

脑组织程序性坏死和细胞因子表达谱对心搏骤停大鼠脑损伤的影响研究

许佳俊 陈文桐 姚建立

福建医科大学附属泉州第一医院急诊科,福建泉州 362000

通信作者:许佳俊, Email: xjj053@163.com

【摘要】 目的 通过观察脑细胞程序性坏死和脑组织中 90 个细胞因子水平的变化,探讨心搏骤停心肺复苏(CPR)后大鼠脑损伤的分子机制。方法 按随机数字表法将 SD 大鼠分为假手术组(Sham 组, $n=10$)和心搏骤停组($n=10$)。采用窒息法诱导大鼠心搏骤停,并于心搏骤停 6 min 后开始 CPR; Sham 组仅常规行气管插管等,未诱导心搏骤停。CPR 后 3 d 对大鼠进行神经功能缺损评分(NDS)后取血并处死大鼠,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 S100B 水平,用免疫荧光法检测脑组织程序性坏死细胞,用蛋白芯片检测脑组织 90 个细胞因子表达水平,以两组蛋白的相对比值 ≥ 1.5 或 ≤ 0.5 且 $P < 0.05$ 为差异表达蛋白。结果 心搏骤停组有 8 只大鼠成功复苏,死亡 2 只,为使样本量匹配,Sham 组随机选择 8 只进行实验。与 Sham 组比较,心搏骤停组大鼠 NDS 评分明显降低[分:63.0(62.5, 64.3)比 80.0(80.0, 80.0), $P < 0.01$],血清 S100B 水平明显升高(ng/L: 47.96 ± 10.16 比 16.56 ± 5.60 , $P < 0.01$)。心搏骤停后脑皮质和海马区程序性坏死细胞较 Sham 组多见[原位末端缺失标记法(TUNEL)阳性且天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)阴性的细胞比例:脑皮质为 $(15.70 \pm 0.32)\%$ 比 $(8.00 \pm 0.28)\%$,海马区为 $(20.80 \pm 1.35)\%$ 比 $(9.00 \pm 4.00)\%$,均 $P < 0.05$]。蛋白芯片检测显示,与 Sham 组比较,心搏骤停组脑组织炎性相关细胞因子细胞因子诱导中性粒细胞趋化因子(CINC-2 α/β 、CINC-3)、 γ -干扰素(IFN- γ)和信号蛋白 C-端 Src 激酶(CSK)表达水平明显升高(心搏骤停组与 Sham 组蛋白表达比值:CINC-2 α/β 为 2.503 ± 0.428 , $P=0.024$; CINC-3 为 2.369 ± 0.142 , $P=0.005$; IFN- γ 为 3.149 ± 1.362 , $P=0.044$; CSK 为 1.887 ± 0.105 , $P=0.001$)。神经保护因子睫状神经营养因子(CNTF)、胶质细胞源性神经营养因子受体(GFR α -1、GFR α -2)、生长激素(GH)、生长激素受体(GHR)、粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)以及抗炎细胞因子白细胞介素-10(IL-10)表达水平明显降低(心搏骤停组与 Sham 组蛋白表达比值:CNTF 为 0.341 ± 0.137 , $P=0.036$; GFR α -1 为 0.461 ± 0.164 , $P=0.044$; GFR α -2 为 0.447 ± 0.017 , $P=0.033$; GH 为 0.450 ± 0.136 , $P=0.024$; GHR 为 0.508 ± 0.128 , $P=0.022$; GM-CSF 为 0.446 ± 0.130 , $P=0.035$; IL-10 为 0.502 ± 0.211 , $P=0.017$)。结论 程序性坏死参与心搏骤停 CPR 后大鼠脑损伤,脑损伤分子机制可能与炎症反应、神经再生障碍和神经细胞存活受损有关。

【关键词】 心搏骤停; 心肺复苏; 神经功能缺损评分; S100B; 程序性坏死; 细胞因子

基金项目:福建省泉州市科技计划项目(2018N078S)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200325-00228

Effects of brain necroptosis and cytokines expression array on brain injury in rats with cardiac arrest

Xu Jiajun, Chen Wentong, Yao Jianli

Department of Emergency, Quanzhou First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian, China

Corresponding author: Xu Jiajun, Email: xjj053@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the underlying molecular mechanisms of brain injury in rats after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation (CPR) by observing necroptosis of brain cells and changes of 90 cytokines in brain tissue. **Methods** Sprague-Dawley (SD) rats were divided into Sham group ($n=10$) and cardiac arrest group ($n=10$) according to random number table method. The model of asphyxia cardiac arrest for 6 minutes followed by CPR model was established. Tracheal intubation in Sham rats were routinely performed without inducing cardiac arrest. Neurological deficit score (NDS) was evaluated, blood samples were collected and rats were sacrificed, then serum S100B level was measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) on the third day after CPR. Necroptotic cells in brain were detected by immunofluorescence staining. The levels of 90 cytokines expression in brain were measured by antibody array. The relative ratio of the two groups of protein expression ≥ 1.5 or ≤ 0.5 and $P < 0.05$ represented the differential expression protein. **Results** There were 8 rats successfully resuscitated and 2 died in cardiac arrest group. There were 8 rats selected in Sham group to match the sample size. Compared with Sham group, the NDS score of cardiac arrest group was significantly lower [63.0 (62.5, 64.3) vs. 80.0 (80.0, 80.0), $P < 0.01$], and the level of serum S100B was significantly higher (ng/L: 47.96 ± 10.16 vs. 16.56 ± 5.60 , $P < 0.01$). More necroptotic cells in cerebral cortex and hippocampus were found in cardiac arrest group [proportion of cells positive for TdT-mediated nick end labeling (TUNEL) and negative for caspase-3: $(15.70 \pm 0.32)\%$ vs. $(8.00 \pm 0.28)\%$ in cortex, $(20.80 \pm 1.35)\%$ vs.

(9.00 ± 4.00)% in hippocampus, both $P < 0.05$]. The levels of inflammatory cytokines [cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC-2 α/β , CINC-3), interferon- γ (IFN- γ)] and signal protein c-Src kinase (CSK) in brain significantly increased after cardiac arrest as compared to Sham group levels (ratio of cardiac arrest group to Sham group: CINC-2 α/β was 2.503 ± 0.428 , $P = 0.024$; CINC-3 was 2.369 ± 0.142 , $P = 0.005$; IFN- γ was 3.149 ± 1.362 , $P = 0.044$; CSK was 1.887 ± 0.105 , $P = 0.001$). However, the levels of neuroprotective cytokines ciliary neurotrophic factor (CNTF), glial cell-derived neurotrophic factor receptor (GFR α -1, GFR α -2), growth hormone (GH), growth hormone receptor (GHR), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and anti-inflammatory protein interleukin-10 (IL-10) significantly decreased after cardiac arrest (ratio of cardiac arrest group to Sham group: CNTF was 0.341 ± 0.137 , $P = 0.036$; GFR α -1 was 0.461 ± 0.164 , $P = 0.044$; GFR α -2 was 0.447 ± 0.017 , $P = 0.033$; GH was 0.450 ± 0.136 , $P = 0.024$; GHR was 0.508 ± 0.128 , $P = 0.022$; GM-CSF was 0.446 ± 0.130 , $P = 0.035$; IL-10 was 0.502 ± 0.211 , $P = 0.017$). **Conclusions** Necroptosis is involved in brain injury after cardiac arrest. The molecular mechanisms of brain injury may be related to inflammatory response, neurogenesis disorder and impaired survival of nerve cells.

【Key words】 Cardiac arrest; Cardiopulmonary resuscitation; Neurological deficit score; S100B; Necroptosis; Cytokine

Fund program: Quanzhou Science and Technology Project of Fujian Province of China (2018N078S)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200325-00228

脑损伤是心搏骤停后患者的主要死亡原因^[1]。本课题组前期研究证实,心搏骤停后全脑缺血引起散在的缺血神经元改变,尤其在皮质和海马 CA1 易损区;进一步研究还发现,程序性坏死可能与脑损伤有关^[2]。然而,脑损伤的分子机制至今仍未完全阐明。许多研究表明,细胞因子在心搏骤停和心肺复苏(CPR)后脑损伤中发挥重要作用,如白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)可促进脑损伤^[3],而 IL-10 和转化生长因子- β (TGF- β)可发挥神经保护作用^[4]。尽管很多研究表明细胞因子表达变化参与心搏骤停和 CPR 后脑损伤,但是大多数研究着眼于对 1 个或多个细胞因子的观察,缺乏从整体上研究这些细胞因子水平的改变,从而割裂这些细胞因子之间的内在联系。本研究用免疫荧光法检测 CPR 后大鼠脑细胞程序性坏死,同时用蛋白芯片技术检测脑组织蛋白表达水平,观察其中 90 个细胞因子的水平变化,初步探讨心搏骤停和 CPR 后脑损伤的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组处置:基于窒息法致心搏骤停-CPR 大鼠模型的成功率(约 80%)^[5],本实验共需 20 只大鼠。20 只 10 周龄 SPF 级 SD 大鼠,体重 300~400 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号:SCXK(京)2012-0001。按随机数字表法将大鼠分为假手术(Sham)组和心搏骤停组,每组 10 只。采用窒息法诱导大鼠心搏骤停,心搏骤停 6 min 后开始 CPR,共成功复苏 8 只动物,死亡 2 只。为与心搏骤停组样本量匹配,从 Sham 组中随机选择 8 只动物,仅常规行血管置管和气管插管等,未诱导心搏骤停。

1.2 窒息法致心搏骤停-CPR 大鼠模型制备:大鼠适应性喂养 1 周,制模前禁食 12 h、自由饮水。以戊巴比妥 45 mg/kg 腹腔注射麻醉,经口气管插管接小动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司);分离右颈外静脉并缓慢置入 23 号聚乙烯管用于药物注射;分离左股动脉并缓慢置入 23 号聚乙烯管到胸主动脉,用于监测动脉血压,置管前导管均充满 5 000 U/L 肝素生理盐水。连接肢体导联心电图。机械通气参数设置:吸入氧浓度 0.21,潮气量 6.5 mL/kg,通气频率 100 次/min;数据均保存在 BL-420S 生物机能实验采集系统(成都泰盟软件有限公司)。静脉注射肌松剂维库溴铵 1 mg/kg 诱导呼吸停止。心搏骤停判断标准:主动脉血压失去搏动波形并且平均动脉压(MAP)降至 20 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa)以下。心搏骤停 6 min 后开始行胸外心脏按压,按压频率 200 次/min,按压深度为胸廓前后径 1/3,同时以 100 次/min 同步机械通气(吸入氧浓度 0.21),并维持舒张压在 20 mmHg 左右,按压 2 min 后按 0.005 mg/kg 最多给予 3 次肾上腺素,每次间隔 1 min。自主循环恢复(ROSC)判定标准:恢复室上性心律,MAP \geq 60 mmHg 持续 5 min 以上。胸外按压 4 min 后仍无 ROSC,则放弃 CPR。大鼠 ROSC 后持续通气 2 h,苏醒前拔除所有导管并回笼观察。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准,经医院伦理委员会审批(审批号:2018627)。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 神经功能缺损评分(NDS)^[6]:CPR 后 3 d 由专人对大鼠进行 NDS 评分。NDS 评分标准涵盖觉醒、脑神经反射、运动功能、简单的行为反射等多方面内容。正常脑功能总分为 80 分,0 分为脑死亡。

1.3.2 血清 S100B 检测: NDS 评分后,麻醉并处死大鼠,采集下腔静脉血,按大鼠 S100B 特异酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(武汉华美生物科技有限公司)说明书要求测定血清 S100B 水平。

1.3.3 脑组织坏死神经元检测: 每组取 5 只大鼠脑组织,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 后,分别置于 20% 和 30% 蔗糖过夜行梯度脱水,在冰冻切片机上连续行 10 μm 厚的冠状切片。正常羊血清封闭切片,再与兔抗天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)抗体(1:100,美国 Abcam 公司)4℃孵育过夜,然后与荧光基因 Dylight 594 标记的羊抗兔二抗(1:100,美国 EarthOx 公司)孵育。按原位末端缺刻标记法(TUNEL)试剂盒(瑞士罗氏公司)说明书步骤进行荧光染色。所有切片最后用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)复染。激光共聚焦显微镜下选择 3~5 个非重叠高倍视野,分别计算皮质和海马区 TUNEL 阳性且 caspase-3 阴性细胞占总细胞的比例。

1.3.4 脑组织细胞因子蛋白芯片检测: 每组取 3 只大鼠脑组织各 500 mg,抽提总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白芯片(美国 RayBiotech 公司)在封闭缓冲液中封闭 30 min,再与蛋白样品室温孵育 1~2 h,清洗芯片,加入生物素标记的抗体室温孵育 1~2 h;清洗芯片后加入辣根过氧化物酶(HRP)耦联的链霉亲和素室温孵育 2 h。芯片经洗涤缓冲液彻底清洗后,加入化学发光试剂,暗室内用 X 线胶片曝光。通过扫描仪获得 X 线胶片曝光图片。通过灰度值定量获得原始蛋白信号强度,经修正后与阳性蛋白进行标准化,两组蛋白表达的相对比值 ≥ 1.5 或 ≤ 0.5 且 P < 0.05 即为差异表达蛋白。

1.4 统计学方法: 使用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。正态分布的计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验;非正态分布的计量资料以中位数(四分位数)[$M(Q_L, Q_U)$]表示,组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。计数资料比较采用 χ^2 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠基线指标比较(表 1): 两组大鼠体重、心率、血压和呼吸频率比较差异均无统计学意义(均 P > 0.05)。

2.2 NDS 评分和血清 S100B 水平(表 2): 心搏骤停组大鼠 NDS 评分较 Sham 组明显降低,血清 S100B 水平较 Sham 组明显升高(均 P < 0.01)。

表 1 两组大鼠基线指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	体重(g)	心率(次/min)	血压(mmHg)	呼吸频率(次/min)
Sham 组	8	407.0 ± 22.9	378.0 ± 42.5	126.0 ± 10.5	82.0 ± 9.4
心搏骤停组	8	398.0 ± 28.9	380.0 ± 33.0	128.0 ± 7.8	83.0 ± 10.9
t 值		0.594	0.123	0.361	0.138
P 值		0.562	0.904	0.723	0.893

注: Sham 为假手术; 1 mmHg = 0.133 kPa

表 2 两组大鼠 NDS 评分和血清 S100B 水平比较

组别	例数(例)	NDS 评分[分, $M(Q_L, Q_U)$]	血清 S100B (ng/L, $\bar{x} \pm s$)
Sham 组	8	80.0 (80.0, 80.0)	16.56 ± 5.60
心搏骤停组	8	63.0 (62.5, 64.3)	47.96 ± 10.16
Z/t 值		-3.599	-7.649
P 值		0.000	0.000

注: Sham 为假手术, NDS 为神经功能缺损评分

2.3 脑组织细胞因子表达(表 3): 蛋白芯片检测显示,与 Sham 组比较,心搏骤停后脑组织炎症相关细胞因子如细胞因子诱导中性粒细胞趋化因子(CINC-2α/β、CINC-3)和 γ-干扰素(IFN-γ)以及信号蛋白 C-端 Src 激酶(CSK)表达水平明显升高,神经保护因子如睫状神经营养因子(CNTF)、胶质细胞源性神经营养因子受体(GFRα-1、GFRα-2)、生长激素(GH)、生长激素受体(GHR)和粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)以及抗炎细胞因子 IL-10 表达水平明显降低(均 P < 0.05)。

表 3 两组大鼠脑组织细胞因子差异蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

细胞因子	蛋白表达(灰度值)		心搏骤停组与 Sham 组蛋白表达比值	P 值
	Sham 组	心搏骤停组		
IL-10	0.008 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.502 ± 0.211	0.017
CINC-2α/β	0.009 ± 0.001	0.021 ± 0.005	2.503 ± 0.428	0.024
CINC-3	0.010 ± 0.001	0.024 ± 0.003	2.369 ± 0.142	0.005
CNTF	0.034 ± 0.010	0.012 ± 0.002	0.341 ± 0.137	0.036
CSK	0.014 ± 0.002	0.026 ± 0.002	1.887 ± 0.105	0.001
GFRα-1	0.015 ± 0.003	0.007 ± 0.003	0.461 ± 0.164	0.044
GFRα-2	0.014 ± 0.003	0.006 ± 0.001	0.447 ± 0.017	0.033
GM-CSF	0.013 ± 0.003	0.006 ± 0.001	0.446 ± 0.130	0.035
GH	0.016 ± 0.003	0.007 ± 0.000	0.450 ± 0.136	0.024
GHR	0.018 ± 0.002	0.009 ± 0.003	0.508 ± 0.128	0.022
IFN-γ	0.009 ± 0.002	0.027 ± 0.009	3.149 ± 1.362	0.044

注: Sham 为假手术, IL-10 为白细胞介素-10, CINC-2α/β 为细胞因子诱导中性粒细胞趋化因子-2α/β, CINC-3 为细胞因子诱导中性粒细胞趋化因子-3, CNTF 为睫状神经营养因子, CSK 为 C-端 Src 激酶, GFRα-1 为胶质细胞源性神经营养因子受体 α-1, GFRα-2 为胶质细胞源性神经营养因子受体 α-2, GM-CSF 为粒-巨噬细胞集落刺激因子, GH 为生长激素, GHR 为生长激素受体, IFN-γ 为 γ-干扰素

2.4 脑皮质和海马 CA 区坏死神经元(图 1): Sham 组脑皮质和海马 CA 区少见 caspase-3 阳性细胞和

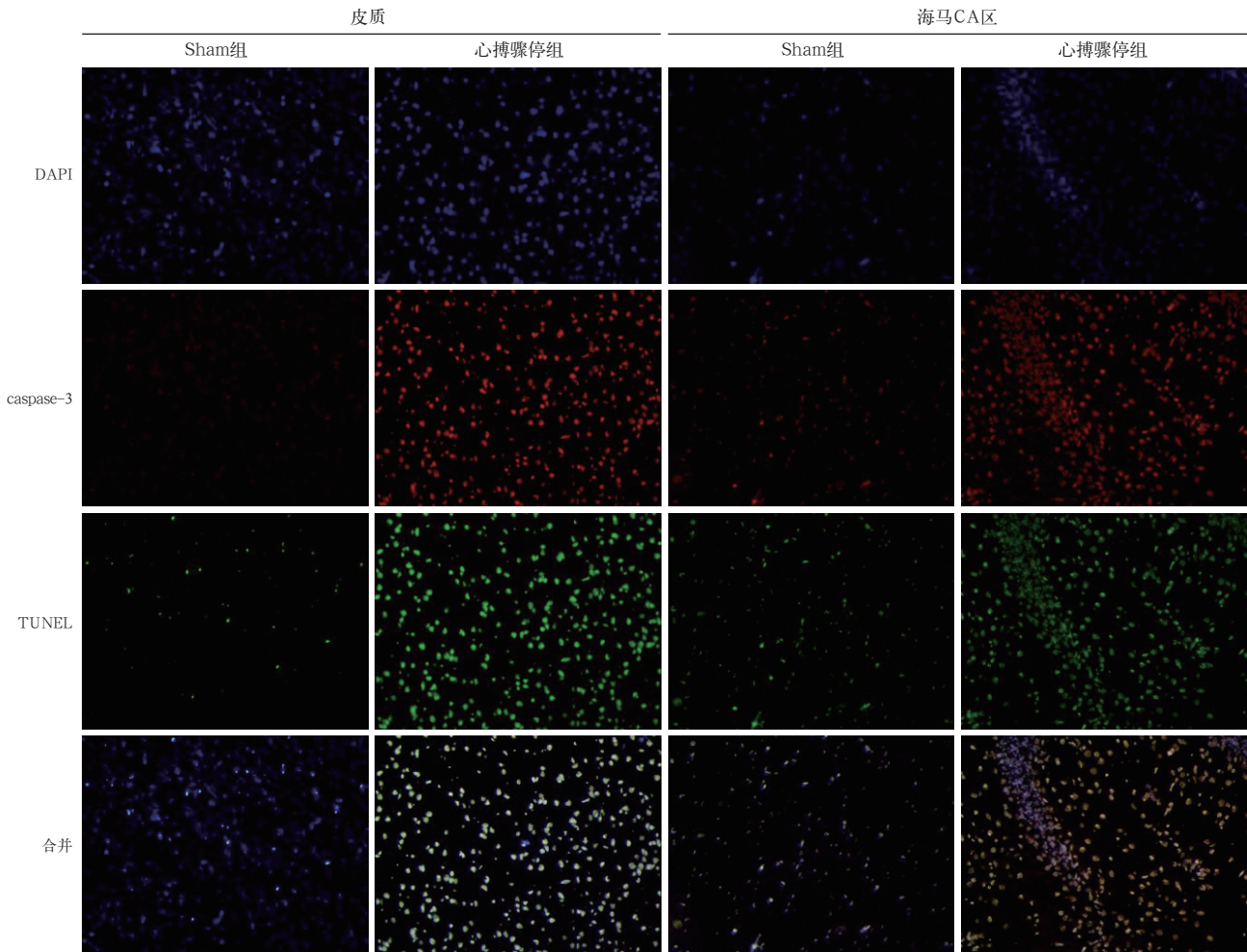


图1 激光共聚焦显微镜下观察两组大鼠心肺复苏后3 d脑皮质和海马CA区神经细胞死亡情况 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色细胞核呈蓝色,Dylight 594 荧光标记活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3)阳性细胞呈红色,原位末端缺刻标记法(TUNEL)阳性细胞呈绿色。假手术(Sham)组脑皮质和海马区少见 caspase-3 阳性细胞和 TUNEL 阳性细胞;心搏骤停组脑皮质和海马区 caspase-3 阳性细胞及 TUNEL 阳性细胞较多,且可见较多 TUNEL 阳性且 caspase-3 阴性的细胞 中倍放大

TUNEL 阳性细胞。心搏骤停组 caspase-3、TUNEL 阳性细胞较多,而且还发现许多 TUNEL 阳性且 caspase-3 阴性的细胞,与 Sham 组比较差异有统计学意义[脑皮质:(15.70±0.32)%比(8.00±0.28)%, $\chi^2=5.145, P=0.023$;海马区:(20.80±1.35)%比(9.00±4.00)%, $\chi^2=4.418, P=0.036$],提示程序性坏死参与心搏骤停后脑损伤。

3 讨论

本研究显示,与 Sham 组比较,心搏骤停组大鼠 NDS 评分明显降低,血清 S100B 水平明显升高,提示心搏骤停 CPR 后存在脑损伤;此外研究显示,心搏骤停后大鼠脑组织可见较多 TUNEL 阳性且 caspase-3 阴性的细胞,结合前期研究结果心搏骤停后脑组织受体相互作用蛋白激酶(RIP1、RIP3)表达上调^[2],从而证实程序性坏死参与脑损伤。本研究中进一步通过含有 90 个细胞因子的蛋白芯片检

测显示,心搏骤停 CPR 后缺血/再灌注损伤的脑组织细胞因子表达谱发生明显改变,即促炎细胞因子 CINC-2 α/β 、CINC-3 和 IFN- γ 表达上调,抗炎细胞因子 IL-10 表达下调,神经保护细胞因子 CNTF、GFR α -1、GFR α -2、GH、GHR 和 GM-CSF 表达均下调,信号蛋白 CSK 表达上调。这些细胞因子表达谱的变化或许从整体上提示心搏骤停后脑损伤的分子机制可能与炎症反应、神经再生及细胞增殖分化有关,即脑组织由于过度炎症反应、神经再生障碍和细胞存活受损,最终导致神经元坏死。

CINC-2 α/β 和 CINC-3 均是趋化因子,在细胞间交流及募集炎性细胞中发挥着重要作用。脑缺血后,高表达的趋化因子通过增加白细胞浸润促进脑损伤^[7-8]。IFN- γ 是促炎细胞因子,脑缺血后数小时内表达升高,参与缺血后脑损伤^[9]。IL-10 为抗炎细胞因子,可以抑制促炎细胞因子的表达,从

而发挥脑保护效应^[10]。在脑卒中小鼠模型中,侧脑室注射 IL-10 可以发挥神经保护作用^[11]。本研究中通过蛋白芯片技术同时检测到促炎细胞因子 CINC-2 α/β 、CINC-3 和 IFN- γ 表达上调,而抗炎细胞因子 IL-10 表达下调,提示全脑缺血后可能通过抑制抗炎细胞因子,增加促炎细胞因子,最终募集外周血白细胞到脑缺血部位,增加脑损伤。然而,心搏骤停全脑缺血后脑损伤与促炎细胞因子水平变化的因果关系仍未明确。钱永兵和王瑞兰^[12]综合分析发现,程序性坏死释放大量危险相关模式分子(DAMPs),特定的 DAMPs 如 S100B 等为重要的炎性介质,引起炎症反应和损伤。因此推测心搏骤停后脑组织程序性坏死可引起炎症反应和脑损伤。

CNTF 是一种重要的神经营养因子,可促进髓鞘再生以及神经元损伤后神经元的存活和再生^[13-14]。GFR α -1 和 GFR α -2 参与脑损伤后神经元再生及神经保护作用^[15]。GH 与 GHR 结合后促进细胞物质代谢和生长发育,GH 及其受体 GHR 在脑损伤后神经再生方面发挥一定的作用^[16]。GM-CSF 是造血生长因子,研究显示,GM-CSF 对脑损伤有保护作用,可能对早期轴突再生有益^[17]。CSK 参与细胞内众多信号转导通路,在细胞增殖、分化和凋亡等生理学中发挥重要作用。脑缺血后,CSK 活性明显升高,导致脑缺血后神经元坏死。CSK 基因敲除或抑制 CSK 活性可保护缺血后脑损伤^[18]。本研究中通过蛋白芯片技术同时检测到神经保护细胞因子 CNTF、GFR α -1、GFR α -2、GH、GHR 和 GM-CSF 表达下调,而信号蛋白 CSK 表达上调,提示脑缺血后脑损伤与神经元再生障碍和细胞存活受损有关,可能神经元再生的保护因子缺乏以及神经元存活受损最后导致神经元坏死。

综上,程序性坏死参与心搏骤停后脑损伤,而脑损伤的分子作用机制不可能由单一因素发挥作用,是多方面不利因素共同作用导致的。本研究中通过蛋白芯片同时检测脑组织 90 个细胞因子表达谱,发现炎症反应、神经元再生障碍和神经细胞存活受损可能参与心搏骤停后脑损伤的分子作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Tam J, Hong A, Naranjo PM, et al. The role of decreased cardiolipin and impaired electron transport chain in brain damage due to cardiac arrest [J]. *Neurochem Int*, 2018, 120: 200-205. DOI: 10.1016/j.neuint.2018.08.013.

[2] 林庆明,唐夏泓,林世荣,等.坏死性凋亡在干细胞移植改善心搏骤停后神经功能的作用[J]. *中华急诊医学杂志*, 2017, 27(1): 39-43. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2018.01.008.

Lin QM, Tang XH, Lin SR, et al. Mesenchymal stem cells transplantation improves functional recovery after cardiac arrest: contribution of necroptosis [J]. *Chin J Emerg Med*, 2018, 27(1): 39-43. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2018.01.008.

[3] Xu M, Zhou GM, Wang LH, et al. Inhibiting high-mobility group box 1 (HMGB1) attenuates inflammatory cytokine expression and neurological deficit in ischemic brain injury following cardiac arrest in rats [J]. *Inflammation*, 2016, 39(4): 1594-1602. DOI: 10.1007/s10753-016-0395-2.

[4] Xiang Y, Zhao H, Wang J, et al. Inflammatory mechanisms involved in brain injury following cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation [J]. *Biomed Rep*, 2016, 5(1): 11-17. DOI: 10.3892/br.2016.677.

[5] 林庆明,赵桑,周莉莉,等.心肺复苏干细胞移植后肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 6 的表达[J]. *中华急诊医学杂志*, 2014, 23(10): 1098-1104. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2014.10.007.

Lin QM, Zhao S, Zhou LL, et al. Expression of tumor necrosis factor- α -induced protein 6 after transplantation of mesenchymal stem cells in a rat model of cardiopulmonary resuscitation [J]. *Chin J Emerg Med*, 2014, 23(10): 1098-1104. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2014.10.007.

[6] Geocadin RG, Ghodadra R, Kimura T, et al. A novel quantitative EEG injury measure of global cerebral ischemia [J]. *Clin Neurophysiol*, 2000, 111(10): 1779-1787. DOI: 10.1016/s1388-2457(00)00379-5.

[7] Mayer AM, Murphy J, MacAdam D, et al. Classical and alternative activation of cyanobacterium *Oscillatoria* sp. Lipopolysaccharide-treated rat microglia *in vitro* [J]. *Toxicol Sci*, 2016, 149(2): 484-495. DOI: 10.1093/toxsci/kfv251.

[8] Szymdynger-Chodobska J, Strazielle N, Zink BJ, et al. The role of the choroid plexus in neutrophil invasion after traumatic brain injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(9): 1503-1516. DOI: 10.1038/jcbfm.2009.71.

[9] Silva BC, de Miranda AS, Rodrigues FG, et al. The 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibitor zileuton reduces inflammation and infarct size with improvement in neurological outcome following cerebral ischemia [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2015, 12(4): 398-403. DOI: 10.2174/1567202612666150812150606.

[10] Liesz A, Bauer A, Hoheisel JD, et al. Intracerebral interleukin-10 injection modulates post-ischemic neuroinflammation: an experimental microarray study [J]. *Neurosci Lett*, 2014, 579: 18-23. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.07.003.

[11] Zhu Y, Liu Z, Peng YP, et al. Interleukin-10 inhibits neuroinflammation-mediated apoptosis of ventral mesencephalic neurons via JAK-STAT3 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 50: 353-360. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.07.017.

[12] 钱永兵,王瑞兰.受体相互作用蛋白对凋亡和坏死性凋亡以及炎症反应的调控机制[J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28(2): 184-187. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.02.020.

Qian YB, Wang RL. Receptor-interacting protein activation results in apoptosis, necroptosis and inflammation [J]. *Chin Crit Care Med*, 2016, 28(2): 184-187. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.02.020.

[13] Zuo W, Wu H, Zhang K, et al. Baicalin promotes the viability of Schwann cells *in vitro* by regulating neurotrophic factors [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(1): 507-514. DOI: 10.3892/etm.2017.4524.

[14] Fan L, Xiong Y, Fu Z, et al. Polyaniline promotes peripheral nerve regeneration by enhancement of the brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor expression and activation of the ERK1/2/MAPK signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 7534-7540. DOI: 10.3892/mmr.2017.7534.

[15] Cheng Q, Di Liberto V, Caniglia G, et al. Time-course of GDNF and its receptor expression after brain injury in the rat [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 439(1): 24-29. DOI: 10.1016/j.neulet.2008.04.089.

[16] Lavnja I, Ajdzanovic V, Trifunovic S, et al. Cortical ablation induces time-dependent changes in rat pituitary somatotrophs and upregulates growth hormone receptor expression in the injured cortex [J]. *J Neurosci Res*, 2014, 92(10): 1338-1349. DOI: 10.1002/jnr.23408.

[17] Bombeiro AL, Pereira BTN, de Oliveira ALR. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor improves mouse peripheral nerve regeneration following sciatic nerve crush [J]. *Eur J Neurosci*, 2018, 48(5): 2152-2164. DOI: 10.1111/ejn.14106.

[18] Paul R, Angele B, Popp B, et al. Differential regulation of blood-brain barrier permeability in brain trauma and pneumococcal meningitis—role of Src kinases [J]. *Exp Neurol*, 2007, 203(1): 158-167. DOI: 10.1016/j.expneurol.2006.08.003.

(收稿日期: 2020-03-25)