

神经生长因子联合神经节苷脂对弥漫性轴索损伤患者神经保护作用及其对血清及脑脊液中髓鞘碱性蛋白含量的影响

费立博¹ 狄佳¹ 陈慧敏¹ 聂时南¹

[摘要] 目的:研究神经生长因子(NGF)联合神经节苷脂(GM1)对弥漫性轴索损伤(DAI)神经保护作用及其对血清及脑脊液中髓鞘碱性蛋白(MBP)含量的影响。方法:选择符合诊断标准100例患者随机分为治疗组和对照组,每组50例,用Elisa法测定两组患者治疗前及治疗后第1、3、7、20天血清及脑脊液中MBP水平。结果:两组治疗后血清和脑脊液MBP水平均有不同程度下降,治疗组术后第3、7、20天血清和脑脊液MBP水平显著低于对照组。且治疗结束后6个月随访,治疗组显效率显著高于对照组。结论:DAI患者早期联合应用NGF和GM1能减少血清和脑脊液中MBP含量,从而减少神经细胞凋亡,促进损伤的神经元修复,发挥其脑保护作用。

[关键词] 神经生长因子;神经节苷脂;弥漫性轴索损伤;髓鞘碱性蛋白

doi:10.13201/j.issn.1009-5918.2018.04.013

[中图分类号] R651.15 [文献标识码] A

The influence of neuroprotective effect and the content of myelin basic protein in serum and cerebrospinal of nerve growth factor combined with monosialotetrahexosy-1 ganglioside in the treatment of diffuse axonal injury

FEI Libo DI Jia CHEN Huimin NIE Shinan

(Department of Emergency Medicine, Jinling Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, 210002, China)

Corresponding author: NIE Shinan, E-mail: shn_nie@sina.com

Abstract Objective: To study the influence of neuroprotective effect and the content of myelin basic protein (MBP) in serum and cerebrospinal of nerve growth factor (NGF) combined with monosialotetrahexosy-1 ganglioside (GM1) in the treatment of diffuse axonal injury (DAI). **Method:** One hundred patients accord with diagnostic criteria were selected and randomly divided into treatment group and the control group, 50 cases in each group, the content of MBP in serum and cerebrospinal of patients were measured by Elisa at 1, 3, 7, 20 days. **Result:** Serum and cerebrospinal MBP levels of the two groups after treatment decreased to varying degrees; after 3, 7, 20 days, the serum and cerebrospinal MBP levels of treatment group were significantly lower than the control group. Followed-up 6 months after the end of treatment, effective rate of treatment group was significantly higher than that in the control group. **Conclusion:** Early combined use of NGF and GM1 in patients with DAI can reduce the content of MBP in serum and cerebrospinal, reducing the apoptosis of neurons and promoting the repairment of injured neurons.

Key words nerve growth factor; monosialotetrahexosy-1 ganglioside; diffuse axonal injury; myelin basic protein

弥漫性轴索损伤(diffuse axonal injury, DAI)是由于外伤使脑组织内部易发生剪力作用,从而以神经轴索断裂为特征的重型闭合性脑损伤^[1],除原发性损伤外还存在多种继发机制导致后续更多损伤^[2]。最显著的临床特征是持久的原发性意识障碍,临床缺乏定位体征,预后多不良,死亡率和导致患者植物状态的几率很高^[3]。临床上一概予以脱水降低颅内压、亚低温、高压氧治疗、防止并发症及支持治疗,此外,也有采取免疫疗法、细胞移植及基

因治疗等^[4],近年来神经营养药物开始在临床上得到应用,并取得了令人较为满意的疗效。本课题选取具有代表性的两类神经营养药物:神经节苷脂(monosialotetrahexosy-1 ganglioside, GM1)和神经生长因子(nerve growth factor, NGF),研究两者协同作用对于临床上以神经损伤为主要特点的DAI患者治疗效果,并选择血清及脑脊液中髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)的浓度、GCS评分、GOS评分共同作为疗效的评价标准。

本研究测定了联合应用NGF和GM1治疗DAI患者前后血清及脑脊液中MBP含量及神经功能的变化,探讨NGF和GM1联合用药对DAI

¹南京大学医学院附属金陵医院(南京军区南京总医院)急救医学科(南京,210002)
通信作者:聂时南, E-mail: shn_nie@sina.com

患者神经损伤的改善作用及其血清及脑脊液中 MBP 的影响,从另一个方面解释 NGF 和 GM1 联合用药的脑保护作用机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本研究为回顾性研究,收集 2010-12-01—2016-06-31 期间我院急救医学科及神经外科收治的颅脑外伤患者 48 h 内到达医院,且最终诊断为弥漫性轴突损伤的患者 100 例,其中车祸伤 67 例,坠落伤 24 例,重物击伤 9 例。100 例患者随机分为治疗组和对照组,每组各 50 例。

本研究已得到医院伦理委员会审核通过,并签署知情同意书。诊断标准:①颅脑外伤后持续昏迷(>6 h);②头颅 CT 或 MRI 示胼胝体、脑干、内囊、深部白质有小的出血点;③无颅脑明确结构异常伤后持续植物状态。排除标准:①患有严重慢性疾病及脑肿瘤、严重精神障碍等患者;②严重的多发伤和(或)复合伤者;③病程中出现迟发性脑出血、脑疝接受外科手术、休克患者或死亡患者;④入院时已双瞳孔散大、眼球固定、无自主呼吸者及入院时 GCS 低于 5 分的患者;⑤ 20 d 内出院及失访等原因导致研究终止的患者。

1.2 研究方法

两组均先给予常规的综合性治疗,主要包括:①脱水减轻脑水肿:根据患者的脑水肿情况选用甘露醇或甘油果糖脱水减轻脑水肿,②亚低温脑保护治疗;③高压氧治疗:高压氧对于各种脑创伤的疗效也已得到公认,故两组患者在病情允许的前提下都尽早的给予高压氧治疗;④纠正呼吸、循环衰竭,防治癫痫、感染等并发症,加强营养支持;⑤钙离子拮抗剂等药物的应用,防治各种并发症,如有患者昏迷时间较长,行气管切开术、高压氧等其他对症治疗的方法。治疗组除常规治疗外,给予单唾液酸四己糖神经节苷脂钠(GM1,商品名:申捷,齐鲁制药有限公司生产)100 mg 静滴,1 次/d,2 周为 1 疗程,同时联用注射用鼠神经生长因子(NGF,商品名:金路捷,武汉海特生物制药股份有限公司生产)20 μg 肌肉注射,1 次/d,2 周为 1 个疗程。对照组则应用 0.9%氯化钠注射液 100 mL 静脉滴注,30 min 内滴完,2 次/d,2 周为 1 个疗程。两组均持续 2 个疗程。

记录两组患者治疗 1、3、7、20 d 的 GCS 评分,采取医疗及护理人员共同评分,以提高准确性(评分人员为监护室固定护士长及医疗组主治医师,如护理、医疗两者评分不一致则纳入 1 名医疗高级职称,3 人共同判断评分,少数服从多数);如有患者接受镇静治疗,于每日停药 4 h 后进行 GCS 评分。根据 GOS 量表评价 6 个月后患者预后情况记。如

治疗过程中发生不良反应,及时记录在册(20 d 内出院及随访失访等原因导致研究终止的患者已于分组前剔除)。

分别测定患者血清及脑脊液 MBP 浓度:于治疗前和治疗后 1、3、7、20 d 采静脉血 4 ml,4000 r/min、4℃离心 10 min,分离血清,于-20℃冰箱中保存待测。在同样时间点采集脑脊液标本 5 ml,于治疗后 1、3、7 d 通过颅内压监测系统脑室外引流管采集脑脊液标本,治疗后 20 d 采用腰穿采集脑脊液标本(对于严重颅内高血压患者先给予甘露醇后,再小心收集脑脊液),于-20℃冰箱中保存待测。按照说明书操作,采用 Elisa 方法测定血清及脑脊液中 MBP 含量。

1.3 观察指标

①分别于患者 1、3、7、20 d 检测患者血浆及脑脊液 MBP 浓度;②记录治疗 1、3、7、20 d 两组患者的 GCS 评分。

1.4 疗效判定

采用 GOS 的 5 级划分:恢复良好(5 分)、中残(4 分)、重残(3 分)、植物状态(2 分)、死亡(1 分),疗效判定时间为伤后 6 个月。治疗结果以恢复良好和中残表示显著。

1.5 统计学方法

应用 SPSS12.0 软件进行相关性分析,对于满足正态分布的计量资料,应用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,对于不满足正态分布的计量资料,应用中位数和四分位数间距的形式表示。如果两组待比较数据都符合正态分布,应用独立 T 检验比较,如果有一个待比较数据不符合正态分布或者两个待比较数据都不符合正态分布,应用非参数检验中的秩和检验比较。统计结果以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 测得的各指标结果的描述

在进行正态性检验分析过程中,以 $\alpha = 0.05$ 作为检验标准,经分析,各指标变量均满足正态分布。

2.2 患者基本资料比较

患者基本资料比较见表 1,两组患者各方面要素均差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

表 1 两组患者性别、年龄、GCS 评分比较 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	男/例	女/例	年龄/岁	GCS 评分/分
治疗组	50	31	19	40.1±1.1	7.1±1.1
对照组	50	33	17	39.7±1.2	6.9±0.8

2.3 NGF 联合 GM1 治疗 DAI 前后血清 MBP 水平比较

治疗前及治疗后 1 d 相比,两组患者血清 MBP 水平比较,差异无统计学意义;治疗后 3、7、20 d,两

组患者血清 MBP 水平均有不同程度下降,且治疗组术后 3、7、20 d 时 MBP 水平均显著低于对照组,结果见表 2。

2.4 NGF 联合 GM1 治疗 DAI 前后脑脊液 MBP 水平比较

治疗前及治疗 1 d 后两组患者脑脊液中 MBP 水平比较,差异无统计学意义;之后 MBP 水平呈逐渐升高,于第 3 天达最大值,但治疗组脑脊液中

MBP 水平显著低于对照组;之后,随着时间延长,脑脊液中 MBP 水平逐渐下降,且治疗组第 7 天和第 14 天 MBP 水平均显著低于对照组,但脑脊液中 MBP 水平仍高于正常水平,结果见表 3。

2.5 NGF 联合 GM1 治疗 DAI 疗效比较

治疗结束后 6 个月随访,治疗组显效率显著高于对照组,见表 4。

表 2 NGF 联合 GM1 治疗 DAI 前后血清 MBP 水平比较

$\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$

组别	例数	治疗前	治疗后			
			1 d	3 d	7 d	20 d
治疗组	50	10.88±2.45	11.23±2.03	9.21±2.14 ¹⁾	8.13±1.43 ¹⁾	7.12±0.91 ²⁾
对照组	50	11.01±2.95	11.45±1.98	10.24±2.64	9.87±2.05	8.34±1.27

与对照组相比,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

表 3 NGF 联合 GM1 治疗 DAI 前后脑脊液 MBP 水平比较

$\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$

组别	例数	治疗前	治疗后			
			1 d	3 d	7 d	20 d
治疗组	50	17.47±3.12	19.56±2.94	21.37±3.67 ¹⁾	17.61±1.98 ²⁾	12.31±1.92 ²⁾
对照组	50	18.56±3.31	20.21±3.01	24.49±3.21	21.89±2.61	17.44±2.06

与对照组相比,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

表 4 NGF 联合 GM1 治疗 DAI 疗效比较

例(%)

组别	例数	死亡	植物状态	重残	中残	恢复良好	显效
治疗组	50	6(12.0)	8(16.0)	11(22.0)	15(30.0)	10(20.0)	25(50.0) ¹⁾
对照组	50	9(18.0)	13(26.0)	13(26.0)	8(16.0)	7(14.0)	15(30.0)

与对照组相比,¹⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

GM1 是一种复合糖脂,主要分布在神经元的胞膜中,是神经细胞膜的天然组成部分,具有神经保护和神经修复的双重作用^[5-10],其机理主要为:①增加神经细胞膜上 Na^+ / K^+ ATP 酶、 $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ ATP 酶活性,增加细胞膜稳定性,减轻神经水肿;②减少损伤后自由基的形成,保护线粒体结构和功能;③在神经损伤早期有促进修复作用,在损伤后期能防止受损神经华勒变性,促进神经细胞再生;④提高脑组织中保护性蛋白 Bcl-2 的表达,减少细胞凋亡的数量^[5-8]。

NGF 是氨基酸复合酶类物质,主要存在于神经元的胞体、胞质和突起,外伤性损伤的神经元可以被 NGF 修复,进而再生,从而起到很好的保护作用,减轻损伤的神经元引起的继发性损伤,加快损伤部位的愈合^[11-12],其机理主要存在以下几个方面:①促进神经元损伤后的修复、加速神经纤维再生,减轻继发性损伤;②对神经纤维的生长方向起引导作用^[11]。

追溯 GM1 与 NGF 之间的联系,早在 1994 年 Kubota 等^[13]的研究证实了 NGF 和 GM1 对神经系统的功能重建及神经纤维的再生具有协同作用。1995 年 Mutoh 等^[14]通过实验发现 GM1 可以使 NGF 在低浓度时促进神经轴突促进再生,而单独应用低浓度的 NGF 时则无法促进神经轴突再生,表明 GM1 是 NGF 促进周围神经再生的激活剂。1997 年 Duchemin 等^[15]证实 GM1 可以增加成年大鼠脑内 NGF mRNA 及 NGF 的含量,表明二者对于损伤神经的再生具有明显的协同促进作用,张引成等在兔面神经缺损模型中发现,单独 NGF 促进运动神经元再生的能力有限,但 NGF 和 GM1 混合液对于神经元的再生有良好的生物效应^[5],NGF 促进周围神经再生的能力可以被 GM1 激活^[14],两者联用可以更好地起到保护受损的神经系统的作用^[16]。且临床上已有不少研究表明,二者联合使用对于各种原因导致的神经损伤如缺氧性脑病、脊髓损伤等都取得了良好的效果^[17-20]。MBP 是中枢神经系统(central nervous system,

CNS)髓鞘的主要蛋白质,位于髓鞘浆膜面,维持 CNS 髓鞘结构和功能的稳定,具有神经组织特异性。由于血脑屏障(Blood-Brain Barrier, BBB)的作用,MBP 较难释放到脑脊液,仅少量释放入血液。在 DAI 患者中,BBB 功能被破坏,其通透性发生改变,细胞中的 MBP 即可大量进入脑脊液和血液中,导致脑脊液和血液中的 MBP 含量也相应增加^[21]。因此,早期脑损伤的标志物可选用脑脊液及血清 MBP 蛋白含量,其多少可以反应脑损伤的程度^[22],对判断病情严重程度和预后具有重要意义。MBP 蛋白可能是治疗 DAI 的靶点,降低血清及脑脊液中 MBP 含量将提高 DAI 患者的神经功能,改善预后^[23-25]。

本实验研究发现虽然治疗组血清和脑脊液 MBP 蛋白表达变化趋势与对照组相似,但是在各个时相的蛋白表达含量均低于对照组,且治疗后 3、7、20 d 治疗组血清和脑脊液 MBP 水平均显著低于对照组,且治疗组 MBP 下降幅度较对照组更为显著。并且治疗结束后 6 个月随访,GOS 评估表明治疗组死亡率低于对照组,但差异无统计学意义,而治疗组显效率却显著高于对照组,提示治疗组明显改善 DAI 患者预后,且有研究表明 NGF 能通过降低血浆 MBP 治疗重型颅脑损伤^[15]。这些结果表明 DAI 患者早期联合应用 NGF 和 GM1 能减少血清和脑脊液中 MBP 含量,从而减少神经细胞凋亡,促进损伤的神经元修复,发挥其脑保护作用。该研究结果同时也为临床在 DAI 后尽早使用促进神经组织恢复的药物提供了理论依据。

总之,联合应用 NGF 和 GM1 治疗 DAI 疗效确定,能明显提高治疗的显效率,其作用机制与降低血清和脑脊液中 MBP 含量有关。

参考文献

- [1] 程崇杰,孙晓川,尧瑶.临床征象对弥漫性轴索损伤患者预后判断的价值[J].中华创伤杂志,2012,28(3):215-215.
- [2] 乔梁,王汉东.弥漫性轴突损伤治疗研究进展[J].中华神经外科疾病研究杂志,2011,10(1):82-84.
- [3] Mata-Mbemba D, Mugikura S, Nakagawa A, et al. Intraventricular hemorrhage on initial computed tomography as marker of diffuse axonal injury after traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2015, 32: 359-365.
- [4] 李莹,苏章杰,王金环,等.弥漫性轴索损伤临床诊断与治疗进展[J].中国现代神经疾病杂志,2008,8(1):75-78.
- [5] 陈志刚,卢亦成,朱诚,等.神经节苷脂 GM1 在颅脑损伤早期的脑保护作用[J].第二军医大学学报,2002,23(4):420-422.
- [6] 胡小吾,缪明永,赵麟,等.脑外伤后脑线粒体功能和结构改变及神经节苷脂治疗作用[J].中华神经外科杂志,1999,15(1):27-27.
- [7] 刘华,郭萍,濮海平,等.新生鼠缺氧缺血性脑损伤死亡基因的变化及神经节苷酯的治疗作用[J].中国儿童保健杂志,2005,13(1):59-61.
- [8] 杨鹏,李云,朱军,等.神经节苷酯对大鼠弥漫性脑损伤后学习记忆功能的保护作用[J].中华实验外科杂志,2010,27(6):834-834.
- [9] Hadaczek P, Wu G, Sharma N, et al. GDNF signaling implemented by GM1 ganglioside; failure in Parkinson's disease and GM1-deficient murine model[J]. Experimental Neurol, 2015, 263: 177-189.
- [10] Lutz D, Loers G, Kleene R, et al. Myelin basic protein cleaves cell adhesion molecule L1 and promotes neurogenesis and cell survival[J]. J Biol Chem, 2014, 289: 13503-13518.
- [11] 张淋坤,张引成.神经生长因子和神经节苷脂的研究进展[J].中国实用神经疾病杂志,2010,13(10):89-93.
- [12] Zhang H, Wu F, Kong X, et al. Nerve growth factor improves functional recovery by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced neuronal apoptosis in rats with spinal cord injury[J]. J Transl Med, 2014, 12: 130-130.
- [13] Kubota T, Saito H, Nishiyama N. Neurite extension after damage by laser beam irradiation in culture chick sensory neurons[J]. Biol Pharm Bull, 1994, 17: 1477-1477.
- [14] Mutoh T, Tokuda A. Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulator receptor function[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 5287-5287.
- [15] Duchemin A M, Neff N F, Hadjiconstantinou M. GM1 increases the content and mRNA of NGF in the brain of aged rats[J]. Neuroreport, 1997, 8: 3823-3827.
- [16] Huang F, Dong X, Zhang L, et al. The neuroprotective effects of NGF combined with GM1 on injured spinal cord neurons in vitro[J]. Brain Res Bull, 2009, 79: 85-88.
- [17] Fukuda Y, Fukui T, Hikichi C, et al. Neurotrophin promotes NGF signaling through interaction of GM1 ganglioside with Trkneurotrophin receptor in PC12 cells[J]. Brain Res, 2015, 1596: 13-21.
- [18] 费立博,狄佳,聂时南.神经生长因子联合神经节苷脂干预弥漫性轴索损伤患者的临床观察[J].中国急救医学,2014,34(2):155-158.
- [19] 李俊,李骋,王尚忠,等.神经节苷脂联合鼠神经生长因子治疗新生儿缺氧缺血性脑病 70 例疗效观察[J].海南医学,2015,41(2):260-262.
- [20] 翟宏伟,孙洁,巩尊科,等.神经节苷脂联合神经生长因子治疗对脊髓损伤后生活自理能力恢复的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2013,19(3):185-187.
- [21] 吴崇光,王雷平,姚军.早期高压氧治疗脑弥漫性轴索损伤 45 例[J].中华创伤杂志,2012,28(1):40-42.

- [22] 谢腾,陈治军,罗勇,等.尼莫地平联合高压氧治疗弥漫性轴索损伤的临床研究[J].中国临床神经外科杂志,2011,16(1):27-29.
- [23] 刘劲睿,李元朋,张明石,等.弥漫性轴索损伤预后与髓鞘碱性蛋白的相关性研究[J].黑龙江医药科学,2009,32(6):9-10.
- [24] Ottens A K,Golden E C,Bustamante L,et al. Proteolysis of multiple myelin basic protein isoforms after neurotrauma: characterization by mass spectrometry [J]. Neurochem,2008,104:1404-1414.
- [25] Liu M C,Akle V,Zheng W,et al. Extensive degradation of myelin basic protein isoforms by calpain following traumatic brain injury[J]. J Neurochem,2006,98:700-712.

(收稿日期:2018-02-05)

论文中数字使用的注意事项

论文中数字使用的注意事项:①尾数“0”多的5位以上数字,可以改写为以万和亿为单位的数。一般情况下不得以十、百、千、十万、百万、千万、十亿、千亿等作单位(百、千、兆等词头除外)。如1 800 000可写成180万;142 500可写成14.25万,不能写成14万2千5百;5 000字不能写5千字。②纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。数值有效位数末尾的“0”也不能省略,即应全部写出。如“1.500、1.750、2.000”不能写作“1.5、1.7、2”。③数值的修约不能简单地采用“四舍五入”,应按照GB 8170-87的规则修约,其简明口诀为“4舍6入5看齐,5后有数进上去,尾数为零向左看,左数奇进偶舍弃”。如:修约到一位小数,12.149修约为12.1;16.169修约为16.2;12.150修约为12.2,12.250修约为12.2。④附带长度单位的数值相乘,每个数值后单位不能省略。例如:50 cm×80 cm×100 cm,不能写成50×80×100 cm或50×80×100 cm³。⑤一系列数值的计量单位相同时,可以仅在最末一个数字后写出单位符号。例如:60、80、100 mmol/L,不必写作60 mmol/L、80 mmol/L、100 mmol/L。⑥“大约”、“多”、“余”、“左右”、“上下”等均可表示概数的词,不要与表示范围的数据重叠使用。例如:3~5 cm不要写成3~5 cm左右、约3~5 cm、或3~5 cm多等等。