

·论著·

大剂量地塞米松降低缺氧缺血性 新生大鼠脑 MCP - 1 蛋白表达

田兆方,李述庭

[摘要] 目的 研究新生大鼠缺氧缺血性脑病(HIE)时脑组织单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的表达及地塞米松对其影响。方法 25只新生大鼠分为3组:HIE模型对照组(对照组),大剂量地塞米松治疗组(大剂量组),小剂量地塞米松治疗组(小剂量组);于造模后腹腔内分别注射生理盐水10 ml/kg,地塞米松10 mg/kg及地塞米松0.5 mg/kg;24 h后处死后取脑组织,免疫组化法检查脑组织MCP-1蛋白的表达,光镜检查脑病理改变情况。结果 对照组、大剂量组、小剂量组的MCP-1蛋白,神经细胞总数及变性/坏死神经细胞数,分别为 $7.98 \pm 1.37\%$, $0.97 \pm 0.42\%$, $7.25 \pm 2.45\%$; 158.07 ± 14.48 个/6HP, 203.25 ± 10.27 个/6HP, 155.11 ± 16.61 个/6HP, 22.86 ± 3.13 个/6HP, 17.75 ± 3.45 个/6HP, 23.89 ± 4.18 个/6HP。与对照组相比,大剂量组MCP-1蛋白表达减少($P < 0.01$),神经细胞总数增加($P < 0.05$)及变性/坏死神经细胞数减少($P < 0.01$),而小剂量组改变不明显($P > 0.05$)。结论 大剂量地塞米松可能通过降低HIE脑组织中MCP-1蛋白表达对HIE脑组织损伤产生保护作用。

[关键词] 地塞米松;单核细胞趋化蛋白-1;脑;脑缺氧缺血;新生大鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2000)02-0091-04

High Dose of Dexamethasone Reduces the Expression of MCP - 1 Protein in the Brain of Neonatal Rats with Hypoxia-ischemia

TIAN Zhao-Fang, LI Shu-Ting

Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210011

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of Monocyte Chemoattractant Protein - 1 (MCP - 1) in the brain of neonatal rats subjected to hypoxia-ischemia and the influence of different doses of dexamethasone on the expression of MCP - 1 protein and neuropathology. **Methods** Using a hypoxic-ischemic neonatal rat model ($n = 25$), animals received intraperitoneal injections of normal saline (control group), and 0.5 mg/kg and 10 mg/kg of dexamethasone immediately after the hypoxic injury. All animals were killed 24 hours after hypoxia. Immunocytochemistry with a polyclonal goat anti-rat MCP-1 antibody was used to determine the expression of MCP-1 protein. Total and percentage denatured (necrotic) neurons were determined using light microscopy. **Results** In the control group, the expression of MCP-1 protein and the total number of neurocytes and denatured (necrotic) neurons were $7.98 \pm 1.37\%$, $158.07 \pm 14.48/6HP$ and $22.86 \pm 3.13/6HP$, respectively, while in the high dose group, they were $0.97 \pm 0.42\%$, $203.25 \pm 10.27/6HP$ and $17.75 \pm 3.45/6HP$, respectively. And in the low dose group, they were $7.25 \pm 2.45\%$, $155.11 \pm 16.61/6HP$ and $23.89 \pm 4.18/6HP$, respectively. Compared to the control group, the expression of MCP-1 protein was significantly decreased ($P < 0.01$), the total number of neurons increased ($P < 0.05$), and denatured (necrotic) neurons decreased ($P < 0.01$) in the high dose groups, but there were no major histopathological differences between the low dose group and the control group. **Conclusions** High dose dexamethasone treatment reduces the expression of MCP - 1 protein in the brain of neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy, and might have a neuroprotective role in this disorder.

[Key words] Dexamethasone; MCP - 1 protein; Cerebra; Hypoxia ischemia; Neonatal rat

[作者简介] 田兆方,男,1967年出生,硕士,主治医师。

[作者单位] 210011 南京,南京医科大学第二附属医院儿科(现在江苏省淮阴市第一人民医院儿科 223300)

新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)是围产期窒息所致的严重并发症。地塞米松被认为有较好抗脑缺血损伤的作用^[1]。HIE的发病机制比较复杂,近年来研究发现免疫系统涉及缺氧缺血后未成熟脑损伤的生化级联反应,小胶质细胞的激活是炎症反应的主要过程之一,在脑损伤病理过程中起重要作用。单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)是一种具有较强趋化单核细胞能力的趋化因子,同时也是代表小胶质细胞应答缺氧缺血性损伤的一个功能性重要的分子信号^[2]。本实验通过研究不同剂量地塞米松对HIE新生大鼠脑MCP-1蛋白表达的影响,探讨地塞米松在HIE脑损伤中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

25只7日龄SD大鼠,雌雄不拘,体重10~15g,购自江苏省实验动物中心。一抗为羊抗大鼠MCP-1多克隆抗体(购自Santa Cruz Biotechnology, Inc),生物素标记的兔抗羊抗体超敏试剂盒和DAB染色试剂盒购于福州迈新生物技术开发公司。

1.2 HIE模型制备

7日龄SD大鼠乙醚吸入麻醉后,切开颈部正中皮肤,分离并结扎右侧颈总动脉后,立即置于含8%氧气的密封有机玻璃箱中2h(温度 37 ± 1),再置于正常空气环境中,制成HIE模型^[3]供实验使用。

1.3 实验分组

参照姚氏方法^[1]将25只大鼠随机分为大剂量地塞米松治疗组(大剂量组, $n=9$ 只),于模型制成后立即腹腔内注射地塞米松10 mg/kg;小剂量地塞米松治疗组(小剂量组, $n=9$ 只),于模型制成后立即腹腔内注射地塞米松0.5 mg/kg;HIE对照组(对照组, $n=7$ 只),于模型制成后立即腹腔注射生理盐水10 ml/kg。所有动物均于造模后24h断头处死,取完整脑组织肉眼观察后,置于10%中性福尔马林溶液中固定48h,从视交叉处连续冠状位切取2片厚约2mm的脑组织,石蜡包埋,制成石蜡标本,每个石蜡标本连续切片2张,供免疫组化和病理学检查用。

1.4 免疫组化检查

主要步骤如下:石蜡切片经脱蜡,水化及灭活内源性过氧化物酶,微波修复抗原,1%BSA封闭非特异染色,加一抗,37℃孵育2h,加生物素标记二抗,置室温40min,再加DAB溶液,显微镜下观测反应结果,适时中止反应,苏木素复染封片。阳性结果为

细胞浆染色呈棕色;PBS代替一抗作为阴性对照,左侧作为自身对照。采用MPIAS-500多媒体彩色病理图文分析系统,20倍物镜下由计算机自动算出阳性物质的平均光密度和标准差对染色结果进行分析。

1.5 组织病理检查

组织切片采用HE染色,高倍镜($\times 400$)下随机观测每张切片右侧6个视野,计数神经细胞总数及变性/坏死神经细胞数量。取平均值作为该组动物脑组织神经细胞总数和病变神经细胞数。

1.6 统计学处理

结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较均采用样本均数的 t 检验。

2 结果

2.1 脑组织MCP-1蛋白表达水平

对照组大鼠脑组织MCP-1蛋白明显增高,大剂量组脑组织MCP-1蛋白表达水平下降,两者间统计学上差异有显著性($P < 0.01$);而小剂量组脑组织MCP-1蛋白表达水平与对照组统计学上差异无显著性($P > 0.05$)。提示早期大剂量地塞米松可抑制缺氧缺血性新生大鼠脑组织MCP-1蛋白的表达,而小剂量地塞米松则无此作用。(见附表,图1~4)

附表 地塞米松对各组MCP-1蛋白表达、神经细胞总数及病变细胞数的影响($\bar{x} \pm s$)

Table The influence of dexamethasone on the expression of MCP-1 protein, the number of neurocytes and the number of denatured/ necrosed neurocytes in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MCP-1 蛋白 (%)	神经细胞数 (个/6HP)	变性/坏死神经 细胞数(个/6HP)
对照组	7	7.98 ± 1.37	158.07 ± 14.48	22.86 ± 3.13
大剂量组	9	$0.97 \pm 0.42^{1)}$	$203.25 \pm 10.27^{2)}$	$17.75 \pm 3.45^{1)}$
小剂量组	9	7.25 ± 2.45	155.11 ± 16.61	23.89 ± 4.18

注:对照组相比,1) $P < 0.01$;2) $P < 0.05$



图1 正常脑组织中MCP-1蛋白阴性表达($\times 400$)

Fig 1. No expression of MCP-1 protein in the normal brain

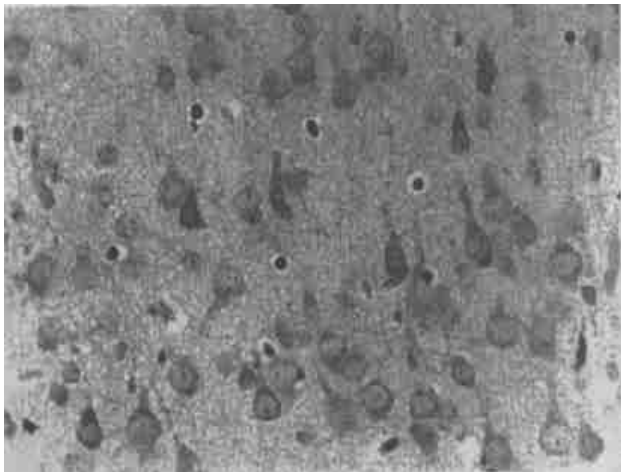


图 2 HIE 对照组脑组织 MCP - 1 蛋白表达 (HE ×400)
Fig 2. The expression of MCP - 1 protein
in the brain of the control group

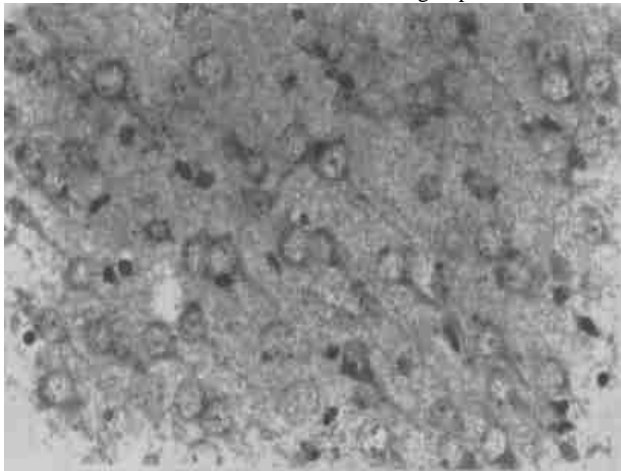


图 3 大剂量组 MCP - 1 蛋白表达明显减少 (HE ×400)
Fig 3. Low expression of MCP - 1 protein
in the brain of the high dose group

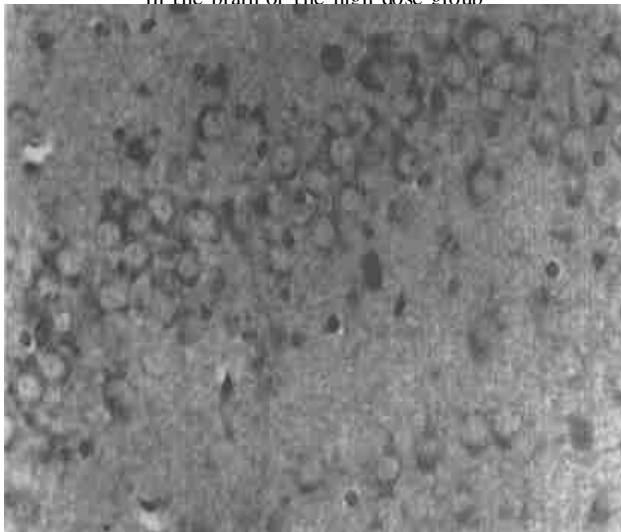


图 4 小剂量组 MCP - 1 表达情况 (×400)

Fig 4. The expression of MCP - 1 protein in the low dose group

2.2 脑组织病理改变

2.2.1 肉眼观察 对照组大鼠结扎同侧脑组织膨出,肿胀明显,软脑膜充血,蛛网膜下腔出血;结扎对侧改变不明显。而大剂量组结扎同侧与对侧脑组织差异不明显。小剂量组肉眼观察与对照组相似。

2.2.2 光镜检查 与对照组相比,大剂量组神经细胞总数增加,病变神经细胞数减少,在统计学上差异均有显著性(分别 $P < 0.05$, $P < 0.01$);而小剂量组与对照组此两指标在统计学上差异无显著性 ($P > 0.05$)见附表。证明 HIE 新生大鼠早期使用大剂量地塞米松对脑损伤具有保护作用,而小剂量地塞米松则无此作用。

3 讨论

临床上对于 HIE 时糖皮质激素的使用争议较大,反对者主要认为其可导致新生儿免疫功能特别是细胞免疫功能的下降及内分泌功能紊乱。近来研究发现地塞米松对新生大鼠胸腺的损伤作用是暂时的,可逆的^[4],短疗程糖皮质激素也不致于引起肾上腺皮质的改变^[5]。而有研究证实早期大剂量使用地塞米松可减轻脑损伤,但具体机制不明^[1]。有学者认为地塞米松在缺血性脑损伤时具有抑制脂质过氧化^[1]及提高谷氨酸转运功能^[6]等作用。

近年来研究认为,脑缺血的病理生理机制是损伤级联反应。它主要包括兴奋性损伤,梗死周围去极化,炎症反应,凋亡等主要内容^[7]。炎症反应在缺血性脑损伤的作用逐渐被认识。脑缺血时炎症反应主要表现为小胶质细胞的活化及白细胞在损伤部位积聚。MCP - 1 作为一种具有极强趋化单核细胞作用的趋化因子,在新生大鼠正常脑组织中无 MCP - 1 mRNA 和蛋白表达,其表达增加与缺氧缺血脑组织损伤部位单核细胞集聚和神经胶质细胞活化有关,活化的神经胶质细胞可产生大量的神经毒性因子,导致神经细胞的变性和坏死^[2]。已有报道证实 HIE 时损伤部位脑组织中 MCP - 1 蛋白表达增加^[3]。并有报道大剂量的甲基强的松龙可降低缺血部位脑组织中 MCP - 1 mRNA 的表达^[8]。本组研究发现 HIE 后早期大剂量地塞米松对脑损伤具保护作用,且缺血部位脑组织 MCP - 1 蛋白表达明显降低;而 HIE 后小剂量地塞米松对脑损伤无保护作用。因而推测大剂量地塞米松的保护作用可能与通过抑制缺氧缺血部位脑组织中 MCP - 1 蛋白表达,进而减少小胶质细胞活化和单核巨噬细胞在损伤部

位积聚等有关。因此地塞米松可能通过抑制缺血性脑损伤生化级联反应中的多个环节产生保护作用。有关地塞米松对 HIE 治疗中的作用机制,有待进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] 姚裕家,李炜如,李念,等. 地塞米松在新生猪缺氧缺血性脑损伤中的防治作用[J]. 中华儿科杂志, 1994, 32(4): 201~202.
- [2] Ivacko J, Szaflarski J, Malinak C. et al; Hypoxic-ischemic injury induces monocyte chemoattractant-1 expression in neonatal rat brain[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1997, 17(7): 759~770.
- [3] 吴婉芳,徐放生,张莉莉,等. 建立新生儿缺氧缺血性脑病动物模型[J]. 新生儿科杂志, 1992, 7(5): 265~267.
- [4] 周伟,吴圣楣,陈惠金,等. 地塞米松对幼大鼠胸腺作用的动态

观察[J]. 临床儿科杂志, 1999, 17(3): 178~179.

- [5] 周密,姚裕家,李炜如,等. 新生猪缺氧缺血脑损伤时地塞米松对肾上腺皮质功能的影响[J]. 中华围产医学杂志, 1999, 2(3): 181~183.
- [6] 任晓燕,曲忠森,葛宝林,等. 大鼠脑缺血一再灌注损伤时脑组织谷氨酸转运功能变化及地塞米松的影响[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(10): 865~867.
- [7] 廖维清, Frank Wiegand Ulrich Dirnagl 综述. 脑缺血损伤的病理生理机制——损伤级联反应[J]. 国外医学脑血管疾病分册, 1998, 6(4): 197~200.
- [8] Kim JS, Chopp M, Gautam SC. High dose methylprednisolone therapy reduces expression of JE/MCP-1 mRNA and macrophage accumulation in the ischemic rat brain[J]. J Neurol Sci, 1995, 128(1): 28~355.

(收稿日期:1999-09-27 修回日期:2000-02-01)

(本文编辑:吉耕中)

病例报告 ·

新生儿半椎体畸形及蝶形椎体畸形 1 例

邓红,袁宇红

[中图分类号] R726.2 [文献标识码] E

患儿,女性。因其母孕 40⁺₃周 G₁P₀,头位临产,骨盆狭小,先兆子宫破裂,行剖宫术娩出。生后评分 10 分,心肺听诊无异常,外观正常。由于入院时行 B 超检查示胎儿脊柱中段上方连续性中断、较窄,考虑轻度脊柱裂可能,故在生后 2 h 给予摄脊柱正侧位片。在正位片上可明确看到第 9 胸椎为半椎体畸形,第 8 胸椎以上至第 1 胸椎呈蝶形畸形。患儿父母及家庭中无遗传病及家庭病史。母亲在怀孕期间无服药史及疾病史。

半椎体畸形是胚胎期间第 6 体节发育不良所致,两侧椎体生成棘突时,棘突发生不全或髓核移行异常造成。蝶形椎体是因椎体的两个化骨中心未联合造成。而脊柱裂指先天性神经弓的椎板愈合不全发生的裂隙。小儿脊柱 X 线片上的 1/4 可见脊柱裂。在胎儿期先天畸形当中,脊柱裂声像图特征明显。半椎体及蝶形椎体畸形在早期往往不容易发现。待患儿长大行走之后出现临床症状,如脊柱侧弯时才发现。



附图 新生儿半椎体畸形及蝶形椎体畸形

(收稿日期:1999-12-21 修回日期:2000-02-01)

(本文编辑:吉耕中)

[作者简介] 邓红,男,1966 年出生,大学本科,主治医师。

[作者单位] 336600 江西分宜县人民医院儿科