维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)06-0857-04

一氧化氮合酶抑制剂对宫内窘迫胎鼠脑神经细胞凋亡和幼年学习记忆能力的影响

张　华,吴虹霆,张建华,姚珍薇

(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆　400016)

【摘　要】目的:研究一氧化氮合酶抑制剂对宫内窘迫胎鼠脑神经细胞凋亡和幼年学习记忆能力的影响及其抑制剂的保护作用。方法:①建立胎鼠宫内窘迫模型。②分为对照组、缺血再灌注组、治疗组[缺血前 1.5h 先注射左旋硝基精氨酸(L-NNA),然后于术前即刻腹腔内注射氨基胍(AG)500mg/kg]、远期观察Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组(将对照组、缺血再灌注组和治疗组中的部分胎鼠继续妊娠至孕 19 天,以剖宫产娩出,饲养至 40 天)。③检测脑组织中细胞色素 C 的胞浆释放量,以 Morris 水迷宫检测幼鼠学习能力。结果:①缺血再灌注组和治疗组胞浆细胞色素 C 含量均高于对照组,治疗组各时间点的胞浆细胞色素 C 含量低于缺血再灌注组($P<0.05$)。②各组幼鼠历时 5 天训练,共 8 个时间段。远期观察Ⅱ组 8 次平均潜伏期与Ⅰ、Ⅲ组比较,明显延长($P<0.05$)。远期观察Ⅲ组与Ⅰ组比较,潜伏期虽然延长,但无统计学意义($P>0.05$)。③幼鼠在第 5 天进行的跨平台次数,远期观察Ⅱ组较Ⅰ组、Ⅲ组明显减少($P<0.05$)。而远期观察Ⅲ组与Ⅰ组比较,无显著性差异($P>0.05$)。结论:NOS 抑制剂通过减轻缺血缺氧脑损伤时胎鼠脑神经细胞凋亡对其出生后的远期智能起保护作用。NOS 抑制剂可能作为一种有价值的治疗方法应用于宫内窘迫的治疗中。

【关键词】宫内窘迫;胎鼠;一氧化氮合酶抑制剂;凋亡;学习能力

【中国图书分类法分类号】R714.51　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2006-06-23

The effect of NOS inhibitors on fetal rat neuron apoptosis during intrauterine distress and childhood's learning and memory

ZHANG Hua, et al

(*Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Evaluating the effect of nitric oxide synthase (NOS) inhibitors on fetal rat neuron apoptosis during intrauterine distress and childhood's learning and memory. *Methods*: ① Set up fetal rat intrauterine distress model. ②Divide into the control group, reperfusion group, treatment group [injected N omega-nitro-L-arginine (L-NNA) 4mg/kg into pregnant rat's abdomen before ischemia and injected aminoguanidine (AG) 500mg/kg before operation], long-term observation group Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ (the part of rats in control group, reperfusion group, treatment group were performed cesarean section on pregnant 19 days and bred to 40 day of age after delivery). ③Measuring the content of cytochrome c in cytosol and examined the ability of learning and memory function. *Results*: ①The content of cytochrome c in reperfusion group (6/12/24h) and treatment group (6/12/24h) were higher than those in the control group ($P<0.05$). The content of cytochrome c in treatment group (6/12/24h) were lower than those in reperfusion group ($P<0.05$). (2) Escape latency in long-term observation group Ⅱ were longer than those in long-term observation group Ⅰ、Ⅲ ($P<0.05$). There were no differences in escape latency between long-term observation group Ⅰ and Ⅲ ($P>0.05$). (3) Crossing platform times in long-term observation group Ⅱ were fewer than those in long-term observation group Ⅰ、Ⅲ ($P<0.05$). There were no differences in crossing platform times between long-term observation group Ⅰ and Ⅲ ($P>0.05$). *Conclusion*: NOS inhibitors play a obvious protective role in long-term intelligence of fetal rat after delivery through relieved neuron apoptosis during hypoxic ischemia encephalopathy. NOS inbibitors can be a valuable therapy method in intrauterine distress treatment.

【Key words】Intrauterine distress; Fetal rat; NOS inbibitors; Apoptosis; Learning ability

胎儿宫内窘迫所致胎儿、新生儿缺血缺氧性脑损伤将严重危害胎儿、新生儿健康,常有严重的远期后遗症,如智能落后、癫痫、脑瘫等。众多研究证实,大约 90%新生儿缺血缺氧性脑损伤发生在宫内和分娩过程,只有 10%发生在新生儿出生之后。宫内窘迫导致的胎儿脑组织缺血再灌注损伤,以神经细胞凋亡为主。胎脑作为未成熟脑组织,凋亡占明显优势。胎儿缺血缺氧性脑损伤时,神经元凋亡、死亡多呈特征性分布。大脑皮层及海马的神经元特别易受损伤。而海马及皮层额叶与出生后的学习和空间记忆能力密切相关。

一氧化氮合酶(NOS)在胎鼠缺血缺氧性脑损伤中起重要作用。本研究在胎鼠宫内窘迫模型上研究一氧化氮合酶抑制剂对宫内窘迫胎鼠脑神经细胞

作者介绍:张　华(1971-　),女,主治医师,博士,主要研究方向:胎儿宫内窘迫的诊治。

维普资讯 http://www.cqvip.com

凋亡和幼年学习记忆能力的影响及其抑制剂的保护作用，从而为临床治疗胎儿宫内窘迫、改善新生儿预后提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 对象与分组

胎鼠宫内窘迫模型的建立：SD 雌性大白鼠，平均体重约 250g，以精液涂片阳性为妊娠第 1 日，于孕 17 天以 3.5% 水合氯醛(1ml/100g)腹腔麻醉后，取下腹正中切口，暴露妊娠子宫，观察双侧宫腔内的活胎数。将两个小动脉钳分别靠内侧钳夹于一侧子宫的上下端，造成子宫胎盘循环障碍致宫内窘迫，缺血 15min 后松开动脉夹，将子宫还纳入腹腔，以头孢唑林钠 50mg 腹腔注入预防感染，缝合腹部伤口，回笼饲养，为缺血再灌注模型，分别于术后 6h、12h、24h 以剖宫产取出胎鼠。正常对照组的胎鼠直接剖宫产取出(具体分组与处理措施见表 1)。

表 1 分组与处理

组别	总例数	再灌注			处理措施
		6h	12h	24h	
对照组	12				
缺血再灌注组	36	12	12	12	
治疗组	36	12	12	12	术前 1.5h 孕鼠腹腔内注射 L-NNA4mg/kg，然后于手术前即刻腹腔内注射氨基胍 500mg/kg。

远期观察阶段，即是将对照组、缺血再灌注组和治疗组中的部分胎鼠继续妊娠至孕 19 天，以剖宫产娩出，相应为远期观察Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组。立即清除新生鼠口鼻分泌物，人工刺激呼吸，使新生鼠迅速建立自主呼吸，上述操作过程在环境温度 30~32℃中进行，复苏胎鼠作好标记交代乳鼠(交配较剖宫产母鼠提前 2~3 天，以保证代乳鼠在剖宫产鼠手术前 1~3 天自然分娩)喂养。新生鼠饲养至生后 21 天断乳，雌、雄鼠分开饲养，至 40 天每组取 12 只幼鼠进行学习记忆能力的测试。

1.2 Western-blot 法检测细胞色素 C 胞浆释放

分别提取胞浆蛋白和线粒体蛋白，经 15% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳后、电转膜、加入小鼠抗细胞色素 C 多克隆抗体(NEOMARKERS 公司)、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、DAB 加镍显色等步骤。显色的滤膜晾干后立即用 Microtec Scan-Maker E6 系统扫描，ImageMaster VDS Software2.0 测定各显色带的绝对积分 OD 值，然后计算每 μg 蛋白对应的 OD 值，结果以 OD 值/μg 蛋白表示。

1.3 幼鼠学习能力检测

水迷宫分为 4 个象限，分别称 SW、NW、SE 及 NE 象限，再加入墨汁使水池不透明。在 SW 象限正中离池壁 33cm 处放置 1 个圆形透明平台。迷宫上方安置着连接显示系统的摄像机，大鼠运动轨迹及测试的记录显示和处理均采用中国科学院心理研究所研制开发的动物行为学软件。实验期间保持环境安静，迷宫外参照物保持不变。实验分为两部分：①定位航行试验：用于测量大鼠对水迷宫学习记忆的获取能力，实验历时 5 天，第 1 天让大鼠自由游泳 2min，第 2 天起，每天分上、下午两段，每段训练 4 次。观察并记录后 4 天训练期间大鼠每次寻找站台所需的潜伏期。②空间探索试验：用于测量大鼠学会寻找平台后，对平台空间位置记忆的保持能力。测其在 120s 内跨过该象限平台相应位置的次数。

1.4 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS10.0 软件进行重复测量的单因素方差分析。

2 结 果

2.1 细胞色素 C 的胞浆释放

缺血再灌注组和治疗组各时间点胞浆细胞色素 C 含量均高于对照组，治疗组各时间点的胞浆细胞色素 C 含量低于缺血再灌注组($P<0.05$)(见表 2)。

表 2 宫内窘迫各时间段胎鼠脑神经细胞细胞色素 C 的胞浆含量(OD 值/μg 蛋白)

组别	正常	再灌注		
		6h	12h	24h
对照组	8.56 ± 0.78			
缺血再灌注组		20.26 ± 3.05$_{\triangle}$	27.39 ± 3.65$^{\triangle}$	30.52 ± 3.76$^{\triangle}$
治疗组		15.66 ± 4.13$^{\triangle\diamond}$	20.49 ± 2.52$^{\triangle\diamond}$	24.15 ± 2.06$^{\triangle\diamond}$

vs control: $^{\triangle}P<0.05$, $^{\blacktriangle}P>0.05$; vs reperfusion group: $^{\diamond}P<0.05$。

2.2 子代幼鼠寻找站台潜伏期

各组幼鼠历时 5 天训练共 8 个时间段，各组幼鼠训练前两天潜伏期迅速下降，从第 3 天开始趋于平稳，维持在相对恒定的水平。远期观察Ⅱ组与Ⅰ、Ⅲ组成绩始终存在差距。训练 5 天总的平均潜伏期各组间存在显著性差异，远期观察Ⅱ组与Ⅰ、Ⅲ组比较，明显延长($P<0.05$)。远期观察Ⅲ组与Ⅰ组比较，潜伏期虽然延长，但无统计学意义($P>0.05$)(见表 3)。

2.3 子代幼鼠末次跨平台次数

幼鼠在第 5 天进行的跨平台次数，远期观察Ⅱ组较Ⅰ、Ⅲ组明显减少($P<0.05$)。而远期观察Ⅲ组与Ⅰ组比较，无显著性差异($P>0.05$)(见表 4)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 幼鼠水迷宫寻找平台平均潜伏期($\bar{x}\pm s$)s

训练次数	分组		
	远期观察Ⅰ组	远期观察Ⅱ组	远期观察Ⅲ组
1	46.51 ± 15.64	69.82 ± 14.84△◇	50.75 ± 10.75▲
2	33.42 ± 6.41	63.27 ± 15.81△◇	43.70 ± 9.38▲
3	27.18 ± 6.07	56.72 ± 13.14△◇	34.87 ± 6.51▲
4	18.47 ± 5.69	47.66 ± 9.04△◇	25.31 ± 3.61▲
5	14.87 ± 4.27	35.20 ± 7.58△◇	17.01 ± 4.73▲
6	11.77 ± 4.19	29.67 ± 7.03△◇	13.24 ± 2.85▲
7	9.78 ± 2.39	25.87 ± 5.26△◇	11.90 ± 2.16▲
8	8.73 ± 2.29	19.77 ± 3.34△◇	9.21 ± 1.32▲

vs long-term observation group: △P<0.05, ▲P>0.05; vs long-term observation group Ⅲ: ◇P<0.05。

表 4 幼鼠水迷宫末次跨平台次数($\bar{x}\pm s$)

分组	跨平台次数
远期观察Ⅰ组	11.25 ± 2.71
远期观察Ⅱ组	8.3 ± 2.10△◇
远期观察Ⅲ组	10.78 ± 2.48▲

vs long-term observation group: △P<0.05, ▲P>0.05; vs long-term observation group Ⅲ: ◇P<0.05。

3 讨 论

宫内窘迫所致的胎儿缺血缺氧性脑损伤中神经元凋亡占明显优势。在 7 日龄新生鼠缺血缺氧性脑损伤中,脑组织大部分区域存在着具有从凋亡至坏死的各种形态学特征的细胞变性[1]。而在一些死产婴儿脑中,甚至只发现了凋亡现象。

3.1 细胞色素 C 的胞浆释放与胎鼠脑神经细胞凋亡的关系

线粒体介导的细胞凋亡途径包括细胞色素 C、procaspase-9 和 Apaf-1 从线粒体内外膜间隙释放及其一系列后续的生化反应。缺血导致线粒体肿胀、膜结构及渗透性发生改变,间腔内潜在有害蛋白(如:细胞色素 C 等)的胞浆释放。细胞色素分布于线粒体内外膜之间,并与线粒体内膜表面松散结合,是在呼吸链中电子传递必需的一类色素蛋白,其色素辅基是含铁卟啉衍生物。当脑组织缺血缺氧时,线粒体通透性转运孔(MPTP)开放。MPTP 的开放引起线粒体内膜两侧离子浓度趋于平衡,线粒体膜电位下降,使跨膜的 H^+ 浓度梯度消失,呼吸链脱耦联,引起线粒体基质高渗,发生渗透性肿胀,使线粒体外膜破裂,原先位于线粒体内膜的细胞色素 C进入胞质[2]。

细胞色素 c 除参与细胞有氧呼吸活动外,在激活 caspase、诱导细胞凋亡方面具有重要意义。本实验发现在脑缺血再灌注期,损伤达到一定时间和程度后,线粒体膜通透性发生明显改变,细胞色素 c 大量地从线粒体转移至胞浆。进入胞浆的细胞色素 c 结合到 Apaf-1 的 WD40 重复区域,促使 Apaf-1 寡聚化,形成 Apaf-1- 细胞色素 c 多聚复合体。此复合体可激活 caspase 级联反应,导致细胞凋亡[3]。故脑缺血后发生的迟发性神经元凋亡中,细胞色素 c 从线粒体释放入胞浆是其关键步骤之一。

3.2 胎鼠缺血缺氧性脑损伤对幼鼠学习记忆能力的影响

Morris 水迷宫是 R.G. Morris[4]创建的一套用于检测大鼠定位航行和空间搜索能力的一种灵敏而有效的方法。该方法分为两部分,先是定位航行实验,以潜伏期表示,测量大鼠获取经验即学习的能力,第二是空间搜索实验,以跨平台次数表示,测量大鼠保存经验即记忆的能力。

Cai 等[5]钳夹孕 17 天孕鼠子宫血管 10min 后,仔鼠生后 28 天应用水迷宫进行行为学测试,发现宫内窘迫的仔鼠学习能力降低。Tombakoglu 等[6]发现大鼠孕中期持续低血压 30min (相当于孕妇低血压 6~7h),可诱导胎鼠脑细胞凋亡、死亡,并影响生后学习能力。学习记忆能力是复杂的脑高级功能,海马尤其是 CA1 区是与学习记忆功能最为密切的脑区。众多研究[7,8]表明只要海马系统完好,大鼠就可精确地完成空间迷宫任务,海马受损,空间学习能力必受到影响。学习记忆的功能活动与许多因素密切相关。突触的结构和功能是学习记忆的生物学基础。胎儿期缺血缺氧性脑损伤,大脑皮层及海马神经细胞特别易受损伤[9]。神经细胞是神经系统的结构和功能单位,也是学习记忆的结构基础。脑缺血缺氧时海马 CA1 区神经细胞变性坏死、数目减少,使突触数量也随之减少,而与受累神经细胞有突触联系的神经纤维也必受影响,神经细胞和突触的这种改变影响了神经细胞之间的信息传递,可导致学习记忆等脑功能受损。本实验发现,随着缺血再灌注时间的延长,胎鼠脑神经细胞凋亡呈明显上升趋势。而对幼鼠的 Morris 水迷宫检测中发现,未经治疗的远期观察Ⅱ组的学习记忆能力明显低于其他组,说明由宫内窘迫引起的缺血缺氧性脑损

维普资讯 http://www.cqvip.com

伤,确可导致幼年学习记忆能力的下降。

3.3 NOS 在胎鼠缺血缺氧性脑损伤中的作用及其抑制剂的保护作用

NOS 有三种类型:nNOS、eNOS、iNOS。nNOS 主要在神经系统的一部分神经元和全身其他一些器官组织内表达。由 nNOS 产生的 NO 是神经毒性 NO 的主要来源,而且在缺血缺氧性脑损伤早期起重要作用。iNOS 一般在健康组织中难以发现有表达,通常在病理情况下表达。缺血缺氧性脑损伤时,NO 及其衍生物过氧化亚硝酸盐通过靶细胞线粒体中的含铁酶类以及与蛋白质相结合形成 NO- 铁复合物,抑制细胞线粒体呼吸链或竞争性地抑制细胞色素氧化酶,影响神经元细胞的生长发育,进而导致细胞凋亡。我们在前一部分的实验中已证实[10],nNOS 和 iNOS 分别介导了宫内窘迫不同时段的胎鼠脑组织线粒体结构和功能的损害。由不同类型 NOS 介导的 NO 异常增加,将通过损害线粒体功能和能量代谢引起细胞凋亡。

L-NNA 是 NO 合成底物 L- 精氨酸类似物,可竞争性抑制 NOS 的作用。Xiao 等[11]用 L-NNA 治疗新生鼠急性缺血缺氧性脑损伤取得很好的疗效。AG 是一种 L- 精氨酸类似物,是近年研究较多的选择性 iNOS 抑制剂。在正常状态下,AG 不能很好地通过血脑屏障,但在脑缺血后,血脑屏障对亲水性小分子物质的通透性增加,AG 能通过血脑屏障发挥神经保护作用,有效抑制 iNOS 的活性。Atan 等[12]的研究发现,AG 可以明显抑制 iNOS 的活性,能明显改善脑缺血和脑外伤后的生理学指数和神经细胞存活率。本实验在制作模型前 1h 给孕鼠腹腔内注射 L-NNA,手术前即刻注射 AG,既可抑制缺血早期 nNOS 的毒性,待进入缺血再灌注期后,AG 恰好可以发挥作用,在缺血再灌注期各时间点对胎鼠脑组织 iNOS 都有明显的抑制作用,这一点也在前部分实验中得到证实[10],并能降低细胞色素 C 的胞浆释放,减少胎鼠脑神经细胞凋亡。

从神经生物学角度认为,宫内窘迫后胎鼠学习记忆能力下降的原因与缺血缺氧后神经细胞凋亡、坏死导致神经细胞之间信息传递障碍有关。那么进行合理有效地干预将减轻神经细胞的损伤,从而保护胎鼠远期智能不受宫内窘迫的影响。本实验结果也提示,用 NOS 抑制剂干预的幼鼠学习记忆能力明显强于未干预的幼鼠,说明 NOS 抑制剂通过减轻缺血缺氧脑损伤时胎鼠脑神经细胞凋亡对其出生后的远期智能起保护作用。因此,NOS 抑制剂可能作为一种有价值的治疗方法应用于宫内窘迫的治疗中。但学习记忆的机制复杂,影响因素众多,本实验对宫内窘迫的远期智能研究只是冰山一角,其中可能的机制尚需进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, et al. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain [J].Pediatr Res,2001;49:735-741.

[2] Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central controlpoint of apoptosis[J].Trends Cell Biol,2000;10:369-377.

[3] Adams JM, Cory S.Apoptosomes: engines for caspase activation [J]. Curr Opin Cell Biol,2002;14:715-720.

[4] Morris R. Developments of a water-mase procedure for studying spatial learning in the rat[J]. J Neurosci Methods,1984;11:47-60.

[5] Cai Z, Xiao F, Lee B, et al. Prenatal hypoxia-ischemia alters expression and activity of nitric oxide synthase in the young rat brain and causes learning deficits[J]. Brain Res Bull,1999;49:359-365.

[6] Tombakoglu M, Durakoglugil M, Kale G, et al. Transient intrauterine hypotension causes apoptosis in fetal rat brain and affects learning [J]. Pediatr Res,2003;53:977-982.

[7] Steffenach HA, Sloviter RS, Moser EI, et al. Impaired retention of spatial memory after transection of longitudinally oriented axons of hippocampal CA3 pyramidal cells [J].Proc Natl Acad Sci USA,2002;99:3194-3198.

[8] Gerlai RT, McNamara A, Williams S, et al. Hippocampal dysfunction and behavioral deficit in the water maze in mice: an unresolved issue[J]. Brain Res Bull,2002;57:3-9.

[9] Moga D, Hof PR, Vissavajjhala P. Pravalbumin containing interneurons in rat hippocampus have an AMPA receptor profile suggestive of vulnerability to excitotoxicity[J]. J Chem Neuroanat, 2002; 23: 249-253.

[10] 张 华,姚珍薇,吴味辛. 一氧化氮合酶抑制剂对宫内窘迫胎鼠脑线粒体结构及功能的影响[J].中华妇产科杂志,2004;39:543-547.

[11] Xiao F, Fratkin JD, Rhodes PG, et al. Reduced nitric oxide is involved in prenatal ischemia-induced tolerance to neonatal hypoxic-ischemia brain injury in rats[J]. Neurosci Lett, 2000;285:5-8.

[12] Atan MS, Moochhala SM, Ng KC, et al. Effects of aminoguanidine and L-arginine methyl ester resuscitation following induction of fluid-percussion injury and severe controlled hemorrhagic shock in the rat brain[J]. J Neurosurg,2004;101:138-144.