

神经生长因子对大鼠急性颅脑损伤的保护作用

李志坚¹ 王益光² 鲁洪² 王玉良² 唐可欣² 王忠伟¹ 郭顺生¹

摘要 目的: 观察神经生长因子 (NGF) 对实验性急性颅脑损伤后大鼠神经病学评分和脑组织中一氧化氮合成酶 (NOS) 含量的影响, 并探讨其作用机制。**方法:** ①将 27 只急性颅脑损伤大鼠随机分为 3 组, 分别用 NGF、胞磷胆碱钠 (CS) 和生理盐水 (NS) 治疗, 于治疗前后检查动物的神经病学评分改变。②再将 65 只急性颅脑损伤大鼠随机分为 3 组, 即实验组 (30 只)、对照组 (30 只) 和正常组 (5 只)。实验组急性颅脑损伤后立即肌肉注射神经生长因子, 对照组则注射等量生理盐水。对照组和实验组大鼠分别在脑损伤后 1h、3h、6h、8h、24h 断头取脑, 对大鼠急性颅脑损伤后脑组织中 NOS 含量进行检测。**结果:** ①与治疗前比较, NGF 和 CS 组治疗后神经病学评分均降低 ($P < 0.05$); 与盐水对照组比较, NGF 和 CS 组治疗后神经病学评分均降低 ($P < 0.05$)。②大鼠脑皮质中 NOS 活性在伤后 1h、3h 较正常组显著升高 ($P < 0.01$)。神经生长因子实验组与盐水对照组比较, NOS 含量在脑损伤后 1h、3h、6h NOS 含量明显下降 ($P < 0.05$)。**结论:** NGF 可明显促进急性脑损伤大鼠神经功能的恢复; NGF 可通过抑制急性脑损伤后 NOS 的升高, 抑制了一氧化氮的毒性作用, 从而保护了脑神经元。

关键词 急性颅脑损伤; 神经生长因子; 神经病学评分; 一氧化氮合成酶; 大鼠

中图分类号: R651.15 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2008)-01-0043-03

Protective effects of nerve growth factor to acute cerebral injury in rats/LI Zhijian, WANG Yiguang, LU Hong, et al. //Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(1): 43—45

Abstract Objective: To study the curative effects of nerve growth factor (NGF) by changes of neurological grades and nitric oxide synthetase (NOS) level in experimental acute cerebral injury rats. **Method:** ①Twenty seven rat models were randomly divided into three groups which were respectively treated with NGF, Citicoline Sodium (CS) or normal saline (NS) for 20 days, and the neurological grades of rat models were observed before and after above treatments. ②Sixty five rats of acute cerebral injury were divided into three groups: treated group (30 rats, treated with nerve growth factor), control group (30 rats, treated with normal saline) and normal group (5 rats, acute cerebral injury rats), the levels of NOS were measured at the 1st, 3rd, 6th, 8th, 24th hour after acute cerebral injury. **Result:** ①The neurological grades of both NGF and CS treated groups were highly lowered compared with that of pretreated groups and NS control group (both $P < 0.05$). ②NOS level of cerebral injury area was higher than that in control group at the 1st hour, 3rd hour after acute cerebral injury. NOS level in nerve growth factor treatment group were obviously lower than that in control group post-traumatic at the 1st, 3th and 6th hour (both $P < 0.05$). **Conclusion:** Nerve growth factor can protect cerebral against injury in vivo and accelerate the nervous function recovery of the rat models with acute cerebral injury. One of the mechanisms may be the nerve growth factor prohibits neurotoxicity of nitric oxide.

Author's address Dept. of Functional Laboratory, Weifang Medical College, Weifang, Shandong Province, 261042

Key words acute cerebral injury; nerve growth factor; neurological grades; nitric oxide synthetase; rats

大鼠颅脑损伤后功能的恢复已越来越引起人们的关注, 并逐渐成为本研究领域的重要课题之一^[1]。脑损伤后受损伤的中枢神经元虽不能再生, 但随着时间延长却常出现有意义的功能恢复, 大量研究表明神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 与之有关^[2-3]。许多报道认为: 一氧化氮 (nitric oxide, NO) 参与了颅脑损伤后脑缺血、缺氧继发性脑损伤的病理过程^[4]。但外源性给予神经生长因子后对 NO 和神经功能的影响, 目前尚未见详尽报道。本研究在建立大鼠颅脑损伤模型的基础上, 通过观察大鼠急性脑颅脑损伤后神经病学评分和脑组织中一氧化氮合成酶

(nitric oxide synthetase, NOS) 含量的变化, 初步探讨急性颅脑损伤后早期应用神经生长因子的神经保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠 100 只, 体重 250—300g, 由山

1 潍坊医学院机能实验室, 山东潍坊, 261042

2 潍坊医学院生理学教研室

作者简介: 李志坚, 女, 实验师

收稿日期: 2007-04-17

东大学实验动物中心提供。

1.2 药品及试剂

2.5s 神经生长因子 (解放军军事医学科学院提纯), 用 0.9%NaCl 溶液溶解后冷藏保存备用。胞磷胆碱钠(山东新华制药股份有限公司生产)。NOS 测定试剂盒由南京建成生物工程所提供。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组: (1)先将造模成功的 27 只, 随即分为 3 组, ①NGF 实验组: 9 只, 后肢肌肉注射 2.5sNGF, 每次肌注 1000BU, 1 次/d, 连续 20d。②胞磷胆碱钠(CS)药物对照组: 9 只, 后肢肌肉注射 CS, 每次肌注 0.1g, 1 次/d, 连续 20d; ③盐水对照组: 2ml 生理盐水, 肌注, 1 次/d, 连续 20d。以上 3 组首次用药均在术后 24h 之内进行。(2)再将造模成功的剩余的 65 只大鼠随机分为 3 组, 即正常组(5 只), 实验组、对照组各 30 只, 实验组和对照组又分为脑损伤后 1h、3h、6h、8h、24h 5 个小组, 每组 6 只。实验组大鼠脑损伤后即刻肌肉注射神经生长因子 1000BU (2ml 生理盐水溶解), 对照组则注射等量生理盐水。

1.3.2 模型制备: 用 20%氨基甲酸乙酯 0.6ml/kg 腹腔麻醉后固定于手术台上, 在无菌条件下于矢状正中线切开头皮、骨膜, 并分离骨膜, 于左侧前囟后 2mm、中线旁开 2mm 处, 做一直径约 4mm 的骨窗, 保持硬膜完整。将其置于自由落体实验平台底部, 将 40g 重砝码沿 25cm 高处滑下, 撞击于左侧顶骨窗之硬膜上。致伤面积约 1cm², 致伤力 1000g/cm², 下陷深度约 2mm。

1.3.3 神经病学评分: 分别于治疗前、后参照 Longa^[5] 5 分评分标准: 0 分, 无神经症状; 1 分, 不能完全伸展对侧前或后爪; 2 分, 向外侧转圈; 3 分, 向手术侧倾倒; 4 分, 不能自发行走, 意识丧失。

1.3.4 脑组织 NOS 测定: 对照组和实验组大鼠分别在脑损伤后 1h、3h、6h、8h、24h 断头取脑, 取创伤部位皮质及对侧相应区域组织约 1.0—2.0cm³, 立即称重, 用玻璃匀浆器制成 10%匀浆, 以 4000r/min 离心 15min, 提取上清液, 检测 NOS 水平。

1.4 统计学分析

实验所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组实验数据采用 SPSS 8.0 软件进行统计学处理。

2 结果

2.1 脑损伤大鼠神经病学评分的结果

治疗后除盐水对照组外, 其余两组评分均低于治疗前 ($P < 0.05$), 也低于盐水对照组 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠脑组织 NOS 含量变化的比较

表 1 NGF 对脑损伤大鼠神经病学评分的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	治疗前	治疗后
盐水对照组	9	2.66±0.47	2.53±0.76
胞磷胆碱钠组	9	2.44±0.56	1.42±0.38 ^{①②}
神经生长因子组	9	2.51±0.39	1.22±0.42 ^{①②}

①与治疗前比较 $P < 0.05$, ②与盐水对照组比较 $P < 0.05$

大鼠脑皮质中的 NOS 活性正常组为 39.32±8.96, 脑损伤后 1h 时较正常组升高 ($P < 0.05$), 6h 开始下降。神经生长因子治疗组大鼠脑损伤后 1h、3h、6h NOS 活性较对照组明显降低 ($P < 0.05$), 表明神经生长因子能拮抗脑损伤后所致的 NOS 活性升高效应。见表 2。

表 2 对照组和实验组大鼠脑损伤后 NOS 水平 ($\bar{x} \pm s$)

时间点	鼠数	NOS 含量	
		盐水对照组	神经生长因子组
1h	6	58.76±13.36	50.38±12.54 ^①
3h	6	56.96±14.28	49.56±12.16 ^①
6h	6	54.27±14.93	45.63±13.28 ^①
8h	6	48.54±13.18	46.32±12.48
24h	6	40.78±12.23	39.84±13.23

①在相应时间点与对照组比较 $P < 0.05$

3 讨论

颅脑损伤后的病死率较高, 如何防治颅脑损伤后的继发性脑损伤是降低病死率的关键。近年来为了控制继发性脑损伤的发生, 临床上采取了多种治疗方法^[6], 但降低病死率的效果并不明显。目前研究证实, 神经生长因子能选择性地作用于中枢神经系统^[7]。胎神经移植与神经生长因子联合注入应用于脑损伤 SD 大鼠皮质的研究表明, 既可改善其活动功能, 又可促进脑损伤的恢复^[8]。在正常生理状态下, 外源性神经生长因子静滴或肌注后不易透过这一脑脊液屏障, 但在急性脑损伤初期, 因这一脑脊液屏障受损^[9], 神经生长因子可透过这一脑脊液屏障进入中枢神经系统而发挥作用。颅脑损伤后会导致脑细胞水肿、软化、变性, 甚至萎缩、坏死, 所以神经病学评分增高。经过神经生长因子治疗后, 神经病学评分降低, 与治疗前比较有显著性差异; 盐水对照组神经病学评分与治疗前比较无显著性差异, 表明神经生长因子对大鼠的神经功能恢复有促进作用。治疗后 NGF 组神经病学评分均低于盐水对照组, 说明神经生长因子对脑损伤的保护和治疗作用是确切的, 这与有关报道是一致的^[10]。

创伤性脑损伤后 NO 增加已得到证实^[11]。而 NO 是近年来新发现的一种特殊的神经递质和自由基, 具有“双重作用”。过量的 NO 则以自由基的形式对神经细胞产生毒性作用, 颅脑损伤后 NO 大量增加, 并且作用时间较长。NO 是由 NOS 催化 L-精氨酸氧化生成的; 而参与神经损伤的 NO 来源于 NOS 阳性

神经元, 由于 NO 极不稳定, 故对 NO 的认识多来源于对 NOS 的研究。实验发现, 创伤性脑损伤后 NOS 表达的变化趋势与脑细胞凋亡的变化趋势基本吻合, 结合增加的 NOS 阳性细胞的形态特征, 可推断为诱导型 NOS 阳性细胞, 而脑损伤后诱导型 NOS 阳性细胞过量的 NO 释放促发了细胞凋亡的发生^[12]。本实验结果显示, 脑损伤后 NOS 活性增加, 与正常组比较有显著性差异 ($P<0.05$), 提示 NO 和 NOS 参与了脑损伤后脑细胞损伤的病理过程, 并随时间呈现一个动态的变化过程。另外, 损伤后脑组织中 NOS 的活性在一定时间内有阶段性升高的变化, 推测是脑损伤后引起谷氨酸释放增加, 谷氨酸通过 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体导致 Ca^{2+} 内流增加, Ca^{2+} 结合钙调素后激活 NOS^[13]。脑损伤后 1h、3h、6h NOS 活性升高, 经过神经生长因子治疗 NOS 活性明显降低, 与相应对照组比较, 有显著性差异 ($P<0.05$), 表明 NGF 能拮抗脑损伤后所致的 NOS 活性升高效应。NGF 能够抑制脑损伤后兴奋性氨基酸的升高效应, 从而间接抑制了兴奋性氨基酸作用于 NMDA 受体所致的 Ca^{2+} 内流进而抑制了 Ca^{2+} 对 NOS 的激活, 减少了 NO 的释放从而保护了神经细胞, 这可能是 NGF 对脑损伤保护作用的机制之一。另外, NGF 还能增加过氧化氢酶、SOD、谷胱甘肽过氧化物酶等自由基清除剂的活性; 对细胞内 Ca^{2+} 的浓度也有很好的稳定作用。

由此可见, NGF 及早、足量的应用, 对颅脑损伤后继发性脑损伤有较好的防治作用, 能够达到治疗

的目的。但是如何提高疗效, 选择较好的给药途径尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 徐平, 王中, 吴冀伟, 等. 正中神经电刺激对颅脑损伤后昏迷患者促苏醒作用的初步研究 [J]. 苏州大学 (医学版), 2004, 24(2): 199—202.
- [2] Grundy PL, Patel N, Harbus MS, et al. Glucocorticoids modulate the NGF mRNA response in the rat hippocampus after traumatic brain injury[J]. Brain Res, 2001, 892(2): 386—390.
- [3] Philips MF, Mattiasson G, Wieloch T, et al. Neuroprotective and behavioral efficacy of nerve growth factor-transfected hippocampal progenitor cell transplants after experimental traumatic brain injury[J]. J Neurosurg, 2001, 94(5): 765—774.
- [4] 陈君. 一氧化氮及一氧化氮合成酶抑制剂对脑缺血缺氧损害的双重作用[J]. 中国麻醉与镇痛, 2003, 5(1): 67—70.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84—91.
- [6] 张秋菊, 王永成, 程惠娟, 等. 通腑健脑液对大鼠颅脑损伤治疗作用的实验研究[J]. 中国中医急症, 2004, 13(5): 309—310.
- [7] 孔喜良, 刘洪珍. 神经生长因子的研究近况 [J]. 中国临床康复, 2004, 8(10): 1920—1921.
- [8] Sinson G, Voddi M, McIntosh TK, et al. Combined fetal neural transplantation and nerve growth factor infusion: effects on neurological outcome following fluid-percussion brain injury in the rat[J]. J Neurosurg, 1996, 84(4): 655—662.
- [9] 李培建, 李兵仓. 神经营养因子的生物学作用及其应用 [J]. 现代康复, 2001, 5(1): 70—71.
- [10] Guegan C, Ceballos-Picot I, Chevalier E, et al. Reduction of ischemic damage in NGF-transgenic mice: correlation with enhancement of antioxidant enzyme activities[J]. Neurobiol Dis, 1999, 6(3): 180—189.
- [11] Wada K, Chatzipanteli K, Busto R, et al. Role of nitric oxide in traumatic brain injury in the rat [J]. J Neurosurg, 1998, 89(5): 807—818.
- [12] 毛伟峰, 金国华, 秦建兵, 等. 大鼠创伤性脑损伤后细胞凋亡及 NOS 阳性细胞的变化 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2003, 21(60): 603—607.

中华医学会第十次全国物理医学与康复学学术会议征文通知

中华医学会第十次全国物理医学与康复学学术会议定于 2008 年 11 月 7—11 日在广州珠江宾馆召开。本次会议由中华医学会物理医学与康复学分会主办, 广东省医学会物理医学与康复学分会承办, 诚挚邀请物理医学与康复科、康复医学科、理疗科、骨科、神经内科、神经外科、老年医学科及其他相关学科的医生、治疗师、护士参加此次盛会。

征文范围: 神经系统疾病康复、骨与关节疾病康复、心肺疾病的康复、儿童脑瘫的康复、语言、吞咽与认知障碍的康复; 针灸、按摩、各种自然及人工物理因子的应用; 疼痛、痉挛的评估与治疗; 矫形器的制作与应用等康复实践方面的成功经验; 社区康复的理论与实践; 学科设置和建设、康复医学教育及康复护理; 康复理疗仪器设备的研制与应用等方面的稿件。

投稿方式: 请以网上在线方式投稿, 投稿网址为 www.capmr.org, 或电子邮件投稿, 电子邮箱为: zjzhong@fimmu.com。邮件主题为“广州全国年会投稿”。非电子邮件投稿恕不接收。

优秀论文: 本次大会将分别设中英文优秀论文一等奖、二等奖、三等奖若干名。参加优秀论文评选的作者报送 4000 字以内的中文或英文全文 2 份和电子邮件文稿, 来稿注明“优秀论文征文”。

截稿时间: 2008 年 9 月 15 日。

联系人: 广东省医学会物理医学与康复学分会, 兰月(13711161667); 张建宏(13380092979)。