

3 种神经细胞保护措施对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织 Fas/FasL 表达的影响

张晶¹ 董燕¹ 胡宝玲² 黄蕊¹ 赵倩¹ 张旭辉³

¹河北医科大学第一医院儿科, 河北石家庄 050031; ²河北医科大学第一医院健康管理部, 河北石家庄 050031; ³石家庄市第一医院儿科, 河北石家庄 050011

通信作者: 张旭辉, Email: 47478818@qq.com

【摘要】 目的 观察 3 种神经细胞保护措施对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织凋亡相关因子及其配体(Fas 和 FasL)基因表达的影响。**方法** 选择 120 只 7 日龄 Wistar 大鼠,按随机数字表法将大鼠分为神经干细胞组、促红细胞生成素(EPO)组、 ω -3 不饱和脂肪酸组、缺氧缺血性脑损伤模型组,每组 30 只。神经干细胞组、EPO 组、 ω -3 不饱和脂肪酸组于制模后经尾静脉注射 5 mL 神经干细胞、EPO、 ω -3 不饱和脂肪酸,缺氧缺血性脑损伤模型组给予等量生理盐水。给药后 6、12、24、48、72 h 5 个时间点各组处死 6 只大鼠取海马组织,测定大脑海马组织 Fas/FasL 的基因表达,以及 Toll 样受体 4(TLR4)、核转录因子 κ B(NF- κ B)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL-1 β 、IL-6)的蛋白表达水平和细胞凋亡率。**结果** ① mRNA 表达:3 个实验组给药后 Fas 和 FasL 的 mRNA 表达均较缺氧缺血性脑损伤模型组显著降低,以给药后 24 h 降低最为显著,且神经干细胞组 < EPO 组 < ω -3 不饱和脂肪酸组 < 缺氧缺血性脑损伤模型组 [Fas mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 140.5 ± 2.9 、 156.4 ± 2.5 、 165.2 ± 2.7 比 173.7 ± 2.8 , FasL mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 143.1 ± 4.3 、 154.6 ± 1.5 、 160.7 ± 1.4 比 174.7 ± 2.8], 各组间比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。② 蛋白表达:3 个实验组给药后海马组织 TLR4、NF- κ B、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的蛋白表达水平均较缺氧缺血性脑损伤模型组显著降低(TLR4/GAPDH: 0.7 ± 0.2 、 0.6 ± 0.1 、 0.2 ± 0.1 比 1.4 ± 0.1 ; NF- κ B/GAPDH: 6.7 ± 0.4 、 5.3 ± 0.1 、 1.1 ± 0.2 比 11.2 ± 0.3 ; TNF- α /GAPDH: 14.3 ± 1.4 、 11.2 ± 1.2 、 3.2 ± 2.1 比 23.2 ± 0.5 ; IL-1 β /GAPDH: 9.4 ± 0.2 、 7.4 ± 0.3 、 2.2 ± 0.3 比 13.4 ± 0.1 ; IL-6/GAPDH: 36.2 ± 4.4 、 39.3 ± 1.5 、 26.2 ± 2.1 比 51.4 ± 1.4 , 均 $P < 0.05$),神经干细胞组上述指标的蛋白表达水平 < EPO 组 < ω -3 不饱和脂肪酸组 < 缺氧缺血性脑损伤模型组。③ 细胞凋亡率: ω -3 不饱和脂肪酸组、EPO 组、神经干细胞组给药后海马组织细胞凋亡率均明显低于缺氧缺血性脑损伤模型组 [(3.7 ± 0.3)%、(3.4 ± 0.2)%、(2.5 ± 0.1)% 比 (5.5 ± 0.4)%, 均 $P < 0.05$]。**结论** 缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织 Fas 和 FasL mRNA 呈高表达;而给予神经干细胞、EPO 及 ω -3 不饱和脂肪酸处理均能减少脑组织 Fas 和 FasL 的 mRNA 表达。

【关键词】 神经干细胞; 促红细胞生成素; ω -3 不饱和脂肪酸; 缺氧缺血性脑损伤; 新生大鼠; 脑组织凋亡相关因子及其配体表达

基金项目: 河北省重点研发计划项目(182777109D); 河北医科大学第一医院“星火”青年科研项目(XH201712)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2019.01.003

Effect of 3 neuroprotective measures on expressions of Fas/FasL in brain tissue of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage Zhang Jing¹, Dong Yan¹, Hu Baoling², Huang Rui¹, Zhao Qian¹, Zhang Xuhui³

¹Department of Pediatrics, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, Hebei, China;

²Department of Health Management, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, Hebei, China;

³Department of Pediatrics, Shijiazhuang First Hospital, Shijiazhuang 050011, Hebei, China

Corresponding author: Zhang Xuhui, Email: 47478818@qq.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of 3 neuroprotective measures on the expressions of apoptosis-related factors and their ligands (Fas and FasL) in brain tissue of neonatal rats with hypoxic ischemic brain injury. **Methods** One hundred and twenty Wistar rats 7 days old were selected as experimental subjects, the rats were divided into four groups: neural stem cell, erythropoietin (EPO), ω -3 unsaturated fatty acid treatment groups and hypoxic ischemic brain damage model group according to random number table method, with 30 rats in each group. Neural stem cell group, EPO group and ω -3 unsaturated fatty acid group were respectively injected with neural stem cells, EPO and ω -3 unsaturated fatty acid, each 5 mL via tail vein after modeling; the hypoxic ischemic brain damage model group was given equal volume of normal saline. At 6, 12, 24, 48 and 72 hours after administration of drug, 6 rats were sacrificed in each group, brain tissue was taken, the mRNA expression levels of Fas/FasL, protein expression levels of Toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL-1 β , IL-6) and cell apoptotic rate in hippocampus tissue were measured. **Results** ① mRNA expressions: the mRNA expressions of Fas and FasL of the 3 experimental groups were significantly lower than those of the hypoxic ischemic brain damage model group, the degrees of descent after administration for 24 hours were the most significant, neural stem cell treatment group < EPO treatment group < ω -3 unsaturated fatty acid treatment group < hypoxic ischemic brain damage model group [Fas mRNA expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 140.5 ± 2.9 , 156.4 ± 2.5 , 165.2 ± 2.7 vs. 173.7 ± 2.8 , FasL mRNA expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 143.1 ± 4.3 , 154.6 ± 1.5 , 160.7 ± 1.4 vs. 174.7 ± 2.8], the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). ② Protein expressions: the protein expressions of TLR4, NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , IL-6 of the

3 experimental groups were significantly lower than those of the hypoxic ischemic brain damage model group (TLR4/GAPDH: 0.7 ± 0.2 , 0.6 ± 0.1 , 0.2 ± 0.1 vs. 1.4 ± 0.1 ; NF- κ B/GAPDH: 6.7 ± 0.4 , 5.3 ± 0.1 , 1.1 ± 0.2 vs. 11.2 ± 0.3 ; TNF- α /GAPDH: 14.3 ± 1.4 , 11.2 ± 1.2 , 3.2 ± 2.1 vs. 23.2 ± 0.5 ; IL-1 β /GAPDH: 9.4 ± 0.2 , 7.4 ± 0.3 , 2.2 ± 0.3 vs. 13.4 ± 0.1 ; IL-6/GAPDH: 36.2 ± 4.4 , 39.3 ± 1.5 , 26.2 ± 2.1 vs. 51.4 ± 1.4 , all $P < 0.05$), the protein expression levels of above indexes in neural stem cell treatment group < those of EPO treatment group < those of ω -3 unsaturated fatty acid treatment group < those of hypoxic ischemic brain damage model group. ③ Apoptotic rates: after drug administration, the apoptotic rates of the ω -3 unsaturated fatty acid group, EPO treatment group, neural stem cell treatment group were obviously lower than the rate of model group [$(3.7 \pm 0.3)\%$, $(3.4 \pm 0.2)\%$, $(2.5 \pm 0.1)\%$ vs. $(5.5 \pm 0.4)\%$, all $P < 0.05$]. **Conclusion** The mRNA expressions of Fas/FasL in the brain of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage are high, and the treatment with each of the following agents; neural stem cells, EPO and ω -3 unsaturated fatty acid can reduce the mRNA expressions of Fas/FasL in such rats' brain tissues.

【Key words】 Neural stem cells; Erythropoietin; ω -3 unsaturated fatty acids; Hypoxic ischemic brain damage; Neonatal rats; Brain tissue apoptosis-related factors and their ligands (Fas/FasL)

Fund program: Hebei Province Key R&D Program (182777109D); "Spark" Youth Research Project of the First Hospital of Hebei Medical University (XH201712)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2019.01.003

新生儿缺氧缺血性脑损伤作为儿科常见疾病,具有较高的致残率及致死率,是造成新生儿死亡的主要原因之一^[1]。目前,临床上针对新生儿缺氧缺血性脑损伤尚无特效疗法,治愈率较低。研究显示,新生儿缺氧缺血性脑损伤的病理、生理过程多表现为脑缺氧、缺血后出现早期脑神经元坏死以及细胞凋亡导致的迟发性脑神经元死亡,故急需寻找安全、有效的治疗方法,以期减轻患儿脑损伤程度,挽救患儿生命^[2-3]。研究表明,神经干细胞是目前治疗神经系统损伤、变性等疾病最有前景的细胞,具有拮抗神经炎症反应及神经元凋亡的作用^[4]。而研究证实脑组织神经元、星形胶质细胞内有促红细胞生成素(EPO)及其受体(EPOR)表达,能发挥营养和保护神经的作用^[4]。 ω -3 不饱和脂肪酸为新型免疫营养制剂,具有较强免疫调节和抗炎作用^[5]。因此,本研究通过观察神经干细胞、EPO 及 ω -3 不饱和脂肪酸对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织凋亡相关因子及其配体(Fas/FasL)表达水平的影响,探讨 3 种措施的神经保护机制,为临床治疗新生儿缺氧缺血性脑损伤提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组:选择 120 只 7 日龄 Wistar 大鼠,雌雄不限,体质量 12~18 g,实验动物合格证号:SCXK(陕)2018-001。按随机数字表法将大鼠分为神经干细胞组、EPO 组、 ω -3 不饱和脂肪酸组、缺氧缺血性脑损伤模型组,每组 30 只。

1.2 模型复制:通过阻断新生大鼠左侧颈动脉、在低氧环境下放置 2 h 的方法复制缺氧缺血性脑损伤大鼠模型^[6],观察其行为改变判断制模是否成功。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 胎鼠脑神经干细胞的培养方法:取 0~1 d 新生 SD 大鼠中脑,剥离脑膜和血管,机械吹打制成单

细胞悬液,按细胞密度 5×10^5 个/mL 接种在 25 mL 培养瓶内,培养液为添加 2% 人类白细胞抗原-B27 (HLA-B27)、20 μ g/L 重组碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的 DMEM/F12 培养基。每 4 d 进行 1 次半量换液;每隔 7~8 d 进行 1 次传代。经充分诱导分化,细胞具有分化、增殖能力后用于实验。

1.4 给药方法:神经干细胞组经尾静脉将培养好的神经干细胞注入大鼠体内;EPO 组经尾静脉将 5 mL EPO 溶于磷酸盐缓冲液(PBS)中注入大鼠体内; ω -3 不饱和脂肪酸组经尾静脉给予 5 mL ω -3 不饱和脂肪酸;缺氧缺血性损伤模型组经尾静脉给予 3 mL 生理盐水。

1.5 观察指标:4 组分别于给药后 6、12、24、48、72 h 各处死 6 只大鼠取材进行后续实验。

1.5.1 各组大鼠大脑海马组织 Fas/FasL mRNA 表达测定:取大鼠大脑海马组织加入离心管中离心后,置于聚合酶链反应(PCR)仪上进行扩增。以 cDNA 设定为模板,稀释引物浓度为 500 nmol/L,引物终浓度在总反应体系中为 200 nmol/L。在瑞士罗氏公司 LightCycler480 实时定量 PCR 反应仪中放置 384 孔板,通过溶解曲线判断 PCR 产物的纯度,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算海马组织 Fas/FasL 的 mRNA 表达量。

1.5.2 各组大鼠大脑海马组织 Toll 样受体 4(TLR4)、核转录因子- κ B(NF- κ B)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL-1 β 、IL-6)蛋白表达测定:取大鼠大脑海马组织蛋白标本,置于 500 μ L 抗氧化剂 + 50 mL 绝对甲醇 + 25 mL 20 倍的 NuPage 转膜缓冲液中浸泡 15 min,分别将膜和胶朝向正、负极方向,以硝酸纤维膜取出时间为完成转膜,扫描后剪下正确的条带;在膜的蛋白表面均匀涂抹,充分反应 3~5 min 后显影保存。用 Multi Gauge V2.3 软件对结果进行分析,以目的蛋白与 3-磷酸甘油醛

脱氢酶(GAPDH)吸光度(A)值比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.5.3 免疫组化法检测各组大鼠海马组织细胞凋亡情况:取大鼠大脑海马组织,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗2次,4%多聚甲醛水溶液固定10 min,透化处理后保存;室温下在封闭液中放置15 min,加入一抗37℃下孵育45 min或4℃孵育过夜,用PBS清洗3次,每次5 min;加入二抗37℃下孵育45 min,用PBS清洗3次,然后用三蒸水清洗1次。在荧光显微镜下观察各组海马组织细胞凋亡情况。

1.5.4 大鼠脑组织病理学观察:取大鼠脑组织行苏木素染色数分钟,酸水及氨水中分色,流水冲洗1 h后入蒸馏水,加入70%和90%乙醇脱水各10 min,再置入乙醇伊红染色液中2~3 min,染色后的切片经纯乙醇脱水,二甲苯透明,于光镜下观察各组大鼠脑组织病理学改变。

1.6 统计学分析:使用SPSS 22.0统计软件分析数据,正态分布计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用*t*检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠大脑海马组织 Fas、FasL 的 mRNA 表达情况比较(表1):ω-3 不饱和脂肪酸组、EPO 组、神经干细胞组大鼠脑组织 Fas、FasL 的基因表

达水平明显低于缺氧缺血性脑损伤模型组,且神经干细胞组的表达水平最低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠大脑海马组织 TLR4、NF-κB、TNF-α、IL-1β、IL-6 蛋白表达比较(图1;表2):ω-3 不饱和脂肪酸组、EPO 组、神经干细胞组 TLR4、NF-κB、TNF-α、IL-1β、IL-6 的蛋白表达水平明显低于模型组,且以神经干细胞治疗组的降低程度更显著(均 $P < 0.05$)。

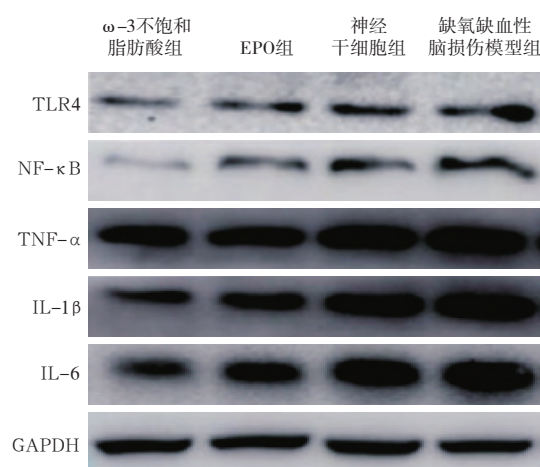


图1 各组大鼠大脑海马组织 TLR4、NF-κB、TNF-α、IL-1β、IL-6 的蛋白表达水平比较

表1 各组大鼠不同时间点大脑海马组织 Fas、FasL 的 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	Fas mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$)				
		术后 6 h	术后 12 h	术后 24 h	术后 48 h	术后 72 h
缺氧缺血性脑损伤模型组	30	173.9±2.5	173.6±2.8	173.7±2.8	173.5±2.6	174.3±2.4
ω-3 不饱和脂肪酸组	30	169.8±2.2 ^a	167.9±2.3 ^a	165.2±2.7 ^a	167.4±2.7 ^a	168.3±2.7 ^a
EPO 组	30	165.7±2.5 ^{ab}	163.1±2.2 ^{ab}	156.4±2.5 ^{ab}	162.3±2.5 ^{ab}	164.2±2.8 ^{ab}
神经干细胞组	30	160.3±2.9 ^{abc}	154.3±2.8 ^{abc}	140.5±2.9 ^{abc}	156.4±2.4 ^{abc}	161.7±2.7 ^{abc}
F 值		74.337	103.663	84.421	100.973	79.171
P 值		0.017	0.001	0.000	0.003	0.000
组别	动物数(只)	FasL mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$)				
		术后 6 h	术后 12 h	术后 24 h	术后 48 h	术后 72 h
缺氧缺血性脑损伤模型组	30	174.8±2.9	173.7±2.8	174.7±2.8	173.5±2.6	174.3±2.4
ω-3 不饱和脂肪酸组	30	168.9±2.4 ^a	167.6±1.5 ^a	160.7±1.4 ^a	166.8±2.3 ^a	167.2±3.0 ^a
EPO 组	30	165.7±2.3 ^{ab}	164.9±1.2 ^{ab}	154.6±1.5 ^{ab}	163.7±2.6 ^{ab}	164.5±2.8 ^{ab}
神经干细胞组	30	160.4±2.1 ^{abc}	152.5±3.4 ^{abc}	143.1±4.3 ^{abc}	152.8±4.3 ^{abc}	157.6±2.9 ^{abc}
F 值		86.266	48.762	101.281	79.004	91.277
P 值		0.001	0.026	0.015	0.002	0.014

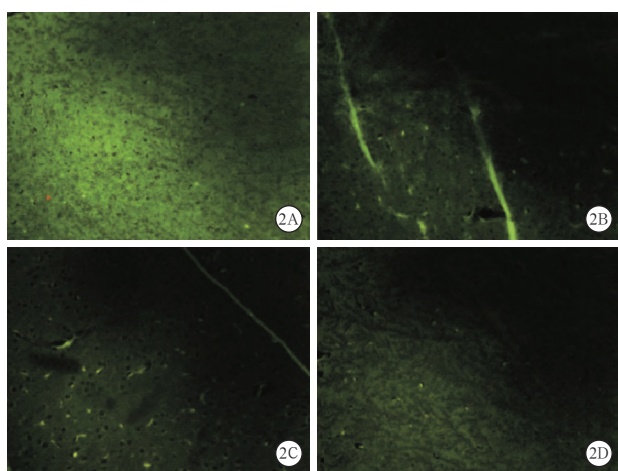
注:与缺氧缺血性脑损伤模型组比较,^a $P < 0.05$;与 ω-3 不饱和脂肪酸组比较,^b $P < 0.05$;与 EPO 组比较,^c $P < 0.05$

表2 各组大鼠大脑海马组织 TLR4、NF-κB、TNF-α、IL-1β、IL-6 的蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	TLR4/GAPDH	NF-κB/GAPDH	TNF-α/GAPDH	IL-1β/GAPDH	IL-6/GAPDH
缺氧缺血性脑损伤模型组	30	1.4±0.1	11.2±0.3	23.2±0.5	13.4±0.1	51.4±1.4
ω-3 不饱和脂肪酸组	30	0.7±0.2 ^a	6.7±0.4 ^a	14.3±1.4 ^a	9.4±0.2 ^a	36.2±4.4 ^a
EPO 组	30	0.6±0.1 ^a	5.3±0.1 ^a	11.2±1.2 ^a	7.4±0.3 ^a	39.3±1.5 ^a
神经干细胞组	30	0.2±0.1 ^a	1.1±0.2 ^a	3.2±2.1 ^a	2.2±0.3 ^a	26.2±2.1 ^a

注:与缺氧缺血性脑损伤模型组比较,^a $P < 0.05$

2.3 各组大鼠大脑海马组织细胞凋亡情况比较 (图 2): ω -3 不饱和脂肪酸组、EPO 组、神经干细胞组细胞凋亡率低于缺氧缺血性脑损伤模型组[(3.7 ± 0.3)%、(3.4 ± 0.2)%、(2.5 ± 0.1)% 比 (5.5 ± 0.4)%, 均 $P < 0.05$]。免疫荧光染色显示, 新生大鼠大脑海马组织凋亡细胞细胞核固缩碎裂, 呈黑色, 胞质荧光亮点、坏死细胞核增多, 且随着细胞凋亡率的升高, 荧光亮点越多。缺氧缺血性脑损伤模型组脑组织皮质部位细胞核可见少量 FasL 阳性细胞, 神经干细胞组、EPO 组、 ω -3 不饱和脂肪酸组脑组织皮质部位 FasL 阳性细胞表达量依次增多。



注: A 为缺氧缺血性脑损伤模型组; B 为 ω -3 不饱和脂肪酸组;
C 为 EPO 组; D 为神经干细胞组

图 2 免疫组化法检测各组大鼠大脑海马组织细胞凋亡情况
(免疫组化染色 高倍放大)

3 讨论

围生期窒息可导致新生儿缺氧缺血性脑损伤, 严重危害新生儿的生命安全, 也是造成儿童神经系统损伤的主要原因之一^[7]。因脑缺氧缺血后可引发早期脑神经元坏死、细胞凋亡, 诱发迟发性神经元死亡, 加上细胞凋亡存在不可逆性, 故逐渐引起临床重视^[8]。研究表明, 缺氧缺血性脑损伤具有较高的致残率及致死率, 但临床尚无有效治疗手段, 治愈率极低, 因此, 急需探索一种抑制细胞凋亡、减轻脑损伤程度的新治疗靶点或方法^[9-10]。

神经干细胞是目前治疗神经系统疾病最有前景的细胞, 具有自我更新, 分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞的潜能^[11]。研究表明, 患病部位相关组织受损后将产生各种趋化因子, 对神经干细胞产生趋化、聚集至损伤部位的作用, 且在局部微环境作用下分化形成不同功能的细胞, 对损伤神经细胞进行修复^[12]。同时, 缺氧缺血造成的血管内皮

细胞及胶质细胞受损, 将增加受损部位通透性, 在多种黏附分子作用下, 神经干细胞能透过血-脑脊液屏障, 不断聚集于损伤部位, 对神经细胞进行修复, 起到神经保护作用^[13]。研究表明, 神经干细胞能释放多种营养因子, 对损伤细胞修复具有促进作用; 且神经干细胞能使神经突触间联系增强, 进而建立新神经环路, 在神经发育、修复受损神经元中起到重要作用^[14]。

EPO 为人体内源性糖蛋白激素, 可刺激红细胞生成, 是临床治疗贫血的常用药物。FasL 分别属于 TNF 及 TNF 受体 (TNFR) 家族, 能与 Fas 和 FasL 抗体相互结合, 之后向 Fas 蛋白传递死亡信号从而激活其所在细胞的凋亡程序, 还能将死亡信号向其他细胞传递, 从而更快地引起周围更多细胞的凋亡^[15]。近年来, 随着临床医学研究的深入发现, 各种脑细胞内均存在 EPO 及其受体表达, 是一种新型神经保护因子, 对脑组织损伤有保护作用。据报道, EPO 的神经保护机制可能为: ① 促血管再生作用: 当脑组织出现缺氧时, 脑血管内皮细胞、神经元均产生 EPOR 表达, 当 EPO 和血管内皮细胞内 EPOR 结合后, 能使 Janus 蛋白激酶-2 (JAK-2)、信号转导和转录激活因子 5 (STAT5) 信号途径活化, 加快内皮细胞蛋白激酶的合成, 使细胞迁移能力增强, 进而促进细胞的增殖、活化^[16]; 同时, 与血管内皮生长因子协同作用, 对血管再生具有促进作用, 改善组织氧供, 进而产生神经保护作用。② 抗神经元凋亡作用: 机体内神经元凋亡是一个主动过程, 是神经元细胞在细胞内外相关死亡信号作用下, 经特异性基因操纵及调控的相关细胞自杀行为, 需新蛋白质及 RNA 合成, 故认为 EPO 能抑制脑损伤下神经元凋亡^[17]。③ 抗炎作用: 炎症反应参与了脑损伤的发生发展过程, 而 EPO 能降低炎症因子表达, 减轻炎症反应, 发挥抗炎作用^[18]。

ω -3 不饱和脂肪酸是一种人体必需脂肪酸, 是构成脑、视网膜的重要成分, 在大脑细胞分裂、增殖、突触生长、发育过程中发挥着重要作用, 为大脑形成、智力发育必不可少的物质。研究表明, ω -3 不饱和脂肪酸能对环氧酶、脱氧核酶产生抑制作用, 减少炎症介质释放, 从而减轻炎症反应, 降低黏附分子表达, 促使抗炎介质合成增加^[19]; 同时, ω -3 不饱和脂肪酸能对细胞膜的流动性及膜上有关信号分子、酶、受体相关功能产生影响, 减轻炎症反应, 保护脑组织^[20]。本研究结果显示, 神经干细胞组、EPO 组、 ω -3 不饱和脂肪酸组大鼠大脑海马

组织 Fas、FasL 基因表达均显著低于对照组,且神经干细胞组表达最低;提示神经干细胞组、EPO 组、 $\omega-3$ 不饱和脂肪酸均能减少或抑制脑组织内 Fas、FasL 表达,产生保护神经作用,特别是神经干细胞的作用最为显著。

综上所述,缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织 Fas/FasL 呈高表达,神经干细胞、EPO 及 $\omega-3$ 不饱和脂肪酸干预治疗后均能使 Fas/FasL 表达减少,从而对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠产生神经保护作用,其中神经干细胞的保护作用最显著。因神经干细胞具有体外获得简便、增殖能力强、安全性高等优势,将成为治疗缺氧缺血性脑损伤的一个新途径,在医学等领域具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 张渊韬,姜泓,李兴珍,等.新生儿缺氧缺血性脑损伤保护性策略研究进展[J].新乡医学院学报,2016,33(11):1002-1006. DOI: 10.7683/xyxyxb.2016.11.018.
- [2] Zhang YT, Jiang H, Li XZ, et al. Advances in protective strategies for neonatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. J Xiangxiang Med Univ, 2016, 33 (11): 1002-1006. DOI: 10.7683/xyxyxb.2016.11.018.
- [3] 王琪.脑神经生长素对新生儿缺氧缺血性脑损伤的保护作用[J].湖南师范大学学报(医学版),2016,13(4):71-73.
- [4] Wang Q. Protective effect of brain nerve growth factor on neonatal hypoxic ischemic brain injury [J]. J Hunan Norm Univ (Med Sci), 2016, 13 (4): 71-73.
- [5] Lunenfeld B, Saad F, Hoesl CE. ISA, ISSAM and EAU recommendations for the investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males: scientific background and rationale [J]. Aging Male, 2005, 8 (2): 59-74. DOI: 10.1080/13685530500163416.
- [6] 易娟,李贵南.神经干细胞移植治疗新生儿脑损伤的前景展望[J].中华新生儿科杂志,2017,32(5):398-400. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2096-2932.2017.05.020.
- [7] Yi J, Li GN. The prospect of neural stem cell transplantation in the treatment of neonatal brain injury [J]. Chin J Neonatol, 2017, 32 (5): 398-400. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2096-2932.2017.05.020.
- [8] 陈祥荣,谢宝缘,骆良钦,等. $\omega-3$ 多不饱和脂肪酸对大鼠创伤性脑损伤后神经功能的影响[J].中华临床营养杂志,2015,23(2):110-115. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-635X.2015.02.008.
- [9] Chen XR, Xie BY, Luo LQ, et al. Effect of $\omega-3$ polyunsaturated fatty acids supplementation on traumatic brain injury in a rat model [J]. Chin J Clin Nutr, 2015, 23 (2): 110-115. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-635X.2015.02.008.
- [10] 张晶,黄蕊,郝玲,等.促红细胞生成素对缺氧缺血性脑损伤大鼠的脑保护作用及机制[J].山东医药,2015,55(17):13-16. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2015.17.005.
- [11] Zhang J, Huang R, Hao L, et al. Protective effect of erythropoietin on rats with hypoxic-ischemic brain injury and its mechanism [J]. Shandong Med J, 2015, 55 (17): 13-16. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2015.17.005.
- [12] 陈勤玲,蒋辉英,杨梅,等.促红细胞生成素在治疗新生儿缺氧缺血性脑损伤中的研究[J].南昌大学学报(医学版),2017,57(5):94-97. DOI: 10.13764/j.cnki.ncdm.2017.05.023.
- [13] Chen QL, Jiang HY, Yang M, et al. Effect of erythropoietin on neonatal hypoxic-ischemic brain damage [J]. Acta Acad Med Jiangxi, 2017, 57 (5): 94-97. DOI: 10.13764/j.cnki.ncdm.2017.05.023.
- [14] 陈英杰,谢良杰,庄耀东,等. $\omega-3$ 多不饱和脂肪酸对重型颅脑损伤患者伤后炎症反应和神经损害的影响[J].中华临床营养杂志,2015,23(4):224-228. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-635X.2015.04.006.
- [15] Chen YJ, Xie LJ, Zhuang YD, et al. Effect of $\omega-3$ polyunsaturated fatty acids on the inflammatory response and nerve damage in severe traumatic brain injury patients [J]. Chin J Clin Nutr, 2015, 23 (4): 224-228. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-635X.2015.04.006.
- [16] Bhasin S, Pencina M, Jasuja GK, et al. Reference ranges for testosterone in men generated using liquid chromatography tandem mass spectrometry in a community-based sample of healthy nonobese young men in the Framingham Heart Study and applied to three geographically distinct cohorts [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96 (8): 2430-2439. DOI: 10.1210/jc.2010-3012.
- [17] 陈国庆.鼠神经生长因子对缺氧缺血性脑病新生儿行为神经的影响[J].中华全科医学,2014,12(10):1610-1612.
- [18] Chen GQ. Effect of mouse nerve growth factor on behavioral neuroscience of neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. Chin J Gen Pract, 2014, 12 (10): 1610-1612.
- [19] 李炳乾,张桂龙,余勇波,等.神经干细胞移植对脑缺血再灌注损伤大鼠脑脊液中炎症因子的影响[J].东南大学学报(医学版),2018,37(3):379-384. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6264.2018.03.003.
- [20] Li BQ, Zhang GL, Yu YB, et al. Effects of neural stem cell transplantation on inflammatory factors in cerebrospinal fluid of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. J Southeast Univ (Med Sci Ed), 2018, 37 (3): 379-384. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6264.2018.03.003.
- [21] 李晓娟,李新娟,朱晓谦,等.孕酮通过 PI3K/Akt 信号通路减轻新生大鼠缺血缺氧性脑损伤[J].中风与神经疾病杂志,2014,31(6):488-491.
- [22] Li XJ, Li XJ, Zhu XQ, et al. Progesterone reduce hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats through PI3K/Akt signaling pathway [J]. J Appl Nerv Dis, 2014, 31 (6): 488-491.
- [23] Atlantis E, Martin SA, Haren MT, et al. Demographic, physical and lifestyle factors associated with androgen status: the Florey Adelaide Male Ageing Study (FAMAS) [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2009, 71 (2): 261-272. DOI: 10.1111/j.1365-2265.2008.03463.x.
- [24] 何红月.鼠神经生长因子改善缺氧缺血性脑病新生儿行为神经功能的作用分析[J].湖南师范大学学报(医学版),2016,13(4):42-44.
- [25] He HY. Analysis on the effects of rat nerve growth factor in improvement of neurobehavioral function in the neonates with hypoxic ischemic encephalopathy [J]. J Hunan Norm Univ (Med Sci), 2016, 13 (4): 42-44.
- [26] 田安好,赵薇,张蕾,等.卵泡抑素、激活素 A 与 BMP-4 在缺血缺氧性脑损伤大鼠脑组织中的表达[J].四川大学学报(医学版),2014,45(5):772-776.
- [27] Tian AH, Zhao W, Zhang L, et al. Expression of follistatin, activin A and BMP-4 in rats with hypoxic-ischemic brain damage [J]. J Sichuan Univ (Med Sci Ed), 2014, 45 (5): 772-776.
- [28] 李杨,王聚信,赵姗姗,等.褪黑素抑制新生大鼠脑缺血缺氧损伤后海马内 Bcl-2/Bax 的下调和 caspase-3 的活化[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2016,25(3):216-222. DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2016.03.003.
- [29] Li Y, Wang JX, Zhao SS, et al. Melatonin inhibits the decrease of Bcl-2/Bax ratio and activation of caspase-3 induced by hypoxia-ischemia brain damage in the hippocampal neurons of neonatal rats [J]. Chin J Histochem Cytochem, 2016, 25 (3): 216-222. DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2016.03.003.
- [30] 许丽琴,齐旭升,杨敏,等.鼠神经生长因子联合高压氧对缺氧缺血性脑病新生大鼠血清神经特异性烯醇化酶和髓鞘碱性蛋白的影响及疗效观察[J].实用心脑血管病杂志,2014,22(4):34-35. DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2014.04.015.
- [31] Xu LQ, Qi XS, Yang M, et al. Effect of mouse nerve growth factor on serum neuron specific enolase and myelin basic protein in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy [J]. Pract J Card Cerebr Pneu Vasc Dis, 2014, 22 (4): 34-35. DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2014.04.015.
- [32] 陈群嫦,曹云涛,诸葛小寅.去铁胺对新生鼠缺氧缺血性脑损伤后海马 CA1 区 BrdU 和 GFAP 表达的影响[J].中国临床药理学杂志,2016,32(22):2077-2080. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2016.22.016.
- [33] Chen QC, Cao YT, Zhuge XY. Effects of deferoxamine on the expression of BrdU and GFAP in hippocampal CA1 region of neonatal rat brain after hypoxic-ischemic brain damage [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2016, 32 (22): 2077-2080. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2016.22.016.
- [34] 陈双,江伟,陈洁,等.视黄酸通过 RAR α 对缺氧缺血性脑损伤后神经元凋亡的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2018,40(4):247-252. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2018.04.002.
- [35] Chen S, Jiang W, Chen J, et al. Retinoic acid affects apoptosis of neurons injured by hypoxic-ischemic brain damage via retinoic acid receptor α [J]. Chin J Phys Med Rehabil, 2018, 40 (4): 247-252. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2018.04.002.
- [36] 王伟,赵海霞.注射用鼠神经生长因子对大鼠缺血脑组织神经生长因子及脑源性神经营养因子表达的影响[J].中国药物与临床,2017,17(2):171-174. DOI: 10.11655/zgywylc.2017.02.006.
- [37] Wang W, Zhao HX. Effect of rat nerve growth factor for injection on expressions of NGF and BDNF in ischemic brain tissues of rats [J]. Chin Remed Clin, 2017, 17 (2): 171-174. DOI: 10.11655/zgywylc.2017.02.006.

(收稿日期:2018-12-04)