

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.03.016

论著·实验研究

## 胰岛素样生长因子-1对缺氧缺血性脑损伤大鼠远期焦虑行为的影响

汤琴 刘芙蓉 罗娅丽 黑明燕

(中南大学湘雅三医院儿科, 湖南 长沙 410013)

**[摘要]** **目的** 了解围产期缺氧缺血性脑损伤(HIBD)恢复期大鼠焦虑行为的变化,并通过胰岛素样生长因子-1(IGF-1)的干预来探讨IGF-1对HIBD大鼠远期焦虑行为的影响和相关机制。**方法** 将90只新生7日龄(P7)大鼠随机分为正常对照组、HIBD组和HIBD+IGF-1组,每组30只。Rice法制作新生大鼠HIBD模型,HIBD+IGF-1组于缺氧缺血(HI)后即刻腹腔注射IGF-1(0.2 mg/kg),其余两组腹腔注射等量的生理盐水。各组于P21和P28时采用高架十字迷宫检测动物的焦虑行为,并于P14、P21、P28时采用免疫组织化学方法检测中脑黑质酪氨酸羟化酶(TH)的表达。**结果** P21、P28时,HIBD组和HIBD+IGF-1组的开放臂停留时间和开放臂停留时间比率均明显低于正常对照组(均 $P<0.05$ ),但HIBD组与HIBD+IGF-1组之间差异均无统计学意义(均 $P>0.05$ );这两个时间点开放臂进入次数比率在3组间的差异均无统计学意义(均 $P>0.05$ )。P14时各组的TH免疫染色阳性面积百分比差异无统计学意义( $P>0.05$ );P21和P28时,HIBD组和HIBD+IGF-1组的TH免疫染色阳性面积百分比均明显低于正常对照组(均 $P<0.05$ ),但HIBD组与HIBD+IGF-1组之间差异均无统计学意义(均 $P>0.05$ )。**结论** 围产期HI损伤可使大鼠青春期焦虑行为发生改变,其机制可能与脑黑质TH表达的减少相关;初生时给予IGF-1干预对大鼠HIBD远期焦虑行为的异常不产生作用,且IGF-1不影响脑黑质TH的表达,大鼠青春期焦虑样行为的改变可能不受IGF-1调控。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(3): 295-300]

**[关键词]** 缺氧缺血性脑损伤; 远期; 焦虑行为; 酪氨酸羟化酶; 胰岛素样生长因子-1; 新生大鼠

### Effect of IGF-1 on long-term anxiety-like behavior in rats after hypoxic-ischemic brain damage

TANG Qin, LIU Fu-Rong, LUO Ya-Li, HEI Ming-Yan. Department of Pediatrics, Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China (Hei M-Y, Email: heiming\_yan@aliyun.com)

**Abstract: Objective** To observe the changes in anxiety-like behavior among rats in the recovery stage after hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) during the perinatal period and to investigate the effect of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) on the long-term anxiety-like behavior and its action mechanism among rats with HIBD. **Methods** Ninety neonatal rats (7 days old) were randomly and equally divided into normal control, HIBD, and HIBD+IGF-1 groups. A neonatal rat model of HIBD was established by Rice method in the HIBD and HIBD+IGF-1 groups. The rats in the HIBD+IGF-1 group were intraperitoneally injected with IGF-1 (0.2 mg/kg) immediately after HIBD, and the other two groups were intraperitoneally injected with an equal volume of normal saline. The anxiety-like behavior was evaluated by elevated plus-maze test on postnatal days 21 and 28. The expression of tyrosine hydroxylase (TH) in the substantia nigra was measured by immunohistochemistry on postnatal days 14, 21, and 28. **Results** On postnatal days 21 and 28, the open-arm time (OAT) and percentage of OAT for the HIBD and HIBD+IGF-1 groups were significantly lower than those for the normal control group ( $P<0.05$ ), but there were no significant differences between the HIBD and HIBD+IGF-1 groups ( $P>0.05$ ); the percentage of open arm entry showed no significant difference between the three groups ( $P>0.05$ ). On postnatal day 14, there were no significant differences in percentage of TH immunostaining-

[收稿日期] 2013-08-15; [接受日期] 2014-02-12

[基金项目] 湖南省科技厅科研课题(2008FJ3157)。

[作者简介] 汤琴,女,硕士研究生。

[通信作者] 黑明燕,女,主任医师。

positive area between the three groups ( $P>0.05$ ). On postnatal days 21 and 28, the HIBD and HIBD+IGF-1 groups had significantly lower percentages of TH immunostaining-positive area than the normal control group ( $P<0.05$ ), but there was no significant difference between the HIBD and HIBD+IGF-1 groups ( $P>0.05$ ). **Conclusions** HIBD in the perinatal period may cause the changes in anxiety-like behavior in adolescent rats, which may be related to decreased expression of TH in the substantia nigra. Neonatally given IGF-1 cannot improve the long-term anxiety-like behavior in rats after HIBD, and it does not affect TH expression in the substantia nigra. IGF-1 may not regulate the changes in long-term anxiety-like behavior in adolescent rats. [Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(3): 295-300]

**Key words:** Hypoxic-ischemic brain damage; Long-term; Anxiety-like behavior; Tyrosine hydroxylase; Insulin-like growth factor 1; Neonatal rats

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是指各种围生期窒息引起的部分或完全缺氧、脑血流减少或暂停而导致胎儿或新生儿脑损伤<sup>[1]</sup>。HIBD的发病原因涉及到能量代谢障碍、氧自由基损伤、钙超载、兴奋性氨基酸及其受体毒性等各个方面<sup>[2]</sup>。在哺乳动物的中枢神经系统中,特别是未成熟脑中,组织的修复和代偿机制会影响其远期的损伤情况和功能恢复情况,因此近期的病理或行为评估不一定和远期评估的结果一致<sup>[3]</sup>。

焦虑行为是目前越来越受到医学界重视的异常行为,而其发生与脑功能受损相关。众所周知,围产期缺氧缺血是导致儿童脑损伤的常见病因之一,临床回顾性研究报道结果显示,与正常儿童相比,有围产期窒息和HIBD病史的患儿青春期和成年后焦虑症发病率较高<sup>[4]</sup>;同时有研究应用新生大鼠HIBD模型发现初生时缺氧缺血损伤可导致大鼠青春期焦虑行为发生改变<sup>[5-6]</sup>。焦虑作为一种情绪反应,包括本能和所伴随的自主神经反应,二者与下丘脑边缘系统的活动均有密切的关系。有研究发现下丘脑部位和杏仁核的fos磷蛋白在焦虑机制中起重要作用<sup>[7]</sup>。同时有研究证实胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)具有促进c-fos基因表达作用<sup>[8]</sup>,且同一细胞中IGF-1受体mRNA的表达与c-fos免疫活性的表达是相伴而行的<sup>[9]</sup>。动物实验证实,大鼠大脑中动脉(MCA)闭塞再灌注后经侧脑室给予IGF-1,可显著减轻脑缺血损伤区的神经元缺失<sup>[10]</sup>。外源性给予IGF-1可减轻新生鼠HIBD,且该神经保护作用可能与IGF-1通过AktGSK3 $\beta$ 途径减轻神经细胞凋亡有关<sup>[11]</sup>。那么,外源性给予IGF-1是否对HIBD后的焦虑行为产生影响,目前未见有关文献报道。酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)是合成多巴胺的限速酶以及标记多巴胺神经元的常用指标,

而研究发现多巴胺神经递质功能的改变可导致焦虑行为异常<sup>[12-13]</sup>。本研究的目的是应用新生大鼠HIBD模型,观察HIBD大鼠远期焦虑行为及TH表达的变化,并通过IGF-1的干预来探讨IGF-1对HIBD大鼠远期焦虑行为和TH表达的影响以及相关可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组和HIBD模型制作

健康新生7日龄(P7)清洁级Sprague-Dawley(SD)大鼠90只,雌雄不限,体重10~16 g,由中南大学湘雅动物实验部提供。随机分为正常对照组、HIBD组和HIBD+IGF-1组,每组各30只。按Rice法制作新生大鼠HIBD模型(即左颈总动脉分离结扎后,再暴露于8%氧气和92%氮气的低氧环境中2 h)。HIBD+IGF-1组于缺氧缺血后即刻腹腔注射IGF-1(产品编号:4119-100,产品批号Lot: B2029,美国BioVision公司生产),剂量为0.2 mg/kg,其余两组腹腔注射等量的生理盐水。

### 1.2 高架十字迷宫实验

高架十字迷宫为测试动物焦虑行为的经典实验。高架十字迷宫由中南大学湘雅二医院精神心理卫生研究所提供,包括两条50 cm×10 cm×1 cm相对开放臂和两条50 cm×10 cm×40 cm相对闭合臂,中央由10 cm×10 cm的区域连接,距离地面50 cm。各组于HIBD后14 d和21 d(即P21和P28)进行高架十字迷宫实验,每组各时间点取10只大鼠。大鼠从中央区面向闭合臂放入迷宫,观察记录5 min内大鼠的活动情况,主要记录开放臂停留时间(进入开放臂停留的时间)、开放臂停留时间比率[开放臂停留时间/(开放臂停留时间+闭合臂停留时间)×100%]、开放臂进入次数

(进入到任一开放臂的次数,以小鼠4个爪子均进入到臂内为准,中途1爪子从该臂中完全退出则为该进入活动完成)和开放臂进入次数比率[开放臂进入次数/(开放臂进入次数+闭合臂进入次数)×100%]。

### 1.3 免疫组织化学方法测定中脑黑质 TH 的表达

实验动物于缺氧缺血后7、14、21 d(即P14、P21、P28)经麻醉、心脏灌注、固定、断头取脑,再次固定、脱水、包埋,于海马黑质水平制作10 μm厚的脑组织冠状切片进行免疫组化染色,DAB显色,每组各时间点取8只大鼠,每只大鼠取4张切片,每张切片随机取4个视野。一抗为小鼠抗大鼠脑黑质TH单克隆抗体(1:100,chemicon公司),二抗为马抗小鼠的IgG单克隆抗体(1:400,Vector公司)。在日本产Nikon Eclipse 80i显微镜下观察结果,并用Nikon DS高分辨率数码相机经NIS-Elements AR3.0软件拍照,收集脑组织切片中黑质及海马切面图像。采用Ver.3.00程序软件作图像数字采集及半定量分析(以着色面积占组织切片总面积的比例确定为标志物免疫组化的阳性数值)。

### 1.4 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件对数据进行统计学分析。在符合正态分布前提下,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示;在方差齐性的前提下,多组间比较采用单因素方差分析,方差不齐时采用Kruskal-Wallis  $H$  检验,组间两两比较采用SNK- $q$  检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高架十字迷宫测试结果

#### 2.1.1 开放臂停留时间

开放臂停留时间越短,

表明动物的焦虑情绪越严重。本实验结果显示P21和P28两个时间点HIBD组和HIBD+IGF-1组动物的开放臂停留时间均较正常对照组明显减少(均 $P < 0.05$ );尽管HIBD+IGF-1组的开放臂停留时间较HIBD组有所延长,但两组之间的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表1。

**2.1.2 开放臂停留时间比率** 开放臂停留时间比率越小,表明动物的焦虑情绪越严重。本实验结果显示P21和P28两个时间点HIBD组和HIBD+IGF-1组动物的开放臂停留时间比率均较正常对照组明显减少(均 $P < 0.05$ );尽管HIBD+IGF-1组的开放臂停留时间比率较HIBD组有所上升,但两组之间的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表1。

**2.1.3 开放臂进入次数比率** 进入开放臂的次数减少,表明动物活动性降低。本实验研究结果显示P21和P28两个时间点,正常组、HIBD组和HIBD+IGF-1组大鼠开放臂进入次数比率差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表1。

### 2.2 免疫组化染色检测各组黑质 TH 表达

各组TH阳性反应物质(棕色)主要分布在细胞质中,各组阳性细胞的细胞膜基本完整,细胞形态无明显异常,从细胞形态判断该阳性细胞为神经元,见图1。

HIBD后各时间点,HIBD组TH的阳性表达细胞数较正常对照组和HIBD+IGF-1组减少,提示HIBD组TH阳性表达水平下降(图2)。与正常对照组相比,P21和P28时HIBD组和HIBD+IGF-1组的TH免疫染色阳性面积百分比明显降低( $P < 0.05$ ),但HIBD组与HIBD+IGF-1组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表2。

表1 高架十字迷宫实验结果 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

| 组别          | 开放臂停留时间(s)           |                      | 开放臂停留时间比率(%)            |                         | 开放臂进入次数比率(%) |         |
|-------------|----------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|--------------|---------|
|             | P21                  | P28                  | P21                     | P28                     | P21          | P28     |
| 正常对照组       | 85 ± 10              | 147 ± 30             | 31.6 ± 2.6              | 51.5 ± 4.2              | 56 ± 19      | 52 ± 7  |
| HIBD组       | 18 ± 7 <sup>a</sup>  | 62 ± 10 <sup>a</sup> | 5.7 ± 1.6 <sup>a</sup>  | 38.1 ± 1.9 <sup>a</sup> | 46 ± 13      | 46 ± 10 |
| HIBD+IGF-1组 | 34 ± 13 <sup>a</sup> | 80 ± 24 <sup>a</sup> | 10.3 ± 3.1 <sup>a</sup> | 42.1 ± 3.2 <sup>a</sup> | 50 ± 12      | 47 ± 11 |
| $F(H)$ 值    | 43.212               | 38.722               | (24.021)                | (20.911)                | 1.043        | 1.212   |
| $P$ 值       | <0.001               | <0.001               | <0.001                  | <0.001                  | 0.326        | 0.313   |

注: a 为与正常对照组比较,  $P < 0.05$ 。

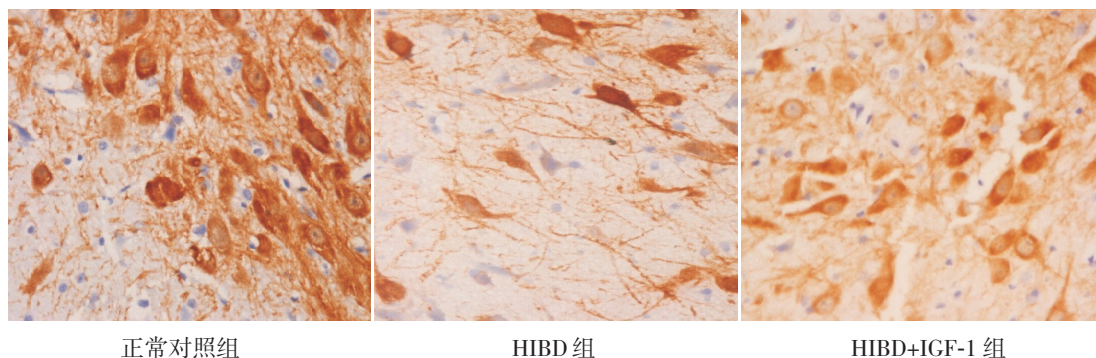


图1 P28时各组黑质TH免疫组化染色结果(DAB显色,  $\times 400$ ) 各组TH阳性反应物质(棕色)主要分布在细胞质中, 各组阳性细胞的细胞膜基本完整, 细胞形态无明显异常, 从细胞形态判断该阳性细胞为神经元。

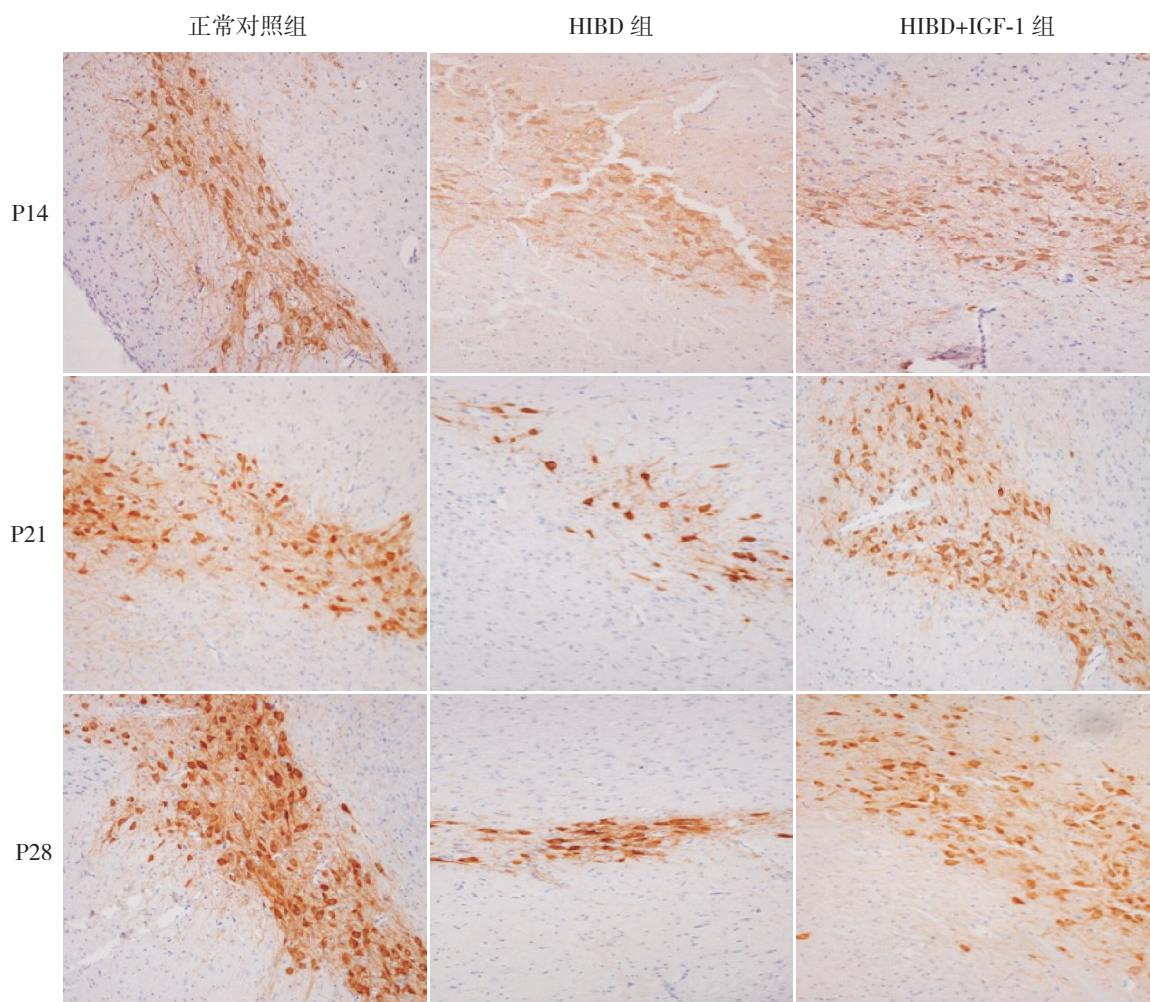


图2 各组黑质TH免疫组化染色结果(DAB显色,  $\times 100$ ) 正常对照组各时间点黑质部位均密布TH阳性染色细胞(棕色), HIBD组的TH阳性染色细胞数量较对照组明显减少; HIBD+IGF-1组的TH阳性染色细胞数量较对照组减少, 但较HIBD组稍有增加。

表 2 各组各时间点 TH 免疫染色阳性面积百分比

( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

| 组别           | P14       | P21                    | P28                    |
|--------------|-----------|------------------------|------------------------|
| 正常对照组        | 3.5 ± 1.0 | 4.6 ± 0.5              | 4.8 ± 0.7              |
| HIBD 组       | 2.8 ± 0.4 | 1.9 ± 0.3 <sup>a</sup> | 1.1 ± 0.2 <sup>a</sup> |
| HIBD+IGF-1 组 | 3.1 ± 0.7 | 3.4 ± 0.5 <sup>a</sup> | 2.6 ± 0.5 <sup>a</sup> |
| <i>F</i> 值   | 0.878     | 39.143                 | 54.105                 |
| <i>P</i> 值   | 0.448     | <0.001                 | <0.001                 |

注: a 为与正常对照组比较,  $P<0.05$ 。

### 3 讨论

在儿童生长发育过程中,青春期的心理焦虑程度处于相对较高的水平。焦虑症是一种并非由焦虑刺激引起的或不能用焦虑刺激合理解释的,以焦虑情绪体验为主,可表现为长期或过度的担忧及紧张、对没有危害或危害甚小的对象的恐惧等,同时伴有植物神经系统功能紊乱的神经症。目前焦虑症是儿童期患病率最高的心理障碍之一,且患病率有逐年增高的趋势。焦虑症的发生与脑功能受损相关,但目前并无证据证明导致焦虑的脑功能受损最可能发生在什么时间,而围产期缺氧缺血导致的脑损伤是常见的导致儿童脑损伤的病因之一,那么围产期的 HIBD 与焦虑症的发病之间是否存在关联是本课题关注的切入点。本研究应用 HIBD 动物模型,了解了 HIBD 恢复期后、当实验动物处于青春期阶段的焦虑样行为改变,同时应用 IGF-1 在围产期进行干预、了解 IGF-1 对该焦虑行为改变的影响。

SD 大鼠的自然寿命为 2.5~3 年, P28 时断奶并具有交配生殖能力,因此 P14~P28 被认为是 SD 大鼠的青春期。在研究焦虑行为问题的动物实验中,高架十字迷宫为非条件反射模型,是测试动物焦虑水平的经典测量方法,是利用动物对新异环境的探究特性和对高悬敞开臂的恐惧心理,形成动物的矛盾行为,来反映动物的焦虑情绪,以进入开放臂次数和在开放臂停留时间的长短来反映动物的焦虑状态,在焦虑动物中上述两指标明显降低。大鼠进入开放臂的次数代表其活动性,如果大鼠进入开放臂的次数无减少,表明其活动性无改变。本研究结果显示,就开放臂的进入次数比率而言, HIBD 组与正常对照组和 HIBD+IGF-1 组之间比较差异无统计学意义,表明动物的活动性无改变。而就开放臂的停留时间及开放臂停留

时间比率而言, HIBD 组和 HIBD+IGF-1 组均较正常对照组明显降低,提示 HIBD 后,大鼠青春期的焦虑程度升高, IGF-1 干预后开放臂的停留时间及开放臂停留时间比率均较未干预组有所升高,尽管升高程度无统计学差异,但仍提示 IGF-1 可能对焦虑样行为起到一定程度的抑制作用。该结果与 Fan 等<sup>[14]</sup>报道的 HIBD 可减轻早产大鼠远期焦虑行为的结果不相符合,该研究是应用 4 日龄早产大鼠双侧颈总动脉结扎造成 HIBD,于 P20 时采用高架十字臂测定动物的焦虑行为,结果显示缺氧缺血造成了动物青春期的焦虑样行为减轻。临床回顾性研究报道结果显示有围产期窒息和 HIBD 病史的患儿青春期和成年后焦虑症发病率比正常儿童高<sup>[4]</sup>,与本次研究结果相同。但由于本研究结果显示 IGF-1 干预后的 HIBD 大鼠在 P21 和 P28 两个时间点的焦虑程度与 HIBD 组比较无统计学差异,因此目前本研究只能得出以下结论: IGF-1 干预后,动物的高架十字迷宫各项焦虑指标均未得到改善,提示其焦虑样行为的异常改变与 IGF-1 及其受体可能无关联, IGF-1 不能对 HIBD 造成的焦虑行为产生保护作用。

众所周知,多巴胺是儿茶酚胺神经递质中的一种, TH 是多巴胺合成过程的限速因子, TH 的表达情况反应了多巴胺能神经元的生存情况,因而在对多巴胺的研究中将 TH 作为多巴胺能神经元的特征。在帕金森病动物模型免疫组化实验研究中, TH 是用以标记多巴胺神经元最常用的指标<sup>[15]</sup>。多巴胺神经递质功能降低可导致 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 功能相对增强,而 5-HT 功能增强可导致焦虑。本实验发现在 HIBD 后 7 d (P14 时间点),大鼠大脑黑质部位的 TH 表达未减少,考虑可能与时间太早导致变化不明显及实验动物例数较少有关,而在 HIBD 后 14 d 及 21 d (P21、P28),大鼠大脑黑质部位的 TH 表达均减少,与 Tatton 等<sup>[16]</sup>在老年小鼠缺血性脑损伤模型中观察的焦虑样行为、多巴胺及其代谢产物的改变的结果一致,提示 HIBD 与单纯缺血均可累及到处于快速生长发育期动物的多巴胺系统,使多巴胺神经元受损,可能是多巴胺功能降低使 5-HT 功能相对增强而导致焦虑。

IGF-1 在脑中有广泛的分布,其是由 78 个氨基酸组成的单链多肽,是一种肽能生长因子,具

有非选择性神经营养作用,存在于脑组织中,参与脑的生长发育<sup>[17]</sup>。有研究报道 IGF-1 在 HIBD 中具有减轻细胞凋亡的作用<sup>[18]</sup>。本实验研究结果显示 HIBD 后即刻给予 IGF-1 (0.2 mg/kg) 腹腔注射, HIBD+IGF-1 组黑质 TH 的表达与 HIBD 组相比较差异无统计学意义,提示 IGF-1 可能不能改善多巴胺能神经元功能,不能通过使黑质部位 TH 的表达增多而影响 5-HT 水平。

人作为生命活动连续的个体,许多儿童期的疾病(包括新生儿期某些疾病)与成年之后的疾病之间存在必然的联系。但是,由于新生儿学科与身心医学科分别属于两个完全不同的专科,相互对各自的临床诊治重点和医学基础研究都缺乏足够的了解;而新生儿科与儿童保健专科尽管都隶属于儿科范畴,但由于临床诊治对象差异较大,因此两个亚专科之间的合作也较少。本研究的创新点是:应用 HIBD 动物模型,将属于新生儿专科的 HIBD 与属于身心医学科的焦虑症联系起来,发现围产期 HIBD 可使大鼠青春期焦虑行为发生改变,其机制与脑黑质 TH 表达的减少相关,但初生时给予 IGF-1 干预对大鼠 HIBD 远期焦虑行为的异常不产生作用,且 IGF-1 不影响脑黑质 TH 的表达,SD 大鼠青春期焦虑样行为的改变可能不受 IGF-1 调控。

#### [参 考 文 献]

- [1] 邵肖梅,叶鸿瑁,丘小汕.实用新生儿学[M].第4版.北京:人民卫生出版社,2011:699-700.
- [2] Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia[J]. *Ann Neurol*, 2011, 69(5): 743-758.
- [3] Bona E, Johansson BB, Hagberg H. Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old-rats[J]. *Pediatr Res*, 1997, 42(5): 678-683.
- [4] Van Handel M, Swaab H, de Vries LS, et al. Long-term cognitive and behavioral consequences of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia: a review[J]. *Eur J Pediatr*, 2007, 166(7): 645-654.
- [5] Ming-Yan H, Luo YL, Zhang XC, et al. Hypoxic-ischemic injury decreases anxiety-like behavior in rats when associated with loss of tyrosine-hydroxylase immunoreactive neurons of the substantia nigra[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2012, 45(1): 13-19.
- [6] Yan XB, Wang SS, Hou HL, et al. Lithium improves the behavioral disorder in rats subjected to transient global cerebral ischemia[J]. *Behav Brain Res*, 2007, 177(2): 282-289.
- [7] 卢晓虹,李凌江,李昌琦,等.应激对中枢神经系统即刻早期基因 c-fos 表达及 HPA 轴的调节作用研究[J]. *中国心理卫生杂志*, 2000, 14(1): 10-13.
- [8] Li M, Chiu JF, Gagne J, et al. Age-related differences in insulin-like growth factor-1 receptor signaling regulates Akt/FOXO3a and ERK/Fos pathways in vascular smooth muscle cells[J]. *Cell Physiol*, 2008, 217(2): 377-387.
- [9] Aguado F, Rodrigo J, Cacicedo L, et al. Distribution of insulin-like growth factor-1 receptor mRNA in rat brain. Regulation in the hypothalamoneurohypophysial system[J]. *Mol Endocrinol*, 1993, 11(2): 231-239.
- [10] Wang JM, Hayashi T, Zhang WR, et al. Reduction of ischemic brain injury by topical application of insulin-like growth factor-1 after transient middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Brain Res*, 2000, 859(2): 381-385.
- [11] Brywe KG, Mallard C, Gustavsson M, et al. IGF-1 neuroprotection in the immature brain after hypoxia-ischemia, involvement of Akt and GSK3beta? [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 21(6): 1489-1502.
- [12] Bakos J, Duncko R, Makatsori A, et al. Prenatal immune challenge affects growth, behavior, and brain dopamine in offspring[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1018: 281-287.
- [13] Winter B, Juckel G, Voktorov I, et al. Anxious and hyperactive phenotype following brief ischemic episodes in mice[J]. *Biol Psychiatry*, 2005, 57(10): 1166-1175.
- [14] Fan LW, Lin S, Pang Y, et al. Minocycline attenuates hypoxia-ischemia-induced neurological dysfunction and brain injury in the juvenile rat[J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 24(2): 341-350.
- [15] Thomas Tayra J, Kameda M, Yasuhara T, et al. The neuroprotective and neurorescue effects of carbamylated erythropoietin Fc fusion protein (CEPO-Fc) in a rat model of Parkinson's disease[J]. *Brain Res*, 2013, 1502: 55-70.
- [16] Tatton W, Greenwood C, Salo PT, et al. Transmitter synthesis increases in substantia nigra neurons of the aged mouse[J]. *Neurosci Lett*, 1991, 131(1): 179-182.
- [17] Lin S, Fan LW, Rhodes PG, et al. Intranasal administration of IGF-1 attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats[J]. *Exp Neurol*, 2009, 217(2): 361-370.
- [18] Zhu DN, Jia YJ, Wang J, et al. Human insulin-like growth factor 1-transfected umbilical cord blood neural stem cell transplantation improves hypoxic-ischemic brain injury[J]. *Neural Regen Res*, 2011, 6(19): 1445-1451.

(本文编辑:刘伟)