

神经生长因子对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

李志坚¹ 王益光² 孙嘉斌² 王玉良² 唐可欣² 张薇¹ 郭顺生¹

摘要 目的:探讨神经生长因子(NGF)对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。**方法:**采用大脑中动脉内栓线阻断法(MCAO)造成大鼠局灶性损伤模型,同时给予NGF治疗,观测神经评分改变,计算脑组织梗死灶,测定脑组织含水量以及一氧化氮合酶(NOS)活动的变化。**结果:**NGF治疗组神经评分明显降低($P<0.05$);与脑缺血再灌注组比较,NGF治疗组脑缺血梗死区缩小,脑组织含水量和NOS活性明显降低($P<0.05$)。**结论:**NGF具有保护脑缺血再灌注损伤的作用,可能与抑制NOS的活性有关。

关键词 神经生长因子;脑缺血再灌注损伤;神经评分;一氧化氮合酶;大鼠

中图分类号:R493,R741 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-02-0107-02

The protective effect of nerve growth factor on acute ischemia reperfusion injured rats/LI Zhijian,WANG Yiguang,SUN Jiabin,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(2): 107—108

Abstract Objective:To study the protective effects and mechanism of nerve growth factor(NGF) on acute brain lesion induced by ischemia-reperfusion in rats.**Method:**The focal ischemia-reperfusion modal was made by thread embolism of middle cerebral artery,after treatment of NGF. The neurological grades were observed,the infarct size, the brain water content and the activity of nitric oxide synthase(NOS) were measured.**Result:**The neurological grades were significantly lowered after treatment compared with ischemia-reperfusion group ($P<0.05$),the infarct size,the brain water content and the activity of NOS in NGF treatment group were obviously lower than that in the ischemia-reperfusion group ($P<0.05$).**Conclusion:**NGF can accelerate the nervous function recovery of the ischemia-reperfusion injured rats,the mechanism is related to NGF prohibits NO production and play a role on amelioration of the brain ischemia-reperfusion injury.

Author's address Dept. of Functional Laboratory, Weifang Medical College, Weifang, 261042

Key words nerve growth factor; brain ischemia-reperfusion injury; neurological grades; nitric oxide synthase; rats

缺血与再灌注时氧自由基产生过多会导致脑组织损伤,早期应用清除自由基的脑保护治疗药物可提高缺血脑组织对其损伤的耐受能力,从而减轻脑组织的损伤。脑损伤后随着时间的变化常出现有意义的神经功能恢复,大量研究表明,神经生长因子(nerve growth factor,NGF)与之有关^[1]。本研究通过观察NGF对大鼠脑缺血再灌注损伤后神经评分,计算脑组织梗死灶,测定脑组织含水量以及一氧化氮合酶(nitric oxide synthase,NOS)含量的影响,探讨NGF的脑保护作用机制,为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组及试剂

雄性Wistar大鼠118只,体重250—300g(山东大学实验动物中心提供)。NGF(解放军军事医学科学院提纯),NOS测定试剂盒(南京建成生物工程所提供)。随机分成脑缺血组、NGF治疗组及正常对照组,每组8只,进行神经病学功能测定;另取96只大鼠再随机分成脑缺血组、NGF治疗组及正常对照

组,每组又分别划分为伤后3h、6h、12h和24h等4个时相组,每组8只,进行脑组织含水量、脑梗死灶体积和NOS含量测试。

1.2 急性脑缺血再灌注损伤模型制备

用20%氨基甲酸乙酯0.6ml/kg腹腔麻醉成功后,按照Kogure等^[2]的方法,采用线栓法可逆性闭塞左侧大脑中动脉,将一端加热后呈膨圆、直径0.165mm的鱼线至颈内动脉内制成中脑动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion,MCAO),缺血1h后拔出栓子,正常对照组不做任何处理。NGF治疗组造模后即刻肌肉注射NGF1000BU(2ml生理盐水溶解),脑缺血组和对照组注射等量生理盐水。

1.3 检测指标

1.3.1 神经评分:分别于术后第3、6、9d参照Longa的5分评分标准^[3]:0分:无神经症状;1分:不能完全伸展对侧前或后爪;2分:向外侧转圈;3分:向手术

1 潍坊医学院机能实验室,山东潍坊,261042

2 潍坊医学院生理学教研室

作者简介:李志坚,女,实验师

收稿日期:2006-04-06

对侧倾倒;4分:不能自发行走,意识丧失。

1.3.2 脑组织含水量测定:按 Gotoh 等方法^[4],于缺血 1h 再灌注 24h 末快速剥出鼠脑,用滤纸吸干表面水分称重后,将梗死侧脑组织置 160℃烤箱中烘干至恒重,按下式计算脑组织含水量:含水量=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.3.3 脑梗死灶体积计算:缺血再灌注实验末快速断头取出鼠脑,置冰箱(-0℃)内 10min 后,取冠状面均匀切成 2mm 厚脑片 5—6 片,将第 3 切片迅速置于 2%TTC 溶液(37℃)中染色。正常脑组织染成红色,缺血区呈灰白色,界线清晰。分离梗死组织与正常组织,分别称重,计算梗死组织占第 3 切片湿重的百分率。

1.3.4 NOS 测定:缺血组和 NGF 治疗组大鼠分别在脑缺血后 3h、6h、12h 和 24h 断头取脑,取损伤侧脑组织约 1.0—2.0cm³,立即称重,用玻璃匀浆器制成 10%匀浆,以 4000r/min 离心 15min,提取上清液,按 NOS 测定试剂盒说明书方法检测。

1.4 统计学分析

实验结果采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析,所得数据用均数±标准差表示。

2 结果

2.1 NGF 对脑缺血再灌注大鼠神经评分的影响

神经生长因子治疗组第 3、6、9d 神经评分均显著降低,与脑缺血组比较差异均有显著性意义($P<0.05$),见表 1。

2.2 NGF 对再灌注后脑组织含水量的影响

肉眼可见缺血组脑组织苍白,肿胀明显,大脑半球中缝向健侧偏移,其脑组织含水量明显高于对照组($P<0.05$),NGF 治疗组抑制脑组织含水量增加($P<0.05$),见表 2。

2.3 NGF 对再灌注后脑梗死范围的影响

与缺血再灌注组相比,NGF 治疗组可使脑梗死范围明显缩小($P<0.05$),见表 2。

2.4 各组大鼠脑组织 NOS 活动变化的比较

大鼠脑皮质中的 NOS 活性,脑缺血后 3h 时升高($P<0.05$),6h 开始下降,24h 后渐下降。NGF 实验组大鼠脑缺血后 3h、6h、24h NOS 活性较脑缺血组降低($P<0.05$),表明 NGF 能拮抗脑缺血后所致的 NOS 活性升高效应,见表 3。

3 讨论

NGF 的生物活性在于维持交感神经和感觉神经的生存,促进神经细胞的分化,决定轴突的生长。

表 1 NGF 对脑缺血再灌注大鼠神经评分的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	术后 3d	术后 6d	术后 9d
对照组	8	0.09±0.32	0.11±0.28	0.10±0.18
脑缺血组	8	2.34±0.36 ^①	2.24±0.34 ^①	2.14±0.32 ^①
NGF 治疗组	8	1.53±0.52 ^②	1.23±0.47	1.13±0.37

①与对照组比较 $P<0.05$;②与脑缺血组比较 $P<0.05$

表 2 NGF 对大鼠脑缺血再灌注损伤脑含水量和梗死范围的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	脑含水量	梗死范围
对照组	8	77.89±0.32	-
脑缺血组	8	83.34±0.36	22.4±0.3
NGF 治疗组	8	79.03±0.52 ^①	18.2±0.4 ^①

①与对照组比较 $P<0.05$

表 3 缺血组和实验组大鼠脑梗死后 NOS 水平 ($\bar{x}\pm s$)

组别	3h	6h	12h	24h
对照组	40.12±9.26	40.32±8.92	40.21±9.16	40.36±9.23
脑缺血组	59.76±13.62	57.24±13.21	55.69±12.59	49.12±12.47
NGF 治疗组	50.26±14.24 ^①	48.27±12.23 ^①	45.63±10.93 ^①	42.25±13.34

①与脑缺血组比较 $P<0.05$

近年研究表明,NGF 能选择作用于中枢神经系统^[5]。胎神经移植与 NGF 联合注入应用于脑损伤的 SD 大鼠皮质研究表明,既可改善其活动功能,又可促进脑损伤损害的恢复。张秋玲等^[6]发现:NGF 能明显改善急性缺血性脑卒中患者的肌力,促进神经功能恢复。诸多报道表明,脑缺血后 NGF 家族中的大多数成员在脑内表达发生改变,且对脑缺血损伤有一定的保护和治疗作用^[7-8]。脑缺血再灌注损伤所造成的脑组织缺血、缺氧,引起脑细胞水肿、软化、变性,甚至坏死,神经评分增高。经过 NGF 治疗后,神经评分降低,与脑缺血组比较有显著性差异,表明 NGF 对大鼠的神经功能恢复有促进作用。说明 NGF 对脑缺血的保护和治疗作用是确切的,这与相关报道一致^[9]。

脑缺血再灌注损伤必然会导致迟发性神经元死亡(delayed neuronal death, DND),由此引起的不可逆脑损伤灶进一步扩大,可能与脑缺血再灌注损伤产生的兴奋性谷氨酸、自由基、钙超载与蛋白质的磷酸化等因素有关。一氧化氮(nitric oxide, NO)是造成迟发性神经元死亡的主要因素,脑损伤后激活了 NOS 产生大量的 NO,神经毒性作用突出,作用时间较长,并且出现持续性的谷氨酸上调和 NGF 表达下调^[8-9]。本实验显示:NGF 治疗组明显抑制脑组织含水量增加($P<0.05$),与缺血再灌注组相比,脑梗死范围明显缩小($P<0.05$)。脑缺血再灌注后 3h NOS 的活性较对照组明显升高,提示 NO 和 NOS 参与了脑缺血后神经细胞损伤的病理过程,且与病情发展密切相关。脑缺血再灌注后 NGF 治疗组大鼠脑缺血后 3h、6h、12h 脑组织的 NOS 活性较脑缺血组明显降低($P<0.05$),表明 NGF 通过抑制 NOS 活性的升高, (下转 132 页)