

• 研究报告 •

亚低温对大鼠脑缺血-再灌注后神经胶质细胞分泌神经生长因子的影响

毛德军 唐咏春 李菲 高丽丽

【关键词】 缺血-再灌注损伤, 脑; 亚低温; 神经生长因子

脑缺血损伤时,神经胶质细胞大量合成、分泌神经生长因子(NGF),对缺血损伤神经元的再生修复起重要作用^[1]。为进一步探讨亚低温治疗急性脑梗死的作用机制,我们对缺血培养大鼠神经胶质细胞分泌 NGF 及亚低温各时间段对其的影响进行观察分析,报告如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物分组与脑缺血-再灌注模型制备:健康雄性 SD 大鼠 30 只,体重 200~250 g(青岛大学医学院动物实验中心提供),随机分为常温缺血组,亚低温 0.5、1 和 3 h 缺血组及常温对照组,每组 6 只大鼠。直径 0.205 mm 尼龙线,每段长 4 mm,一端用蚊香烧成杵状备用。参照 Zea Longa 等^[2]报道的线栓法建立大鼠大脑中动脉缺血模型。各缺血组大鼠均于再灌注后 24 h 在无菌条件下断头取脑。

1.2 神经胶质细胞培养^[3]:取脑组织,无菌条件下分离缺血侧海马和大脑皮质,置于消毒平皿中,解剖液冲洗,用手术刀片切成碎块。用热处理过的粗吸管吸取脑组织放入另一平皿内,加适量解剖液和质量分数为 0.25%的胰酶,于 37℃、体积分数为 5%的 CO₂ 培养箱中消化 30 min,消化后的组织块吸入盛有适量种植培养液的两支试管中,用吸管吹散,1 000 r/min 离心使细胞下沉。去上清,吸入 10 ml 接种液,用吸管吹散至单个细胞。静置,200 目筛网过滤,去除未消化的组织残渣。用血球计数板计数细胞,体积分数为 0.4%的苜蓿兰镜检存活率大于 95%,用种植培养液调节细胞至 5×10⁵/L,接种于涂有质量分数为 0.1%的多聚赖氨酸的 24 孔培养板中,500 μl/孔,培养板置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 72 h。上清移入无菌 Eppendorf 小管,-20℃冷藏待测;同时

消化每孔细胞,计算细胞总数。

1.3 NGF 含量测定:采用双向酶联免疫吸附法(ELISA)^[4]。酶标仪 450 nm 处以阴性对照调零后测定每孔的吸光度(A)值,根据 NGF 标准品及其对应 A 值先得出标准曲线,再求出回归方程,得出每孔样品的 NGF 含量。

1.4 肛温监测:术中及缺血期用电子温度计监测肛温,采用灯泡及热水袋升温、冰袋降温的方法使常温缺血组及常温对照组大鼠肛温稳定在 36~37℃,亚低温各组缺血期肛温保持在 32~33℃。

1.5 统计学方法:数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS10.0 统计软件进行方差齐性检验及组间方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

各组大鼠神经胶质细胞分泌 NGF 量的变化见表 1。

表 1 亚低温缺血培养对大鼠神经胶质细胞分泌 NGF 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	NGF(pg/10 ⁵ 细胞)
常温缺血组	6	3.24±1.02
亚低温 0.5 h 缺血组	6	8.87±1.34
亚低温 1 h 缺血组	6	14.64±2.55*
亚低温 3 h 缺血组	6	23.37±4.03**
常温对照组	6	14.94±3.84

注:与常温缺血组比较;* $P < 0.05$,

** $P < 0.01$

3 讨 论

NGF 主要由神经胶质细胞产生、分泌,对神经元生长、发育起促进作用。此外,NGF 还具有神经保护作用,其机制与稳定细胞内钙离子水平,减少兴奋性氨基酸及钙超载引起的细胞损伤,拮抗 NO 介导的细胞毒,以及调节自由基代谢有关,并对损伤的神经元有修复作用^[1]。本研究结果表明,脑缺血-再灌注损伤可导致 NGF 分泌减少。

亚低温对缺血脑组织和脑功能有确切的保护作用。本研究结果表明,亚低温 1 h 和 3 h 缺血组 NGF 分泌量可明显提高。表明随治疗时间延长,亚低温治疗的脑保护作用越来越明显,其机制可能与

亚低温的下列作用有关^[5-8]:①降低脑代谢,减少乳酸等代谢产物堆积;②减少钙超载引发的一系列有害反应;③减少一氧化氮介导的细胞毒性反应;④减少兴奋性氨基酸、自由基等内源性毒性产物的产生与损害;⑤改变凋亡相关基因(如 bcl-2)的表达,影响细胞色素 C 释放,抑制 caspases 激活;⑥保护血-脑屏障,稳定细胞膜及溶酶体膜,减轻脑水肿;⑦促进线粒体酶活性及功能恢复,减少神经胶质细胞凋亡。

参考文献:

- Lindvall O, Kokaia Z, Bengtzen J, et al. Neurotrophins and brain insults [J]. TINS, 1994, 17: 490-496.
- Zea Longa E L, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in the rats [J]. Stroke, 1989, 20: 84-91.
- McCarthy K D, de Vellis J D. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue [J]. J Cell Biol, 1980, 85: 890-902.
- Weskamp G, Otten U. An enzyme-linked immunoassay for nerve growth factor (NGF), a tool for studying regulatory mechanism involved in NGF production in brain and in peripheral tissues [J]. Neurochemistry, 1987, 48: 1779-1786.
- 王卫民,姜启周,程军,等.选择性脑亚低温治疗重型颅脑损伤疗效的研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 35-37.
- 李承晏,李涛,梅志忠,等.实验性脑梗死的亚低温治疗时间窗——亚低温开始时间对脑梗死体积的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13: 485-487.
- 李承晏,刘传玉,李涛.亚低温联合升压治疗对局灶性脑缺血的脑保护作用 [J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 684-685.
- Maier C M, Ahern K V, Cheng M L, et al. Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia, effects on neurological outcome, infarct size, apoptosis and inflammation [J]. Stroke, 1998, 29: 2171-2180.

(收稿日期:2004-01-10)

修回日期:2005-02-28)

(本文编辑:郭方)

作者单位:266033 青岛市海慈医院神经内科

作者简介:毛德军(1962-),男(汉族),山东省人,副主任医师,青岛市老年病学会委员。