

·论著·

新生大鼠缺氧缺血性脑损伤药物干预的研究

王小阳¹, 张国珍¹, 朱长连¹, 杨静丽¹, 邢清河¹, 程秀永¹, 张欣欣¹, 郭丽英², 周元聪²

(1. 河南医科大学第三附属医院儿内科, 河南郑州 450052; 2. 中国科学院上海生化所, 上海 200031)

[摘要] 目的 探讨神经生长因子(NGF)和丹参对新生大鼠缺氧缺血性脑病(HIE)的防治作用。方法 选用7日龄新生大鼠,在制成HIE模型前后给予NGF和丹参腹腔注射,HIE后分期处死大鼠分别测定谷氨酸(Glu),天门冬氨酸(Asp),一氧化氮合酶(NOS)和做病理检查。结果 HIE组(30 min) Glu,Asp和(48 h) NOS较正常对照组明显升高。Glu:(887.0 ±145.2) μg/g, vs. (776.5 ±103.0) μg/g, ($P < 0.05$); Asp:(278.6 ±48.2) μg/g, vs. (224.8 ±27.0) μg/g, ($P < 0.01$); NOS:(3.346 ±0.745) U/ml, vs. (2.195 ±0.615) U/ml, ($P < 0.01$)。NGF和丹参可以抑制HIE后的Glu,Asp和NOS升高,并可减轻脑组织病理改变。Glu:(694.9 ±83.9) μg/g, vs. (887.0 ±145.2) μg/g, ($P < 0.01$); Asp:(206.1 ±25.4) μg/g, vs. (278.6 ±48.2) μg/g, ($P < 0.01$); NOS:(2.041 ±0.357) U/ml, vs. (3.346 ±0.745) U/ml, ($P < 0.01$)。结论 NGF和丹参对HIE有防治作用。

[关键词] 缺氧缺血性脑病;新生大鼠;神经生长因子;丹参

[中图分类号] R-332;R961.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2000)04-0263-04

Intervention of NGF and Don - Shen Root in Hypoxic - Ischemic Encephalopathy of Newborn Rat

WANG Xiao-Yang, ZHANG Guo-Zhen, ZHU Chang-Lian, et al.

Third Affiliated Hospital, Henan Medical University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: **Objective** To investigate the preventive and therapeutic effects of nerve growth factor (NGF) and dan - Shen root on hypoxic - ischemic encephalopathy (HIE) in newborn rats. **Methods** NGF and dan - Shen root were injected into 7 - day - old rats before and after the HIE models were made. Glutamate (Glu), aspartate (Asp) and nitric oxide synthesis (NOS) levels in brain tissues and pathological changes were examined after the hypoxic - ischemic insults. **Results** Both (Glu, Asp) in 30 min and NOS were significantly increased in HIE rats compared with the control group. The difference between them was markedly significant. Glu: (887.0 ±145.2) μg/g, (776.5 ±103.0) μg/g, ($P < 0.05$), Asp: (278.6 ±48.2) μg/g, (224.8 ±27.0) μg/g, ($P < 0.01$), NOS: (3.346 ±0.745) U/ml, (2.195 ±0.615) U/ml, ($P < 0.01$), respectively. Glu, Asp and NOS after HIE and the pathological changes were reduced by NGF and dan - shen root as well. Glu: (694.9 ±83.9) μg/g, (887.0 ±145.2) μg/g, ($P < 0.01$), Asp: (206.1 ±25.4) μg/g, (278.6 ±48.2), ($P < 0.01$), NOS: (2.041 ±0.357) U/ml, (3.346 ±0.745) U/ml, ($P < 0.01$). **Conclusions** NGF and dan - shen root have preventive and therapeutic effects on HIE.

Key words: Hypoxic - ischemic encephalopathy; Rat; NGF; Dan - shen Root

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic - ischemic encephalopathy, HIE)是严重威胁新生儿生命和健康的疾病之一,死亡率和致残率高。为探讨有效的防治方法,本研究应用新生大鼠HIE模型,对丹参

和神经生长因子(NGF)防治HIE的效果进行了研究。

[收稿日期] 1999-09-09; [修回日期] 2000-04-30
[基金项目] 河南省医学科学院基金资助(961200052)
[作者简介] 王小阳(1965-),女,硕士,主治医师。

1 材料与方法

1.1 实验动物及 HIE 模型制作

7 日龄 Wistar 新生大鼠共 181 只,购自河南医科大学实验动物中心,体重 12~18 g,雌雄不拘,随机分到各实验组。乙醚吸入麻醉后,切开颈部皮肤,分离左颈总动脉并结扎,缝合伤口,休息 1 h 后给予吸入 8% 浓度氧 2 h,制成 HIE 模型^[1]。正常对照组不做任何处理,与 HIE 组一同饲养。

1.2 实验动物分组

全部动物分为药物干预短期观察(48 h)和长期观察(28 d)二大组。每组又分为正常对照组、HIE 组、丹参干预组、NGF 干预组 4 个亚组。短期观察组监测指标:一氧化氮合酶(nitric oxide synthesis, NOS)在缺氧缺血后 48 h 处死动物取脑测定。兴奋性氨基酸(excitatory amino acids, EAAs),分别在缺氧缺血后 30 min 和 75 min 处死动物取脑测定。长期观察组监测指标:体重、脑大体检查和显微镜下病理检查。

1.3 给药方法

于手术前 30 min 及 HIE 模型制成后即刻分别给予腹腔注射药物。剂量:NGF 1 $\mu\text{g/g}$ (从江浙蛇毒中提取,由中科院上海生化所提供),丹参 10 $\mu\text{l/g}$ 。

1.4 EAAs, NOS 测定

采用中科院上海生化所 HITACHI 835-50 型氨基酸自动分析仪测定脑组织中谷氨酸(Glu),天门冬氨酸(Asp)的含量。Glu, Asp 标准品为 Sigma 公司产品,测定结果用 $\mu\text{g/g}$ 湿脑组织表示。NOS 测定采用硝酸还原酶法,NOS 试剂盒购自南京建成生物工程研究所,蛋白测定用双缩脲法。NOS 活性按每毫克脑组织蛋白每分钟生成 1 nmol NO 为一个活性单位。

1.5 病理检查

短期观察组动物 32 只(每组 8 只),制成 HIE 模型后 48 h 处死后快速取脑,在冰盘上将大脑分为左、右皮层及海马、小脑、间脑、中脑 7 部分,分别置于 10% 福尔马林固定,常规包埋、连续切片二套,分别作 HE 染色及尼氏染色后镜检。长期观察组动物 32 只(每组 8 只),制成 HIE 模型后继续喂养 28 d,其中前 10 d 每天腹腔注射药物 1 次,剂量同前,第 28 天称重后处死,快速取脑,分别作脑大体及显微镜下病理检查,病理检查标本制作方法同短期观察组。

1.7 统计学分析

测定结果以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,经方差齐性检验后,组间比较用 t 检验或 t' 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 EAAs 测定值

测定结果显示,在缺氧缺血后 30 min 时,左、右大脑半球 Glu, Asp 含量较正常对照组明显增高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),至 75 min 时, Glu, Asp 水平即开始下降至低于正常水平。NGF 和丹参干预组缺氧缺血后 30 min 脑组织中 Glu, Asp 含量明显低于未用药物干预的 HIE 组 ($P < 0.01$),至 75 min 时干预组与未干预组 Glu, Asp 含量无明显差别,而且干预组 75 min 与干预组 30 min 无明显差别,见表 1。

2.2 NOS 测定结果

HIE 组与正常对照组相比脑组织 NOS 明显升高,差异有极显著意义 ($P < 0.01$),而用 NGF 和丹参干预后脑组织 NOS 明显下降,低于 HIE 组 ($P < 0.01$),与正常对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$),见表 2。

2.3 短期观察组脑病理检查

HIE 大鼠脑病理改变以皮层和海马最明显,可见到轻至中度脑水肿,并可见神经细胞轻至中度变性坏死,还可见脑实质中灶状出血及蛛网膜下腔血管明显充血扩张(见图 1)。丹参干预组脑病理改变以双侧皮层海马蛛网膜下腔血管扩张充血为主,并可见轻度脑水肿及少数神经细胞变性坏死,脑干、小脑、间脑改变不明显(见图 2)。NGF 干预组除可见蛛网膜下腔血管扩张充血外,可在皮层中见到胶质结节,亦可见轻度脑水肿及神经细胞变性坏死,程度较 HIE 组轻(见图 3)。



图 1 (HIE 组) 大脑皮层神经纤维疏松离散,脑内出血,显示脑水肿 HE 染色 $\times 200$

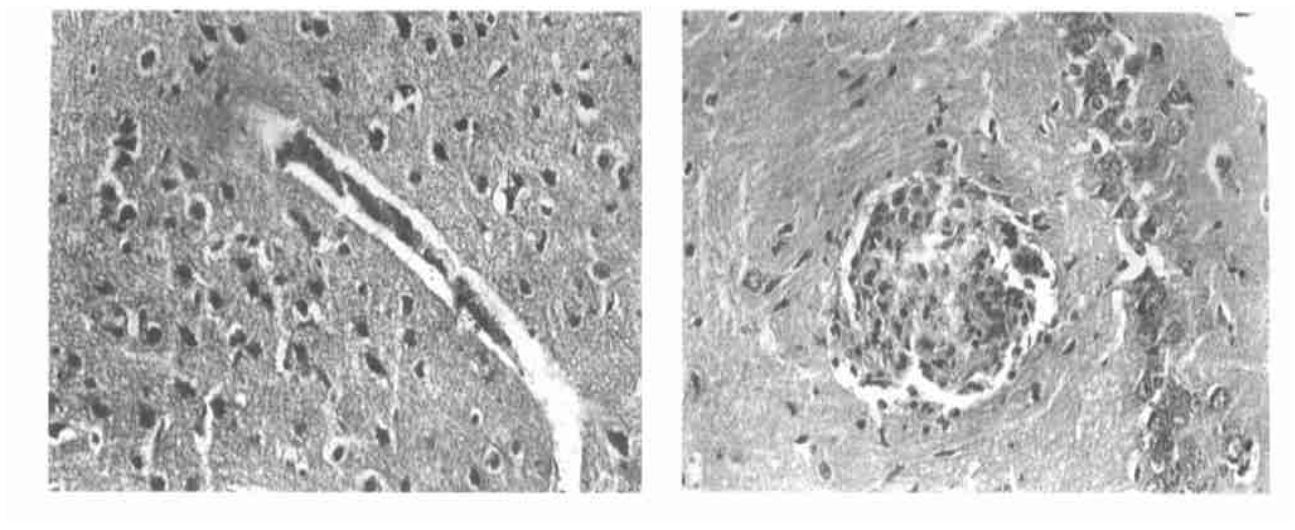


图 2 (丹参治疗组) 大脑皮层内血管扩张、充血、血管周围腔隙扩大,神经元周围腔隙扩大 HE 染色 ×400

图 3 (NGF 治疗组) 大脑皮层脑水肿较轻,可见胶质结节 HE 染色 ×200

表 1 EAA 含量测定值					
Table 1. Measurement of EAA's level					
(μg/g, $\bar{x} \pm s$)					
分组	n	Gu		Asp	
		左	右	左	右
正常对照组	12	776.5 ±103.0	730.7 ±72.1	224.8 ±27.0	224.0 ±35.6
30 min 组					
HIE	8	887.0 ±145.2 ^a	823.5 ±138.5 ^a	278.6 ±48.2 ^b	269.1 ±26.7 ^b
NGF	8	694.9 ±83.9 ^{a,c}	603.7 ±62.9 ^{b,c}	206.1 ±25.4 ^c	188.0 ±40.0 ^{a,c}
丹参	8	647.5 ±77.0 ^{b,c}	661.9 ±59.4 ^{b,c}	232.3 ±21.2 ^c	161.5 ±38.7 ^{b,c}
75 min 组					
HIE	8	700.3 ±74.0 ^a	620.2 ±73.2 ^a	194.8 ±23.8 ^a	170.2 ±23.2 ^b
NGF	8	627.2 ±76.7 ^b	616.6 ±51.4 ^a	237.4 ±45.6	223.4 ±44.6
丹参	8	658.3 ±41.8 ^b	707.1 ±59.6	184.7 ±34.0 ^b	196.9 ±29.2

注:a:与对照组相比 $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; c:与 HIE 30 min 相比 $P < 0.01$

表 2 NOS 测定值			
Table 2. Measurement of NOS level (U/ml, $\bar{x} \pm s$)			
组别	n	左	右
正常对照	16	2.195 ±0.615	2.018 ±0.597
HIE	17	3.346 ±0.745 ^a	3.109 ±0.687 ^a
NGF	12	2.041 ±0.357 ^b	1.904 ±0.823 ^b
丹参	12	2.273 ±0.392 ^b	1.853 ±0.931 ^b

注:a:与正常组相比 $P < 0.01$; b:与 HIE 组相比 $P < 0.01$

2.4 长期观察组大鼠体重增长情况

正常对照组体重平均增长 (71.0 ±14.3) g, HIE 组平均增重 (63.0 ±20.9) g, NGF 组平均增重 (61.0 ±24.8) g, 丹参组平均增重 (62.0 ±31.9) g。

2.5 长期观察组大鼠脑病理检查

脑大体改变:HIE 组主要为左侧大脑半球萎缩,并可见脑组织液化空洞形成。丹参与 NGF 治疗组此改变明显减轻。

显微镜下改变:HIE 组除脑水肿无短期观察组明显外,神经元坏死情况与其相似,除此之外尚可见到脑钙化点。丹参和 NGF 治疗组上述改变较轻。

3 讨论

目前新生儿 HIE 的治疗是困惑临床儿科医生的问题之一,治疗方法众多,一些治疗措施是否有效存在争执,缺乏客观实验依据。NGF 通过与效应神经细胞上的受体 trkA 结合,诱导神经纤维定向生

长,控制神经细胞存活数量和分化,促进损伤神经细胞的修复,参与神经细胞的凋亡过程,David^[2]等人在给新生7 d大鼠做颈总动脉结扎前和后48 h分别脑室内注射NGF,21 d后进行评估发现NGF治疗组的大鼠结扎一侧皮层和纹状体损害明显轻于未用NGF组(10% vs 30%),并且推测是通过trkA以外的途径实现其对HIE损伤的保护作用。Cheng^[3]等则发现脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)对幼鼠(7 d)与大鼠(21 d)的作用不一样,强调缺氧缺血性损伤前用药要比其后用药效果更佳,BDNF可作为围产期窒息引起的急性脑损伤有潜在治疗作用的药物,国内的研究也证实NGF能减轻缺氧缺血后远期的脑损伤,但不能减少新生大鼠缺氧缺血后脑水肿^[4]。有研究表明丹参可降低大鼠和大鼠缺血性脑卒中的发病率和死亡率,减轻缺血引起的脑水肿^[5],拮抗缺血后脑组织的单胺类介质及兴奋性氨基酸的异常升高^[6]。

本研究发现,新生大鼠脑缺氧缺血30 min后脑组织EAA有明显升高,至75 min即开始下降,缺氧缺血48 h后脑组织NOS有明显升高,这与其他文献报道一致^[7~9]。应用NGF和丹参后NOS, EAA明显降低,同时显著改善病理所见,表明NGF和丹参对HIE有防治作用。

近年来对HIE的发病机制研究表明,EAA, NO等均参与了HIE的发生发展。其机制可能是:HIE时EAA明显升高,激活其相应受体,早期引起Na⁺内流,随即Cl⁻和水被动内流导致神经细胞急性渗透性肿胀,后期引起Ca²⁺内流,细胞内钙超载,导致神经细胞延迟性损伤、坏死。NO在脑缺氧缺血时的作用认为有正负两方面的作用:NO的合成在缺血的最初几分钟内,通过NO/cGMP途径使脑血管扩张,增加脑血流,还可抑制Ca²⁺内流,对脑损伤起保护作用,而中晚期产生大量的NO则具有细胞毒作用,同时使NMDA及Glu的兴奋毒性加剧,

加重神经元损伤。由此可以推测NGF、丹参对HIE的防治作用可能是通过降低NO, EAA的水平,减轻它们所引起兴奋毒性,从而减轻对神经元的损害作用。

[参 考 文 献]

- [1] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat [J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2): 131 - 141.
- [2] David M, Holtzman R, Ann S, et al. Nerve growth factor protects the neonatal brain against hypoxic - ischemic injury [J]. *Ann Neurol*, 1996, 39(1): 114 - 122.
- [3] Cheng Y, Gidday JM, Yan Q, et al. Marked age - dependent neuroprotection by brain - derived neurotrophic factor against neonatal hypoxic - ischemic brain injury [J]. *Ann Neurol*, 1997, 41(4): 521 - 529.
- [4] 徐放生, 吴婉芳, 林久治. 神经生长因子减轻新生大鼠缺氧缺血性脑损伤 [J]. *中华儿科杂志*, 1999, 37(6): 365 - 367.
- [5] Kuang PG, Li ZZ, Zhang FY, et al. Protective effect of radix salviae miltiorrhizae composita in cerebral ischemia [J]. *J Trad Chin Med*, 1995, 15(3): 135 - 140.
- [6] Kuang PG, Xiang J. Effect of RSM on EAA and IAA during cerebral ischemia in gerbils - a microdialysis study [J]. *J Trad Chin Med*, 1994, 14(1): 45 - 48.
- [7] Puka SM, Sandberg M, Hagberg H. Brain injury after hypoxia - ischemia in newborn rats: relationship to extracellular levels of excitatory amino acids and cysteine [J]. *Brain Res*, 1997, 750(1~2): 325 - 328.
- [8] Dorrepaal CA, Shadid M, Sttendijk P, et al. Effect of post - hypoxic - ischemic inhibition of nitric oxide synthesis on cerebral blood flow, metabolism and electrocortical brain activity in newborn lambs [J]. *Biol Neonate*, 1997, 72(4): 216 - 226.
- [9] Hignchi Y, Hattori H, Hanttori R, et al. Increased neurons containing neuronal nitric oxide synthase in the brain of a hypoxic - ischemic neonatal rat model [J]. *Brain Dev*, 1996, 18(5): 369 - 375.

(本文编辑:岳少杰)