

# 三磷酸腺苷二钠氯化镁对宫内窘迫胎鼠脑保护作用的研究

张陈彦<sup>1</sup>, 都治香<sup>2</sup>, 祁美玉<sup>1</sup>, 赵敏英<sup>1</sup>, 张铭娜<sup>1</sup>, 张立新<sup>1</sup>, 安雪丽<sup>1</sup>

(1. 石家庄市第一医院产科, 河北 石家庄 050011; 2. 河北医科大学第一医院妇产科, 河北 石家庄 050000)

**摘要:**目的 研究三磷酸腺苷二钠氯化镁对宫内窘迫胎鼠脑组织自由基的影响和病理组织学变化,探讨三磷酸腺苷二钠氯化镁对宫内窘迫胎鼠脑组织的保护作用。方法 成年雌性 Sprague-Dawley 大鼠 15 只,孕鼠随机分为 Sham 组、I/R 组和 T/M 组三组,每组各 5 只。于妊娠第 19 天以 3.5% 水合氯醛腹腔注射麻醉,通过无损伤动脉钳夹双侧子宫、卵巢血管 20 min 建立缺血缺氧宫内窘迫模型。T/M 组缺血前 30 min,  $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  三磷酸腺苷二钠氯化镁腹腔注射,Sham 组和 I/R 组于相同时间给予同等体积的 0.9% 氯化钠注射液。Sham 组只进行开关腹手术,不钳夹子宫卵巢动脉。各组孕鼠缺氧 20 min 后拆除动脉夹以恢复血供,并逐层关腹。各组均于手术后 24 h 取标本。计算胎鼠死亡率。每组随机抽取 10 只胎鼠取脑组织制备标本,检测组织丙二醛水平;行 HE 染色高倍镜下观察胎鼠脑组织病理改变。结果 胎鼠死亡率:I/R 组胎鼠死亡率明显高于 Sham 组( $P < 0.05$ );T/M 治疗组胎鼠死亡率较 I/R 组显著降低( $P < 0.05$ )。MDA 含量:与 Sham 组比较,I/R 组胎鼠脑组织 MDA 含量显著增高( $P < 0.05$ ),但 T/M 组胎鼠脑组织 MDA 活性显著降低( $P < 0.05$ )。结论 三磷酸腺苷二钠氯化镁能够减轻对宫内窘迫胎鼠脑组织细胞损伤,对缺血缺氧脑细胞有保护作用。

**关键词:**三磷酸腺苷二钠氯化镁;胎鼠;缺血缺氧性脑损伤;宫内窘迫;丙二醛

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.04.007

## Protective effect of adenosine triphosphate disodium magnesium chloride on fetal rats with intrauterine distress

ZHANG Chenyan<sup>1</sup>, DU Zhixiang<sup>2</sup>, QI Meiyu<sup>1</sup>, ZHAO Mingying<sup>1</sup>, ZHANG Mingna<sup>1</sup>, ZHANG Lixin<sup>1</sup>, AN Xueli<sup>1</sup>

(1. The First Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang, Hebei 050011, China;

2. The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050000, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of adenosine triphosphate disodium chloride on the free radicals of brain tissue in intrauterine fetal rats and to explore the protective effect of adenosine triphosphate disodium chloride on brain tissue of intrauterine fetal rats. **Methods** Fifteen adult female Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham group, I/R group and T/M group. Five was in each group. On the 19th day of gestation, 3.5% chloral hydrate was injected intraperitoneally with anesthesia. The model of ischemia and hypoxia and intrauterine distress was established by 20 hours of uterine and ovarian vascular occlusion. In the T/M group, 30 min and  $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  were injected intraperitoneally, and the same volume of 0.9% sodium chloride was given to the Sham group and I/R group at the same time. Sham group only switched abdominal surgery, not clamped the uterine ovarian artery. Each group of pregnant rats under hypoxia states for 20 min after removal of the arterial clip to restore blood supply, and layer by layer off the abdomen. The rats were

基金项目:石家庄市科学技术研究与发展计划(151460633)

- [7] 董雅芬,胡滨,杨秋娅,等. 固体分散体在提高难溶性药物口服生物利用度中的应用[J]. 药学与临床研究,2015,23(1): 51-54.
- [8] 魏敏,关皎,徐璐,等. 熔融法制备布洛芬固体分散体[J]. 沈阳药科大学学报,2010,27(1):15-19,23.
- [9] 陈凤珍,李庆国,何贵锋,等. 熔融挤出法制备穿心莲内酯固体分散体的研究[J]. 中药材,2011,34(12):1953-1955.
- [10] 朱丽,杨森,张强,等. 热熔挤出技术制备泊沙康唑固体分散体及其体外评价[J]. 中国药科大学学报,2015,46(3):309-315.
- [11] 张烨,杜祯,孙少平,等. 喷雾冷冻干燥法制备丹参酮 II A 固体分散体及其理化性质评价[J]. 中国药学杂志,2012,47(3): 204-208.

- [12] PARK J, CHO W, KANG H, et al. Effect of operating parameters on PVP/tadalafil solid dispersions prepared using supercritical anti-solvent process[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2014, 90:126-133.
- [13] LABUSCHAGNE PW, KAZARIAN SG, SADIKU RE. Supercritical CO<sub>2</sub>-assisted preparation of ibuprofen-loaded PEG-PVP complexes [J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2011, 57(2):190-197.
- [14] YANG D, JIANG Q, MA J, et al. Nisoldipine dissolution profile enhancement by supercritical carbon dioxide impregnation technique with fumed silica[J]. Powder Technology, 2015, 271:7-15.

(收稿日期:2016-11-05,修回日期:2016-11-21)

sacrificed at 24 h after operation. Calculate fetal mortality. Each group randomly selected 10 fetal rats to prepare brain tissue samples to detect the level of malondialdehyde in tissues. HE staining was used to observe the pathological changes of fetal brain tissue. **Results** The mortality of fetal rats in I/R group was significantly higher than that in Sham group (compared with Sham group, the content of MDA in brain tissue of I/R group was significantly higher than that of Sham group ( $P < 0.05$ ), but the activity of MDA in brain tissue of T/M group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Sodium adenosine triphosphate disodium chloride can reduce the damage of brain tissue cells in intrauterine fetal rats, and protect the brain cells from ischemia and hypoxia.

**Keywords:** triphosphate and magnesium chloride; fetal rat; ischemia and hypoxic brain injury; intrauterine distress; malondialdehyde

新生儿缺氧缺血性脑病是一个新生儿死亡最常见的原因,一些幸存者可能会遗留严重的长期的神经性残疾,包括脑瘫和神经发育延迟。新生儿脑缺氧损伤的严重程度与受多个保护性或有害因素的相互作用结果密切相关。但导致这些调控因素的原理机制还不明白。动物实验及临床研究已证实,缺氧缺血可造成神经元死亡。对缺血缺氧的干预,可减少缺氧缺血后的脑损伤。围产期的缺血缺氧对新生儿脑损伤的预后有着至关重要的影响<sup>[1]</sup>。但治疗胎儿缺氧导致的新生儿大脑缺氧缺血性脑病仍然遥遥无期。本研究的目的是制备宫内窘迫胎鼠模型调查三磷酸腺苷二钠氯化镁对缺血缺氧性脑损伤脑细胞的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 动物模型的分组和建立** 取同批成年雌性 Sprague-Dawley 大鼠 15 只,孕鼠随机分为缺血缺氧再灌注组(I/R 组)和假手术(Sham 组)、三磷酸腺苷二钠氯化镁治疗组(T/M 组)三组,每组各 5 只。于妊娠第 19 天以 3.5% 水合氯醛(1 mL/100 g)腹腔注射麻醉,通过无损伤动脉钳夹双侧子宫、卵巢血管 20 min 建立缺血缺氧宫内窘迫模型。T/M 组缺血前 30 min,  $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  三磷酸腺苷二钠氯化镁腹腔注射,Sham 组和 I/R 组于相同时间给予同等体积的 0.9% 氯化钠注射液。Sham 组只进行开关腹手术,不钳夹子宫卵巢动脉。各组孕鼠缺氧 20 min 后拆除动脉夹以恢复血供,并逐层关腹。各组均于手术后 24 h 取标本。

**1.2 方法** 各组均于关腹后 24 h 剖宫取胎,先确定胎鼠是否存活,点清死胎数,在每组存活胎鼠中随机抽取 10 只断头取脑,剥离头皮,沿前凶剪开颅骨,取全脑标本。于视交叉起始向尾侧,冠状切面厚 2 mm,标本置于 4% 多聚甲醛浸泡 24 h 经乙醇脱水后用石蜡浸泡并制成蜡块。据大鼠脑立体定位图谱,取丘脑中 1/3 平面,水平冠状切片厚 5  $\mu\text{m}$ ,制成石蜡切片。

**1.3 指标检测** 于术后 24 h 以 3.5% 水合氯醛对孕鼠行腹腔麻醉,开腹并暴露双侧子宫,观察宫腔

内的活胎数,剖出胎鼠并观察存活新生鼠皮肤颜色、四肢运动等情况。计算胎鼠死亡率。取胎鼠,断头处死,取出完整胎脑,于 4% 多聚甲醛固定 48 h,经脱水透明后石蜡包埋切片,备用。

取胎鼠脑组织,滤纸拭干,称质量后,加入 4  $^{\circ}\text{C}$  的 HEPES 缓冲液中,其体积是脑组织块质量的 9 倍,用玻璃匀浆器制成匀浆,匀浆液以  $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min,分装于  $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。按试剂盒说明书,利用分光光度计检测胎鼠脑组织的丙二醛(MDA)水平。MDA 试剂盒,购于南京建成科技有限公司。

固定后的组织分置于  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  多聚甲醛中  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  后固定,常规脱水,石蜡包埋后切片,脱蜡,行 HE 染色,光学显微镜下观察各组织形态学改变。

**1.4 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较为单因素方差分析 + LSD- $t$  检验。计数资料以例数及率表示,比较采用整体 + 分割  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组胎鼠死亡率** I/R 组胎鼠死亡率 23.31%,明显高于 Sham 组( $P < 0.05$ ),T/M 组胎鼠死亡率 15%,较 I/R 组显著降低( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组胎鼠死亡率

| 组别         | 胎鼠只数 | 死亡只数 | 死亡率/%               |
|------------|------|------|---------------------|
| Sham 组     | 57   | 0    | 0                   |
| I/R 组      | 61   | 13   | 23.31 <sup>a</sup>  |
| T/M 组      | 60   | 9    | 15.00 <sup>ab</sup> |
| $\chi^2$ 值 |      |      | 12.938              |
| $P$ 值      |      |      | 0.002               |

注:两两比较为分割  $\chi^2$  检验,a,b 分别为与 Sham、I/R 组比, $P < 0.05$ 。

**2.2 胎鼠脑组织 MDA 表达** 与 Sham 组比较,I/R 组胎鼠脑组织 MDA 含量显著增高( $P < 0.05$ ),但 T/M 组胎鼠脑组织 MDA 活性显著降低( $P < 0.05$ )。见表 2。

表2 各组胎鼠心组织中MDA的变化

| 组别     | 胎鼠只数 | MDA/(nmol/mg, pr, $\bar{x} \pm s$ ) |
|--------|------|-------------------------------------|
| Sham 组 | 10   | 1.54 $\pm$ 0.47                     |
| I/R 组  | 10   | 4.96 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>        |
| T/M 组  | 10   | 2.85 $\pm$ 0.62 <sup>ab</sup>       |
| 方差分析   |      |                                     |
| F 值    |      | 67.102                              |
| P 值    |      | 0.000                               |

注:两两比较为 LSD-*t* 检验,a、b 分别为与 Sham、I/R 组比, $P < 0.05$ 。

**2.3 脑组织 HE 染色病理学变化** 光镜下 Sham 组细胞层次清晰,脑细胞完整,细胞形态正常,未见明显损伤性改变(见图1)。T/M 组细胞排列紊乱,组织疏松水肿,神经细胞及胶质细胞变性(见图2)。I/R 组可见细胞结构层次紊乱加重,细胞水肿组织疏松水肿更加严重,细胞皱缩,核浓缩,胞质内核碎片,尚可见单个圆形凋亡小体,还有部分坏死病灶,周围可见炎性细胞浸润(见图3)。



图1 Sham 组病理图(HE × 10)

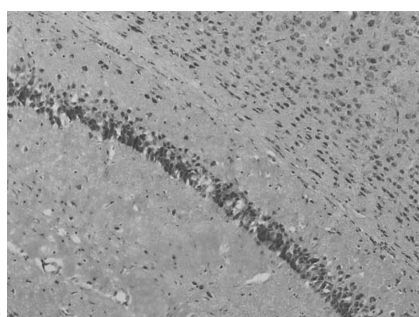


图2 T/M 组病理图(HE × 10)

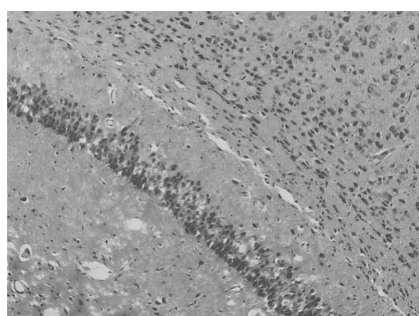


图3 I/R 组病理图(HE × 10)

### 3 讨论

妊娠期缺氧是影响胎儿发育和增加新生儿发病风险的常见原因。围产期新生儿脑损伤是缺氧缺血性脑病最常见的原因<sup>[2]</sup>。缺氧缺血性损伤影响胎儿或新生儿的中枢神经系统发育<sup>[3]</sup>。虽说缺氧缺血性脑病的发病机制尚不明确,但近年来的研究表明,不良宫内环境可能造成脑发育异常<sup>[4]</sup>。缺氧是宫内创伤中一种常见形式,和胎儿在经历长时间各种可能缺氧的条件密切相关,包括在高海拔地区怀孕、妊娠合并贫血、胎盘功能不全、脊髓压迫、先兆子痫、合并心脏、肺和肾脏疾病、或血红蛋白病等。研究表明,胎儿缺氧影响新生儿正常的大脑发育和导致各种的神经功能缺损<sup>[5]</sup>。

新生儿缺血缺氧性脑病的发病机制复杂,一般认为,脑能量代谢障碍、氧自由基损害、钙离子失衡及兴奋性氨基酸毒性作用是引起缺血细胞死亡的关键环节。三磷酸胞苷二钠是一类腺苷酸类药物,对神经细胞内的核酸、磷脂及蛋白质等成分的合成及代谢有促进作用,能调节神经细胞的生物膜合成,使神经细胞的抗损伤能力增强,还可营养神经细胞,使神经细胞的凋亡速度得以延缓<sup>[6]</sup>。镁,称为“高能离子”是细胞内第二个最丰富的阳离子,超过300种酶的辅因子,其中一些催化氧化磷酸化,激活能量储存和代谢ATP。此外,镁离子参与细胞膜的调节渗透性和动脉压。可能因细胞内ATP和ADP存在镁复合物和ATP酶需要镁作为辅因子,氯化镁能增强三磷酸腺苷的作用。

各种不利的循环条件下如低血容量休克、局部缺血和败血症等各种损伤中,给予外源性的三磷酸腺苷二钠氯化镁能够改善亚细胞、细胞或器官的功能,纠正或改善动物休克后的生存率<sup>[7]</sup>。三磷酸腺苷二钠氯化镁能够提高第二信使cAMP和IP3的基础水平,在出血性休克时降低其在膜信号传导过程中的损伤。因此,发生失血性休克时经三磷酸腺苷二钠氯化镁处理对细胞膜功能的有利影响<sup>[8]</sup>。在缺血缺氧的状态下,心血管系统会改变心率,心输出量重新分配,以保护有限的能源资源,保持大脑足够的能量供给<sup>[9]</sup>。且三磷酸腺苷二钠氯化镁对脊髓损伤有保护作用<sup>[10]</sup>。镁离子还可促进氧与产妇和胎儿血红蛋白的结合,提高子宫胎盘的血流速度,从而提高产妇与胎儿之间的物质交换,提高胎盘的功能<sup>[11]</sup>。ATP对缺血缺氧损伤的保护作用机制是三磷酸腺苷二钠氯化镁可以直接提供对细

胞内钠离子的能量或能量底物-钾-ATP 酶以及钙-ATP 酶保留在细胞外和细胞内的离子平衡,减轻细胞内酸中毒和细胞肿胀。此外,三磷酸腺苷氯化镁也对微循环的改善效果,修复膜的电压,恢复正常膜的渗透性和细胞功能的改进<sup>[12]</sup>。氯化镁的二价阳离子抑制 ATP 的螯合作用,并且抑制 ATP 的脱氨基作用和去磷酸化,从而维持组织的高 ATP 水平。围产期脑损伤后细胞凋亡较显著。由于三磷酸腺苷二钠氯化镁的神经保护作用,可以降低新生儿缺血缺氧性脑病的风险。

本实验中 I/R 组胎鼠死亡率明显高于 Sham 组,T/M 组胎鼠死亡率较缺血缺氧组显著降低,从而证实三磷酸腺苷二钠氯化镁可以降低宫内窘迫胎鼠死亡率,提高存活率。本研究病理组织学结果提示,光镜下 Sham 组细胞层次清晰,脑细胞完整,细胞形态正常,未见明显损伤性改变。无水肿,无核浓缩,无核碎片,凋亡小体少见,并且未见坏死灶。I/R 组可见细胞水肿,细胞皱缩,核浓缩,胞质内核碎片,尚可见单个圆形凋亡小体,还有部分坏死病灶,周围可见炎性细胞浸润;T/M 组上述现象明显减少、减轻。提示三磷酸腺苷二钠氯化镁在减轻宫内窘迫胎鼠脑组织损伤方面有明显的保护作用。

三磷酸腺苷二钠氯化镁降低缺血再灌注过氧化产物,从而减弱线粒体的脂质过氧化作用,达到清除氧自由基的功能<sup>[9]</sup>。而组织中 MDA 水平可用于测定组织中的氧化应激状态,是反映自由基损伤程度的重要指标<sup>[13]</sup>。本组实验的结果提示,与 Sham 组比较,I/R 组胎鼠脑组织 MDA 含量显著增高,但 T/M 组胎鼠脑组织 MDA 活性显著降低,提示三磷酸腺苷二钠氯化镁能够减少 MDA 生成,从而减轻组织的脂质过氧化损伤,减轻宫内窘迫胎鼠脑组织损伤方面有明显的保护作用。此理论提示三磷酸腺苷二钠氯化镁可以是治疗新生儿缺氧缺血性脑病的选择。这种疗法应进行确认的临床疗效研究论证。

## 参考文献

- [1] KUMRAL A,YESILIRMAK DC,SOZMEN S,et al. Effect of leptin treatment on neonatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. J Matern Fetal Neonatal Med,2012,25(2):141-146.
- [2] DOUGLAS-ESCOBAR M,WEISS MD. Biomarkers of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborns [J]. Front Neurol, 2012, 3:144.
- [3] TAGIN M,SHAH PS,LEE KS. Magnesium for newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy:a systematic review and meta-analysis[J]. J Perinatol,2013,33(9):663-669.
- [4] LI Y,XIAO DL,DASGUPTA C,et al. Perinatal nicotine exposure increases vulnerability of hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats;role of angiotensin II receptors [J]. Stroke, 2012, 43 (9): 2483-2490.
- [5] LI Y,GONZALEZ P,ZHANG L. Fetal stress and programming of hypoxic/ischemic-sensitive phenotype in the neonatal brain: Mechanisms and possible interventions [J]. Progress in Neurobiology, 2012,98(2):145-165.
- [6] 柯江维,段荣,江英. 窒息新生儿神经内分泌部分指标变化与预后关系的研究[J]. 检验医学,2007,22(1):19,22.
- [7] FUKUHARA S,MICHAEL LEITMAN I. The role of exogenous adenosine triphosphate administration for the prevention of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle[J]. J Surg Res,2013,185(1):e55-e57.
- [8] AKKOYUN HT,KARADENIZ A. Investigation of the protective effect of ellagic acid for preventing kidney injury in rats exposed to nicotine during the fetal period [J]. Biotech Histochem,2016,91(2):108-115.
- [9] 王雪菲,冯映真. 左卡尼汀联合 ATP-MgCl<sub>2</sub> 及黄芪注射液治疗病毒性心肌炎临床观察[J]. 湖北中医杂志,2014,36(4):6-7.
- [10] SIRIN YS. Comparison of ATP-MgCl<sub>2</sub> and methylprednisolone in experimentally induced spinal cord trauma[J]. Journal of Clinical and Analytical Medicine,2012,3(3):442-447.
- [11] 顾培君. 硝苯地平联合硫酸镁对妊娠期高血压疾病母体的影响研究[J]. 安徽医药,2016,20(12):2347-2350.
- [12] ZWANENBURG A,JELLEMA RK,JENNEKENS W, et al. Heart rate-mediated blood pressure control in preterm fetal sheep under normal and hypoxic-ischemic conditions[J]. Pediatr Res,2013,73(4 Pt 1):420-426.
- [13] KUNLE-ALABI OT,AKINDELE OO,RAJI Y, et al. Cardioprotective and renoprotective effects of Cocos nucifera water in offspring of high fat diet fed wistar rat dams [J]. Journal of Coastal Life Medicine,2016,8(4):634-638.

(收稿日期:2017-05-19)