

## • 论著 •

神经生长因子和依达拉奉对缺血/再灌注损伤  
脑保护作用的比较研究

付江泉 王迪芬 刘辉

**【摘要】** 目的 比较神经生长因子(NGF)和自由基清除剂依达拉奉预处理对脑缺血/再灌注(I/R)损伤神经细胞的保护作用。方法 取出生 24 h 内的 SD 乳鼠脑皮质细胞,体外培养 7 d 后分为对照组,药物损伤组,NGF 10、50、100  $\mu\text{g/L}$  预处理组及依达拉奉 100  $\mu\text{mol/L}$  预处理组。各预处理组分别预处理 24 h 后,给予 200  $\mu\text{mol/L}$  谷氨酸(Glu)损伤 0.5 h,换正常培养液继续培养 24 h;培养 9 d 时检测神经细胞存活率[四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法]、乳酸脱氢酶(LDH)漏出率(分光光度法)、细胞凋亡率(流式细胞术);用苏木素-伊红(HE)染色后在倒置相差显微镜下观察细胞形态变化,在透射电镜下观察细胞超微结构改变。结果 与药物损伤组比较,NGF 10、50、100  $\mu\text{g/L}$  预处理组和依达拉奉预处理组细胞存活率明显升高[(0.21 $\pm$ 0.04)%、(0.23 $\pm$ 0.04)%、(0.21 $\pm$ 0.04)%、(0.24 $\pm$ 0.04)%比(0.19 $\pm$ 0.04)%],LDH 漏出率[(0.50 $\pm$ 0.06)%、(0.46 $\pm$ 0.07)%、(0.50 $\pm$ 0.02)%、(0.43 $\pm$ 0.06)%比(0.56 $\pm$ 0.03)%]和细胞凋亡率[(10.77 $\pm$ 1.07)%、(10.38 $\pm$ 0.70)%、(13.34 $\pm$ 0.57)%、(9.99 $\pm$ 0.77)%比(14.52 $\pm$ 0.77)%]均不同程度降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );细胞形态受损程度和神经元超微结构病变均减轻。NGF 3 个浓度组中以 50  $\mu\text{g/L}$  组效果最佳,且与依达拉奉组各指标差异无统计学意义。结论 NGF 和依达拉奉预处理脑皮质细胞 24 h 对脑 I/R 损伤均有保护作用;50  $\mu\text{g/L}$  NGF 和 100  $\mu\text{mol/L}$  依达拉奉预处理效果最佳,且二者最佳浓度时疗效相当。

**【关键词】** 神经生长因子; 依达拉奉; 谷氨酸; 预处理; 缺血/再灌注损伤,脑

**A comparative study on the protection effect of nerve growth factor and edaravone pretreatment against cerebral ischemia/reperfusion injury** FU Jiang-quan, WANG Di-fen, LIU Hui. Intensive Care Unit, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China  
Corresponding author: WANG Di-fen, Email: dfwang6@yahoo.com.cn

**【Abstract】 Objective** To compare the protective effect of nerve growth factor (NGF) and edaravone (a free radical scavenger) pretreatment against cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury to nerve cells. **Methods** Cortical neurons of Sprague-Dawley (SD) mouse aged shorter than 24 hours were cultured for 7 days, then they were randomly divided into control group, I/R group, NGF of 10, 50, 100  $\mu\text{g/L}$  pretreatment groups and 100  $\mu\text{mol/L}$  edaravone pretreatment group. In pretreatment groups the cells were pretreated with drugs correspondingly. After culturing for 24 hours, glutamate of 200  $\mu\text{mol/L}$  was given into the culture of all groups, except control group, for half an hour. Then culture medium in all groups were renewed with ordinary culture medium, and cultures were continued for 24 hours. The survival rate (by methyl thiazolyl tetrazolium assay), the content of lactate dehydrogenase (LDH, by spectrometry) and the rate of apoptosis (by flow cytometric) were determined. The cellular shape and ultrastructure were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and electronic microscopy correspondingly. **Results** The survival rate of nerve cells in NGF groups and edaravone group was significantly higher than that in I/R group [(0.21 $\pm$ 0.04)%, (0.23 $\pm$ 0.04)%, (0.21 $\pm$ 0.04)%, (0.24 $\pm$ 0.04)% vs. (0.19 $\pm$ 0.04)%]. The content of LDH in culture medium and the rate of apoptosis in NGF groups and edaravone group were lower than those in I/R group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The release rate of LDH in each group was (0.50 $\pm$ 0.06)%, (0.46 $\pm$ 0.07)%, (0.50 $\pm$ 0.02)%, (0.43 $\pm$ 0.06)% vs. (0.56 $\pm$ 0.03)%, respectively. The rate of apoptosis in each group was (10.77 $\pm$ 1.07)%, (10.38 $\pm$ 0.70)%, (13.34 $\pm$ 0.57)%, (9.99 $\pm$ 0.77)% vs. (14.52 $\pm$ 0.77)%, respectively. The cellular shape and ultrastructure of nerve cells in NGF groups and edaravone group were affected much less than that of I/R group. NGF of 50  $\mu\text{g/L}$  pretreatment group gave the best effect among three groups. There was no significant difference between NGF 50  $\mu\text{g/L}$  pretreatment group and edaravone pretreatment group. **Conclusion** NGF and edaravone pretreatment 24 hours before cerebral I/R give protective effects against cerebral I/R injury. The protective effects are best in NGF of 50  $\mu\text{g/L}$  pretreatment group and edaravone pretreatment group, and there is no significant difference between them.

**【Key words】** Nerve growth factor; Edaravone; Glutamate; Pretreatment; Cerebral ischemia/reperfusion injury

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.04.010

基金项目:贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目(2005220);贵州省科技厅基金项目(20092216)

作者单位:550004 贵州,贵阳医学院附属医院 ICU

通信作者:王迪芬,Email:dfwang6@yahoo.com.cn

缺血性脑血管病是我国人群的高发病,致死、致残率高,临床治疗主要原则是恢复血流再通,挽救濒死的细胞。但在血流恢复抢救细胞的同时,也会因为缺血/再灌注(I/R)损伤加重细胞损伤与死亡。预处理是近 20 年发现能减轻 I/R 损伤的途径之一,因药物预处理具有相对安全、使用方便、易控等优点,成为研究保护 I/R 损伤的一种新途径和发展趋势。神经生长因子(NGF)能有效促进外周及中枢神经元的分化、生长及存活,防止损伤的神经细胞死亡,促进神经元的修复。依达拉奉是一种强效的羟自由基清除剂和抗氧化剂,实验研究和临床试验均表明,自由基清除剂依达拉奉对 I/R 损伤具有保护作用。本研究中通过用培养鼠脑皮质细胞制作 I/R 损伤模型,用 NGF 和依达拉奉进行预处理,比较二者的疗效并探讨其机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及主要试剂:**新生 SD 乳鼠(由贵阳医学院实验动物中心提供);DMEM/F12 培养基(美国 HyClone 公司);标准胎牛血清(天津市海洋生物制品科技有限公司);注射用鼠 NGF(武汉海特生物制药股份有限公司);依达拉奉(南京先声东元制药有限公司);即用型链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);乳酸脱氢酶(LDH)测试盒(南京建成生物工程研究所);四甲基偶氮唑盐(MTT)细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(凯基生物科技发展有限公司)。

**1.2 乳鼠大脑皮质神经细胞原代培养:**取出生后 24 h 内 SD 乳鼠双侧大脑皮质,胰蛋白酶常温下消化 3~5 min,用培养基中止消化,200 目筛网过滤成单细胞悬液,细胞计数板计数,加适量培养基,调整细胞浓度为 $(1\sim 10)\times 10^5/L$ 的细胞悬液,分别接种在 96 孔和 24 孔培养板、盖玻片、培养瓶中,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育,3 d 时用含 2.5 mg/L 阿糖胞苷培养基换液 1 次,抑制神经胶质细胞及纤维细胞生长,7 d 时用培养基换液,准备大脑皮质神经细胞鉴定和实验分组。

**1.3 大脑皮质神经细胞鉴定:**脑皮质细胞体外培养 7 d,取出 24 孔培养板内的盖玻片,参照神经元特异性烯醇化酶(NSE)即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒说明书操作,然后观察。

**1.4 实验分组:**将细胞分为对照组,谷氨酸(Glu)药物损伤组,NGF 10、50、100 μg/L 预处理组,依达拉奉 100 μmol/L 预处理组共 6 组。去掉原培养基后

分别加入相应浓度的 NGF 培养基或依达拉奉培养基,继续培养 24 h。

**1.5 Glu 毒性神经细胞损伤模型的建立<sup>[1]</sup>:**培养 8 d 的皮质神经细胞去掉原培养基,除对照组外其他各组加入含 Glu(终浓度 200 μmol/L)的无血清培养基作用 0.5 h, D-Hank 液冲洗 2 遍后,各组均换含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,继续培养 24 h。

**1.6 指标检测及方法:**各组细胞生长 9 d 时用于检测下列各指标。

**1.6.1 神经细胞存活率测定:**用 MTT 比色法在酶标仪 550 nm 波长处测定 96 孔板中细胞的吸光度(A)值,计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(加药组细胞 A 值/对照组细胞 A 值)×100%。

**1.6.2 LDH 漏出率的测定:**从 24 孔培养板中吸取每孔培养液,参照 LDH 试剂盒说明书采用分光光度法测定各孔 A 值;再在培养板中加入培养液,用力吹打,显微镜下可见细胞基本无存活,再测定各孔 A 值。根据公式计算 LDH 漏出率<sup>[2]</sup>:细胞培养液 LDH 漏出率=培养液 LDH 的 A 值/(培养液 LDH 的 A 值+细胞匀浆液 LDH 的 A 值)×100%。

**1.6.3 细胞凋亡率检测:**将各组细胞消化、离心,收集于离心管,制成单细胞悬液,按凋亡试剂盒要求加入试剂,6 h 内用流式细胞仪检测凋亡细胞。

**1.6.4 细胞形态学观察:**苏木素-伊红(HE)染色,倒置相差显微镜下观察神经细胞形态学变化。

**1.6.5 细胞超微结构观察:**分别收集各组细胞,用细胞固定液固定,醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染,透射电镜下观察。

**1.7 统计学处理:**用 SPSS 13.0 统计软件分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较用方差分析和 *q* 检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大脑皮质神经细胞鉴定:**随机抽取生长 7 d 的细胞进行免疫组化染色,阳性着色为棕黄色。彩色插图 1 显示,培养细胞呈阳性着色,说明培养细胞是脑皮质细胞。

**2.2 神经细胞存活率(表 1):**药物损伤组神经细胞存活率较对照组明显下降( $P<0.01$ );NGF 预处理各组神经细胞存活率较药物损伤组显著升高,尤以 NGF 50 μg/L 组升高明显( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );依达拉奉预处理组神经细胞存活率较药物损伤组亦明显升高( $P<0.01$ ),且与 NGF 50 μg/L 组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**表 1 各组乳鼠神经细胞存活率、LDH 漏出率、细胞凋亡率比较( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	细胞存活率(%)	LDH 漏出率(%)	细胞凋亡率(%)
对照组	0.25±0.05(28)	0.41±0.09(8)	7.88±0.70(5)
药物损伤组	0.19±0.04(28) <sup>a</sup>	0.56±0.03(8) <sup>a</sup>	14.52±0.77(5) <sup>a</sup>
NGF 10 μg/L 组	0.21±0.04(28) <sup>b</sup>	0.50±0.06(8) <sup>b</sup>	10.77±1.07(5) <sup>c</sup>
NGF 50 μg/L 组	0.23±0.04(28) <sup>c</sup>	0.46±0.07(8) <sup>c</sup>	10.38±0.70(5) <sup>c</sup>
NGF 100 μg/L 组	0.21±0.04(28) <sup>b</sup>	0.50±0.02(8) <sup>b</sup>	13.34±0.57(5) <sup>b</sup>
依达拉奉组	0.24±0.04(28) <sup>c</sup>	0.43±0.06(8) <sup>c</sup>	9.99±0.77(5) <sup>c</sup>

注:LDH:乳酸脱氢酶;与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与药物损伤组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ,<sup>c</sup> $P<0.01$ ;括号内为样本数

**2.3 LDH 漏出率(表 1):**药物损伤组 LDH 漏出率较对照组明显升高( $P<0.01$ ); NGF 预处理各组 LDH 漏出率较药物损伤组明显下降,尤其以 NGF 50 μg/L 组最低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );依达拉奉预处理组 LDH 漏出率较药物损伤组亦明显下降( $P<0.01$ ),且与 NGF 50 μg/L 组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**2.4 神经细胞凋亡率(表 1):**药物损伤组细胞凋亡率显著高于对照组( $P<0.01$ );NGF 预处理各组细胞凋亡率较药物损伤组均有明显下降,且以 NGF 50 μg/L 组最低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );依达拉奉预处理组细胞凋亡率亦较药物损伤组均明显下降( $P<0.01$ ),且与 NGF 50 μg/L 组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**2.5 细胞形态变化(彩色插页图 2):**对照组细胞形态基本正常。药物损伤组胞体皱缩成球形,胞核大部分破碎,轴突皱缩明显,有的突起断裂,网络消失,细胞破裂死亡,数量明显减少。NGF 50 μg/L 组、依达拉奉组细胞数量减少不明显,细胞基本连成网状,较多细胞保留突起,仅少数细胞肿胀、坏死。

**2.6 细胞超微结构改变(彩色插页图 3):**对照组细胞形态基本正常。药物损伤组染色质浓缩、边聚,核膜出现溶解、断裂;胞质内细胞器数量明显减少,线粒体出现严重肿胀、嵴消失,呈空泡样或固缩;粗面内质网严重扩张。而 NGF 50 μg/L 组、依达拉奉组神经元病理改变较药物损伤组明显减轻,核膜完整,细胞器损伤也明显减轻。

**3 讨论**

目前关于 I/R 损伤的发病机制主要有:①氧自由基大量生成学说;②钙超载学说;③兴奋性氨基酸大量释放学说;④能量代谢障碍及酸中毒学说;⑤内皮素的作用、一氧化氮(NO)的合成等。脑缺血引起的神经元损伤包含凋亡与坏死两种方式。而凋亡是延迟性神经元死亡的重要通路。

研究表明,采用适度的脑缺血预处理可以改善致死性缺血性损伤所引起的神经元损害<sup>[3]</sup>。而药物预处理是在缺血预处理的理论基础上,可通过药物模拟缺血预处理样作用,对脑 I/R 损伤产生保护作用,其作用机制主要有:减轻炎症反应、改变酶的活性、清除自由基、减轻钙超载等<sup>[4]</sup>,具有很好的临床应用价值。

本研究中采用酶学方法分离乳鼠神经细胞,建立了相对稳定、可靠的获得神经元的方法。并根据 I/R 损伤发病机制中的兴奋性氨基酸大量释放学说,用高浓度 Glu 模拟脑缺血时兴奋性神经递质的大量释放,建立 I/R 模型。无论从细胞凋亡率、还是从酶学检测及形态学上看,都说明制模成功,Glu 对神经细胞确有毒性。

MTT 比色原理是利用活细胞线粒体脱氢酶能将 MTT 还原成蓝紫色甲瓟颗粒,以颗粒溶解后呈现的颜色深浅反映细胞活性,增殖生长旺盛的细胞将还原更多的 MTT,并具有较高的 A 值,反之则 A 值越低<sup>[5]</sup>。LDH 广泛存在于各种组织细胞中,在病理情况下细胞膜通透性增高时 LDH 漏出增加,在细胞学实验中常以 LDH 漏出率反映细胞的损伤程度。流式细胞分析法可对单个细胞或其他生物微粒进行快速定量分析与分选,是定量检测细胞凋亡的重要方法之一。本研究结果表明,Glu 可造成神经元胞体皱缩成球形、突起断裂、网络消失,细胞数量明显减少,不少细胞破裂死亡;染色质浓缩、边聚,核膜出现溶解、断裂,胞质内细胞器数量明显减少,线粒体出现严重肿胀、嵴消失,呈空泡样或固缩,粗面内质网严重扩张。而 NGF 和依达拉奉预处理各组细胞数量减少不明显,细胞基本连成网状。较多细胞保留突起,仅少数细胞肿胀、坏死;核膜完整,细胞器损伤也明显减轻。说明 NGF 和依达拉奉预处理对 Glu 介导的神经细胞损伤确有保护作用。

NGF 的生物学活性是通过与效应细胞上的特异受体结合而实现的。NGF 减少神经细胞损伤的机制目前还不十分明确,主要有:①抗自由基作用:NGF 可通过增加过氧化氢酶、超氧化物歧化酶(SOD)等自由基清除剂的活性,对减轻神经元损伤有重要作用<sup>[6]</sup>;②拮抗兴奋性氨基酸的神经毒性:王艳辉等<sup>[7]</sup>的实验证明了这一点;③稳定细胞内 Ca<sup>2+</sup> 水平:脑缺血损伤后,细胞内钙超载可通过多种机制引起神经元的凋亡和坏死,NGF 能稳定细胞内自由 Ca<sup>2+</sup> 水平来抵御缺血的损伤;④抑制神经细胞凋亡:谭永星等<sup>[8]</sup>采用夹闭沙土鼠双侧颈总动脉造成全脑

I/R 损伤模型,侧脑室注射 NGF 进行预处理,检测 I/R 损伤后脑皮质及海马 CA1 区凋亡神经细胞及凋亡相关调控基因 Bcl-2、Bax 蛋白的表达。得出结论:NGF 预处理通过调节凋亡相关调控基因 Bcl-2 及 Bax 的不同表达,能明显减轻沙土鼠全脑 I/R 损伤引起的神经细胞凋亡。结合本实验结果,NGF 可能是通过拮抗 Glu 引起的细胞内钙超载和活性氧成分堆积而发挥保护作用的。

依达拉奉是一种新型自由基清除剂,马小董等<sup>[9]</sup>用依达拉奉治疗急性脑梗死在临床试验上取得了良好的效果。目前研究显示依达拉奉对自由基毒性损伤具有强大的抑制作用,能够减轻自由基导致的级联损伤,具有脑保护作用。在缺血性脑损伤的发病机制中,氧自由基的毒性作用占有重要地位。脑缺血可以诱发一系列的损伤机制,如兴奋性氨基酸介导的 Ca<sup>2+</sup> 通道开放,导致细胞内 Ca<sup>2+</sup> 超载,由此触发花生四烯酸代谢级联反应及活性氧酶系统,产生大量自由基造成大脑细胞 DNA 的损伤。依达拉奉是一种由吡唑啉衍生的、具有“自由基清道夫”之称的自由基清除剂,特别是对毒性作用较大的·OH 有较强的清除作用<sup>[10]</sup>,它能够通过抗氧化,减轻脑水肿,抑制迟发性神经元死亡,保护脑组织<sup>[11]</sup>。而刘辉等<sup>[12]</sup>通过离体细胞实验提示,依达拉奉预处理离体乳鼠脑皮质细胞 24 h 对脑 I/R 损伤有保护作用,与本实验结果相符。

本研究中,NGF 50 μg/L 组的脑保护作用最好,但并没有呈现出剂量-效应关系。考虑原因可能为 NGF 的生物学活性是通过与效应细胞上的特异受体结合而实现的。NGF 受体分为高亲和力受体 TrkA 和低亲和力受体 P75NTR<sup>[13-14]</sup>,TrkA 是一种酪氨酸蛋白激酶受体,被认为是 NGF 的功能受体,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<sup>[15]</sup>。当 NGF 的浓度达到一定值时,NGF 与 TrkA 结合就达到了饱和,即产生了受体饱和现象。所以 NGF 的保护作用并没有随剂量的增加而加强。

综上所述,通过离体细胞培养实验,NGF 对 Glu 介导的神经细胞 I/R 损伤确有一定的保护作用,且这种保护作用与自由基清除剂依达拉奉比较无明显差异,但其保护作用的具体机制还有待进一步的探索和研究。

参考文献

- [1] Morishita E, Masuda S, Nagao M, et al. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*, 1997, 76:105-116.
- [2] 洪庆涛,宋岳涛,唐一鹏,等. 细胞培养液乳酸脱氢酶漏出率的比色测定及其应用. *细胞生物学杂志*, 2004, 26:89-92.
- [3] Weih M, Prass K, Ruscher K, et al. Ischemia tolerance; model for research, hope for clinical practice? *Nervenarzt*, 2001, 72: 255-260.
- [4] 文继月,陈志武. 药物预处理的脑保护作用. *淮南职业技术学院学报*, 2006, 4:119-122.
- [5] 王廷华,冯忠堂, Eng-Ang Ling. *神经细胞培养理论与技术*. 北京:科学出版社, 2005:83.
- [6] 李强,王冬阳,赵宝东. 神经生长因子与脑缺血. *锦州医学院学报*, 2004, 25:52-54.
- [7] 王艳辉,赵宝东,赵春玉,等. 神经生长因子对新生的大鼠小脑皮质神经细胞凋亡的影响. *中国临床康复*, 2005, 9:50-51.
- [8] 谭永星,王迪芬,李雪梅,等. 神经生长因子预处理对沙土鼠全脑缺血/再灌注损伤脑神经细胞凋亡及 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2007, 19:358-360.
- [9] 马小董,詹佩娟,徐金华. 依达拉奉联合银杏达莫治疗急性脑梗死的临床观察. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14:60.
- [10] Druker BJ, Sawyers CL, Capdeville R, et al. Chronic myelogenous leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2001:87-112.
- [11] Nakagomi T, Yamakawa K, Sasaki T, et al. Effect of edarvone on cerebral vasospasm following experimental subarachnoid hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2003, 12:17-21.
- [12] 刘辉,王迪芬,付江泉. 异丙酚和依达拉奉对脑缺血/再灌注损伤保护作用的研究比较. *中国危重病急救医学*, 2008, 20:691-692.
- [13] Susen K, Heumann R, Blöchl A. Nerve growth factor stimulates MAPK via the low affinity receptor p75 (LNTR). *FEBS Lett*, 1999, 463:231-234.
- [14] Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 2000, 10:381-391.
- [15] Lee TH, Kato H, Pan LH, et al. Localization of nerve growth factor, trkA and P75 immunoreactivity in the hippocampal formation and basal forebrain of adult rats. *Neuroscience*, 1998, 83:335-349.

(收稿日期:2009-05-23)  
(本文编辑:李银平)

• 广告目次 •

- ①广东天普药业:天普洛尔 ..... (封二)
- ②珠海健帆:血液灌流器 ..... (插页)
- ③德尔格:Smart Care™智能化自动脱机系统 ..... (插页)
- ④天津生化制药:琥珀氢可 ..... (插页)
- ⑤第一制药:克倍宁 ..... (插页)
- ⑥天津红日药业:血必净注射液 ..... (封底)

# 神经生长因子和依达拉奉对缺血/再灌注损伤脑保护作用的比较研究

(正文见 226 页)

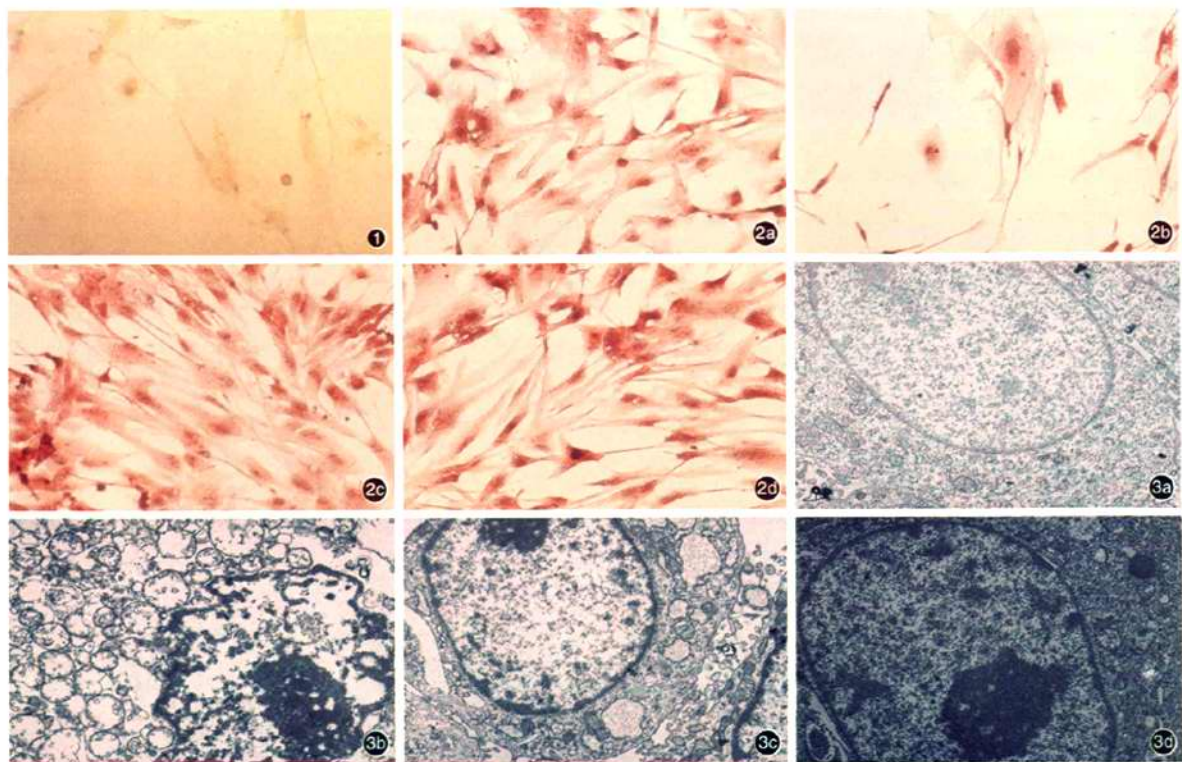


图1 光镜下观察新生乳鼠大脑皮质细胞生长7d时呈棕黄色着色 免疫组化  $\times 1\ 000$  图2 倒置相差显微镜下观察各组新生乳鼠神经细胞形态学变化 对照组(a)细胞形态基本正常;谷氨酸药物损伤组(b)细胞胞体皱缩成球形,细胞核大部分破碎,轴突皱缩明显,有的突起断裂,网络消失,细胞数量明显减少,不少细胞破裂死亡;神经生长因子(NGF)  $50\ \mu\text{g}/\text{L}$ 组(c)和依达拉奉组(d)细胞数量减少不明显,细胞基本连成网状,较多细胞保留突起,仅有少数细胞肿胀、坏死  $\text{HE}\ \times 200$  图3 透射电镜下观察各组新生乳鼠神经细胞超微结构改变 对照组(a)细胞形态基本正常;谷氨酸药物损伤组(b)染色质浓缩、边聚,核膜出现溶解、断裂,胞质内细胞器数量明显减少,线粒体出现严重肿胀、嵴消失,呈空泡样或固缩;粗面内质网严重扩张;NGF  $50\ \mu\text{g}/\text{L}$ 组(c)和依达拉奉组(d)神经元病理改变较药物损伤组明显减轻,核膜完整,细胞器损伤也明显减轻 醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染  $\times 2\ 000$

## 利多卡因与神经生长因子预处理对沙土鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用

(正文见 234 页)

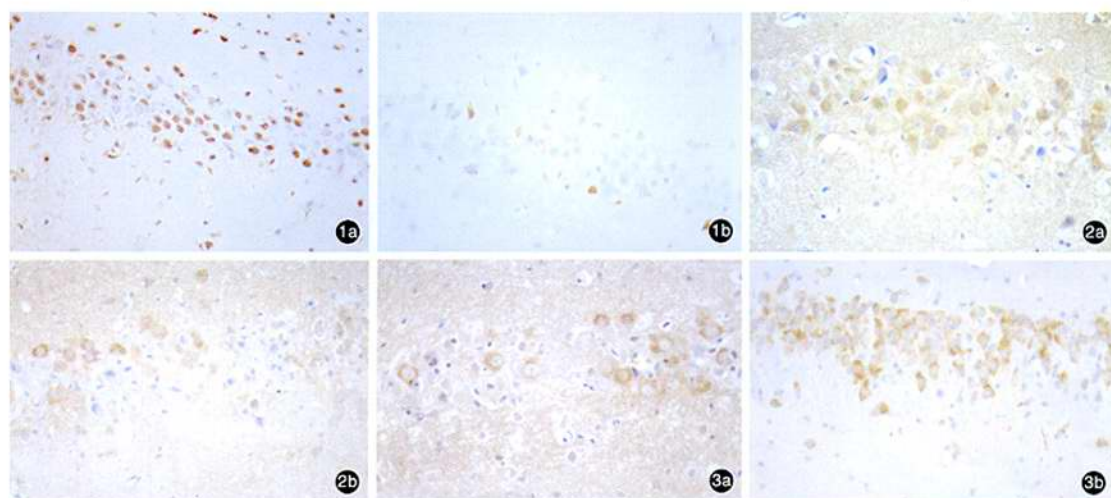


图1 光镜下观察沙土鼠脑缺血/再灌注后脑组织海马CA1区细胞凋亡情况 利多卡因对照组(a)可见大量凋亡细胞,细胞核中出现棕黄色颗粒;利多卡因预处理48 h组(b)可见少数几个凋亡细胞 TUNEL  $\times 400$  图2 光镜下观察沙土鼠脑缺血/再灌注后脑组织海马CA1区Bax表达改变 利多卡因对照组(a)可见大量的Bax阳性细胞及空泡变性细胞;利多卡因预处理48 h组(b)可见少量的Bax阳性细胞 免疫组化  $\times 400$  图3 光镜下观察沙土鼠脑缺血/再灌注后脑组织海马CA1区Bcl-2表达改变 利多卡因对照组(a)可见少量Bcl-2阳性细胞,细胞核层次破坏明显;利多卡因预处理48 h组(b)可见大量Bcl-2阳性细胞,细胞核层次清晰 免疫组化  $\times 400$

# 神经生长因子和依达拉奉对缺血/再灌注损伤脑保护作用的比较研究

作者: 付江泉, 王迪芬, 刘辉  
作者单位: 贵阳医学院附属医院ICU, 贵州, 550004  
刊名: 中国危重病急救医学 ISTIC PKU  
英文刊名: CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE  
年, 卷(期): 2010, 22(4)  
被引用次数: 0次

## 参考文献(15条)

1. 马小董;詹佩娟;徐金华 依达拉奉联合银杏达莫治疗急性脑梗死的临床观察[期刊论文]-中国中西医结合急救杂志 2007(1)
2. 谭永星;王迪芬;李雪梅 神经生长因子预处理对沙土鼠全脑缺血/再灌注损伤脑神经细胞凋亡及Bcl-2和Pax蛋白表达的影响 2007
3. 王艳辉;赵宝东;赵春玉 神经生长因子对新生的大鼠小脑皮质神经细胞凋亡的影响[期刊论文]-中国临床康复杂志 2005(09)
4. 李强;王冬阳;赵宝东 神经生长因子与脑缺血[期刊论文]-锦州医学院学报 2004(2)
5. 王廷华;冯忠堂;Eng-Ang Ling 神经细胞培养理论与技术 2005
6. Susen K;Heumann R;Blochl A Nerve growth factor stimulates MAPK via the low affinity receptor p75 (LNTN) 1999
7. 刘辉;王迪芬;付江泉 异丙酚和依达拉奉对脑缺血/再灌注损伤保护作用的研究比较[期刊论文]-中国危重病急救医学 2008(11)
8. Nakagomi T;Yamakawa K;Sasaki T Effect of edarvone on cerebral vasospasm following experimental subarachnoid hemorrhage 2003
9. Druker BJ;Sawyers CL;Capdeville R Chronic myelogenous leukemia 2001
10. Morishita E;Masuda S;Nagao M Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death 1997
11. Lee TH;Kato H;Pan LH Localization of nerve growth factor, trkA and P75 immunoreactivity in the hippocampal formation and basal forebrain of adult rats 1998
12. Kaplan DR;Miller FD Neurotrophin signal transduction in the nervous system 2000
13. 文继月;陈志武 药物预处理的脑保护作用[期刊论文]-淮南职业技术学院学报 2006(04)
14. Weih M;Prass K;Ruscher K Ischemia tolerance, model for research, hope for clinical practice 2001
15. 洪庆涛;宋岳涛;唐一鹏 细胞培养液乳酸脱氢酶漏出率的比色测定及其应用[期刊论文]-细胞生物学杂志 2004(1)

## 相似文献(6条)

1. 期刊论文 谢兵 依达拉奉联合神经生长因子治疗急性混合性脑卒中的评价 -实用临床医药杂志2008, 12(9)  
混合性卒中中有成为中风的一种独立类型倾向[1]. 由于病变性质的不同及其特殊的病理生理学改变, 积极稳妥的“中性治疗”十分必要[2]. 我科自2004年1月至今, 在混合性脑卒中中性治疗中, 应用依达拉奉(必存)、神经生长因子(恩经复)联合治疗40例住院患者, 取得了较好的疗效, 报告如下.
2. 学位论文 王炜 依达拉奉对大鼠缺血脑组织NGF及BDNF表达的影响 2010  
目的: 研究依达拉奉对大鼠缺血脑组织中脑源性神经营养因子(BDNF)和神经生长因子(NGF)表达的影响。<br>方法: 健康雄性Wistar大鼠, 采用改良的Zea-Longa法建立大脑中动脉局灶缺血模型(MCAO)。实验分为模型对照组和依达拉奉组, 每组各20只大鼠。依达拉奉组予以腹腔内注射依达拉奉, 每天1次, 每次3mg/kg; 模型对照组每天注射等量生理盐水。72小时后行神经功能评分, 然后处死, 分别取脑梗死周围、海马区和梗死区脑组织作免疫组化染色检测BDNF、NGF蛋白表达变化, 原位杂交检测BDNFmRNA、NGFmRNA的表达。<br>

结果: <br>

1. 神经功能学评分: 治疗前依达拉奉组和对照组之间神经功能学评分差异无统计学意义( $P>0.05$ )。3d后, 与对照组相比, 依达拉奉组大鼠的神经功能缺损显著改善( $P<0.05$ )。<br>
  2. 脑组织BDNF蛋白及mRNA的表达: 与对照组相比, 依达拉奉组在梗死区周围、海马区BDNF表达水平较高, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。但在梗死区两组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。依达拉奉组在梗死区周围、海马区BDNFmRNA表达水平较高, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 但在梗死区两组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。<br>
  3. 脑组织NGF蛋白及mRNA的表达: 与对照组相比, 依达拉奉组在梗死区周围、海马区NGF表达水平较高, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 但在梗死区两组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。依达拉奉组在梗死区周围、海马区NGFmRNA表达水平较高, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 但在梗死区两组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。<br>
- 结论: <br>
1. 依达拉奉可以明显改善缺血后大鼠的神经功能。<br>
  2. 依达拉奉可上调大鼠梗死区周围和海马区缺血脑组织中BDNF和NGF的表达。<br>
  3. 依达拉奉可能通过上述机制对大鼠缺血脑组织起到保护作用, 为临床应用该药提供更为丰富的实验依据。<br>

### 3. 期刊论文 [王炜, 张生林, WANG Wei, ZHANG Sheng-lin 依达拉奉对大鼠缺血脑组织NGF及BDNF表达的影响 - 中国医学期刊 \(上半月\) 2010, 5\(4\)](#)

目的 研究依达拉奉对大鼠缺血脑组织中脑源性神经生长因子(BDNF)和神经生长因子(NGF)表达的影响。方法 健康雄性Wistar大鼠, 采用改良的Zea-Longa法建立大鼠大脑中动脉局灶缺血模型(MCAO)。实验分为模型对照组和依达拉奉组, 每组各20只大鼠。依达拉奉组予以腹腔内注射依达拉奉, 1次/d, 每次3mg/kg; 模型对照组每天注射等量生理盐水。72h后行神经功能评分, 然后处死, 分别取脑梗死周围、海马区和梗死区脑组织作免疫组化染色检测BDNF、NGF蛋白表达变化, 原位杂交检测BDNFmRNA、NGFmRNA的表达。结果 依达拉奉组神经功能缺损评分低于模型对照组( $p<0.05$ )。依达拉奉治疗组BDNF和NGF蛋白BDNFmRNA和NGFmRNA在梗死区周围和海马区表达均高于模型对照组, 差异有统计学意义( $p<0.05$ ), 在梗死区差异均无统计学意义( $p>0.05$ )。结论 依达拉奉可上调大鼠梗死区周围和海马区缺血脑组织中BDNF和NGF的表达, 并可能通过此机制起到保护作用。

### 4. 期刊论文 [韩爱龙, 王迪芬, 梅治, 刘兴敏, 刘鲜林, 吴承龙, 利多卡因对谷氨酸致大鼠大脑皮质神经元损伤的保护作用研究 - 中国危重病急救医学 2008, 20\(12\)](#)

脑缺血、缺氧时大量兴奋性氨基酸(EAA)尤其是谷氨酸(Glu)爆发性释放, EAA过度激活, 使某些受体在正常生理刺激下引起第二信使效应放大, 突触后神经元过度兴奋、溃变、坏死。这就是所谓的兴奋性毒性[1]。目前Glu的兴奋性毒性作用于缺血性脑损害的研究最多。脑缺血时突触前Glu释放增加, 再摄取减少, 导致N-甲基-D-天门冬氨酸受体过度兴奋,  $Ca^{2+}$ 大量内流, 产生离子依赖性兴奋性毒性。我们前期的研究和文献报道显示, 临床上常用药物纳洛酮、神经生长因子、异丙酚和依达拉奉等对神经细胞均有保护作用[2-4]; 而利多卡因在

### 5. 期刊论文 [彭国平, 葛求富, 魏尔清 神经保护药和抗炎药对小鼠脑片缺氧缺血/再灌注损伤的作用 - 中国药理学杂志 2004, 39\(3\)](#)

目的在离体脑片缺血性损伤模型上, 建立筛选与评价神经保护药和抗炎药的方法。方法小鼠离体脑片缺氧缺血/再灌注(OGD/RP)的模型上, 以2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑(TTC)产物formazan定量测定评价脑片活性, 观察不同药物离体给药或整体预给药7 d对脑片损伤的保护作用。结果抗氧化剂依达拉奉、钙拮抗剂尼莫地平及神经生长因子可显著减轻脑片的缺血性损伤; 半胱氨酰白三烯受体拮抗剂ONO-1078和孟鲁司特、糖皮质激素地塞米松及中枢抗炎药米诺环素无明显作用。整体给予地塞米松(0.2, 2, 5 mg·kg<sup>-1</sup>)能减轻脑片对缺血损伤的程度; 孟鲁司特仅大剂量给药(15 mg·kg<sup>-1</sup>)有增强作用。结论离体小鼠脑片TTC产物formazan定量分析评价药物抗缺血性损伤作用的方法, 可用于初筛具有直接神经保护作用药物。

### 6. 学位论文 [何巍 米诺环素对大鼠原代神经元和海马脑片缺氧缺血及NMDA损伤的保护作用 2004](#)

目的: (1) 建立神经元缺氧缺血(OGD)模型。(2) 在大鼠大脑皮层神经元和海马脑片OGD和NMDA损伤模型上, 观察米诺环素的保护作用, 并分析其作用环节(着重探讨与NMDA受体的关系)。(3) 探讨米诺环素的保护作用时间依赖特点。结论: (1) 该实验建立了在96孔板基础上的原代皮层神经元OGD损伤模型。OGD对神经元的损伤作用有明显的时间依赖关系, 随着OGD时间增加和再灌注时间的延长, 其损伤作用增强。阳性药神经生长因子和依达拉奉对OGD损伤有显著的保护作用, 证明该实验建立的OGD损伤模型是有效的。该模型为今后高效率筛选抗缺血药物提供了简便的方法。(2) 以OGD和NMDA诱导大鼠原代神经元24 h后的损伤以及海马脑片即刻损伤。米诺环素对相对缓慢发生的神经元损伤有浓度依赖性保护作用, 对海马脑片的即刻损伤作用不明显; 说明米诺环素的作用不是通过拮抗NMDA受体, 而是影响一些损伤的中间环节。(3) 米诺环素在OGD 3 h后再灌注2 h加入米诺环素(10 μmol/L)仍有神经元保护作用, 说明它有相对宽的治疗时间窗。

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zgwzbjyxx201004009.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgwzbjyxx201004009.aspx)  
授权使用: qkzgz16(qkzgz16), 授权号: 7845f424-0d7a-4039-aa27-9ede015a23b0

下载时间: 2011年5月9日