

韩遵华,段森,李清香. 依达拉奉对缺氧缺血性脑病新生大鼠脑水肿及 CD163/HO-1 信号通路的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 34 - 40.

Han ZH,Duan M,Li QX. Influence of edaravone on cerebral edema in neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy and on CD163/HO-1 signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 34 - 40.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.04.006

# 依达拉奉对缺氧缺血性脑病新生大鼠脑水肿及 CD163/HO-1 信号通路的影响

韩遵华,段 森\*,李清香

(贵州省遵义市第一人民医院新生儿科,贵州 遵义 563002)

【摘要】 目的 探究依达拉奉对缺氧缺血性脑病(HIE)新生大鼠脑水肿及 CD163/HO-1 信号通路的影响。方法 7 日龄 SD 新生大鼠 120 只,其中 90 只双结扎左颈总动脉并缺氧制作缺氧缺血性脑损伤(hypoxic ischemic brain damage,HIBD)模型,并随机分为模型组、依达拉奉组,另外 30 只仅穿线不结扎不缺氧作为假手术组。依达拉奉组在造模后立即腹腔注射依达拉奉 2 mg/kg,每日 1 次,连续 5 d;模型组和假手术组分别在同一时间给予腹腔注射等量生理盐水。术后注意观察各组 SD 新生大鼠的生物学行为。造模后 24 h,TTC 染色观察各组 SD 新生大鼠脑组织形态。造模后在 6 h、12 h、24 h、2 d、3 d、5 d 分别检测各组 SD 新生大鼠脑组织含水量变化;荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术检测 CD163、HO-1 mRNA 表达水平;Western blot 技术检测 CD163、HO-1 蛋白表达水平。结果 术后 90 只 SD 新生大鼠出现嗜睡、精神萎靡、抽搐等症状,依达拉奉治疗后症状较模型组明显减轻,3 d 内症状改善。TTC 染色发现造模后 24 h 模型组新生大鼠左脑半球出现水肿、颜色苍白,体积比右半球稍大,依达拉奉治疗后脑组织损伤程度显著降低。模型组、依达拉奉组新生大鼠大脑左半球梗死面积均显著大于假手术组( $P<0.05$ ),依达拉奉治疗后脑梗死面积显著小于模型组( $P<0.05$ )。脑组织含水量检测结果显示:造模后 6 h,模型组、依达拉奉组新生大鼠脑组织含水量均显著高于假手术组( $P<0.05$ ),2 d 时脑含水量最高。依达拉奉治疗后新生大鼠脑组织含水量明显低于模型组( $P<0.05$ )。qRT-PCR 和 Western blot 结果显示,与假手术组相比,模型组、依达拉奉组新生大鼠脑组织 CD163、HO-1 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高( $P<0.05$ ),依达拉奉治疗后新生大鼠 CD163、HO-1 mRNA 和蛋白表达水平显著高于模型组( $P<0.05$ )。结论 依达拉奉能明显减轻 HIBD 新生大鼠脑水肿、脑梗死程度,其机制可能与 CD163/HO-1 信号通路受到活化有关。

【关键词】 依达拉奉;缺血缺氧性脑病;脑水肿;CD163;HO-1;新生儿大鼠

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2019) 04-0034-07

## Influence of edaravone on cerebral edema in neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy and on CD163/HO-1 signaling pathway

HAN Zunhua, DUAN Miao\*, LI Qingxiang

(Department of Neonatology, the First People's Hospital of Zunyi, Zunyi 563002, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the influence of edaravone on cerebral edema in neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) and on the CD163/HO-1 signaling pathway. **Methods** A total of 120 SD neonatal rats (7

[基金项目] 遵义市红花岗区科学技术项目(遵红科合社字(2017)12 号);遵义市联合科技研发资金项目(遵市科合社字(2017)39 号)。

[作者简介] 韩遵华(1969 —),男,副主任医师,研究方向:急性损伤。E-mail: hanzunhua@126.com

[通信作者] 段森(1979 —),女,副主任医师,研究方向:脑损伤。E-mail: weimiao123@163.com

days old) were included here, 90 of which underwent double ligation of the proximal and distal ends the left common carotid artery to establish a hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) model. After ligation and hypoxia the rats were then divided into a model group and an edaravone group. The remaining 30 rats had only separated the common carotid artery without ligation as a sham operation group. The rats in the edaravone group were immediately intraperitoneally injected with 2 mg/kg edaravone after model establishment, once a day for 5 consecutive days. The model group and the sham operation group were given the same amount of saline intraperitoneally at the same time. After operation, the biological behaviors of the neonatal rats were observed. After modeling for 24 h, the morphology of brain tissue in neonatal rats was observed by TTC staining. Changes of the water content in brain tissue of neonatal SD rats were detected at 6, 12, and 24 h, and 2, 3, and 5 days after model establishment. CD163 and HO-1 mRNA expression levels were determined by quantitative fluorescence PCR (qRT-PCR). CD163 and HO-1 protein expression levels were tested using western blotting. **Results** After operation, 90 neonatal rats showed lethargy, malaise, and convulsions. Those symptoms were clearly alleviated after treatment with edaravone compared with those in the model group, and improved within 3 days. At 24 h after model establishment, TTC staining showed that the left hemisphere was edematous and had a pale color in the model group, and also had a slightly larger volume than the right hemisphere. The degree of injury of brain tissue significantly decreased after edaravone treatment. The infarct size in the left hemisphere of the rats in the model group and the edaravone group was significantly greater than that in the sham operation group ( $P < 0.05$ ), and the infarct size in the edaravone-treated group was significantly smaller than that in the model group ( $P < 0.05$ ). At 6 h after modeling, water contents of brain tissue in the model group and edaravone group were significantly higher than that in the sham operation group ( $P < 0.05$ ), and brain water content was the highest at 2 days. The water content in brain tissue of neonatal rats treated with edaravone was significantly lower than that in the model group ( $P < 0.05$ ). qRT-PCR and western blotting showed that CD163 and HO-1 mRNA/protein expression levels in brain tissue of neonatal rats in the model group and edaravone group were significantly increased compared with those in the sham operation group ( $P < 0.05$ ). CD163 and HO-1 mRNA/protein expression levels in neonatal rats were significantly higher than those in the model group after edaravone treatment ( $P < 0.05$ ). **Conclusions**

Edaravone can clearly reduce the degrees of cerebral edema and cerebral infarction in neonatal rats with HIBD. The mechanism behind this may be related to activation of the CD163/HO-1 signaling pathway.

**[Keywords]** edaravone; hypoxic-ischemic encephalopathy; brain edema; CD163; HO-1; neonatal rats

新生儿缺氧缺血性脑病 (hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE) 是新生儿在围生期因缺氧而引起的缺氧缺血性脑损伤 (hypoxic ischemic brain damage, HIBD), 临床上常表现为意识障碍、脑水肿、高颅压、肌张力改变等神经系统症状<sup>[1]</sup>。脑水肿、出血是新生儿 HIE 早期重要的病理变化, 也是导致病情进展和恶化的重要因素<sup>[2]</sup>。清道夫受体蛋白 CD163/HO-1 (heme oxygenase-1) 信号通路在血红蛋白 (haemoglobin, Hb) 分解代谢中起着关键作用, 还具有抗脂质过氧化和抗炎作用<sup>[3-4]</sup>。研究发现, CD163、HO-1 在脑出血所致脑损伤组织中的表达明显升高, 可促进脑水肿吸收, 减轻脑组织损害<sup>[5]</sup>。依达拉奉是一种自由基清除剂, 主要用于治疗脑梗塞急性期患者, 它可通过清除自由基, 避免脂质过氧化, 抑制脑、血管内皮和神经细胞的氧化损伤, 进而缓解脑缺血引起的脑水肿、脑梗塞<sup>[6]</sup>。但依达拉奉是否可用于治疗新生儿 HIE 尚无具体报道。因此, 本研究通过建立新生大鼠 HIBD 模型, 探究依达拉奉对 HIE 新生大鼠脑水肿及 CD163/HO-1 信号

通路的影响, 以期能为依达拉奉临床应用提供理论指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 7 日龄 SD 新生大鼠 11 窝共 120 只, 体重 12~16 g, 雌雄不限, 由重庆第三军医大学野战外科研究所动物室提供 [SCXK (渝) 2012-0001], 饲养于 SPF 级实验室 [SYXK (渝) 2017-0012]。饲养的环境温度:  $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 相对湿度 50% ~ 60%, 光照 12 h / 12 h 明暗交替, 每笼 5 只。实验过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

550D 数码相机 (日本佳能公司), Image J 软件 (National Institutes of Health, 美国); GIS-2020 数码图像分析系统 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。依达拉奉注射液 (规格号: 国药准字 H200502820, 购自南京先声东元制药有限公司), Rat Brain Matrix (Zivic Instruments, USA); 2,3,3-三苯基氯化四氮唑

(TTC, 美国 Sigma-Aldrich 公司); NCBI Primer Blast 设计定量引物序列(由上海生工生物工程有限公司合成); RNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司); 反转录试剂(宝生物大连公司); 实时荧光定量 PCR 仪(Beckman Couhe 公司); 组织蛋白提取试剂(南京凯基生物公司); BCA 法进行蛋白定量(南京建成生物工程研究所); 硝酸纤维素膜(上海基因公司);  $\beta$ -actin 兔抗大鼠 IgG 溶液(美国 Sigma 公司); 二抗稀释液(1:1000 碱磷酶标记山羊抗兔 IgG 溶液, 美国 Sigma 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物模型建立

根据 Rice 等<sup>[7]</sup>方法建立 HIBD 模型, 将 7 日龄 SD 新生大鼠麻醉后, 仰卧固定于手术台, 颈部用 75% 酒精消毒, 于颈部正中切口, 游离左侧颈总动脉并在远、近心端进行双结扎, 缝合伤口并消毒后放回母鼠旁恢复 2 h。然后将新生大鼠放入的缺氧玻璃舱内, 缺氧舱浸泡在 37℃ 恒温水浴中, 同时向舱内不断通入 8%  $O_2$  和 92%  $N_2$  混合气体, 持续缺氧 2 h。最后将新生大鼠放回母鼠处继续喂养。假手术组新生大鼠只游离左侧颈总动脉穿线但不结扎, 缝合伤口后不进行缺氧处理。

#### 1.3.2 分组与给药处理

将术后的 90 只 HIBD 新生大鼠随机分为依达拉奉治疗组(即依达拉奉组)和模型组各 45 只, 另取 30 只新生大鼠行假手术作为假手术组。各组又分为 6 个亚组即 6 h、12 h、24 h、2 d、3 d、5 d 组。将依达拉奉注射液用生理盐水(体积比 1:4)稀释为 0.3 mg/mL, 依达拉奉组在术后立即给予腹腔注射依达拉奉 2 mg/kg, 间隔 24 h 给药 1 次, 连续 5 d。模型组和假手术组给予腹腔注射等量生理盐水。

#### 1.3.3 脑组织标本的处理

各组新生大鼠在术后相应时间点断头取出脑组织, 用 10% 多聚甲醛在室温下固定 24 h, 沿左侧脑组织视交叉处冠切, 做成石蜡包块, 连续冠状切片, 进行相关检测。另取每组新生大鼠左侧脑组织于液氮中冻存, 待标本集齐后进行后续 qRT-PCR 和 Western blot 实验。

#### 1.3.4 2,3,5-三苯基四氮唑一水合物(TTC)染色

造模后 24 h, 各组随机取 4 只新生大鼠断头取出脑组织, 浸泡在 4℃ 0.15 mol/L PBS 中 5 min, 采用 Rat Brain Matrix 沿大脑冠状面进行切片, 切片厚 2 mm; 将切片浸泡在含 2% TTC 的 0.15 mol/L PBS

中, 室温孵育 30 min; 用 4℃ PBS 冲洗两遍后, 于 4℃ 10% 福尔马林缓冲液中避光固定。照相后, 用 Image J 1.8.0 软件测量梗死面积。红色为正常脑组织, 白色为梗死区脑组织。统计参数用梗死面积占同侧脑半球总面积百分比来表示。

#### 1.3.5 脑组织含水量测定

用干湿比重法<sup>[8]</sup>进行测定, 每组新生大鼠在术后时间点处死, 断头开颅后迅速将脑组织取出, 用电子天平称脑组织湿重(精确到 0.1 mg)。然后置于 100℃ 恒温烘箱中 24 h 左右, 待质量恒定后称脑组织干重。按 Elliot 公式, 脑含水量 = (湿重 - 干重) / 湿重  $\times$  100%。脑水肿程度用脑含水量来表示。

#### 1.3.6 qRT-PCR 实验

以  $\beta$ -actin 作为内参基因, 用 NCBI Primer Blast 设计定量引物序列, 引物序列如下:

CD163: 上游引物(5' to 3'): AGCATGGAAGCGGTCTCTGTGATT, 下游引物(5' to 3'): AGCTGACTCATTCCCACGACAAGA。HO-1: 上游引物(5' to 3'): A CCGCCTTCCTGCTCAACAT, 下游引物(5' to 3'): GGGCGTCTCTGCAGAGGTAG。 $\beta$ -actin: 上游引物(5' to 3'): TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT, 下游引物(5' to 3'): CACGATGGAGGGGCCGGA CTCATC。

取出每组液氮冻存的脑组织, 利用 Trizol 法提取 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 并用紫外分光光度计检测其纯度及浓度。取 1  $\mu$ g 总 RNA, 用反转录试剂合成 cDNA。合成 cDNA 第一链后, 取 5  $\mu$ L cDNA(稀释 20 倍)为模板, 加入 10  $\mu$ L 2 $\times$ SYBR Green qPCR Super Mix、0.5  $\mu$ L GAPDH(或 CD163、HO-1)上下游引物、4.0  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L, 在实时荧光定量 PCR 仪上扩增。反应条件: 预变性 95℃ 30 s; 扩增 40 个循环 95℃ 5 s, 60℃ 35 s。实验进行 3 次生物学重复。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法分析 qRT-PCR 结果,  $\Delta CT = CT_{\text{目的基因}} - CT_{\text{内参基因}}$ ,  $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{目的基因}} - \Delta CT_{\text{内参基因}}$ 。

#### 1.3.7 Western blot 分析

取每组大鼠脑组织充分研磨, 用组织蛋白提取试剂常规提取蛋白。每组取 4  $\mu$ L 蛋白样品, 用 BCA 法进行蛋白定量, 调节好蛋白浓度; 将蛋白样品与等体积 2 $\times$  SDS 缓冲液混合后加热变性; 接着通过 SDS-PAGE 电泳分离上清液; 把分离的蛋白质转印到硝酸纤维素膜上; 将膜洗涤后在 5% 牛血清蛋白溶液中室温封闭 1 h; 洗涤后将膜置于一抗稀释液(1:100 的 CD163、HO-1、 $\beta$ -actin 兔抗大鼠 IgG 溶液中, 4℃ 孵育

过夜;次晨将膜快速清洗后,转移到二抗稀释液中,在室温下孵育 2 h;清洗后用新配制的显色液进行显色,待出现清晰的条带后终止;最后使用 GIS-2020 数码图像分析系统扫描并分析蛋白杂交条带。

1.4 数据统计分析

本研究利用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理,用平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,计量资料采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析;以 *P*<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SD 新生大鼠模型行为观察

术前所有 SD 新生大鼠生物学行为正常。术后模型组和依达拉奉组新生大鼠在低氧舱中 10~15 min 后开始出现烦躁不安;缺氧 30 min 后呼吸频率加快,不能站稳,翻滚,逐渐出现全身震颤,不能翻身,夹尾左旋;1 h 后出现嗜睡,不爱活动,精神萎靡,少数出现抽搐情况,均未死亡,呈现先兴奋后抑制行为。假手术组新生大鼠的行为无明显异常。造模后置于正常环境,发现模型组新生大鼠症状逐渐加重,2~3 d 时最为严重,6~7 d 时症状减轻;依达拉奉治疗后症状也加重,2 d 时最为严重,但较模型组明显减轻,3 d 内症状改善。

2.2 SD 新生大鼠脑组织形态观察

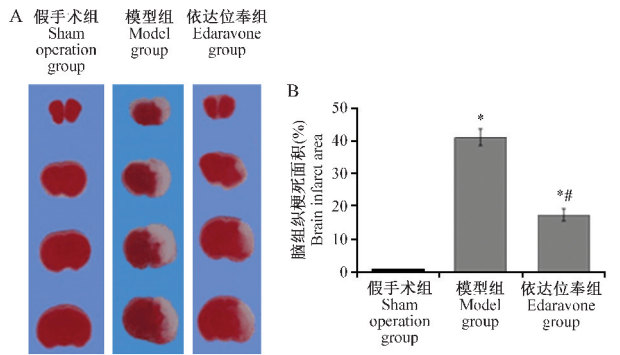
TTC 染色结果发现,造模后 24 h 模型组新生大鼠大脑左半球皮层、海马、纹状体等区域出现水肿、颜色苍白,左半球体积比右半球稍大,而依达拉奉治疗后脑组织损伤程度显著降低。结果见图 1A。经定量分析发现,与假手术组相比,模型组和依达拉奉组新生大鼠大脑左半球梗死面积均显著增加(*P*<0.05)。与模型组相比,依达拉奉治疗后脑梗死面积显著减小(*P*<0.05)。结果见图 1B。

2.3 SD 新生大鼠脑组织含水量变化

术后 6 h,与假手术组相比,模型组、依达拉奉组新生大鼠脑组织含水量均明显升高(*P*<0.05),2 d 时脑含水量最高。依达拉奉治疗后新生大鼠脑组织含水量明显低于模型组(*P*<0.05)。结果见表 1。

2.4 SD 新生大鼠脑组织 CD163、HO-1 mRNA 表达水平

qRT-PCR 结果显示,与假手术组相比,模型组、依达拉奉组新生大鼠脑组织 CD163、HO-1 mRNA 表达水平均显著升高(*P*<0.05),在 24 h 时,CD163 mRNA 表达水平达到最高随后趋于平稳,而 HO-1 mRNA 表达水平达到最高时逐渐下降。但依达拉奉治疗后新生大鼠 CD163、HO-1 mRNA 表达水平显著高于模型组(*P*<0.05)。结果见图 2。



注:A:各组典型脑梗死图片。B:各组脑组织梗死面积。与假手术组相比,\**P*<0.05;与模型相比,#*P*<0.05。

图1 造模后 24 h 各组 SD 新生大鼠脑梗死情况(*n*=4)

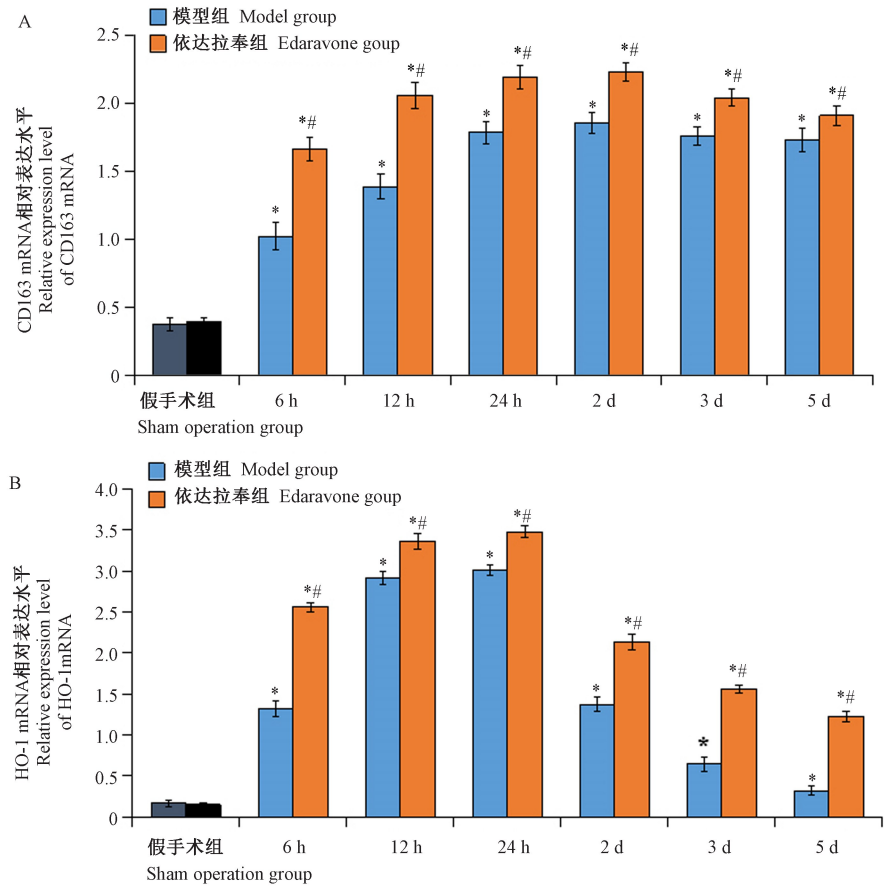
Note. A, Typical pictures of brain infarct in each group. B, Brain infarct area of each group. Compared with the sham operation group, \**P*<0.05. Compared with model group, #*P*<0.05.

Figure 1 Infarct size of each group of neonatal rats at 24 h after model establishment

表1 各组 SD 新生大鼠在不同时间点脑组织含水量变化( $\bar{x} \pm s$ , %, *n*=6)  
Table 1 Changes of water content in brain tissue of the neonatal rats at different time points

| 时间点<br>Time point | 假手术组<br>Sham operation group | 模型组<br>Model group | 依达拉奉组<br>Edaravone group |
|-------------------|------------------------------|--------------------|--------------------------|
| 6 h               | 64.32±0.85                   | 69.17±0.93 *       | 67.56±1.24 *#            |
| 12 h              | 64.89±1.25                   | 73.88±1.03 *       | 68.81±0.94 *#            |
| 24 h              | 65.28±0.96                   | 76.33±1.08 *       | 71.96±0.93 *#            |
| 2 d               | 65.17±0.78                   | 81.89±0.93 *       | 76.13±0.69 *#            |
| 3 d               | 65.02±1.57                   | 80.70±1.35 *       | 73.83±0.82 *#            |
| 5 d               | 64.97±0.91                   | 76.98±0.86 *       | 69.59±1.15 *#            |

注:与假手术组相比,\**P*<0.05;与模型组相比,#*P*<0.05。  
Note. Compared with the sham operation group, \**P*<0.05. Compared with the model group, #*P*<0.05.



注:A:CD163 mRNA 表达变化。B:HO-1 mRNA 表达变化。与假手术组相比,\* $P<0.05$ ;与模型相比,# $P<0.05$ 。以  $\beta$ -actin 作为内参基因。

图 2 各组新生大鼠不同时间点脑组织 CD163、HO-1 mRNA 表达变化( $n=6$ )

Note. A, The expressing of CD163 mRNA. B, The expressing of HO-1 mRNA. Compared with the sham operation group, \* $P<0.05$ . Compared with the model group, # $P<0.05$ .

Figure 2 Changes of the expression of CD163 and HO-1 mRNA in each group of the neonatal rats at different time points

2.5 SD 新生大鼠脑组织 CD163、HO-1 蛋白表达水平

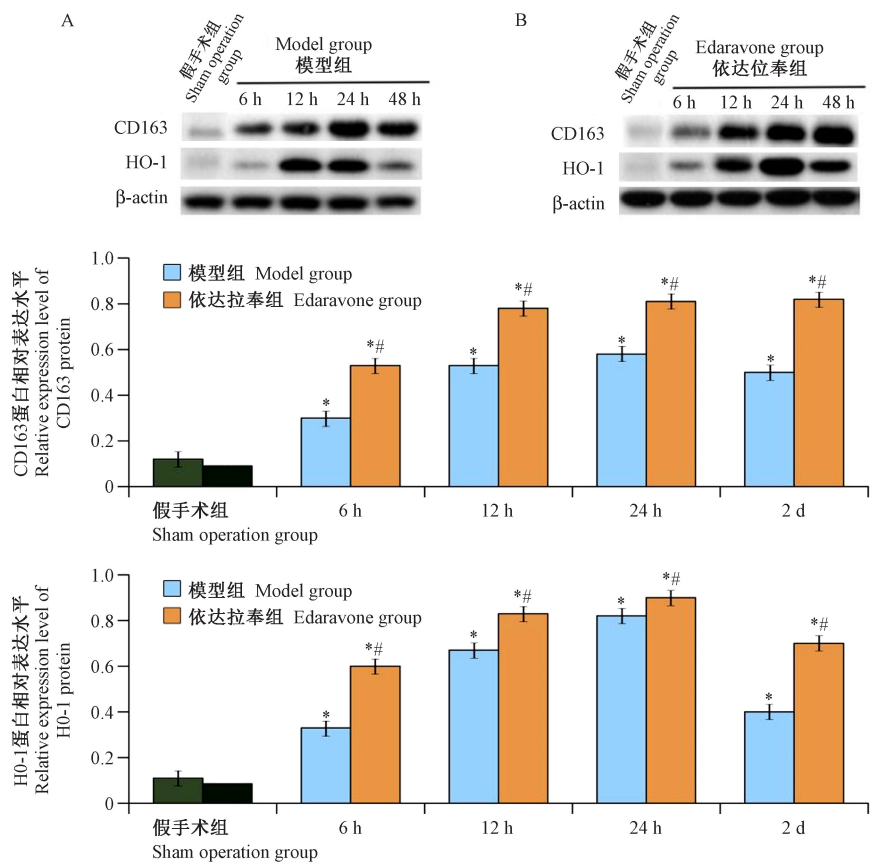
Western blot 结果显示,与假手术组相比,模型组、依达拉奉组新生大鼠脑组织 CD163、HO-1 蛋白表达水平均显著升高( $P<0.05$ ),依达拉奉治疗后,新生大鼠 CD163、HO-1 蛋白表达水平显著高于模型组( $P<0.05$ ),与 qRT-PCR 结果一致。结果见图 3。

3 讨论

新生儿 HIE 是围生期的常见病,其发病率仅次于新生儿黄疸和肺炎,易造成新生儿死亡,且幸存者常伴有智力低下、脑瘫、癫痫等神经系统后遗症<sup>[8-11]</sup>。研究发现脑组织缺氧缺血后,花生四烯酸被环加氧酶、脂氧化酶氧化是引起脑损伤的初步反应,进一步导致氧自由基、一氧化氮、炎症因子等产生增加,胞膜脂质被过度氧化,膜上离子泵遭到破

坏,钠离子、钙离子、水分子等进入胞内,导致神经细胞水肿、凋亡以及坏死<sup>[12-13]</sup>。新生儿 HIE 目前尚无既安全又有效的治疗手段,因此根据其发病机理寻找新的治疗药物尤为重要。

依达拉奉是临床常用的脑保护剂,其在治疗急性脑梗死、脑出血及其相关疾病具有很好的疗效,它可通过清除自由基防止脂质过氧化;保护脑组织、血管内皮免受氧化损伤,从而减轻脑缺血引起的脑水肿、脑梗塞<sup>[14-15]</sup>,故在理论上它能够治疗新生儿 HIE。本研究参照 Rice 等<sup>[7]</sup> HIBD 模型经典创建方法,选用与新生儿神经发育类似的 7 日龄新生大鼠,术后缺氧过程中新生大鼠出现呼吸加快、发绀、站立不稳,随后新生大鼠行为能力发生障碍,夹尾旋转;显微镜观察发现结扎侧大脑形态异常,出现脑含水量增加,脑组织肿胀,脑梗死等。与前人造模结果<sup>[7]</sup>一致。经依达拉奉治疗 HIBD 新生大鼠



注:与假手术组相比, \*  $P < 0.05$ 。与模型组相比, #  $P < 0.05$ 。

图 3 各组新生大鼠不同时间点脑组织 CD163、HO-1 蛋白表达变化 ( $n = 6$ )

Note. Compared with the sham operation group, \*  $P < 0.05$ . Compared with the model group, #  $P < 0.05$ .

Figure 3 Changes of the expression of CD163 and HO-1 proteins in each group of the neonatal rats at different time points

后,上述行为学症状明显改善;模型组新生大鼠大脑左侧脑含水量显著增加,脑肿胀程度严重,梗死区域较大,而依达拉奉治疗后左侧脑含水量显著减少,脑肿胀程度减轻,梗死面积显著减小,说明依达拉奉治疗能明显减轻 HIBD 新生大鼠脑水肿、脑梗死程度。

研究发现,缺氧缺血脑损伤组织中 CD163、HO-1 的表达明显增加<sup>[16-17]</sup>。CD163 属于富半胱氨酸清道夫受体家族 (SRCR) 成员,通常分布于单核-巨噬细胞膜表面,在单核细胞发育成巨噬细胞过程中,其表达持续上升。小胶质细胞在生理条件下不表达 CD163,在受到 Hb 刺激后才开始表达 CD163。血浆中 Hb 的主要结合蛋白是触珠蛋白 (Hp), Hb-Hp 结合物能被单核或巨噬细胞膜上 CD163 受体摄入胞内,其在内质体中分解为强氧化物——血红素,其生成后可由内质体转移至溶酶体,血红素氧化酶 (HO) 可催化其代谢为亚铁离子、一氧化碳以及胆绿素,血红素具有很强的神经毒性,易造成继

发性脑损伤。HO 包括两种亚型:HO-1 和 HO-2,脑损伤后 HO-1 在神经系统起关键作用,因此脑损伤后 CD163/HO-1 途径为 Hb 分解代谢的重要途径<sup>[18-19]</sup>。在正常生理条件下,每天约 10% 红细胞发生退化,退化红细胞内的 Hb 可通过 CD163/HO-1 途径分解清除。然而,在病理条件下,CD163/HO-1 途径分解 Hb 的作用加强,CD163、HO-1 在脑损伤引起的脑水肿组织中的表达明显增加<sup>[20]</sup>。此外,CD163 还具有抗脂质过氧化、抗炎作用<sup>[21]</sup>。因此,本研究通过双结扎新生大鼠左颈总动脉并缺氧制作 HIBD 模型,比较依达拉奉治疗组和模型组中脑水肿组织周围 CD163 与其下游蛋白 HO-1 的转录和蛋白表达变化,对依达拉奉治疗与脑水肿组织 CD163、HO-1 转录和蛋白表达的相关性做了基本的研究和探讨。本研究结果显示模型组、依达拉奉组新生大鼠脑组织中 CD163、HO-1 的表达水平显著高于假手术组,而且依达拉奉治疗后新生大鼠脑组织中 CD163、HO-1 的转录和蛋白表达水平明显高于模

型组,说明依达拉奉可能通过激活 CD163/HO-1 信号通路来减轻 HIBD 新生大鼠脑水肿、脑梗死程度。这充实了 CD163/HO-1 途径在缺氧缺血脑损伤方面实验研究,为依达拉奉临床治疗新生儿 HIE 提供了实验依据和理论指导。

模型组新生大鼠脑损伤组织中 CD163、HO-1 mRNA 和蛋白表达水平显著增加;依达拉奉治疗后新生大鼠脑组织中 CD163、HO-1 的转录和蛋白表达水平明显增高,且依达拉奉治疗能明显减轻 HIBD 新生大鼠脑水肿、脑梗死程度。新生儿 HIE 发生发展的相关因素很多、相关机制复杂,依达拉奉最终在临床上能否治疗新生儿 HIE,还需继续深入的研究。

#### 参考文献:

- [1] 徐恒昀,曹和涛,徐金标. 新生儿缺血缺氧性脑病 CT 及 MRI 诊断比较[J]. 中国超声医学杂志,2015,13(1):32-35.
- [2] Zhu XY, Ye MY, Zhang AM, et al. Influence of one-year neurologic outcome of treatment on newborns with moderate and severe hypoxic-ischemic encephalopathy by rhuEPO combined with ganglioside (GM1)[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2015, 19(20):3955-3960.
- [3] Sierra-Filardi E, Vega MA, Sánchezmateos P, et al. Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release [J]. Immunobiology, 2010, 215(9-10):788-795.
- [4] Harteman J, Nikkels PG, Benders MJ, et al. Placental pathology in full-term infants with hypoxic-ischemic neonatal encephalopathy and association with magnetic resonance imaging pattern of brain injury[J]. J Pediatr, 2013, 163(4):968-995.
- [5] 刘宝华,白光辉,邬伟,等. 大鼠脑出血后 IL-1 $\beta$  和 CD163/HO-1 信号通路表达及其与脑水肿的相关性[J]. 浙江创伤外科, 2014, 19(3):348-350.
- [6] 张俊英. 丹红注射液联合依达拉奉治疗急性脑梗死的临床研究[J]. 中国医药科学, 2016, 6(5):222-224.
- [7] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat [J]. Ann Neurol, 1981, 9(2):131-141.
- [8] 刘俐,霍丽琴,张峰,等. 模糊 BP 神经网络在新生儿 HIE 早期诊断中的应用研究[J]. 生物医学工程杂志, 2011, 28(4):814-818.
- [9] 路军,叶启先,钟严艳. 高压氧联合亚低温治疗中重度新生

儿 HIE 的临床分析[J]. 中国计划生育学杂志,2015, 23(5): 334-336.

- [10] 潘兆军,周利,高子波,等. 头部亚低温治疗新生儿 HIE 的临床疗效分析[J]. 中国妇幼健康研究, 2016, 27(12):1494-1497.
- [11] 段森,曹云涛,王旭芹,促红细胞生成素在缺氧缺血性脑病大鼠模型中的神经保护作用[J]. 中国比较医学杂志, 2018(01):28-32.
- [12] Kojima, Toshio, Ueda, et al. Comprehensive gene expression analysis of cerebral cortices from mature rats after neonatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. J Mol Neurosci, 2013, 49(2):320-327.
- [13] Chun PT, Mcpherson RJ, Marney LC, et al. Serial plasma metabolites following hypoxic-ischemic encephalopathy in a nonhuman primate model[J]. Dev Neurosci, 2015, 37(2):161-171.
- [14] 李平,汪波.依达拉奉联合溶栓治疗急性脑梗死的疗效及对氧自由基清除效果的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(28):49-52.
- [15] 肖桂荣,王赵伟,朱仁洋,等.丁苯酞注射液联合依达拉奉治疗急性脑梗死的疗效观察[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2016, 23(1):51-54.
- [16] Merchant NM, Azzopardi DV, Edwards AD. Neonatal hypoxic ischaemic encephalopathy: current and future treatment options [J]. Expert Opin Orphan Drugs, 2015, 3(4):357-377.
- [17] 祝大丽,何平,朱萍,等.三七总皂甙对新生鼠窒息致脑损伤时细胞凋亡及 HO-1 表达的影响[J]. 中国妇幼保健,2015,30(13):2083-2086.
- [18] Liu B, Hu B, Shao S, et al. CD163/hemoglobin oxygenase-1 pathway regulates inflammation in hematoma surrounding tissues after intracerebral hemorrhage [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2015, 24(12):2800-2809.
- [19] 王春燕,李锦玉,李志强,等.慢性心衰病人血红蛋白清道夫受体 CD163 表达及其与心功能的关系[J].中西医结合心脑血管病杂志,2017, 15(3):327-331.
- [20] Gutiérrez E, Egido J, Rubio-Navarro A, et al. Oxidative stress, macrophage infiltration and CD163 expression are determinants of long-term renal outcome in macrohematuria-induced acute kidney injury of IgA nephropathy[J]. Nephron Clin Pract, 2012, 121(1-2):42-53.
- [21] Caglar C, Cosar AM, Merve G, et al. Hepatopulmonary syndrome and liver transplantation: a recent review of the literature[J]. J Clin Transl Hepatol, 2016, 4(1):47-53.

[收稿日期]2018-09-30