

论著·实验研究

枸橼酸咖啡因对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后髓鞘碱性蛋白的影响

徐发林 程慧清 王彩红 张彦华 郭佳佳

(郑州大学第三附属医院新生儿科, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的** 研究枸橼酸咖啡因对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)后脑白质髓鞘碱性蛋白(MBP)表达的影响及其相关机制。**方法** 将48只7日龄Sprague-Dawley新生大鼠随机分为假手术组、HIBD组和枸橼酸咖啡因干预组,每组16只。左侧颈总动脉结扎并缺氧(80 mL/L氧气和920 mL/L氮气)2 h制作HIBD模型;假手术组仅分离左侧颈总动脉,不行结扎及缺氧处理;干预组在缺氧缺血前、缺氧缺血后0、24、48、72 h给予枸橼酸咖啡因(20 mg/kg)腹腔注射,HIBD组分别在同一时间点以等量生理盐水行替代腹腔注射。各组大鼠于12日龄处死,采用免疫组织化学法检测左侧脑皮层下白质MBP的表达;实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应技术(Real-time PCR)检测各组大鼠左侧脑组织腺苷A1受体(A1R)和A2a受体(A2aR)mRNA的含量。**结果** HIBD组左侧脑皮质下白质MBP表达较假手术组明显减少($P<0.05$),干预组较HIBD组MBP表达增多,但仍低于假手术组($P<0.05$);HIBD组A1R mRNA较假手术组显著上调($P<0.05$),干预组A1R mRNA较HIBD组显著下降($P<0.05$)。**结论** 枸橼酸咖啡因能减轻缺氧缺血后新生大鼠脑白质损伤,这种保护作用可能与下调腺苷A1R表达有关。
[中国当代儿科杂志, 2015, 17(9): 984-988]

[关键词] 枸橼酸咖啡因;脑损伤;髓鞘碱性蛋白;腺苷受体;新生大鼠

Effects of caffeine citrate on myelin basic protein in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

XU Fa-Lin, CHENG Hui-Qing, WANG Cai-Hong, ZHANG Yan-Hua, GUO Jia-Jia. Department of Neonatology, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email: xufalin72@126.com)

Abstract: Objective To study the effects of caffeine citrate on myelin basic protein (MBP) expression in the cerebral white matter of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) and the related mechanism. **Methods** Forty-eight seven-day-old Sprague-Dawley neonatal rats were randomly assigned to 3 groups: sham operation ($n=16$), HIBD ($n=16$) and HIBD+caffeine citrate ($n=16$). The rats in the HIBD and HIBD+caffeine citrate groups were subjected to left common carotid artery ligation, and then were exposed to 80 mL/L oxygen and 920 mL/L nitrogen for 2 hours to induce HIBD. The rats in the sham operation group were only subjected to a sham operation, without the left common carotid artery ligation or hypoxia exposure. Caffeine citrate (20 mg/kg) was injected intraperitoneally before hypoxia ischemia (HI) and immediately, 24 hours, 48 hours and 72 hours after HI. The other two groups were injected intraperitoneally with an equal volume of normal saline at the corresponding time points. On postnatal day 12, the expression of MBP in the left subcortical white matter was detected by immunohistochemistry, and the levels of adenosine A1 receptor mRNA and A2a receptor mRNA in the left brain were detected by real-time PCR. **Results** The expression of MBP in the left subcortical white matter in the HIBD group was lower than in the sham operation group ($P<0.05$). The MBP expression in the HIBD+caffeine citrate group was significantly higher than in the HIBD group, but was still lower than the sham operation group ($P<0.05$). Real-time PCR showed that the adenosine A1 receptor mRNA expression was significantly higher in the HIBD group than in the sham operation group, and it was significantly lower in the HIBD+caffeine citrate group than in the HIBD group ($P<0.05$). **Conclusions** Caffeine citrate can improve brain white matter damage following HIBD in neonatal rats and the protection mechanism might be related with the down-regulation of adenosine A1 receptor expression.
[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(9): 984-988]

Key words: Caffeine citrate; Brain damage; Myelin basic protein; Adenosine receptor; Neonatal rats

[收稿日期] 2015-06-15; [接受日期] 2015-07-20

[基金项目] 河南省教育厅自然科学研究计划项目(13A320664);郑州市2013年科技创新团队项目(131PCXTD621)。

[作者简介] 徐发林,男,博士,主任医师,副教授。

咖啡因属于甲基黄嘌呤类药物,临床上广泛用于治疗早产儿呼吸暂停已达40余年^[1]。临床研究显示,咖啡因不仅可以治疗早产儿呼吸暂停,提高撤机成功率,而且可以降低支气管肺发育不良的发生率。还有研究表明,咖啡因在早产儿纠正胎龄18~21个月时,可减少神经系统后遗症的发生率,减轻认知障碍^[2]。与安慰剂组对比,咖啡因治疗组患儿脑白质发育更为成熟^[3]。远期随访至5岁时,Doyle等^[4]发现咖啡因干预治疗后,患儿动作协调障碍发生率明显降低。动物实验研究发现咖啡因可减轻新生大鼠缺氧缺血后神经细胞的凋亡^[5]、突触递质转移的抑制^[6]、改善大鼠神经解剖学损伤及远期行为学缺陷^[7],由此可见,咖啡因早期应用在未成熟脑组织缺氧缺血性损伤中有一定的保护作用^[8]。目前国内治疗早产儿呼吸暂停多选用枸橼酸咖啡因,20 mg 枸橼酸咖啡因相当于10 mg 咖啡因,进入体内后枸橼酸迅速代谢,因此在治疗中起作用的为咖啡因。咖啡因作为非选择性腺苷受体拮抗剂,可透过血脑屏障作用于脑组织,通过拮抗腺苷受体发挥药理作用。围生期缺氧缺血是导致新生儿死亡和儿童致残的重要原因,给家庭和社会带来沉重的负担。新生儿缺氧缺血性脑病常伴有脑白质损伤(white matter damage, WMD),导致反应性星形细胞胶质化、髓鞘损害和轴突病变等病理学改变,而这些病变是脑瘫发生的最重要的危险因素,表现为发育障碍、认知及行为异常等神经系统后遗症^[9]。枸橼酸咖啡因对缺氧缺血后脑白质损伤的影响文献报道较少,这种影响是否与腺苷受体有关,目前国内仍无相关报道。本文将通过研究枸橼酸咖啡因对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)新生大鼠脑白质髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)的影响,并探讨可能的相关机制,即在转录水平上测定脑组织内腺苷A1受体(adenosine 1 receptors, A1R)及A2a受体(adenosine 2a receptors, A2aR)的表达,进一步阐明枸橼酸咖啡因对未成熟脑组织缺氧缺血性损伤的影响,为枸橼酸咖啡因的临床应用进一步提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及模型制备

48只清洁级7日龄(P7)Sprague-Dawley

(SD)新生大鼠[许可证号:SCXK(豫)2010-0002]由河南省实验动物中心提供,雌雄不限,体重12~18 g。在光照-黑暗各交替12 h条件下,由母鼠自由喂养,采用随机数字表法随机分成假手术组、HIBD组和枸橼酸咖啡因干预组(简称干预组),每组16只。参照Rice等^[10]的方法制作新生大鼠HIBD模型,新生大鼠无水乙醚吸入麻醉后,结扎左侧颈总动脉,术后放回母鼠身边恢复1 h,再置于37℃恒温的密闭容器中,通入80 mL/L氧气和920 mL/L氮气的混合气体行缺氧处理2 h;假手术组仅分离左侧颈总动脉,不结扎,亦不做缺氧处理;干预组于缺氧缺血前、缺氧缺血后0、24、48、72 h分别给予枸橼酸咖啡因(20 mg/kg)腹腔注射,HIBD组于相同时间分别给予等量的生理盐水行替代腹腔注射。

1.2 主要试剂及设备

兔抗大鼠MBP多克隆抗体、两步法免疫组化试剂盒(SV002)均购于北京博奥森生物技术有限公司,DAB显色剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司,Ultrapur RNA Kit 购于北京康为世纪生物科技有限公司、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 购自东洋纺绩株式会社,引物由金斯瑞生物科技有限公司合成,枸橼酸咖啡因(规格:20 mg/mL)由意大利凯西公司提供。

1.3 标本制作

至12日龄时,每组随机选取8只大鼠,进行乙醚麻醉,将麻醉好的新生大鼠,取仰卧位,充分暴露心脏。将连有头皮针的注射器刺入左心室后,右心耳处剪口;生理盐水灌注出全身血液,再用4%多聚甲醛灌注至躯体变硬苍白,尾巴僵直,快速剥取脑组织,然后多聚甲醛固定、梯度酒精脱水和二甲苯透明,石蜡包埋。以海马部位为标志,冠状位连续切片,切片厚度为5 μm,烤片后备用。

1.4 苏木精-伊红染色

石蜡切片脱蜡,梯度酒精水化,苏木精液染色2 min;蒸馏水洗1 min,盐酸酒精分化,蒸馏水洗2~3 s,滴加伊红溶液染色2 min;脱水、透明、封片。

1.5 免疫组织化学法

石蜡切片常规二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,枸橼酸钠抗原修复液微波加热修复,3%过氧化氢室温避光孵育30 min,山羊血清封闭后,分别滴

加一抗（兔抗大鼠 MBP，1:100），4℃ 过夜。滴加相应生物素化二抗 37℃ 孵育 30 min，DAB 显色，苏木素复染，盐酸酒精分化，自来水冲洗，常规脱水、透明、中性树胶封片，镜检。每个标本随机选取 5 张切片，100 倍光学显微镜下每张切片随机选取 5 个视野（MBP 选皮层下白质），应用 Biosens Digital Imaging Systems V1.6 分析系统测定每个视野内阳性表达区域平均积分光密度值（IOD 值），取其均值作为 MBP 的表达值（IOD 均值与蛋白表达信号呈正比）。

1.6 Real time PCR 检测

各组另取 8 只大鼠于 12 日龄断头处死，取其左侧皮层、海马区和皮层下白质，放在无 RNase 的 Eppendorf 中于 -80℃ 保存备用。用 Ultrapure RNA Kit 进行总 RNA 提取，逆转录为 cDNA 后，以 β -actin 为内参引物，进行 Real time PCR 检测，PCR 引物序列见表 1。PCR 反应体系（20 μ L）：cDNA 1 μ L，上、下游引物各 0.6 μ L，2 $\times$ SYBR green PCR mix 10 μ L，50 $\times$ ROX reference dye 0.4 μ L，RNase-Free Water 补足体积至 20 μ L。PCR 反应条件：95℃ 预变性 1 min；95℃ 变性 15 s，60℃ 退火 1 min，72℃ 延伸 30 s，共 40 个循环。应用美国 ABI Step One TM Software v2.1 分析荧光检测结果，计算各组 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值得出其相对表达量。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计学分析，计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间计量资料比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK-*q* 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 PCR 引物序列

目的基因	引物序列 (5' $\rightarrow$ 3')	产物大小 (bp)
A1R	上游: CATTGGGCCACAGACCTACT	200
	下游: CAAGGGAGAGAATCCAGCAG	
A2aR	上游: CTACAAAGAGGGGGCATGAA	170
	下游: CTTTGGACGCTTCTGGAG	
β -actin	上游: CACCCGCGAGTACAACCTTC	207
	下游: CCCATACCCACCATCACACC	

2 结果

2.1 各组新生大鼠左侧脑组织病理改变

假手术组大鼠左侧脑组织海马结构完整、细胞层次清晰，排列紧凑；HIBD 组大鼠脑组织出现不同程度的病理学改变，表现为细胞边界不清、排列紊乱，细胞周围间隙增宽；干预组较 HIBD 组细胞层次相对清晰，排列整齐。见图 1。

2.2 各组新生大鼠脑组织 MBP 表达水平比较

MBP 在皮层下白质呈棕黄色纤维条索状分布（图 2）。HIBD 组新生大鼠 MBP 表达较假手术组表达明显减少（ $P < 0.05$ ）；干预组 MBP 表达水平较 HIBD 组增多，但仍低于对照组（ $P < 0.05$ ）。见表 2。

2.3 各组新生大鼠脑组织 A1R mRNA 和 A2aR mRNA 表达水平的变化

Real time PCR 检测发现 HIBD 组脑组织 A1R mRNA、A2aR mRNA 有不同程度的升高，以 A1R mRNA 升高为主（ $P < 0.05$ ），A2aR mRNA 升高不明显（ $P > 0.05$ ）；给予枸橼酸咖啡因干预后，A1R mRNA 较 HIBD 组明显下降（ $P < 0.05$ ），而 A2aR mRNA 下降不明显（ $P > 0.05$ ）。见表 2。

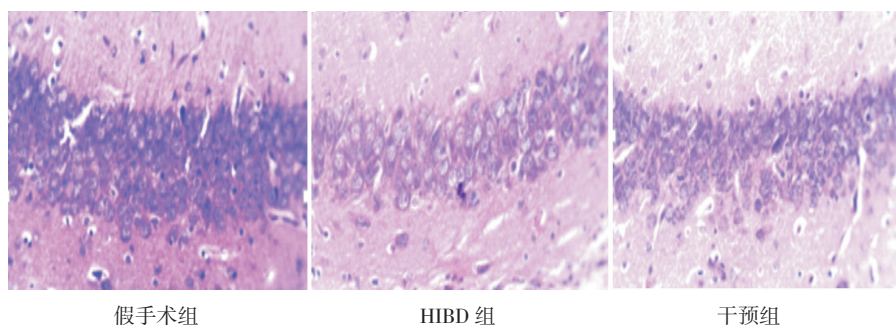


图 1 各组新生大鼠左侧脑组织 CA1 区苏木精-伊红染色（ $\times 400$ ） 假手术组大鼠左侧脑组织海马结构完整、细胞层次清晰；HIBD 组细胞边界不清、排列紊乱；干预组较 HIBD 组细胞层次相对清晰，排列整齐。

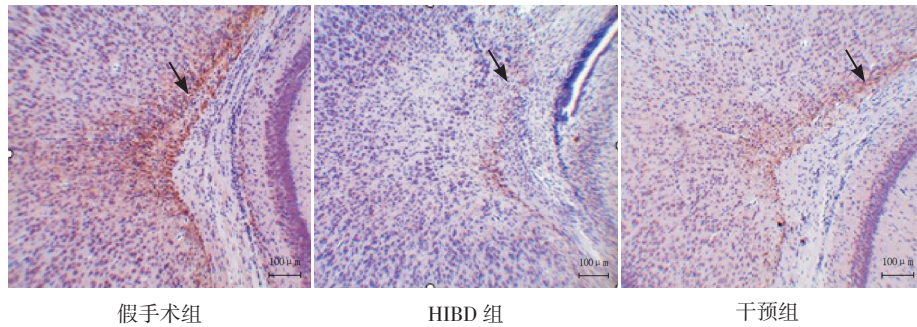


图 2 各组新生大鼠左侧脑组织皮层下 MBP 表达 ($\times 100$) 干预组大鼠皮层下 MBP 较假手术组明显减少, 但较 HIBD 组明显增多, MBP 为棕黄色纤维条索状分布 (黑色箭头所示)。

表 2 各组新生大鼠脑组织 MBP、A1R mRNA 和 A2aR mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	MBP	A1R mRNA	A2aR mRNA
假手术组	8	140.2 $\pm$ 2.2	1.02 $\pm$ 0.18	1.09 $\pm$ 0.21
HIBD 组	8	103.4 $\pm$ 4.6 ^a	1.28 $\pm$ 0.34 ^a	1.13 $\pm$ 0.36
干预组	8	122.1 $\pm$ 3.5 ^{a,b}	0.94 $\pm$ 0.17 ^{a,b}	0.96 $\pm$ 0.14
<i>F</i> 值		214.31	4.42	0.97
<i>P</i> 值		<0.01	0.03	0.39

注: MBP: 髓鞘碱性蛋白; A1R: 腺苷 A1 受体; A2aR: 腺苷 A2a 受体。a 示与假手术组比较, $P < 0.05$; b 示与 HIBD 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

近些年来, 随着枸橼酸咖啡因在早产儿呼吸暂停治疗中的广泛使用, 其对未成熟脑发育的影响也逐步受到关注。临床研究显示, 咖啡因能改善早产儿脑白质结构^[3]。Back 等^[11]利用处于低氧状态的日龄为 3~12 d 的新生大鼠进行动物实验, 发现咖啡因可增加未成熟少突胶质细胞比例, 促进白质髓鞘化形成, 减轻脑室扩张度, 并且发现这一保护作用可能与抑制 A1R 表达有关。高剂量咖啡因也未表现出对未成熟脑组织白质明显的不利作用^[12]。

MBP 是髓鞘形成的主要蛋白质, 在中枢神经系统的发育过程中起重要作用。缺氧缺血后, 新生大鼠脑白质损伤具有选择缺血易损性, 可以造成少突胶质成熟障碍和髓鞘发育延迟^[13]。本研究发现缺氧缺血后皮层下白质 MBP 表达量最少, 而给予枸橼酸咖啡因治疗后, MBP 的表达量明显增加, 提示枸橼酸咖啡因对缺氧缺血后髓鞘损伤有一定的保护作用, 即咖啡因可以改善围生期脑白质损伤, 这与 Back 等^[11]认为咖啡因可减轻低氧造成的新生大鼠髓鞘化脱失及继发性脑室扩张观点

一致。本课题组既往实验结果显示咖啡因还可减轻新生大鼠缺氧缺血后神经细胞凋亡, 提高远期认知功能^[14]。

腺苷受体分为 4 种: A1R、A2aR、A2bR、A3R, 咖啡因的生物学效应是通过作用于脑区神经元和胶质细胞不同的腺苷受体亚型, 前两者受体在脑中表达量相对较高^[15], 也是咖啡因作用的主要靶点, A2bR 和 A3R 在脑内的表达很难检测到^[16-17]。缺氧缺血后脑内腺苷浓度迅速上升, 极重度缺氧缺血时可升高达 100 倍。

咖啡因对脑白质损伤的保护作用, 其机制目前不完全明确, 目前多数观点认为与 A1R 的表达有关。A1R 早在胚胎期第 12 天就有表达, 至孕晚期表达量虽低于成年期, 但仍可检测到 A1R^[18]。A1R 的一个显著特点就是其在白质区域也有分布, 事实上, 海马区 and 大脑皮层白质区分布的 A1R 配体结合力比灰质还要高^[19]。腺苷 A1R 活化在成熟脑组织中表现出保护作用^[20], 而研究表明给予 A1R 激动剂模拟体内高浓度腺苷水平, 可以降低新生大鼠少突胶质细胞前体的比例, 导致新生大鼠髓鞘化减少、继发性脑室扩张, 抑制神经元和轴索发育及下调皮层和海马神经元细胞数目^[21], 诱导未成熟脑组织损伤。腺苷高表达还可以促进细胞凋亡活性的表达, 导致自由基和凋亡蛋白酶的升高^[22]及诱发电位突触抑制, 这显示 A1R 活化可以抑制轴索生长和脑白质形成, 而咖啡因的应用可以改善脑白质损伤。A2aR 主要存在于纹状体, 毛细血管中也有表达。A2aR 活化时导致血管加重缺氧缺血性损伤, 这也可以解释为什么咖啡因可以减轻脑室内出血的发生率^[23]。除此之外, 用于治疗早产儿呼吸暂停剂量的咖啡因血浆浓度还与抗炎机制有关, 如下调 IL-6 和 TNF- α 的表达, 促

进 IL-10 的表达;减轻 LPS 诱导的脑损伤^[24]。

本实验结果显示缺氧缺血后脑组织 A1R mRNA 显著升高,咖啡因干预后 A1R mRNA 表达水平下调,而 A2aR mRNA 虽有升高趋势,干预治疗后有下降趋势,但整体幅度不大。缺氧缺血后脑组织腺苷浓度升高,以 A1R 升高为主,干预治疗后 A1R 下调,与 MBP 的表达刚好相反,从转录水平说明 A1R 的高表达可能会加重大鼠髓鞘化损伤,A1R 表达水平下调可能减轻髓鞘化损伤,而 A2aR 水平虽整体变化不明显,但也是缺氧缺血后升高,干预治疗后有下降趋势,一定程度上提示咖啡因可以通过阻断腺苷受体水平对脑组织起正向作用。Kumral 等^[25]将非选择性腺苷受体拮抗剂作用于间断缺氧新生大鼠后,发现 A1R 水平较缺氧后下降,而 A2a 水平整体变化不大,这与本研究结果相一致。缺氧缺血后咖啡因干预治疗脑组织腺苷水平较假手术组低,而 MBP 的表达水平未较假手术组增高,这可能与蛋白表达的转录水平与翻译水平并不总是一致有关。

综上所述,枸橼酸咖啡因能够减轻新生大鼠缺氧缺血后脑白质损伤,这种保护作用可能与下调腺苷 A1R 表达有关。

[参 考 文 献]

- [1] Kreutzer K, Bassler D. Caffeine for apnea of prematurity: a neonatal success story[J]. *Neonatology*, 2014, 105(4): 332-336.
- [2] Schmidt B, Roberts RS, Davis P, et al. Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(19): 1893-1902.
- [3] Doyle LW, Cheong J, Hunt RW, et al. Caffeine and brain development in very preterm infants[J]. *Ann Neurol*, 2010, 68(5): 734-742.
- [4] Doyle LW, Schmidt B, Anderson PJ, et al. Reduction in developmental coordination disorder with neonatal caffeine therapy[J]. *Pediatrics*, 2014, 165(2): 356-359.
- [5] Kilicdag H, Daglioglu YK, Erdogan S, et al. Effects of caffeine on neuronal apoptosis in neonatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2014, 27(14): 1470-1475.
- [6] Gervitz LM, Lutherer LO, Davies DG, et al. Adenine induces initial hypoxic-ischemic depression of synaptic transmission in the rat hippocampus in vivo[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001, 280(3): R639-R645.
- [7] Alexander M, Smith AL, Rosenkrantz TS, et al. Therapeutic effect of caffeine treatment immediately following neonatal hypoxic-ischemic injury on spatial memory in male rats[J]. *Brain Sci*, 2013, 3(1): 177-190.
- [8] Favrais G, Tourneux P, Lopez E, et al. Impact of common treatments given in the perinatal period on the developing brain[J]. *Neonatology*, 2014, 106(3): 163-172.
- [9] Gieron-Korthals M, Colon J. Hypoxic-ischemic encephalopathy in infants: new challenges[J]. *Fetal Pediatr Pathol*, 2005, 24(2): 105-120.
- [10] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2): 131-141.
- [11] Back SA, Craig A, Luo NL, et al. Protective effects of caffeine on chronic hypoxia-induced perinatal white matter injury[J]. *Ann Neurol*, 2006, 60(6): 696-705.
- [12] Atik A, Cheong J, Harding R, et al. Impact of daily high-dose caffeine exposure on developing white matter of the immature ovine brain[J]. *Pediatr Res*, 2014, 76(1): 54-63.
- [13] Albertsson AM, Bi D, Duan L, et al. The immune response after hypoxia-ischemia in a mouse model of preterm brain injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2014, 11: 153.
- [14] 徐发林,王彩红,张彦华,等. 枸橼酸咖啡因对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后神经细胞增生和凋亡及远期学习记忆能力的影响[J]. *临床儿科杂志*, 2015, 33(4): 368-372.
- [15] Solinas M, Ferre S, Antoniou K, et al. Involvement of adenosine A1 receptors in the discriminative-stimulus effects of caffeine in rats[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2005, 179(3): 576-586.
- [16] Rivkees SA, Thevananther S, Hao H. Are A3 adenosine receptors expressed in the brain?[J]. *Neuroreport*, 2000, 11(5): 1025-1030.
- [17] Stehle JH, Rivkees SA, Lee JJ, et al. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype[J]. *Mol Endocrinol*, 1992, 6(3): 384-393.
- [18] Rivkees SA. The ontogeny of cardiac and neural A1 adenosine receptor expression in rats[J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 1995, 89(2): 202-213.
- [19] Swanson TH, Drazba JA, Rivkees SA. Adenosine A1 receptors are located predominantly on axons in the rat hippocampal formation[J]. *J Comp Neurol*, 1995, 363(4): 517-531.
- [20] Fredholm BB. Adenosine and neuroprotection[J]. *Int Rev Neurobiol*, 1997, 40: 259-280.
- [21] Turner CP, Yan H, Schwartz M, et al. A1 Adenosine receptor activation induces ventriculomegaly and white matter loss[J]. *Neuroreport*, 2002, 13(9): 1199-1204.
- [22] Cunha RA. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A (2A) receptor blockade[J]. *Purinergic Signal*, 2005, 1(2): 111-134.
- [23] Rivkees SA, Zhao Z, Porter G, et al. Influences of adenosine on the fetus and newborn[J]. *Mol Genet Metab*, 2001, 74(1-2): 160-171.
- [24] Chavez Valdez R, Ahlawat R, Wills-Karp M, et al. Correlation between serum caffeine levels and changes in cytokine profile in a cohort of preterm infants[J]. *J Pediatr*, 2011, 158(1): 57-64.
- [25] Kumral A, Yesilirmak DC, Aykan S, et al. Protective effects of methylxanthines on hypoxia-induced apoptotic neurodegeneration and long-term cognitive functions in the developing rat brain[J]. *Neonatology*, 2010, 98(2): 128-136.

(本文编辑: 万静)