

论著·实验研究

围产期反复感染对未成熟鼠脑发育的影响

宋丽丽¹ 黄志恒² 裴益玲² 陈超²

(1. 复旦大学附属妇产科医院新生儿科, 上海 200090;
2. 复旦大学附属儿科医院新生儿科, 上海 201102)

[摘要] **目的** 探讨围产期反复感染对未成熟脑发育的影响及相关机制。**方法** 将6只C57BL/6孕小鼠随机分为宫内感染组、反复感染组与正常对照组。母鼠于妊娠第18天单次腹腔注射LPS(0.5 mg/kg)制成宫内感染脑损伤模型;反复感染组取宫内感染母鼠所生仔鼠,于生后3~12 d每日腹腔注射单剂LPS(0.5 mg/kg)制成围产期反复感染脑损伤模型;对照组用等量生理盐水替代LPS在上述相同时间点给予母鼠和仔鼠腹腔注射。各组仔鼠于生后13 d分别评估早期神经行为改变。评估完成后处死取脑组织检测脑重变化;焦油紫染色进行神经病理学评估;Western blot检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)和髓鞘碱性蛋白(MBP)的表达变化。**结果** 与对照组和宫内感染组相比,围产期反复感染组仔鼠脑重下降($P<0.05$),且表现出较为明显的神经病理学改变。Western blot结果显示反复感染组TNF- α 和Caspase-3的表达水平均高于宫内感染组与正常对照组(均 $P<0.01$);而MBP表达量却低于宫内感染组与正常对照组($P<0.01$)。神经行为学检测结果显示,生后13 d时反复感染组小鼠步态反射、翻正反射与负向趋地反射完成时间均长于宫内感染组与正常对照组(均 $P<0.05$)。**结论** 围产期反复感染加重未成熟脑组织内的炎症反应与神经细胞凋亡,是导致未成熟脑白质损伤的重要危险因素。

中国当代儿科杂志, 2014, 16(12): 1260-1264

[关键词] 宫内感染;重复感染;未成熟脑;损伤;小鼠

Effect of perinatal recurrent infection on the brain development in immature mice

SONG Li-Li, HUANG Zhi-Heng, PEI Yi-Ling, CHEN Chao. Department of Neonatology, Obstetrics and Gynecology Hospital of Fudan University, Shanghai 200090, China (Chen C, Email: chen6010@163.com)

Abstract: Objective To study the effects of perinatal recurrent infection on the brain development in immature mice. **Methods** Six pregnant C57BL/6 mice were randomly assigned to three groups: intrauterine infection, perinatal recurrent infection and control. The intrauterine infection group was intraperitoneally injected with LPS (0.5 mg/kg) on the 18th day of pregnancy. The perinatal recurrent infection group was injected with LPS (0.5 mg/kg) on the 18th day of pregnancy and their offsprings were intraperitoneally injected with the same dose of LPS daily from postnatal day 3 to 12. The control group was administered with normal saline at the same time points as the recurrent infection group. The short-time neurobehaviors were assessed on postnatal day 13. The mice were then sacrificed to measure brain weights and neuropathological changes using cresyl violet staining. Western blot was used to evaluate the expression of TNF- α , Caspase-3 and myelin basic protein (MBP). **Results** The brain weights of the recurrent infection group were significantly lower than the control and intrauterine infection groups ($P<0.05$) and the recurrent infection group displayed significant neuropathological changes. Perinatal recurrent infection resulted in increased expression levels of TNF- α and Caspase-3, and decreased expression level of MBP compared with the intrauterine infection and control groups ($P<0.01$). The neurobehavior test showed that the recurrent infection group used longer time in gait reflex, right reflex and geotaxis reflex compared with the control and intrauterine infection groups on postnatal day 13 ($P<0.05$). **Conclusions** Perinatal recurrent infection may exacerbate inflammatory response and cell death in the immature brain, which may be one of the important factors for perinatal brain injury.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(12): 1260-1264]

Key words: Intrauterine infection; Recurrent infection; Immature brain; Injury; Mice

[收稿日期] 2014-06-03; [接受日期] 2014-07-23

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81100450; 81300520)。

[作者简介] 宋丽丽,女,硕士,主治医师。

[通信作者] 陈超,男,主任医师,教授。

随着围产医学的发展,早产儿救治的水平在不断提高,然而由于早产儿脑发育的不成熟性,容易出现“早产儿脑病”,导致脑性瘫痪、认知缺陷等神经系统后遗症^[1]。近年研究表明围产期感染是导致“早产儿脑病”的重要原因。产前绒毛膜羊膜炎、胎膜早破等是导致宫内感染的重要原因,而新生儿期发生的败血症、脑膜炎及坏死性小肠结肠炎等是导致生后感染的重要原因^[2-3]。宫内感染与生后感染对未成熟脑损伤的影响国内外已经有报道。宫内感染作为“初次打击”,对胎儿及新生儿脑造成损伤。免疫功能低下的早产儿在新生儿科救治时容易出现院内感染,出现“二次打击”^[4],然而围产期反复感染对未成熟脑损伤的影响如何,目前未见报道。本研究在国内外首次通过新生小鼠围产期反复感染脑损伤动物模型,探讨髓鞘发育障碍与神经功能障碍的关系,以期进一步阐述早产儿脑损伤的机制,为今后的预防、治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型制作

清洁级孕18d C57BL/6小鼠共6只,购自斯莱克实验动物有限公司。所有母鼠随机分为宫内感染组、围产期反复感染组和对照组。宫内感染模型制作方法参照文献^[5],即给予孕18d C57BL/6母鼠单剂腹腔注射LPS(0.5 mg/kg)。围产期反复感染脑损伤模型制作方法参照文献^[6],即宫内感染母鼠所生仔鼠在生后第3~12天,连续每日固定时间腹腔注射1次LPS(0.5 mg/kg)。对照组均用等量生理盐水替代LPS在上述相同时间点给予母鼠和仔鼠腹腔注射。注射结束后,动物放回动物房饲养。各组仔鼠生后第3~12天每日测量体重变化情况,于生后第13天待神经发育检测完成后处死。

1.2 取材

各组仔鼠经水合氯醛麻醉,右心房处剪一切口,然后用注射器于左心室灌注生理盐水,至流出液体变清为止。4%多聚甲醛灌注。取脑后置于4%多聚甲醛里4℃冰箱过夜,梯度蔗糖脱水,脑组织沉底后称重,将固定脑组织取视交叉水平冰冻切片,厚度为30 μm。脑片放于原位杂交脑保护液中,-20℃冰箱保存。

1.3 神经病理评估

生后13d,每组各取仔鼠8只,每只仔鼠取相同侧脑室层面脑片1张,贴片干燥后常规采用焦油紫染色,评价胼胝体及脑室大小。

1.4 Western blot 检测

生后13d,每组各取6只仔鼠全脑组织,0.25%胰酶消化及离心后收集细胞沉淀,蛋白裂解液抽提细胞蛋白。取上清,BCA法测蛋白浓度,各孔加入100 μg蛋白样品电泳、转膜,5%小牛血清封闭液封闭1h,加入肿瘤坏死因子-α多克隆抗体(TNF-α,1:500,Millipore)、半胱氨酸蛋白酶-3多克隆抗体(Caspase-3,1:1000,CST),髓鞘碱性蛋白单克隆抗体(MBP,1:1000,Covance),TBST洗膜3次,二抗室温孵育1h,TBST洗膜3次,ECL显色,用凝胶成像分析软件测定条带的积分光密度值(IOD),并计算目的蛋白和内参β-actin的IOD比值,即为相对光密度。

1.5 神经行为发育测定

生后第13天,每组8只仔鼠分别检测步态反射、翻正反射和负向趋地反射,每项间隔时间10 min,重复4次,计算各组平均时间,以评价早期神经行为发育情况;如果动物在规定时间内不能完成任务,步态反射记录最长时间为60 s^[7]。

1.6 统计学分析

采用SPSS 13.0软件对数据进行统计学分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较行单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组体重与脑重变化

各组仔鼠生后3~12d每日监测体重,测定每日体重增长值,对照组平均每日增重 0.49 ± 0.14 g,反复感染组平均每日增重 0.40 ± 0.08 g,宫内感染组平均每日增重 0.41 ± 0.05 g,3组比较差异无统计学意义($F=1.38, P>0.05$)。生后第13天各组仔鼠处死后,统一称重脑组织,结果表明对照组、宫内感染组和反复感染组仔鼠脑重分别为 0.35 ± 0.02 g、 0.29 ± 0.01 g和 0.26 ± 0.01 g,差异有统计学意义($F=52.16, P<0.01$),围产期反复感染组脑重下降最为明显,与对照组和宫内感染

组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.2 神经病理学评估

焦油紫染色进行神经病理学评估。结果显示宫内感染与反复感染均引起未成熟脑组织萎缩,具体表现为侧脑室体积扩大,胼胝体厚度变薄、脑皮质区神经细胞疏松等,反复感染组的上述病理学改变更为突出,见图 1。

2.3 围产期反复感染对脑损伤的影响

取各组生后 13 d 仔鼠脑组织,行匀浆后进行 Western blot 检测。结果显示反复感染组 TNF- α 和

Caspase-3 表达水平均明显高于对照组和宫内感染组 (均 $P<0.01$)。MBP 标记脑白质髓鞘发育情况,结果显示反复感染组 MBP 表达水平明显低于对照组和宫内感染组 ($P<0.01$)。见表 1, 图 2。

2.4 反复感染对各组脑神经行为发育的影响

检测生后 13 d 各组仔鼠的步态反射、翻正反射和负向趋地反射,评估各组早期神经行为发育。结果显示,不论是步态反射、翻正反射,还是负向趋地反射,反复感染组完成反射所需时间均明显长于对照组和宫内感染组 (均 $P<0.01$) ,见表 2。

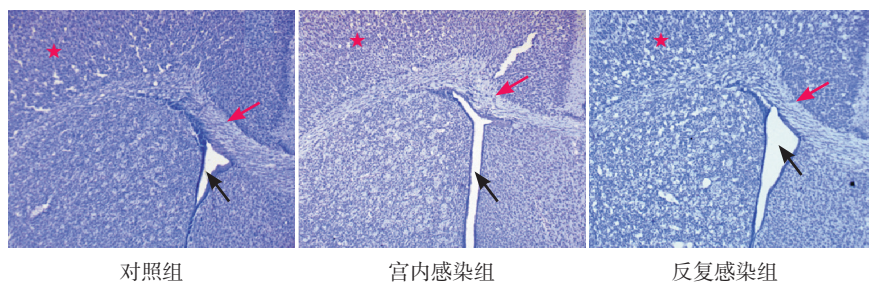


图 1 各组仔鼠生后 13 d 脑组织神经病理学评估 (焦油紫染色, $\times 10$) 与对照组和宫内感染组相比,反复感染组脑组织胼胝体明显变薄、侧脑室明显扩张、大脑皮质区结构疏松。红色箭头示胼胝体,黑色箭头示侧脑室,★示脑皮质区。

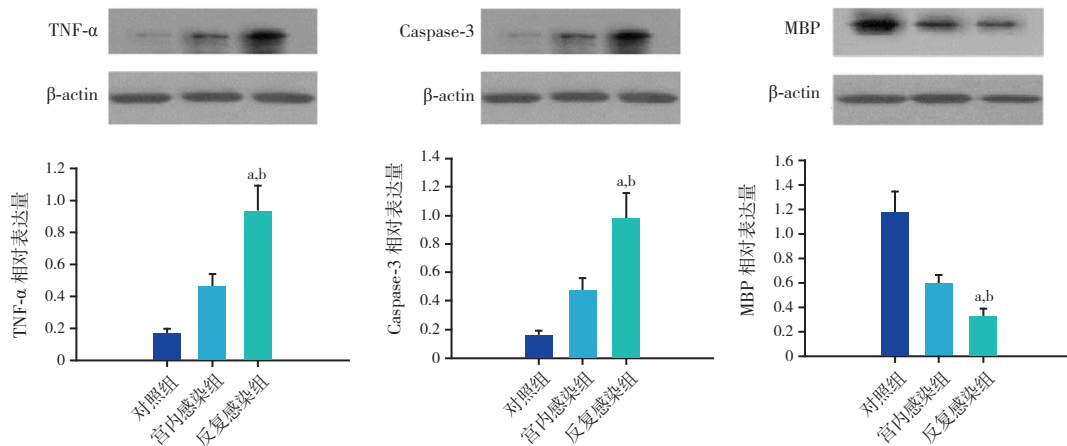


图 2 Western blot 定量分析围产期反复感染对未成熟脑组织 TNF- α 、Caspase-3 和 MBP 表达的影响 ($n=6$)

上图为 Western blot 电泳条带图; 下图为统计图, a 示与对照组比较, $P<0.05$; b 示与宫内感染组比较, $P<0.05$ 。

表 1 各组 TNF- α 、Caspase-3 和 MBP 表达水平比较
($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TNF- α	Caspase-3	MBP
对照组	6	0.17 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.04	1.17 $\pm$ 0.17
宫内感染组	6	0.46 $\pm$ 0.07	0.47 $\pm$ 0.09	0.59 $\pm$ 0.08
反复感染组	6	0.93 $\pm$ 0.16 ^{a,b}	0.98 $\pm$ 0.18 ^{a,b}	0.33 $\pm$ 0.06 ^{a,b}
<i>F</i> 值		52.23	52.00	52.12
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01

注: a 示与对照组比较, $P<0.05$; b 示与宫内感染组比较, $P<0.05$ 。

表 2 各组大鼠脑神经行为发育指标比较 ($\bar{x} \pm s, s$)

组别	<i>n</i>	步态反射	翻正反射	负向趋地反射
对照组	6	8.8 $\pm$ 1.3	1.3 $\pm$ 0.3	10.5 $\pm$ 2.2
宫内感染组	6	9.3 $\pm$ 1.3	1.5 $\pm$ 0.3	10.2 $\pm$ 1.8
反复感染组	6	16.0 $\pm$ 3.7 ^{a,b}	3.5 $\pm$ 0.4 ^{a,b}	14.7 $\pm$ 3.3 ^{a,b}
<i>F</i> 值		4.576	6.050	3.440
<i>P</i> 值		0.028	0.012	0.039

注: a 示与对照组比较, $P<0.05$; b 示与宫内感染组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

随着围产医学的日益发展,早产儿存活率在不断增加。早产儿由于脑发育不成熟,容易发生以脑室周围白质损伤同时伴有灰质神经元及轴突破坏为特征的“早产儿脑病”,导致神经功能发育障碍。

国内外研究发现,围产期脑损伤除了与缺氧缺血关系密切外,感染/炎症同样也是重要原因。围产期感染包括宫内感染与新生儿期感染。宫内感染又称先天性感染,是由于孕妇在妊娠期出现绒毛膜羊膜炎及TORCH感染等,导致胎儿感染性脑损伤。虽然目前新生儿尤其早产儿存活率在不断提高,然而其免疫功能非常不成熟,在新生儿期容易感染葡萄球菌、绿脓杆菌、大肠埃希菌等,引起败血症、脑膜炎及坏死性小肠结肠炎等各种问题,导致新生儿期脑损伤^[8-9]。由于未成熟脑对损伤的敏感因素存在不同程度差异,影像学表现也各有不同,有的损伤较为轻微,可以恢复到完全正常,有的损伤较为严重,出现脑性瘫痪、认知缺陷等神经系统后遗症^[7,10]。究竟是什么原因引起这些差异,具体机制目前不清,需要深入的研究。

动物实验表明宫内感染与生后感染均是导致新生儿脑损伤的重要因素。以往利用孕鼠腹腔注射内毒素,模拟宫内感染,造成脑损伤;生后2~5 d小鼠脑发育与23~32周早产儿脑内白质发育大致相当,所以有人采用生后3 d新生小鼠开始连续多日腹腔注射LPS,模拟新生儿期感染。以上两种模型均造成炎症因子释放,神经细胞凋亡,神经行为出现障碍。本研究参考以上文献采用宫内感染脑损伤模型,模拟胎儿宫内感染受到“初次打击”情况,制作出产前感染引起的脑损伤^[11],同时利用部分宫内感染的小鼠于出生后连续腹腔注射LPS,使其新生儿期再次发生感染,出现“二次打击”的情况,制作反复感染脑损伤动物模型。本研究发现反复感染组小鼠体重不受影响,而脑重量明显下降,焦油紫染色提示胼胝体变薄,侧脑室扩大,说明反复感染比单纯宫内感染对脑损伤的危害更为严重,而且对高级系统影响更明显。

到目前为止,宫内感染与新生儿期感染引起的炎症反应、神经细胞凋亡仍是新生儿脑损伤不良预后的重要机制,一直受到关注^[3]。在脑损伤的急

性期,LPS可引起小胶质细胞、星形胶质细胞大量激活,分泌TNF- α 、IL-6、IL-8、NO等各种炎症因子,可以通过直接或间接作用引起神经细胞变性坏死。LPS也可与TLR2或TLR4结合,引起NF- κ B释放及下游Caspase-3激活,使神经细胞发生凋亡^[12]。Yanowitz等^[13]对胎龄25~31周的早产儿进行研究,发现母亲有绒毛膜炎时,脐血IL-6和IL-1 β 显著升高。感染或细胞因子还可引起全身血流动力学的不稳定,例如TNF- α 可直接使血管平滑肌舒张血压下降。TNF- α 和IL-1 β 还能促使血管内皮细胞生成舒血管因子,如前列腺环素和NO,使血管舒张。此外细胞因子还破坏血脑屏障,促使白细胞迁移和黏附,使大量炎性反应细胞进入脑组织,引起脑水肿,加重脑循环障碍。

少突胶质前体细胞是早产儿脑病的主要靶细胞,无论产前还是新生儿期感染/炎症均可对少突胶质细胞造成损伤。TNF- α 是肿瘤坏死因素家族重要成员之一,可直接杀死少突胶质细胞,机制可能与其介导的死亡途径有关。TNF- α 与肿瘤坏死因子I型受体结合,激活Caspase-3,从而引起Caspase级联反应,诱导细胞凋亡^[14]。此外,TNF- α 作为炎症因子也可抑制少突胶质细胞分化成熟而影响髓鞘正常生成^[15]。在本研究,反复感染后MBP染色评估脑白质发育情况,结果表明反复感染组髓鞘化障碍更为明显,可能与感染/炎症损伤少突胶质前体细胞,导致其凋亡有关。

本研究发现,围产期反复感染引起炎症因子表达的更多,神经细胞凋亡也更严重,以后未成熟脑髓鞘发育障碍更明显。机制可能是宫内感染时,破坏血脑屏障功能,导致生后再次感染时各种炎症因子更易通透血脑屏障,对少突胶质前体细胞的损伤更大^[16-17]。其次,也有可能宫内感染时抑制正常免疫系统,体内T淋巴细胞、B淋巴细胞功能低下,出现对再次发生损伤的不耐受^[8]。再次,早产儿脑血管自主调节功能障碍,容易形成压力被动性脑血流,反复感染可能对脑室周围长短穿通支血管影响更明显,导致脑供血不足,加重脑损伤。最后,宫内感染时可能引起脑内炎症、凋亡、兴奋性谷氨酸受体等相关基因高表达,影响未成熟脑神经细胞的发育,当再次发生感染时进一步促进这些基因表达,加重未成熟脑的损伤^[18]。

感染/炎症会导致神经行为的发育异常。评

价神经功能发育状况常见的指标在人类有新生儿NBNA、贝利量表、Gesell等,在啮齿类动物早期评估包括步态反射、翻正反射、悬崖回避反射、负向趋地反射等。神经行为的改变被认为是一种早期评价脑损伤敏感的指标。这些早期行为反射对了解远期发生神经功能障碍的几率很有意义^[19]。本动物实验发现,反复感染组新生小鼠表现出明显的神经发育障碍,表明围产期反复感染不仅对神经细胞结构造成损伤,对其功能也产生不利影响。早期的这些神经行为发育异常同样可预测远期神经行为情况,同时提示及早采取合理干预措施有非常重要的意义。

总之,本研究表明防治围产期感染是减少早产儿脑病发生的关键,不仅要防治宫内感染,而且要防治新生儿期感染,尽量避免围产期反复感染对未成熟脑的多次打击,这将对降低早产儿脑病发生率,提高远期生活质量有非常重要的意义。

[参 考 文 献]

- [1] Volpe JJ. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances[J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8(1): 110-124.
- [2] Yuan TM, Yu HM. Notch signaling: key role in intrauterine infection/inflammation, embryonic development, and white matter damage? [J]. *J Neurosci Res*, 2010, 88(3): 461-468.
- [3] Jenster M, Bonifacio SL, Ruel T, et al. Maternal or neonatal infection: association with neonatal encephalopathy outcomes[J]. *Pediatr Res*, 2014, 76(1): 93-99.
- [4] Berardi A, Rossi C, Lugli L, et al. Group B streptococcus late-onset disease: 2003-2010[J]. *Pediatrics*, 2013, 131(2): e361-e368.
- [5] Cai Z, Pan ZL, Pang Y, et al. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration[J]. *Pediatr Res*, 2000, 47(1): 64-72.
- [6] Wang X, Hellgren G, Löfqvist C, et al. White matter damage after chronic subclinical inflammation in newborn mice[J]. *J Child Neurol*, 2009, 24(9): 1171-1178.
- [7] Ten VS, Bradley-Moore M, Gingrich JA, et al. Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Behav Brain Res*, 2003, 145(1-2): 209-219.
- [8] Mallard C, Wang X. Infection-induced vulnerability of perinatal brain injury[J]. *Neurol Res Int*, 2012, 2012: 102153.
- [9] 黄志恒, 孙轶, 陈超. 早产儿脑病的研究现状 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2011, 13(10): 771-775.
- [10] Vinall J, Miller SP, Bjornson BH, et al. Invasive procedures in preterm children: brain and cognitive development at school age[J]. *Pediatrics*, 2014, 133(3): 412-421.
- [11] Chang EY, Zhang J, Sullivan S, et al. N-acetylcysteine attenuates the maternal and fetal proinflammatory response to intrauterine LPS injection in an animal model for preterm birth and brain injury[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2011, 24(5): 732-740.
- [12] Procianny RS, Silveira RC. Association between high cytokine levels with white matter injury in preterm infants with sepsis[J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2012, 13(2): 183-187.
- [13] Yanowitz TD, Jordan JA, Gilmour CH, et al. Hemodynamic disturbances in premature infants born after chorioamnionitis: association with cord blood cytokine concentrations[J]. *Pediatr Res*, 2002, 51(3): 310-316.
- [14] Wang X, Svedin P, Nie C, et al. N-acetylcysteine reduces lipopolysaccharide-sensitized hypoxic-ischemic brain injury[J]. *Ann Neurol*, 2007, 61(3): 263-271.
- [15] Kim S, Steelman AJ, Koito H, et al. Astrocytes promote TNF-mediated toxicity to oligodendrocyte precursors[J]. *J Neurochem*, 2011, 116(1): 53-66.
- [16] Cardoso FL, Kittel A, Veszelka S, et al. Exposure to lipopolysaccharide and/or unconjugated bilirubin impair the integrity and function of brain microvascular endothelial cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e35919.
- [17] Stridh L, Ek CJ, Wang X, et al. Regulation of Toll-like receptors in the choroid plexus in the immature brain after systemic inflammatory stimuli[J]. *Transl Stroke Res*, 2013, 4(2): 220-227.
- [18] Eklin S, Hagberg H, Wang X, et al. Effect of lipopolysaccharide on global gene expression in the immature rat brain[J]. *Pediatr Res*, 2006, 60(2): 161-168.
- [19] Wang KC, Fan LW, Kaizaki A, et al. Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats[J]. *Neuroscience*, 2013, 234: 146-157.

(本文编辑: 万静)