

· 实验研究 ·

下丘脑神经生长因子前体对心肺转流大鼠室旁核场电位的影响

程翹 刘程曦 石福 杨振宇 王海英 徐军美 喻田

【摘要】 目的 探讨下丘脑神经生长因子前体(nerve growth factor precursor, proNGF)在大鼠心肺转流(CPB)过程中的改变以及可能对交感输出产生的作用。**方法** 雄性 SD 大鼠 42 只,3~4 月龄,体重 350~500 g。其中 18 只建立大鼠 CPB 模型,将大鼠分为三组:对照组、CPB 组和心肌缺血-再灌注组(IR 组)。CPB 110 min 后,取大鼠下丘脑和心脏节段背根神经节,检测 NGF mRNA 表达量以及 proNGF 蛋白含量。另选取 12 只大鼠双侧室旁核(PVN)插管,连续 7 d 注入 proNGF 蛋白,检测并记录延髓头端腹外侧区(RVLM)场电位。另选取 12 只大鼠侧脑室注入 proNGF 蛋白,检测并记录给药前后 PVN 场电位;PVN 场电位记录结束后,检测下丘脑谷氨酸以及 γ -氨基丁酸(GABA)含量。**结果** 与对照组比较,CPB 末 CPB 组、IR 组 proNGF 蛋白含量明显升高($P < 0.05$),DRG 以及下丘脑 NGF mRNA 表达量明显升高($P < 0.05$)。注入 proNGF 蛋白后,RVLM 以及 PVN 场电位 1~4 Hz 频段能量明显下降,其余频段能量明显升高($P < 0.05$);侧脑室注入 proNGF 对下丘脑谷氨酸无明显影响,但明显降低 GABA 含量($P < 0.05$)。**结论** 大鼠 CPB 后下丘脑 proNGF 表达增加,可能参与下丘脑交感输出改变。

【关键词】 神经生长因子前体;心肺转流;场电位;交感输出

Effect of hypothalamic nerve growth factor precursor on field potential of paraventricular nucleus during rat cardiopulmonary bypass CHENG Chi, LIU Chengxi, SHI Fu, YANG Zhenyu, WANG Haiying, XU Junmei, YU Tian. Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China

Corresponding author: YU Tian, Email: zyyutian@126.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of cardiopulmonary bypass (CPB) on the expression of hypothalamic nerve growth factor precursor (proNGF) and the influence of hypothalamic proNGF on the sympathetic output of paraventricular nucleus. **Methods** Forty-two male SD rats, aged 3 - 4 months, weighing 350 - 500 g, were divided into control group, CPB group and ischemia reperfusion (IR) group. At the end of CPB for 110 min, hypothalamus and dorsal root ganglion (DRG) were taken to measure the levels of proNGF mRNA and hypothalamic proNGF protein. Mini pipe was put into bilateral paraventricular nucleus (PVN) and human recombination proNGF protein was injected into PVN for 7 d before the local field potentials (LFP) of RVLM was recorded. Human recombination proNGF protein was administrated into lateral ventricle, the prior-administration-LFP of PVN and post-administration -LFP were recorded and compared. At the end of the experiment, hypothalamus was taken to measure the levels of glutamate and gamma amino butyric acid (GABA). **Results** Hypothalamic proNGF protein in CPB group and IR group was higher than that in the control group ($P < 0.05$); NGF mRNA of hypothalamus and DRG in CPB and IR group were higher than those of control group ($P < 0.05$). In PVN and RVLM, after the administration of proNGF protein, the power of delta band significantly decreased and other bands increased ($P < 0.05$). The hypothalamic GABA level decreased ($P < 0.05$) with no change of hypothalamic glutamate after proNGF was injected into lateral ventricle. **Conclusion** CPB increases the expression of proNGF in the hypothalamus contributing to the changes of hypothalamic sympathetic output.

【Key words】 Nerve growth factor precursor; Cardiopulmonary bypass; Local field potential; Sympathetic output

DOI: 10.12089/jca.2019.02.015

基金项目:国家自然科学基金(81660051);贵州省教育厅自然科学研究项目[黔科合 KY 字(2015)440 号];遵义市红花岗区科学技术项目[遵红科合社字(2015)13 号]

作者单位:563003 遵义医学院附属医院麻醉科(程翹、王海英、喻田);遵义医科大学器官保护及全麻机制重点实验室(刘程曦、石福、杨振宇);中南大学湘雅二医院麻醉科(徐军美)

通信作者:喻田,Email: zyyutian@126.com

心脏手术最常见的并发症是心律失常,其中房颤最常见。目前术后房颤的发生机制仍未明了。前期研究发现,心肺转流(CPB)后心脏交感神经活性增高^[1],心脏术后交感神经活性增加是术后房颤的原因之一^[2]。既往研究发现,促炎因子在急性心肌梗死大鼠室旁核(PVN)内蓄积,脑内的促炎因子增加有助于增加交感神经活性。相反地,抑制脑内促炎因子合成可以减轻心力衰竭时的交感过度兴奋^[3]。神经生长因子前体(nerve growth factor precursor, proNGF)在许多器官中都有助于炎症反应发生,有学者认为 proNGF 作为一种细胞因子参与炎症性疾病^[4-6]。因此,本研究探讨 CPB 对下丘脑 proNGF 的影响以及 proNGF 对交感输出的作用。

材料与方法

实验材料与仪器 人重组 proNGF 蛋白(prospec, cyt-426,以色列);记录电极(A-M system,575579,美国);家兔型膜式氧合器;蠕动泵(YZ15-13A);小动物呼吸机(ALC-V8);生物信号采集处理系统(MD3000);体温维持仪(69001);ELISA 试剂盒。

实验动物 雄性 SD 大鼠 42 只,3~4 月龄,体重 350~500 g,由第三军医大学大坪医院医学实验动物中心提供[SCXK(渝)2012-0005]。

CPB 模型的建立 10%水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射,麻醉生效后,将大鼠固定在大鼠固定器上。利用可视喉镜经气管插管(16 G 套管针)后,连接小动物呼吸机进行机械通气,RR 60 次/分,VT 3 ml/kg,I:E 1:1.5。分离右颈静脉,置管(14 G 套管针)后妥善固定。术中持续监测动脉血压。剪断右侧胸壁第 2~4 肋骨,分离主动脉,并在主动脉下放置较粗的线,心肌缺血时结扎主动脉根部。静脉血流入一 20 ml 注射器内,与家兔型膜式氧合器连接,通过蠕动泵经右股动脉回输入体。准备工作完成后,于尾静脉注入肝素 300 IU/kg。CPB 开始时调整颈静脉置管的位置,寻找最佳的引流位置。灌注流量逐渐增大,目标为 $100 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。CPB 过程中若 MAP < 60 mmHg,增大灌注流量,使其 $\geq 60 \text{ mmHg}$,灌注后将灌注压调为 $100 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。CPB 过程中使用加热毯,头顶灯使肛温保持 $(32.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。心肌缺血时肛温维持在 30°C 左右。CPB 过程中气血比 1:1。

选取 18 只大鼠随机分为三组:对照组、CPB 组和 CPB 心肌缺血-再灌注组(IR 组),每组 6 只。对照组行气管插管,动静脉置管以及开胸术,不接受

CPB;CPB 组持续 CPB 110 min;IR 组 CPB 10 min 后夹闭主动脉根部 40 min,总 CPB 时间 110 min。CPB 结束后迅速取材(下丘脑和心脏节段背根神经节)检测 NGF mRNA 表达量以及下丘脑 proNGF 蛋白含量。

PVN 插管模型的建立和延髓头端腹外侧区(PVLM)场电位 选取 12 只大鼠,10%水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射麻醉后,将大鼠固定于脑立体定位仪上。用宠物剃毛机将头部鼠毛剃除,1%利多卡因局部浸润后,于颅顶减去一小块毛皮,再用双氧水反复摩擦颅骨直至骨性标志暴露清楚。调平 Bregma 点和 Lambda 点。按照脑立体定位图谱定位,PVN 坐标为:前囟后 -1.5 mm,中线旁开 0.5 mm,深度 7.9 mm。所有 SD 大鼠双侧 PVN 置管。

3 d 后,大鼠随机分为 proNGF 组以及 NS 组,连续给药 7 d。proNGF 组连续双侧 PVN 注入人重组 proNGF 蛋白(100 ng/ml)200 nl,NS 组给相同体积的生理盐水。第 8 天记录模型大鼠延髓头端腹外侧区(RVLM)场电位,RVLM 坐标为:前囟后 12 mm,中线旁开 2.2 mm,深度 10.2 mm。大鼠均无术后感染。

侧脑室给药记录 PVN 场电位 另选 12 只大鼠,定位方法同上。侧脑室(坐标为:前囟后 0.72 mm,中线旁开 1.85 mm,深度 4 mm)及 PVN 定位后,先将记录电极插入至 PVN 处,并记录 PVN 场电位 10 min 后,侧脑室注入人重组 proNGF 蛋白(100 ng/ml)5 μl 。将针头保留 10 min 后,拔出,记录 PVN 场电位 10 min。对比给药前后 PVN 场电位。

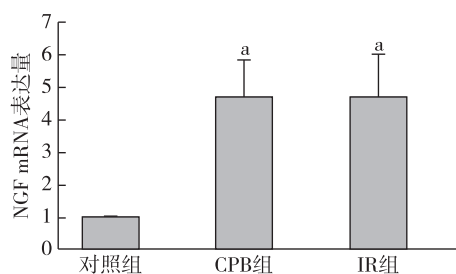
下丘脑谷氨酸以及 γ -氨基丁酸(GABA)检测 PVN 场电位记录结束后,检测下丘脑谷氨酸以及 GABA 含量。标本统一按照试剂盒说明书检测。

统计分析 采用 SPSS 17.0 进行统计处理。场电位数据处理主要采用 spike2 软件作离线分析。所得数据先行正态性检验,正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,给药前后比较采用配对 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

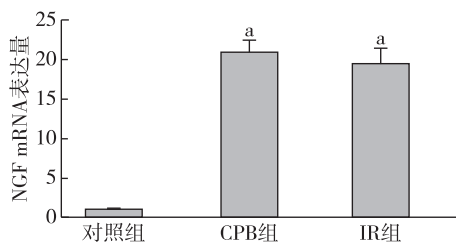
下丘脑和心脏节段背根神经节 NGF mRNA 表达量 与对照组比较,CPB 组、IR 组 NGF mRNA 表达量明显升高($P < 0.05$)。CPB 组与 IR 组 NGF mRNA 表达量差异无统计学意义(图 1—2)。

下丘脑 proNGF 蛋白含量 与对照组比较,CPB



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

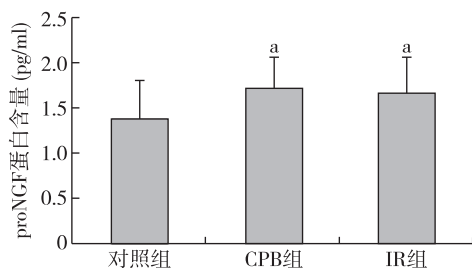
图1 三组大鼠下丘脑 NGF mRNA 表达量的比较



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

图2 三组大鼠心脏节段 DRG NGF mRNA 表达量的比较

组和 IR 组 proNGF 蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$)。CPB 组与 IR 组 proNGF 蛋白含量差异无统计学意义(图3)。

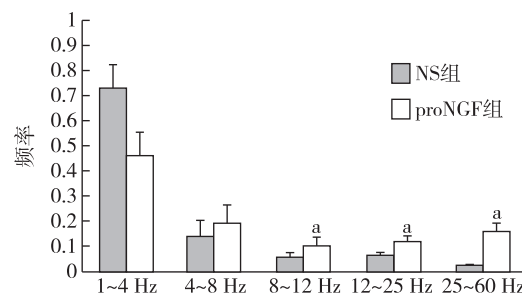


注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

图3 三组大鼠下丘脑 proNGF 蛋白含量的比较

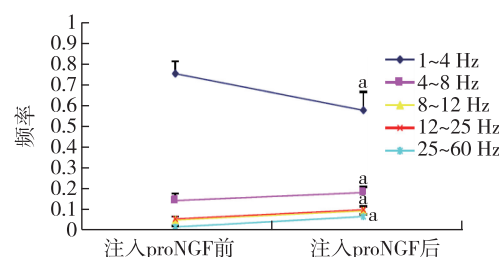
PVN 连续注 proNGF 7 d 后 RVLM 场电位 与 NS 组比较, proNGF 组 1~4 Hz 的能量明显降低 (45.91% vs 72.79%) ($P < 0.05$), 8~12 Hz (4.97% vs 9.54%), 12~25 Hz (5.43% vs 11.09%) 以及 25~60 Hz (1.76% vs 15.02%) 的能量明显升高 ($P < 0.05$), 4~8 Hz 的能量升高 (13.72% vs 18.44%) (图4)。

急性侧脑室注入 proNGF 后 PVN 场电位 侧脑室注入 proNGF 后, 1~4 Hz 的能量明显降低 (75.57% vs 57.87%) ($P < 0.05$), 而 4~8 Hz (13.70% vs 17.96%), 8~12 Hz (4.58% vs 8.66%) 以及 25~60 Hz (1.20% vs 6.28%) 的能量明显升高 ($P < 0.05$), 12~25 Hz (4.77% vs 9.23%) 的能量升高 ($P = 0.065$) (图5)。



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

图4 两组大鼠 RVLM 不同频段场电位频率的比较



注:与注入 proNGF 前比较,^a $P < 0.05$

图5 侧脑室注入 proNGF 前后 PVN 场电位频率的比较

急性侧脑室注药后下丘脑谷氨酸以及 GABA 含量 侧脑室内注入 5 μ l 人重组 proNGF (100 ng/ml) 后, 下丘脑内谷氨酸含量没有改变, 而 GABA 含量明显降低 ($P < 0.05$) (图6—7)。

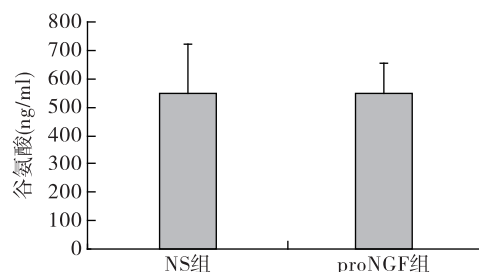
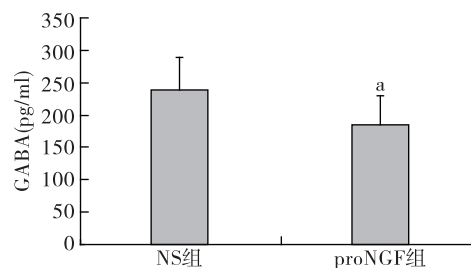


图6 侧脑室注入 proNGF 后下丘脑谷氨酸含量的比较



注:与 NS 组比较,^a $P < 0.05$

图7 侧脑室注入 proNGF 后下丘脑 GABA 含量的比较

讨 论

本实验结果提示,CPB 后下丘脑 proNGF mRNA 和蛋白表达上调。其原因可能是神经生长因子(NGF)代谢途径障碍。既往研究发现许多类型的脑损伤(应激,缺血,癫痫,低血糖等)诱导中枢神经系统中 NGF mRNA 表达的改变^[7-8]。NGF 合成分泌是通过剪切 proNGF 得到的,在细胞内通过福林蛋白酶剪切,而在细胞外则是通过金属蛋白酶-7 剪切。在氧化应激和炎症情况下,蛋白酶活性改变,导致 proNGF 在神经元和组织中蓄积^[4, 9]。而 CPB 过程中,氧化应激以及炎症是主要的病理生理改变机制。因此推测 CPB 过程中,proNGF 蓄积于下丘脑以及心脏是由于负责剪切 proNGF 的酶活性发生改变。本研究结果提示脊髓背根神经节内 NGF mRNA 显著增加。由于受到标本量的限制,本实验没有检测蛋白含量变化。在伤害性刺激或者炎症时,NGF 可以使感觉神经和交感神经反应敏化^[10]。大鼠心肌梗死后,脊髓神经阻滞可以显著降低心脏节段背根神经节内 NGF mRNA,这说明背根神经节感觉神经元内 NGF 增加与心肌伤害性刺激传入有关^[11]。因此本实验结果提示 CPB 过程中,背根神经节内 NGF mRNA 的表达增加可能与传递心脏伤害性刺激有关。

PVN 是交感神经活性的重要整合部位,PVN 是通过对 RVLM 和中间外侧柱(IML)的投射来控制交感神经活动的重要整合位点,而且参与高血压和心衰时交感神经激活。本研究发现 RVLM 以及 PVN 场电位出现 δ 震荡,急性注入 proNGF 以及慢性注入 proNGF 都对交感神经高级中枢核团场电位产生影响,即低频段的能量减少,而高频段的能量增加。PVN 场电位的研究较少,因此尚不清楚 PVN 场电位各个频段的能量改变所代表的意义。然而 proNGF 注入侧脑室后,GABA 减少,而谷氨酸没有改变(GABA/谷氨酸减小)。高血压时 PVN 内兴奋性谷氨酸活性增加以及 GABA 能活性减低。谷氨酸可以兴奋交感输出,而 PVN 内的 GABA 是抑制交感活性的主要神经递质,PVN 交感输出的最终整合取决于谷氨酸和 GABA 之间的平衡^[12-13]。因此结合场电位和 GABA/谷氨酸结果,proNGF 可能增加下丘脑交感输出。

综上所述,CPB 导致下丘脑内 proNGF 蓄积,proNGF 可以通过减少 GABA 含量增加 PVN 内神经元活性,进而增加交感输出。

参 考 文 献

- [1] Cheng C, Xu JM, Yu T. Neutralizing IL-6 reduces heart injury by decreasing nerve growth factor precursor in the heart and hypothalamus during rat cardiopulmonary bypass. *Life Sci*, 2017, 178: 61-69.
- [2] Kalman JM, Munawar M, Howes LG, et al. Atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting is associated with sympathetic activation. *Ann Thorac Surg*, 1995, 60(6): 1709-1715.
- [3] Wei SG, Yu Y, Weiss RM, et al. Inhibition of brain mitogen-activated protein kinase signaling reduces central endoplasmic reticulum stress and inflammation and sympathetic nerve activity in heart failure rats. *Hypertension*, 2016, 67(1): 229-236.
- [4] Mysona BA, Matragoon S, Stephens M, et al. Imbalance of the nerve growth factor and its precursor as a potential biomarker for diabetic retinopathy. *BioMed Res Int*, 2015, 2015:571456.
- [5] Mysona BA, Al-Gayyar MM, Matragoon S, et al. Modulation of p75^{NTR} prevents diabetes- and proNGF-induced retinal inflammation and blood-retina barrier breakdown in mice and rats. *Diabetologia*, 2013, 56(10): 2329-2339.
- [6] Mohamed R, Coucha M, Elshaer SL, et al. Inducible overexpression of endothelial proNGF as a mouse model to study microvascular dysfunction. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(3): 746-757.
- [7] Greenwood SG, Montroull L, Volosin M, et al. A novel neuroprotective mechanism for lithium that prevents association of the p75^{NTR}-sortilin receptor complex and attenuates proNGF-induced neuronal death in vitro and in vivo. *eNeuro*, 2018, 5(1).
- [8] Givalois L, Naert G, Rage F, et al. A single brain-derived neurotrophic factor injection modifies hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis activity in adult male rats. *Mol Cell Neurosci*, 2004, 27(3): 280-295.
- [9] Hempstead BL. Commentary: regulating proNGF action: multiple targets for therapeutic intervention. *Neurotox Res*, 2009, 16(3): 255-260.
- [10] Lu J, Xing J, Li J. Role for NGF in augmented sympathetic nerve response to activation of mechanically and metabolically sensitive muscle afferents in rats with femoral artery occlusion. *J Appl Physiol* (1985), 2012, 113(8): 1311-1322.
- [11] Guo Z, Yue W. Alteration of nerve growth factor in dorsal root ganglia at early time of acute myocardial infarction and the role of spinal nerve afferents. *Neurosci Lett*, 2014, 564: 1-5.
- [12] Blackburn MB, Andrade MA, Toney GM. Hypothalamic PVN contributes to acute intermittent hypoxia-induced sympathetic but not phrenic long-term facilitation. *J Appl Physiol* (1985), 2018, 124(5): 1233-1243.
- [13] Grzęda E, Schlicker E, Toczek M, et al. CB1 receptor activation in the rat paraventricular nucleus induces bi-directional cardiovascular effects via modification of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2017, 390(1): 25-35.

(收稿日期:2018-05-17)