

脂多糖致早产鼠脑白质损伤的实验研究

姜大朋, 李昭铸, 张玉波

[摘要] 目的 探讨宫内感染致早产鼠脑白质损害的机制。方法 30 只 Wistar 孕鼠分为实验组 18 只和对照组 12 只,在妊娠第 15、16 天,对实验组孕鼠连续 2 d 腹腔内注射脂多糖(LPS) 0.2 mg/kg,对照组孕鼠注射等量蒸馏水;取实验组早产鼠 45 只、对照组足月鼠 45 只,采用放免法(RIA)测定两组鼠脑组织白细胞介素 6(IL-6)含量;另取实验组早产鼠 47 只、对照组足月鼠 41 只,对脑组织进行 HE 染色;再取 50 只实验组早产鼠及 50 只对照组足月鼠进行脑组织含水量测定。结果 实验组早产鼠脑组织 IL-6 含量明显高于对照组足月鼠($P < 0.01$),脑组织含水量较对照组足月鼠明显增高($P < 0.01$);早产鼠脑组织切片均见脑室周围白质水肿,神经毡疏松化,细胞成分明显减少,神经细胞间隙增宽,细胞肿胀、破裂;对照组足月鼠脑组织形态结构未见异常。结论 细菌内毒素可导致早产鼠脑白质损害,且脑组织中 IL-6 及含水量均增高。

[关键词] 脂多糖;脑瘫;脑白质损害

Experimental Study of Cerebral White Matter Damage in Premature Rats Induced by Lipopolysaccharide JIANG Da-peng, LI Zhao-zhu, ZHANG Yu-bo. The Department of Pediatric Surgery, the Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang, China

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of cerebral white matter damage in premature rats induced by intrauterine infection. **Methods** 30 mature pregnant Wistar/Imamichi rats were divided into the experimental group ($n=18$) and control group ($n=12$). The rats of the experimental group were injected with lipopolysaccharide (LPS) 0.2 mg/kg in abdomen on 15th and 16th day after gestation. Those of the control group were injected with distilled water in equal volume. 45 premature rats born in the experimental group and 45 full-term rats born in the control group were tested with RIA for interleukin-6 (IL-6). The brain tissues of another 47 premature rats and 41 full-term rats were stained with HE method. Finally water content in brain tissue were tested in 50 premature rats and 50 full-term rats. **Results** IL-6 concentration of brain tissue of the premature rats in the experimental group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$); and water content of the premature rats' brain was also higher than that of the full-term rats ($P < 0.01$). The edema of periventricular white matter, loose neuropil, decreased cell numbers, broaden intercellular space, and cell swelling and rupture were found in the brain tissue of the premature rats, no abnormal form and structure were found in the control group. **Conclusion** White matter damage of premature rats can be caused by endotoxin, and accompanied by IL-6 and water contents increasing.

Key words: lipopolysaccharide; cerebral palsy; white matter damage

[中图分类号] R742.3 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2006)10-0829-02

[本文著录格式] 姜大朋,李昭铸,张玉波.脂多糖致早产鼠脑白质损伤的实验研究[J].中国康复理论与实践,2006,12(10): 829-830.

早产儿脑损伤是引起脑瘫、癫痫等多种神经系统疾病的重要原因,对早产导致的脑瘫患儿进行早期诊断、早期干预,提高其生存质量,是减少儿童残疾的重要课题^[1]。随着医学免疫学的发展,炎症细胞因子在感染与损伤中的介导作用日益受到关注,母亲宫内感染后引起的细胞因子网络反应可能是发生早产及早产儿脑损伤的机制之一^[2,3]。本研究旨在通过孕鼠腹腔注射脂多糖,探讨宫内感染致早产鼠脑白质损害的机制,为防治宫内感染致新生儿脑损伤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 选用 5 个月龄,体重 380~420 g 的健康孕 15 d 的 Wistar 大鼠(清洁级,由哈尔滨医科大学实验动物中心提供) 30 只,分为实验组 18 只和对照组 12 只。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)为大肠杆菌

O₅₅:B₅ 菌株(1 mg/ml),美国 Sigma 公司产品,白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)试剂盒购自北京东雅生物技术研究所。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 在妊娠第 15、16 天,对实验组孕鼠称量体重,连续 2 d 于腹中线处腹腔内注射 LPS 0.2 mg/kg;对照组孕鼠在同一时间使用等量蒸馏水腹腔内注射。妊娠第 17~21 天,有 14 只实验组孕鼠早产,对照组孕鼠无早产。共获早产幼鼠 142 只(11 只出生时死亡幼鼠不用于试验)。妊娠第 21 天,对照组 12 只孕鼠均分娩,获存活新生足月幼鼠 136 只。

1.2.2 检测指标及方法: ①IL-6 含量测定:取实验组早产鼠 45 只、对照组足月鼠 45 只,于出生后断头处死,快速取脑,制备幼鼠脑组织匀浆,采用放免法测定两组幼鼠脑组织 IL-6 含量;②幼鼠脑组织 HE 染色:取实验组早产鼠 47 只,对照组足月鼠 41 只,于出生后立即断头快速取脑,经甲醛固定后,进行石蜡包埋,以海马部位为标志,厚度为 5 μ m,间隔 0.5 mm 作连续

冠状切片,进行苏木素-伊红染色;③脑组织含水量测定:将 50 只实验组早产鼠及 50 只对照组足月鼠于生后断头取脑,除去小脑、脑干,沿大脑中央纵裂分离左右大脑半球,取大脑左侧半球,用电子天平精确称量湿重,100℃条件下干燥,烤至恒重。脑组织含水量 = $[(\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重}] \times 100\%$ 。

1.3 统计学处理 所有数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,用 SPSS 10.0 统计软件进行两组间比较的 t 检验。

2 结果

2.1 脑组织 IL-6 含量 实验组早产鼠脑组织 IL-6 含量和含水量均明显高于对照组足月鼠($P < 0.01$),见表 1、表 2。

表 1 实验组早产鼠与对照组足月鼠脑组织 IL-6 含量比较 $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	IL-6 (ng/g)
实验组(早产鼠)	45	2.87 ± 0.34^a
对照组(足月鼠)	45	0.58 ± 0.16

注:a:与对照组比较, $P < 0.01$ 。

表 2 实验组早产鼠与对照组足月鼠脑组织含水量比较 $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	脑组织含水量
实验组(早产鼠)	50	90.16 ± 0.93^a
对照组(足月鼠)	50	87.94 ± 1.05

注:a:与对照组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 组织学观察 实验组早产鼠脑组织切片 91% 表现为胼胝体及内囊部位组织疏松,细胞成分明显减少,神经细胞间隙增宽,神经毡疏松化(见封三图 1.1); 24% 的实验组早产鼠脑室周围白质软化合并有出血(见封三图 1.2)。对照组足月鼠脑组织切片见脑室周围白质区域层次清楚,神经元排列整齐。

3 讨论

近年来,围产期宫内感染、细胞因子等的异常变化已成为新生儿脑白质损害发生机制研究的热点^[4,5]。在早产,特别是胎膜早破的情况下,容易发生感染,进而导致 IL、肿瘤坏死因子 α (tumor necrotic factor- α , TNF- α) 等增加,这些物质除促使前列腺素生成而促成早产外,尚可由于胎儿脑血管发育不完善,导致胎儿脑血管破裂。IL-1、IL-6、TNF- α 等因子对少突神经胶质细胞和髓鞘也有毒性,可诱发髓鞘变性及少突胶质细胞凋亡,致血管破裂,组织缺氧,造成大面积神经细胞死亡,对胎儿及新生儿造成严重危害^[6]。

Yoon 等发现,当脐血中 IL-6 水平 $> 0.4 \mu\text{g/L}$ 时,对检测脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL) 相关性损伤的敏感度为 72%,特异度为 74%^[7],对早产儿脑损伤的早期诊断有临床实用价值。PVL 患儿出生前母亲羊水中 IL-6 及 IL-1 增高,组织切片发现脑室周围区域存在 TNF- α 和 IL-6 表达,提

示 PVL 与宫内感染有关^[8]。

本实验参考了 Bell 等的内毒素致胎鼠脑白质损害的动物模型^[9],在妊娠第 15、16 天,连续 2 d 对实验组孕鼠进行脂多糖腹腔内注射,造成类似于孕鼠宫内感染的状态,然后对孕鼠所产早产鼠脑组织进行 IL-6 含量和含水量测定,以及幼鼠脑组织 HE 染色,探讨宫内感染致早产及早产鼠脑白质损害的机制。本实验结果显示,实验组早产鼠脑组织 IL-6 及含水量明显高于对照组足月鼠;实验组早产鼠脑组织切片见脑室周围白质损害,表现为胼胝体及内囊部位组织疏松,细胞成分明显减少,神经细胞间隙增宽,神经毡疏松化,灶状凝固性坏死及囊腔形成,且部分早产鼠出现 PVL 且合并有出血,而对照组足月鼠脑组织切片见脑室周围白质区域层次清楚,细胞形态结构清晰完整,未见白质水肿及软化灶。

本实验结果提示,给孕鼠注射内毒素可导致其早产仔鼠脑组织损害。TLR4(toll-like receptor 4)作为脂多糖的特异性受体,主要在小胶质细胞表达,细菌内毒素可能直接作用于 TLR4,激活小胶质细胞参与少突胶质细胞的死亡过程。另外,炎症性细胞因子如 IL-6 具有较强血管活化效应,可引起脑血管调节障碍及脑血流下降,从而造成缺血性脑损伤。相信通过宫内感染致早产鼠脑白质损伤机制的研究,可以为新生儿脑白质损害及后遗脑瘫病因研究提供新的思路。

[参考文献]

[1] 姜大朋, 韩福友. 宫内感染与脑白质损伤[J]. 中国康复理论与实践, 2005, 11(12): 1007—1008.

[2] Debillon T, Gras-Leguen C, Leroy S, et al. Patterns of cerebral inflammatory response in a rabbit model of intrauterine infection-mediated brain lesion[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2003, 145(1): 39—48.

[3] 孙杨, 文芳, 姚汉云, 等. 免疫炎症因子过度表达在脑性瘫痪发病机制中的作用[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(2): 93—94.

[4] Gibson CS, MacLennan AH, Goldwater PN, et al. Antenatal causes of cerebral palsy: associations between inherited thrombophilias, viral and bacterial infection, and inherited susceptibility to infection[J]. Obstet Gynecol Surv, 2003, 58(3): 209—220.

[5] 陆华宝. 脑性瘫痪的病因与病理[J]. 中国康复理论与实践, 2003, 9(12): 763—766.

[6] 程秀永, 乔丽丽, 朱长连, 等. 细菌内毒素对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠远期智能的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2003, 18(2): 92—93.

[7] Yoon BH, Jun JK, Romero R, et al. Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy[J]. Am J Obstet Gynecol, 1997, 177(1): 19—26.

[8] 杜彩霞, 赵凤临. 白细胞介素 6 与新生大鼠脑损伤的研究[J]. 中华围产医学杂志, 2001, 4(3): 170—172.

[9] Bell MJ, Hallenbeck JM. Effects of intrauterine inflammation on developing rat brain[J]. J Neurosci Res, 2002, 70(4): 570—579.

(收稿日期: 2006-06-19)

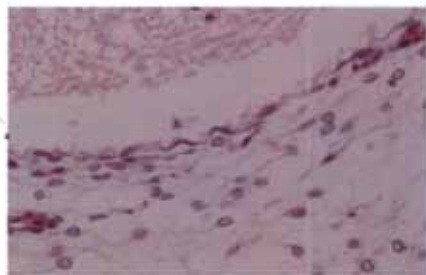


图 1.1 脑室周围白质水肿, 神经细胞间隙增宽 (光镜 40 ×)

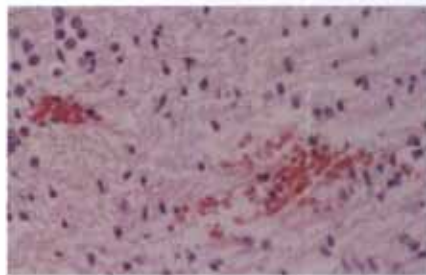


图 1.2 脑室周围白质软化合并出血 (光镜 40 ×)

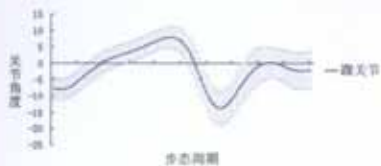
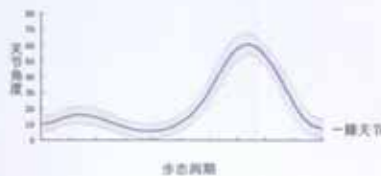
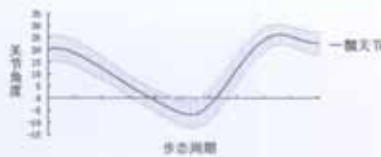


图 2.1 正常人 20~39 岁组关节运动学曲线

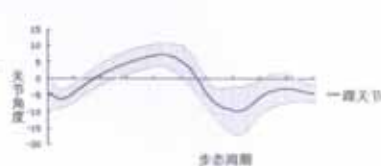
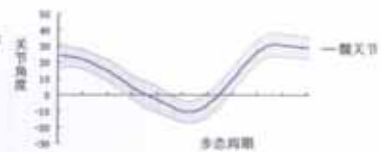


图 2.2 正常人 40~59 岁组关节运动学曲线