

宫内发育迟缓对大鼠脑内 NGF 及 TrkA 表达影响的研究

曲香¹ 贺宝平² 王华¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院儿科, 辽宁 沈阳 110004;
2. 鄂尔多斯市准格尔旗中心医院, 内蒙 鄂尔多斯 010300)

[摘要] 目的 观察神经生长因子(NGF)及酪氨酸激酶受体 A(TrkA)在宫内发育迟缓(IUGR)大鼠脑不同发育阶段的变化,探讨 IUGR 大鼠脑发育迟缓的机制。方法 32 只孕鼠随机分成 IUGR 组和正常对照组。采用孕期全程低蛋白饮食的方法建立 IUGR 大鼠模型。各组仔鼠于生后 0 d、7 d、14 d、21 d 断头取脑,免疫组织化学及 Western blot 方法检测脑中 NGF 和 TrkA 蛋白的表达情况。结果 免疫组化及 Western blot 结果均显示低蛋白饮食组 0 d、7 d、14 d、21 d 仔鼠脑内 NGF 及 TrkA 蛋白的表达均较正常组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 脑内 NGF 及 TrkA 蛋白表达的降低可能是 IUGR 大鼠脑发育迟缓发生的机制之一。

[中国当代儿科杂志, 2011, 13(5):415-418]

[关键词] 宫内发育迟缓;神经生长因子;酪氨酸激酶受体;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)05-0415-04

Expression of NGF and TrkA in the brain of rats with intrauterine growth retardation

QU Xiang, HE Bao-Ping, WANG Hua. Department of Pediatrics, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Wang H, Email: wangh1@sj-hospital.org)

Abstract: Objective To study the mechanism of brain development delay in rats with intrauterine growth retardation (IUGR) by examining the expression of nerve growth factor (NGF) and tyrosine kinase receptor A (Trk A) in the brain. **Methods** Thirty-two pregnant rats were randomly fed with a normal diet (control group) or lower protein diet (IUGR group) during pregnancy ($n = 16$ each). The pup rats were sacrificed at 0, 7, 14 or 21 days after birth. The protein levels of NGF and TrkA in the brain were determined by Western blot and immunohistochemistry staining. **Results** The levels of NGF and TrkA in the brain in pup rats of the IUGR group were significantly lower than those in the control group 0, 7, 14 and 21 days after birth. **Conclusions** The decreased expression of protein levels of NGF and TrkA in the brain might be one of the causes of brain development delay in IUGR rats. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (5):415-418]

Key words: Intrauterine growth retardation; Nerve growth factor; Tyrosine kinase receptor A; Rats

胎儿宫内发育迟缓(intrauterine growth retardation, IUGR)又称为胎儿生长受限,是指孕 37 周后,胎儿出生体重 < 2500 g,或低于同胎龄、同性别平均体重的 2 个标准差,或低于正常体重的第 10 百分位数以下。IUGR 是围生儿死亡的重要原因之一,其围生儿病死率为正常儿的 8 倍^[1]。IUGR 是导致神经发育异常的高危因素,可引起神经生物学,认知、记忆等方面的功能障碍^[2]。目前,对 IUGR 的研究

主要集中在内分泌方面,在神经系统方面的研究报道少见,尤其是在其发生机制方面,而且目前的研究观察 IUGR 大鼠发育阶段的时程比较短。本研究拟采用母体营养不良法建立 IUGR 模型,通过分析神经生长因子(nerve growth factor, NGF)及酪氨酸激酶受体 A(tyrosine kinase receptor A, TrkA)在 IUGR 大鼠不同生长阶段的表达改变,探讨 IUGR 脑发育异常的分子机制。

[收稿日期]2010-08-25; [修回日期]2010-10-07

[作者简介]曲香,女,硕士,医师。现工作单位:鄂尔多斯市准格尔旗中心医院,邮编 010300。

[通信作者]王华,教授。

1 材料与方法

1.1 动物模型的制备及分组

健康 Wistar 雌性大鼠 32 只, 体重 230 ~ 260 g, 健康 Wistar 雄性大鼠 8 只, 体重 230 ~ 280 g (购自中国医科大学实验动物中心), 大鼠按雌雄 4:1 比例随机于实验前 1 日 5 pm 合笼, 次日 8 am 进行雌鼠阴道涂片, 以发现精子作为妊娠第 1 天。孕鼠按受孕顺序随机分成宫内发育迟缓 (IUGR) 组和正常对照 (CON) 组, 孕鼠所生大鼠按随机原则分为 0 d、7 d、14 d、21 d 等 4 个亚组, 每组 8 只。按照文献^[3]的方法建立动物模型, 具体方法如下: 对照组孕鼠饲以标准饲料, IUGR 组孕鼠自妊娠第 1 天饲以低蛋白饮食饲料, 孕鼠每日进食饲料量均为 18 ~ 20 g, 单独饲养。低蛋白饮食饲料配制按参考文献^[4]设计, 由中国医学院实验动物研究所配制。低蛋白饮食饲料的热卡与标准饲料相近, 为 1558 J/100 g, 蛋白质含量为 8%, 标准饲料的热卡为 1583 J/100 g, 蛋白质含量为 23%。

1.2 IUGR 的判断标准及标本的制备

IUGR 判断标准^[5]: 新生鼠出生体重低于正常对照组体重的 2 个标准差的为 IUGR 大鼠。标本的制备: 所有孕鼠均自然分娩, 计数活胎数、死胎数, 称量出生 12 h 内新生仔鼠体重、脑重, 精确到 0.01 g。各组仔鼠于生后 0 d、7 d、14 d、21 d 行心脏灌注, 断头取脑。取材前称量体重, 精确到 0.1 g, 所取脑组织置于 -70℃ 冰箱中备用。

1.3 实验药品及试剂

Western blot 试剂盒, NGF、TrkA 兔抗大鼠 IgG 和磷酸酶标记山羊抗兔 IgG 均购于博士德试剂有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 免疫组织化学染色 脑组织切片脱蜡水化后, 加过氧化酶阻断液, 室温下孵育, 抗原修复; 滴加非免疫性动物血清, 室温下孵育, 加入一抗 (稀释度 1:200), 37℃, 30 min; 生物素标记的二抗, 37℃ 孵育 30 min; 加 ABC 复合物, 37℃, 45 min; 加新鲜配制的 DAB 溶液, 显微镜下观察 5 ~ 10 min; 苏木素复染, 中性树胶封固; 阴性对照用 PBS 替代一抗, 结果判定以细胞浆内棕黄色颗粒沉着为阳性细胞。

1.4.2 Western blot 法 每组标本各取 100 mg 脑组织, 加入裂解液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5,

1% TritonX-100, 2 mmol/L EDTA, 140 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EGTA, 2 mmol/L PMSF) 提取总蛋白, 按 Bradford 法测定总蛋白浓度。取 50 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 并将蛋白电转移至硝酸纤维膜上。再用 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h。加兔抗 NGF、TrkA 多克隆抗体 (1:100) 4℃ 过夜。洗膜后加碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG (1:1000), 室温下轻摇 1 h, 充分洗膜后加显色剂反应至特异性条带出现, 应用 GIS-2000 成像系统分析密度并计算 1 mg 总蛋白中 NGF、TrkA 表达的相对密度值。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析, 所有数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本方差齐性检验应用 *F* 检验, 两组间均数比较应用 *t* 检验, 率的比较用 χ^2 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IUGR 发生率的比较

IUGR 组仔鼠宫内发育迟缓的发生率为 56% (29/52), 明显高于 CON 组的 9% (5/53), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 25.74, P < 0.01$)。

2.2 死胎率的比较

IUGR 组的死胎率为 23% (12/52), 明显高于 CON 组的 9% (5/53), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.09, P < 0.05$)。

2.3 IUGR 对不同发育阶段的仔鼠体重的影响

CON 组仔鼠出生体重为 5.2 ± 0.4 g, 明显高于 IUGR 组仔鼠的出生体重 (4.2 ± 0.6 g), 差异有统计学意义。生后 7、14、21 d 两组仔鼠体重差异无统计学意义。见表 1。

表 1 两组仔鼠不同发育阶段的体重变化 ($\bar{x} \pm s, g$)

组别	仔鼠数	0 d	7 d	14 d	21 d
CON	8	5.2 ± 0.4	12.0 ± 1.3	25.6 ± 2.3	42.8 ± 2.7
IUGR	8	4.2 ± 0.6	10.8 ± 1.2	24.4 ± 2.0	41.1 ± 2.5
<i>t</i> 值		8.911	3.473	1.608	1.349
<i>P</i> 值		0.001	0.07	0.118	0.199

2.4 IUGR 对不同发育阶段的大鼠脑重的影响

IUGR 组仔鼠 0 d、7 d、14 d、21 d 组的脑重较 CON 组均显著降低, 差异有统计学意义。见表 2。

表2 两组仔鼠不同发育阶段的脑重变化 ($\bar{x} \pm s, g$)

组别	仔鼠数	0 d	7 d	14 d	21 d
CON	8	0.226 ± 0.037	0.674 ± 0.020	1.049 ± 0.033	1.169 ± 0.011
IUGR	8	0.164 ± 0.018	0.455 ± 0.032	0.904 ± 0.030	1.023 ± 0.010
<i>t</i> 值		6.211	21.391	9.279	27.046
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.5 两组仔鼠脑内 NGF 蛋白的表达

免疫组织化学染色结果示 CON 组的仔鼠大脑皮层的分子层、颗粒层、锥体细胞层、内颗粒层及海马细胞中均可见较多棕黄色 NGF 表达, IUGR 组棕黄色颗粒沉积明显减少。见图 1。Western blot 结果显示 IUGR 组 0 d、7 d、14 d、21 d 组的脑内 NGF 蛋白的表达较 CON 组显著降低, 差异有统计学意义。见表 3 和图 2。

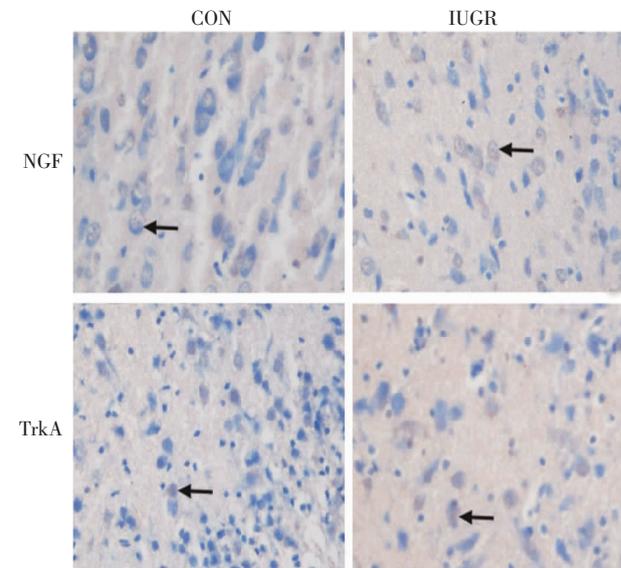


图1 7 d 组脑组织中 NGF 及 TrkA 表达(免疫组化, ×400) CON 组可见较多阳性细胞, IUGR 组免疫阳性细胞明显减少, 箭头所指为阳性细胞。

表3 两组仔鼠不同发育阶段的脑组织中 NGF 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	仔鼠数	0 d	7 d	14 d	21 d
CON	8	213.7 ± 6.4	220.7 ± 2.6	227.4 ± 3.5	220.0 ± 5.2
IUGR	8	131.2 ± 2.7	168.4 ± 1.7	201.3 ± 6.8	206.3 ± 3.2
<i>t</i> 值		35.915	48.013	9.592	6.363
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

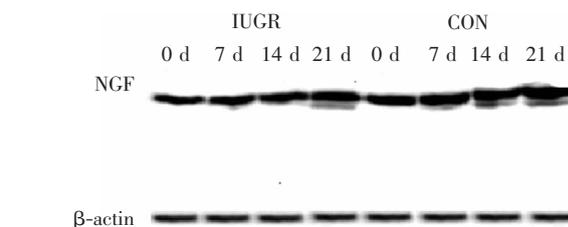


图2 两组仔鼠不同发育阶段的脑组织中 NGF 蛋白的表达(Western blot)

2.6 两组仔鼠脑内 TrkA 蛋白的表达

免疫组织化学染色结果示 CON 组的仔鼠大脑皮层的分子层、颗粒层、锥体细胞层、内颗粒层及海马细胞中均可见 TrkA 蛋白表达, IUGR 组 TrkA 蛋白表达减少。见图 1。Western blot 结果显示 IUGR 组 0 d、7 d、14 d、21 d 组的脑内 TrkA 蛋白的表达较 CON 组显著降低, 差异有统计学意义。见表 4 和图 3。

表4 两组仔鼠不同发育阶段的脑组织中 TrkA 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	仔鼠数	0 d	7 d	14 d	21 d
CON	8	146 ± 9	174 ± 4	177 ± 5	167 ± 4
IUGR	8	88 ± 7	128 ± 5	140 ± 9	150 ± 5
<i>t</i> 值		14.989	19.708	10.734	7.137
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

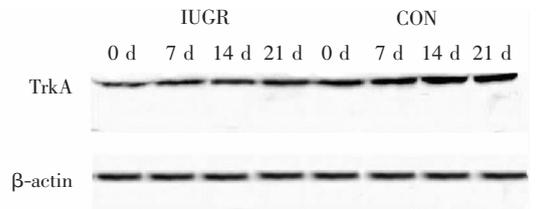


图3 两组仔鼠不同发育阶段的脑组织中 TrkA 蛋白的表达(Western blot)

3 讨论

母体孕期营养不良、低氧、糖尿病、高血压等不良状况都会影响胎儿的生长, 导致 IUGR, 引起胎儿出生低体重, 进而造成神经系统发育异常。本研究中, 采用孕期低蛋白饮食的方法成功地建立了动物模型, IUGR 组仔鼠的出生体重明显低于对照组。

在本研究中, IUGR 组仔鼠 0 d 体重与对照组相比差异有统计学意义, 说明由于 IUGR 导致仔鼠生长发育限制, 出生低体重, 但 7 d 组、14 d 组、21 d 组的大鼠体重相比没有明显差异, 考虑为出生后生长追赶的原因。Ong 等^[6]对英国 845 名单胎足月儿 0 ~ 5 岁之间前瞻性研究后发现, 30.7% 的低出生体重

儿在0~2岁期间表现出生长追赶,这些有生长追赶的儿童在5岁时较没有生长追赶的儿童体重指数增大,体脂肪含量高,且脂肪呈向心性分布。这种生长加速可能与补偿其宫内生长发育的不足有关,但这种特殊的生长类型使其出生后发生代谢综合征的危险性增加。Barker首先提出了“胎儿起源的成人疾病”假说,认为低出生体重儿成年后代谢综合征(肥胖、高血压、糖耐量异常和2型糖尿病)的风险明显增高,后来研究也证实这一点,但具体机制不清楚^[7]。

本研究结果发现,IUGR组仔鼠各个阶段的脑重较对照组均显著降低,说明IUGR组仔鼠脑发育异常。同时IUGR组仔鼠脑内NGF及其受体TrkA蛋白的表达在不同阶段均明显低于对照组,提示NGF及其受体TrkA蛋白表达的下降可能是IUGR仔鼠脑发育异常的原因,由于NGF及其受体TrkA蛋白表达的下降造成神经系统的损伤,与以往的研究相同^[8-10],在神经系统损伤者,NGF及其高亲和力受体TrkA表达同步升高,NGF及TrkA表达升高,可以减轻神经系统的损伤,有利于神经系统损伤的恢复。NGF及其受体TrkA蛋白表达下降的机制及NGF、TrkA通过下游调控因子导致神经系统损伤的具体机制有待进一步研究。外源性增加NGF和TrkA的表达能否改善神经系统的损伤是今后继续研究的问题。

[参 考 文 献]

(本文编辑:王霞)

[1] Alkalay AL, Graham JM Jr, Pomerance JJ. Evaluation of neonates

born with intrauterine growth retardation: review and practice guidelines[J]. *J Perinatol*, 1998, 18(2): 142-151.

[2] Pallotto EK, Kilbride HW. Perinatal outcome and later implications of intrauterine growth restriction[J]. *Clin Obstet Gynecol*, 2006, 49(2): 257-269.

[3] 丘大汕,沈振宇,黄婷婷,柯志勇. 早期营养干预对宫内生长迟缓大鼠瘦素、胰岛素敏感性的影响[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2004, 20(2): 161-164.

[4] Merezak S, Hardikar AA, Yajnik CS, Remacle C, Reusens B. Intrauterine low protein diet increases fetal beta-cell sensitivity to NO and IL-1 beta: the protective role of taurine[J]. *J Endocrinol*, 2001, 171(2): 299-308.

[5] 卢岩,刘晓梅,李书琴. L-精氨酸对宫内发育迟缓胎鼠胰岛素样生长因子及其结合蛋白表达的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2006, 8(4): 319-322.

[6] Ong KL, Ahmed ML, Emmett PM, Preece MA, Dunger DB. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study[J]. *BMJ*, 2000, 320(7240): 967-971.

[7] Veening MA, van Weissenbruch MM, Heine RJ, Delemare-van de Waal HA. Beta-cell capacity and insulin sensitivity in prepubertal children born small for gestational age; influence of body size during childhood[J]. *Diabetes*, 2003, 52(7): 1756-1760.

[8] Chien CC, Fu WM, Huang HI, Lai YH, Tsai YF, Guo SL, et al. Expression of neurotrophic factors in neonatal rats after peripheral inflammation[J]. *J Pain*, 2007, 8(2): 161-167.

[9] Lee TH, Yang JT, Ko YS, Kato H, Itoyama Y, Kogure K. Influence of ischemic preconditioning on levels of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and their high-affinity receptors in hippocampus following forebrain ischemia[J]. *Brain Res*, 2008, 1187: 1-11.

[10] Conti G, Gale K, Kondratyev A. Immunohistochemical evaluation of the protein expression of nerve growth factor and its TrkA receptor in rat limbic regions following electroshock seizures[J]. *Neurosci Res*, 2009, 65(2): 201-209.