

# 大鼠全脑缺血再灌注损伤富氢液不同时间点给药的疗效比较

刘 杨 徐苗苗 胡玉萍 余志阳 段满林 惠康丽

( 南京军区南京总医院 麻醉科 江苏 南京 210002)

**【摘要】**目的: 评价再灌注后富氢液不同时间点给药, 对大鼠全脑缺血再灌注损伤的影响。方法: 清洁级成年雄性SD大鼠72只, 随机均分为4组: 假手术组(S组)、全脑缺血再灌注损伤组(I/R组)、再灌注即刻给药组(H<sub>1</sub>组)、再灌注期间给药组(H<sub>2</sub>组)。I/R组、H<sub>1</sub>组、H<sub>2</sub>组按照四血管阻塞法制作全脑缺血再灌注损伤模型。H<sub>1</sub>组大鼠在再灌注即刻, 经腹腔注射富氢液5 mL/kg(浓度0.6 mmol/L)。H<sub>2</sub>组大鼠在再灌注后6 h, 经腹腔注射富氢液5 mL/kg(浓度0.6 mmol/L)。I/R组大鼠经腹腔注射等容量的生理盐水。再灌注24 h后, 分别测定海马组织丙二醛(MDA)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素-6(IL-6)的含量。结果: 与I/R组相比较, H<sub>1</sub>组和H<sub>2</sub>组海马组织的MDA含量、TNF-α、IL-6水平降低(P<0.05)。H<sub>1</sub>组与H<sub>2</sub>组海马组织的MDA含量、TNF-α和IL-6水平无显著差异(P>0.05)。结论: 再灌注后不同时间点给予富氢液均能改善大鼠全脑缺血再灌注损伤, 但两种给药方法之间无明显差异。

**【关键词】**富氢液; 脑; 再灌注损伤

**【中图分类号】**R 743.3 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2015.04.027

## Outcomes of hydrogen-rich saline given at different time point after reperfusion in rats with transient global cerebral ischemia-reperfusion

LIU Yang, XU Miaomiao, HU Yuping, YU Zhiyang, DUAN Manlin, HUI Kangli

Department of Anesthesiology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China

**【Abstract】Objective:** To observe the effect of hydrogen-rich saline given at different time point after reperfusion in rats with transient global cerebral ischemia-reperfusion. **Methods:** Adult male Sprague-Dawley rats of clean grade were randomized into 4 groups: i. e., sham operative group (S), cerebral ischemia-reperfusion group (I/R), I/R plus hydrogen-rich saline injected at the beginning of reperfusion group (H<sub>1</sub>), and I/R plus hydrogen-rich saline injected at 6h after reperfusion group (H<sub>2</sub>). Rat models of global cerebral ischemia-reperfusion were developed with four-vessel occlusion technique for groups of I/R, H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub>. Rats in H<sub>1</sub> group were intraperitoneally injected with hydrogen-rich saline in dose of 5mL/kg(0.6 mmol/L) immediately after reperfusion, and those in H<sub>2</sub> group were intraperitoneally administered with the same agent and same dosage after 6 h of reperfusion. Rats in I/R group were given equal volume of normal saline. At 24 h of reperfusion, the hippocampus was taken from the above animals and detected for malondialdehyde (MDA), tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) level. **Results:** Compared to I/R group, the concentrations of MDA, TNF-α and IL-6 were significantly reduced in H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> group (P<0.05), yet the difference was not significant between H<sub>1</sub> group and H<sub>2</sub> group (P>0.05). **Conclusion:** Intraperitoneal administration of hydrogen-rich saline at different time point after reperfusion may reduce the brain injury of rats suffered from global cerebral ischemia-reperfusion. However, there is no difference in the efficacy between the two administration methods.

**【Key words】** hydrogen-rich saline; brain; reperfusion injury

休克和心跳骤停的复苏治疗中, 容易并发全脑缺血再灌注损伤, 其主要病理生理机制包括氧自由基大量生成和炎症反应<sup>[1]</sup>。富氢液中的 H<sup>+</sup> 通过对氧自由基的选择性清除、以及对炎症反应的抑制, 可减轻缺血再灌注损伤<sup>[2-6]</sup>。研究表明, 再灌注即刻或再灌注期间经腹腔注射富氢液均可减轻大鼠全脑

缺血再灌注损伤<sup>[6]</sup>。但是, 再灌注即刻给药与再灌注期间给药疗效之间是否存在差异, 目前尚无相关研究报道证实。因此, 本研究拟评价再灌注后富氢液不同时间点给药, 对大鼠全脑缺血再灌注损伤的影响。

收稿日期: 2014-12-19

作者简介: 刘 杨(1984-), 女, 主治医师, 硕士, (电话) 13951810429, (电子信箱) 86294826@qq.com;

惠康丽, 女, 主治医师, (电子信箱) hanshiyu1982@163.com, 通讯作者。

1 材料和方法

1.1 实验动物及模型制作 清洁级成年雄性健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠共计 72 只(由南京军区南京总医院动物实验中心提供), 9~10 周龄, 体质量 260~300 g。按照随机数字表法均分为 4 组: 假手术组(S 组)、全脑缺血再灌注损伤组(I/R 组)、再灌注即刻给药组(H<sub>1</sub> 组)、再灌注期间给药组(H<sub>2</sub> 组), 每组 18 只。采用四血管阻塞法<sup>[7-9]</sup>制备全脑缺血再灌注损伤模型。S 组: 仅阻塞双侧椎动脉, 双侧颈动脉不阻断。模型制备成功判定标准: 缺血 60 s 内大鼠出现昏迷、眼球苍白、角膜反射、翻正反射以及对光反射消失。制备全程中采用烤灯保温, 维持直肠温度 36.7~37.3℃。

1.2 试剂 富氢液由第二军医大学潜水医学科协助制备: 将等渗生理盐水注射液 500 mL 用低压舱(压力 0.5MPa)减压处理后, 于 2℃、常压下放置 2 h 充分冷却。将纯氢气充分溶解于等渗生理盐水中至饱和水平后, 置于 4℃ 下保存<sup>[10]</sup>。

1.3 给药方法 H<sub>1</sub> 组于再灌注后即刻, 经腹腔注射富氢液 5 mL/kg(浓度 0.6 mmol/L); H<sub>2</sub> 组于再灌注后 6 h, 经腹腔注射富氢液 5 mL/kg(浓度 0.6 mmol/L), I/R 组大鼠经腹腔注射等量生理盐水。

1.4 标本采集及检测 再灌注 24 h 后, 每组各取 18 只大鼠, 采取 10% 水合氯醛麻醉(腹腔注射 400 mg/kg)。将大鼠仰卧位放置在冰上开胸, 采取心脏插管法, 生理盐水持续从心脏灌注, 直至右心房流出的液体变为清澈无血, 大鼠双肺、爪子、眼球变为苍白, 迅速留取脑组织标本, 分离海马组织, -80℃ 冰箱中保存。将每组 18 只大鼠再分为 3 组, 每组 6 只, 分别测定 MDA、TNF-α、IL-6 含量。MDA 含量测定: 分离制备海马组织匀浆液, 离心后再取上清液, 采用化学比色法检测, 浓度单位 nmol/mg(试剂盒购于南京建成生物工程研究所)。TNF-α 及 IL-6 含量测定: 分离制备海马组织匀浆液, 采用 ELISA 法检测, 浓度单位 ng/g(试剂盒购于美国 R&D 公司)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

与 S 组比较, I/R 组、H<sub>1</sub> 组、H<sub>2</sub> 组的海马组织 MDA 含量、TNF-α 及 IL-6 浓度水平均升高; 其中, H<sub>1</sub> 组、H<sub>2</sub> 组海马组织 MDA 含量、TNF-α 及 IL-6 浓度水平均较 I/R 组下降 ( $P < 0.05$ ), 而 H<sub>1</sub> 组和 H<sub>2</sub> 组海马组织 MDA 含量、TNF-α 及 IL-6 浓度水平无

显著差异 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 4 组大鼠脑组织 MDA、TNF-α、IL-6 的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	MDA(nmol/mg)	TNF-α(ng/g)	IL-6(ng/g)
S 组	2.60 ± 0.6	31.9 ± 2.8	41.8 ± 7.1
I/R 组	11.20 ± 0.9 <sup>a</sup>	92.2 ± 15.8 <sup>a</sup>	158.0 ± 28.2 <sup>a</sup>
H <sub>1</sub> 组	9.27 ± 0.84 <sup>ab</sup>	70.9 ± 12.7 <sup>ab</sup>	100.9 ± 10.3 <sup>ab</sup>
H <sub>2</sub> 组	8.50 ± 2.2 <sup>ab</sup>	68.9 ± 9.1 <sup>ab</sup>	93.8 ± 15.0 <sup>ab</sup>
F 值	156.576	90.117	138.737
P 值	<0.05	<0.05	<0.05

注: 与 S 组比较 <sup>a</sup>  $P < 0.05$ ; 与 I/R 组比较 <sup>b</sup>  $P < 0.05$

3 讨论

本研究制备大鼠全脑缺血再灌注模型, 采用的是四血管阻塞法<sup>[7-9]</sup>。该模型制作方法具有模型稳定、重复性高、不需要开颅、可较好地模拟全脑缺血再灌注状态等优点, 是目前研究全脑缺血再灌注损伤的常用动物模型。由于四血管阻塞法采取清醒状态下制备缺血再灌注损伤, 所以模型的成功与否较其他建模方法容易判断, 通过简单的行为学判定即可。

脑缺血再灌注后, 原先缺血的脑组织释放大量的氧自由基, 后者可以和各种细胞成分, 特别是细胞膜脂质结构, 发生不可逆性反应, 从而破坏细胞的结构功能<sup>[11]</sup>。此外, 生理状态下, 机体处于氧化系统和抗氧化系统相平衡的状态, 一旦机体内氧化和抗氧化作用失衡, 将产生脂质过氧化反应, 通过大量氧自由基的释放诱导细胞膜、线粒体和溶酶体的结构破坏, 最终发生细胞凋亡或坏死<sup>[12]</sup>。目前, 尚缺乏评估体内氧化自由基生成量和活性的金标准, 本实验选取 MDA 作为评估指标。当自由基作用于脂质时发生过氧化反应, 氧化的最终产物为 MDA, 它是自由基与细胞的膜性结构成分, 可用来反映体内氧化自由基的生成量和活性, 从而间接反映脂质过氧化损伤的水平, 因此常用于氧化应激损伤的评估。本实验结果显示, 模型组的 MDA 浓度高于假手术组, 提示模型能较好地模拟全脑缺血再灌注损伤状态; 给予富氢液后, H<sub>1</sub> 组与 H<sub>2</sub> 组的 MDA 浓度较模型组均发生了下降, 说明富氢液具有抗氧化效应。但是, 不同时间点给药的两组之间的 MDA 浓度无明显差异, 提示给药时间点的不同可能对富氢液的抗氧化效应没有影响。

炎症反应是全脑缺血再灌注损伤的另一重要病理生理机制, 能与氧化应激共同作用于机体, 引起能量代谢障碍及自由基产生等。大量的氧自由基和促

炎症反应细胞因子,可激活 NF-κB。激活的 NF-κB 进一步启动级联反应,引起大量炎症细胞因子包括 TNF-α、IL-6 等的释放<sup>[13]</sup>。因此,TNF-α、IL-6 可作为反映炎症反应程度的指标。本实验结果提示,模型组 TNF-α 和 IL-6 浓度较假手术组升高,且能够在给予富氢液后下降;与 Kajiya 等<sup>[14]</sup>报道的口服富氢液,可以降低药物诱导的结肠炎患者体内的 TNF-α 等炎症因子浓度的研究结果相似。但是,同时我们也发现给予富氢液的时间点不同并没有对大鼠海马组织 TNF-α、IL-6 含量产生影响,说明给药时间点的不同可能并不改变富氢液对于再灌注损伤的保护效应大小。上述研究结果可能与我们选取的给药干预时间点较少、没有更深层次地探讨基因变化有关,因此,对结果的解释仍需谨慎,有待将来的研究进一步证实。

本研究通过建立大鼠全脑缺血再灌注损伤模型证实,在全脑缺血 15 min 后,富氢液能够有效地降低氧化应激和炎症反应水平,但是给药时间点的不同并没有显示出对于减轻大鼠全脑缺血再灌注损伤的差异。

【参考文献】

[1] Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012, 298(5): 229 - 317.

[2] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals [J]. *Nat Med*, 2007, 13(6): 688 - 694.

[3] Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, et al. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361(3): 670 - 674.

[4] Zheng X, Mao Y, Cai J, et al. Hydrogen-rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Free Radic Res*, 2009, 43(5): 478 - 484.

[5] Cai J, Kang Z, Liu WW, et al. Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 441(2): 167 - 172.

[6] 惠康丽, 韩云飞, 周玉弟, 等. 富氢液对大鼠全脑缺血再灌注损伤的影响 [J]. *医学研究生学报*, 2011, 24(6): 573 - 577.

[7] Li J, Jian L, Xu H, et al. Characteristics of global cerebral ischemia models constructed by modified four-vessel occlusion in rats [J]. *Neural Regen Res*, 2006, 1(5): 436 - 440.

[8] Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation [J]. *Stroke*, 1988, 19(7): 913 - 914.

[9] Toda S, Ikeda Y, Teramoto A, et al. Highly reproducible rat model of reversible forebrain ischemia—modified four-vessel occlusion model and its metabolic feature [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2002, 144(12): 1297 - 1304.

[10] 郑娟, 刘刊, 蔡建美, 等. 氢气饱和生理盐水对肺型氧中毒保护效应的研究 [J]. *中华航海医学与高压医学杂志*, 2009, 16(4): 197 - 199.

[11] Cai J, Kang Z, Liu K, et al. Neuroprotective effects of hydrogen saline in neonatal hypoxia-ischemia rat model [J]. *Brain Res*, 2009, 1256(2): 129 - 137.

[12] Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 29(3): 323 - 333.

[13] Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(11): 1603 - 1616.

[14] Kajiya M, Silva MJ, Sato K, et al. Hydrogen mediates suppression of colon inflammation induced by dextran sodium sulfate [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 386(1): 11 - 15.