

## 尼莫地平孕期干预对生长受限仔鼠神经系统损伤的保护作用

王英兰, 张建平, 杨冬梓, 王蕴慧, 张睿  
(中山大学附属第二医院妇产科, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】探讨钙离子拮抗剂孕期干预能否减轻生长受限仔鼠神经系统损伤。【方法】将40只SD大鼠按妊娠先后顺序随机分为3组:①A组:不缩窄子宫动脉,不予尼莫地平治疗;②B组:缩窄子宫动脉,不予尼莫地平治疗;③C组:缩窄子宫动脉,术后予尼莫地平治疗。通过TUNEL法检测各组新生仔鼠皮层和海马CA1区神经元凋亡;Morris水迷宫法检测出生21d后各组仔鼠学习记忆功能。【结果】①3组仔鼠皮层神经细胞凋亡率差异有统计学意义( $F=55.63, P<0.01$ )。其中C组仔鼠平均为 $(2.98\pm 0.54)$ 个/HP,低于FGR组 $(5.05\pm 1.17)$ 个/HP( $P<0.01$ ),但高于对照组 $(2.30\pm 0.69)$ 个/HP( $P<0.05$ )。②3组仔鼠海马CA1区神经元凋亡率差异有统计学意义( $H=34.88, P<0.01$ )。其中C组中位数为 $0.833(0.332)$ 个/HP,低于B组 $1.5(0.75)$ 个/HP( $P<0.01$ ),高于A组 $0.5(0.333)$ 个/HP( $P<0.01$ )。③Morris水迷宫学习记忆功能检测,3组仔鼠5d的训练差异有统计学意义, $F$ (组间)= $44.052, P<0.01$ ;  $F$ (时间)= $7153.846, P<0.01$ )。C组仔鼠找到平台的时间较B组短( $P<0.05$ ),但较A组长( $P<0.05$ )【结论】钙离子拮抗剂尼莫地平孕期治疗能对生长受限仔鼠神经系统损伤有保护作用。

**关键词:**尼莫地平; 胎儿生长受限; 海马

中图分类号:R714.1

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2005)02-0156-04

## Protective Effect of Nimodipine Treatment during Gestation on Neural Injury for Rats Complicated with Fetal Growth Restriction

HUANG Ying-lan, ZHANG Jian-ping, YANG Dong-zi, WANG YUN-hui, ZHANG Rui

(Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:**【Objective】To study whether calcium channel antagonist treatment during gestation can alleviate the neural system damage.【Method】Forty SD rats were randomly divided into 3 groups: ①group A: without uterine artery ligation, without Nimodipine treatment; ②group B: partial occlusion of bilateral uterine artery, without nimodipine treatment. ③group C: partial occlusion of bilateral uterine artery, with nimodipine treatment after operation. Neuronal apoptosis in cortex and hippocampus of newborn pups in each group were detected by TUNEL. The pups' learning-memory ability was tested by Morris water maze task on the 21st day after birth.【Result】① The ratio of neuronal apoptosis in cortex of each group was statistically different ( $F=55.63, P<0.01$ ). It was  $(2.98\pm 0.54)$ /HP in group C, lower than that of group B  $(5.05\pm 1.17)$ /HP, ( $P<0.01$ ), but higher than that of group A  $(2.3\pm 0.69)$ /HP, ( $P<0.05$ ). ② The ratio of neuronal apoptosis in hippocampus in each group was statistically different ( $H=34.88, P<0.01$ ). The media in group C was  $0.833(0.332)$ /HP, lower than that of group B,  $1.5(0.75)$ /HP ( $P<0.01$ ), but higher than that of group A,  $0.5(0.333)$ /HP( $P<0.01$ ). ③ The results of Morris water maze showed that it was statistically different among three groups( $F$  of groups= $44.052, P<0.01$ ;  $F$  of time= $7153.846, P<0.01$ ). In group C, the average escape latency was shorter than group B, but longer than group A.【Conclusion】Calcium channel antagonist nimodipine treatment during gestation has a protective effect on neural injury induced by FGR.

**Key words:** nimodipine; fetal growth restriction; hippocampus

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26(2):156-159]

胎儿生长受限(fetal growth restriction, FGR)是常见的妊娠并发症之一。临床研究发现FGR胎

儿出生后不仅体格发育落后,且常伴有神经系统损害,如神经运动功能异常、智商及学业成就较正

收稿日期:2004-08-04

基金项目:广东省科委重点基金资助项目(2003B30505)

作者简介:王英兰(1975-),女,湖北咸宁人,博士研究生;杨冬梓,教授,博士生导师,通讯作者。E-mail: dongziyang@hotmail.com.

常出生体重儿显著降低等远期并发症<sup>[1,2]</sup>。钙超载被普遍认为是细胞损伤的共同机制,孕期应用钙离子拮抗剂治疗能否减轻FGR仔鼠神经系统的损伤?本实验通过子宫动脉缩窄法建立FGR大鼠模型,观察钙离子拮抗剂——尼莫地平孕期治疗对FGR仔鼠神经细胞凋亡和学习记忆功能的影响,为探讨FGR治疗新方案提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 对 象

成年雌性SD大鼠40只,体质量:180~210 g,无交配史。成年雄性SD大鼠10只。以标准大鼠颗粒喂养。室温22℃,相对湿度85%左右。

### 1.2 妊娠的确定及分组

将雌雄鼠按3:1比例于前1 d傍晚合笼,次晨8~9点行阴道涂片,精子阳性者为妊娠第1天。按受孕先后顺序将孕鼠编号。再随机分为3组:①A组:为对照组,共10只,于妊娠第17天行腹腔麻醉、开腹、关腹手术,术后腹腔放置青霉素15万单位,每日予生理盐水0.2 mL腹腔注射直至分娩。②B组:15只,于妊娠第17天行经腹子宫动脉缩窄术。缩窄方法:Hayashi改良法<sup>[3]</sup>,游离子宫动脉根部,平行放置3/0铜丝,丝线结扎,然后轻轻抽出铜丝。其余处理同A组。③C组:于妊娠第17天行子宫动脉缩窄术,方法同前。术后每日予尼莫地平(商品名尼莫同,德国拜尔公司生产)0.1 mL/100 g腹腔注射直至分娩,其余处理同A组。术后待其自然分娩。妊娠21~23 d分娩为足期分娩,其仔鼠为本实验研究对象。

### 1.3 FGR的判断及标本收集

仔鼠用电子天平进行称质量,精确到0.01 g。以低于A组仔鼠平均体质量的2个标准差为FGR的判断标准,废弃B组和C组体质量不符合FGR诊断标准的仔鼠,以下所指B组和C组仔鼠均为FGR仔鼠。各组分别留取10只仔鼠由其母鼠喂养至出生后21 d。A组随机选取20只仔鼠,其余两组选取部分仔鼠留其脑组织,用于检测神经元细胞凋亡。脑块40 g/L多聚甲醛固定24 h,从海马平面作直径约2 mm冠状切片,常规石蜡包埋切片。

### 1.4 神经元原位凋亡检测

产用末端脱氧核糖核酸转移酶 dUTP 缺口末端标记法 (Tdt-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)。试剂盒购自瑞士Rocher公司。方法:参照说明书进行。结果判断:阳性细胞为棕黄色。每个部位计数左右各3个×400高倍镜视野下阳性细胞数,取其平均值。

### 1.5 Morris水迷宫实验

Morris水迷宫参考文献自制<sup>[4]</sup>。直径50 cm,高25 cm,水深15 cm,水温26℃±1℃,平台6 cm,没于水下1 cm,水池内倒入墨水,肉眼看不到水下平台。池壁上标记4个与平台等距离的点作为起始点。试验前1 d将大鼠放入水池中自由游泳2 min,使其熟悉环境。从与平台相对的象限将大鼠面向池壁放入水中,记录大鼠找到平台的时间(逃避潜伏期)。若60 s内找不到平台(潜伏期记为60 s),则将其拿上平台,在平台上休息30 s,再进行下一次试验。试验历时5 d。每天分上、下午各训练3次,共6次。

### 1.6 统计学分析

正态分布方差的计量资料采用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间均数比较采用独立样本 $t$ 检验。多组间均数比较采用单因素方差分析,组间比较采用LSD检验。Morris水迷宫试验结果采用重复测量方差分析。非正态分布方差不齐的计量资料采用中位数(四分位数间距表示,采用Kruskal-Wallis多个独立样本的秩和检验,多重比较采用近似 $Z$ 检验。

## 2 结 果

### 2.1 各组母鼠分娩仔鼠情况

B组有4只、C组有3只母鼠,于术中分离子宫动脉时,血管破裂出血死亡。另C组有2只母鼠于术后数天死亡,死亡原因为感染。各组母鼠术后均有一定的流产率,所产活仔鼠数目均少于术中所见孕囊数。各组母鼠未见有过期妊娠。A组共产活仔鼠72只,B组56只、C组51只。

### 2.2 各组仔鼠体质量

A组仔鼠平均体质量(6.26±0.39)g,因此以小于5.48 g为FGR仔鼠的判断标准。据此标准,B组有31(55.4%)只、C组有27(52.9%)只FGR仔鼠,两组FGR仔鼠的发生率无明显差异( $P >$

0.05)。B 组 FGR 仔鼠体重中位数为 5.10 g, C 组为 5.12 g, 经 Mann-Whitney 检验差异无统计学意义。

### 2.3 各组仔鼠脑重及神经元细胞凋亡率

B 组和 C 组仔鼠脑重均明显低于 A 组, 但 C 组仔鼠脑重明显高于 B 组 ( $P < 0.01$ )。TUNEL 法细胞凋亡检测的结果: 各组皮层细胞凋亡数目均有极显著差异 ( $P < 0.01$ )。C 组海马神经细胞的凋亡率显著低于 B 组, 但高于 A 组 ( $P < 0.05$ ) 见表 1。

### 2.4 Morri 水迷宫学习记忆功能测试

所有大鼠随着 Morris 水迷宫测试训练累积, 找到平台的时间均有缩短, 说明各组大鼠都在习得。在空间探索过程中, B 组仔鼠找到平台的时间较 A 组及 C 组长, 且在第 2 天开始即表现明显 ( $P < 0.01$ ), 至第 5 天其成绩是 A 组的 2 倍多。尼莫地

平治疗组仔鼠与 A 组差别逐渐缩小, 从第 4 天开始已无明显差异。见表 2。

表 1 各组仔鼠脑质量和皮层及海马 CA1 区神经细胞凋亡率  
Table 1 Weights of brains and changes of apoptotic neurons in the cortex and CA1 hippocampal

Group	n	Weights of brains (g) <sup>1)</sup>		
		( $\bar{x} \pm s$ )	Apoptotic neurons	
			Cortex <sup>2)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	CA1 hippocampal M(Q) <sup>3)</sup>
A	20	0.235±0.017	2.3±0.69	0.50(0.333)
B	21	0.196±0.018 <sup>4)</sup>	5.05±1.17 <sup>4)</sup>	1.50(0.750) <sup>4)</sup>
C	17	0.216±0.023 <sup>5), 6)</sup>	2.98±0.54 <sup>4), 6)</sup>	0.833(0.332) <sup>4)</sup>

Statistic method: 1) One-way ANOVA;  $F=28.208, P < 0.01$ . 2) One-way ANOVA,  $F=55.631, P < 0.01$ . 3) M: median, Q: quarter interval; Kruskal-Wallis test,  $H=34.88, P < 0.01$ ; Z test,  $Z_{AB}=5.81, P < 0.01$ ;  $Z_{AC}=2.08, P < 0.05$ ;  $Z_{BC}=3.46, P < 0.01$ ; 4) Compared with group A,  $P < 0.01$ . 5) Compared with group A,  $P < 0.05$ . 6) Compared with group B,  $P < 0.01$

表 2 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期(找到平台的时间)

Table 2 Escape latency of Morris water test (time to find the flat)

Group	n	Escape latency (time to find the flat) ( $\bar{x} \pm s$ )				
		1 <sup>st</sup> day	2 <sup>nd</sup> day	3 <sup>rd</sup> day	4 <sup>th</sup> day	5 <sup>th</sup> day
A	10	53.88±2.88	41.28±4.06	30.45±3.66	20.87±2.60	11.93±1.90
B	10	55.50±1.33	49.57±3.75	41.7±3.42	34.05±3.81	25.27±4.20
C	10	54.28±1.29	47.7±3.24	36.38±3.36	23.43±2.45	16.97±6.66

Statistic method: Repeated measures ANOVA statistics,  $F_{time}=7153.846, P < 0.01$ ;  $F_{group}=44.052, P < 0.01$

## 3 讨论

胎儿生长受限, 既往称之为胎儿宫内发育迟缓(intrauterine growth retardation, IUGR)是神经系统异常的高危因素之一。据报道 IUGR 儿生长到 1 岁时, 神经学异常和神经运动异常的发生率分别为 27% 和 32%, Bayley's 测试, 其智力和精神运动障碍的发生率分别为 22% 及 33%, 均较对正常儿明显增加<sup>[5]</sup>。Fattal-Valevski 等<sup>[6]</sup>对 85 例 IUGR 的儿童随访到 3 岁, 发现 IUGR 儿童神经系统发育评分明显低于正常出生体重儿。Leitner 等<sup>[7]</sup>对 81 例 IUGR 和 41 例正常对照的儿童随访到 6~7 岁, 发现 IUGR 组儿童生长发育指数、神经系统发育评分、IQ 均明显对于正常对照组儿童。

FGR 引起神经系统异常的原因尚不完全清楚。根据临床观察, 60% 的非遗传因素引起的 FGR 是由于胎盘功能不全所致, 推测 FGR 胎儿神经系统损害, 与胎盘血流灌注不足, 宫内慢性缺血缺氧有关<sup>[8]</sup>。

迄今关于 FGR 胎儿神经系统损伤的研究不

多。本研究采用的子宫动脉缩窄法成功地制备了 FGR 大鼠模型, 此种建模方法能够很好的模拟临床 FGR 的病理生理改变——子宫-胎盘血流灌注不足。此法于 1988 年由 Hayashi<sup>[9]</sup> 提出, 在国外较为普遍采用, 迄今国内尚未见报道, 可能与手术要求精细, 技术难度高有关。

本研究发现, FGR 仔鼠脑质量较对照组明显降低, 但没有体质量降低程度明显, 可能与缺血引起的“脑保护效应”有关<sup>[9]</sup>。海马与学习记忆功能密切相关, 且对缺氧极为敏感。临床上 FGR 胎儿出生后智商、学业成就等较正常出生体重儿低, 究其原因, 可能与宫内慢性缺血缺氧致海马神经元损伤有关。

凋亡是脑组织缺血缺氧后神经元损伤的一个重要机制。严重的急性缺氧导致细胞坏死, 而慢性缺氧主要导致细胞凋亡。宫内生长受限对胎儿神经细胞凋亡率的影响, 国内外尚未见报道。本研究结果显示 FGR 胎鼠皮层、海马 CA1 区神经元凋亡率明显高于对照组, 提示神经元细胞凋亡是引起 FGR 胎儿神经系统损伤的机制之一。

钙超载与神经元细胞凋亡 正常情况下, 细胞

内外钙保持着内低外高的动态平衡。缺血缺氧时脑组织氧供不足,能量代谢发生障碍,电压依赖性钙通道被激活,引起钙内流;同时能量依赖性钙泵失活,导致细胞内钙不能泵出。胞内钙急剧增高,细胞内浓度过高的钙离子激活多种蛋白水解酶和磷脂酶,并产生氧自由基,攻击细胞膜,引起细胞损伤。细胞内钙超载,被普遍认为是细胞死亡的“最后共同途径”<sup>[10]</sup>。

研究报道钙离子拮抗剂如尼莫地平能够减轻脑血管痉挛,抑制钙离子内流,减轻缺血缺氧后神经元细胞的损伤程度。有学者用尼莫地平治疗新生儿缺血缺氧性脑病,取得良好效果<sup>[11]</sup>。本研究发现,经尼莫地平治疗的FGR仔鼠神经元细胞的凋亡率明显低于未经治疗的FGR组,水迷宫试验的结果显示经尼莫地平治疗后的FGR仔鼠,其学习记忆功能较未治疗组有明显改善,接近正常对照组,提示孕期尼莫地平治疗,能够改善FGR胎儿神经系统的预后。同时,本研究亦发现:虽然经尼莫地平治疗后,FGR仔鼠的神经元细胞凋亡率依然明显高于对照组,但长大后水迷宫测试学习记忆功能却于对照组无显著差别,提示胎儿期神经系统的损害,在后天的成长过程中,存在一定自愈倾向,与Roth等<sup>[12]</sup>的研究结论相符。

尼莫地平有组织特异性,能选择性地扩张脑血管,对外周血管的影响小。因此尼莫地平对神经系统的保护作用,其机制除了抑制细胞凋亡外,还可能与其选择性地扩张脑血管有关。由于客观原因,本实验未研究尼莫地平对胎鼠脑血流量的影响。

尼莫地平治疗FGR的有效药物浓度及疗程。已有研究证实,尼莫地平能够通过胎盘屏障,胎鼠组织内平均当量浓度比母体内的相应浓度低3~4倍,母体与胎儿血药浓度比为2.4:1<sup>[13]</sup>。尼莫地平孕期用药,用于防治FGR胎儿神经系统损伤,目前尚未见临床研究报道,其有效剂量及疗程尚需进一步探讨。

至于尼莫地平的用药安全性问题。该药用于治疗重度妊高征引起的脑血管病变已有数十年历史,迄今为止,尚未见对胎儿有不良影响的报道。

#### 参考文献:

[1] Gale CR, Martyn CN. Birth weight and later risk of depression in a national birth cohort[J]. *Br J Psychiatry*,

2004, 184(1):28-33.

- [2] Many A, Fattal A, Leitner Y, *et al.* Neurodevelopmental and cognitive assessment of children born growth restricted to mothers with and without preeclampsia [J]. *Hypertens Pregnancy*, 2003, 22(1):25-9.
- [3] Hayashi TT, Dorko ME. A rat model for the study of intrauterine growth retardation [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1988, 158(5):1203-7.
- [4] Morris R. Developments of a water maze procedure for studying spatial learning in the rats [J]. *J Neurosci Methods*, 1984, 11(1):47-60.
- [5] Fernandez-Carrocera LA, Chavez-Torres R, Casanueva E, *et al.* Intrauterine growth retardation and neurodevelopment at one year of age in Mexican children [J]. *Nutrition Research*, 2003, 23(1):1-8.
- [6] Fattal-Valevski A, Leitner Y, Kutai M, *et al.* Neurodevelopmental outcome in children with intrauterine growth retardation: a 3-year follow-up [J]. *J Child Neurol*, 1999, 14(11):724-7.
- [7] Leitner Y, Fattal-Valevski A. Six-year follow-up of children with intrauterine growth retardation: long-term, prospective study [J]. *J Child Neurol*, 2000, 15(12):781-6.
- [8] Gagnon R. Placental insufficiency and its consequences [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003, 22;110 (Suppl 1):S99-107.
- [9] Kassanos D, Siristatidis C, Vitoratos N, *et al.* The clinical significance of Doppler findings in fetal middle cerebral artery during labor [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003, 109 (1): 45-50.
- [10] Annunziato L, Amoroso S, Pannaccione A, *et al.* Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions [J]. *Toxicol Lett*, 2003, 139(2-3):125-33.
- [11] Greiner C, Schmidinger A, Hulsmann S, *et al.* Acute protective effect of nimodipine and dimethyl sulfoxide against hypoxic and ischemic damage in brain slices [J]. *Brain Res*, 2000, 887(2):316-22.
- [12] Roth S, Chang TC, Robson S, *et al.* The neurodevelopmental outcome of term infants with different intrauterine growth characteristics [J]. *Early Human Development*, 1999, 55 (1) 39-50.
- [13] 王会茹. 尼莫地平治疗妊高征进展[J]. *国外医学妇幼保健分册*. 1999, 10(1):10-3.

(编辑 张恩健)