

论著·实验研究

## 胶质细胞源性营养因子和美金胺对脑室周围白质软化新生大鼠远期预后的影响

李文娟 陈惠金 钱龙华 何亚芳 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 评估胶质细胞源性营养因子(GDNF)和美金胺对脑室周围白质软化(PVL)新生 Sprague-Dawley 大鼠远期预后的影响。方法 32只5日龄新生大鼠随机分为假手术(Sham)组、PVL组、GDNF组以及美金胺(Mem)组。除Sham组外,其他3组均行右颈总动脉结扎及缺氧处理(PVL造模)。GDNF组和Mem组分别于造模后即刻注射GDNF 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和Mem 20  $\text{mg}/\text{kg}$ 。每天对各组大鼠称重。于26日龄(造模后21 d)对各组大鼠进行Morris水迷宫测试及Rivlin斜板实验,记录水迷宫测试时的逃逸潜伏期(escape latency, EL)和游泳距离以及斜板测试时在斜板上至少停留5 s的最大倾斜角度。结果 术后PVL组大鼠的平均体重明显低于Sham组和两个用药组( $P < 0.05$ );EI值和游泳距离均较Sham组和两个用药组显著延长( $P < 0.05$ 或 $< 0.01$ );在斜板上至少停留5 s的最大倾斜角度明显低于Sham组和两个用药组( $P < 0.05$ )。两个用药组和Sham组在体重、EI和游泳距离以及斜板的最大倾斜角度之间的差异均无统计学意义。结论 GDNF和Mem均可增强PVL大鼠的空间辨识、学习记忆和运动协调能力,促进体重增长,明显改善远期预后。 [中国当代儿科杂志,2011,13(9):743-746]

**[关键词]** 脑室周围白质软化;胶质细胞源性营养因子;美金胺;新生大鼠

**[中图分类号]** R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)09-0743-04

### Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and memantine on long-term prognosis in neonatal rats with periventricular leukomalacia

LI Wen-Juan, CHEN Hui-Jin, QIAN Long-Hua, HE Ya-Fang, 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 evaluate the effects of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and memantine on the long-term prognosis in neonatal rats with ischemia-induced periventricular leukomalacia (PVL). **Methods** Thirty-two 5-day-old neonatal rats were randomly divided into 4 groups: sham-operated, PVL, GDNF-treated and memantine-treated. PVL was induced by right carotid artery ligation and hypoxia in the PVL, GDNF-treated and memantine-treated groups. GDNF (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) or memantine (20  $\text{mg}/\text{kg}$ ) was injected in the two treatment groups immediately after PVL induction. The weight of the rats was measured immediately before and after hypoxia ischemia (HI). Both of Morris water maze test and Rivlin inclined plane test were performed at 26 days old (21 days after HI). The values of the escape latency (EL) and swimming distance, and the maximum inclined plane degree which the rats could stand at least 5 seconds were compared among the four groups. **Results** The lower weight, the prolonged mean values of EL and swimming distance and the reduced maximum inclined plane degree were observed in the PVL group compared to those in the sham-operated, GDNF-treated and memantine-treated groups. There were no significant differences in the weight, the values of EI and swimming distance and the maximum inclined plane degree between the two treatment groups and the sham-operated group. **Conclusions** The administration of either GDNF or memantine can markedly increase the abilities of spatial discrimination, learning and memory, and motor coordination, promote weight gain, and improve long-term prognosis in rats with PVL. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (9):743-746]

**Key words:** Periventricular leukomalacia; Glial cell line-derived neurotrophic factor; Memantine; Neonatal rats

脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL)是早产儿常见脑损伤,是脑瘫和智力、视

听障碍的主要原因,迄今尚无有效防治方法。研究证实,在哺乳动物脑内始终存在着具有神经干细胞

[收稿日期]2011-03-22; [修回日期]2011-04-20

[基金项目]国家自然科学基金(81070989)。

[作者简介]李文娟,女,硕士研究生。

[通信作者]陈惠金,教授。

功能的神经祖细胞(progenitor),缺血损伤可诱导激活脑内神经祖细胞出现增殖、分化并迁移至损伤部位进行修复<sup>[1]</sup>。然而神经再生是一极其复杂的过程,与相关神经营养因子的调控和祖细胞实施修复功能的脑微环境有关。胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF)是一种与神经细胞生长、存活相关的神经营养细胞因子,本研究组以往研究曾证实 GDNF 能明显促进外源性神经干细胞分化为少突胶质细胞前体,增加髓鞘的形成,从而有助于脑室周围白质损伤的进一步改善<sup>[2]</sup>。美金胺(Mem)作为一种非竞争性 NMDA 受体拮抗剂,可有效阻断缺血诱导未成熟脑白质的谷氨酸异常信号传输路径,改善脑内不良微环境,对脑缺血性损伤具有良好的神经保护作用<sup>[3]</sup>。本研究在以往研究的基础上,拟通过 Morris 水迷宫测试和 Rivlin 斜板测试等方法,分别评估 GDNF 和 Mem 对 PVL 新生大鼠远期预后的影响,以期寻找 PVL 的有效治疗方法并探讨相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

32 只 5 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]。随机分为假手术(Sham)组、PVL 组、GDNF 组以及 Mem 组,每组各 8 只。造模前后所有新生大鼠均置于(20±2)℃、湿度 60%~70% 的 IVC 饲养盒内,母乳自由喂养。

### 1.2 制备缺血型 PVL 新生大鼠模型

参照本研究组已建立的 PVL 模型制备方法<sup>[4-5]</sup>: 5 日龄新生大鼠乙醚麻醉后,固定于仰卧位,颈部正中切口,分离并结扎右侧颈总动脉,术毕缝合切口,火棉胶涂抹伤口。术后 30 min 将新生大鼠送入恒温缺氧箱内缺氧 2 h,箱温 37℃,湿度(70±5)%,以 1.5 L/min 的流量恒定输入 8% O<sub>2</sub> 和 92% N<sub>2</sub> 混合气体。Sham 组仅予游离右侧颈总动脉,不予结扎和缺氧。术毕各组大鼠送回母鼠身边继续喂养。

### 1.3 给药方法

GDNF 组于造模后即刻在脑立体定位仪下经右侧脑室注入 GDNF 100 μg/kg(购自 Perotech 公司),进针点位于前囟右侧 5 mm,后侧 2 mm,深度 2 mm,经微量注射泵以 0.5 μL/min 的速度缓慢注入脑室内。Mem 组于造模后即刻经腹腔注入 Mem 20 mg/kg

(购自 Sigma 公司)。PVL 组和 Sham 组则不予用药。

### 1.4 评估方法

1.4.1 体重监测 建模前和建模后每天监测各组大鼠体重。

1.4.2 Morris 水迷宫实验 Morris 水迷宫装置由黑色圆形铁皮水池、平台和记录设备(电脑和摄像头)组成。水池直径 120 cm,池壁用不同颜色标记 4 个人水点,将水池均分为 4 个象限,平台固定放置于其中一个象限内。实验前将水池灌以清水至超过平台 2 cm,再加入适量墨汁使之成为不透明黑色,水温控制在 23~25℃ 之间。造模 17 d 始连续 4 d 对大鼠进行训练,将大鼠分别从 4 个人水点放入水中,让其自由游泳 120 s 以熟悉环境,若大鼠在 120 s 内找到平台,遂让其在平台上站立 10 s,若不能找到平台,则将大鼠放置于平台上 10 s,以增强其记忆力。于造模后 21 d 对各组大鼠正式进行测试,分别记录各入水点大鼠找到平台的时间即逃逸潜伏期(escape latency, EL)和游泳距离,根据 EL 和游泳距离的长短,判断大鼠的空间辨识和学习记忆功能,EL 值和游泳距离越小,提示学习记忆速度越快,空间辨识能力越强。

1.4.3 Rivlin 斜板实验 由本研究组自行改良设计的 Rivlin 斜板由两个矩形有机玻璃板铰链形成,其中一块作为底板,另一块为可调节角度的倾斜板,板面覆盖厚约 0.2 cm 的橡皮垫。将 26 日龄(建模后 21 d)大鼠垂直置于倾斜板上,每次升高角度 2.5°,测定大鼠在斜板上至少停留 5 s 的最大倾斜角度,共测试 3 次,取其平均值。大鼠停留的倾斜角度越高,提示其肌肉协调能力越强。

### 1.5 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件,所有数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析、SNK 检验进行分析,方差不齐的两样本比较采用 Wilcoxon 秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠体重比较

PVL 组大鼠造模后出现皮肤发绀、活动减少、睁眼时间延迟、体重增长缓慢等异常表现。术前各组大鼠的体重差异无统计学意义(表 1),术后 PVL 组大鼠的平均体重明显低于 Sham 组和两个用药组( $P < 0.05$ )。两个用药组间以及用药组和 Sham 组间在体重之间的差异则无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**表1 各组大鼠建模前后体重比较** ( $\bar{x} \pm s, g; n = 8$ )

组别	建模前	建模后 7 d	建模后 14 d	建模后 21 d
Sham 组	13.2 ± 1.0	25.9 ± 1.3	41.6 ± 2.6	60.7 ± 5.2
PVL 组	12.9 ± 1.6	21.3 ± 3.3 <sup>a</sup>	35.2 ± 4.2 <sup>a</sup>	49.1 ± 7.6 <sup>a</sup>
GDNF 组	13.3 ± 1.2	26.2 ± 4.0 <sup>b</sup>	43.7 ± 7.3 <sup>b</sup>	59.7 ± 6.8 <sup>b</sup>
Mem 组	13.3 ± 1.9	25.7 ± 5.2 <sup>b</sup>	41.2 ± 7.0	57.4 ± 9.4
F 值	0.165	3.137	3.466	4.641
P 值	0.919	0.041	0.029	0.017

a: 与 sham 组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与 PVL 组比较,  $P < 0.05$

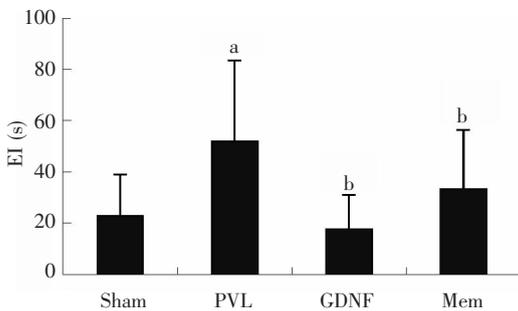
## 2.2 各组大鼠 Morris 水迷宫测试结果

各组大鼠于造模后 17 d 始进行水迷宫测试训练,随着训练天数的增加,各组大鼠的 EI 值和游泳距离逐渐缩短。建模后 21 d 正式测试,结果显示(表 2,3;图 1,2),PVL 组的平均 EI 值和平均游泳距离( $52 \pm 32$  s,  $1609 \pm 1032$  cm)均明显长于 Sham 组( $23 \pm 16$  s,  $397 \pm 324$  cm)、GDNF 组( $18 \pm 14$  s,  $459 \pm 343$  cm)和 Mem 组( $33 \pm 23$  s,  $692 \pm 520$  cm)。进一步进行两两比较,显示 PVL 组大鼠在第一和第二象限的 EI 值和游泳距离均较 Sham 组和两个用药组显著延长( $P < 0.05$  或  $< 0.01$ ),两个用药组与 Sham 组在 EI 和游泳距离之间的差异则均无统计学意义( $P > 0.05$ )。GDNF 组的 EI 值及游泳距离虽然均短于 Mem 组,但两个用药组间的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**表2 各组大鼠 26 日龄水迷宫各象限 EI 值比较** ( $\bar{x} \pm s, s$ )

组别	第一象限	第二象限	第三象限	第四象限
Sham 组	11 ± 5	16 ± 8	25 ± 14	23 ± 17
PVL 组	50 ± 39 <sup>a</sup>	37 ± 14 <sup>a</sup>	58 ± 28 <sup>a</sup>	63 ± 39 <sup>a</sup>
GDNF 组	15 ± 16 <sup>b</sup>	16 ± 12 <sup>b</sup>	17 ± 15 <sup>c</sup>	22 ± 13 <sup>b</sup>
Mem 组	13 ± 8 <sup>b</sup>	20 ± 17 <sup>b</sup>	38 ± 6	37 ± 29

a: 与 Sham 组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与 PVL 组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与 PVL 组比较,  $P < 0.01$

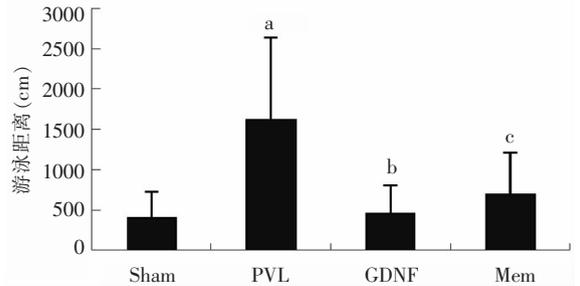


**图1 各组大鼠 26 日龄四个象限的平均 EI 值比较** a: 与 Sham 组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与 PVL 组比较,  $P < 0.01$

**表3 各组大鼠 26 日龄水迷宫各象限游泳距离比较** ( $\bar{x} \pm s, cm$ )

组别	第一象限	第二象限	第三象限	第四象限
Sham 组	249 ± 206	452 ± 307	501 ± 415	387 ± 340
PVL 组	1866 ± 140 <sup>a</sup>	1228 ± 542 <sup>a</sup>	1355 ± 554 <sup>a</sup>	1985 ± 1298 <sup>a</sup>
GDNF 组	473 ± 400 <sup>b</sup>	355 ± 237 <sup>c</sup>	383 ± 313 <sup>c</sup>	624 ± 397 <sup>b</sup>
Mem 组	384 ± 182 <sup>b</sup>	510 ± 364 <sup>b</sup>	947 ± 459	927 ± 134

a: 与 Sham 组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与 PVL 组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与 PVL 组比较,  $P < 0.01$



**图2 各组大鼠 26 日龄四个象限的平均游泳距离比较** a: 与 Sham 组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与 PVL 组比较,  $P < 0.01$ ; c: 与 PVL 组比较,  $P < 0.05$

## 2.3 各组大鼠斜板测试结果

26 日龄(造模后 21 d)的 Rivlin 斜板测试显示,各组大鼠在斜板上至少停留 5 s 的最大倾斜角度之间的差异有统计学意义( $F = 3.561, P < 0.05$ )。进一步两两比较显示,PVL 组( $40.9 \pm 2.2$  度,范围:  $37.5 \sim 43$  度)的最大倾斜角度明显低于 Sham 组( $44.0 \pm 3.4$  度,范围:  $38 \sim 50$  度)、GDNF 组( $43.3 \pm 1.4$  度,范围:  $42.5 \sim 46$  度)和 Mem 组( $43.9 \pm 0.8$  度,范围:  $41.5 \sim 45$  度)( $P < 0.05$ )。两个用药组间和 Sham 组间在最大倾斜角度之间的差异则均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

早产儿 PVL 是脑室周围未成熟白质的缺血性病变,以形成髓鞘的少突胶质细胞前体的受损和丢失为特征<sup>[6]</sup>,引起轴索髓鞘化障碍,动作电位传递速度下降甚至终止,进而严重影响神经功能的正常发挥。缺血可诱导激活谷氨酸的异常信号传输、脑内 NO 等氧化产物的增加以及神经营养因子的缺乏,导致脑内再生神经细胞多在数周内死亡,因而脑的内源性修复功能十分有限<sup>[7]</sup>。

GDNF 是一种与多巴胺能和运动能神经细胞的生长、存活相关的神经营养细胞因子,对中枢和周围神经系统的轴突生长和髓鞘化有明显促进作用,属于转化因子  $\beta$  超家族成员。近年研究显示,GDNF 通过 MAPK 信号传导途径,可提升脑 SVZ(侧脑室

室管膜下区)和SGZ(海马齿状回颗粒下层)的神经祖细胞对表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor 2, FGF2)的反应性,促进神经祖细胞增殖分化为少突胶质细胞,有助于白质髓鞘化<sup>[8]</sup>。

近年来已确认脑白质内存在大量的NMDA受体<sup>[9]</sup>,缺血诱导不成熟脑白质内谷氨酸的异常信号传输,可能是导致早产儿发生缺血性PVL的主要原因<sup>[10]</sup>。Mem是目前唯一在临床应用的NMDA受体拮抗剂,其通过与NMDA受体通道内的苯环己哌啶(phencyclidine, PCP)位点结合,可有效抑制钙离子通道开放,阻断NMDA受体激活及由之引起的缺血性兴奋毒损伤,抑制神经细胞的凋亡和坏死<sup>[11]</sup>,从而有利于改善脑微环境,促进内源性神经干细胞的增殖、分化及迁移,提高再生细胞的成活率,增强脑的内源性修复功能。本研究组以往曾对脑缺血缺血损伤新生大鼠在造模后即刻应用Mem,显示Mem可明显增强脑缺氧缺血大鼠的空间辨识能力和学习记忆功能,显著改善其长期预后<sup>[3]</sup>。

在上述本研究组系列研究的基础上,本研究对一组PVL新生大鼠在造模后即刻分别应用GDNF和Mem,通过在26日龄进行Morris水迷宫测试和Rivlin斜板测试,评估GDNF和Mem对PVL新生大鼠长期预后的影响。Morris水迷宫实验是目前公认为评估大鼠学习记忆和空间辨识功能最为经典的行为学测试方法<sup>[12]</sup>。本研究的水迷宫测试结果显示,PVL组大鼠的平均EI值和游泳距离均较两个用药组和Sham组显著延长,两个用药组的测试结果则接近Sham组。提示GDNF和Mem均能明显增强PVL大鼠的学习记忆、空间辨识及认知能力,尤其GDNF有更良好的效果。这种良好的增强作用可能与这两种药物能促进脑的内源性神经再生及改善脑微环境密切相关。

斜板实验由Allmark等创建于1949年<sup>[13]</sup>。Rivlin等<sup>[14]</sup>于1977年对斜板方法进行了改良。由于Rivlin斜板实验简便易行,目前已成为评价神经肌肉功能的常用方法。本研究Rivlin斜板实验结果显示,PVL组大鼠在斜板上至少停留5s的最大倾斜角度明显低于Sham组和两个用药组。两个用药组的测试结果则接近Sham组。提示PVL大鼠脑白质损伤可能导致支配肢体的锥体束损伤,致使出现肢体的肌力下降和运动协调和维持姿势的能力下降。本研究中PVL组和Sham组最大倾斜角度之间相差约为3~5度,低于通常的研究结果<sup>[14-15]</sup>。其原因主要与本研究所使用的模型有关。由于本研究制作的PVL模型采用一侧颈总动脉结扎,主要引起同侧白质损伤及对侧肢体损伤。在斜板实验中,虽然PVL组大鼠的一侧肢体呈肌力下降,但尚能借助

损伤不严重的另一侧肢体依附在附有橡皮垫的斜板上,这是两组最大倾斜角度差距没有更大拉开的主要原因。这种现象也可见于对局部脑缺血大鼠进行斜板测试但效果不理想的一些文献报道中<sup>[16-17]</sup>。

综上所述,本研究显示GDNF和Mem均可明显改善PVL大鼠的远期预后,有望成为治疗早产儿PVL的有效药物。

### [参 考 文 献]

- [1] Fagel DM, Ganat Y, Silbereis J, Ebbitt T, Stewart W, Zhang H, et al. Cortical neurogenesis enhanced by chronic perinatal hypoxia [J]. *Exp Neurol*, 2006, 199(1): 77-91.
- [2] 贺月秋,陈惠金,钱龙华,陈冠仪. GDNF能增强神经干细胞经脑室移植治疗脑室周围白质软化新生大鼠的疗效[J]. *临床儿科杂志*, 2009, 27(10): 963-970.
- [3] 高瑛,陈惠金,钱龙华,陈冠仪. 金胺治疗对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠长期预后的影响研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2006, 8(1): 38-40.
- [4] 贺月秋,陈惠金,钱龙华,陈冠仪. 脑室周围白质软化新生大鼠模型的创建及所伴随的白内障病变[J]. *中国当代儿科杂志*, 2007, 9(3): 220-224.
- [5] 贺月秋,陈惠金,钱龙华,陈冠仪. 不同缺血方式制作脑室周围白质软化大鼠模型比较[J]. *实验动物与比较医学*, 2010, 30(3): 153-157.
- [6] Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity[J]. *Arch Dis Child Fetal Neonatal EJ*, 2008, 93(2): F153-F161.
- [7] Franklin RJ. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3(9): 705-714.
- [8] 李云涛,晋光荣,徐汉荣,刘俊华,陆澄. GDNF对局灶性脑缺血大鼠SVZ和SGZ细胞增殖及学习记忆的影响[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2005, 108(2): 111-114.
- [9] Kúradóttir R, Cavelier P, Bergersen LH, Attwell D. NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia[J]. *Nature*, 2005, 438(7071): 1162-1166.
- [10] 李文娟,陈惠金. 缺血诱导未成熟脑白质谷氨酸异常信号传输的研究进展[J]. *中国当代儿科杂志*, 2011, 13(3): 268-272.
- [11] Manning SM, Talos DM, Zhou C, Selip DB, Park HK, Park CJ, et al. NMDA receptor blockade with memantine attenuates white matter injury in a rat model of periventricular leukomalacia[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(26): 6670-6678.
- [12] Morris R. Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. *J Neurosci Methods*, 1984, 11(1): 47-60.
- [13] Allmark MG, Bachinski WM. A method of assay for curare using rats[J]. *Am Pharmacol Assoc*, 1949, 38: 43-45.
- [14] Rivlin AS, Talor CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat[J]. *J Neurosurg*, 1977, 47(4): 577-581.
- [15] 宋海涛,贾连顺,陈哲宇,曹丽,袁文,王成海. 胶质源性营养因子对大鼠脊髓不完全损伤后运动功能的保护[J]. *中国康复医学杂志*, 2001, 16(2): 71-73.
- [16] 邹晓萍,李晓瑜,李亮亮,庄思齐,车丽红. 米诺环素对未成熟新生大鼠缺血缺氧性脑损伤的作用[J]. *中华儿科杂志*, 2010, 48(11): 848-854.
- [17] Chang MW, Young MS, Lin MT. An inclined plane system with microcontroller to determine limb motor function of laboratory animals[J]. *J Neurosci Methods*, 2008, 168(1): 186-194.

(本文编辑:邓芳明)