

• 论著 •

缺氧缺血性脑损伤新生兔血清神经元特异性烯醇化酶 改变及黄芪的保护作用

杜翠琼, 林迺苍, 朱世泽, 黄煌, 许湘洋, 黄媛贤

(福建省泉州医学高等专科学校儿科教研室, 福建 泉州 362000)

【摘要】 目的 探讨缺氧缺血性脑损伤(HIBD)时血清神经元特异性烯醇化酶(NSE)的表达规律以及黄芪的干预作用。方法 取孕中晚期新西兰兔 36 只, 随机分为对照组、缺氧组及黄芪干预组。于各组新生兔出生后 1、2、3、7 d 采血, 用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清 NSE 含量。结果 对照组各时间点血清 NSE 含量比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05); 缺氧组、黄芪干预组 NSE 水平较对照组明显升高, 但黄芪干预组明显低于缺氧组, 差异有统计学意义(P 均 < 0.01)。动态监测血清 NSE 发现, 缺氧组、黄芪干预组血清 NSE 高峰出现在兔出生后 1 d, 并随日龄增长含量逐渐下降, 7 d 时仍未降至正常水平, 且两两比较差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。结论 血清 NSE 变化与 HIBD 程度密切相关, HIBD 程度越重, NSE 升高越明显。黄芪干预后可降低缺氧动物血中 NSE 水平, 推断黄芪对缺氧时的脑组织有保护作用。

【关键词】 缺氧缺血性脑损伤; 新生兔; 神经元特异性烯醇化酶; 黄芪

中图分类号: R285.5, R742 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.06.009

The change of neuron-specific enolase in serum of newborn rabbit with hypoxic/ischemic brain damage and protection of astragalus (黄芪) DU Cui-qiong, LIN Jing-cang, ZHU Shi-ze, HUANG Huang, XU Xiang-yang, HUANG Mei-zian. Department of Pediatrics Faculty Working Office, Quanzhou Medical College, Quanzhou 362000, Fujian, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression law of neuron-specific enolase (NSE) in serum of newborn rabbits with hypoxia/ischemia brain damage (HIBD) and protection of astragalus (黄芪). Methods Thirty-six New Zealand rabbits in the medium- and terminal pregnancy-term were taken, and then they were randomly divided into three groups: control, oxygen deprivation and astragalus intervention groups. After they were born, blood was collected from newborn rabbits at 1, 2, 3 and 7 days respectively. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to quantitatively estimate the content of NSE in the serum. Results No significant statistical significance was obtained in difference of NSE content in serum in the control group at the different time points (all $P > 0.05$). The NSE levels in the oxygen deprivation group and the astragalus intervention group were significantly increased compared with those in the control group, but NSE level in the astragalus intervention group was obviously lower than that in the oxygen deprivation group (all $P < 0.01$). With dynamic detection of NSE in serum, the NSE content in the oxygen deprivation group and the astragalus intervention group reached a peak 1 day after birth. The content of NSE in serum gradually decreased with time, and not dropped to normal level after 7 days. There was statistical significance in difference of NSE content with paired-comparisons (all $P < 0.05$). Conclusion The result indicates that the change of NSE in serum is closely related with the HIBD level. The more severe is the HIBD level, the more significant elevation is the NSE level. Astragalus intervention can decrease NSE level in the serum of hypoxic animal, that indicates the astragalus may play a role in protection of brain tissue from oxygen deprivation.

【Key words】 hypoxic/ischemic brain damage; newborn rabbit; neuron-specific enolase; astragalus

新生儿缺氧缺血性脑损伤(HIBD)是由围生期新生儿窒息引起的脑损伤,是临床一种常见病、多发

病,严重者可威胁新生儿生命,存活者易留下神经系统后遗症,如脑瘫、智力障碍、癫痫、痉挛和共济失调等^[1]。因此,必须及早用药干预治疗,但目前尚无特效治疗措施。黄芪是临床常用补气药,对 HIBD 有神经保护作用。本研究中参考 Williams 等^[2]的方法建立新生兔 HIBD 模型,观察模型兔脑损伤过程中血

基金项目:福建省教育厅科技计划项目(JB07203);福建省泉州市科技计划项目(2007Z50)

作者简介:杜翠琼(1951-),女(汉族),福建省人,副教授,副主任医师,Email:ducq2007@163.com。

清神经元特异性烯醇化酶(NSE)的变化,并探讨黄芪对 HIBD 兔脑组织的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物来源以及分组:选取健康孕中晚期新西兰兔 36 只。按随机数字表法分为对照组(12 只)、缺氧组(11 只)及黄芪干预组(13 只)。对照组:模拟放进缺氧箱,但不予缺氧处理。缺氧组:将怀孕 10 d 的母兔置于自制玻璃舱内,造成缺氧状态,舱内混合气体氧含量为(12.0±0.1)%,舱内气压与大气压平衡,舱内 CO₂ 含量始终<3%,温度保持在 19~23 ℃,饲料及饮水同常。每日分 2 次缺氧,每次 4 h,连续 20 d,至孕 30 d 分娩止。黄芪干预组:将孕兔按上述方法放置于缺氧箱进行缺氧,并于缺氧前腹腔注射黄芪注射液(四川成都地奥公司提供)2 ml/kg,每日 2 次,共 20 d。每组随机选取出出生后兔崽(对照组 12 只,缺氧组 11 只,黄芪干预组 13 只)断头取血^[3]。

1.2 实验方法:各组分别于兔崽出生后 1、2、3、7 d 采血 2 ml 离心分离血清,置-20 ℃冰箱保存待测。血清 NSE 含量测定采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA),试剂盒购自福州迈新生物科技有限公司,检测步骤按说明书进行。

1.3 统计学处理:采用 SPSS 12.0 统计软件进行分析,计量数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较用 *q* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

表 1 结果显示,对照组各时间点血清 NSE 比较差异无统计学意义;缺氧组各时间点血清 NSE 含量均明显高于对照组;黄芪干预组各时间点血清 NSE 水平均明显低于缺氧组(*P*均<0.01)。缺氧组、黄芪干预组血清 NSE 高峰出现在出生后 1 d,随日龄增长血清 NSE 含量逐渐下降,7 d 时仍未降至正常水平(*P*均<0.05)。

表 1 各组新生兔出生后不同时间点血清 NSE 含量变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	血清 NSE 含量(μg/L)			
		出生 1 d	出生 2 d	出生 3 d	出生 7 d
对照组	12	0.320±1.790	0.320±0.088	0.320±0.095	0.320±0.089
缺氧组	11	1.281±0.182 ^a	1.192±0.150 ^{ac}	1.153±0.130 ^{ad}	0.780±0.093 ^{ac}
黄芪干预组	13	0.751±0.140 ^{ab}	0.712±0.088 ^{abc}	0.631±0.092 ^{abcd}	0.421±0.083 ^{abc}
<i>F</i> 值		102.62	130.12	228.03	120.82
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与对照组比较,^a*P*<0.01,与缺氧组比较,^b*P*<0.01;与本组出生 1 d 比较,^c*P*<0.05;与本组出生 2 d 比较,^d*P*<0.05;与本组出生 3 d 比较,^e*P*<0.05

3 讨论

HIBD 是新生儿窒息的严重并发症,对中枢神经系统具有破坏性损害,其机制复杂。章翔等^[3]的研究也表明,加重继发性脑损害的关键因素是氨基酸谱改变引起神经细胞兴奋毒性和代谢性应激反应。洪新如等^[4]研究发现,新生大鼠发生 HIBD 即刻脑皮质、海马、纹状体中促肾上腺皮质激素(ACTH)水平即显著升高,并维持至伤后 72 h,说明 ACTH 除参与机体的应激反应外,损伤后期 ACTH 的持续升高说明 ACTH 可能也具有直接的营养和保护神经作用;而缺血区脑组织 ACTH 水平的变化对脑损伤及其修复所起的作用不很清楚,还有待进一步探讨。而王华等^[5]的研究表明,蛋白激酶 C 及 c-fos 参与了 HIBD 时脑细胞损伤过程。

HIBD 的临床诊断主要依靠病史、临床表现和影像学检查,没有客观的反映病情和预后的血液生化诊断指标。NSE 是神经元和神经内分泌细胞所特有的一种酶,特异性定位于神经元内^[6]。在脑损伤时,由于神经细胞受损崩解,血脑屏障被破坏,使血清 NSE 浓度升高^[7-8]。有研究表明,当神经元损伤或坏死后,NSE 迅速从细胞内溢出到脑脊液和血液中,致使 NSE 水平升高,其水平可反映神经元死亡的程度,对早期直接而准确了解脑损伤程度具有重要意义^[9]。NSE 在正常体液中含量甚微,波动范围小,呈相对稳定性,与非神经性烯醇化酶之间无交叉免疫反应。本研究结果显示,HIBD 及血脑屏障破坏时,存在于脑脊液中的 NSE 大量进入血液,使血中 NSE 浓度升高,可代替脑脊液中的 NSE 检测,表明对该酶的检测具有早期诊断新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)的价值。

黄芪是以补气健脾为主的临床常用中药,具有清除氧自由基、改善血液流变学指标、降低血小板聚集功能等作用^[10]。已进行的大量现代药理研究证实,黄芪具有增强免疫、抗疲劳、耐缺氧以及强心、降压、改善心肌缺血/再灌注损伤等多种药理作用。黄芪可明显改善窒息幼鼠缺氧、缺血时的脑组织水肿,增加幼鼠脑部血流量,抑制脑缺氧、缺血后脂质过氧化损伤,减少一氧化氮(NO)的产生,调节神经细胞的功能活动,进而达到治疗目的。裴林等^[11]研究表明,黄芪还可增加脑组织血流量,降低 NO 及自由基代谢产物丙二醛(MDA)含量,对 HIBD 具有治疗作用。也有研究表明,胞二磷胆碱与黄芪作用类似,对新生儿 HIE 的有效治疗也是通过改善脑血管张力、增加血流量起作用的^[12]。陈春富和郭述芬^[13]利用大

鼠局灶性脑缺血/再灌注和全脑缺血/再灌注损伤两种动物模型,观察黄芪注射液对脑缺血后再灌注期脑组织的保护作用,结果显示,应用黄芪的动物大脑局部血流量均显著增加,表明黄芪对缺氧的神经细胞有一定的保护作用。卓名等^[14]研究也显示,黄芪注射液治疗 HIE,可使患儿的异常原始反射、肌张力、意识障碍、惊厥等症状消失时间以及住院时间均明显缩短,并可通过抑制血浆及外周血单个核细胞产生白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子- α 等损伤性细胞因子,发挥脑保护作用。李迎国等^[15]应用黄芪注射液治疗后,发现可使严重颅脑损伤患者血清 NSE 明显升高;而本研究结果显示,在对血清 NSE 动态监测中发现,缺氧组、黄芪干预组新生兔血清 NSE 升高,高峰出现在出生后 1 d,并随日龄增长血清 NSE 含量逐渐下降,7 d 时仍未降至正常水平。表明血清 NSE 变化与 HIBD 程度密切相关,HIBD 程度越重,NSE 升高越明显。而黄芪干预组各时间点血清 NSE 水平较缺氧组均明显下降,可推断黄芪对缺氧时的脑组织有保护作用。同时本研究还发现,黄芪干预组随着缺氧持续时间延长,窒息症状及脑细胞损伤程度逐渐加重且持续时间也越长,提示 NSE 持续生成并外溢而导致血清中 NSE 持续性增高或呈持续高值状态。对出生窒息新生儿进行血清 NSE 监测,可以预测脑组织损伤发生;动态监测可在一定程度上反映窒息脑损伤程度。

综上所述,分析本研究结果可得出如下结论:

- ①血清 NSE 变化与 HIBD 程度密切相关,HIBD 程度越重,NSE 升高越明显。
- ②黄芪干预组各时间点 NSE 含量较缺氧组明显下降,可推断黄芪对缺氧时脑组织有保护作用。

参考文献

[1] 吴婉芳. 新生儿缺氧缺血性脑病动物实验研究[J]. 中国实用儿科杂志,1995,10(2):71-74.

[2] Williams CE, Gunn AJ, Synek B, et al. Delayed seizures occurring with hypoxic-ischemic encephalopathy in the fetal sheep [J]. *Pediatr Res*, 1990, 27(6):561-565.

[3] 章翔, 费舟, 吴景文, 等. 重型颅脑损伤合并缺血缺氧后氨基酸谱改变[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(11):643-645.

[4] 洪新如, 刘丽珍, 陈新民. 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后脑内血管活性肠肽和促肾上腺皮质激素的动态变化[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(10):618-620.

[5] 王华, 韩玉昆, 吴保敏. 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤蛋白激酶 C 与 c-fos 基因表达关系的探讨[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(10):621-624.

[6] Jacobi C, Reiber H. Clinical relevance of increased neuron-specific enolase concentration in cerebrospinal fluid[J]. *Clin Chim Acta*, 1988, 177(1):49-54.

[7] Horn M, Seger F, Schlote W. Neuron-specific enolase in gerbil brain and serum after transient cerebral ischemia[J]. *Stroke*, 1995, 26(2):290-296.

[8] Schaarschmidt H, Prange HW, Reiber H. Neuron-specific enolase concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular disease[J]. *Stroke*, 1994, 25(3):558-565.

[9] Bandyopadhyay S, Hennes H, Gorelick MH, et al. Serum neuron-specific enolase as a predictor of short-term outcome in children with closed traumatic brain injury[J]. *Acad Emerg Med*, 2005, 12(8):732-738.

[10] 张路云, 崔国鲁. 黄芪在缺血缺氧性疾病中应用的研究进展[J]. 福建医药杂志, 2008, 30(2):93-95.

[11] 裴林, 刘唤荣, 张少丹, 等. 黄芪对缺氧缺血性脑损伤幼鼠一氧化氮、丙二醛含量的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8(4):222-224.

[12] 杨淑华. 综合疗法治疗新生儿缺氧缺血性脑病 64 例[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8(2):115.

[13] 陈春富, 郭述苏. 黄芪对脑缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[J]. 河北中医学报, 1999, 14(3):1-3.

[14] 卓名, 陈鸿莲, 蔡娜丽, 等. 黄芪注射液对新生儿缺氧缺血性脑病的临床与免疫学机制研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(1):13-15.

[15] 李迎国, 杨喜民, 唐宗椿, 等. 黄芪注射液对急性重型颅脑损伤患者血清神经特异性烯醇化酶、髓鞘碱性蛋白和 S100 蛋白 B 含量的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(6):337-339.

(收稿日期:2009-08-17)

(本文编辑:李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

《中国中西医结合急救杂志》投稿须知

为缩短稿件修改时间,提高效率,加快文稿刊发速度,请作者在投稿时注意以下问题:①来稿须实事求是、数据可靠,具有科学性、逻辑性和时效性,文字精练,引用资料应给出文献依据。②论著类文章在正文前应有内容、格式完全相同的中英文摘要〔按目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)、结论(Conclusions)4个部分分别说明〕以及关键词(3~8个),全部作者的中、英文姓名及单位,中、英文摘要均应一式2份。③文稿作者顺序排名(不排并列作者),作者单位及邮政编码在作者姓名后注明。英文的作者顺序及单位写法与中文完全相同。④在文稿首页下脚注中写明第一作者姓名(出生年),性别(民族),籍贯,硕士以上学位,职称,主要研究方向、研究成果及业绩,发表论文数,国外进修情况及学术地位等。⑤如文稿属科研基金资助项目或重点攻关、研究课题,请在文稿首页的脚注中一并注明,出示课题号,并务必同时邮寄上述证明复印件(A4复印纸)。⑥投稿须提供纸质文稿2份,同时交付电子版文稿(软盘、光盘或发电子邮件,Email: cccm@em120.com)。⑦审稿费每篇100元。

(本刊编辑部)