

· 基础研究 ·

缺血再灌注损伤大鼠脑内 GFAP 的变化及
通心络的影响*卢昌均¹ 陆兵勋¹ 王立新¹ 尹瑞雪¹ 刘忆星¹

摘要 目的:探讨胶质纤维酸性蛋白(GFAP)在脑缺血再灌注损伤(MCAO)后星形胶质细胞的活化增殖情况及通心络对其影响。**方法:**采用大鼠缺血再灌注损伤(MCAO)模型,应用免疫组织化学方法观察缺血后 3d、7d、14d 以及 21d 缺血侧室管膜及室管膜下区(SVZ)、海马齿状回(SGZ)GFAP 的变化。给予模型大鼠通心络灌胃,观察神经干细胞增殖分化的变化。**结果:**GFAP 阳性细胞随缺血再灌注时间的延长,荧光强度值增加,第 7 天、第 14 天、第 21 天组与假手术组比较,差异具有显著性意义($P<0.05$)。造模后通心络组 BrdU 阳性细胞荧光强度值和 BrdU+GFAP 免疫双标荧光强度值均高于脑缺血再灌注模型组,差异显著($P<0.05$)。**结论:**大鼠缺血再灌注损伤后可引起其缺血侧 SVZ、SGZ 区星形胶质细胞反应和增殖;而通心络可显著增加 MCAO 大鼠神经干细胞增殖分化能力。

关键词 脑缺血;胶质纤维酸性蛋白;大鼠;通心络

中图分类号:R493,R741,R28 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2006)-03-0234-03

The activation of GFAP after middle cerebral artery occlusion in rats and treatment with Tongxinluo/LU Changjun, LU Bingxun, WANG Lixin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(3):234—236

Abstract Objective: To investigate the activation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) after middle cerebral artery occlusion in rats and treatment with Tongxinluo.**Method:** Ischemia was induced by temporary middle cerebral artery occlusion(MCAO). In endypendyma and subependymal zone(SVZ)、Hippocampus dentate gyrus zone(SGZ) of rats at 3, 7, 14 and 21 days after MCAO, the numbers of GFAP were detected by immunohistochemistry which were treated with Tongxinluo.**Result:** Compared with the sham operation group, GFAP was significantly increased in the MCAO on the day 7, 14 and 21 ($P<0.05$). Immunofluorescence intensity of BrdU+GFAP had significantly increased in SVZ. After the treatment of Tongxinluo, the number of BrdU and immunofluorescence intensity of BrdU+GFAP were significantly increased as compared with the MCAO group($P<0.05$).**Conclusion:** This study demonstrates that the focal cerebral ischemia in the rat results in a rapid response, a process often referred to as reactive GFAP, from resident astrocytes of the SVZ and SGZ to the side of ischemia; Tongxinluo enhances the ability of the differentiation and proliferation of neural stem cell in MCAO.

Author's address Dept. of Neurology, Nanfan Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, 510515

Key words cerebral ischemia; glial fibrillary acidic protein; rat; Tongxinluo

胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 是星形胶质细胞的特异蛋白和骨架成分之一,并可作为其特异性分子标记^[1]。我们应用免疫组织化学方法检测缺血再灌注损伤(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 后不同时间点大鼠脑缺血侧室管膜及室管膜下区(subependymal zone, SVZ)、海马齿状回(Hippocampus dentate gyrus zone, SGZ) GFAP 的变化。探讨脑缺血损伤后这些区域内源性神经干细胞的增殖分化的过程,以及通心络对脑缺血损伤后内源性神经干细胞的增殖分化作用。

1 材料与方法

1.1 栓线的制备

取 3—0 号尼龙线,用酒精灯将其头端烫成球

形,浸泡消毒后,栓线头端浸入 0.1%多聚赖氨酸溶液中过夜,60℃烤箱中 1h 后取出,浸入 12500U/ml 肝素盐水中备用。

1.2 动物模型

健康雄性 SD 大鼠,体重 250±20g,南方医科大学实验动物中心提供(动物质量合格证号 2004A067)。144 只大鼠分为缺血再灌注 3 天、7 天、14 天、21 天共 4 批进行,每批随机分为通心络治疗组、脑缺血再灌注模型组(等量的生理盐水)和假手术组,各组 12 只(雌雄各半)。参照 Koizumi 法^[2],结合

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400612)

1 南方医科大学南方医院神经内科,广州,510515

作者简介:卢昌均,男,主治医师,博士在读

收稿日期:2005-08-13

我们实验室的改良法进行。复制大鼠右侧大脑 MCAO 模型。将大鼠称重后,按 0.4ml/kg 以 10%水合氯醛腹腔麻醉,分离并结扎右侧颈总动脉、颈外动脉,手术中避免刺激迷走神经。在颈总动脉近颈内、外动脉分叉处以动脉夹夹闭,取带有处理过的 3—0 号尼龙线的 4.5 号头皮针自结扎处远端刺入颈总动脉,松开动脉夹,以针头将尼龙线导入颈内动脉,深度为距颈总动脉分叉处约 $19.5\pm0.5\text{mm}$ 。90min 后拔出丝线进行缺血再灌注。

按经典的 Zea longa 神经功能评分法评分(5 级 4 分法)^[9],0 分:无神经功能缺损症状;1 分:轻微神经功能缺损,不能完全伸展左侧前爪;2 分:中度局灶性神经功能缺损,向左侧转圈;3 分:重度局灶性神经功能缺损,向左侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识水平下降。除假手术组外,各组选取造模后 6h 神经功能缺损评分在 2 分以上的大鼠纳入研究,症状轻微的大鼠剔除。假手术组也插入丝线,但深度为 10mm 左右,不阻塞大脑中动脉。术后在约 20℃的空调环境下单笼饲养,自由进食、进水。给药:通心络主要成分人参、水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣、蝉蜕、赤芍、冰片等^[10](石家庄以岭药业股份有限公司,国药准字 Z19980015)。将通心络胶囊内容物溶于蒸馏水中配成溶液,通心络 1g/kg·d 组浓度为 15g/100ml,按每只 1g/kg·d 给药;模型对照组、假手术组分别以等量蒸馏水灌胃。各组大鼠于再灌注清醒后即给药,2 次/d。

1.3 BrdU 标记法

各组大鼠于处死前两天即造模后第 1、2 天、第 5、6 天、第 12、13 天、第 19、20 天分别按 100mg/kg 腹腔注射 BrdU 生理盐水液,每日 2 次。

1.4 免疫组织化学方法

各组在脑缺血后相应时间点水合氯醛麻醉下断头取脑,将脑组织迅速置-80℃冷冻并保存。-20℃恒冷切片机于前卤后 0.3—1.2mm 为 SVZ;前卤后 3.14—4.52mm 为 SGZ,连续冠状切片,切片以 0.1%多聚赖氨酸处理,每张脑片厚 8μm,所得切片依次入 4%多聚甲醛固定 15min 后,吹干,置 4℃冰箱中备用。BrdU 与 GFAP 免疫荧光双标染色法按试剂盒说明操作。“一抗”Mouse anti-Rat BrdU IgG

(Zymed, s.san. Francisco California), Goat anti-Rat GFAP IgG (Zymed s.san. Francisco California);“二抗”Rabbit anti-Goat IgG TRITC (Zymed, s.san. Francisco California), Goat anti-Mouse IgG FITC (Zymed, s.san. Francisco California)。在以上检测过程中均常规设立阴性对照(一张不加“一抗”,另一张不加“二抗”)。图片在激光共聚焦显微镜统一放大倍数(10×20)下,设置相等的检测窗口面积,随机选 10 个阳性细胞区域,分别测其缺血侧 SGZ、SVZ 区阳性细胞的荧光强度值并求均值,作为此张片的阳性细胞荧光强度值。

1.5 统计学分析

所得数据输入计算机用 SPSS10.0 软件进行统计处理。做单因素方差分析和 *t* 检验。

2 结果

2.1 脑缺血再灌注损伤后不同时间大鼠海马颗粒层和齿状回 BrdU 阳性细胞荧光强度值的变化

大鼠脑缺血再灌注后各个时间段活动较假手术组减少,体重减轻;免疫组化双标显示各时段模型组 BrdU 阳性细胞主要在要布在缺血侧皮质、海马(以颗粒层和齿状回更为明显)、室管膜上皮细胞及室下区、脉络丛上皮细胞等;部分 BrdU 阳性细胞同时呈 GFAP 染色阳性;随缺血再灌注时间的延长,荧光强度值增加,其中造模后第 7 天、第 14 天、第 21 天组与假手术组 (SVZ: 70.12 ± 9.60 , SGZ: 60.32 ± 8.32) 比较,差异具有显著性意义 ($P<0.05$)。见表 1。且造模后第 7 天大鼠海马颗粒层和齿状回 BrdU 阳性细胞荧光强度值最高,与其他时间点相比,差异有显著性意义 ($P<0.05$);第 14 天时室管膜上皮细胞及室下区、脉络丛上皮细胞的 BrdU 阳性细胞荧光强度值最高,与其他时间点相比,差异有显著性意义 ($P<0.05$);但造模后第 21 天时, BrdU 阳性细胞荧光强度和 BrdU+GFAP 免疫双标荧光强度值下降,但仍高于第 3 天时的强度值 ($P<0.05$)。

2.2 通心络对脑缺血再灌注大鼠不同时间段神经干细胞(neural stem cell, NSC)增殖分化的影响

见表 1。实验结果显示:给予通心络治疗后第 3 天缺血侧海马、室管膜及室下区 BrdU+GFAP 免疫

表 1 各组大鼠脑缺血侧室管膜及 SVZ、SGZ BrdU+GFAP 阳性细胞荧光强度值的比较 ($\bar{x}\pm s$, 200 倍视野下)

组别	切片数	3d	7d	14d	21d
SVZ 模型组	6	73.7±10.6	96.9±11.7	120.7±10.4	91.5±6.3
通心络组	8	75.3±11.1	147.0±10.3 ^①	168.9±12.4 ^①	126.4±9.3 ^①
SGZ 模型组	6	62.4±11.3	85.1±10.6	108.5±10.2	71.9±10.1
通心络组	8	64.3±12.1	132.5±13.2 ^①	158.5±11.7 ^①	111.8±8.3 ^①

同区与模型组比较:① $P<0.05$

双标荧光强度值与脑缺血再灌注模型组相比无显著性差异($P>0.05$);通心络治疗后第7天、14天、21天时海马、室管膜及室下区 BrdU 阳性细胞荧光强度值和 BrdU+GFAP 免疫双标荧光强度值均高于脑缺血再灌注模型组,差异有显著性意义($P<0.05$)。提示通心络治疗7天起,缺血侧海马、室管膜及室下区神经干细胞开始大量增殖,部分增殖细胞分化为星形胶质细胞,并持续到缺血后第21天。

3 讨论

既往研究表明,局灶性成年大鼠脑缺血损伤后脑内均有明显的神经再生现象,而星形胶质细胞在脑缺血中的作用日益受到关注。脑缺血后星形胶质细胞可能通过分泌生长因子、细胞因子、识别分子等修复损伤的神经元、促进神经轴突再生及诱导再生神经元的迁移,从而有利神经系统正常功能的恢复^[5-9]。GFAP 是脑间质纤维的主要亚单位,是星形胶质细胞的一种标志蛋白。BrdU 是胸腺嘧啶脱氧核苷类似物,在细胞分裂前 DNA 的合成期,它可作为底物,参与 DNA 的合成,被用于细胞增殖的标记^[10]。

我们的实验以 BrdU 标记神经再生,GFAP 标记成熟星形胶质细胞,观察局灶性脑缺血再灌注损伤后增生的神经干细胞分化为哪类细胞及通心络的影响。实验结果提示:大鼠脑缺血再灌注损伤后第3天缺血侧皮质、海马(以颗粒层和齿状回更为明显)、室管膜上皮细胞及室下区、脉络丛上皮细胞就有 BrdU 阳性细胞的表达,其中 BrdU 阳性细胞在海马于第7天时表达最多,在室管膜上皮细胞及室下区、脉络丛上皮细胞于第14天表达最多。而大鼠通心络治疗组脑缺血3天后 GFAP 阳性星形胶质细胞已出现,与脑缺血再灌注模型组比较无显著性差异($P>0.05$);脑缺血7天后 GFAP 阳性细胞大量增生、14天达高峰、21天后略有下降,与脑缺血再灌注模型组比较有显著性差异。免疫荧光双标检测结果表明:各时间段缺血侧室管膜上皮细胞及室下区、脉络丛上皮细胞 BrdU+GFAP 免疫双标荧光强度值高于海马颗粒层和齿状回的荧光强度值;提示在室管膜上

皮细胞及室下区、脉络丛上皮细胞增生的干细胞大部分可能分化为星形胶质细胞。因此大鼠缺血再灌注损伤后脑缺血侧 SVZ、SGZ 区 GFAP 的增值变化可能对缺血侧脑组织起到保护作用,通心络治疗组可显著增加 MCAO 脑缺血大鼠神经干细胞的向 GFAP 的增殖分化。其详细机制,尤其是对通心络是如何影响神经干的增殖分化,又是如何影响细胞周期的变化,这些问题需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Gould E, Gross CG. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems[J]. J Neurosci, 2002, 22(3):619—623.
- [2] Tamura A, Nakayama H, Narita K, et al. Rat middle cerebral artery occlusion models [J]. CVD Grand Round Series, 2001, 4(1): 75—90.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without Craniectomy in rats[J]. J Stroke, 1989, 20(1):84—91.
- [4] 周华东,邓娟,陈曼娥.通心络胶囊对脑缺血—再灌注大鼠保护作用的实验研究[J]. 中国急救医学, 2001, 21(8):435—437.
- [5] Cameron HA, Tanapat P, Gould E. Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway[J]. Neuroscience, 1998, 82(2): 349—354.
- [6] Gould E, Tanapat P. Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat [J]. Neuroscience, 1997, 80(2): 427—436.
- [7] Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, et al. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus [J]. J Neurosci, 1997, 17(10): 3727—3738.
- [8] 郭家松,曾园山,李海标,等.神经干细胞与 NT-3 基因修饰雪旺细胞联合移植促进全横断脊髓损伤大鼠功能修复的实验研究[J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(5):323—326.
- [9] 肖岚,黎杏群,唐涛,等.脑溢安对新生大鼠海马神经干细胞缺氧损伤及白介素-6 和白介素-6mRNA 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2004, 19(6):433—436.
- [10] Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, et al. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia[J]. J Neurosci, 2001, 105(1):33—41.