

论著·实验研究

1400W 对脂多糖诱导少突胶质细胞前体死亡通路的阻断研究

何亚芳 陈惠金 钱龙华 陈冠仪

(上海交通大学医学院附属新华医院,上海市儿科医学研究所,上海 200092)

[摘要] **目的** 建立细菌脂多糖(LPS)诱导的2日龄感染型脑室周围白质软化(PVL)新生大鼠动物模型,探讨iNOS抑制剂1400W对LPS诱导脑白质少突胶质细胞(OL)前体死亡的体内阻断效果。**方法** 2日龄新生大鼠随机分为假手术组、PVL组、1400W-即刻组、1400W-8h组、1400W-16h组以及1400W-24h组,分别在LPS注射后即刻、8h、16h以及24h经皮下注射1400W 20 mg/kg。于造模后第5天处死取脑,分别进行光镜下脑白质病理评估、硝酸还原法检测一氧化氮(NO)含量、Western blot法检测诱生型一氧化氮合酶(iNOS)表达量、免疫组织化学染色检测过氧亚硝酸盐(ONOO⁻)含量以及OL前体数量。**结果** LPS诱导可引起新生大鼠脑白质明显损伤,脑内iNOS表达明显上调,NO和ONOO⁻含量显著增加,脑白质内少突胶质细胞前体标记物(O4)标记的OL前体显著减少。与PVL组比较,1400W-即刻组、1400W-8h组以及1400W-16h组新生大鼠的脑白质病理均获明显改善,iNOS蛋白合成量、NO及ONOO⁻生成量均显著降低,OL前体数量明显增加($P < 0.05$)。1400W-24h组的各项检测结果与PVL组相似,均无明显改善。**结论** 体内研究确认1400W通过抑制iNOS的表达上调、减少脑内NO及ONOO⁻的生成量,从而阻断OL前体的死亡通路,发挥对脑白质的保护效果。在LPS诱导后16h内应用1400W,均有良好的脑保护作用。
[中国当代儿科杂志,2010,12(5):357-362]

[关键词] 细菌脂多糖;脑室周围白质软化;诱生型一氧化氮合酶;1400W;新生大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)05-0357-06

1400W blocks death pathway of LPS-induced activated-microglia to preOLs

HE Ya-Fang, CHEN Hui-Jin, QIAN Long-Hua, CHEN Guan-Yi. Shanghai Institute for Pediatric Research, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China (Chen H-J, Email: hjchenk@online.sh.cn)

Abstract: Objective To explore the efficacy of inductible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor 1400W *in vivo* in blocking the death pathway of lipopolysaccharide (LPS)-induced activated-microglia to preoligodendrocytes (preOLs) in neonatal rats with infective-type periventricular leukomalacia (PVL) induced by LPS. **Methods** Two-day-old neonatal rats were randomly divided into: a sham-operated group, an untreated PVL group, and four 1400W-treated PVL groups that were subcutaneously administrated with 20 mg/kg of 1400W at 0 h, 8 hrs, 16 hrs, and 24 hrs after LPS induction, respectively. The brain specimens were obtained 5 days after LPS induction. The pathological assessment of cerebral white matter was performed under a light microscope. Concentrations of nitric oxide (NO) were measured by nitric acid-deoxidize colorimetry. Synthesis of iNOS was determined by Western blot analysis. Peroxynitrite (ONOO⁻) level and the amount of preOLs were determined by immunocytochemistry. **Results** The obvious injuries of periventricular white matter, massive loss of positive O4-labelled preOLs, and increased levels of NO, ONOO⁻ and iNOS were observed in neonatal rats with PVL. Compared to the untreated PVL group, the use of 1400W at 0 h, 8 hrs and 16 hrs after LPS induction significantly improved white matter injuries, reduced the levels of NO, ONOO⁻ and iNOS, and increased the amount of O4-labelled preOLs. However, the use of 1400W at 24 hrs after LPS induction did not result in the improvements. **Conclusions** iNOS inhibitor 1400W can effectively block the toxicity of LPS-activated microglia to preOLs and protect cerebral white matter through inhibiting iNOS and reducing the production of NO and ONOO⁻. The use of 1400W within 16 hrs after LPS induction may provide cerebral protections in neonatal rats with PVL. **[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (5):357-362]**

Key words: Lipopolysaccharide; Periventricular leukomalacia; Inducible nitric oxide synthas; 1400W; Neonatal rats

[收稿日期]2009-11-09;[修回日期]2010-01-07
[基金项目]国家自然科学基金(30672246)。
[作者简介]何亚芳,女,硕士,医师。
[通信作者]陈惠金,教授。

脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL)是早产儿脑损伤的最主要类型,迄今尚无防治方法,是早产儿死亡和存活儿脑瘫和智力落后的主要原因。近年来,母胎感染/炎症导致PVL的感染学说正在得到普遍认可^[1]。在感染诱导小胶质细胞激活、导致少突胶质细胞(oligodendrocyte, OL)前体死亡的通路中,由诱生型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)产生的NO和由NADPH氧化酶产生的 O_2^- ,两者反应所生成的过氧亚硝酸盐(peroxynitrite, ONOO⁻)被认为是导致OL前体死亡的主要毒性因子^[2]。在成功进行了iNOS抑制剂1400W(N-[3-(氨甲基)苯甲基]乙脒, N-[3-(aminomethyl)benzyl]acetamidine)对细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导OL前体死亡通路阻断效果的体外研究^[3]、并成功建立了感染型PVL新生大鼠动物模型的基础上^[4],本研究拟进一步探讨iNOS抑制剂1400W对LPS诱导OL前体死亡通路阻断效果的体内研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

2日龄Sprague-Dawley(SD)新生大鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司(动物生产许可证号:SCXK(沪)2008-0016;动物使用许可证:SYXK(沪)2008-0052)。动物无性别选择,随机分为假手术组、PVL组和PVL+1400W组。根据不同的给药时间,将PVL+1400W组进一步分为1400W-即刻组、1400W-8h组、1400W-16h组以及1400W-24h组,每组8只。造模前后所有新生大鼠均置于室温 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度60%~70%、光照时间白天黑夜各12h的环境中,由母鼠自由喂哺。

1.2 制备感染型PVL新生大鼠动物模型

2日龄新生大鼠乙醚麻醉后,固定于脑立体定位仪下。参照Paxino和Watson大鼠立体定位图谱及Pang等^[5]文献报道,脑内穿刺点定位于:前囟后1mm,中线外侧1mm,深度2mm。LPS(Sigma公司)用量 $1 \mu\text{g/g}$ 体重,注射速度 $0.5 \mu\text{L/min}$ 。在微量注射泵(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)的控制下,将LPS缓慢注入PVL组新生大鼠一侧脑室内。对假手术组新生大鼠则注射相同体积生理盐水。

术毕缝合皮肤伤口,火棉胶涂抹伤口。待麻醉苏醒后,迅速将新生大鼠放回母鼠处哺喂。药物处理组则根据不同的给药时间,分别于造模后即刻、8h、16h以及24h皮下注射1400W(碧云天生物工程研究所)

20mg/kg体重,连续给药3d。

1.3 检测方法

1.3.1 光镜下脑白质病理检测 造模后第5天(7日龄)处死取脑,固定脑组织,每个脑组织取4张切片,进行苏木精-伊红染色。参照Uehara等^[6]评分方法,拟定光镜下脑白质损伤病理评分标准如下:0度为正常;I度(白质轻度异常)为白质轻度疏松,神经纤维排列不整齐;II度(白质重度异常)为白质严重疏松,神经纤维排列紊乱,有凝固性坏死和囊腔形成。

1.3.2 硝酸还原法检测NO含量 取各组脑组织匀浆液500 μL ,根据试剂盒(南京建成生物工程研究所)指示,分别与配好的试剂一和试剂二混匀,37 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴60min,加入试剂三和试剂四,漩涡混匀后室温下静置40min,离心取上清加入显色剂,混匀室温下静置10min后,于波长550nm处,蒸馏水调零,比色测OD值。按下列公式计算NO含量:NO含量($\mu\text{mol/gprot}$)=(测定管OD-空白管OD)/(标准管OD-空白管OD) $\times$ 标准品浓度(20 $\mu\text{mol/L}$) $\times$ 样品的蛋白含量(gprot/L)。

1.3.3 Western blot法检测脑内iNOS含量 造模后第5天(7日龄)处死取脑,收集各组脑组织抽提总蛋白。根据蛋白定量上样,8%聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离,并以湿法电转移将蛋白转移至PVDF膜上,5%TBST脱脂奶粉封闭液37 $^\circ\text{C}$ 封闭1h,用兔抗大鼠iNOS抗体(英国Abcam公司)(1:1000)4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。洗去一抗,此膜再与HRP标记的山羊抗兔IgG(1:5000)反应,增强化学发光法显色,X线底片曝光显影。结果用图像处理仪进行灰度扫描分析,并以稳定表达的基因 β -微管蛋白(β -tubulin)作为内参照。

1.3.4 免疫组化法检测3-硝基酪氨酸和OL前体 石蜡切片经二甲苯及乙醇脱蜡至水;3% H_2O_2 孵育10min,PBS漂洗3min $\times$ 3次;加入Tris-EDTA修复液(pH7.6~7.8),微波修复10min;自然冷却后,PBS漂洗3min $\times$ 3次;加入10%山羊血清封闭液,室温孵育30min;甩干血清加入单克隆抗体:抗O4单克隆抗体(美国R&D公司)1:100和3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine, 3-NT)单克隆抗体(美国Chemicon公司)1:200 4 $^\circ\text{C}$ 过夜,PBS漂洗3min $\times$ 3次;加入HRP标记二抗工作液(北京中衫金桥生物技术有限公司),37 $^\circ\text{C}$ 孵育1h,PBS漂洗3min $\times$ 3次;DAB显色4min,苏木素复染5min,盐酸酒精分化后脱水,透明,封片,镜检。以PBS代替一抗作为阴性对照。应用Image-Pro Plus 5.0图像分析软件

对图像进行分析,每张切片在200倍镜下,在脑室周围同一部位随机取3个视野采图,阳性O4或3-NT标记物均呈棕黄色,根据阳性面积/总面积×100%计算O4、3-NT细胞阳性率。

1.4 统计分析

各组数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用SPSS 11.0统计软件处理,计量资料根据方差齐性检验结果,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD;计数资料使用 χ^2 检验,等级资料使用非参秩和检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 1400W对LPS诱导脑白质病变阻断效果的光镜下病理评估

2日龄新生大鼠于造模后第5天处死取脑,进行光镜下脑白质病理检查。结果显示假手术组大鼠的脑皮质和皮质下细胞结构清晰、形态正常,皮层下神经纤维致密,走向整齐,未发现病理改变。PVL组皮质下和脑室周围白质病变明显,组织结构模糊,坏死疏松,神经纤维走向紊乱,呈网状、条索状,部分可见囊性空洞形成,其中白质轻度病变和重度病变各占59.4%和40.6%,未见正常白质。在1400W-即刻、1400W-8h及1400W-16h 3组中,脑白质损伤均较PVL组明显改善,白质疏松和神经纤维排列紊乱状况明显好转,部分白质结构接近正常,其中正常白质占31.3%~37.5%,轻度病变为50.0%~

56.3%,重度病变为6.3%~15.6%,在1400W-即刻组的白质改善最为明显。1400W-24h组脑损伤情况类似于PVL组,未见正常白质。见表1、图1。

表1 各组新生大鼠光镜下脑白质损伤病理评估
[n=8;n(%)]

组别	0度	I度	II度	平均秩和
假手术组	32(100)	0(0)	0(0)	33.50
PVL组	0(0)	19(59.4)	13(40.6)	137.09
1400W-即刻组	12(37.5)	18(56.3)	2(6.3)	86.19
1400W-8h组	12(37.5)	16(50.0)	4(12.5)	90.13
1400W-16h组	10(31.3)	17(53.1)	5(15.6)	96.97
1400W-24h组	0(0)	20(62.5)	12(37.5)	135.13

注:每个脑组织取4张切片取其平均数,应用非参秩和检验(Kruskal-Wallis Test), $H=88.479$, $P=0.000$ 。

2.2 1400W对LPS诱导脑内NO生成的阻断效果

于LPS脑内注射后第5天,应用硝酸还原酶法-比色法检测各组新生大鼠脑内NO含量。结果显示,与假手术组相比,PVL组新生大鼠脑内NO含量显著升高($t=34.73$, $P<0.01$)。于LPS脑内注射后即刻、8h和16h应用1400W,均可显著减少脑内NO生成量($F=211.62$, $P<0.01$),但造模后24h应用1400W,脑内NO的生成量无明显减少,与PVL组比较差异无统计学意义($t=11.97$, $P>0.05$)。提示1400W对LPS诱导脑内NO大量生成有显著阻断效果,在LPS诱导后16h内应用1400W均有明显效果,迟于造模后24h用药则无阻断作用。见表2。

表2 各组新生大鼠脑内NO含量、iNOS蛋白相对合成量、3-NT阳性表达率以及O4阳性率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NO($\mu\text{mol/gprot}$)	iNOS相对合成量	3-NT表达率(%)	O4阳性率(%)
假手术组	8	1.10±0.08	0.28±0.01	0.00±0.00	11.51±0.78
PVL组	8	2.88±0.18 ^a	0.90±0.04 ^a	11.00±1.73 ^a	3.35±0.42 ^a
1400W-即刻组	8	1.28±0.10 ^b	0.31±0.02 ^b	0.00±0.00 ^b	10.38±0.34 ^b
1400W-8h组	8	1.56±0.08 ^b	0.37±0.03 ^b	2.67±0.58 ^b	8.75±0.65 ^b
1400W-16h组	8	1.69±0.13 ^b	0.54±0.03 ^b	6.67±1.53 ^b	6.84±0.58 ^b
1400W-24h组	8	2.75±0.16	0.85±0.05	10.53±1.13	3.70±0.72

a:与假手术组比较, $P<0.01$; b:与PVL组比较, $P<0.01$ 。

2.3 1400W对LPS诱导脑内iNOS合成的阻断效果

Western blot检测各组新生大鼠脑内iNOS蛋白含量,结果显示正常情况下脑内仅有微量iNOS合成,LPS可诱导脑内iNOS蛋白的合成量明显增加($t=43.72$, $P<0.01$);1400W能明显抑制LPS诱导的iNOS合成上调,尤其LPS诱导后8h内应

用1400W对iNOS合成上调的抑制效果最为明显;LPS诱导后24h应用1400W,对LPS诱导iNOS的合成上调则无明显抑制作用($t=9.85$, $P>0.05$)。提示1400W对LPS诱导脑内iNOS的大量合成有明显阻断效果,在LPS诱导后16h内应用1400W效果明显,造模24h后用药则无阻断作用。见表2、图2。

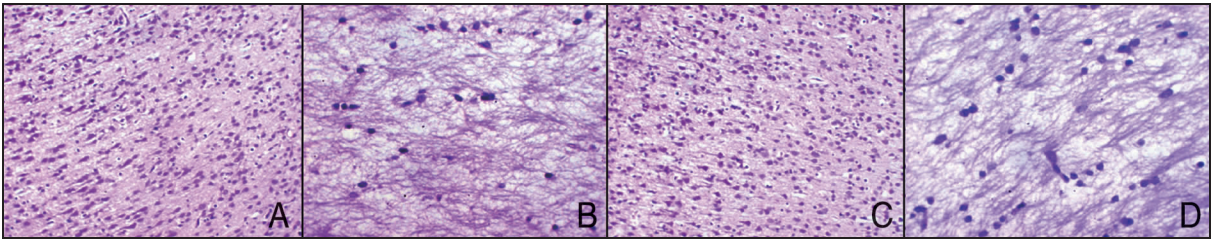


图 1 1400W 对 LPS 诱导新生大鼠脑白质病变阻断效果的光镜下病理改变 A:假手术组(×200)显示正常白质; B: PVL 组(×400)显示白质重度病变; C: 1400W-即刻组(×200)显示白质接近正常; D:1400W-24 h 组(×400)显示白质重度病变。

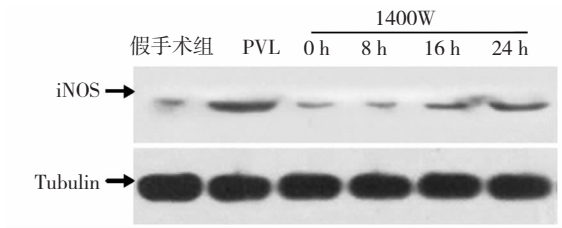


图 2 Western blot 法检测各组脑内 iNOS 蛋白的合成 从左到右分别是:假手术组, PVL 组, 1400W-即刻组, 1400W-8h 组, 1400W-16h 组和 1400W-24h 组。显示 LPS 可诱导 iNOS 的蛋白合成明显增加, LPS 诱导后 16 h 内应用 1400W 均可明显抑制 LPS 诱导的 iNOS 蛋白合成上调。

2.4 1400W 对 LPS 诱导过氧亚硝酸盐生成的阻断效果

低倍镜下观察到呈棕黄色的 3-NT 阳性细胞主要集中在侧脑室周围的脑白质区域。假手术组未检测到 3-NT 阳性细胞;PVL 组 3-NT 阳性率为(11.00 ± 1.73)%,1400W-即刻、1400-8 h 及 1400-16 h 3 组的 3-NT 阳性表达率显著减少,尤其是 1400W-即刻组未检测到 3-NT 阳性细胞。1400W-24h 组 3-NT 阳

性率则接近 PVL 组。提示 1400W 对 LPS 诱导脑内过氧亚硝酸盐的大量生成有显著阻断效果,在 LPS 诱导后 16 h 内应用 1400W 均有明显效果,造模 24 h 后用药则无阻断作用。见表 2、图 3A ~ D。

2.5 1400W 对 LPS 诱导 OL 前体死亡的阻断效果

免疫组化方法检测各组新生大鼠脑组织中 O4 标记 OL 前体的阳性率,结果显示假手术组新生大鼠脑内存在较多 O4 阳性 OL 前体,PVL 组新生大鼠脑内 O4 阳性 OL 前体明显减少,两组比较差异有统计学意义($t=16.01, P<0.01$)。应用 1400W 后,各用药组 O4 阳性 OL 前体的阳性率明显提高,尤以 LPS 诱导后即刻用药组的 OL 前体阳性率最高。1400W-24h 组 O4 阳性 OL 前体阳性率则接近 PVL 组($t=5.88, P>0.05$)。提示 LPS 诱导引起脑内 O4 阳性标记的 OL 前体大量丢失,1400W 对 LPS 诱导脑内 OL 前体的丢失有显著保护效果,在 LPS 诱导后 16 h 内应用 1400W 均有明显效果,造模 24 h 后用药则无阻断作用。见表 2、图 3 E ~ H。

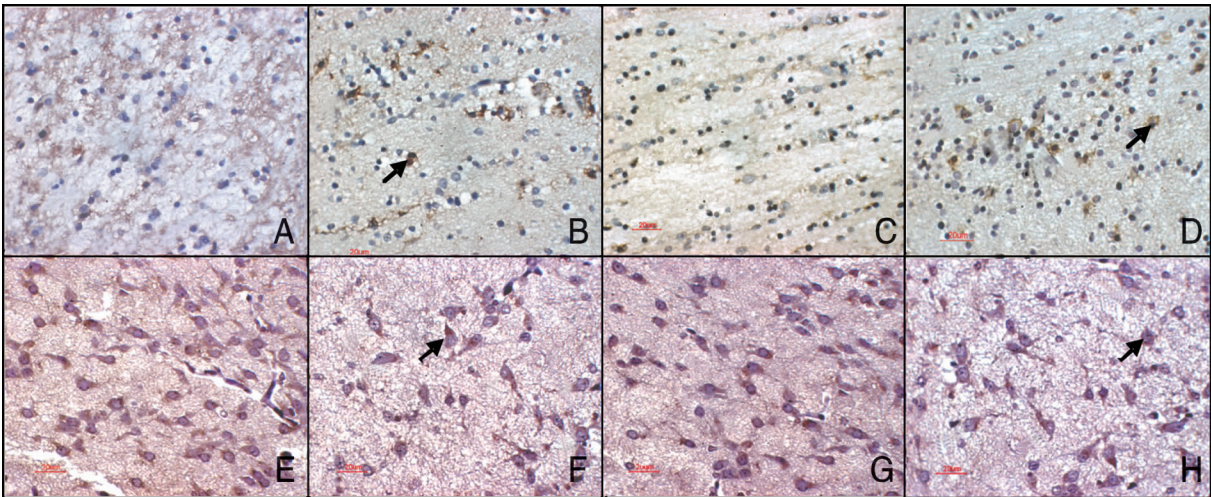


图 3 各组 3-NT 和 O4 免疫组化结果 A ~ D 为 3-NT 免疫组化结果(×200) A:假手术组; B:PVL 组; C:1400W-即刻组; D:1400W-24h 组。1400W 能显著减少 LPS 诱导的 3-NT 阳性细胞表达率。E ~ H 为 O4 阳性免疫组化结果(×400); E:假手术组; F:PVL 组; G:1400W-即刻组; H:1400W-24h 组。1400W 能明显阻断 LPS 诱导 O4 阳性 OL 前体的丢失。

3 讨论

近年来的研究显示,感染因素广泛参与多种脑疾病的病理损伤^[7],其作用机理主要是通过激活小胶质细胞,诱导小胶质细胞表达 iNOS 和活化 NADPH 氧化酶,生成大量的 O_2^- 和 NO,两者进一步反应生成毒性更强的物质—过氧亚硝酸盐^[8-9],后者被认为是导致 OL 前体死亡的主要毒性因子。抑制或减少小胶质细胞对 NO 和 O_2^- 的生成,理论上应是保护 OL 前体免受感染因素损害的有效方法。

NO 是独特的生物信使分子和效应分子,由左旋精氨酸与氧在 NOS 作用下催化生成。iNOS 为 Ca^{2+} -钙调蛋白非依赖性酶,仅在炎性因子的刺激下被诱导激活,可诱导生成大量 NO,产生明显的神经毒性。Jafarian-Tehrani 等^[10]在缺血再灌注损伤模型中观察到, Ca^{2+} -非依赖性 NOS 活力升高的同时,伴随着 NO 生成的明显增加。脑损伤模型中,iNOS-基因敲除小鼠与野生型对照组小鼠相比,其 NO 含量显著减少^[11]。表明 iNOS 是病理条件下 NO 的主要来源,iNOS 的表达上调是感染诱导 NO 大量产生的主要基础。

关于 iNOS 的表达机制尚有争议。近年研究显示,iNOS 诱导表现分为早期急性和晚期延迟两种状况,其中来源于早期阶段的 NO 被认为是有害的,而晚期 iNOS 产生的 NO 则被认为有益^[12]。选择性 iNOS 抑制剂的保护作用主要发生在早期阶段。对缺血性脑损伤大鼠皮层神经元的 iNOS 基因和蛋白表达检测发现,iNOS 基因从脑损伤后 6 h 开始表达,24 h 达高峰,持续到 72 h,而 iNOS 蛋白则在脑损伤后 24 h 开始合成,持续到 72 h^[13]。另有研究进一步显示,iNOS 蛋白确切的合成时间在缺血损伤后 18~24 h^[14]。因此动态观察 iNOS 诱导状态,为选择性 iNOS 抑制剂提供了较宽的治疗窗口。

1400W 是一种高度选择性的强效 iNOS 抑制剂,可在体内与 iNOS 选择性缓慢地紧密结合,是迄今为止选择性和抑制效能最强的 iNOS 抑制剂^[15]。本研究针对 iNOS 的表达特点,在成功建立 LPS 诱导的 2 日龄新生大鼠感染型脑白质损伤 PVL 模型基础上,分别在 LPS 注射后即刻、8 h、16 h、24 h 等不同时间点给予 1400W 治疗,以探讨 1400W 对感染型 PVL 脑损伤的保护效果及其有效治疗的时间窗。结果显示,LPS 脑内注射后第 5 天,PVL 组新生大鼠的脑白质出现明显损伤,皮质下和脑室周围白质疏松、神经纤维排列紊乱,大量少突胶质细胞前体

标记物(antigen on the surface of oligodendrocyte progenitor, O4)阳性的 OL 前体丢失,iNOS 合成量及其产物 NO 的生成量明显增加,证实感染/炎症因素促使了 PVL 的发生和发展,LPS 诱导小胶质细胞激活导致 iNOS 表达上调,是促使这一病理过程的重要因素。应用 1400W 后,无论是即刻用药组还是 16 h 用药组,其脑白质疏松和神经纤维排列紊乱状况明显改善,部分脑白质结构接近正常,轻度和重度病变的比例均较 PVL 组明显降低。但 24 h 用药组的脑白质病理与 PVL 组相比并无明显改善。提示 PVL 后 16 h 内应用 1400W,能够很好发挥对脑白质的保护作用,尤其早期用药有更好的脑保护效果,近期国外一项对白质多发性硬化症的实验研究也有类似结论^[16]。进一步对各用药组脑内 NO 含量和 iNOS 蛋白表达量进行检测,发现与 PVL 组相比,即刻用药组、8 h 用药组以及 16 h 用药组的 NO 含量和 iNOS 表达量均显著降低,24 h 用药组的 NO 含量和 iNOS 表达量则均无明显改善。3-NT 常作为体外检测 ONOO⁻的足迹蛋白,其含量可间接反映 ONOO⁻的含量^[17]。通过免疫组化法检测 3-NT 和 O4 阳性的 OL 前体,证实由 LPS 诱导的 OL 前体死亡通路及白质损伤,在 LPS 诱导后 16 h 内均能被 1400W 有效阻断,从而减少 OL 前体的受损和丢失,发挥脑保护作用。

综上所述,本研究通过体内实验,证实感染炎症所导致的脑白质损伤,与 iNOS 蛋白表达上调,促使生成大量的 NO 及 ONOO⁻,进一步引起 OL 前体的死亡有关。高效选择性 iNOS 抑制剂 1400W 通过抑制 iNOS 的表达上调、减少脑内 NO 及 ONOO⁻的生成量,从而阻断 OL 前体的死亡通路,发挥对脑白质的保护效果。在 LPS 诱导后 16 h 内应用 1400W,均有良好的脑保护作用,可为感染所致脑白质损伤的治疗赢得宝贵时间,有望今后在临床上应用于早产儿 PVL 的早期防治,改善早产儿的生存率及生存质量。

[参 考 文 献]

- [1] Back SA, Riddle A, McClure MM. Maturation-dependent vulnerability of perinatal white matter in premature birth [J]. *Stroke*, 2007, 38(2):724-730.
- [2] Czapski GA, Cakala M, Chalimoniuk K, Gajkowska B, Strosznajder JB. Role of nitric oxide in the brain during lipopolysaccharide-evoked systemic inflammation [J]. *J Neurosci Res*, 2007, 85(8):1694-1703.
- [3] 何亚芳,陈惠金,钱龙华,陈冠仪. iNOS 抑制剂阻断由细菌脂多糖诱导活性小胶质细胞对少突胶质前体毒性作用的研究 [J]. *中华儿科杂志*, 2009, 47(7):537-543.
- [4] 何亚芳,陈惠金,钱龙华,陈冠仪. 感染型 PVL 新生大鼠模型

的制备[J]. 实验动物与比较医学,2010,30(1):8-11.

[5] Pang Y, Cai Z, Rhodes PG. Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide [J]. Brain Res Dev Brain Res B, 2003, 140(2):205-214.

[6] Uehara H, Yoshioka H, Naqai H, Ochiai R, Naito T, Hasegawa K, Sawada T. Doxapram accentuates white matter injury in neonatal rats following bilateral carotid artery occlusion [J]. Neurosci Lett, 2000, 281(2-3):191-194.

[7] Wilkinson BL, Landreth GE. The microglial NADPH oxidase complex as a source of oxidative stress in Alzheimer's disease[J]. J Neuroinflammation, 2006, 3:30.

[8] Mander P, Brown GC. Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death; a dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration [J]. J Neuroinflammation, 2005, 2:20.

[9] Li J, Baud O, Vartanian T, Volpe JJ, Rosenberg PA. Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(28):9936-9941.

[10] Jafarian-Tehrani M, Louin G, Royo NC, Besson VC, Bohme GA, Plotkine M, et al. 1400W, a potent selective inducible NOS inhibitor, improves histopathological outcome following traumatic brain injury in rats[J]. Nitric Oxide, 2005, 12(2):61-69.

[11] Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross M. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene[J]. J Neurosci, 1997, 17(23):9157-9164.

[12] Gahm C, Holmin S, Mathiesen T. Nitric oxide synthase expression after human brain contusion [J]. Neurosurgery, 2002, 50(6):1319-1326.

[13] Lu J, Mochhala S, Shirhan M, Ng KC, Teo AL, Tan MH, et al. Neuroprotection by aminoguanidine after lateral fluid-percussive brain injury in rats: a combined magnetic resonance imaging, histopathologic and functional study[J]. Neuropharmacology, 2003, 44(2):253-263.

[14] Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, Kiff RJ, Laszlo F, Whittle BJ, et al. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo[J]. J Biol Chem, 1997, 272(8):4959-4963.

[15] Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, et al. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS [J]. J Neurosci, 2002, 22(7):2478-2486.

[16] Grammatikopoulos G, Pignatelli M, D'Amico F, Fiorillo C, Fratesiello A, Sadile AG. Selective inhibition of neuronal nitric oxide synthesis reduces hyperactivity and increases non-selective attention in the Naples High-Excitability rat [J]. Behav Brain Res, 2002, 130(1-2):127-132.

[17] Jack C, Antel J, Bruck W, Kuhlmann T. Contrasting Potential of nitric oxide and peroxynitrite to mediate oligodendrocyte injury in multiple sclerosis [J]. Glia, 2007, 55(9):926-934.

(本文编辑:黄 榕)

· 消息 ·

全国第八届儿童发育和早产儿优化发展临床学术研讨会暨学习班征文通知

儿童早期发展和早产儿等高危新生儿早期干预涉及多学科合作,为了把这些交叉学科及专业的科研成果让大家共享,由中国优生优育协会、中华预防医学会主办的全国第八届儿童发育和早产儿优化发展临床学术研讨会暨学习班定于2010年7月16日至20日在北京召开。会间将邀请国内外著名的围产医学、儿童早期干预、儿科临床、儿童保健,小儿眼科、康复医学等方面的专家做专题报告,并授予国家级医学继续教育学分。会议征文可为涉及儿童早期发展、高危儿早期干预基础、临床、营养、保健、管理、康复、心理、教育等各方面内容的论文。稿件寄至北京市宣武区清芷园11号楼B座105号宝篮贝贝儿童早期发展中心,鲍秀兰、孙淑英收。邮编:100054。联系电话:010-63528545;或投稿至baoxl@163bj.com。截稿日期:2010年5月15日。