

·论著·

神经生长因子对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用

胡勇¹, 邬建荣¹, 孔元原¹, 俞海国², 汤云珍²

(1. 贵阳医学院附院儿科, 贵州 贵阳 550004; 2. 东南大学附属中大医院儿科, 江苏 南京 210000)

[摘要] 目的 研究神经生长因子(NGF)对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)的保护作用。方法 将新生7日龄SD大鼠40只随机分为NGF治疗组(n=16),对照组(n=16)和假手术组(n=8),缺氧缺血(HI)后即刻腹腔注射100 U NGF或等量生理盐水(假手术组不注射),然后观察NGF对HIBD模型鼠的体重增长、脑组织病理及超微结构改变的影响,并用TUNEL法原位标记DNA片段,观察NGF对HIBD后脑细胞凋亡的影响。结果 NGF治疗组体重增长(4.16 ± 0.24) g明显高于对照组(2.86 ± 0.17) g, (P < 0.01); TUNEL检测结果, HIBD后24 h治疗组左侧海马和皮质凋亡细胞数(分别为199.75 ± 19.61, 182.75 ± 19.12)明显低于对照组(分别为285.50 ± 32.67, 271.00 ± 28.36) (P < 0.01); HIBD后48 h治疗组左侧海马、皮质凋亡细胞数(分别为77.75 ± 15.76, 82.50 ± 19.15)亦明显低于对照组(分别为106.50 ± 16.96, 122.75 ± 16.56) (P < 0.01)。结论 外源性NGF对HIBD后脑细胞凋亡可能具有一定的保护作用。

[关键词] 脑缺氧; 脑缺血; 脑损伤; 神经生长因子; 细胞凋亡; 大鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)02-0170-03

Protective Effects of Nerve Growth Factor on Hypoxic - ischemic Brain Damage in Neonatal Rats

HU Yong, WU Jian-Rong, KONG Yuan-Yuan, et al.

Department of Pediatrics, Affiliated Hospital, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China

Abstract: **Objective** To explore the protective effects of nerve growth factor (NGF) on hypoxic - ischemic brain damage (HIBD) in neonatal rats. **Methods** Forty 7-day postnatal rats were randomly divided into NGF-treated (n = 16), control (n = 16) and sham surgery groups (n = 8). Immediately after hypoxic-ischemic (HI) injury, 100 U NGF or normal saline solution was injected intraperitoneally; the sham surgery group was not injected. The effects on body weights, macro- and microscopical changes were then assessed. The effect on apoptosis of neurons was observed by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL) staining. **Results** The increased body weight in the NGF treated group was significantly higher than that in the control group [(4.16 ± 0.24) g and (2.86 ± 0.17) g, respectively (P < 0.01)]. The average number of positive cells in the left hippocampus and cortex in the NGF-treated group at 24 h after HIBD were much lower than those in the control group (199.75 ± 19.61 vs 285.50 ± 32.67, 182.75 ± 19.12 vs 271.00 ± 28.36, respectively, P < 0.01). At 48 h after HIBD, they were also much lower than those in the control group (77.75 ± 15.76 vs 106.50 ± 16.96; 82.50 ± 19.15 vs 122.75 ± 16.56, respectively, P < 0.01). **Conclusions** It is suggested that intraperitoneal administration on NGF has protective effects on neuronal apoptosis associated with hypoxic-ischemic injury.

Key words: Cerebral ischemia; Cerebral anoxia; Brain damage; Nerve growth factor; Apoptosis; Rat

围产期窒息所致的缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)为新生儿期危害最大的常见病之一,常引起新生儿死亡和其后神经系统的发育障碍,其发病机制十分复杂。脑缺氧缺血性损伤引起的细胞死亡有坏死和凋亡两种形式,寻求抑制神经细胞凋亡的干预措施将为缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)的治疗开拓新思路。体外实验表明,神经生长因子(nerve growth factor, NGF)缺乏可诱导细胞凋亡。然而腹腔注射NGF对HIBD后脑细胞凋亡的影响目前尚未见报道,本研究采用新生SD大鼠制备HIBD模型,TUNEL标记DNA片段,观察NGF对HIBD后脑细胞凋亡的影响。

1 对象和方法

1.1 对象

实验对象为新生7日龄SD大鼠共40只,平均体重(14.0±2.0)g,雌雄不拘,由南京医科大学实验动物中心提供。

1.2 HIBD模型制备和分组

取40只新生7日龄SD大鼠随机分为5组,每组均为8只动物,即:假手术组,对照组₁,治疗组₁,对照组₂,治疗组₂,前3组于HIBD后24h采集标本,后2组于HIBD后48h采集标本。动物模型制作:乙醚吸入麻醉后,分离、结扎大鼠左侧颈总动脉,恢复2.5~3h后吸入含8%氧和92%氮的混合气体2.5h,假手术组只分离左侧颈总动脉,缝合皮肤,不造成缺血缺氧(HI)。

1.3 治疗

治疗组₁,对照组₁于HI后即刻腹腔注射NGF(军事医学科学院提供)100U/只或等量生理盐水;治疗组₂,对照组₂于HI后即刻、24h分别腹腔注射NGF100U/只或等量生理盐水,假手术组不注射。

1.4 组织切片及病理观察

于设定的时间点将实验鼠乙醚吸入麻醉后,经心脏用生理盐水冲洗,4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液(4pH7.4)灌注至面部及肢体僵硬后,取脑浸入上述缓冲液中固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,冠状连续切片,切片厚5μm,常规HE染色,光镜下观察组织病理学变化。

1.5 超微结构观察

取左侧脑组织标本以3%戊二醛固定,PBS缓冲液漂洗后,1%锇酸内固定,系列脱水,Epon 812

包埋,超薄切片后铀铅双染色,透射电镜下观察脑组织超微结构变化。

1.6 原位标记DNA片段

用TUNEL法原位标记凋亡DNA片段,程序性细胞死亡检测试剂盒由华美生物工程公司提供,具体操作程序按说明书进行。凋亡细胞统计:400倍光镜下计数3000个细胞中凋亡细胞数。

1.7 结果分析与统计学处理

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用t检验,用SPSS 8.0医学统计软件进行。

2 结果

2.1 实验鼠体重增长及左右脑重量差值比较

NGF治疗组(48h点)左右脑重量差值与对照组比较差异有显著性意义($P < 0.01$),体重增长治疗组明显高于对照组($P < 0.01$),见表1。

表1 HI后48h治疗组与对照组左右脑重量差值及体重增长比较

组别	例数	左右脑重量差值	体重增长
对照组	8	0.075 ±0.037	2.86 ±0.17
治疗组	8	0.028 ±0.016 ^a	4.16 ±0.24 ^a

注:a与对照组比较, $P < 0.01$

2.2 病理改变

对照组左侧脑组织水肿、细胞死亡及丢失情况、细胞凋亡情况均较治疗组明显,缺血中心区以坏死为主,边缘区以凋亡为主。

2.3 超微结构改变

HIE后脑神经细胞在电镜下呈现出明显的凋亡细胞特征,可见明显的细胞膜皱缩,泡状突起,核不规则,染色质聚集成小块状,边集,胞浆极度致密,内质网肿胀,可见凋亡小体。对照组凋亡细胞数为20%左右(计数30个视野),而治疗组为5%左右,治疗组细胞坏死、丢失亦较对照组减轻。

2.4 TUNEL染色结果

TUNEL染色显示HI后左侧脑组织可见较多凋亡细胞DNA片段末端标记阳性信号。治疗组与对照组左侧皮质、海马TUNEL染色阳性细胞数比较,结果显示NGF治疗组均明显低于对照组,差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。而右脑及假手术组全脑仅偶见标记阳性信号。见表2,表3。

表2 HI后24h左侧脑神经细胞凋亡数比较

Table 2 Average number of positive cells by TUNEL staining in the left brain at 24 h after HI injury ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	凋亡细胞数(个/3000个细胞)	
		海马	皮质
对照组	8	285.50 ± 32.67	271.00 ± 28.36
治疗组	8	199.75 ± 19.61 ^a	182.75 ± 19.12 ^a

注:a与对照组比较 $P < 0.01$

表3 HI后48h左侧脑神经细胞凋亡数比较

Table 3 Average number of positive cells by TUNEL staining in the left brain at 48 h after HI injury ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	凋亡细胞数(个/3000个细胞)	
		海马	皮质
对照组	8	106.50 ± 16.96	122.75 ± 16.56
治疗组	8	77.75 ± 15.76 ^a	82.50 ± 19.15 ^a

注:a与对照组比较 $P < 0.01$

3 讨论

HIE的发病机制复杂,随着有关缺血性神经细胞障碍病理学研究的进展,从分子水平高度来探索HIE的机制及其防治措施已成为当前研究的热点。Hill等^[1]在1995年首次证明了乳大鼠单侧脑HI后,脑组织中有断裂DNA细胞,提示有细胞凋亡的存在。国内蒋犁等^[2]亦证实新生大鼠HIE后24h皮质细胞凋亡最明显。HIBD时脑神经细胞凋亡的检测手段很多,目前比较推崇的是TUNEL法,此法较一般检测方法敏感。

NGF的分子结构经过40余年的大量研究,氨基酸排列顺序、基因克隆、受体及其作用机制均已先后阐明。在脑内NGF能保护那些具有trkA受体标志的胆碱能神经元抵抗多种不同类型的损伤,同时也保护皮质、海马等部位不具有trkA受体的神经元^[3]。如脑室内注入外源性NGF可防止沙土鼠缺血性脑损伤和新生大鼠HIBD^[3]。NGF对神经细胞的保护机制有:提高自由基清除剂的活力,实验显示,NGF能增加过氧化物酶、超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽,谷胱甘肽过氧化物酶等自由基清除剂的活性^[4];拮抗兴奋性氨基酸(EAA)的神经毒性;稳定细胞内Ca⁺⁺浓度,其机制在于诱导钙结合蛋白的表达、影响钙通道和钙排出系统的活化,从而

促进Ca⁺⁺的排出及减少Ca⁺⁺的内流;抑制神经细胞的程序性细胞死亡。Zhai等^[5]报道NGF通过增加bcl-2表达抑制细胞凋亡。Chalfie等^[6]提出NGF缺乏时细胞合成了一种杀伤蛋白而启动细胞死亡程序,应用NGF可抑制该种蛋白的合成,从而防止神经细胞死亡。Tanaka等^[7]研究提示NGF可能通过抑制神经细胞骨架蛋白变性、促进其再生而抑制细胞凋亡,其确切机制有待进一步探索。

NGF等大分子物质在正常情况下不易通过血脑屏障,然而新生动物血脑屏障发育不完善,且HIE后血脑屏障通透性增加,已为实验所证实^[8],从而为HIBD时NGF等大分子物质通过周围途径用药提供了实验依据。本研究显示HIBD后24h点缺血侧皮质、海马部位的凋亡细胞数高于48h点,说明凋亡高峰时间在24h左右,与文献报道相符^[1]。本研究证实腹腔注射NGF可使新生大鼠HI后皮质和海马部位的神经细胞凋亡明显减轻,脑组织病理及超微结构改变均减轻,表明NGF可能通过抑制神经细胞凋亡对HIBD具有一定的保护作用,为其临床应用提供了实验依据。

【参 考 文 献】

- [1] Hill IE, MacManus JP, Rasquinha I, et al. DNA fragmentation indicative of apoptosis following unilateral cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat [J]. Brain Res, 1995, 676(2): 398 - 403.
- [2] 蒋犁,汤云珍,俞咏华,等. 缺氧缺血对新生大鼠脑皮质细胞凋亡的影响 [J]. 新生儿科杂志, 1998, 13(5): 117 - 119.
- [3] Holtzman DM, Sheldon RA, Jaffe W, et al. Nerve growth factor protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury [J]. Ann Neurol, 1996, 39(1): 114 - 122.
- [4] Pan Z, Perez-Polo R. Role of nerve growth factor in oxidant homeostasis: glutathione metabolism [J]. J Neurochem, 1993, 61(5): 1713 - 1721.
- [5] Zhai S, Yaar M, Doyle SM, et al. Nerve growth factor rescues pigment cells from ultraviolet-induced apoptosis by upregulating BCL-2 levels [J]. Exp Cell Res, 1996, 224(2): 335 - 343.
- [6] Chalfie M, Wolinsky E. The identification and suppression of inherited neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1990, 345(6274): 410 - 416.
- [7] Tanaka K, Tsukahara T, Hashimoto N, et al. Effect of nerve growth factor on delayed neuronal death after cerebral ischemia [J]. Acta Neurochem, 1994, 129(1): 64 - 71.
- [8] 栾佐,马波,周正,等. 血脑屏障对碱性成纤维细胞生长因子通透性的实验研究 [J]. 新生儿科杂志, 1999, 14(3): 116 - 117.

(本文编辑:曹励之)