

磷酸肌酸对新生鼠缺氧缺血性脑损伤线粒体功能的影响*

张玉晶 赵霞霞 杨艳辉 田执梁 吕莹

(哈尔滨医科大学附属二院 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 目的:探讨外源性磷酸肌酸(PCr)在缺氧缺血性脑损伤中对线粒体功能的影响。**方法:**将96只七龄Wistar新生鼠随机分为四组,分别为A假手术组、B生理盐水对照组、C磷酸肌酸小剂量干预组、D磷酸肌酸大剂量干预组,每组24只。除假手术组外其余三组动物制成HIBD模型,并在术前1h分别给予生理盐水、小剂量磷酸肌酸、大剂量磷酸肌酸腹腔注射,24h后取脑,观察脑组织线粒体内三磷酸腺苷(ATP)、还原型谷胱甘肽(GSH)以及丙二醛(MDA)的含量变化。**结果:**外源性磷酸肌酸干预后脑组织中线粒体内ATP、GSH、MDA含量与盐水对照组相比具有差异性($P<0.05$)。**结论:**外源性磷酸肌酸可以改善线粒体能量代谢,减轻脂质过氧化,保护脑组织。

关键词:磷酸肌酸;线粒体;ATP;GSH;MDA

中图分类号:R-332,R322.61 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)21-4040-03

Effect of Phosphocreatine on Mitochondrial in Brain Tissue of Neonate Rats After Hypoxia Ischemia Brain Damage (HIBD) *

ZHANG Yu-jing, ZHAO Xia-xia, YANG Yan-hui, TIAN Zhi-liang, LV Ying

(Harbin medical university of the second affiliated hospital, 150086, Harbin, China)

ABSTRACT Objective: To observe the protective effect of phosphocreatine on cerebral mitochondrial membrane in neonate rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods:** 96Wistar seven day old rats were randomly assigned into four groups: contrasted group, 0.9%NaCl contrasted group, PCr group 1 and PCr group 2. Every group was given shamming therapy or 0.9%NaCl or small dose PCr or large dose PCr before hypoxia-ischemia onset. To observe the contents of ATP on cerebral mitochondrial membrane in neonate rats. **Result:** The cerebral ATP、MDA、GSH contents in the PCr groups were changed significantly ($P<0.05$). **Conclusions:** PCr protect brain tissue and improve the energetic metabolism of the mitochondria.

Key words: PCr; Mitochondria; ATP; GSH; MDA

Chinese Library Classification(CLC): R-332, R322.61 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)21-4040-03

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是指各种围生期窒息引起部分性或完全性缺氧、脑血流减少或暂停从而导致胎儿或新生儿脑损伤。新生儿窒息导致脑损伤在病理生理上的最基本环节是缺氧导致ATP缺乏以及随之出现的一系列级联反应。而磷酸肌酸是参与细胞能量代谢的重要物质之一,也是ATP的重要补充来源,因而推测可以通过补充能量减轻对脑的损伤。

1 材料和方法

1.1 动物分组与处理

1.1.1 动物及分组 健康七龄Wistar清洁级大鼠96只,体重11-16g,雌雄不限,由哈尔滨医科大学动物实验中心提供。动物分为4组:A假手术组、B生理盐水对照组、C小剂量肌酸干预组、D大剂量肌酸干预组。

1.1.2 模型制作 参考新生鼠缺氧缺血脑病模型制作方法^[1],B、C、D三组新生鼠均分离并结扎右侧颈总动脉后在缺氧箱中缺氧,制成HIE模型,A组假手术组动物仅分离颈总动脉,不结扎也不缺氧。

1.1.3 干预措施 除A组外其余三组动物在模型制作前1h分别给予腹腔注射生理盐水(B组)、磷酸肌酸50mg/10g(C组)、磷酸肌酸150mg/10g(D组)。所有动物均回到母鼠笼内饲养,24小时后断头取脑。

1.2 脑组织线粒体ATP的测定

1.2.1 分离线粒体 动物迅速断头取脑,参照Clark^[2]等的文献方法提取线粒体。

1.2.2 线粒体ATP的测定 用高效液相色谱法分离并定量ATP。色谱条件:色谱柱为Hypersil ODS,25 μ m,4.6 $\times$ 250mm。流动相为20mm/L磷酸盐缓冲液(pH6.0)与甲醇(97.2/2.5,V/V),流速1ml/min,恒速洗脱。紫外检测波长254nm。全程10min。

1.2.3 脑组织线粒体中MDA和GSH的测定 GSH、MDA试剂盒购自南京建成生物研究所,MDA含量的测定采用硫代巴比妥法测定。荧光分光光度计测定GSH含量。

1.3 数据处理

统计分析方法采用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

* 基金项目:黑龙江省卫生厅课题(编号2007-324)

作者简介:张玉晶(1973-)女,硕士,研究方向:新生儿疾病,E-mail: zhangyujing73@yahoo.com.cn

(收稿日期:2011-05-06 接受日期:2011-05-30)

异。

2 结果

与假手术组比较, 盐水对照组大鼠脑组织线粒体匀浆中 MDA 含量明显增高、ATP 和 GSH 含量明显降低, 给予外源性

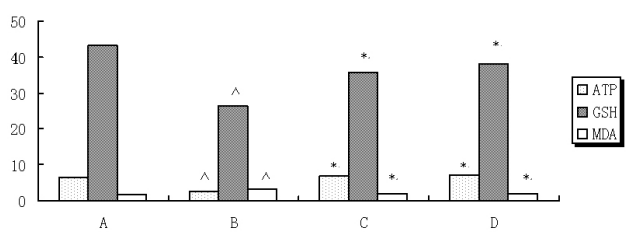
磷酸肌酸后对于上述变化均有不同程度的逆转, 磷酸肌酸(50 mg/10g)和磷酸肌酸(150 mg/10g)均能明显抑制新生大鼠缺血后脑组织中 MDA 增加和 ATP、GSH 含量的降低, 但两种剂量相比结果无显著差异。见表 1、图 1。

表 1 各组脑组织线粒体内 ATP、GSH、MDA 的变化(̄x± s)

Tab1 Effect of phosphocreatine on mitochondrial ATP, GSH, MDA in brain tissue of rats after HIBD

Group	ATP (mol/mgPro. × 10 ⁻¹⁰)	GSH (mg/gProt)	MDA (nmol/mgProt)
Sham operation A	6.516± 1.395	43.181± 10.23	1.598± 0.239
Control group B	2.589± 0.701 [△]	26.34± 7.113 [△]	3.267± 0.443 [△]
S-PCr group C	6.911± 1.459*	35.67± 8.651*	2.006± 0.547*
L-PCr group D	7.185± 1.627*	37.96± 9.241*	1.891± 0.162*

Note : Compared with sham group [△]P<0.05; compared with NS control group *P<0.05



Note : Compared with sham group [△]P<0.05; compared with NS control group *P<0.05;

图 1 各组脑组织线粒体内 ATP、GSH、MDA 的变化(̄x± s)
Fig.1 Effect of phosphocreatine on mitochondrial ATP, GSH, MDA in brain tissue of rats after HIBD

3 讨论

新生儿缺氧缺血脑病是由围生期窒息导致的脑损伤, 其病死率和致残率极高。对新生儿危害极大, 因此适宜的脑保护剂一直是新生儿疾病研究的重点。脑组织在人体组织中对缺氧最感, 因其能量代谢率高, 且能量储存有限, 只能进行有氧代谢。ATP 是细胞最直接的能源, 在线粒体内通过氧化磷酸化生成, 生成的 ATP 供自身内部或其他部位的各种能量活动所用, 或者另外转变为磷酸肌酸和其它三磷酸核苷等高能磷酸化合物。缺氧缺血受损伤后, 脑组织线粒体氧化磷酸化失偶联导致 ATP 生成减少等^[3,4]。在本实验中盐水对照组 ATP 明显减少, 与对照组相比, 差别具有显著性, 也证实了上述结论。ATP 减少导致 AMP 增多并通过嘌呤的降解反应生成腺苷、肌苷、次黄嘌呤, 在缺氧缺血时次黄嘌呤在体内大量聚集, 加之细胞内浓度过高的钙离子激活多种蛋白水解酶和磷脂酶, 蛋白酶可使黄嘌呤脱氢酶水解变成氧化酶, 当氧气恢复供应的时候, 将组织中的次黄嘌呤在黄嘌呤氧化酶的作用下形成黄嘌呤, 这两个过程都产生大量的氧自由基^[5]; 氧自由基具有强烈的引发脂质过氧化的作用; MDA 为脂质过氧化的终产物, 其在血中的水平反映机体细胞氧化损伤的程度^[6], 在本实验中, 盐水对照组脑组织线粒体中 MDA 明显增多, 提示缺氧缺血后脑组织脂质过氧化明显。在这种脑组织脂质过氧化增加会诱发谷胱甘肽过氧化物酶

(GsH-Px) 活性下降、GSH 含量下降等所引起的对活性氧清除能力的降低, 在神经元损伤中起着重要的作用。本实验生理盐水对照组线粒体内 GSH 含量明显比假手术组下降证明了上述理论。

磷酸肌酸分子中存在氮 - 磷键, 在高能量转化的细胞(如心肌、骨骼肌和脑细胞)中, 该键水解是可释放高能量, 合成 ATP。通过此途径可作为一能量缓冲剂, 又可作为细胞内的能量载体, 目前已被广泛应用于心肌梗死、心肌炎等疾病中。研究发现脑组织中磷酸肌酸的含量很高^[7,10], 而且供应效力强。给予外源性磷酸肌酸, 通过参与各种代谢途径维持了 ATP 水平, 使氧自由基生成减少, 故而阻断了 "瀑布" 式反应, 最终达到保护神经细胞的作用。已有研究将磷酸肌酸应用于成人脑梗死, 证实在急性脑梗死后尽早应用该药可以减轻脑损伤程度^[8]。但是磷酸肌酸应用于新生儿缺氧缺血性脑病研究很少。本实验中给予磷酸肌酸治疗的线粒体中 ATP 含量明显高于对照组, 差别具有显著性, 而且干预的磷酸肌酸量越高, 效果越明显。; 提示磷酸肌酸的保护机制可能与线粒体能量的正常生成和转运有关, 为提前预处理为细胞提供了大量能量储备, 维持 ATP 量的稳定^[9,12], 从而起到保护脑组织的作用。而 ATP 的稳定防止了大量氧自由基的产生 (实验中 PCr 干预组 MDA 和 GSH 含量较盐水对照组差异明显), 从而减少了氧自由基对脑组织的损伤。

实验证明用外源性磷酸肌酸预处理缺氧缺血脑组织, 可穿透缺血细胞直接供能, 对氧化应激状态下的脑细胞具有保护作用, 其机制可能与维持线粒体膜结构完整及正常氧化磷酸化功能有关, 因而对缺血脑组织起到保护作用, 可以减轻脑损伤的程度, 且副作用小, 应用于新生儿有很大可行性, 但是还需要关于其时间窗及最安全剂量等方面的研究。

参考文献(References)

[1] 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.新生儿科杂志,1992,7(6):265
Wu Wan-fang, Xu Fang-sheng, Zhang Li-li. Creation Animal Models of hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. The Journal of neonatology, 1992, 7(6):265

- [2] Clark JB, Nickas WJ. The metabolism of rat brain mitochondria [J]. J Biol Chem. 1970, 245(18):4724-4731
- [3] 周丛乐, 苗鸿才, 陈晓霞等. 缺氧对新生鼠脑细胞生物氧化的影响及干预治疗. 中国优生优育杂志, 2000, 11(3): 101-103
Zhou Cong-le, Miao Hong-cai, Chen Xiao-xia, et al. Effect of hypoxia on cerebral intracellular biological oxidation in newborn rats and intervention. Chinese Journal of Reproductive Health, 2000, 11 (3): 101-103
- [4] 高文祥, 柳君泽等. 急、慢性缺氧对大鼠脑组织线粒体能量代谢的影响. 中国病理生理杂志, 2000, 16(10): 879-882
Gao Wen-xiang, Liu Jun-ze et, al. Characteristics of energy metabolism in brain mitochondria of rats exposed to hypoxia. J Chinese Journal of Pathophysiology, 2000, 16(10): 879-882
- [5] 韩伟, 朱长连, 王小阳. 新生儿脑缺氧缺血后细胞凋亡的线粒体机制. 医学论坛杂志 2010, 31(12) 14-16
Han Wei, Zhu Chang-lian, Wang Xiao-yang. Apoptotic Mechanisms in Hypoxic-ischemic Mediated Immature Brain Injury. Journal of Medical Forum 2010, 31(12): 14-16
- [6] Zhu C, Wang X, Deinum J, et al. Cyclophilin A participates in the nuclear translocation of apoptosis - inducing factor in neurons after cerebral hypoxia - ischemia [J]. J Exp Med, 2007, 204 (8): 1741-1748
- [7] Limansky Yu P, Tamarova ZA, Piliyavsky AI, et al. The effect of creatine phosphate on reflex transmission in spinal cord in normal conditions and under hypoxia. Voprosi Neurokhirurgii, 1990, 4: 25-29.
- [8] 秦丽杰. 外源性磷酸肌酸治疗急性脑梗死患者的临床观察. 中国实用神经疾病杂志, 2007, 10(3): 31-32
Qin Li-jie. Clinical observation of the effects of exogenous phosphocreatine on acute cerebral infarction J Chinese Journal of Practical Nervous Diseases, 2007, 10(3): 31-32
- [9] Balestrino M, Lensman M, Parodi M, et al. Role of creatine and phosphocreatine in neuronal protection from anoxic and ischemic damage [J]. Amino Acids, 2002, 23(1/3): 221
- [10] Wouters K A, Kremer L C, Miller T L, et al. Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies [J]. Br J Haematol, 2005, 131(5): 561-578
- [11] Lipshultz S E, Lipsitz S R, Sallan S E, et al. Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for children acute lymphoblastic leukemia [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(12): 2629-2636.
- [12] Saleh JA, Aji BM, Yusuph H. phosphocreatine for chronic heart failure [J]. Niger J Med, 2007; 16(2): 102-106

(上接第 4029 页)

- [9] 吴长利, 史明, 张文岚. 缺血再灌注对肾细胞氧化损伤与细胞凋亡的影响 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2006, 16(2): 68-71
Wu Chang-li, Shi Ming, Zhang Wen-lan. The Influence of Ischemia-reperfusion on the Oxidative Damage and Apoptosis of Renal Cell [J]. Shenzhen Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2006, 16(2): 68-71 (In Chinese)
- [10] 李苏童, 王汉民, 李嫚, 等. 缺血后处理对缺血再灌注损伤大鼠肾脏 HIF-1 α 的影响 [J]. 中国血液净化, 2008, 7(5): 266-269
Li Su-tong, Wang Han-min, Li Man, et al. Effect of ischemic postconditioning on expression of HIF-1 α in the kidney after ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Chinese Journal of Blood Purification, 2008, 7(5): 266-269 (In Chinese)
- [11] Mozaffari MS, Abdelsayed R, Patel C, et al. Differential effects of taurine treatment and taurine deficiency on the outcome of renal ischemia reperfusion injury [J]. J Biomed Sci, 2010, 17 Suppl 1: S32
- [12] Day YJ, Huang L, Ye H, et al. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2005, 288(4): 722-731.
- [13] Liu M, Gu M, Xu D, et al. Protective effects of Toll-like receptor 4 inhibitor eritoran on renal ischemia-reperfusion injury [J]. Transplant Proc, 2010, 42(5): 1539-1544
- [14] Shah KG, Rajan D, Jacob A, et al. Attenuation of renal ischemia and reperfusion injury by human adrenomedullin and its binding protein [J]. J Surg Res, 2010, 163(1): 110-117
- [15] Feng L, Guo Y, Cheng F, et al. Effects of pretreatment with Yisheng injection on renal warm ischemia/reperfusion injury in mice [J]. Transplant Proc, 2010, 42(5): 1545-1549