

电刺激小脑顶核对大鼠局灶脑缺血再灌注后 脑内神经干细胞增殖的影响*

黄艳君^{1,2,3} 罗 勇^{1,2,4}

摘要 目的:研究电刺激小脑顶核(FNS)对成年大鼠局灶脑缺血再灌注后脑内不同部位、不同时间点神经干细胞增殖的变化规律,探讨 FNS 治疗缺血性脑损伤的作用机制。**方法:**雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组(NC 组)、假手术组(SC 组)、局灶脑缺血再灌注组(I/R 组)、局灶脑缺血再灌注+小脑顶核假刺激组(I/RFs 组)、局灶脑缺血再灌注+小脑顶核刺激组(I/RF 组),每组根据再灌注时间的不同又分为第 1、3、7、14、21、28 天 6 个亚组(n=6)。缺血时间均为 1h/再灌注,于再灌注后立即刺激对侧小脑顶核 1h。采用线栓法制备大鼠右侧大脑中动脉局灶脑缺血再灌注模型。**结果:**局灶脑缺血再灌注后不同时间点 Brdu 阳性细胞在缺血侧侧脑室区、海马齿状回的表达均有增加,呈单峰变化趋势,第 1 天开始增加($P<0.01$),第 7 天达到高峰($P<0.01$),第 14 天后下降($P<0.01$);第 21、28 天时已明显下降($P<0.05$),而 FNS 后,Brdu 阳性细胞数量在缺血/再灌注基础上增加更加明显($P<0.05$, $P<0.01$),第 7 天达到高峰($P<0.01$),峰值更高,第 14 天后仍维持在较高水平($P<0.01$),第 21 天后逐步下降($P<0.05$),第 28 天已明显下降;且引起整个侧脑室和海马齿状回、颗粒下层、锥体细胞层细胞增殖。Brdu 阳性细胞有明显形态改变。**结论:**FNS 可促进局灶脑缺血再灌注后脑内侧脑室和海马 Brdu 阳性细胞的增殖,提示这种作用可能是 FNS 治疗缺血性脑损伤的重要作用机制之一。

关键词 局灶脑缺血再灌注;神经干细胞;电刺激,小脑顶核

中图分类号:R364.1,R454.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-03-0211-05

Effect of electrical stimulating to fastigial nucleus on proliferation of neural stem cell in brain of adult rat after focal cerebral ischemia/reperfusion/HUANG Yanjun, LUO Yong//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(3): 211—215

Abstract Objective:To study the influence of electrical stimulating to fastigial nucleus on the proliferation regularity of expression of Brdu in adult rat brain after focal cerebral ischemia and to explore the mechanism of fastigial nucleus electrical stimulation (FNS) in treating ischemic brain injury. **Method:**The rats were randomly divided into five groups: normal control group (NC group), sham operation control group (SC group), ischemia/reperfusion group (I/R group), ischemia/reperfusion treated with sham FNS group (I/R Fs group), and ischemia/reperfusion treated with FNS group (I/RF group), each group contained the 1st, 3rd, 7th, 14th, 21st, 28th d six time points, at each point n=6. Animal models of focal cerebral ischemia/reperfusion were made by filament occlusion of right middle cerebral artery.**Result:**After focal cerebral ischemia/reperfusion, the number of Brdu positive cells increased at each time point, reached small peak value at the 7th d ($P<0.01$). With FNS, the number of Brdu positive cells increased more strikingly at each time point ($P<0.05$, $P<0.01$), reached higher peak value at the 7th d ($P<0.01$).**Conclusion:**Fastigial nucleus electrical stimulation can promote the proliferation of Brdu positive cells in some brain regions after focal cerebral ischemia/reperfusion, which might be one of the important mechanisms of fastigial nucleus stimulation in treating ischemic brain injury.

Author's address Dept. of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing Key Laboratory of Neurology, Chongqing, 400016

Key words focal cerebral ischemia/reperfusion; neural stem cell; electrical stimulation; fastigial nucleus

缺血性脑血管病为临床常见病、多发病,以局灶脑缺血最为多见。目前国内外对缺血性脑血管病的治疗取得了一些成果,但仍不尽如人意。因此,寻找新的治疗方法和有效的干预策略成了当前神经科学领域研究的热点和难点。侧脑室外侧壁的室下带(subventricular zone,SVZ)和海马齿状回(dentate gyrus,DG)的颗粒下层是所有哺乳动物(包括人类)脑内的 2 个神经干细胞富集区,这两个区域在成年还存在着持续的神经发生现象^[1]。神经干细胞具有自

我更新和分化潜能,为治疗脑血管病等疾病造成的神经功能缺失提供了新的思路。既往研究已经证实,小脑顶核电刺激(fastigial nucleus electrical

*基金项目:重庆市科委攻关项目(渝科发计字[2003]43 号文,2003-7)、重庆市卫生局科研项目(渝卫科教[2005]31 号文,编号:2005-2-179)

1 重庆医科大学附属第一医院神经内科,400016

2 重庆市神经病学重点实验室

3 四川省绵阳市第三人民医院神经内科

4 通讯作者:罗勇(重庆医科大学附属第一医院神经内科,400016)

作者简介:黄艳君,女,硕士,主治医师

收稿日期:2007-12-5

stimulation, FNS)能启动内源性神经保护机制,产生广泛、持久的神经保护作用,但机制尚未完全明了。本实验通过动态观察 FNS 对成年大鼠局灶脑缺血再灌注后缺血侧侧脑室和海马神经干细胞增殖水平的影响,以进一步了解 FNS 的神经保护作用及其神经修复机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性 Wistar 大鼠 180 只,体重 250—300g,由重庆医科大学实验动物中心提供。大鼠术前 12h 禁食不禁水。随机分为 5 组:正常对照组(NC 组)、假手术组(SC 组)、局灶脑缺血再灌注组(I/R 组)、局灶脑缺血再灌注+小脑顶核假刺激组(IRFs 组)、局灶脑缺血再灌注+小脑顶核刺激组(IRF 组),每组根据再灌注时间的不同分为第 1、3、7、14、21 和 28 天 6 个亚组($n=6$),涉及缺血/再灌注动物均为缺血 1h。

1.2 大鼠大脑中动脉局灶脑缺血再灌注模型制备

根据 Longa 等^[2]报道的方法,参照罗勇等^[3]的经验,采用线栓法制备右侧大脑中动脉局灶脑缺血再灌注模型;栓塞成功的大鼠缺血 1h,再次麻醉,拔出线栓至颈外动脉残端内,实现再灌注(假手术组只进行类似模型操作,但不插入丝线)。模型成功标准:左侧肢体疼痛回缩迟钝或消失,提尾倒悬时左上肢向胸前屈曲,行走时向左侧倾倒或向左转圈;右侧出现霍纳(Honer's)征。排除标准:神经学症状评分低于 2 分者(评分标准参照 1.4 神经症状学评分);蛛网膜下腔出血者;HE 染色无缺血病理改变者;未到观察时相点便死亡者。凡因各种因素导致各实验组动物数不足预定数量者通过随机抽样原则补齐。

1.3 电刺激小脑顶核

大鼠固定在立体定向仪上,根据 Wistar 大鼠脑立体定向图谱结合鼠的大小确定小脑顶核的适当位置,一般小脑顶核坐标为:以前囟后缘为零点,正中线向后 11.4—11.8mm,旁开 0.8—1.0mm,深 5.2—5.7mm;于颅骨上钻 1 个孔,将同心圆电极插入病灶对侧小脑顶核(选左侧),采用 SEN-7233 三通道电子刺激器(日本),电流强度为 50 μ A、频率为 50—100Hz、时程为 0.5ms 的直角方波脉冲;于再灌注后立即给予电刺激,持续时间 1h;刺激过程中动物均处于浅麻醉状态。假刺激组操作同小脑顶核刺激组,电极插入小脑顶核但不通电流刺激,只留针 1h。

1.4 神经症状学评分

参照 Zea Longa 5 分制评分标准,大鼠清醒后评分:0 分、无神经功能缺失症状;1 分、轻度局灶性

神经功能缺失(不能完全伸展左侧前肢);2 分:中度局灶性神经功能缺失(向左侧转圈);3 分:中度局灶性神经功能缺失(向左侧倾倒);4 分:不能自发行走,意识水平降低。评分时间点:于局灶脑缺血再灌注后第 1h、6h、12h、1d、3d、7d 进行评定。

1.5 神经干细胞标记

5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxy-uridine, Brdu)是胸腺嘧啶的类似物,在细胞增殖周期 S 期可以整合到细胞核 DNA 中,是一种细胞增殖的标识物,常用来标记体内增殖的神经干细胞。用法:用生理盐水稀释后腹腔注射;手术麻醉苏醒后 2h 第 1 次给药,每天 2 次,间隔 12h。时间点:手术当天、手术后第 2、6、13、20、27 天,在最后一次注射后 24h 内处死动物;用量:50mg/kg。

1.6 固定、取材、切片

实验动物到达观察时相点之后,经左心室常规灌注固定,开颅取脑,由前向后作冠状切片,取经侧脑室(包含室管膜下区)及海马中心脑组织块各 1 块,行固定、脱水、浸蜡、包埋、石蜡切片(片厚 4 μ m),用于 HE 染色、免疫组化检测。取材部位:侧脑室(AP 前囟-0.30mm 至前囟-1.2mm),海马(AP 前囟-3.14 至前囟-4.5mm)。

1.7 免疫组织化学检测 Brdu 阳性细胞(SABC 法)

切片常规脱蜡至水,复合消化酶室温下孵育,蒸馏水冲洗;50%甲酰胺/2 $\times$ SSC65 $^{\circ}$ C 孵育,2 $\times$ SSC 冲洗;2N/L 盐酸 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,0.1M 硼酸(pH8.5)室温下孵育 10min,1%过氧化氢室温下孵育 15min,封闭液室温孵育 2h,甩去多余液体,勿洗;小鼠抗大鼠 Brdu 抗体(1:200,武汉博士德)4 $^{\circ}$ C 过夜,生物素化山羊抗小鼠 IgG(武汉博士德)25 $^{\circ}$ C 孵育 2h,SABC 室温下孵育 2h,DAB 显色,苏木素轻度复染(以上各步前后用 0.01MPBS 冲洗),脱水、透明、封片。阴性对照用正常羊血清代替一抗,其余步骤同上。

1.8 图像分析及统计学分析

切片在统一放大倍数(10 $\times$ 20)下,随机选择 10 个非重叠视野,以缺血侧侧脑室和海马回为观察部位,每个时相点 6 只动物,每只动物的每个部位随机取 5 张非连续切片,应用重庆医科大学电镜室北航 CM-2000B 型生物医学图像分析系统进行自动计算平均阳性细胞数,所得数据用均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SAS8.2 统计软件进行统计学处理。选择 $P<0.05$ 为差异有显著性, $P<0.01$ 为差异有非常显著性。

2 结果

2.1 电刺激小脑顶核(FNS)对脑缺血后大鼠神经功

能缺损的影响

大鼠脑缺血 1h 后均出现神经功能缺损, 各組间比较差异无显著性意义 ($P>0.05$), 说明各組脑缺血状况基本一致; 随着缺血/再灌注时间的延长, 各組神经功能缺失症状逐渐减轻; I/R 组和 I/R Fs 组比

较差异无显著性 ($P>0.05$), 但 I/Rf 组各时间点神经功能评分均低于 I/R 组和 I/R Fs 组, 比较差异有显著性 ($P<0.05, P<0.01$), 提示 FNS 能有效改善大鼠脑缺血再灌注后的神经功能缺损, 见表 1。

2.2 Brdu 阳性细胞检测

表 1 大鼠局灶脑缺血再灌注后神经功能评分及 FNS 的效果 ($\bar{x}\pm s$, 分)

组别	第 1 小时	第 6 小时	第 12 小时	第 1 天	第 3 天	第 7 天
I/R 组	2.83±0.31 ^②	2.74±0.55 ^②	2.49±0.42 ^②	2.28±0.62 ^②	1.61±0.51 ^②	1.18±0.32 ^②
I/RFs 组	2.89±0.45	2.88±0.71	2.56±0.49	2.00±0.60	1.58±0.45	1.02±0.58
I/Rf 组	2.92±0.66 ^②	2.58±0.51 ^①	1.83±0.31 ^①	1.42±0.62 ^③	1.01±0.62 ^③	0.55±0.44 ^③

① $P<0.05$ I/R 组与 I/RFs 组比较, ② $P>0.05$ I/R 组与 I/RFs 组比较, ③ $P<0.01$ I/R 组与 I/RFs 组比较

2.2.1 缺血侧侧脑室区 Brdu 阳性细胞计数及 FNS 对其影响

2.2.1.1 Brdu 阳性细胞随时间的数量变化规律: 正常侧脑室区域 Brdu 阳性细胞主要分布在脉络丛、室管膜、SVZ, 细胞数量极少。局灶脑缺血再灌注后, 缺血侧侧脑室区域 Brdu 阳性细胞数量随着再灌注时间延长呈现出单峰变化趋势, 即第 1 天时开始增加 ($P<0.05$), 第 3 天时增加明显 ($P<0.01$), 第 7 天时达峰值 ($P<0.01$), 第 14 天后逐步下降 ($P<0.01$), 第 28

天时已明显下降 ($P<0.05$); I/R 组和 I/R Fs 组两组变化相似, 各对应时间点比较差异无显著性 ($P>0.05$), 而 FNS 后, I/Rf 组 Brdu 阳性细胞的表达虽具有同样趋势, 但在每一时间点上, Brdu 阳性细胞的数量增加明显, 与 I/R 组和 I/RFs 组在第 1、3、7、14 天时间点比较, 差异有非常显著性 ($P<0.01$), 在第 21、28 天比较, 差异有显著性 ($P<0.05$), 而与 NC 组和 SC 组各对应时间点比较, $P<0.01$, 见表 2。

2.2.1.2 Brdu 阳性细胞随时间的形态变化规律: 正

表 2 各实验组侧脑室区 Brdu 阳性细胞数 ($\bar{x}\pm s$, n/mm², 200 倍视野⁻¹, n=6)

缺血/再灌注后时相点	NC 组	SC 组	I/R 组	I/RFs 组	I/Rf 组
第 1 天	14.53±1.78 ^①	15.75±1.55	20.47±3.47 ^{②③}	22.26±2.12 ^③	26.50±4.89 ^{⑤④}
第 3 天	15.62±1.23 ^①	14.74±1.41	46.66±2.61 ^{②③}	47.14±3.72 ^③	60.91±4.56 ^{⑤④}
第 7 天	14.63±1.24 ^①	14.35±1.14	67.05±8.27 ^{②③}	70.13±3.84 ^③	90.4±6.99 ^{⑤④}
第 14 天	15.55±0.89 ^①	15.72±1.02	45.51±6.23 ^{②③}	47.01±8.52 ^③	70.32±4.32 ^{⑤④}
第 21 天	14.89±1.09 ^①	14.67±0.97	22.89±4.01 ^{②③}	20.67±4.58 ^③	36.33±3.14 ^④
第 28 天	13.66±1.22 ^①	13.39±1.34	15.62±3.45 ^{②③}	17.29±2.56 ^③	18.11±1.22 ^④

①与 SC 组比较 $P>0.05$; ②与 I/R Fs 比较 $P>0.05$ ③与 Ns 组和 SC 组比较 $P<0.05$; ④与 NS 组和 SC 组比较 $P<0.01$; ⑤与 I/R 组和 I/R Fs 组比较 $P<0.01$

常侧脑室区域, Brdu 阳性细胞分布在室管膜上的为单层柱状上皮, 在 SVZ 呈散在分布, 细胞数量极少。局灶脑缺血再灌注后第 1 天, I/R 组、I/RFs 组分布在室管膜上的 Brdu 阳性细胞增厚, 变为两层或多层, 分布在 SVZ 区的 Brdu 阳性细胞可见呈成对和直线排列的细胞; 而 I/Rf 组在室管膜上的阳性细胞增殖更加明显, 在 SVZ 区的 Brdu 阳性细胞成簇、成团更加明显, 细胞核深染。局灶脑缺血再灌注后第 3 天, I/R 组、I/RFs 组分布在室管膜上的 Brdu 阳性细胞继续增厚为多层, 在 SVZ 区的阳性细胞成簇、成团, 而 I/Rf 组 Brdu 阳性细胞增殖更加明显。局灶脑缺血再灌注后第 7 天, 随着 I/R 组、I/R Fs 组、I/Rf 组 Brdu 阳性细胞增殖到达高峰, 室管膜上和 SVZ 区阳性细胞形态呈多样化改变, 可见两种 Brdu 阳性细胞: 一种反应强烈, 染色为深棕色, 另一种反应较弱, 染色相对较浅; 核的形态有圆形、椭圆形和杆状三种。I/R 组和 I/RFs 组常见成对存在的杆状或椭圆形细胞核的阳性细胞; 而 I/Rf 组成对存在的杆状或椭圆形细胞核的阳性细胞数目增多, 细胞核体积变大, 管膜扩增更明显, 阳性细胞核反应显著增强, 大部分细胞深

染为棕黑色。一部分阳性细胞聚集在侧脑室前外侧角, 成簇、成团更加明显; 局灶脑缺血再灌注后第 14 天, I/R 组、I/RFs 组阳性细胞反应程度减弱, 室管膜细胞分层现象也减弱, 而 I/Rf 组变化不明显; 缺血/再灌注后第 21 天, I/R 组、I/RFs 组室管膜上阳性细胞分层现象消失, I/Rf 组室管膜上阳性细胞分层现象仍然存在, 缺血/再灌注后第 28 天, Brdu 阳性细胞已接近正常状态。

2.2.2 缺血侧海马 Brdu 阳性细胞计数及 FNS 对其影响

2.2.2.1 Brdu 阳性细胞随时间的数量变化规律: 正常大鼠海马区域存在少量的 Brdu 阳性细胞, 局灶脑缺血再灌注后, 缺血侧海马 Brdu 阳性细胞数量随着再灌注时间延长呈现出单峰变化趋势, 即第 1d 时开始增加 ($P<0.05$), 第 3 天增加明显 ($P<0.01$), 第 7 天达峰值 ($P<0.01$), 第 14 天后逐步下降 ($P<0.01$), 第 28 天已明显下降 ($P<0.05$); I/R 组和 I/RFs 组两组变化相似, 各对应时间点比较差异无显著性 ($P>0.05$), 而 FNS 后, I/Rf 组 Brdu 阳性细胞的表达虽具有同样趋势, 但在每一时间点上, Brdu 阳性细胞的数量

增加明显, 与 I/R 组和 I/RFs 组在第 1、3、7、14 天时间点比较, 差异有非常显著性 ($P<0.01$), 在第 21 天、28 天比较, 差异有显著性 ($P<0.05$), 而与 NC 组和

SC 组各对应时间点比较, 差异有非常显著性 ($P<0.01$) (表 3)。

2.2.2.2 Brdu 阳性细胞随时间的分布和形态变化规律

表 3 各实验组海马 Brdu 阳性细胞数 ($\bar{x}\pm s$, n/mm², 200 倍视野⁻¹, n=6)

缺血/再灌注后时间点	NC 组	SC 组	I/R 组	I/RFs 组	I/RF 组
第 1 天	5.33±1.63 ^①	5.75±1.95	12.50±2.82 ^{②③}	11.33±2.25 ^③	20.36±2.82 ^{⑤*}
第 3 天	4.83±1.83 ^①	4.99±1.65	20.55±3.11 ^{②③}	22.19±2.63 ^③	40.82±3.51 ^{⑤*}
第 7 天	4.67±1.63 ^①	5.26±2.94	53.58±5.63 ^{②③}	57.01±11.30 ^③	71.23±8.25 ^{⑤*}
第 14 天	5.58±1.19 ^①	4.86±1.57	32.78±5.60 ^{②③}	35.90±7.57 ^③	55.36±5.42 ^{⑤*}
第 21 天	5.76±1.28 ^①	5.00±1.50	13.09±5.82 ^{②③}	15.43±4.64 ^③	18.54±3.70*
第 28 天	5.22±1.37 ^①	5.03±2.03	6.90±2.51 ^②	6.57±5.14	7.94±5.65*

①与 SC 组比较 $P>0.05$; ②与 I/R Fs 比较 $P>0.05$; ③与 Ns 组和 SC 组比较 $P<0.05$; ④与 NS 组和 SC 组比较 $P<0.01$; ⑤与 I/R 组和 I/R Fs 组比较 $P<0.01$

律: 正常大鼠海马区域存在少量的 Brdu 阳性细胞, 主要分布于颗粒细胞层和门区, 细胞排列稀疏。局灶脑缺血再灌注后第 1 天, I/R 组和 I/RFs 组阳性细胞略有增加, 而 I/RF 组增加明显, 可看到增殖的 Brdu 阳性细胞成对、成团排列; 局灶脑缺血再灌注后第 3 天, 随着阳性细胞数量继续增加, 阳性细胞分布在齿状回、颗粒下层、锥体细胞层, 而 I/RF 组分布在齿状回的阳性细胞形成非连续性排列; 局灶脑缺血再灌注后第 7 天, Brdu 阳性细胞增殖达高峰, 阳性细胞成队、成团主要表现为两种模式: 一类细胞呈丛集性, 细胞核形态不规则; 另一类细胞呈单个或两个, 无丛集性, 但细胞核形态相对比较规则; I/R 组和 I/RFs 组以这两种形式为主, 而 I/RF 组阳性细胞“丛集”现象更加明显, 沿齿状回的颗粒下层非连续性排列, 一些 Brdu 阳性细胞从颗粒细胞下层迁移至颗粒细胞层, 细胞核较颗粒细胞下层增大, 呈圆形, 表现出成熟颗粒细胞的特征; 缺血/再灌注后第 14 天, I/R 组和 I/RFs 组 Brdu 阳性细胞形态和分布同再灌注后第 7 天基本相似; 而 I/RF 组“丛集”现象仍较明显; 缺血/再灌注后第 21 天, 阳性细胞形态和分布同再灌注后第 1 天基本相似, 缺血/再灌注后第 28 天, Brdu 阳性细胞已接近正常状态。

3 讨论

传统观点认为中枢神经系统在发育成熟和损伤后不能再生, 但近年来研究证实, 人类及成年动物神经系统中均存在神经干细胞, 在正常情况下处于静息状态, 在缺血缺氧、外伤、氧化应激等多种因素刺激下, 神经干细胞可再次增殖和分化, 参与修复缺损的神经功能^[4]。

Brdu 是一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物, 在细胞增殖周期 S 期可整合到细胞核 DNA 中, 被用作神经干细胞的标识物, 其阳性细胞被看成是具有增殖活性的细胞。本实验证明, 在正常成年脑组织侧脑室区域 Brdu 阳性细胞仅局限在脉络丛、室管膜、SVZ, 且

数量极少。局灶脑缺血再灌注后, I/R 组、I/RFs 组上述区域 Brdu 阳性细胞数量表现为随时间单峰增加的动态变化趋势, 即第 1 天时开始增加, 第 3 天时增加明显, 第 7 天达一小高峰, 然后迅速下降, 第 28 天时细胞数量已甚少, 这与既往相关研究结果一致^[5-9]。但国外一些报道^[10]细胞增殖达到高峰的时间是第 14 天, 和我们略有差别, 可能与模型的选择、动物的种属、缺血时间的不同等有关。本实验观察到, 局灶脑缺血再灌注后再给予 FNS, Brdu 阳性细胞数量随时间变化规律与 I/R 组、I/RFs 组基本相似, 但在对应时间点上阳性细胞数量都比 I/R 组和 I/RFs 组明显增加, 且室管膜增殖为两层或多层, 阳性细胞聚集成簇、成团, 形态多样。这提示, FNS 可以进一步促进脑内处于“静止”或“休眠期”的神经干细胞分裂分化的潜能。既往研究大多是将目光集中在损伤侧脑室前角水平, 我们研究结果显示, FNS 引起整个侧脑室包括前角、下角、SVZ 增殖, Brdu 阳性细胞数量明显增多, 并伴有形态的明显改变, 表现出活跃的分裂相。这提示 FNS 刺激了整个侧脑室新生细胞增殖, 新生细胞增殖以侧脑室前角水平最为显著, 但这些细胞的来源和分化类型需进一步研究。

本实验还观察到, 正常成年海马颗粒细胞层和门区存在少量的 Brdu 阳性细胞, 细胞排列稀疏, 局灶脑缺血再灌注后 Brdu 阳性细胞数量变化明显, 表现出与侧脑室区域相似的动态变化趋势, 这与国内外相关报道基本一致^[11-14]。本结果显示, FNS 后 Brdu 阳性细胞数量在各时间点不仅数量明显增加, 而且细胞形态和分布也发生明显变化, 尤其在细胞增殖高峰第 7 天时, Brdu 阳性细胞沿 DG 的颗粒下层非连续性排列, “丛集”现象更加明显, 一些 Brdu 阳性细胞从颗粒细胞下层迁移至颗粒细胞层, 细胞核增大呈圆形, 表现出成熟颗粒细胞的特征, 这种现象一直持续到第 14 天。这说明 FNS 也可以激活局灶脑缺血再灌注后海马区域的神经干细胞分裂分化的潜能, 促进神经干细胞增殖。虽然本研究目前没有对

新生细胞进一步的分化情况进行深入探讨,但国外已有研究证明,短暂性脑缺血大鼠齿状回 Brdu 阳性细胞约 60%在 2 周后分化为幼稚神经元^[15]。

中枢神经再生主要包括神经干细胞的增殖、迁移和向神经元方向分化 3 个环节,神经干细胞的增殖是最基础的一步,强化神经干细胞的增殖可能促进神经再生。目前认为,SVZ 和 DG 的颗粒下层是所有哺乳动物(包括人类)脑内的 2 个神经干细胞富集区。本研究结果显示,FNS 可以明显促进这两个区域的神经干细胞增殖,不仅促进其数量增加,而且使其形态也发生明显变化,促进新生细胞向成熟细胞分化。从大鼠神经功能评分来看,第 7 天时 I/R 组神经病学评分最低,与对照组比较差异有显著性,表明 FNS 促进大鼠患肢功能恢复,与 Brdu 升高同步进行,提示 FNS 后 Brdu 阳性细胞的表达持续增强,参与了局灶脑缺血再灌注后神经组织的重建。Zhang 等^[16]却认为,MCAO 造成的脑缺血仅能影响 SVZ,不能促进 DG 细胞的增殖,细胞增殖的标识物 Brdu 在大脑皮质也有表达,主要分布在缺血灶周围。本研究结果显示,FNS 不但可促使脑缺血后 SVZ 的神经干细胞增殖,也可以促进 DG 的神经干细胞分裂,说明 FNS 所引起的脑保护作用广泛的。有研究表明,脑缺血后 80%的新生神经元死亡,只有 20%的新生神经元存活,存活的新生神经元也只替代了 0.2%的坏死细胞^[17],这说明了脑缺血后内源性神经干细胞若要修复受损的神经功能,需要是一系列基因和蛋白在时间、空间和浓度上的精确调控。但 FNS 后产生的新生细胞能否迁移至缺血损伤区域,能否转化成有功能的神经元,以及 FNS 调控神经干细胞的确切机制有待更深入的研究。

参考文献

- [1] Gage FH. Mammalian neural stem cell [J]. Science, 2000, 287(5457): 1433—1438.
- [2] Schweighofer N, Ferriol G. Diffusion of nitric oxide can facilitate cerebellar learning: A simulation study [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(19):10661—10665.
- [3] 赵建新,田元祥,李国明,等. 拟血管性痴呆小鼠模型皮层及海马细胞病理组织学动态观察 [J]. 中国病理生理杂志,2000,16(11):1214—1216.
- [4] 樊敬峰,宋春风,吕佩源,等. 血管性痴呆小鼠海马胆碱乙酰转移酶和其 mRNA 变化特征及喜得镇的影响 [J]. 中国老年学杂志,2005,25(6):677—679.
- [5] Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury[J]. Trends Neurosci, 1997, 20(3):132—139.
- [6] 李巍,姜立刚,徐忠信,等. 实验性血管性痴呆小鼠中枢神经系统细胞凋亡与迟发性神经元坏死 [J]. 中国临床康复,2005,9

- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84—91.
- [3] 罗勇,董为伟. Wistar 大鼠插线法局灶性脑缺血再灌注模型的实验研究[J]. 重庆医科大学学报, 2002, 27(1): 1—4.
- [4] Reynold BA, Weiss A. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. Science, 1992, 255(5052): 1707—1710.
- [5] 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]. Neuroscience, 2001, 105(1): 33—41.
- [6] Li Y, Chen J, Chopp M. Cell proliferation and differentiation from ependymal subependymal and choroids plexus cells in response to stroke in rats [J]. J Neurol Sci, 2002, 193(2):137—146.
- [7] 张波,王任直,姚勇,等. 脑梗死后自体神经干细胞原位增殖与分化的实验研究[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(22):1975—1979.
- [8] 张蓬勃,刘勇,李捷,等. 局灶性脑缺血后室管膜/室下区细胞迁移到梗塞区周围并分化为神经元和星形胶质细胞[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(10): 1201—1206.
- [9] Zhang P, Liu Y, Li J, et al. Cell proliferation in ependymal/subventricular zone and nNOS expression following focal cerebral ischemia in adult rats [J]. Neurol Res, 2006, 28(1): 91—96.
- [10] Jin K, Minami M, Lan JQ, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(8): 4710—4715.
- [11] Liu J, Solway K, Messing RO, et al. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils [J]. J Neurosci, 1998, 18(19): 7768—7778.
- [12] Takagi Y, Nozaki K, Takahashi J, et al. Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice [J]. Brain Res, 1999, 831(1-2): 283—287.
- [13] 张志军,万琪,江文,等. 成年大鼠脑缺血再灌注损伤后海马齿状回神经发生的实验研究 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2002, 4(5): 345—348.
- [14] 李常新,黄如训,陈立云,等. 脑梗死大鼠神经前体细胞增殖水平的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2004, 21(5): 391—393.
- [15] Kee NJ, Preston E, Wojtowice JM. Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat [J]. Exp Brain Res, 2001, 136(3): 313—320.
- [16] 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]. Neuroscience, 2001, 105(1): 33—41.
- [17] Arvidsson A, Collin T, Kirik D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke[J]. Nat Med, 2002, (9): 963—970.

(上接 210 页)

- memory impairment: assessing the role of nitric oxide[J]. Ann N Y Acad Sci, 1998, 854(35): 307—317.
- [2] Schweighofer N, Ferriol G. Diffusion of nitric oxide can facilitate cerebellar learning: A simulation study [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(19):10661—10665.
 - [3] 赵建新,田元祥,李国明,等. 拟血管性痴呆小鼠模型皮层及海马细胞病理组织学动态观察 [J]. 中国病理生理杂志,2000,16(11):1214—1216.
 - [4] 樊敬峰,宋春风,吕佩源,等. 血管性痴呆小鼠海马胆碱乙酰转移酶和其 mRNA 变化特征及喜得镇的影响 [J]. 中国老年学杂志,2005,25(6):677—679.
 - [5] Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury[J]. Trends Neurosci, 1997, 20(3):132—139.
 - [6] 李巍,姜立刚,徐忠信,等. 实验性血管性痴呆小鼠中枢神经系统细胞凋亡与迟发性神经元坏死 [J]. 中国临床康复,2005,9

- (28):133—135.
- [7] 吕佩源,尹昱,王伟斌,等. 二氢麦角环肽对血管性痴呆小鼠海马钙信号转导机制的干预作用[J]. 中华老年医学杂志,2004,23(3):192—195.
- [8] 胡志安,罗峻,黎海蒂,等. 大鼠离体海马脑片 NO 变化与 LTP 产生的关系[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(20):1837—1839.
- [9] Musleh W, Yaghoubi S, Baudry M. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor on NMDA receptor function in organotypic hippocampal cultures[J]. Brain Res, 1997, 770(1-2):298—301.
- [10] Noda Y, Yamada K, Nabeshima T. Role of nitric oxide in the effect of aging on spatial memory in rats [J]. Behav Brain Res, 1997, 83(1-2):153—158.
- [11] 李久峰,富艳冰,王桂静. 舒脑宁促进康复期脑梗死患者记忆功能的疗效分析[J]. 中国临床康复,2002,6(7):1033.