

别嘌呤醇对未成熟大鼠脑白质 损伤时自由基变化的影响

胡勇¹ 邵肖梅² 张旭东²

(¹ 同济大学附属第一妇婴保健院新生儿科-上海市早产儿医疗护理中心
上海 200040; ² 复旦大学附属儿科医院新生儿科 上海 200032)

【摘要】 目的 通过制作早产儿脑白质损伤动物模型,探讨自由基在早产儿脑白质损伤发病机制中的作用及别嘌呤醇的保护作用。方法 利用新生1日龄SD大鼠32只行双侧颈总动脉结扎(BCAO)制作脑白质损伤模型,随机分为假手术组(Sham, n=8)、BCAO组(BCAO, n=12)及别嘌呤醇干预组(ALLO, n=12)。BCAO后48h检测脑白质XO、iNOS、Na⁺-K⁺-ATP酶、谷胱甘肽转移酶(GST)及·OH活力、尿酸(UA)及丙二醛(MDA)含量。结果 MDA含量(nmol/mg prot):BCAO组(2.56±0.78)较Sham组(1.36±0.23)明显升高(P<0.01),而ALLO组(1.59±0.19)较BCAO组明显降低(P<0.01)。UA含量(mg/g prot):BCAO组(13.57±0.72)及ALLO组(12.34±0.21)均较Sham组(11.42±0.56)明显升高(P<0.01),而ALLO组较BCAO组明显降低(P<0.01);·OH活力(U/mg prot):与Sham组(156.0±8.07)比较,BCAO组(206.6±21.27)明显升高(P<0.01),而ALLO组(191.7±13.04)较BCAO组显著降低(P<0.05)。XO及iNOS活力:BCAO组较Sham组明显升高(P<0.01),而ALLO组较BCAO组明显降低(P<0.05);Na⁺-K⁺-ATP酶活力(μmol pi/mg prot/h):与Sham组(3.04±0.26)比较,BCAO组(2.30±0.37)及ALLO组(2.11±0.26)均明显降低(P<0.01),而ALLO组与BCAO组相比差异无显著性(P>0.05);GST活力(U/mg prot):与Sham组(56.75±4.22)比较,BCAO组(37.60±8.32)明显降低(P<0.01),而ALLO组(43.39±4.44)比BCAO组显著提高(P<0.05)。结论 自由基在早产儿脑白质损伤中可能发挥了核心作用。别嘌呤醇对缺血引起的早产大鼠脑白质损伤具有一定的保护作用。

【关键词】 新生; 早产; 脑缺氧; 脑缺血; 脑白质; 黄嘌呤氧化酶; 自由基; 羟自由基; 别嘌呤醇

【中图分类号】 R 722.6 **【文献标识码】** A

The effects of allopurinol on changes of free radicals in damaged white matter in premature rats

HU Yong¹, SHAO Xiao-mei², ZHANG Xu-dong²

(¹ Department of Neurology, First Maternity and Infant Health Hospital, Tongji University, Shanghai 200040, China; ² Department of Neurology, Children's Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Objective The study was designed to investigate the role of free radicals in pathogenesis of white matter damage in premature infants and the protective effects of allopurinol. **Methods** White matter damage animal model was established by bilateral carotid artery occlusion (BCAO). Thirty-two Sprague Dawley (SD) newborn rats (aging 1 day old) were used and were divided randomly into three groups (Sham surgery, Sham; BCAO group, BCAO; allopurinol treated group, ALLO). XO, iNOS, Na⁺-K⁺-ATPase and ·OH activity, UA (uric acid) and MDA (malondialdehyde) content changes in white matter was determined 48 h after BCAO. **Results** Compared with sham surgery group (1.36±0.23), the MDA level (nmol/mg prot) in BCAO group (2.56±0.78) increased significantly (P<0.01); Compared with BCAO group, MDA level in ALLO group (1.59±0.19) decreased

△Corresponding author E-mail: huyongcn@yahoo.cn

significantly ($P < 0.05$). The UA level (mg/gprot) in BCAA group (13.57 ± 0.72) and that in ALLO group (12.34 ± 0.21) were higher than that in sham group (11.42 ± 0.56) ($P < 0.01$); However, the UA level in ALLO group was lower than that in BCAA group ($P < 0.01$). Compared with sham surgery group (156.0 ± 8.07), the $\cdot\text{OH}$ activity (U/mgprot) in BCAA group (206.6 ± 21.27) increased significantly ($P < 0.01$); Compared with BCAA group, $\cdot\text{OH}$ activity in ALLO group (191.7 ± 13.04) decreased significantly ($P < 0.05$). The XO and iNOS activity in BCAA group were higher than that in sham group ($P < 0.01$); However, the XO and iNOS activity in ALLO group was lower than that in BCAA group ($P < 0.05$). Compared with sham surgery group (3.04 ± 0.26), the $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity ($\mu\text{molpi/mg prot per hour}$) in BCAA group (2.30 ± 0.37) and that in ALLO group (2.11 ± 0.26) decreased significantly ($P < 0.01$); However the difference between ALLO group and BCAA group was not statistically significant ($P > 0.05$). Compared with sham surgery group (56.75 ± 4.22), the GST activity (U/mgprot) in BCAA group (37.60 ± 8.32) decreased significantly ($P < 0.01$); However, the GST activity in ALLO group (43.39 ± 4.44) was higher than that in BCAA group ($P < 0.05$).

Conclusions Free radicals may play a pivotal role in WMD (white matter damage). Allopurinol may have a potential protective effect on premature SD rat with ischemic WMD.

【Key words】 newborn; premature infant; cerebral anoxia; cerebral ischemia; white matter; xanthine oxidase; free radicals; hydroxyl radicals; allopurinol

早产儿脑白质损伤的主要神经病理类型——脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL)最常见于极低出生体重($< 1500\text{ g}$)的早产儿^[1],在胎龄32周以下的早产儿中发生率为5%~15%。发生于新生儿期的PVL常与晚期严重的神经疾患如脑瘫、智力低下、视觉损害相关。在预防其发生或减轻其不良后果的干预策略中,有必要了解PVL的病理生理和分子机制。虽然PVL的发病机制尚未完全清楚,但近期的研究证实,PVL的发生发展与分化早期少突胶质细胞(oligodendrocyte, OLs)对缺血再灌注损伤,特别是对自由基攻击的易感性密切相关^[2-3]。因此,推测使用自由基清除剂别嘌呤醇(allopurinol, ALLO)以防治氧自由基对OLs的毒性损害有望成为防治PVL的有效手段。我们在实验中已经证实^[4],利用一日龄大鼠行双侧颈总动脉结扎(bilateral carotid artery occlusion, BCAA)可较好地制作早产儿脑白质损伤模型,别嘌呤醇对缺血引起的未成熟大鼠脑白质损伤具有保护作用。本研究进一步探讨自由基在早产儿脑白质损伤发病机制中的作用,并探讨黄嘌呤氧化酶抑制剂和自由基清除剂别嘌呤醇对缺血后早产儿脑白质自由基变化的影响。

材料和方法

实验对象 新生1日龄(出生当天计为0日龄)SD清洁级大鼠体重雌雄不拘,体重6.25~8.93 g,由中国科学院上海生命科学院药物研究所实验动

物中心提供。

实验分组及模型制作

模型制作 行BCAO^[1]:将1日龄新生SD大鼠30只随机标号后称重,放入含有少量乙醚的密闭罐中,待其停止活动3~5 s后取出,用胶布固定于操作台上,取颈部正中切口,长约0.5 cm,肉眼下依次分离并结扎左右两侧颈总动脉后将动脉放回原处,缝合切口后将实验鼠放入37℃的暖箱中恢复15 min左右放归母鼠。

分组 取术后存活的新生1日龄SD大鼠24只,随机分为BCAO组(BCAO, $n = 12$)及别嘌呤醇治疗组(ALLO, $n = 12$)。另取1日龄新生SD大鼠8只作为正常对照组即假手术组(Sham, $n = 8$),只麻醉并分离双侧颈总动脉但不结扎。于BCAO后48 h断头取脑,去除脑皮质、小脑后,立即放入已标记的冷冻管,置液氮中保存备测。

治疗ALLO 治疗组于BCAO后即刻和24 h分别腹腔注射ALLO(0.5%ALLO + 0.5%CMC)每次135 mg/kg,假手术组、HI对照组注射等量生理盐水(0.9%NaCl + 0.5%CMC)。

观察指标 化学发光法检测脑白质XO、iNOS、 $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 及 $\cdot\text{OH}$ 活力,UA及MDA含量(试剂盒由南京建成生物工程研究所提供)。

结果分析与统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 11.0统计分析软件,多组均数比较用单因素方差分析(One way ANOVA),组间两两比较用 q 检验。

结 果

脑白质 MDA 及 UA 含量测定 MDA 含量 (nmol/mg prot):BCAO 组(2.56 ± 0.78)较 Sham 组(1.36 ± 0.23)明显升高($P < 0.01$),而 ALLO 组(1.59 ± 0.19)较 BCAO 组明显降低($P < 0.01$),ALLO 组与 Sham 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。UA(mg/g prot):BCAO 组(13.57 ± 0.72)及 ALLO 组(12.34 ± 0.21)均较 Sham 组(11.42 ± 0.56)明显升高($P < 0.01$),而 ALLO 组较 BCAO 组明显降低($P < 0.01$)(表 1)。

表 1 BCAO 后 48 h 脑白质 MDA 及 UA 含量比较
Tab 1 MDA and UA content changes in white mater at 48 h after BCAO hemisphere at 48 h after BCAO

| Group | (n) | MDA(nmol/mg prot) | UA(mg/g prot) |
|-------|------|-----------------------|---------------------------|
| Sham | (8) | 1.36 ± 0.23 | 11.42 ± 0.56 |
| BCAO | (12) | $2.56 \pm 0.78^{(1)}$ | $13.57 \pm 0.72^{(1)}$ |
| ALLO | (12) | $1.59 \pm 0.19^{(2)}$ | $12.34 \pm 0.21^{(1)(2)}$ |

⁽¹⁾ Compared with Sham-group, $P < 0.01$;
⁽²⁾ Compared with BCAO-group, $P < 0.01$

脑白质 XO、iNOS 及 ·OH 活力测定 XO 活力 (U/g prot):BCAO 组(11.62 ± 0.61)较 Sham 组(10.05 ± 0.33)明显升高($P < 0.01$),而 ALLO 组(11.16 ± 0.31)较 BCAO 组明显降低($P < 0.05$); iNOS 活力(U/mg prot):BCAO 组(0.47 ± 0.07)较 Sham 组(0.25 ± 0.04)明显升高($P < 0.01$),而 ALLO 组(0.41 ± 0.04)较 BCAO 组明显降低($P < 0.05$)。·OH 活力(U/mg prot):与 Sham 组(156.0 ± 8.07)比较,BCAO 组(206.6 ± 21.27)明显升高($P < 0.01$);而 ALLO 组(191.7 ± 13.04)较 BCAO 组显著降低($P < 0.05$)见表 2、图 1。上述结果提示,BCAO 即脑缺血可以引起脑白质及 ·OH 活力的增强,说明自由基在脑白质损伤中发挥重要作用。而 ALLO 则能抑制 XO、iNOS,并降低 ·OH 活力,可能系其发挥了 XO 抑制剂和自由基清除剂的双重作用。

脑白质 Na⁺-K⁺-ATP 酶及 GST 活力测定 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力 ($\mu\text{mol pi/mg prot/h}$):与 Sham 组(3.04 ± 0.26)比较,BCAO 组(2.30 ± 0.37)及 ALLO 组(2.11 ± 0.26)均明显降低($P < 0.01$);而 ALLO 组较 BCAO 组差异无显著性($P > 0.05$)。GST 活力(U/mg prot):与 Sham 组(56.75 ± 4.22)比较,BCAO 组(37.60 ± 8.32)及 ALLO 组(43.39 ± 4.44)均明显降低($P < 0.01$);而 ALLO

组较 BCAO 组显著提高($P < 0.05$)(表 3)。

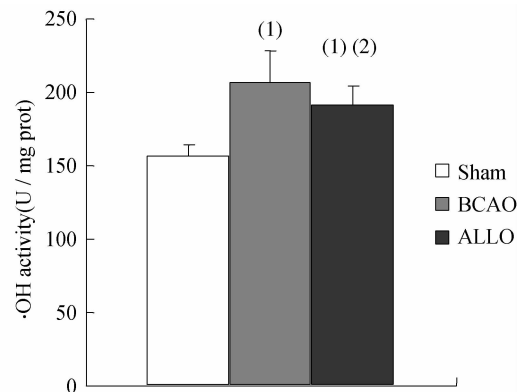


图 1 BCAO 后 48 h 脑白质羟自由基活力比较 ($\bar{x} \pm s$)

Fig 1 ·OH activity changes in white mater at 48 h after BCAO ($\bar{x} \pm s$)

⁽¹⁾ Compared with Sham-group, $P < 0.01$;
⁽²⁾ Compared with BCAO-group, $P < 0.05$

表 2 BCAO 后 48 h 脑白质 XO 及 iNOS 活力比较
Tab 2 XO and iNOS activity changes in white mater at 48 h after BCAO

| Group | (n) | XO (U/g prot) | iNOS (U/mg prot) |
|-------|------|---------------------------|--------------------------|
| Sham | (8) | 10.05 ± 0.33 | 0.25 ± 0.04 |
| BCAO | (12) | $11.62 \pm 0.61^{(1)}$ | $0.47 \pm 0.07^{(1)}$ |
| ALLO | (12) | $11.16 \pm 0.31^{(1)(2)}$ | $0.41 \pm 0.04^{(1)(2)}$ |

⁽¹⁾ Compared with Sham-group, $P < 0.01$;
⁽²⁾ Compared with BCAO-group, $P < 0.05$

表 3 BCAO 后 48 h 脑白质 Na⁺-K⁺-ATP 酶及 GST 活力比较

Tab 3 Na⁺-K⁺-ATPase and GST changes in white mater at 48 h after BCAO

| Group | (n) | Na ⁺ -K ⁺ -ATPase ($\mu\text{mol pi/mg prot/h}$) | GST (U/mg prot) |
|-------|------|--|---------------------------|
| Sham | (8) | 3.04 ± 0.26 | 56.75 ± 4.22 |
| BCAO | (12) | $2.30 \pm 0.37^{(1)}$ | $37.60 \pm 8.32^{(1)}$ |
| ALLO | (12) | $2.11 \pm 0.26^{(1)}$ | $43.39 \pm 4.44^{(1)(2)}$ |

⁽¹⁾ Compared with Sham-group, $P < 0.01$;
⁽²⁾ Compared with BCAO-group, $P < 0.05$

讨 论

PVL 与宫内缺氧、感染、绒毛膜羊膜炎、PROM、产时失血、窒息、血容量降低、低碳酸血症、反复呼吸暂停、心动过缓、败血症、急性坏死性小肠结肠炎等因素密切相关。围产期脑缺氧缺血被认为是 PVL 的主要发生因素^[5]。作为 PVL 主要靶细胞的少突胶质细胞前体细胞具有成熟依赖的易损性,这种易损性与其发育窗有关,该发育窗以抗氧化能力缺陷和在 OLs 分化中对铁的积极性相结合为

特征。研究证实^[2],缺血再灌注损伤时产生致死性氧自由基,尤其是细胞毒性较强的羟自由基,自由基攻击早期分化少突胶质细胞,导致 OLs 的凋亡性死亡。发病机制中的重要参与因素与易受自由基攻击的这一中心环节相互作用^[5]。

我们的实验结果显示,BCAO 后 48 h 脑组织中 $\cdot\text{OH}$ 活力明显增强,脂质过氧化产物的代谢物 MDA 含量明显增加,提示脑缺血引起脑组织自由基生成增加。实验还显示,BCAO 后 48 h 脑组织中 XO、iNOS 活力明显增强,XO 催化的产生自由基的反应终产物 UA 含量明显增加,提示 BCAO 引起脑组织 XO、iNOS 进一步活化,进而导致大量自由基的生成。GST 部分地反应了脑组织的抗氧化能力,BCAO 后 GST 明显降低,说明早产脑组织本就发育不完善的抗氧化能力进一步受损。BCAO 引起的自由基的大量产生还可能抑制了脑组织的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶功能,本实验显示,BCAO 后脑组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力明显减弱,与相关报道相符^[6]。上述结果提示自由基对 OLs 的损害在脑白质损伤的发生发展中起着非常重要的作用。

对 PVL 发病机制的新认识提出了潜在的预防性干预措施。由于缺血等引起的致死性氧自由基的产生和 OL 易受自由基攻击最终凋亡性死亡,是早产儿脑白质损伤发病机制的中心环节,因而使用自由基清除剂以防止氧自由基的毒性有望预防或减轻早产儿脑白质损伤。我们在实验中已经证实^[4],别嘌呤醇对缺血引起的未成熟大鼠脑白质损伤具有一定程度的保护作用,本实验进一步探讨其对脑白质损伤的保护作用机制。

实验中我们发现,与 BCAO 组相比,ALLO 组 BCAO 后 48 h 脑组织中 $\cdot\text{OH}$ 活力明显减弱,脂质过氧化产物的代谢物 MDA 含量及 XO 催化的反应产物 UA 含量明显减少,提示 ALLO 具有抑制黄嘌呤氧化酶和直接清除自由基的作用。我们还发现,

与 BCAO 组相比,ALLO 组 XO、iNOS 活力明显减弱,提示 ALLO 通过抑制 XO、iNOS 的活化等途径而减少自由基的生成。另外,ALLO 组 GST 的活力较 BCAO 组明显增强,说明 ALLO 的干预改善了缺血脑组织的抗氧化能力。但实验也显示 ALLO 对缺血脑组织的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶功能受损改善不明显,可能与自由基对 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶产生了不可逆性抑制作用有关。

综上所述,自由基尤其是细胞毒性最强的羟自由基可能在早产儿脑白质损伤中发挥了核心作用。别嘌呤醇可能通过减少自由基的生成和直接清除自由基的作用对缺血引起的早产大鼠脑白质损伤具有一定的保护作用。确切的机制有待进一步地深入研究。

参 考 文 献

- [1] Cai ZW, Pang Y, Xiao F, *et al.* Chronic ischemia preferentially causes white matter injury in the neonatal rat brain[J]. *Brain Res*, 2001, 898: 126 - 135.
- [2] Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy. Neurology of the Newborn[M]. 4th Edition. Philadelphia: WB Saunders Co, 2001: 217.
- [3] Back SA, Han BH, Luo NL, *et al.* Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia[J]. *J Neurosci*, 2002, 22: 455 - 463.
- [4] 胡勇,邵肖梅,王莹,等. 别嘌呤醇对未成熟鼠脑白质损伤保护作用的研究[J]. *中华儿科杂志*, 2006, 44 (3): 182 - 186.
- [5] Volpe JJ. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature Infant[J]. *Pedi Res*, 2001, 5(50): 553 - 562.
- [6] Mark RJ, Hensley K, Butterfield DA, *et al.* Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities; evidence for a role in loss of neuronal Ca^{2+} homeostasis and cell death[J]. *J Neurosci*, 1995, 15: 6 239 - 6 249.

(收稿日期:2008-01-22;编辑:沈玲)