

· 基础研究 ·

不同时间开始亚低温对脑缺血损伤保护作用的影响

方瑗 张洪 梅元武 孙圣刚 童萋塘

【摘要】目的 研究脑缺血后不同时间开始亚低温对脑缺血损伤的影响。**方法** 脑缺血动物模型采用改良的 Pulsinelli 四动脉阻断法,48 只大鼠随机分为假手术组(8 只)、常温脑缺血组(8 只)和脑缺血亚低温组(32 只),后者再分为脑缺血后即时、30、60 和 90 min 开始亚低温组,每组均为 8 只。观察不同时间开始亚低温对脑缺血组织抗氧化酶、MDA、ATP、乳酸和脑含水量的影响。**结果** 常温脑缺血组组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、还原型谷胱甘肽(GSH)及三磷酸腺苷(ATP)的含量明显低于假手术组($P < 0.01$),丙二醛(MDA)、乳酸、含水量以及 Ca^{2+} 的含量明显高于假手术组($P < 0.01$)。脑缺血后 60 min 内开始亚低温,可明显减少脑缺血组织中 SOD、GSH-Px、GSH 及 ATP 含量,而 MDA、乳酸、含水量增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);脑缺血后 90 min 开始亚低温,组织中上述指标和常温脑缺血组差异无显著性意义($P > 0.05$)。**结论** 脑缺血后即时亚低温可明显延缓常温脑缺血组织中抗氧化酶及 ATP 的消耗,减少脂质过氧化产物和乳酸的堆积并减轻脑水肿。亚低温这种作用在脑缺血后 30 min 内实施效果好。

【关键词】 亚低温; 脑缺血; 抗氧化酶; 能量代谢

Effects of mild brain hypothermia beginning at different time after cerebral ischemia on cerebral ischemia/reperfusion injury FANG Yuan, ZHANG Hong, MEI Yuan-wu, SUN Sheng-gang, TONG E-tang. Department of Neurology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

【Abstract】Objective To study the effect of mild brain hypothermia beginning at different time after cerebral ischemia on cerebral ischemia injury. **Methods** Sprague-Dawley (SD) rats were treated with modified Pulsinelli 4-artery occlusion model, and randomized into a sham operation group, a normal temperature group and a mild hypothermia group. The later group were observed at 4 time points (mild hypothermia started at 0min, 30min, 60min and 90min after cerebral ischemia) with regard to the effects of mild hypothermia on SOD, MDA, ATP, lactate and water content. **Results** In normothermia group, the amount of SOD, GSH-Px, GSH and ATP were lower and MDA, lactate, water content and Ca^{2+} was higher than those in the sham-operated group ($P < 0.05$). Mild hypothermia beginning within 60min delayed the consumption of SOD, GSH-Px, GSH, ATP and decreased the accumulation of MDA, lactate, water content as compared with the normothermia group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Mild hypothermia beginning at 90min resulted in no significant difference as compared with the normothermia group. **Conclusion** The results showed that mild hypothermia alleviated ischemia injury when applied within 60min after cerebral ischemia.

【Key words】 Mild hypothermia; Cerebral ischemia; Antioxidant enzyme; Energy metabolism

现有研究表明,无论是全脑缺血还是局灶性脑缺血,缺血后即时亚低温作用均可明显减轻脑损伤,但脑缺血后多长时间开始低温才有保护作用,是倍受关注的问题。本实验通过建立大鼠四动脉阻断的全脑缺血模型,观察脑缺血后即时和 30、60、90 min 开始实施亚低温对脑缺血再灌注后脑组织中抗氧化酶、丙二醛(MDA)、三磷酸腺苷(ATP)、乳酸和脑水肿的影响,以探讨不同时间开始亚低温对脑缺血损伤的影响。

材料与方法

一、实验动物与分组

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科

健康、雄性 Sprague-Dawley 大鼠 48 只,体重(250 ± 15)g,由同济医学院实验动物中心提供。随机分为假手术组(8 只)、常温脑缺血组(8 只)和脑缺血亚低温组(32 只),后者再分为脑缺血后即时和 30、60、90 min 开始亚低温组,每组均为 8 只。

二、脑缺血动物模型的制备

采用改良的 Pulsinelli 四动脉阻断法^[1]。用 20% 乌拉坦溶液(1 g/kg 体重)腹腔麻醉大鼠。脑缺血 20 min 后松开双侧 CCA 的止血镊,开始再灌注达 240 min。

三、脑温的测量和维持

根据包新民主编《大鼠脑立体定位图谱》,将大鼠固定于立体定位仪上,通过颅骨钻孔,用点式测温仪直

接测量海马的温度。脑温的降低采用冰袋或冰帽局部降温,脑温过低则采用 60 W 白炽灯距大鼠头顶照射来完成。常温组脑温维持 37 ~ 38℃,亚低温(31 ~ 32℃)持续时间为 60 min,亚低温前或后维持脑温在 37 ~ 38℃。

四、标本的收集

脑缺血再灌注 240 min 后,将大鼠断头处死,在 0℃ 下取出全脑,分离大脑皮质用于测量超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、还原型谷胱甘肽(GSH)、MDA、ATP 和乳酸的含量。余下组织用于测量脑组织的含水量和 Na⁺、K⁺、Ca²⁺ 的含量。分离的大脑组织置 -80℃ 深低温冰箱保存待测。

五、脑组织中 SOD、GSH-Px、GSH、MDA、ATP 和含水量以及 Na⁺、K⁺、Ca²⁺ 的测定

(1)SOD 的测定:采用黄嘌呤氧化酶法。所用试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,具体方法严格按说明书操作。(2)GSH-Px 的测定:采用 5,5-二硫对硝基苯(DTNB)直接显色法。用 722 型光栅分光光度计在波长 420 nm 处测得样品的 OD 值,用谷胱甘肽(GSH)作标准曲线,计算脑组织中 GSH-Px 的含量。(3)GSH 的测定:采用分光光度法。用 722 型光栅分光光度计在波长 412 nm 处测得样品的 OD 值,结合 GSH 标准曲线求得组织中 GSH 的含量。(4)MDA 的测定:采用硫代巴比妥酸(TBA)法。用 722 型光栅分光光度计在波长 532 nm 处测得样品的 OD 值,计算脑组织中 MDA 的含量。(5)ATP 的测定:采用 ATP 生物发光法,用 LKB-1251 发光仪(瑞士 Pharmacia 公司产)测定样品的发光值,结合标准曲线计算脑组织 ATP 的含量。(6)水含量和 Na⁺、K⁺、Ca²⁺ 的测定:采用干湿质量法测定脑组织水含量,并按 Ellis 公式计算。脑含水量 = [(湿质量 - 干质量) ÷ 湿质量] × 100%。称取 60 ~ 80 mg 干组织,加入混合酸(硝酸和高氯酸,3:1)

1 ml,160℃ 消化至清亮无色,冷却后用 AA-680 型原子吸收分光光度计(日本岛津公司 Shimadzu 生产)测定组织中 Na⁺、K⁺ 和 Ca²⁺ 的含量。

六、统计学分析

实验结果以($\bar{x} \pm s$)表示,各组间差别的显著性检验采用方差分析,两组间的比较采用 *t* 检验。

结 果

从表 1 可见,常温脑缺血脑组织中 SOD、GSH-Px、GSH、ATP 和 K⁺ 的含量均明显低于假手术组($P < 0.01$),MDA 及脑组织中乳酸、含水量、Na⁺ 和 Ca²⁺ 的含量高于假手术组($P < 0.01$)。脑缺血后 30 min 内开始亚低温延缓了常温脑缺血时组织中 ATP、K⁺ 含量的下降和乳酸、含水量、Na⁺、Ca²⁺ 的增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。脑缺血后 60 min 内开始亚低温延缓了组织中 SOD、GSH-Px、GSH、ATP 和 K⁺ 含量的下降,MDA 的升高以及乳酸、含水量的增加,与常温脑缺血组相比,差异有显著性意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);脑缺血后 90 min 开始亚低温组与常温脑缺血组中上述指标比较,差异无显著性意义($P > 0.05$)。

讨 论

一、不同时间开始亚低温对脑缺血时组织抗氧化酶和 MDA 生成的影响

自由基在缺血性脑损伤中的作用已引起人们广泛的重视,而生物体内自由基的生成与清除只有处于一种动态平衡状态,才能维持机体正常的生理机能。生物体内抗氧化酶 SOD、GSH-Px 的作用,相互补充、相互制约,协同清除各类自由基,它们在协调生物体内自由基的动态平衡中起关键性作用。因此,组织中 SOD、GSH-Px、GSH、MDA 的含量可反映组织清除自由基的能力。

表 1 不同时间开始亚低温对脑缺血组织抗氧化酶、MDA、ATP、乳酸和脑含水量等指标的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	SOD(U/gw)	GSH-Px(U/gw)	GSH(mg/gw)	MDA(nmol/gw)
假手术组	286.32 ± 55.44	143.67 ± 20.42	628.89 ± 78.23	122.96 ± 18.44
即时低温组	261.74 ± 52.39 ^{▲▲}	120.81 ± 21.88 ^{*▲▲}	566.25 ± 63.22 ^{▲▲}	168.94 ± 20.39 ^{* *▲▲}
30 min 低温组	206.92 ± 35.66 ^{* *▲}	103.09 ± 17.26 ^{*▲}	508.94 ± 68.34 ^{*▲▲}	186.94 ± 23.92 ^{* *▲▲}
60 min 低温组	173.66 ± 30.28 ^{* *▲}	80.87 ± 17.47 ^{* *▲}	442.67 ± 54.33 ^{* *▲▲}	284.54 ± 28.32 ^{* *▲}
90 min 低温组	150.73 ± 32.82 ^{* *}	71.43 ± 12.25 ^{* *}	356.25 ± 60.27 ^{* *}	334.67 ± 30.14 ^{* *}
常温脑缺血组	141.20 ± 27.15 ^{* *}	59.85 ± 10.23 ^{* *}	374.63 ± 57.84 ^{* *}	317.35 ± 29.88 ^{* *}

组 别	ATP(mmol/gw)	乳酸(mmol/gw)	含水量(%)	Na ⁺ (mmol/gD)	K ⁺ (mmol/gD)	Ca ²⁺ (mmol/gD)
假手术组	3.54 ± 0.58	8.53 ± 1.06	78.68 ± 0.34	336.27 ± 54.32	558.42 ± 34.67	2.44 ± 0.52
即时低温组	3.02 ± 0.54 ^{▲▲}	12.39 ± 1.92 ^{* *▲▲}	79.36 ± 0.47 ^{* *▲▲}	379.64 ± 63.28 ^{▲▲}	576.34 ± 39.61 ^{▲▲}	3.21 ± 0.64 ^{* *▲▲}
30 min 低温组	2.96 ± 0.43 ^{* *▲}	19.38 ± 3.55 ^{*▲▲}	80.52 ± 0.54 ^{* *▲▲}	429.87 ± 72.66 ^{*▲}	558.11 ± 52.23 [▲]	3.95 ± 0.58 ^{* *▲}
60 min 低温组	1.78 ± 0.37 ^{* *▲}	24.95 ± 4.87 ^{* *▲▲}	81.33 ± 0.62 ^{* *▲}	502.15 ± 79.74 [*]	530.87 ± 58.32 [*]	4.49 ± 0.75 ^{* *}
90 min 低温组	1.57 ± 0.32 ^{* *}	31.43 ± 5.43 ^{* *}	81.94 ± 0.68 ^{* *}	564.43 ± 82.31 ^{* *}	518.22 ± 54.78 ^{* *}	4.88 ± 0.92 ^{* *}
常温脑缺血组	1.40 ± 0.21 ^{* *}	34.24 ± 5.38 [*]	82.24 ± 0.72 ^{* *}	548.93 ± 87.59 ^{* *}	504.97 ± 42.36 ^{* *}	4.78 ± 0.89 ^{* *}

注:与假手术组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与常温脑缺血组相比,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$

研究表明,脑缺血时氧自由基生成增多,而脑缺血后低温具有明显抑制再灌注时氧自由基的生成^[2],并减少脂质过氧化反应和 O_2^- 的生成^[3],另外, Karibe^[4] 在大鼠局灶性脑缺血实验中发现,低温 (33℃) 可明显降低或抑制再灌注时内源性抗氧化剂抗坏血酸盐和 GSH 的消耗。在狗脑缺血后立即低温可使缺血组织中 MDA 的生成减少, SOD 的含量相对增加^[5]。

本实验的结果显示:常温脑缺血后脑组织中抗氧化酶 SOD、GSH-Px 和 GSH 含量下降,脂质过氧化 (LPO) 的产物 MDA 含量增加;脑缺血后 60 min 内进行亚低温可延缓常温脑缺血时 SOD、GSH-Px、GSH 的下降和 MDA 的升高;脑缺血后 90 min 开始亚低温则无此作用,说明了及时低温具有减少缺血组织中抗氧化酶的消耗,增强清除自由基的能力。

二、不同时间开始亚低温对脑缺血时组织 ATP、乳酸和脑含水量的影响

在脑缺血、缺氧时, ATP 合成减少, Na^+ - K^+ -ATP 酶功能活动受到影响;细胞内 Na^+ 积聚、 K^+ 逸出导致细胞内水肿。脑缺血时 ATP 的减少,使神经细胞突触前膜 EAA 的释放增加,作用于 NMDA 受体,使受体依赖的 Ca^{2+} 通道开放,大量 Ca^{2+} 内流。另外,由于缺血组织的线粒体破坏,不能利用有氧氧化产生 ATP,使组织中乳酸堆积,导致酸中毒的发生,使脑水肿加重。现有研究表明,脑缺血后低温可明显减少缺血组织中 ATP 的消耗及乳酸的堆积,使脑水肿减轻^[6],同时还可能减少损伤性因子 Ca^{2+} 和 EAA 等的升高,从而发挥脑保护作用^[7]。

本实验的结果显示:常温脑缺血后脑组织中 ATP 含量下降,组织中乳酸和含水量以及细胞内 Na^+ 、 Ca^{2+} 明显增加, K^+ 含量下降。脑缺血后 30 min 内开始亚低温可减缓常温脑缺血时 ATP 的消耗、乳酸堆积和脑水肿的加剧;脑缺血后 60 min 开始亚低温尚有部分作用;但脑缺血后 90 min 开始亚低温则无任何作用。

三、不同时间开始亚低温对脑缺血损伤的影响

许多研究表明,缺血后亚低温可通过以下途径发挥脑保护作用:抑制兴奋性氨基酸的释放;减少神经元坏死和凋亡^[8];减少 NO 的生成,减少自由基的生成及增强自由基清除系统的功能^[9];减少细胞内钙超载;减轻脑水肿;减轻酸中毒,改善细胞能量代谢促进 ATP 的恢复^[10]。但脑缺血后多长时间开始低温才有保护作用,这是倍受关注的问题。

本实验的结果说明,在大鼠全脑缺血后 30 min 内开始亚低温可减少脑缺血损伤作用;脑缺血后 60 min 开始亚低温时这种保护作用减轻;在缺血后 90 min 内开始亚低温则无任何作用。说明脑缺血后 60 min 内开始低温对脑缺血有保护作用。与 Miyazawa^[11] 的报道

一致,其研究发现缺血后 1 h 内开始亚低温能有效地使梗死体积减小。也有研究发现,在沙土鼠脑缺血后立即低温对神经元有保护作用,而缺血 30 min 和 1 h 开始低温则无保护作用。但 Garnier 等^[12] 报道,脑缺血 2 h 开始低温仍有保护作用,这可能与不同研究者采用的动物模型、观察时间不同以及温度的不同有关,但多数学者认为缺血后开始亚低温时间越早,其神经保护作用越好。

总之,本研究结果显示脑缺血后尽早实施亚低温可有效地减轻脑缺血后的损伤,发挥脑保护作用。相信通过进一步的实验研究,将为临床应用亚低温治疗缺血性脑血管病提供理论依据。

参 考 文 献

- 1 Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 1979, 10:267-272.
- 2 Horiguchi T, Shimizu K, Ogino M, et al. Posts ischemic hypothermia inhibits the generation of hydroxyl radical following transient forebrain ischemia in rats. *J Neurotrauma*, 2003, 20:511-520.
- 3 Maier CM, Sun GH, Cheng D, et al. Effects of mild hypothermia on superoxide anion production, superoxide dismutase expression and activity following transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*, 2002, 11:28-42.
- 4 Karibe H, Chen SF, Iarow GJ, et al. Mild intraischemic hypothermia suppresses consumption of endogenous antioxidants after temporary focal ischemia in rats. *Brain Res*, 1994, 649:12-18.
- 5 Lei B, Tan X, Cai H, et al. Effect of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest resuscitation. *Stroke*, 1994, 25:147-152.
- 6 Bacher A, Kwon JY, Zornow MH. Effects of temperature on cerebral tissue oxygen tension, carbon dioxide tension, and pH during transient global ischemia in rabbits. *Anesthesiology*, 1998, 88:403-409.
- 7 刘志超, 李承晏, 董红娟, 等. 亚低温对大鼠急性脑梗塞后脑组织内 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、EAA 血浆 ET 变化的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25:662.
- 8 Ooboshi H, Ibayashi S, Takano K, et al. Hypothermia inhibits ischemia-induced efflux of amino acids and neuronal damage in the hippocampus of aged rats. *Brain Res*, 2000, 24:23-30.
- 9 胡波, 孙圣刚, 梅元武, 等. 亚低温在大鼠脑缺血再灌注中对氨基酸和自由基系统动态平衡的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25:195.
- 10 Kimura T, Sako K, Tanaka K, et al. Effect of mild hypothermia on energy state recovery following transient forebrain ischemia in the gerbil. *Exp Brain Res*, 2002, 145:83-90.
- 11 Miyazawa T, Tamura A, Fukhui S, et al. Effect of mild hypothermia on focal cerebral ischemia review of experimental studies. *Neurol Res*, 2003, 25:457-464.
- 12 Garnier Y, Pfeiffer D, Jensen A, et al. Effect of mild hypothermia on metabolic disturbances in fetal hippocampal slices after oxygen/glucose deprivation depend on depth and time delay of cooling. *J Soc Gynecol Investig*, 2001, 8:198-205.

(收稿日期:2003-09-25)

(本文编辑:熊芝兰)