论著

文章编号:1000-5404(2009)24-2432-04

麻黄碱对缺氧缺血新生大鼠海马神经细胞的保护作用

许 蓓[1],肖 农[1],张晓萍[2] (重庆医科大学附属儿童医院:[1]康复中心,[2]儿科研究所,重庆 400014)

摘 要:目的 观察麻黄碱(ephedrine, EPH)对大鼠缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)海马神经细胞凋亡及远期学习记忆能力的影响。**方法** 新生SD大鼠(7日龄)按随机数字表法分为麻黄碱组(EPH组)、对照组(Con组)和假手术组(Sham组)。分别于HIBD后6、12 h,1、3、7 d采用免疫组织化学检测各组大鼠bcl-2蛋白和bax蛋白在海马区的表达,HIBD后4周Morris水迷宫测试其学习记忆能力。**结果** EPH组bcl-2表达较Con组显著增高,1 d时达到高峰,3 d后逐渐下降;bax蛋白表达较Con组明显降低,1 d时最低;各组平均潜伏时间均逐渐缩短,EPH组3~5 d时平均潜伏时间较Con组明显缩短。EPH组穿越平台次数及在目标象限游泳距离与总距离百分比均高于Con组。**结论** 麻黄碱可使新生大鼠HIBD后海马bcl-2蛋白表达增加和bax蛋白表达减少,并能提高远期学习记忆能力。

关键词: 缺氧缺血性脑损伤;麻黄碱;bcl-2;bax;水迷宫
中图法分类号: R282.71;R741.05;R743.31 **文献标识码:** A

Ephedrine protects hippocampal neurons in neonatal rats after hypoxic-ischemic brain injury

XU Bei[1], XIAO Nong[1], ZHANG Xiao-ping[2] ([1]Department of Rehabilitation Center, Children's Hospital; [2] Institute of Pediatrics, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To explore the effects of ephedrine on the hippocampal cell apoptosis and behavioral performance after hypoxia-ischemia brain injury in neonatal rats. Methods Totally 90 7-day rats were randomly divided into 3 groups, ephedrine treatment group, model group, and sham group. Hypoxia-ischemia brain injury model was established by permanently ligating right common carotid artery. Ephedrine (1.5 mg/kg, once per day) was injected intraperitoneally to the rats of ephedrine treatment group for 7 d, and the rats of model group was given normal saline at the same volume. At the following time interval of 6 and 12 h, and 1, 3, and 7 d after hypoxia, the expression of bcl-2 and bax were detected in the hippocampal region by immunohistochemical staining. At 4 weeks after surgery, behavioral changes in the remaining rats were tested by Morris water maze. Results Compared with model group, the expression of bcl-2 in the ephedrine treatment group was significantly increased after hypoxic-ischemic injury, peaked at 1 d and decreased in 3 d after operation. And the expression of bax in the ephedrine treatment group was decreased in 1 d after hypoxic-ischemia. The average time of escape latency was gradually decreased in each group. However, from the 3rd to 5th day, it was much shorter in ephedrine treatment group than in model group. In addition, the frequency platform passing in the ephedrine treatment group and the percentage of swimming distance traveled in the previous target quadrant was significantly greater than those of the control group. Conclusion Ephedrine upregulates bcl-2 and downregulates bax in the hippocampus of neonatal rats after hypoxia-ischemia, and improves their ability of learning and memory.

Key words: hypoxic-ischemic brain damage; ephedrine; bcl-2; bax; Morris water maze

缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是由围产期窒息缺氧、脑血流减少或暂停而导致胎儿或新生儿脑损伤。它是引起新生儿急性死亡及小儿智能发育障碍、脑性瘫痪和癫痫的重要原因,给家庭和社会带来了极大的负担,目前尚无特效的治疗方法。麻黄碱(ephedrine, EPH)是从传统中药麻黄中

基金项目: 重庆市卫生局科研项目(07-2-153)
Supported by the Scientific Research Program of Chongqing Municipal Health Bureau(07-2-153)
作者简介: 许 蓓,女,河北省保定市人,硕士研究生,医师,主要从事小儿神经系统疾病及康复方面的研究。E-mail:xubei0817@163.com
通信作者: 肖 农,电话:(023)63633040, E-mail: xiaonongwl@163.com
收稿日期: 2009-09-03;**修回日期:** 2009-10-12

提取的生物碱,是一种交感神经兴奋胺,可以激活突触后 α 和 β 受体直接提高去甲肾上腺素受体的活性[1]。课题组的前期研究已证实:脑缺血大鼠经麻黄碱治疗后可明显加快运动功能的康复速度,减少神经元的损伤,诱导神经生长营养因子的释放,显示出良好的临床应用前景[2,3]。由于海马区对脑缺氧缺血极其敏感,而 CA3 区与学习记忆能力密切相关,本实验通过研究麻黄碱对抗凋亡蛋白 bcl-2 和促凋亡蛋白 bax 的影响,探讨麻黄碱的神经保护性作用,为中西医结合治疗小儿缺氧缺血性脑病提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　动物　　90 只健康 7 日龄(P7)SD 大鼠,清洁级,雌雄不拘,体质量 12 ~ 16 g,由重庆医科大学实验动物中心提供,动物许可证号:SYXK 渝 20040001。

1.1.2　药物及试剂　　麻黄碱, 纯度 > 99%(赤峰制药厂,批号:420325),bcl-2 兔抗鼠多克隆抗体(美国 Santa Cruz 生物技术公司),bax 兔抗鼠多克隆抗体(美国 Santa Cruz 生物技术公司),SABC 山羊抗兔免疫组化二抗试剂盒(北京中杉生物技术有限公司),DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物有限公司)。

1.1.3　仪器　　CY-100 数字测氧仪(浙江省建德市利达仪器厂),石蜡切片机(英国 Thermo Shando 公司),Morris 水迷宫(中国医学科学院药物所),显微镜及自动照相系统(日本 Olympus 公司)。

1.2　方法

1.2.1　动物模型的制备　　参照 Rice 等[4]方法制作,所有动物按随机数字表法分为 3 组:麻黄碱治疗组(EPH 组)、模型组(Con 组)和假手术组(Sham 组)。EPH 组和 Con 组用 1% 水合氯醛麻醉,于双前肢根部与正中线交点略偏右上为起点向头部剪开皮肤约 1 cm,分离皮下组织、筋膜和肌肉,暴露右颈总动脉,分离周围组织并进行双线永久结扎。将动物放回笼中休息 2 ~ 3 h 后,放入 1.5 L 密闭缺氧舱中,缓慢通以含 8% O_2 + 92% N_2 混合气体,使氧浓度维持在(8 ± 0.3)%,同时将缺氧舱置于 37 ℃的水浴槽内,持续缺氧 2 h。Sham 组只分离颈总动脉,不结扎。

1.2.2　给药　　EPH 组于缺氧结束后 5 min 腹腔注射麻黄碱 1.5 mg/kg (n = 30)(根据成年动物剂量换算而来);Con 组给予等量的生理盐水(n = 30),1 次/d,共 7 d;Sham 组不给药(n = 30)。

1.2.3　HE 染色　　各组动物分别于缺氧缺血后 6、12 h,1、3、7 d 随机抽取 6 只。将动物麻醉后固定于手术台上,从胸骨剑突处剪开皮肤及筋膜,向上沿胸廓边缘剪开肋骨,暴露胸腔。剥离心包,由左心室心尖处插入灌注针,同时剪开右心耳,快速注入生理盐水约 100 ml,冲洗血管。之后缓慢注入 4% 多聚甲醛 100 ml,将组织内固定。取出脑组织,放入 4% 多聚甲醛中继续固定 48 h。将固定好的组织块进行常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,切片(厚度为 5 μm)。室温下将切片经二甲苯脱蜡,酒精梯度脱水,苏木精染色 10 min,1% 盐酸酒精分化 3 s,饱和碳酸锂蓝化 3 s,伊红染色 1 min,酒精脱水,晾干,中性树胶封片后镜检。

1.2.4　免疫组化检测海马区 bcl-2 和 bax 阳性细胞的表达　　脑组织石蜡切片经过二甲苯脱蜡、酒精梯度脱水后,依次通过以下步骤进行免疫组化染色:3%(质量体积分数)双氧水室温孵育 15 min,以消除内源性过氧化物酶活性,枸橼酸盐缓冲液高温修复抗原,正常山羊血清封闭液室温孵育 10 min,以封闭非特异性抗原,滴加一抗(bcl-2 或 bax)4 ℃孵育过夜。滴加生物素结合二抗。37 ℃孵育 40 min 后,加辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉卵白素。最后 DAB 显色,苏木精复染,酒精梯度脱水,晾干,中性树胶封片、镜检。

1.2.5　图像分析　　使用平均光密度(OD)来计算和分析 bcl-2、bax 免疫反应的强度。每个标本分别从海马区随机抽取 5 个高倍视野(×400)光镜下照相,使用 Image-Pro Plus 5.1 图像分析软件系统进行分析。

1.2.6　行为学测试　　行为学测试于 HIBD 后 28 d(P35)进行,圆形水池直径 90 cm,池中水温(20 ± 2)℃,水面高度为超过平台 1 cm。实验过程中保证室内环境不变,包括光线,参照物的位置。实验时操作者不在动物视野之内,以免成为参照物之一,整个过程避免噪音。

水迷宫测试主要包括:①定位航行实验:将大鼠面向池壁分别从 4 个不同的入水点放入池中,1 次/d,共 5 d,记录大鼠找到平台时间(即平均潜伏时间)。之后,将动物放回笼中休息 1 h,进行下次实验。②空间探索实验:于第 7 天撤除平台,任选 1 点将大鼠放入水池中。记录其 60 s 内穿越原平台的次数并计算目标象限游泳距离与总距离百分比。

1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,组间差异用单因素方差分析。

2　结果

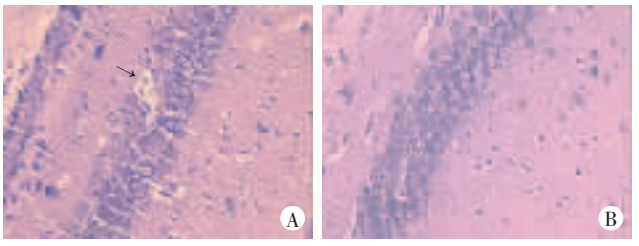
2.1　大鼠海马 CA3 区神经元形态学观察

肉眼观察 Con 组 3 例出现右脑萎缩,2 例出现软化灶,EPH 组 1 例出现右脑萎缩,没有出现软化灶。Sham 组两侧大脑半球对称,无脑萎缩及软化灶出现。Con 组可见海马区细胞水肿,细胞排列紊乱,结构不清晰,神经元凋亡和坏死明显,伴胶质细胞增生(图 1A)。EPH 组可见海马区细胞轮廓清晰,无明显细胞水肿,神经元排列密集,凋亡和坏死较 Con 组明显减轻,无明显胶质细胞增生(图 1B)。Sham 组可见细胞排列整齐,轮廓清晰,无细胞水肿,凋亡和坏死不明显。

2.2　各时间点海马区 bcl-2 和 bax 的表达

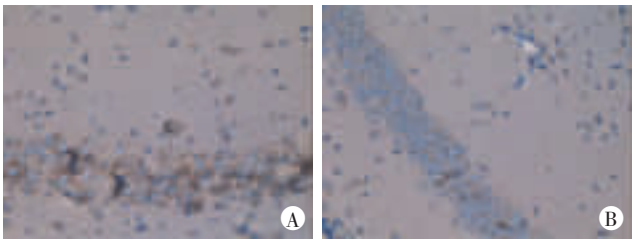
2.2.1　海马区 bcl-2 的表达　　bcl-2 蛋白为神经细胞细胞质、突起及细胞核膜着色,呈棕黄色颗粒,细胞核不着色,阴性对照片中未见阳性细胞(图 2)。定量分析显示:与 Con 组相比,EPH 组海马区 bcl-2 的表达在缺氧缺血后 12 h 时明显增高(P < 0.05),1 d 是达到顶峰(P < 0.01),3 d 后开始降低(P < 0.01),

7 d时仍高与正常水平($P<0.05$)(表1)。



A：Con组　↑：海马神经细胞丢失；B：EPH组

图1　大鼠海马CA3区神经元形态学观察　(HE×400)



A：EPH组；B：Con组

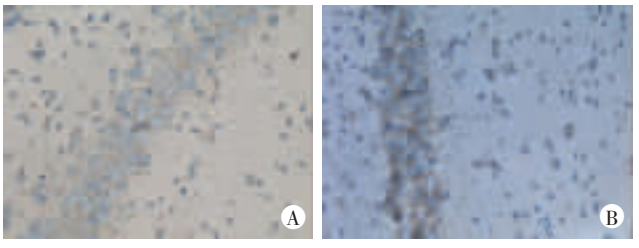
图2　大鼠海马CA3区bcl-2阳性细胞形态学观察　(SABC×400)

表1　缺氧缺血后不同时间点bax的表达($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	6 h	12 h	1 d	3 d	7 d
Sham组	0.12±0.03	0.12±0.02	0.14±0.04	0.13±0.02	0.12±0.02
Con组	0.17±0.05	0.30±0.06^{b}	0.57±0.16^{b}	0.35±0.10^{b}	0.27±0.08^{b}
EPH组	0.16±0.04	0.20±0.05^{ac}	0.31±0.08^{bd}	0.22±0.04^{ac}	0.18±0.04^{ac}

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

2.2.2　海马区bax的表达　海马区bcl-2阳性细胞为神经细胞细胞质着色，呈棕黄色颗粒(图3)。定量分析显示：与Con组相比，EPH组海马区bax蛋白表达在缺氧缺血后12 h、3、7 d时显著降低($P<0.05$)，1 d时最为明显($P<0.01$，表2)。



A：EPH组；B：Con组

图3　大鼠海马CA3区bax免疫阳性细胞形态学观察　(SABC×400)

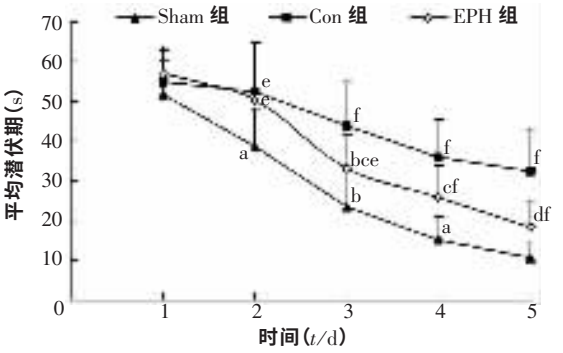
表2　缺氧缺血后不同时间点bcl-2的表达($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	6 h	12 h	1 d	3 d	7 d
Sham组	0.12±0.02	0.11±0.02	0.13±0.03	0.12±0.04	0.12±0.03
Con组	0.22±0.06^{a}	0.24±0.09^{a}	0.36±0.10^{b}	0.33±0.10^{b}	0.25±0.09^{a}
EPH组	0.25±0.08^{a}	0.38±0.11^{bc}	0.59±0.13^{bd}	0.57±0.15^{bd}	0.39±0.11^{bc}

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

2.3　行为学测试

定位航行实验：1 d时各组平均潜伏期无明显差异($P>0.05$)，2～5 d，Sham组较EPH组和Con组平均潜伏期缩短，差异有统计学意义($P<0.05$，$P<0.01$)；从3 d起，EPH组平均潜伏期明显短于Con组，差异有统计学意义($P<0.05$)；与前1 d相比，Sham组从第2天起平均潜伏期较前1 d均明显缩短，差异有统计学意义($P<0.05$，$P<0.01$)，以后趋势渐缓；EPH组从第3天潜伏期较前1 d明显缩短($P<0.01$)，以后趋势减缓(图4)。



a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与前1 d比较，c：$P<0.05$ d：$P<0.01$，与Con组比较；e：$P<0.05$，f：$P<0.01$，与Sham组比较

图4　缺氧缺血后4周各组大鼠平均潜伏期

空间探索实验：①穿越平台次数：EPH组和Con组穿越原平台次数均少于Sham组($P<0.05$，$P<0.01$)；但EPH组穿越原平台的次数较Con组明显增多($P<0.05$)。②目标象限游泳距离占总距离的百分比：EPH组和Con组明显少于Sham组，($P<0.05$，$P<0.01$)，但EPH组较Con组明显增多($P<0.05$)(表3)。

表3　各组大鼠记忆能力的测定($\bar{x}\pm s$)

组别	n	穿越平台次数	目标象限游泳距离与总距离百分比(%)
Sham组	8	7.67±2.21	62±13
Con组	8	3.56±1.73^{b}	38±8^{b}
EPH组	8	6.05±1.15^{ac}	53±6^{ac}

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

3　讨论

围产期窒息缺氧导致的缺氧缺血性脑损伤至今仍是一个难以解决的临床问题[5,6]。缺氧缺血性脑损伤时兴奋性氨基酸过度释放，氧自由基生成增加，免疫炎症反应启动，营养因子减少等都导致线粒体膜通透性增加，神经细胞由可逆性损伤变为不可逆性损伤，继而发生凋亡[7]。bcl-2蛋白家族被认为是内源性线粒体细胞凋亡途径的仲裁者[8]，主要定位于线粒体膜、内质网膜和核膜上，它主要包括两类功能蛋白：促凋亡蛋白(如bax蛋白)和抗凋亡蛋白(如bcl-2蛋白、Bak蛋白)。这两类成员之间互相平衡，促凋亡蛋白比例增加，细胞就通过内源性凋亡途径进行凋亡；相反，抗凋亡蛋白增加，则细胞存活[9,10]。有研究显示，促凋亡bcl-2蛋白家族成员bax可通过电压依赖性阴离子通道和/或腺嘌呤核苷转运体，形成线粒体渗透小孔(PTP)，从而使细胞色素C从线粒体基质内进入细胞质，从而启动凋亡起始因

子启动效应器 半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶(caspases)放大细胞死亡信号[11]。Gibson 等[12]发现将小鼠 bax 基因敲除能明显减轻缺氧缺血性脑损伤。Wang 等[13]发现使用 bax 抑制肽能够减轻损伤,并能下调未成熟脑缺氧缺血后 caspase 活性,而对成熟大脑无此作用。

7 日龄大鼠的神经发育水平类似于人新生儿期,新生大鼠缺氧缺血性脑损伤模型能表现新生儿缺氧缺血时的病理变化。由于缺氧缺血性脑损伤时细胞死亡主要以凋亡的形式进行,并受相关调控基因的影响,所以本实验通过检测相关凋亡基因表达从细胞凋亡的角度来研究麻黄碱的神经保护作用。本研究结果显示,HIBD 后海马早期即启动了细胞凋亡机制。使用麻黄碱治疗可以通过提高抗凋亡蛋白 bcl-2 的表达,降低促凋亡蛋白 bax 的表达,抑制海马神经细胞的凋亡,明显减轻损伤。其原因可能为缺氧缺血由于能量代谢障碍,离子稳态失衡,细胞水肿,导致脑内诸如胰岛素样生长因子(IGF-1)、脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)等神经营养因子减少,而这些神经营养因子在一定程度上可提高 bcl-2 家族抗凋亡蛋白并抑制促凋亡蛋白表达,下调下游的 caspase 水平从而减轻缺氧缺血后的脑损伤[7]。有研究报道,麻黄碱能降低成年大鼠缺血在灌注损伤后 1 周内 β-内啡呔的表达,从而减轻细胞水肿,并能促进 BDNF 含量的增加[14],故推测麻黄碱可能是通过此途径提高缺氧缺血后 BDNF 水平,使促凋亡蛋白 bcl-2 增加,抗凋亡蛋白 bax 减少。

35 日龄大鼠的脑发育水平约相当于人 2 岁左右的脑发育水平。Morris 水迷宫从行为学角度测试缺氧缺血性脑损伤动物应用麻黄碱治疗后其与海马相关的学习记忆能力[15,16]。平均潜伏时间与大鼠的空间学习能力成负相关,平均潜伏期越短说明大鼠的学习能力越强。为期 5 d 的定位航行实验显示,随实验进行,各组动物平均潜伏期均越来越短。然而,Con 组通过训练获得的学习能力明显低于 Sham 组和 EPH 组,EPH 组的学习能力逐渐提高,但仍较 Sham 组差。空间探索实验的目的是评价对原平台的记忆能力,Sham 组大鼠穿越平台次数明显较 EPH 组和 Con 组增多,且寻找平台的目标性较强,游泳轨迹主要在目标象限,而 EPH 组和 Con 组由于对原平台空间记忆能力减退,故游泳轨迹分布于目标象限较少,EPH 组的空间记忆能力较 Con 组有所提高,但仍低于 Sham 组。表明应用麻黄碱可以促进缺氧缺血大鼠远期学习记忆能力的提高,而学习记忆水平与海马区神经元的功能直接相关,其机制可能和麻黄碱抑制海马区功能神经元的减少有关。

总之,麻黄碱能明显减轻缺氧缺血对海马神经细胞的损害,并能改善与海马相关的学习记忆能力。但是本实验只研究了麻黄碱对缺氧缺血后主要凋亡调控因子变化的影响,其基因水平的变化及是否有其他因素协同参与其神经保护作用还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Laifenfeld D, Klein E, Ben-Shachar D. Norepinephrine alters the expression of genes involved in neuronal sprouting and differentiation: relevance for major depression and antidepressant mechanisms[J]. J Neurochem, 2002, 83(5): 1054 - 1064.

[2] 赵晓科, 肖　农, 周江堡, 等. 麻黄碱促进脑缺血大鼠运动功能康复的细胞及分子机制[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(3): 240 - 243.

[3] 李石志, 肖　农, 张晓萍. 麻黄碱对脑缺氧缺血后新生大鼠神经可塑性影响的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(16): 1684 - 1687.

[4] Rice J E 3rd, Vannucci R C, Brierley J B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat [J]. Ann Neurol, 1981, 9(2): 131 - 141.

[5] Gill M B, Perez-Polo J R. Hypoxia ischemia-mediated cell death in neonatal rat brain[J]. Neurochem Res, 2008, 33(12): 2379 - 2389.

[6] 尹晓娟, 周冬翠, 安育林, 等. 高压氧在新生鼠缺氧缺血性脑损伤神经修复中的作用机制[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(22): 2175 - 2177.

[7] Hagberg H, Mallard C, Rousset C I. Apoptotic mechanisms in the immature brain: Involvement of mitochondria[J]. J Child Neurol, 2009, 24(9): 1141 - 1146.

[8] Wong W W, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway[J]. IUBMB Life, 2008, 60 (6): 390 - 397.

[9] Daval J L, Pourie G, Grojean S, *et al*. Neonatal hypoxia triggers transient apoptosis followed by neurogenesis in the rat CA1 hippocampus [J]. Pediatr Res, 2004, 55(4): 561 - 567.

[10] Adams J M, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential[J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19(5): 488 - 496.

[11] Hallin U, Kondo E, Ozaki Y, *et al*. Bcl-2 phosphorylation in the BH4 domain precedes caspase-3 activation and cell death after neonatal cerebral hypoxic-ischemic injury[J]. Neurobiol Dis, 2006, 21 (3): 478 - 486.

[12] Gibson M E, Han B H, Choi J, *et al*. Bax contributes to apoptotic-like death following neonatal hypoxia-ischemia: evidence for distinct apoptosis pathways[J]. Mol Med, 2001, 7(9): 644 - 655.

[13] Wang X, Carlsson Y, Basso E, *et al*. Developmental shift of cyclophilin D contribution to hypoxic-ischemic brain injury[J]. J Neurosci, 2009, 29(8): 2588 - 2596.

[14] Chen Y, Xiao N, Zhang X, *et al*. Optimal compatible doses and effects of ephedrine and naloxone on the neural plasticity in cerebral ischemia/reperfusion rats[J]. Neural Regen Res, 2008, 3(12): 1290 - 1296.

[15] Arteni N S, Salgueiro J, Torres I, *et al*. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat[J]. Brain Res, 2003, 973(2): 171 - 178.

[16] Vorhees C V, Williams M T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. Nat Protoc, 2006, 1(2): 848 - 858.

(编辑　王　红)