

·论著·

神经生长因子减轻新生大鼠 缺氧缺血性脑损伤的研究

王来栓¹, 朱长连¹, 程秀永¹, 王小阳¹, 杨静丽¹, 温洪涛², 朱洪³, 周元聪³

(1. 河南医科大学第三附属医院儿内科, 河南 * 郑州 450052; 2. 河南医科大学药理学教研室, 河南 * 郑州 450052; 3. 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)减轻新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)的作用及其机制。方法 将 NGF 以 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.3 $\mu\text{g/kg}$ 两个剂量组用于新生大鼠 HIBD 模型, 采用干湿比重法、原子吸收光谱法和高效液相色谱电化学法检测缺氧缺血后脑组织含水量、脑组织钙含量和单胺类神经递质含量变化。结果 新生大鼠缺氧缺血组结扎侧脑组织平均含水量、组织钙含量及单胺类神经递质(除 DOPAC 外)含量较结扎对侧和/或正常对照组明显增高, 含水量: (91.14 $\pm$ 2.21) % vs (82.99 $\pm$ 6.53) % ($P < 0.05$), (91.44 $\pm$ 2.21) % vs (87.22 $\pm$ 1.13) % ($P < 0.05$), 钙含量: (255.24 $\pm$ 122.6) $\mu\text{mol/g}$ 干重 vs (44.12 $\pm$ 13.54) $\mu\text{mol/g}$ 干重 ($P < 0.01$), (255.24 $\pm$ 122.6) $\mu\text{mol/g}$ 干重 vs (42.68 $\pm$ 4.35) $\mu\text{mol/g}$ 干重 ($P < 0.05$), NGF 干预后, 结扎侧脑组织含水量、组织钙含量及单胺类神经递质(除 DOPAC 外)含量均明显下降, 与 HIBD 组结扎侧相比有显著性差异, 与正常对照组相比无显著性差异。0.1 μg NGF 组, 含水量: (86.86 $\pm$ 0.86) % vs (91.14 $\pm$ 2.21) % ($P < 0.05$), 钙含量: (44.34 $\pm$ 3.10) $\mu\text{mol/g}$ 干重 vs (255.24 $\pm$ 122.6) $\mu\text{mol/g}$ 干重 ($P < 0.01$)。0.3 μg NGF 组, 含水量: (87.45 $\pm$ 0.37) % vs (91.14 $\pm$ 2.21) % ($P < 0.05$), 钙含量: (42.03 $\pm$ 14.99) $\mu\text{mol/g}$ 干重 vs (255.24 $\pm$ 122.6) $\mu\text{mol/g}$ 干重 ($P < 0.01$)。结论 NGF 可以降低钙超载, 减轻脑水肿, 减弱或抑制单胺类神经递质等从而有可能减轻 HIBD。

[关键词] 神经生长因子; 钙; 神经递质/单胺类; 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(2001)03-0253-04

Ameliorative Effect of the Nerve Growth Factor on Newborn Rats with Hypoxic-Ischemic Brain Damage

WANG Lai-Shuan, ZHU Chang-Lian, CHENG Xiur Yong, et al.

Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital, Henan Medical University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of ameliorative effects of the nerve growth factor (NGF) on newborn rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** NGF dosage (0.1 $\mu\text{g/kg}$ and 0.3 $\mu\text{g/kg}$) was administrated intraperitoneally to the rat pups 30 minutes before and immediately following the hypoxic exposure. The percentage of brain water content was determined according to the formula: (wet weight-dry weight)/wet weight $\times 100$ = % water content. Brain tissue calcium concentration was measured with atomic absorption spectroscopy. Monoamine neurotransmitter concentration in the rat brain was measured using high performance liquid chromatography with electrochemical detector (HPLC-ECD). **Results** Brain water content, calcium concentration and monoamine neurotransmitters (except DOPAC) concentration increased significantly after hypoxic-ischemic insult in the ipsilateral hemisphere of the HIBD group compared with the contralateral hemisphere and/or control group: water contents = (91.44 $\pm$ 2.21) % vs (82.99 $\pm$ 6.53) % ($P < 0.05$) and (91.44 $\pm$ 2.21) % vs (87.22 $\pm$ 1.13) % ($P < 0.05$) respectively; calcium concentration = (255.24 $\pm$ 122.6) $\mu\text{mol/g}$ dry weight vs (44.12 $\pm$ 13.54) $\mu\text{mol/g}$ dry weight (P

[收稿日期] 2000-07-16; [修回日期] 2000-10-16

[基金项目] 河南省科委科技攻关项目(971200718)

[作者简介] 王来栓(1974-),男,硕士,住院医师。

< 0.01) and $(255.24 \pm 122.6) \mu\text{mol/g dry weight}$ vs $(42.68 \pm 4.35) \mu\text{mol/g dry weight}$ ($P < 0.01$), respectively. There were significant decreases in water content, calcium concentration and monoamine neurotransmitters (except DOPAC) concentration in the $0.1 \mu\text{g/kg}$ and $0.3 \mu\text{g/kg}$ NGF-treated HIBD group (compared with untreated HIBD group): water contents = $(86.86 \pm 0.86) \%$ and $(87.45 \pm 0.3) \%$, respectively; calcium concentration = $(44.34 \pm 3.10) \mu\text{mol/g dry weight}$ and $(42.03 \pm 14.99) \mu\text{mol/g dry weight}$, respectively. No difference was found between the NGF group and control group. **Conclusions** Water content, calcium concentration and monoamine neurotransmitters may be involved, alone or interactively, in the pathophysiologic process of HIBD. NGF has ameliorative effects on newborn rats with HIBD, possibly through maintaining calcium homeostasis, ameliorating brain edema and attenuating or inhibiting the neurotoxic effects of monoamine neurotransmitters.

Key words: NGF; Calcium; Neurotransmitters/ Monoamine; Hypoxic/ Ischemic; Rat/ Newborn

新生儿缺氧缺血性脑病 (Hypoxia-ischemia encephalopathy, HIE) 是严重威胁新生儿生命和健康的疾病之一,具有很高的病死率和致残率,该病的发病机制还未完全明了,也缺乏公认的特效治疗措施。探讨 HIE 的发病机制、寻求有效的防治措施一直是围产医学领域的研究重点。神经生长因子 (Nerve growth factor, NGF) 是具有多方面生物学作用的神经活性多肽,对神经细胞的存活、生长和分化及受损神经元的修复起着重要的调节作用。本研究采用新生大鼠缺氧缺血性脑损伤 (Hypoxia-ischemia brain damage, HIBD) 模型,探讨 NGF 干预对 HIBD 的作用及其机制,为临床应用 NGF 治疗 HIE 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象与分组

Wistar 7 日龄新生大鼠购自河南医科大学实验动物中心,体重 $12 \sim 18 \text{ g}$,性别不拘,共 59 只,随机分为 HIBD 组 (15 只),NGF 小剂量干预组 (15 只),NGF 大剂量干预组 (15 只) 及正常对照组 (14 只) 4 组。

1.2 新生大鼠 HIBD 模型制作^[1]

7 日龄新生大鼠经标号称重,乙醚吸入麻醉后置于手术板上,仰卧固定头部及四肢,消毒后切开颈部左侧皮肤,分离皮下组织及颈部肌肉组织于动脉搏动最明显处暴露左侧颈总动脉,丝线结扎,缝合皮肤切口,1 h 后置于预热的 37°C 缺氧瓶中吸入 $8\% \text{ O}_2$ 和 $92\% \text{ N}_2$ 的混合气体 2 h。正常对照组 (假结扎组) 仅分离出左侧颈总动脉,不结扎亦不缺氧。

1.3 给药方法及药物来源

NGF 干预组于手术前 30 min 和缺氧结束后即刻分 2 次给予腹腔注射药物,以后再用药 2 次,间隔 12 h。药物剂量:NGF 小剂量干预组 $0.1 \mu\text{g/kg}$,NGF 大剂量干预组 $0.3 \mu\text{g/kg}$ 。NGF 系从江浙蝮蛇毒中提取,由中国科学院上海生化所提供。

1.4 实验方法

1.4.1 脑组织含水量及钙含量的测定 脑组织含水量及钙含量的测定用同 1 份标本,各组试验动物均于缺氧缺血后 44 h 断头处死,在冰盘上快速取脑,除去嗅脑,小脑和脑干,沿大脑纵裂分为左、右大脑半球,用万分之一光电分析天平分别精确称重并记录,然后置于 100°C 烤箱中 $5 \sim 6 \text{ h}$,烤至恒重后再依次称重,算出脑组织的湿重、干重,用 $(\text{湿重} - \text{干重}) \div \text{湿重} \times 100\%$ 来表示脑组织含水量。采用浓硝酸湿法消化脑组织干样过夜,第二天取出在电热板上 (450°C) 蒸发至干 (消除高氯酸对钙的影响),样品成白色粉末状,然后吸取 1 N 盐酸 2 ml 沿坩锅盖及壁加入各个坩锅中,静置 2 h,加盐酸定容至刻度,用原子吸收光谱法测定脑组织钙含量。

1.4.2 单胺类神经递质测定^[2] HIBD 后 44 h 分组处死动物,分离大脑左侧皮层及海马,加 0.1 M 的高氯酸,在小玻璃乳钵内研磨均匀,制成脑组织匀浆, $14\,000 \text{ rpm}$ 高速冷冻离心后取上清 $20 \mu\text{l}$ 直接进样,用高效液相色谱电化学检测法检测脑组织中单胺类递质含量。

1.5 统计学处理

数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据均应用 SAS 统计软件处理,结扎侧与结扎对侧比较采用配对 t 检验或 t 检验,多组均数比较用单因素方差分析 (one-way ANOVA),组间两两比较用 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 新生大鼠 HIBD 时脑内含水量、钙离子含量变化及 NGF 的影响

脑组织含水量测定结果显示,缺氧缺血后 44 h, HIBD 组大鼠结扎侧脑组织含水量明显增加,与结扎对侧相比存在明显差异,与正常对照组及 NGF 大、小剂量干预组相比,差异有显著性。NGF 小剂

量干预组、NGF 大剂量干预组及正常对照组间脑组织含水量无明显差异;钙离子含量在 HIBD 组结扎侧有显著增加,与对侧相比差异非常显著,与正常对照组、NGF 小剂量干预组、NGF 大剂量干预组相比亦有显著意义。其它各组间未见明显差异(见表 1)。

2.2 新生大鼠 HIBD 时脑组织中单胺类神经递质含量的变化及 NGF 的影响

本研究测定的脑组织中单胺类神经递质包括去甲肾上腺素 (noradrenaline, NA),多巴胺 (dopamine, DA),5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine,

5-HT),5-羟吲哚乙酸 (5-hydroxyindole-3-acetic acid, 5-HIAA),3,4-二羟基本乙酸 (3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC) 和高香草酸 (homovanillic acid, HVA);测定结果显示,HIBD 后 44 h,HIBD 组大鼠脑内的单胺类神经递质代谢发生紊乱,结扎侧脑内的单胺类神经递质含量均明显增高(除外 DOPAC),与对照组及小剂量 NGF 干预组、大剂量 NGF 干预组结扎侧比较,具有显著性差异。而在 NGF 干预组,无论是小剂量还是大剂量,差异无显著性意义(见表 2)。

表 1 NGF 干预对 HIBD 时脑组织含水量及钙含量的影响
Table 1 Effect of NGF on the brain water content and calcium concentration following HIBD ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	含水量 (%)		t	钙含量(μmol/g 干重)		t
		左	右		左	右	
对照组	9	87.22 ±1.13 ^c	87.46 ±0.79	0.42	42.68 ±4.35 ^d	44.93 ±3.94	0.93
HIBD 组	10	91.14 ±2.21 ^a	82.99 ±6.53	3.74	255.24 ±122.6 ^b	44.12 ±13.54	5.93
NGF 小剂量干预组	10	86.86 ±0.86 ^c	87.25 ±0.89	1.04	44.34 ±3.10 ^d	45.45 ±1.00	0.90
NGF 大剂量干预组	10	87.45 ±0.37 ^c	87.28 ±0.21	0.83	42.03 ±14.99 ^d	44.61 ±3.90	1.27
F 值		6.10			20.64		

注:与结扎对侧(右侧)及对照组比较,a * " P < 0.05,b * " P < 0.01; 与 HIBD 组比较,c * " P < 0.05,d * " P < 0.01

表 2 新生大鼠 HIBD 时脑内单胺类递质含量变化及 NGF 的影响(mg/g 湿重,n = 5)
Table 2 Effect of NGF on the monoamine neurotransmitters following HIBD of newborn rats ($\bar{x} \pm s$)

分组	NE	DOPAC	DA	5-HIAA	HVA	5-HT
对照组	290.4 ±51.3 ^a	709.5 ±64.9	211.9 ±24.0 ^a	2705.3 ±715.0 ^a	758.4 ±92.6 ^a	150.2 ±59.0 ^a
HIBD 组	384.6 ±57.1	842.6 ±116.0	596.7 ±139.0	4705.3 ±386.0	1655.3 ±300.2	302.9 ±60.0
NGF 小剂量干预组	262.3 ±13.2 ^a	751.3 ±251.0	366.4 ±120.0 ^a	2773.9 ±279.0 ^a	944.7 ±241.0 ^a	293.9 ±81.2 ^a
NGF 大剂量干预组	187.8 ±49.4 ^a	614.4 ±142.0	304.4 ±40.0 ^a	2398.7 ±143.0 ^a	709.8 ±140.0 ^a	250.3 ±32.1 ^a
F 值	19.40	1.78	20.89	7.91	21.67	22.47

注:a 与 HIBD 组比较 P < 0.01

3 讨论

研究已发现,缺氧缺血早期即可出现脑细胞水肿,24 h 时就可出现明显的脑水肿,包括脑组织水肿和脑细胞水肿。前者是由于缺氧缺血导致毛细血管的通透性增加,大量水份透过毛细血管进入组织间隙引起。后者的形成包括 3 个方面:一是能量代谢衰竭(ATP 泵衰竭)使水的转运障碍,大量水份随着 Na⁺ 进入细胞内;二是缺氧缺血时,脑内兴奋性氨

基酸大量增加,过度激活非 NMDA 受体造成 Na⁺ 内流,Cl⁻ 和 H₂O 亦被动进入引起细胞水肿;三是各种体液因子如 β-内啡肽,内皮素 以及肾素-血管紧张素-醛固酮系统的激活,ADH 分泌释放增加,醛固酮分泌增加等都促使脑水肿的发生发展。缺氧缺血时钙稳态破坏,引起细胞浆及线粒体的钙超载,钙超载时,钙离子作为第二信使激活蛋白酶、磷脂酶、核酸酶,导致细胞骨架溶解破坏,自由基生成增多,以及神经突触传导障碍,激活程序性细胞死亡途径而使细胞发生凋亡,钙超载是细胞死亡的最后

通路^[3]。

本研究发现,HIBD 急性期脑水肿明显,组织钙含量亦明显增加,说明 HIBD 时期存在钙离子和水代谢的紊乱,与临床报道相符,同时说明钙超载,脑水肿在 HIBD 的原发性或继发性损害的病程进展中起着非常重要的作用。早期应用干预措施,预防或减少钙紊乱的发生,维持钙代谢的平衡显得尤为重要。

NGF 子是中枢神经系统最早发现的也是最主要的神经营养因子,它通过与效应细胞上的受体 tr K 结合,能诱导神经纤维定向生长,控制神经细胞存活数量和分化,促进受损神经细胞的修复,参与神经细胞的凋亡过程,但 NGF 减轻新生大鼠缺氧缺血性脑水肿、降低钙超载的作用罕见报道。本研究证实 NGF 确有减轻脑水肿,降低钙超载的作用。其减轻脑水肿的机制还不十分清楚,有报道 NGF 可维持钙稳态,其机制是诱导钙结合蛋白如 28kDa calbindin 的表达,影响钙通道与钙排出系统的表达与活化,从而促进 Ca^{2+} 的排出和(或)缓冲细胞内 Ca^{2+} 浓度的上升,以及减少 Ca^{2+} 的内流,维持或改善线粒体功能,从而降低细胞内 Ca^{2+} ,保护细胞功能^[4,5]。

中枢性单胺类递质包括儿茶酚胺类(Catecholamine CA),5-羟色胺(5-HT)和组胺。缺氧缺血时,单胺类神经递质的生成、代谢发生紊乱,引起兴奋性毒性作用。本研究表明,HIBD 时脑组织中单胺类神经递质代谢紊乱,与文献报道结果基本一致^[6,7],进一步表明了单胺类神经递质在 HIBD 中起重要作用,本研究也证实在单胺类神经递质增高的同时,脑组织中含水量及钙离子含量亦显著增加,推测单胺类神经递质和钙离子协同作用,共同促进 HIBD 的病情发展。有报道外源性 NGF 可以提高

自由基清除剂的活力,拮抗兴奋性氨基酸、单胺类神经递质的毒性^[8]从多方面显示了其对受损神经元的保护作用。本研究也证实 NGF 可以减轻新生大鼠 HIBD,其机制可能与减轻脑水肿、稳定钙平衡和减弱单胺类神经递质的兴奋毒性作用有关。

[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(1): 131 - 141.
- [2] 屈志伟,刘云,张均田. 用高效液相色谱电化学检测器测定小鼠脑内单胺类物质的研究 [J]. *中国医学科学院学报*, 1987, 9(5): 371 - 374.
- [3] Harkness RA, Diamond G, Valore EV, et al. Is post hypoxic-ischemic cell damage associated with excessive ATP consumption rather than a failure of ATP production? [J] *Acta Pediatr*, 1997, 86(1): 1 - 5.
- [4] Mattson MP, Cheng B, Burke RE, et al. Growth factors protect neurons against excitotoxic/ischemic damage by stabilizing calcium homeostasis [J]. *Stroke*, 1993, 24(12 Suppl): 136 - 140.
- [5] Mattson MP, Zhang Y, Bose S, et al. Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis, and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons deprived of glucose [J]. *Exp Neurol*, 1993, 121(1): 1 - 13.
- [6] Johnston MV. Neurotransmitter alterations in a model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Ann Neurol*, 1983, 13(5): 511 - 518.
- [7] Silverstein F, Johnston MV. Effects of hypoxia on monoamine metabolism in the immature brain [J]. *Ann Neurol*, 1984, 15(3): 342 - 347.
- [8] Cheng B, Mattson MP, Burke RE, et al. NT-3 and BDNF protects CNS neurons against metabolic-excitotoxic insults [J]. *Brain Res*, 1994, 640(1): 56 - 67.

(本文编辑:曹励之)