

【基础研究】

通信作者:唐成和(1968-),男,河南安阳人,硕士,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向:新生儿脑损伤;E-mail:tc8275@163.com

tion and apoptosis in hippocampus of neonatal rats with brain injury induced by lipopolysaccharide(LPS). **Methods** Forty-eight neonatal Sprague Dawley rats(3 days) were randomly divided into control group, LPS group, ω -3 PUFA group and ω -6 PUFA group, with 12 rats in each group. The rats in the LPS group, ω -3 PUFA group and ω -6 PUFA group were given $0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LPS via intraperitoneal injection, then equal volume of saline, ω -3 PUFA and ω -6 PUFA was immediately given via intraperitoneal injection respectively; while the rats in the control group were all given equal volume of saline. The rats in each group were sacrificed at 24 hours after intraperitoneal injection with saline or fat emulsions to obtain the hippocampus. The levels of superoxide dismutase(SOD) and malondialdehyde(MDA), reduced glutathion(GSH), oxidized glutathione(GSSG) were detected and GSSG/GSH was calculated. The apoptotic index was measured by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling. **Results** Compared with the control group, the levels of SOD and GSH in hippocampus of rats in the LPS group, ω -6 PUFA group and ω -3 PUFA group were significantly decreased($P < 0.05$), and the levels of MDA, GSSG and the ratio of GSSG/GSH were significantly increased($P < 0.05$). Compared with the LPS group, the levels of SOD and GSH in hippocampus of rats in ω -6 PUFA group were significantly decreased($P < 0.05$), the levels of MDA, GSSG and the ratio of GSSG/GSH were significantly increased($P < 0.05$); the levels of SOD and GSH in hippocampus of rats in ω -3 PUFA group were significantly increased($P < 0.05$), the levels of MDA, GSSG and the ratio of GSSG/GSH were significantly decreased($P < 0.05$). Compared with the ω -6 PUFA group, the levels of SOD and GSH in hippocampus of rats in ω -3 PUFA group were significantly decreased($P < 0.05$), the levels of MDA, GSSG and the ratio of GSSG/GSH were significantly increased($P < 0.05$). The apoptotic index in the LPS group, ω -6 PUFA group and ω -3 PUFA group was higher than that in the control group($P < 0.05$). The apoptotic index in the ω -6 PUFA group was higher than that in the LPS group($P < 0.05$). The apoptotic index in the ω -3 PUFA group was lower than that in the LPS group and ω -6 PUFA group($P < 0.05$). **Conclusion** ω -3 PUFA can alleviate the oxidative stress, and decrease the apoptosis of hippocampus in neonatal rats with brain injury induced by LPS. So it has a neuroprotective effect in brain injury induced by LPS.

Key words: polyunsaturated fatty acids; brain injury; lipopolysaccharide; superoxide dismutase; malondialdehyde; glutathion; oxidized glutathione; apoptosis

缺氧、感染等多种致病因素均可引起早产儿脑病^[1]。既往研究表明,早产儿脑病的主要危险因素为缺氧和产前感染等^[2],感染后必然会发生氧化应激反应^[3]。 ω -6 多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)在临床中作为静脉营养脂肪乳剂使用非常广泛,但有研究表明,此类脂肪乳在感染应激状态下,可加重脂质过氧化反应,最终导致器官功能损害^[4]。本课题组的前期研究结果表明, ω -3 PUFA 能够降低急性肺损伤大鼠炎症因子分泌,减少细胞凋亡^[5-6];也有研究发现, ω -3 PUFA 可减少缺氧损伤大鼠脑组织中炎症因子表达,并降低细胞凋亡指数(apoptosis index, AI)^[7-8]。因此作者推测, ω -3 PUFA 可能会减轻早产儿感染所致脑损伤中的氧化应激反应,减少脑细胞凋亡,从而对脑组织具有保护作用。本研究使用 3 日龄新生大鼠模拟人类早产儿,通过注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)制作感染所致脑损伤模型,观察 ω -3 PUFA 对 LPS 所致脑损伤新生大鼠海马组织中氧化应激产物和细胞凋亡的影响,以期为临床治疗早产儿脑损伤提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 48 只 3 日龄 Sprague Dawley 大鼠由新乡医学院实验动物中心提供,雌雄不限,体质量

(18.2 ± 4.3)g;新生大鼠和母鼠均置于 25°C ,湿度约 60% 的动物实验室内饲养,光照时间白天:黑夜 = 12 h : 12 h;由母鼠喂养新生大鼠,避免过多打扰母鼠及新生大鼠;注意饲养环境的卫生,每天更换水和垫料 1 次;母鼠进食与孕期一致的普通饲料,保证营养均衡、卫生,以满足母鼠和新生大鼠的需求。

1.2 主要试剂与仪器 LPS(*E. coli* O111:B4)购自美国 Sigma 公司,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所,还原型谷胱甘肽(reduced glutathion, GSH)、氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)活性测定试剂盒购自美国 Cayman Chemical 公司,原位细胞凋亡检测试剂盒购自德国 Roche 公司;Olympus CX21FS1 型普通光学显微镜购自日本 Olympus 公司, LKB-V2088 型超薄切片机购自瑞典 LKB 公司。

1.3 实验动物分组及处理方法 将 3 日龄新生大鼠随机分为对照组、LPS 组、 ω -3 PUFA 组和 ω -6 PUFA 组,每组 12 只;固定时间点称体质量并腹腔注射药物。对照组大鼠腹腔注射 $0.6 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 生理盐水后,立即腹腔注射等容积生理盐水;LPS 组、 ω -3 PUFA 组和 ω -6 PUFA 组大鼠腹腔注射 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LPS 后,分别立即腹腔注射等容积生理盐水、 ω -3 PUFA 和 ω -6 PUFA^[9]。24 h 后腹腔注射水合氯醛麻醉各

组大鼠,快速断头取海马组织,置于-80℃冰箱中保存备用。

1.4 各组新生大鼠海马组织中 SOD、MDA、GSH 及 GSSG 水平检测 取各组大鼠海马组织,用无菌生理盐水作为匀浆介质,按 1 g:10 mL 在冰浴中充分匀浆制成 100 g·L⁻¹ 组织匀浆,2 000 r·min⁻¹ 离心 2 min,取上清液,采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 水平,改良硫代巴比妥酸法检测 MDA 水平,分别采用 GSH、GSSG 活性测定试剂盒测定 GSH 和 GSSG 水平,并计算 GSSG/GSH 比值;具体操作严格按照说明书进行。

1.5 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 法检测各组新生大鼠海马组织细胞凋亡情况 取各组新生大鼠海马组织,石蜡包埋后切片,TUNEL 法染色后常规进行脱蜡加水,滴加适量蛋白酶 K 工作液,37℃恒温箱孵育 15 min,随后滴加标记缓冲液,37℃标记 2 h,封闭后滴加生物素化抗地高辛抗体,37℃恒温箱充分反应 30 min,荧光显微镜下用蓝色光激发观察,蓝色荧光激发下,明亮的绿色代表 TUNEL 标记的阳性细胞核,提示存在细胞凋亡。在相同放大倍数(×200)、光强度下分析读片,每张切片取 3 个

视野记录凋亡细胞数,并计算 AI,AI=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Bonferroni 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组新生大鼠海马组织中 SOD、MDA、GSH、GSSG 水平及 GSSG/GSH 比值比较 结果见表 1。与对照组比较,LPS 组、ω-6 PUFA 组和 ω-3 PUFA 组新生大鼠海马组织中 SOD 和 GSH 水平显著降低,MDA、GSSG 水平及 GSSG/GSH 比值显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 LPS 组比较,ω-6 PUFA 组新生大鼠海马组织中 SOD 和 GSH 水平显著降低,MDA、GSSG 水平及 GSSG/GSH 比值显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);ω-3 PUFA 组新生大鼠海马组织中 SOD 和 GSH 水平显著升高,MDA、GSSG 水平及 GSSG/GSH 比值显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 ω-6 PUFA 组比较,ω-3 PUFA 组新生大鼠海马组织中 SOD 和 GSH 水平显著升高,MDA、GSSG 水平及 GSSG/GSH 比值显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

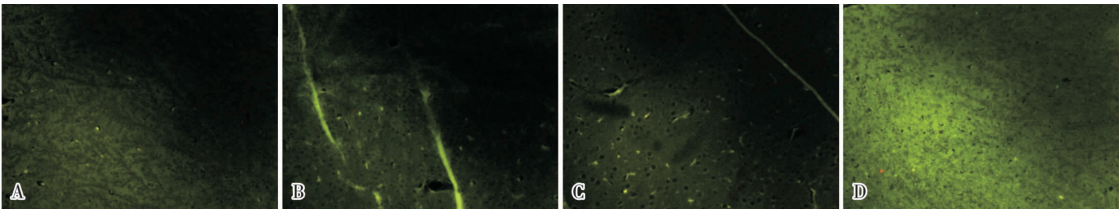
表 1 各组新生大鼠海马组织中 SOD、MDA、GSH、GSSG 水平及 GSSG/GSH 比值比较
Tab.1 Comparison of levels of SOD,MDA,GSH,GSSG and the ratio of GSSG/GSH in hippocampus of neonatal rats among the groups

组别	n	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(μmol·g ⁻¹)	GSH/(mg·g ⁻¹)	GSSG/(mg·g ⁻¹)	GSSG/GSH
对照组	12	114.32±19.22	11.56±3.26	1.45±0.35	0.028±0.004	0.017±0.003
LPS 组	12	89.13±15.89 ^a	37.74±13.54 ^a	0.89±0.21 ^a	0.035±0.007 ^a	0.037±0.007 ^a
ω-6 PUFA 组	12	83.28±12.48 ^{ab}	41.25±16.99 ^{ab}	0.79±0.15 ^{ab}	0.038±0.007 ^{ab}	0.048±0.010 ^{ab}
ω-3 PUFA 组	12	96.65±13.19 ^{abc}	33.68±9.17 ^{abc}	1.02±0.11 ^{abc}	0.032±0.003 ^{abc}	0.032±0.005 ^{abc}
F		5.952	12.323	5.138	4.947	10.232
P		0.002	0.000	0.004	0.004	0.000

注:与对照组比较^a $P < 0.05$;与 LPS 组比较^b $P < 0.05$;与 ω-6 PUFA 组比较^c $P < 0.05$ 。

2.2 各组新生大鼠海马组织 AI 比较 结果见图 1。对照组、LPS 组、ω-6 PUFA 组和 ω-3 PUFA 组新生大鼠海马组织 AI 分别为(2.35±0.76)%、(2.87±1.14)%、(3.01±1.20)%、(2.77±0.89)%。LPS 组、ω-6 PUFA 组和 ω-3 PUFA 组新生大鼠海马组织

AI 显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);ω-6 PUFA 组新生大鼠海马组织 AI 显著高于 LPS 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);ω-3 PUFA 组新生大鼠海马组织 AI 显著低于 ω-6 PUFA 组和 LPS 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A:对照组;B:LPS 组;C:ω-6 PUFA 组;D:ω-3 PUFA。

图 1 TUNEL 法检测各组新生大鼠海马组织细胞凋亡情况(×200)

Fig.1 Apoptosis in hippocampus of neonatal rats in each group detected by TUNEL(×200)

3 讨论

有研究表明,出生后3~7 d啮齿类动物发育水平与人类孕23~36周早产儿的中枢神经系统发育水平接近^[10]。动物实验表明,全身性LPS刺激可以导致小鼠脑损伤,在人类早产儿也有类似的情况出现^[11]。采用3日龄新生大鼠腹腔内注射LPS($0.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)可成功制作感染致脑损伤模型^[12]。早产儿生后暴露于全身性感染可导致新生儿脑损伤^[13-14]。炎症反应过程中产生大量的氧自由基也参与了脑损伤的形成^[15]。在内毒素的激活下,巨噬细胞等免疫细胞生成过多的活性氧,可引起体内抗氧化能力下降,脂质过氧化反应增多,氧化还原平衡被打乱^[16-17]。早产儿大脑发育不成熟,机体抗氧化能力有限,抗氧化酶活性相对偏低,因此,更容易出现氧化还原失衡^[18-19]。SOD、GSH是清除体内自由基的重要物质,SOD、GSH水平代表了体内抗氧化系统状态。MDA是脂质过氧化的最终产物,由机体内PUFA在自由基作用下产生,可作为评估氧化损伤严重程度的间接指标^[20-22]。GSH在氧化剂作用下通过谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽转移酶被氧化成GSSG,GSSG/GSH比值可作为机体氧化/抗氧化系统是否失衡的间接评价指标。

ω -3 PUFA的主要成分是二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid,DHA)^[23],DHA可直接透过血脑屏障进入脑细胞。研究表明,DHA对新生大鼠缺氧缺血性损伤可发挥神经保护效应^[24-25]。本研究结果发现,LPS组新生大鼠海马组织中SOD、GSH水平较对照组显著降低,MDA、GSSG水平GSSG/GSH比值较对照组显著升高,证明脑损伤新生大鼠海马组织中氧化应激反应增加; ω -3 PUFA组新生大鼠海马组织中SOD、GSH水平高于LPS组和 ω -6 PUFA组,MDA、GSSG水平及GSSG/GSH比值低于LPS组和 ω -6 PUFA组,使机体氧化还原系统失衡的程度降低,故可减少氧化应激产物对脑组织的损害;与LPS组比较, ω -6 PUFA组新生大鼠海马组织中SOD和GSH水平显著降低,MDA、GSSG、GSSG/GSH比值显著升高,提示 ω -6 PUFA组新生大鼠体内氧化/抗氧化系统失衡较为严重。

中枢神经系统具有高氧耗、高代谢、抗氧化防御弱等特点,易受到活性氧作用而出现早期氧化应激反应,大量活性氧可导致机体氧化还原平衡紊乱,最终出现细胞凋亡。未发育成熟的大脑更容易受到氧化应激的损伤,细胞凋亡大量增加^[24-25]。本研究结果发现,LPS组、 ω -6 PUFA组和 ω -3 PUFA组新生大鼠海马组织AI显著高于对照组; ω -3 PUFA组新生

大鼠海马组织AI显著低于 ω -6 PUFA组和LPS组;说明 ω -3 PUFA可明显抑制海马组织细胞凋亡,且变化趋势与其降低氧化应激反应的趋势一致,提示 ω -3 PUFA可能通过降低氧化应激反应而减少细胞凋亡,具有神经保护作用。

综上所述, ω -3 PUFA可降低LPS所致脑损伤新生大鼠海马组织中氧化应激反应和细胞凋亡水平,但 ω -3 PUFA是通过哪些信号通路调节氧化应激和细胞凋亡,尚需进一步探讨。

参考文献:

- [1] VOLPE J J. Encephalopathy of prematurity includes neuronal abnormalities[J]. *Pediatrics*, 2005, 116(1): 221-225.
- [2] VOLPE J J. Postnatal sepsis, necrotizing enterocolitis, and the critical role of systemic inflammation in white matter injury in premature infants[J]. *J Pediatr*, 2008, 153(2): 160-163.
- [3] 许冰. 从炎症反应和氧化应激探究麻醉剂影响老龄大鼠认知功能的分子机制[D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [4] HUSCHAK G, ZUR N K, HOELLI T, et al. Olive oil based nutrition in multiple trauma patients; a pilot study[J]. *Intensive Care Med*, 2005, 31(9): 1202-1208.
- [5] 石计朋, 闫建国, 韩金芬, 等. ω -3 PUFAs、 ω -6 PUFAs 和 ω -9 MUFAs 对 LPS 诱导急性肺损伤大鼠血清 IL-6 及细胞凋亡的影响[J]. 中国儿童保健杂志, 2014, 22(3): 271-274.
- [6] 石计朋, 闫建国, 韩金芬, 等. ω -3 PUFAs 对 LPS 诱导急性肺损伤大鼠前炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的影响[J]. 中国儿童保健杂志, 2014, 22(1): 35-37, 40.
- [7] 宋亚辉, 尤庆旺, 王倩楠, 等. Omega-3 鱼油脂肪乳对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠海马组织 Toll 样受体 4 和核因子 κ B 的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(12): 923-926.
- [8] 李艳艳. ω -3 鱼油脂肪乳和亚低温对新生大鼠缺氧缺血脑损伤保护作用探讨[D]. 新乡: 新乡医学院, 2015.
- [9] HAGBERG H, PEEBLES D, MALLARD C. Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults[J]. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 2002, 8(1): 30-38.
- [10] MALLARD C, WAND X. Infection-induced vulnerability of perinatal brain injury[J]. *Neurol Res Int*, 2012, 2012: 102153.
- [11] DAMMANN O, LEVITON A. Inflammatory brain damage in preterm newborns: dry numbers, wet lab, and causal inferences[J]. *Early Hum Dev*, 2004, 79(1): 1-15.
- [12] 徐发林, 庄方莉, 白琼丹, 等. 细菌脂多糖对不同成熟度新生小鼠脑发育的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(8): 611-613, 616.
- [13] STOLL B J, HANSEN N I, ADAMS-CHAPMAN I, et al. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection[J]. *JAMA*, 2004, 292(19): 2357-2365.
- [14] FAN L W, TIEN L T, ZHENG B, et al. Dopaminergic neuronal injury in the adult rat brain following neonatal exposure to lipopolysaccharide and the silent neurotoxicity[J]. *Brain Behav Immun*, 2011, 25(2): 286-297.

参考文献:

[1] YE H J K, CHEN C C, HSIEH M J, *et al.* Impact of homocysteine level on long-term cardiovascular outcomes in patients after coronary artery stenting[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2017, 24 (7) : 696-705.

[2] AUSTEN S K, COOMBES J S, FASSETT R G. Homocysteine and cardiovascular disease in renal disease [J]. *Nephrology*, 2003, 8 (6) : 285-295.

[3] PRZEMYSŁAW W, PIOTR K, GRAZYNA C, *et al.* Total, free, and protein-bound thiols in plasma of peritoneal dialysis and predialysis patients[J]. *Int Urol Nephrol*, 2011, 43 (4) : 1201-1209.

[4] BALD E, CHWATKO G, GLOWACKI R, *et al.* Analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1032 (1/2) : 109-115.

[5] SJOBERG B, ANDERSTAM B, SULIMAN M, *et al.* Plasma reduced homocysteine and other aminothiol concentrations in patients with CKD[J]. *Am J Kidney Dis*, 2006, 47 (1) : 60-71.

[6] 杨涛,沈高. 高效液相荧光法同时测定人血浆中 4 种硫醇物的浓度[J]. 复旦学报(医学版), 2014, 41 (5) : 679-684.

[7] JUAN G E, MARIA M B, ELISA B G, *et al.* Determination of reduced homocysteine in human serum by elemental labelling and liquid chromatography with ICP-MS and ESI-MS detection[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407 (26) : 7899-7906.

[8] NOLIN T D, MCMENAMIN M E, HIMMELFARB J. Simultaneous

determination of total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, and glutathione in human plasma by high-performance liquid chromatography: application to studies of oxidative stress[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 852 (1/2) : 554-561.

[9] BENKOVA B, LOZANAV V, IVANOV I P, *et al.* Determination of plasma aminothiols by high performance liquid chromatography after precolumn derivatization with with N-(2-acridonyl) maleimide [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 870 (1) : 103-108.

[10] FERIN R, PAVAO M L, BAPTISTA J. Methodology for a rapid and simultaneous determination of total cysteine, homocysteine, cysteinylglycine and glutathione in plasma by isocratic RP-HPLC[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, 911 : 15-20.

[11] PASTORE A, MASSOUD R, MOTTI C, *et al.* Fully automated assay for total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, glutathione, cysteamine, and 2-mercaptopropionylglycine in plasma and urine [J]. *Clin Chem*, 1998, 44 (4) : 825-832.

[12] RUAN Q, CHEN Y, KONG X, *et al.* Comparative studies on sulfhydryl determination of soy protein using two aromatic disulfide reagents and two fluorescent reagents [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61 (11) : 2661-2668.

[13] NERBASS F B, DRAIBE S A, FEITEN S F, *et al.* Homocysteine and its determinants in nondialyzed chronic kidney disease patients[J]. *J Am Diet Assoc*, 2006, 106 (2) : 207-270.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)

(上接第 458 页)

[15] VOLPE J J. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances[J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8 (1) : 110-124.

[16] DAL-PIZZOL F, RITTER C, CASSOL-JR O J, *et al.* Oxidative mechanisms of brain dysfunction during sepsis [J]. *Neurochem Res*, 2010, 35 (1) : 1-12.

[17] 李兰根,伟伟,张玉凤,等. 信号转导/转录激活因子 3 抗 ARPE-19 细胞氧化应激研究[J]. 眼科新进展, 2016, 36 (11) : 1020-1023.

[18] BLOMGREN K, HAGBERG H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40 (3) : 388-397.

[19] 栗志勇,张慧,张婷,等. 丹皮酚对急性心肌梗死大鼠氧化应激和内皮型一氧化氮合酶信号通路的影响[J]. 新乡医学院学报, 2017, 34 (5) : 356-360.

[20] 郭俊国,赵晴,王兴荣,等. 六锐胶囊对葡萄膜炎大鼠血清

SOD、MDA 和 NT-3 含量的影响[J]. 眼科新进展, 2016, 36 (4) : 334-335, 344.

[21] 陈莹恩,杨秀丽,赵奕霖,等. 辛伐他汀对慢性心力衰竭幼兔心肌凋亡及氧化应激机制的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2017, 32 (13) : 1022-1025.

[22] 董志军,陈志宏,李玲娜,等. 丝胶对糖尿病大鼠视网膜氧化应激和微炎症状态的改善作用[J]. 眼科新进展, 2018, 38 (3) : 218-221.

[23] 齐可民,樊超男. n-3 多不饱和脂肪酸与儿童生长发育和健康 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31 (23) : 1761-1765.

[24] 张雯婷. OMEGA-3 多不饱和脂肪酸在新生大鼠脑缺血缺氧损伤中的作用及机制研究[D]. 上海:复旦大学, 2010.

[25] BERMAN D R, MOZURKEWICH E, LIU Y, *et al.* Docosahexaenoic acid augments hypothermic neuroprotection in a neonatal rat asphyxia model[J]. *Neonatology*, 2013, 104 (1) : 71-78.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)