

·论著·

神经节苷脂治疗新生大鼠 缺血缺氧性脑损伤的研究

张桂林, 傅万海

(第一军医大学附属珠江医院儿科, 广东 广州 510282)

[摘要] 目的 观察神经节苷脂(GM1)对缺氧缺血(HI)新生大鼠的治疗作用及对凋亡相关基因 Bax/Bcl-2 表达的影响。方法 应用生后第7天的SD大鼠,制备缺血缺氧性脑病(HIE)模型。用TUNEL法检测细胞凋亡,用免疫组织化学SABC法检测 Bax/Bcl-2 的表达。结果 新生大鼠 HI 后脑细胞存在凋亡。GM1 治疗能减少细胞凋亡。治疗组皮质凋亡细胞数为 55.75 ± 6.71 , 较 HI 组 75.25 ± 4.94 下降 ($P < 0.01$); 治疗组海马凋亡细胞数较对照组也有下降 (47.25 ± 6.6 vs 32.14 ± 4.88), $P < 0.01$ 。各组 Bax 和 Bcl-2 表达皆为阳性,但在 HI 对照组, Bax 表达更强,而 Bcl-2 表达较弱。结论 应用 GM1 治疗 HI 脑损伤可减少脑细胞凋亡, GM1 治疗对凋亡相关基因 Bax/Bcl-2 表达有一定的影响, HI 脑损伤后细胞凋亡可能与这两种基因相关。

[关键词] 缺氧缺血; 细胞凋亡; 神经节苷脂; 新生大鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)05-0522-03

Effect of Gangliosides in the Treatment of Hypoxic-Ischemic Brain Damage in Neonatal Rats

ZHANG Gui-Lin, FU Wan-Hai

Department of Pediatrics, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of gangliosides (GM1) on the apoptosis and expression of Bax and Bcl-2, two genes involved in apoptosis. **Methods** An HIE model was produced in 7-day-old Sprague-Dawley (SD) rats by unilateral carotid artery ligation followed by hypoxic insult (8% oxygen) for 2.5 hours. Six of these HIE rats were treated promptly with GM1 (30 mg/kg daily for 3 days) and 6 were not given any treatment as the controls. Apoptosis was examined using terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL) staining and the expression of Bax and Bcl-2 was detected by the immunohistochemical strepto-avidin-biotin peroxidase complex (SABC) method in all neonatal rats. **Results** Apoptosis was noted in the cerebral neurons of the neonatal rats after HI injuries. Apoptosis secondary to HI could be eliminated with prompt treatment with GM1 after the HI insult. The number of apoptotic cells in the cortex and hippocampus decreased from 75.25 ± 4.94 and 47.25 ± 6.6 to 55.75 ± 6.71 and 32.14 ± 4.88 respectively ($P < 0.01$). Bax and Bcl-2 were expressed in all neonatal rats. Bax was expressed to a greater extent and Bcl-2 to a lesser extent in HIE neonatal rats compared with neonatal rats with prompt treatment with GM1 ($P < 0.05$). **Conclusions** Prompt treatment with GM1 after HI injuries in neonatal rats results in decreased neuronal apoptosis. GM1 could partly affect the expression of Bax and Bcl-2. The results suggest that neonatal neuronal apoptosis after HI injuries may be related to changes in the expression of these two genes.

Key words: Hypoxic-ischemic; Apoptosis; Gangliosides; Neonatal, rat

新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)是新生儿窒息后的严重并发症,病情重,病死率高,并可产生永久性

的神经功能障碍。近年来,随着产科技术的发展, NICU 的建立,许多窒息患儿可以存活,但部分患儿

存在严重的运动障碍和智力低下,给家庭带来严重的精神和经济负担。早期应用药物或其他干预措施改善脑功能,可望改善患儿的预后。神经节苷脂(gangliosides, GM1)在神经系统损伤中目前应用较多,研究发现外源性 GM1 可透过血脑屏障,嵌入到神经细胞结构,调节膜介导的细胞功能,刺激中枢神经系统损伤后替代的潜在机制,阻止损害发展,保护未受损的神经组织,达到有效的治疗作用。本实验观察 GM1 对新生大鼠缺氧缺血(HI)脑损伤后脑细胞的凋亡的影响,为 GM1 应用于临床治疗新生儿 HIE 提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

生后第 7 天的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,体重 12 ~ 14 g,由第一军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要药品试剂

GM1 由巴西 GRT 药厂提供;原位细胞凋亡检测试剂盒由德国 Boehringer Mannheim 公司供应;Bax 兔抗鼠多抗、Bcl-2 兔抗鼠多抗、SABC 免疫组化染色试剂盒均由武汉博士德生物工程有限公司供应。

1.3 实验方法

1.3.1 新生大鼠 HIE 模型的制作 生后第 7 天的 SD 大鼠,乙醚麻醉后,取仰卧位,四肢固定于手术板上,取颈正中切口,游离右侧颈总动脉,用 6-0 丝线结扎,缝合切口,整个手术过程 < 6 min。手术后的新生大鼠在母鼠身边恢复 2 ~ 4 h 后,将其置于 2 000 ml 密闭容器中,该容器置于 37 ℃ 水浴箱,以 2 ml/min 的速度输入 8 % O₂ 92 % N₂ 的混合气体,持续 2.5 h。

1.3.2 实验分组 新生第 7 天大鼠分 GM1 治疗组、HI 对照组及正常组对照,各组 6 只,共 18 只。治疗组在 HI 模型制成后立即及 2 d 以后同一时间予 GM1 (30 mg/kg) 腹腔注射,共 3 d; HI 对照组在相同的时间给予腹腔注射生理盐水;正常组不作任何处理,在与实验组相同日龄处理取材。

1.3.3 原位组织学观察 标本处理:4 % 多聚甲醛灌注固定后取脑组织,后固定,经梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡,包埋,6 μm 石蜡切片。

TUNEL 法检测细胞凋亡:操作程序按原位细胞凋亡检测试剂盒说明书进行。阳性对照加 TUNEL 反应液前用核酸酶 (10 μg/ml) 室温下 10 min 诱导 DNA 片段,阴性对照所加的 TUNEL 反应液中不含末端转移酶。免疫组化 SABC 法检测 Bax/Bcl-2 表达:操作程序按 SABC 免疫组化染色试

剂盒说明书进行,阳性对照采用所购之阳性对照片,阴性对照操作中省略加一抗的步骤。

1.3.4 观察指标 TUNEL 法检测比较 3 组细胞凋亡情况,每只大鼠取 6 个视野、高倍视野下用测微网计数 1.0 mm TUNEL 阳性细胞数。Bax/Bcl-2 免疫组化半定量标准:阴性 (-):无表达;弱阳性 (+):在若干细胞内表达,阳性细胞占整个视野的 0 ~ 25 %,着色浅;阳性 (++) :阳性细胞占整个视野的 25 ~ 50 %,着色强度中等;强阳性 (+++) ~ (++++) :++++ 阳性细胞着色深占整个视野的 50 % 以上,++++ 几乎满视野细胞皆深染阳性表达。

1.4 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本均数比较用方差分析。

2 结果

2.1 TUNEL 法检测细胞凋亡的变化

TUNEL 法显示新生大鼠 HI 组皮质和海马凋亡细胞较对照组明显增多 ($P < 0.01$), GM1 治疗组皮质及海马凋亡细胞较 HI 对照组少,但较正常新生大鼠多,差异有显著性 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 皮质和海马的凋亡细胞数
Table 1 Number of apoptotic cells in cortex and hippocampus
($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	皮质(个)	海马(个)
正常对照组	4.00 ± 2.07	3.33 ± 1.87
HI 对照组	75.25 ± 4.94 ^a	47.25 ± 6.6 ^a
GM1 治疗组	55.75 ± 6.71 ^{a,b}	32.14 ± 4.88 ^{a,b}

注: a 与正常对照组比较 $P < 0.01$; b 与 HI 对照组比较 $P < 0.01$

2.2 Bax, Bcl-2 免疫组化

GM1 治疗组、HI 对照组及正常对照组均观察到 Bax, Bcl-2 均呈阳性表达,阳性细胞呈层状排列。HI 对照组 Bax 表达强于正常对照组,而 Bcl-2 则弱于正常对照组; GM1 治疗组 Bax 表达较 HI 组减弱,而 Bcl-2 表达则较 HI 增强。见表 2。

表 2 Bax 和 Bcl-2 在不同组的表达
Table 2 Expression of Bax and Bcl-2

组别	例数	Bax	Bcl-2
正常对照组	6	+++	+++
HI 对照组	6	++++	++
GM1 治疗组	6	+++	+++

3 讨论

新生儿缺氧缺血性脑病是新生儿窒息后的严重并发症,病情重,病死率高,并可产生永久性的神经功能障碍^[1]。HI脑损伤是一个不断进展的过程,脑HI后可引起细胞生化活动改变、细胞内能量不足和酸中毒、谷氨酸、NO、炎性细胞因子、自由基、 Ca^{2+} 蓄积、脂质过氧化等导致细胞结构破坏而死亡^[2]。

HI复苏后的一段时间为治疗窗口期,在这段时间干预治疗可有效地减轻脑损害的严重程度。人们一直寻找有效的治疗方法来阻止或减轻HIE后的远期损害^[3,4,5]。近年来,神经节苷脂GM1在神经系统损伤中应用较多。本实验观察新生大鼠HI脑损伤后脑细胞凋亡的情况,以及GM1治疗对脑细胞凋亡的影响。我们前期的实验证实,HI损伤后,新生大鼠脑细胞凋亡在48~72 h达到高峰,故取HI后3 d时间点比较正常对照组、HI对照组及GM1治疗组脑细胞凋亡情况。结果表明,GM1治疗组皮质及海马TUNEL染色阳性细胞较HI对照组少,但较正常新生大鼠多,GM1对神经细胞凋亡有确切的抑制作用。

GM1抑制HI后细胞凋亡的机制可能与以下几个方面有关:GM1对过度兴奋的兴奋性氨基酸(excitatory amino acid, EAA)受体有抑制作用,GM1可进入中枢神经系统保护其免受过度激活的EAA介导的神经毒作用,减轻HIE后继发的行为障碍^[4]。GM1能够增加缺氧缺血组织对氧自由基的清除能力,对细胞膜结构有一定的保护作用^[5]。GM1可加强营养因子对神经细胞的作用,GM1本身还有神经营养作用。新生儿神经组织特别是脑组织还不成熟,正处于生长发育的活跃期,有着较强的潜在修复能力。GM1可加强营养因子对神经细胞的作用,促进神经再生,减少病灶周围细胞死亡。本实验发现新生大鼠HI后应用GM1能减轻脑细胞凋亡,但与正常对照组比较,脑细胞凋亡依然明显,说明其治疗

作用有限。

细胞凋亡在神经发育、维持及神经退变性疾病中起着重要作用,Bcl-2家族对细胞凋亡起着调节作用,Bcl-2是细胞凋亡的重要抑制基因,而Bax则是重要的促凋亡基因,Bcl-2/Bax组成一个平衡体系,他们表达的蛋白在体内共同调节细胞的凋亡^[6,7]。本实验发现,新生SD大鼠,GM1治疗组、HI对照组及正常对照组均观察到Bax,Bcl-2呈阳性表达,阳性细胞呈层状排列。说明GM1治疗能在一定程度上影响Bcl-2/Bax的表达,至于所有实验组皆阳性表达,则考虑与幼龄期动物神经细胞正常发育有关。以这两种基因的表达情况来作为损伤、治疗的观察指标意义有限。

[参 考 文 献]

- [1] Younkun DP. Hypoxic-ischemic brain injury of the newborn: statement of the problem and overview [J]. Br Pathol, 1992, 2(3): 209 - 210.
- [2] Saito K, Packianathan S, Longo LD. Free-induced elevation of ornithine decarboxylase activity in developing rat brain slices [J]. Brain Res, 1997, 763(2): 232 - 238.
- [3] Saugstad OD. Role of xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia: reoxygenation injury [J]. Pediatrics, 1996, 98(1): 103 - 107.
- [4] Lipartiti M, Lazzaro A, Zanoni R, et al. Monosialoganglioside GM1 reduces NMDA neurotoxicity in neonatal rat brain [J]. Exp Neurol, 1991, 113(3): 301 - 305.
- [5] Mahadik SP, Makar TK, Murthy JN, et al. Temporal changes in superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase levels in primary and perischemic tissue. Monosialoganglioside (GM1) treatment effects [J]. Mol Chem Neuropathol, 1993, 18(1-2): 1 - 14.
- [6] Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene [J]. Cell, 1995, 80(2): 293 - 299.
- [7] Yang E, Zha J, Jockel J, et al. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death [J]. Cell, 1995, 80(2): 285 - 291.

(本文编辑:俞燕)