

宫内感染对早产新生大鼠脑发育的影响

尚云¹ 刘玲¹ 曹坤峰² 王多德¹ 王薇¹ 许浩¹

(1. 贵阳市妇幼保健院贵阳市儿童医院新生儿科, 贵州 贵阳 550003;
2. 河南大学教育科学学院心理学教研室, 河南 开封 475004)

[摘要] **目的** 本实验通过对孕鼠腹腔内注射脂多糖(LPS)制备宫内感染动物模型,探讨宫内感染对胎鼠脑神经细胞凋亡及其对早产新生大鼠远期脑发育的影响。**方法** 妊娠18 d孕鼠随机分为对照组、低剂量感染组和高剂量感染组,对感染组分别给予0.3 mg/kg和0.6 mg/kg LPS腹腔内注射,对照组腹腔注射生理盐水,24 h后处死部分大鼠($n=7$),取胎盘组织行苏木精-伊红染色观察其病理变化、TUNEL法观察胎鼠脑神经细胞的凋亡情况,部分孕鼠继续怀孕至21 d前诱导分娩,将新生早产鼠饲养至42 d行迷宫试验。**结果** 与对照组比较,宫内感染组孕鼠胎盘组织可见明显的炎性细胞浸润,血管充血等病理改变,感染组胎鼠脑组织神经细胞的凋亡增加(对照组 8.00 ± 0.36 vs 低剂量感染组 32.41 ± 5.36 ,高剂量感染组 66.41 ± 7.61 , $P<0.01$),且神经细胞的凋亡随着宫内感染的程度加重而增多。感染组大鼠Y型迷宫试验达标所需的训练次数较对照组明显增多(对照组 56.8 ± 3.7 vs 低剂量感染组 117.8 ± 8.7 和高剂量感染组 194.4 ± 13.7 , $P<0.01$),记忆保持中正确反应次数明显低于对照组(对照组 0.92 ± 0.06 vs 低剂量感染组 0.62 ± 0.09 和高剂量感染组 0.37 ± 0.09 , $P<0.05$)。**结论** 宫内感染可导致胎鼠脑神经细胞的凋亡,并损伤新生大鼠的学习记忆功能,影响其远期智能发育。

[中国当代儿科杂志,2010,12(7):569-572]

[关键词] 宫内感染;神经细胞凋亡;脑发育;胎鼠;新生大鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)07-0569-04

Impact of intrauterine infection on long-term brain development of premature rats

SHANG Yun, LIU Ling, CAO Kun-Feng, WANG Duo-De, WANG Wei, XU Hao. Department of Neonatology, Guiyang Maternal and Child Health Care Hospital, Guiyang Children's Hospital, Guiyang 550003, China (Liu L, Email: liulingpedgz@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To investigate the impact of intrauterine infection induced by LPS injection on long-term brain development of premature rats. **Methods** Eighteen day-gestation pregnant rats were randomly assigned to a control group receiving an intraperitoneal injection of normal saline, and two infection groups that were intraperitoneally injected with 0.3 mg/kg or 0.6 mg/kg LPS. Twenty-four hours after injection, 7 pregnant rats of each group were sacrificed. The pathological changes of the placenta after hematoxylin and eosin staining were observed under a light microscope. The neural cell apoptosis of fetal brains was examined by the TUNEL assay. The remained pregnant rats were induced to labour before 21 gestation days. The long-term brain development of premature rats was tested with the Y type electric maze on postnatal day 42. **Results** Obvious pathological changes were observed in the placenta in the infection groups. The apoptotic neural cells in the fetal brain increased in the infection groups compared with that in the control group (32.41 ± 5.36 in the 0.3 mg/kg infection group and 66.41 ± 7.61 in the 0.6 mg/kg infection group vs 8.00 ± 0.36 in the control group; $P<0.01$). The number of trials to criterion in the Y type maze test in the infection groups was much more than that in the control group [117.8 ± 8.7 (0.3 mg/kg infection group) and 194.4 ± 13.7 (0.6 mg/kg infection group) vs 56.8 ± 3.7 (control group); $P<0.01$]. The number of correct reactions in memory retaining in the infection groups was lower than that in the control group (0.62 ± 0.09 in the 0.3 mg/kg infection group and 0.37 ± 0.09 in the 0.6 mg/kg infection group vs 0.92 ± 0.06 in the control group; $P<0.05$). **Conclusions** Intrauterine infection can cause fetal rats' neural cell apoptosis and affect adversely long-term brain development of neonatal rats.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (7):569-572]

Key words: Intrauterine infection; Neural cell apoptosis; Brain development; Fetal rats; Neonatal rats

[收稿日期]2009-11-02;[修回日期]2010-01-20
[基金项目] 贵阳市人才创新基金项目,筑卫科技合同字2006第17-16号。
[作者简介] 尚云,女,硕士,住院医师。现在新乡医学院第一附属医院新生儿科。
[通信作者] 刘玲,主任医师。

随着产科和新生儿重症监护治疗技术的发展,早产儿的存活率不断提高。由于早产儿脑发育的病理生理特点,有关宫内感染引发的早产儿脑损伤问题也日益引起广大学者的关注。据文献报道早产儿在围产期因宫内感染导致的脑损伤主要为脑白质损伤(white matter damage, WMD),尤其是脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL),轻者可导致认知功能的损害,重度则可引起脑瘫等永久性伤残^[1-3]。本研究拟通过使用两种剂量的脂多糖(LPS)处理妊娠18 d孕鼠,探讨宫内感染及程度对胎脑神经细胞凋亡及其对早产新生大鼠远期脑发育的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组与取材

孕18 d Wistar 大鼠(清洁级,新乡医学院实验动物中心提供)随机分为对照组、感染组1和感染组2。予感染组1孕鼠腹腔内注射LPS^[4](购自美国Sigma公司)0.3 mg/kg,感染组2孕鼠腹腔内注射LPS 0.6 mg/kg;对照组为同期分娩的孕鼠,予腹腔内注射等量生理盐水。造模后24 h各组均取出7只孕鼠,剖腹取胎盘和胎鼠脑组织观察胎盘病理变化及检测胎脑神经细胞的凋亡情况,剩下的大鼠待其怀孕至21 d前诱导分娩。感染组中15只孕鼠有12只早产,留取早产鼠。其余各孕鼠在诱导早产后,感染组1和感染组2中各随机抽取15只幼鼠,对照组抽取10只幼鼠,饲养至42 d做迷宫测试。

1.2 实验方法

1.2.1 胎盘组织病理切片检查 常规石蜡切片厚5 μm,苏木精-伊红染色后光镜下观察胎盘组织的病理改变。

1.2.2 胎脑凋亡神经细胞的检测和判断 凋亡细胞的检测按TUNEL免疫组化试剂盒(购自武汉博士德公司)步骤进行,感染组与对照组各5张组织切片,在400倍光镜下随机观察5个视野,每个视野计数100个细胞,胞浆呈淡或深棕黄色为凋亡阳性细胞,计数凋亡阳性细胞并统计均值。

1.2.3 学习、记忆能力测试 早产新生大鼠42日龄时用三等分辐射式迷路箱和MG33型迷宫刺激器检测。学习能力用大鼠学习达到学会标准前所需的测试数,表示其空间反应的学习记忆成绩。所需次数越少说明学习速度越快或学习能力越强;所需次数越多,提示学习记忆能力下降,以连续10次中有9次或以上正确反应(正确反应率≥90%)定为学会标准;记忆能力在学会后24 h再测试,正确反应次数定为A,以A/10

表示记忆的保持能力,此值越高说明记忆力越好^[5]。

1.3 统计学处理

实验数据采用SPSS 15.0软件进行统计,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。经方差齐性检验方差均齐,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胎盘组织苏木精-伊红染色结果

镜下观察,感染组胎盘血管充血、水肿,大量中性粒细胞浸润,且随着LPS剂量的增大,即感染程度的加重,炎性病理改变愈明显。而对照组胎盘组织结构清晰,未见中性粒细胞聚集等炎症反应。表明本研究宫内感染模型制作成功(图1)。

2.2 胎鼠脑组织神经细胞凋亡的检测

以胞浆呈淡或深棕黄色为凋亡阳性细胞,主要分布在皮质。感染后24 h感染组凋亡细胞数量较对照组明显增多,且随着感染程度的加重,凋亡的神经细胞明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表1,图2。

2.3 迷宫测试结果

感染组大鼠反应迟钝、自主活动少,运动速度慢,学习及记忆能力较对照组明显降低,达标所需的训练次数明显增多,记忆保持中正确反应数明显降低,且随着LPS剂量的增大即感染程度的加重,学习及记忆能力呈下降趋势(表2)。

表1 各组胎鼠脑组织凋亡细胞的比较 (细胞数, $\bar{x} \pm s$)

分组	鼠数	凋亡细胞
对照组	7	8.0 ± 0.4
感染组1	7	32.4 ± 5.4
感染组2	7	66.4 ± 7.6 ^{a,b}
F值		18.22
P值		<0.01

a: 与对照组比较, $P < 0.01$, b: 与感染组1比较, $P < 0.05$

表2 42日龄早产大鼠学习和记忆能力的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	鼠数	学习能力	记忆能力
		训练次数	记忆保持率
对照组	10	57 ± 4	0.92 ± 0.06
感染组1	15	118 ± 9 ^a	0.62 ± 0.09 ^b
感染组2	15	194 ± 14 ^{a,c}	0.37 ± 0.09 ^{b,d}
F值		14.45	8.96
P值		<0.01	<0.05

与对照组比较, a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$; 与感染组1比较, c: $P < 0.01$, d: $P < 0.05$

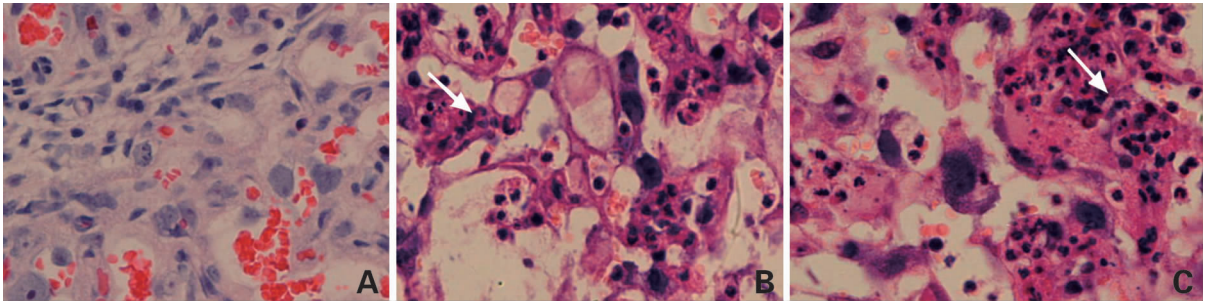


图1 大鼠胎盘组织苏木精-伊红染色后观察结果(×400) A: 对照组,镜下未见白细胞浸润;B: 感染组1,胎盘组织镜下见较多的白细胞浸润;C: 感染组2,白细胞浸润较感染组1严重。箭头所指为白细胞。

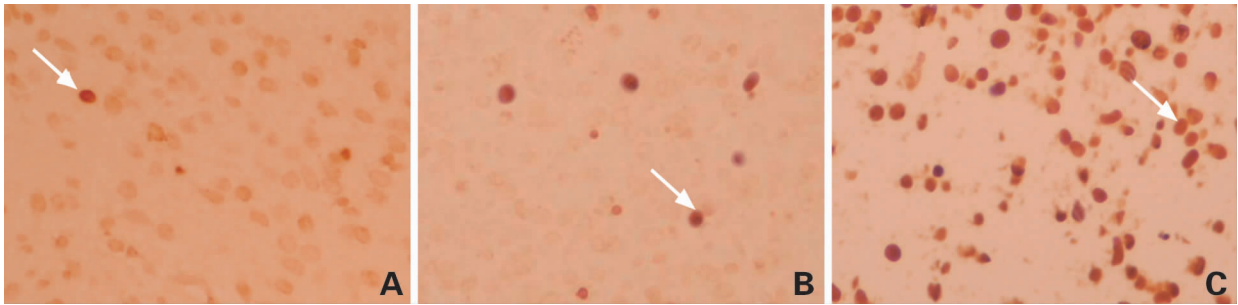


图2 胎鼠脑神经细胞凋亡的变化(×400) A: 对照组,胎脑组织仅见少许凋亡的神经细胞;B: 感染组1,胎脑组织见较多凋亡的神经细胞;C: 感染组2,胎脑组织凋亡的神经细胞明显增加。箭头所指为凋亡细胞。

3 讨论

近年来关于宫内感染导致早产及早产新生儿脑损伤已逐渐引起国内外学者的关注^[6],但其发生机制尚不十分清楚。研究认为细菌 LPS 联合 TLR-4 受体,激活了炎症反应信号通路导致早产和胎儿脑损伤是主要机制之一^[7-8]。但对宫内感染与早产鼠脑发育远期行为影响的研究国内外文献未见报道,国内仅发现学者对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后的远期行为研究^[9-10]。本实验旨在通过制作早产大鼠宫内感染模型,试图探讨宫内感染对胎鼠神经细胞凋亡及其对早产新生鼠脑发育的影响,为临床预防和治疗早产儿脑损伤提供理论依据。

细胞凋亡又称程序性的细胞死亡,是与坏死不同的细胞死亡现象。坏死过程中,在早期细胞逐渐肿大,随后溶解;而凋亡过程中,细胞逐渐萎缩,片段化,形成所谓的凋亡小体。细胞凋亡是个体发育过程中的一种自然形式,适度的细胞凋亡是组织器官正常发育过程中的生理性事件。过度的细胞凋亡将导致组织器官的器质性病变和功能障碍。近年的许多研究表明凋亡参与了宫内感染导致脑损伤的发生发展,研究显示宫内感染脑损伤时少突胶质细胞

(OL)前体细胞的死亡方式主要是凋亡^[11]。有研究显示早产儿脑室周围白质软化(PVL)的一个重要的病理改变就是弥漫性脑白质 OL 凋亡、坏死^[12-13]。Bell 等^[14]给妊娠 15 d 的大鼠宫颈内注射亚临床感染剂量的 LPS,5 d 后发现胎鼠脑组织中 TUNEL 阳性细胞数目明显增加。本研究在造模后 24 h 应用 TUNEL 法检测也发现感染组胎鼠脑组织神经细胞的凋亡较对照组明显增多,且随着感染程度的加重神经细胞的凋亡也增多。

学习记忆是中枢神经系统的高级神经活动,是衡量脑发育的重要指标。学习是神经系统接受环境的变化而获得新行为习惯的过程,记忆是学习后经验的储存和保持。在中枢神经系统中,海马属边缘系统,是与学习记忆和情绪、行为功能密切相关的重要脑区,且海马又是宫内感染导致脑损伤的易损部位^[15]。本研究通过对 42 日龄早产大鼠电迷宫测试,结果显示感染组学习及记忆能力较对照组明显降低,达标所需的训练次数明显增多,记忆保持中正确反应次数明显降低,表明宫内感染可导致早产新生鼠脑神经细胞的凋亡,并对大鼠远期智能的发育产生影响,分析其原因可能与宫内感染或 LPS 腹腔内注射后,母体发生绒毛膜羊膜炎,导致炎症介质如 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 和 inter- γ 等的分泌增加,这

些炎症介质经过胎盘从母体进入胎儿循环^[16],因为胎儿血脑屏障(brain blood barrier, BBB)发育不完善,炎症介质又通过 BBB 进入胎儿脑组织,刺激并激活胎脑组织内的小胶质细胞和星型胶质细胞^[17],使胎脑组织上述炎症介质的分泌增高^[14],而胎脑组织的一些神经生长因子如 NGF、脑源性神经生长因子 BDNF 的表达下降;另外炎症介质还诱导一氧化氮 NO 和前列腺素 PGE 及血管内皮生长因子 VEGF 的表达增加^[18],使发育中的胎脑组织血管生成增加,但血管的正常发育受到影响,上述这些因素的共同作用,致胎脑神经细胞的凋亡增加^[19],最终导致胎鼠脑的发育受到影响,从而使早产鼠远期脑的发育受到损害。

[参 考 文 献]

[1] Hermansen MC, Hermansen MG. Perinatal infections and cerebral palsy [J]. Clin Perinatol, 2006, 33 (2):315-333.

[2] Kumral A, Baskin H, Yesilirmak DC, Erqur BU, Aykan S, Genc S, et al. Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain [J]. Neonatology. 2007, 92 (4):269-278.

[3] Dammann O, Kuban KCK, Leviton A. Perinatal infection, fetal inflammatory response, white matter damage, and cognitive limitation in children born preterm [J]. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2002, 8(1):46-50.

[4] 程秀永, 董慧芳. 宫内感染和宫内窒息对早产鼠脑损伤的联合作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(3):849-850.

[5] 王跃春. Y 型电迷宫在大鼠学习记忆功能测试中的合理运用 [J]. 中国行为医学科学, 2005, 14(1):69-70.

[6] Schendel D, Schuchat A, Thorsen P. Public health issues related to infection and pregnancy and cerebral palsy [J]. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2002, 8(1):39-45.

[7] Pirianov G, Waddington SN, Lindstrom TM, Terzidou V, Mehmet H, Bennett PR. The cyclopentenone 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J(2) delays lipopolysaccharide-induced preterm delivery and reduces mortality in the newborn mouse [J]. Endocrinology, 2009, 150(2):699-706.

[8] Cai Z, Pan ZO, Pang Y, Evans OB, Rhodes PG. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration [J]. Pediatr Res, 2000, 47 (1):64-72.

[9] 齐志业, 贺湘英, 李琪, 莫亚雄, 梁琨. 新生小鼠兴奋毒性脑损伤的神经行为功能研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11 (3):191-193.

[10] 钟乐, 王霞, 余小河, 杨于嘉. 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后的远期行为测试 [J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(3):245-248.

[11] Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury [J]. J Neurosci, 2001, 21(4):1302-1312

[12] Cai Z, Pang F, Rhodes PG. Chronic ischemia preferentially causes white matter injury in the neonatal rat brain [J]. Brain Res, 2001, 898(1):126-135.

[13] Tsuji M, Wilson MA, Lange MS, Johnston MV. Minocycline worsens hypoxic-ischemic brain injury in a neonatal mouse model [J]. Exp Neurol, 2004, 189(3):58-65.

[14] Bell MJ, Hallenbeck JM. Effects of intrauterine inflammation on developing rat brain [J]. Neurosci Res, 2002, 70(4):570-579.

[15] Kannan S, Saadani-Makki F, Muzik O, Chakraborty P, Mangner TJ, Janisse J, et al. Microglial activation in perinatal rabbit brain induced by intrauterine inflammation: detection with 11C-(R)-PK11195 and small-animal PET [J]. Nucl Med, 2007, 48(6):946-954.

[16] Kaukola T, Satyaraj E, Patel DD, Tchernev VT, Grimwade BG, Kingsmore SF, et al. Cerebral palsy is characterized by protein mediators in cord serum [J]. Ann Neurol, 2004, 55(2):186-194.

[17] Pang Y, Cai Z, Rhodes PG. Effects of lipopolysaccharide on oligodendrocyte progenitor cells are mediated by astrocytes and microglia [J]. J Neurosci Res, 2000, 62(4):510-520.

[18] Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling [J]. J Neurooncol, 2000, 50(1-2):1-15.

[19] Debillon T, Gras-Leguen C, Verielle V, Winer N, Caillon J, Roze JC, et al. Intrauterine infection induces programmed cell death in rabbit periventricular white matter [J]. Pediatr Res, 2000, 47(6):736-742.

(本文编辑:王庆红)