核心位置,是 caspase 级联反应中最关键的效应蛋白酶,被称为凋亡步兵^[3]。Rami 等^[4]报道,启动的 caspase-3 从细胞质转运到细胞核,在细胞核 caspase-3 分解它的作用底物如 DNA 修复蛋白及降解酶类。Zhu 等^[5]在缺氧缺血动物模型中,用免疫组化法检测 caspase-3 的活性亚单位 p17,发现在缺氧缺血后 3 h 就可检测到 p17,其高峰在 24 ~ 72 h,后逐渐下降。脑缺血再灌注损伤后引起 caspase-3 mRNA 表达水平明显升高,亚低温可能对凋亡通路上的线粒体功能具有保护作用,下调 caspase-3 mRNA 表达,从而减少脑缺血再灌注损伤后神经细胞的凋亡。Xu 等^[6]在成年鼠的大脑缺血模型所作的实验表明,亚低温治疗可对线粒体膜起到保护作用,从而减少线粒体释放凋亡促进因子如细胞色素 C 等。亚低温治疗后细胞色素 C 释放减少,caspase-3 活性降低,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达增多等许多效应有助于减少缺氧缺血后细胞凋亡。

本研究应用 ELISA 方法检测中、重度 HIE 后患儿血中 caspase-3 浓度,结果显示,接受常规治疗的患儿 caspase-3 浓度在 48 h 达到高峰,72 h 下降。接受亚低温治疗的患儿的 caspase-3 浓度在 24 h 即开始下降,48 h 下降明显并趋于稳定,未出现明显高峰,与国外文献实验结果基本符合^[5]。这说明经过常规治疗及亚低温治疗后中、重度 HIE 患儿随着病程的延长,均有所恢复,相比较来说,亚低温治疗对于抑制缺氧缺血后脑细胞凋亡,缩短病程更加有效。

缺氧缺血性脑损伤均伴有过激炎症反应。IL-18 可诱导某些细胞产生 IL-1 β 、TNF- α 、IL-2、TNF- γ 等炎症细胞因子。此外,还可通过刺激 Th1 细胞、NK 细胞表达较高水平 Fas 受体而加强细胞毒作用,启动小胶质细胞,引起脑细胞炎症反应而间接导致脑损伤^[7]。Hedtj rn 等^[8]学者报道在新生小鼠脑缺氧缺血再灌注损伤后 12 h 时 IL-18 开始升高,并持续升高 24 ~ 72 h。IL-18 在缺氧缺血后分泌增加,是机体对缺氧缺血损伤免疫反应的结果。体外实验中,亚低温能抑制培养的小胶质细胞的增殖、过氧化物及 NO 的产生^[9]。在成年小鼠实验中,亚低温能抑制创伤后 IL-1 β 的释放和多形核白细胞的聚集作用,延迟暂时缺血后的中性粒细胞聚集和小胶质细胞的启动^[10],稳定免疫系统、减轻脑水肿、抑制神

经元的凋亡和胶质细胞损伤、明显抑制炎症细胞因子表达级联反应的形成。

本研究发现,亚低温治疗组在 24 h IL-18 浓度即开始下降,48 h 趋于正常,无明显高峰;而常规治疗组在 24 h、48 h、72 h 各时间点 IL-18 浓度呈升高趋势,并在 72 h 达高峰,说明亚低温治疗能抑制缺氧缺血后炎症反应的过度启动。这和以上 Hedtj rn 等^[8]的动物实验结果相符合。

本研究表明亚低温可能通过抑制缺氧后细胞凋亡途径的启动,抑制 caspase-3 的释放,减轻细胞 DNA 的断裂,最终减轻迟发性神经元凋亡。同时,对炎症因子 IL-18 的表达有下调作用,抑制创伤后 IL-18 的释放,抑制缺氧后炎症反应的过度启动,发挥其对机体炎症反应的调节功能,从而起到神经保护作用,避免脑损伤的进一步加重。这证明了亚低温治疗具有神经保护作用,为其治疗 HIE 的临床推广提供了理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] Gluckman P, Wyatt J, Azzopardi D, Ballard R, Edwards A, Ferrieroet D, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial[J]. *Lancet*, 2005, 365(9460):663-670.
- [2] 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(1):97-98.
- [3] Northington FJ, Graham EM, Martin LJ. Apoptosis in perinatal hypoxic-ischemic brain injury: how important is it and should it be inhibited?[J]. *Brain Res Rev*, 2005, 50(2):244-257.
- [4] Rami A, Jansen S, Giesser I, Winckler J. Post-ischemic activation of caspase-3 in the rat hippocampus: evidence of an axonal and dendritic localisation[J]. *J Neurochem Int*, 2003, 43(3):211-223.
- [5] 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.
- [6] Xu L, Yenari A, Steinberg K, Giffa G. Mild hypothermia reduces apoptosis of mouse neurons in vitro early in the cascade[J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(1):21-28.
- [7] Galasso JM, Liu Y, Szaflarski J, Warren S, Silverstein S. Monocyte chemoattractant protein-1 is a mediator of acute excitotoxic injury in neonatal rat brain[J]. *Neuroscience*, 2000, 101(3):737-744.
- [8] Hedtj rn M, Leverin AL, Eriksson K, Blomgren K, Mallard C, Hagberg H. Interleukin-18 involvement in hypoxic-ischemic brain injury[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(14):5910-5919.
- [9] Si QS, Nakamura Y, Kataoka K. Hypothermic suppression of microglial activation in culture: inhibition of cell proliferation and production of nitric oxide and superoxide[J]. *Neuroscience*, 1997, 81(1):223-229.
- [10] Gunn AJ, Thoresen M. Hypothermic neuroprotection[J]. *NeuroRx*, 2006, 3(2):154-169.

(本文编辑:黄 榕)