论著

文章编号:1000-5404(2006)24-2430-04

神经生长因子和神经节苷脂对新生鼠缺氧缺血性脑损伤海马神经细胞的保护作用

胡 伟[1],赵聪敏[2],巩守平[3] ([1]武警陕西总队医院儿科,西安 710054;[2]第三军医大学新桥医院儿科,重庆 400037;[3]西安交通大学第二医院神经内科,西安 710004)

提 要:目的 观察联用神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和神经节甘脂(ganglioside GM_1)对实验大鼠缺氧缺血性脑损伤的治疗作用,探讨其神经保护的可能机制。**方法** 120只新生鼠分为假手术组、缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain injury, HIBI)组、NGF治疗组、GM_1治疗组和NGF+GM_1治疗组。给药后以HE染色观察各组海马区神经细胞形态变化,免疫组化观察Bcl-2、Bax蛋白表达,TUNEL法观察海马区神经细胞凋亡情况。**结果** 缺氧缺血后HIBI组海马区病理变化明显,药物干预组上述变化减轻,合用组为著;假手术组海马区Bcl-2表达较弱,HI(缺氧缺血)后该区Bcl-2表达仍弱,Bax表达增强,出现凋亡细胞;药物干预组Bcl-2表达较HIBI组增强,Bax表达较HIBI组减弱($P<0.01$),凋亡细胞减少,合用组最明显。**结论** HIBI后Bax蛋白表达增强,细胞凋亡增加。两药联用可上调Bcl-2表达,下调Bax表达,使凋亡细胞减少,这可能是其治疗新生儿缺氧缺血性脑损伤的机制之一。

关键词: 缺氧缺血性脑损伤;神经生长因子;神经节阿苷脂;凋亡

中图法分类号: R322.81;R743.31;R977 **文献标识码:** A

Protective effect of combined NGF and ganglioside GM_1 on hypoxic-ischemic brain injury of newborn rats

HU Wei[1], ZHAO Cong-min[2], GONG Shou-ping[3] ([1]Department of Pediatrics, General Hospital of Shaanxi Armed Police, Xi'an 710054; [2]Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [3]Department of Neurology, The Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

Abstract: Objective To study the therapeutic effect of combined administration of nerve growth factor (NGF) and ganglioside GM_1 on the hypoxic-ischemic brain injury (HIBI) rat model and the relevant involving mechanisms. **Methods** A total of 120 7-day old rats were randomly divided into 5 groups: sham-operation group, HIBI group, NGF group, GM_1 group and NGF+GM_1 group. HE staining, immunohistochemical staining and TUNEL staining were employed respectively to study the morphological changes, bcl-2 and Bax expressions and apoptosis in the hippocampal neuron after treatment. **Results** Pathological changes were observed in the hippocampal neuron after HIBI. In NGF+GM_1 group, the level of Bcl-2 expression was increased significantly ($P<0.01$), while that of Bax and the number of apoptotic cells in the hippocampal region were decreased significantly in comparison to the HIBI group ($P<0.01$). **Conclusion** The combined administration of NGF and GM_1 may increase Bcl-2 expression and attenuate Bax expression, and thus inhibit the apoptosis in hippocampal region.

Key words: hypoxic-ischemic brain injury; nerve growth factor; ganglioside GM_1; apoptosis

缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain injury, HIBI)是由于宫内窘迫、新生儿窒息等引起的新生儿脑部严重损伤,有较高的发病率和病死率,也是导致智能落后和脑性瘫痪等儿童伤残的主要原因[1]。HIBI发病机制复杂,涉及多个环节,而凋亡是后期神经细胞缺失和功能障碍的重要原因。细胞凋亡持续时间较长[2],给予适当治疗可逆转凋亡的病理过程,从而改善预后。神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是一种神经营养性因子,而神经节苷脂(ganglioside GM_1)是内源性神经营养因子的前体增强剂。从理论角度分析,二者对HIBI后神经系统功能恢复具有协同作用。因此有必要进一步研究联合应用NGF和GM_1

基金项目: 陕西省2004年科技计划项目(2004K11-G9)
Supported by the Sci & Tech Project Foundation of 2004, Shaan xi Province (2004K11-G9)

作者简介: 胡 伟(1969-),女,陕西省西安市人,硕士,主治医师,主要从事小儿脑损伤及干预方面的研究。电话:(029)82245800

通讯作者: 赵聪敏,电话:(023)68755602

收稿日期: 2005-10-31;**修回日期:** 2006-06-21

对 HIBI 后神经细胞的保护作用。我们采用新生大鼠 HIBI 模型，观察 NGF、GM_1 及 NGF 与 GM_1 联合应用对 HIBI 后海马神经细胞形态学、凋亡及其调控基因 Bcl-2、Bax 蛋白表达的变化，了解药物治疗对海马神经细胞的保护作用，初步探讨联合应用 NGF 与 GM_1 对 HIBI 的保护作用及其可能机制。

1　材料与方法

1.1　仪器

自制透明有机玻璃缺氧舱，氮氧混合气体（8% 氧，92% 氮），光学显微镜，Q550CW 型图像采集与分析系统。

1.2　试剂

注射用鼠神经生长因子（NGF，商品名恩经复）（厦门北大之路生物工程公司）；注射用神经节苷脂（GM_1，商品名施捷因）（广州精优惠南医药公司）；兔抗大鼠 Bcl-2 多克隆抗体，小鼠 Bax 单克隆抗体，免疫组化染色 S-P 试剂盒，细胞凋亡检测试剂盒（武汉博士得生物工程公司）。

1.3　实验动物分组及处理

出生 7 d 的健康 SD 大鼠 120 只，体质量 12 ~ 16 g，雌雄不拘（第四军医大学实验动物中心）。按照实验设计分为假手术组、缺氧缺血性脑损伤（HIBI）组、NGF 治疗组、GM_1 治疗组和 NGF + GM_1 治疗组，每组 24 只。各组均分为 HIBI 后 6、24、72 h 及 7 d 时间组，每组鼠 6 只。

参照 Rice 法制作 HIBI 模型[3]。大鼠乙醚吸入麻醉，常规消毒，取颈部正中切口，暴露并双线结扎左侧颈总动脉，缝合皮肤。恒温（36.5 ℃）水浴箱恢复 0.5 ~ 1 h，再置于有机玻璃缺氧舱中（温度 36 ~ 37 ℃），以 3 L/min 的速度持续输入氧浓度为 8% 的氮氧混合气体 2 h，制成 HIBI 模型。缺氧后新生鼠放回母鼠身边常规喂养。假手术组只切开大鼠颈部皮肤并暴露左颈总动脉，不结扎，缝合皮肤后不入缺氧舱，常规喂养。NGF 组、GM_1 组及合用组以腹腔注射法分别给药，每日 1 次，连用 7 d。NGF 组予浓度为 200 U/ml 的 NGF 10 ml/kg + 生理盐水 10ml/kg；GM_1 组予浓度为 2 mg/ml 的 GM_1 10 ml/kg + 生理盐水 10 ml/kg；NGF + GM_1 组予浓度为 200 U/ml 的 NGF 10 ml/kg + 浓度为 2 mg/ml 的 GM_1 10 ml/kg；HIBI 组只注射等量的生理盐水。各组均于缺氧缺血（HI）后 6、24、72 h、7 d 灌注，取脑，以 4% 多聚甲醛溶液固定，于视交叉、四叠体平面冠状平行切除额部及小脑、脑干组织，取材修饰后行脑组织脱水，石蜡包埋，冠状切片（片厚 4 μm），备检。

1.4　组织病理学观察

石蜡切片 HE 染色，普通光学显微镜观察各组海马组织形态变化。

1.5　Bcl-2 和 Bax 蛋白免疫组化染色

每个动物标本取 4 张相邻的脑组织切片（2 张行苏木精复染备组织学观察，2 张不行苏木精复染以备测灰度值），行 S-P 免疫组化染色。光学显微镜下观察，细胞质内反应物质呈棕黄色颗粒为免疫组织化学染色阳性细胞。结果用 Q550CW 型图像信号采集与分析系统进行处理，每张切片在海马区随机取 6 个位置相应、不重复的视野（CA1 区 3 个视野，CA3 区 3 个视野），应用 Qwin 软件测量灰度值，取 6 个视野均值作为该片灰度值，每样本 2 张切片均值作为该样本实验结果，再以该组 6 例样本的均值作为该组实验结果。

1.6　原位细胞凋亡染色

每个动物标本取 2 张相邻的脑组织石蜡切片按 TUNEL 法检测海马区细胞凋亡情况，细胞核染成棕黄色为 TUNEL 染色阳性细胞。由病理科 2 位医师分别计数海马区 TUNEL 阳性细胞，每张切片在 400 倍光镜下于海马区随机选取 6 个视野，取 2 张切片的均值，再以 2 位医师计数的均值作为该样本实验结果，以该组 6 例样本的均值作为该组实验结果。

1.7　统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析，两两比较用 Turkey 方法。

2　结果

2.1　HE 染色海马区形态学变化

HE 染色光镜下可见假手术组双侧及 HIBI 组右侧大脑海马结构层次清楚，细胞排列整齐、形态正常。HIBI 组左脑海马区于 HI 后 6 h 出现细胞肿胀、排列紊乱，24 h 出现细胞变性、坏死；72 h 时变性、坏死更趋明显，HI 后 7 d 海马区细胞呈现片状坏死软化。NGF 组、GM_1 组及 NGF + GM_1 组在各时间点左侧海马病理改变较 HIBI 组减轻，尤以合用组为著。

2.2　各组海马区凋亡细胞的变化

光镜下细胞核呈棕黄色表现者为 TUNEL 染色阳性细胞，即凋亡细胞。假手术组海马区偶见凋亡细胞；HIBI 组于 6 h 出现凋亡细胞，持续至 7 d；NGF 组和 GM_1 组各时间点凋亡细胞数较 HIBI 组减少（$P < 0.01$）；NGF + GM_1 组凋亡细胞数较 NGF 组、GM_1 组减少（$P < 0.01$，$P < 0.05$）（表 1）。

表 1　各组大鼠左侧海马区细胞凋亡数目的变化（个/视野，$n = 24$，$\bar{x} \pm s$）

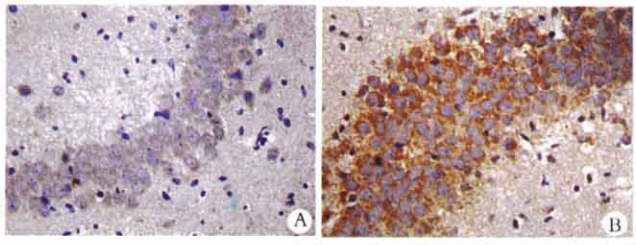
组别	损伤后不同时间			
	6 h	24 h	72 h	7 d
假手术组	2.89 ± 1.34	2.93 ± 1.17	2.97 ± 1.10	2.81 ± 1.05
HIBI 组	22.98 ± 4.09[a]	45.46 ± 8.33[a]	56.99 ± 9.78[a]	28.28 ± 5.96[a]
NGF 组	17.14 ± 4.25[ab]	34.74 ± 5.03[ab]	47.04 ± 6.34[ab]	20.59 ± 4.40[ab]
GM_1 组	15.85 ± 4.04[ab]	30.58 ± 6.03[ab]	45.06 ± 6.03[cb]	20.12 ± 4.31[ab]
NGF + GM_1 组	10.29 ± 3.51[abcd]	22.05 ± 5.65[abcd]	33.26 ± 5.59[abcd]	14.22 ± 4.19[abce]

a：$P < 0.01$，与假手术组比较；b：$P < 0.01$，与 HIBI 组比较；c：$P < 0.01$，与 NGF 组比较；e：$P < 0.05$，d：$P < 0.01$，与 GM_1 组比较

2.3　各组海马区 Bcl-2、Bax 蛋白表达的变化

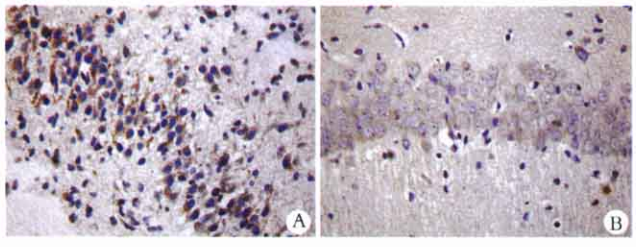
光镜下 Bcl-2、Bax 蛋白表达以细胞质呈棕黄色为阳性细胞。蛋白表达越强，其灰度值越低。HIBI 组 Bcl-2 蛋白表达于 HI 后 6 h 出现，持续至 7 d。各时间点 NGF 组与 GM_1 组 Bcl-2 蛋白表达均较 HIBI 组增强（$P < 0.01$，$P < 0.05$）（图 1A），NGF + GM_1 组治疗后 Bcl-2 蛋白表达较 NGF 组、GM_1 组明显增强（P

<0.01，$P<0.05$）（图1B）。HIBI组Bax蛋白表达在HI后6 h出现，持续至7 d（图2A）。NGF和GM_1治疗组Bax蛋白表达于各时间点均弱于HIBI组（$P<0.01$），NGF+GM_1组治疗后Bax蛋白表达较NGF组、GM_1组减弱（$P<0.01$，$P<0.05$）（图2B）。假手术组Bcl-2蛋白表达于各时间点呈弱阳性，Bax蛋白于各时间点呈阴性（表2、3）。



A：NGF组；B：NGF+GM_1组

图1 HI后24 h海马CA3区Bcl-2的表达 （S-P×400）



A：HIBI组；B：NGF+GM_1组

图2 HI后72 h海马CA1区Bax的表达 （S-P×400）

表2 各组大鼠左侧海马区Bcl-2表达的灰度值变化（$n=24$，$\bar{x}\pm s$）

组别	损伤后不同时间			
	6 h	24 h	72 h	7 d
假手术组	158.27±5.13	157.23±4.45	157.67±6.41	158.80±6.02
HIBI组	147.18±6.99^{b}	141.25±5.65^{b}	146.33±7.07^{b}	150.75±7.89^{a}
NGF组	138.42±7.97^{bc}	125.71±7.27^{bd}	133.58±7.55^{bd}	137.98±7.53^{bd}
GM_1组	136.45±7.62^{bd}	124.48±6.73^{bd}	131.72±7.11^{bd}	138.20±6.49^{bd}
NGF+GM_1组	129.25±3.27^{bd}	111.90±7.44^{bdfh}	116.38±7.95^{bdfh}	129.65±5.56^{bdeg}

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与假手术组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与HIBI组比较；e：$P<0.05$，f：$P<0.01$，与NGF组比较；g：$P<0.05$，h：$P<0.01$，与GM_1组比较

表3 各组大鼠左侧海马区Bax表达的灰度值变化（$n=24$，$\bar{x}\pm s$）

组别	损伤后不同时间			
	6 h	24 h	72 h	7 d
假手术组	167.94±4.31	165.64±3.61	164.08±3.56	166.16±4.37
HIBI组	131.61±8.21^{b}	132.63±6.50^{b}	125.83±7.99^{b}	140.14±9.65^{b}
NGF组	147.24±7.63^{bc}	142.89±6.67^{bc}	136.89±4.62^{bc}	151.26±8.27^{bc}
GM_1组	147.63±8.62^{bc}	144.66±6.23^{bc}	140.01±3.77^{bcd}	152.32±8.61^{bc}
NGF+GM_1组	158.77±5.80^{acef}	157.20±2.05^{bcef}	150.40±2.10^{bcef}	162.73±3.74^{cef}

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与假手术组比较；c：$P<0.01$，与HIBI组比较；d：$P<0.05$，e：$P<0.01$，与NGF组比较；f：$P<0.01$，与GM_1组比较

3 讨论

神经生长因子（NGF）是神经系统中最重要的生物活性物质之一，具有增强神经递质活性、促进合成代谢，维持神经细胞存活、生长、分化和成熟等生物学效应[4]。神经节苷脂（GM_1）是大多数神经元生存所必需的，它具有介导细胞与细胞，细胞与微生物以及细胞与基质间的相互作用，可以调控细胞膜中蛋白质的功能[5]。研究表明，NGF和GM_1对缺氧缺血后神经细胞凋亡均具有抑制作用。NGF是一种神经营养性因子，而GM_1是内源性神经营养因子的前体增强剂。从理论角度分析，二者对HIBI后神经系统功能恢复具有协同作用。

本实验从HIBI新生鼠海马区形态学观察到两药合用治疗后海马区神经细胞损伤减轻，凋亡细胞明显减少，凋亡调控基因Bcl-2、Bax蛋白表达改变，这表明合用NGF和GM_1具有较强的神经细胞保护作用，可联合应用NGF和GM_1对缺氧缺血性脑损伤进行治疗。此作用国内外鲜有类似报道。根据本实验结果及相关文献分析，联合应用NGF和GM_1的脑保护作用机制可能与增强TrkA受体的激活有关。NGF受体分为高亲和力受体TrkA和低亲和力受体P75NTR[6,7]。TrkA是一种酪氨酸蛋白激酶受体，研究表明TrkA为形成高亲和力结合位点以及介导NGF效应所必需，被认为是NGF的功能受体。TrkA主要在神经系统细胞上表达，NGF与TrkA结合后，通过多种途径促进神经元存活。TrkA不仅能启动促进细胞存活的信号，同时能抑制P75NTR启动的死亡信号[8]。GM_1是大多数神经元生存所必需的，它可能与神经营养因子相互作用或激活与神经营养因子相同的信号传导通路有关。实验证实，GM_1不仅与NGF有协同作用，能促进NGF诱导的Trk受体的磷酸化，而且单独使用也能激活Trk受体，如激活C6神经胶质瘤细胞膜上TrkA受体，激活小脑颗粒细胞膜上的TrkB受体，来防止兴奋性氨基酸毒性作用引起的细胞凋亡[6]。另外，GM_1也是Trk受体正常表达和发挥功能所必需的，因为在GM_1缺失的NG细胞膜上无Trk受体，且NGF不能诱导其磷酸化[9]；GM_1和Trk受体都位于细胞膜的GEM区，降低内源性的GM_1含量，使磷酸化的TrkB含量也随之降低。NGF还可减轻大鼠皮层损伤引起的神经生化、形态学改变，改善行为障碍，如同时应用GM_1可增强NGF的作用。GM_1的上述作用可能是通过增强NGF的高亲和力受体TrkA受体二聚作用以及其自身磷酸化，即激活受体酪氨酸激酶而实现。此外，GM_1还能直接、紧密结合

Trk受体,其效应较NGF单独引发的Trk自身磷酸化增加了3倍,受体激活可促发下游的信号通路而发挥增强NGF的作用。

本实验证实NGF与GM_1合用治疗新生鼠HIBI较两药单用效果更好。其机制可能为NGF、GM_1合用明显增加了TrkA的自身磷酸化,促进了Bcl-2的表达,抑制了Bax的表达,从而抑制了HIBI后的神经元凋亡。

参考文献:

[1] MERCURI E, RICCI D, COWAN F M, *et al*. Head growth in infants with hypoxic-ischemic encephalopathy: correlation with neonatal magnetic resonance imaging[J]. Pediatrics, 2000, 106(2 Pt 1): 235-243.

[2] 王菊莉,韩玉昆. 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤神经细胞凋亡时程[J]. 新生儿科杂志, 2003, 18(3): 111-113.

[3] VANNUCCI R C, VANUCCI S J. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage[J]. Ann N Y Acad Sci, 1997, 835(3): 234-249.

[4] CROLL S D, SURI C, COMPTON D L, *et al*. Brain derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and *in vitro* hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex[J]. Neuroscience, 1999, 93(4): 1491-1506.

[5] AVROVA N F, VICTOROV I V, TYURIN V A, *et al*. Inhibition of glutamate-induced intensification of free radical reactions by gangliosides: possible role in their protective effect in rat cerebellar granule cells and brain synaptosomes[J]. Neurochem Res, 1998, 23(7): 945-952.

[6] SUSEN K, HEUMANN R, BLOCHL A. Nerve growth factor stimulates MAPK *via* the low affinity receptor p75(LNTR)[J]. FEBS Lett, 1999, 463(3): 231-234.

[7] KAPLAN D R, MILLER F D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system[J]. Curr Opin Neurobiol, 2000, 10(3): 381-391.

[8] LEE T H, KATO H, PAN L H, *et al*. Localization of nerve growth factor, trkA and P75 immunoreactivity in the hippocampal formation and basal forebrain of adult rats[J]. Neuroscience, 1998, 83(2): 335-349.

[9] MUTOH T, HAMANO T, YANO S, *et al*. Stable transfection of GM_1 synthase gene into GM_1-deficient NG108-15 cells, CR-72 cells, rescues the responsiveness of Trk-neurotrophin receptor to its ligand, NGF[J]. Neurochem Res, 2002, 27(7-8): 801-806.

(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2006)24-2433-01

个案与短篇

经鼻内窥镜下视神经管减压术的围手术期护理

黄茂华,杨 芳,冯德珍,孙丽平,杨 森,郑雪莲 (第三军医大学西南医院耳鼻咽喉-头颈外科,重庆 400038)

临床上常见的视神经损伤多为间接损伤,外力通过额骨的传导集中于视神经管区域,导致神经管骨折或变形[1],该骨折可引起视神经缺血水肿、变性,甚至视神经纤维萎缩而失明。采用经鼻内窥镜视神经管减压术治疗视神经外伤手术时间短、创伤小,术后不遗留疤痕等。现将围手术期护理体会总结如下。

1 一般资料

选择本科视神经外伤患者10例,男性7例,女性3例,年龄10~49岁。左眼4例,右眼6例,伤后视力无光感7例,眼前手动3例,伴有眼球活动障碍1例。CT提示:眼眶外侧壁、内侧壁6例,视神经管骨折2例,视神经管变窄、蝶窦内积血1例。受伤时间为2~30 d,10例均诊断为外伤性视神经损伤。采用经鼻内窥镜视神经管减压术治疗6例视力不同程度恢复,4例无效。

2 护理

2.1 术前护理

2.1.1 心理护理 术前向患者及家属介绍手术的方法、说明手术目的、优点及简要的手术过程、预后、可能发生的并发症和术后视力可能恢复多少等情况,解除患者及家属的精神负担,增强患者战胜疾病的信心。

2.1.2 鼻腔准备 术前1 d剪鼻毛,男患者同时刮胡须,术前30 min清除鼻腔内的血痂及分泌物。

2.1.3 大剂量激素冲击治疗的观察和护理 由于创伤及手术刺激后,使眼眶内组织高度水肿,为减轻视神经水肿,避免炎症及出血对组织的破坏,恢复视神经的血液供应,保护视神经功能,受伤及术后需要短期内应用大剂量的激素,一般为成人20~50 mg/d,缓慢递减至维持量。切不可突然停用或减量过快,应随时观察有无诱发感染、加重溃疡、柯兴氏征以及眼压升高等现象,保证安全用药[2]。

2.1.4 预防颅内感染 有鼻出血者应保持鼻腔清洁,不用棉球、纱布填塞,需用无菌敷料覆盖,注意应保持半卧位,防止逆行性颅内感染。

2.2 术后护理

2.2.1 常规护理 按鼻窦内窥镜术后护理常规。

2.2.2 饮食 以高蛋白、高维生素、低盐流质饮食为宜,纱条取出后可改为半流食,误用吸管,因吸管吸吮时用力可能加重出血及加剧疼痛,可使用汤勺。

(下转2436页)

作者简介:黄茂华(1963-),女,四川省三台县人,主管护师,主要从事耳鼻咽喉专科护理及护理管理方面的研究,发表论文18篇。电话:(023)68765390

收稿日期:2006-10-20;修回日期:2006-11-02