

行为学训练对海马梗死大鼠齿状回区神经干细胞增殖能力的影响

李 玲¹ 江 山² 袁 华² 潘惠娟² 王 冰²

摘要

目的:研究行为学训练对海马梗死大鼠齿状回区巢蛋白(nestin)表达的影响,探讨行为学训练对齿状回区神经干细胞增殖能力的影响。

方法:102只SD大鼠随机分为训练3d、7d、14d、21d、28d、35d、42d、49d组,制动3d、7d、14d、21d、28d、35d、42d、49d组及正常对照组。每组6只,采用光化学法造成大鼠单侧海马区梗死,造模1d后,训练组给予水迷宫训练,制动组给予制动,观察各时间点不同组大鼠梗死侧和梗死对侧海马齿状回区 nestin 阳性细胞的表达情况。

结果:①对照组大鼠海马齿状回区有少量 nestin 阳性细胞。②在梗死侧,训练第14—42天 nestin 的表达高于制动组($P<0.01$)。③在梗死对侧,训练第21—35天 nestin 的表达也高于制动组和对照组($P<0.05$)。

结论:①行为学训练可以促进单侧海马梗死大鼠齿状回区 nestin 阳性细胞的表达。②nestin 蛋白是神经干细胞的特殊标记物,故行为学训练可以增强神经干细胞增殖能力,促进神经功能的恢复。

关键词 大鼠;齿状回;巢蛋白;水迷宫;神经干细胞;增殖

中图分类号:R743, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-11-1035-05

Effect of behavior training on proliferation of neural stem cell in dentate gyrus in rats with left hippocampal infarction/LI Ling, JIANG Shan, YUAN Hua, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(11): 1035—1039

Abstract

Objective: To study the effect of behavior training on the expression of nestin in dentate gyrus (DG) in rats with left hippocampal infarction.

Method: One hundred and two SD rats were randomized into 3d, 7d, 14d, 21d, 28d, 35d, 42d, 49d training groups, 3d, 7d, 14d, 21d, 28d, 35d, 42d, 49d immobilization groups and control group. Behavior training and immobilization were performed from 1d after infarction in training groups and immobilization groups respectively. Immunohistochemistry was used to detect the expressions of nestin in DG at different time points.

Result: Certain expression of nestin appeared in normal DG of rats. In DG of infarction side, the expressions of nestin in 7d to 42d behavior training groups were higher than that in immobilization groups ($P<0.01$). In DG of infarction opposite side, from the 21st d to 35th d the expressions of nestin in training groups were higher than that in immobilization groups and control group($P<0.05$).

Conclusion: Behavior training can accelerate the expression of nestin in DG of rats with left hippocampal infarction.

Author's address Department of Physiotherapy and Rehabilitation, the First affiliated Hospital of Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100048

Key words rat; dentate gyrus; nestin; water maze; neural stem cell; proliferation

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.11.004

1 解放军总医院第一附属医院康复理疗科,北京,100048; 2 第四军医大学第一附属医院康复理疗科

作者简介:李玲,女,主任医师,教授; 收稿日期:2010-02-13

1992年,Reynold等学者诱导发现神经干细胞(neural stem cells, NSCs),其后的研究发现成年大鼠海马齿状回区(dentate gyrus, DG)是重要的神经生发区,为脑缺血后内源NSCs参与修复奠定了研究基础^[1]。McKay等研究发现,内源性NSCs通过增殖、迁移、分化过程参与脑缺血大鼠的神经功能修复^[2]。

巢蛋白(nestin)被认为是神经干细胞最好的标记物,其在成体脑组织的室管膜细胞、室下区细胞核以及内皮细胞内微弱表达。研究表明,脑损伤后nestin的表达增加有利于脑重塑和修复过程,对神经干细胞的增殖起到了支持作用。本研究拟以nestin标记神经干细胞,观察各组大鼠海马齿状回区nestin阳性细胞的数目,探讨行为学训练对NSCs增殖能力的影响,为脑缺血的临床康复提供理论依据。现将实验结果报告如下:

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 自制冷光源:由第四军医大学第一附属医院和中国科学院西安光学精密机械研究所联合研制。光源为一充气氙灯,输出功率:最小值 $0.008\text{W}/\text{cm}^2$,最大值 $0.37\text{W}/\text{cm}^2$;输出波长 $490\sim 530\text{nm}$,波峰 530nm 。输出端连一直径 0.6mm 的石英光纤。

1.1.2 实验动物及主要试剂:二级SD大鼠102只,平均体重 $(210\pm 10)\text{g}$,雄性,年龄8—10周,由第四军医大学实验动物中心提供;四氯四碘荧光素钠(虎红, RB, 北京化工厂,批号:870627),密封避光保存,使用前用生理盐水稀释为2.5%的浓度;小鼠抗nestin抗体(Chemicon);大鼠抗小鼠IgG(Sigma);生物素-卵白素-HRP复合物(Sigma)。

1.2 行为训练和制动器材

1.2.1 Morris水迷宫:为一盛有乳白色溶液,直径 150cm ,高 70cm 的圆池,水温 $(23\pm 2)^{\circ}\text{C}$,水深 47cm 。在池壁上分别标记东南西北四个入水点,将水池分为四个象限。随机选一象限,将一直径 8cm 、高 45cm 的乳白色站台固定其内,站台没于水面下 2cm 。训练期间周围参照物保持不变。

1.2.2 制动笼:一网状笼,长 40cm ,直径 6cm ,头端有一容器给予食物和水,能使大鼠的四肢和身体处

于固定状态。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及处理:将102只大鼠随机分为训练3d、7d、14d、21d、28d、35d、42d、49d组,制动3d、7d、14d、21d、28d、35d、42d、49d组及正常对照组。每组各6只。训练及制动组大鼠从造模1d后开始分别给予行为训练或制动,正常对照组不予处理。训练组大鼠每天上午选择同一时间进行训练,每天训练3次,每次间隔 10min ;制动组大鼠持续固定饲养于制动笼中。

1.3.2 左侧海马梗死模型制作方法:模型制作方法采用光化学法制作,该方法由Watson等于1985年首次报道^[3],后被广泛应用于不同动物脑梗死的研究,我们在此基础上研制成功光化学法诱导的单侧海马梗死模型,该模型经HE染色可见明确梗死灶^[4],体积不波及海马外组织,且动物死亡率低,重复性好。具体方法:1%巴比妥钠($50\text{mg}/\text{kg}$)常规麻醉训练组和制动组大鼠,将其俯卧固定于大鼠立体定位仪上,切开头皮暴露颅骨,在前囟后 4.8mm 、中线向左旁开 3.5mm 处,用牙科钻轻轻钻一个直径约 1mm 的骨窗,光纤管尾端至皮质下 4.0mm (海马CA1区)。于股静脉注射虎红($70\text{mg}/\text{kg}$)后,立即通过光纤管照射左侧海马组织。光照强度: $0.37\text{W}/\text{cm}^2$,照射时间: 30min 。术后缝合头皮,正常喂养。

1.3.3 水迷宫训练:术后第1天,将训练组大鼠放于水迷宫中适应 2min ,从第2天开始,随机选择站台所占象限外的另3个象限之一作为入水点,将大鼠面向池壁放入池中,观察记录大鼠入水至爬上平台的时间(潜伏期)。如 2min 内找不到平台,则将大鼠引至平台并在其上放置 30s 后再放回笼中,此时潜伏期记为 120s 。训练时分别从3个不同的入水点入水,每次不同动物的入水点相同,训练顺序固定。此项主要训练大鼠的学习记忆功能。

1.3.4 取材及处理:训练和制动组大鼠分别于不同时间点灌注取材,正常对照组大鼠在喂养28d后灌注取材。1%戊巴比妥钠($50\text{mg}/\text{kg}$)常规麻醉大鼠,打开胸腔,拨开心包膜,暴露心脏,剪开右心房放出血液,剪开左心室将灌注头插入主动脉并用动脉夹固定,先快速灌注 150ml 生理盐水将血管内的血液冲洗干净,再缓慢注入10%福尔马林液 400ml 灌流固

定 1.5h。灌注完毕后,用咬骨钳咬开颅骨,小心取出完整的脑组织,放入 10%福尔马林液中固定 2h,再换入 20%蔗糖液中直至标本沉底,4℃冰箱保存过夜。我们在光纤管入脑处冠状切开造模大鼠脑组织,可见海马或其附近脑组织有直径约 3mm 的圆形梗死灶。选取梗死灶位于海马部位的标本,进行连续冠状冰冻切片,片厚 30μm,隔五取一,进行免疫组化染色。

1.3.5 免疫组化染色:按 ABC 法进行抗 nestin 免疫组织化学反应,切片先放入 KPBS 液(含 0.3% TritonX-100 和 3%牛血清白蛋白)中室温浸泡 30min,然后加入小鼠抗 nestin (1:1000, Chemicon) 4℃下孵育 48h,再放入生物素标记的大鼠抗小鼠 IgG(1:500, Sigma),室温孵育 2h,接下来放入生物素-卵白素-HRP 复合物(ABC, 1:500, Sigma),室温孵育 2h。以上每一步骤之后均用 0.01mol/L KPBS 液充分漂洗 3 次,每次 10min。最后用葡萄糖氧化酶-DAB-硫酸镍胺法呈色,免疫阳性物呈紫蓝色。阴性对照用一抗稀释液(1%小牛血清白蛋白+0.3% TritonX-100+0.01mol/L KPBS, pH 7.4)替代孵育,其他反应步骤相同。最后常规贴片、脱水、透明、封片。全部反应分 4 轮进行,每一轮均严格将同一时间点的训练组和制动组切片一起反应,以保证二者具有可比性,减少实验误差。所有阴性对照切片不着色或仅呈淡的背景色。

1.4 图像分析

用德国产 LEICA QWin 图像处理与分析系统进行图像分析。从每只大鼠脑中片中选择典型反应的 3 张切片检测海马结构及海马齿状回区 nestin 免疫

反应的光密度值,测量时,不同鼠脑不同套切片之间,相同解剖结构的测量区域位置相同,每一解剖结构各测 3 个视野,每个视野测量的像素量(即被测量面积)保持一致。以上测量值与相应阴性对照切片测量值相减后的平均值为各区域的最终平均光密度。

1.5 统计学分析

结果采用 SPSS11.0 统计软件进行数据处理,按完全随机设计资料进行方差分析,并进一步进行多个样本均数间两两比较的 LSD/t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠梗死侧海马齿状回区 nestin 阳性细胞表达的变化

Nestin 阳性表达细胞镜下可见两种类型,一种类似星形胶质细胞,着色部位在胞质和突起,此种细胞镜下又可呈现胞体较小、突起长而纤细的纤维状细胞和胞体肿胀、突起粗短、深染的肥大型细胞两种形态。本研究中,我们发现,正常对照组大鼠可见少量胶质细胞样 nestin 表达,其平均光密度为(6.2±1.1),着色较淡,突起较短。与正常对照组相比,无论是制动 7d 组还是训练 7d 组大鼠,其 DG 区 nestin 表达明显增多($P<0.01$),但制动组和训练组之间无明显差异($P>0.05$)。而随着缺血时间的延长,训练组和制动组 nestin 的表达逐渐增高,训练组在第 28 天达到峰值,制动组在第 14 天达到峰值,此时 nestin 阳性细胞着色加深,胞核肿胀,凸起明显增长,多伸向缺血梗死区。从第 14—42 天,训练组 nestin 的表达均明显高于制动组($P<0.01$),此外,制动第 49 天组 nestin 的表达即已接近正常水平(见表 1,图 1—2)。

表 1 各组大鼠梗死侧海马 DG 区 nestin 的表达(平均光密度) (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天	第 42 天	第 49 天
训练组	8.2±0.9	17.3±2.4	30.6±6.5 ^①	34.8±2.1 ^①	35.8±7.3 ^①	25.4±4.7 ^①	17.6±5.2 ^①	12.4±7.5
制动组	7.9±1.1	16.3±3.7	26.3±3.8	24.5±7.3	19.7±8.5	17.1±2.7	12.3±6.5	9.8±2.4

与制动组比较:① $P<0.01$

2.2 各组大鼠梗死对侧海马齿状回区 nestin 阳性细胞表达的变化

梗死对侧齿状回区 nestin 阳性细胞表达的变化总的来说不如梗死侧明显,训练组细胞的形态上以纤维状细胞为主,而制动组多见突起粗短、深染的肥大型细胞,纤维状细胞少见。与正常组相比较,制动

28d 组的表达明显高于正常组($P<0.05$),而训练第 21—35 天的表达也高于正常组($P<0.05$)。此外,第 21—35 天,训练组的表达明显高于制动组($P<0.05$)。其余训练各组与制动组之间无明显差异,都接近正常水平($P>0.05$)(见表 2,图 3—4)。

表 2 各组大鼠梗死对侧海马 DG 区 nestin 的表达 (平均光密度) (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天	第 42 天	第 49 天
训练组	5.8±1.9	6.1±1.3	7.0±0.3	12.5±2.3 ^②	18.4±1.4 ^②	8.6±3.9 ^①	7.2±2.3	5.4±2.7
制动组	6.0±0.8	6.3±0.5	6.8±1.1	6.7±0.6	8.5±4.1	6.3±2.1	5.9±3.8	6.6±1.9

与制动组比较:①P<0.05;②P<0.01

图1 训练第 28 天梗死侧 DG 区 nestin 的表达 (ABC, ×400) 图 2 制动第 28 天梗死侧 DG 区 nestin 的表达 (ABC, ×400) 图 3 训练第 28 天梗死对侧 DG 区 nestin 的表达 (ABC, ×400) 图 4 制动第 28 天梗死对侧 DG 区 nestin 的表达 (ABC, ×400)



3 讨论

自 Reynolds 等人首次分离并培养出神经干细胞^[1-2], 研究发现成体脑内存在神经发生, 且与脑损伤的自身修复和生理状态下某些脑区的功能相关。目前认为脑室和脑室下区以及海马齿状回区是成年神经发生的主要区域。我们在本研究中制作大鼠单侧海马缺血模型, 观察了缺血后 DG 区 NSCs 的发生以及行为训练对其生发规律的影响, 为脑缺血疾病的神经康复提供一定的理论基础和依据。

NSCs 的增殖能力在脑缺血后神经再生过程中具有关键作用, 其决定了神经损伤后的自身修复水平, 故如何提高 NSCs 的增殖能力已经成为各种研究的重点。

康复训练对脑梗死的作用, 早在 20 世纪 90 年代中期, 就有学者研究发现脑梗死大鼠的行为功能在丰富环境作用下恢复加快, 考虑是由于大脑在丰富环境下, 其损伤的感觉运动区周边皮质结构发生改变, 包括蛋白成分、树突发芽、突触联系面积的大小以及皮质重量改变等, 其中运动起了非常重要的作用^[5-6]。姚志彬等学者研究也发现长期运动能促进神经元树突的出芽并能建立新的突触联系, 运动不仅能使海马、小脑和脊髓内突触素的数量增加, 同时也延缓海马、小脑内突触素随年龄的减少^[7-8]。有研究表明, 复杂环境本身能够使脑缺血后海马神经元的突触发生增加, 并能促进树突生长^[9]。以上都提示我们, 功能训练可以促进缺血损伤区附近神经环路的恢复, 有利于患者神经功能的恢复及重建。

行为学训练是康复训练的一种, 它主要训练动物的本能行为能力, 如学习、记忆、空间辨别及觅食等, 促进受损的行为学功能的恢复。在本研究中, 我们选用水迷宫进行训练, 因为大鼠的梗死灶位于海马区, 而水迷宫被证实是学习记忆能力最好的训练工具。Morris 水迷宫是 20 世纪 80 年代初, 由英国心理学家 Morris 和其同事设计并在学习记忆机制研究中应用的^[10]。我们既往在此模型基础上的一系列研究表明, 双侧海马梗死大鼠经过水迷宫训练后, 其受损的学习记忆明显得到恢复, 在训练后 3 周基本可达正常水平, 而制动组大鼠的学习记忆能力虽然也有一定恢复, 但始终低于正常水平^[11]。说明水迷宫训练可以促进海马梗死大鼠的学习记忆能力的恢复。我们的实验发现脑缺血大鼠海马区和颞叶皮质 NR2B 的表达在行为学训练后得到增强, 由于 NR2B 是学习记忆的关键物质, 我们认为增强 NR2B 的表达可能是行为学训练提高大鼠学习记忆能力的机制之一^[12]。

我们的研究也证实, 行为学训练可以促进海马 DG 区多聚唾液酸神经细胞黏附分子 (polysialic acid-neural cell adhesion molecule, PSA-NCAM) 阳性神经元的表达^[13], PSA-NCAM 是一种糖蛋白, 主要在新生成的齿状回颗粒细胞的胞体和树突发育时表达, 其作用主要是介导细胞间黏附和识别^[14], 是神经干细胞迁移的特殊标记物, 与 NSCs 的迁移有着密切关系^[15-17], 因此我们认为行为学训练可以促进 NSCs 的迁移能力。以上的研究结果表明行为学训练

能积极促进缺血损伤后脑组织的神经再生,可能是脑缺血大鼠学习记忆能力经行为训练后可以恢复的机制之一。

本实验中,造模后制动和训练组梗死侧 DG 区 nestin 的表达高于正常组,这是因为脑梗死本身作为一种应激,其释放的各种应激因子促进了海马 DG 区 NSCs 的增殖。近期的体内外研究也分别表明,组织缺氧能够刺激神经干细胞的增殖^[18-19]。而随着时间的推移,训练组的 nestin 的表达高于制动组,这说明行为训练可以促进神经干细胞的增殖。

行为学训练促进神经干细胞的增殖,其具体机制可能是通过各种脑损伤修复因子来实现的。本研究结果提示:行为学训练促进神经干细胞增殖和迁移的重要机制之一有可能是通过神经生长因子实现的^[20]。近年国内的研究表明,探索学习能够促进梗死灶周围微血管增生^[21],随后的研究发现这可能与增加血管内皮生长因子及其受体表达有关,血管生成可改善神经干细胞生发的微环境,促进其增殖^[22]。探索学习能使梗死灶周围碱性成纤维生长因子表达增加,从而促进神经干细胞的增殖^[23]。虽然行为学训练可以促进 NSCs 的增殖,但是其具体作用途径尚待研究。

参考文献

- [1] Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes[J]. *J Neurosci*, 1992, 12(11):4565—4574.
- [2] McKay R. Stem cells in the central nervous system[J]. *Science*, 1997, 276:66—71.
- [3] Watson BD, Dietrich WD, Busto R, et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis[J]. *Ann Neurol*, 1985, 17(5):497—504.
- [4] 潘惠娟,李玲,刘卫,等.光化学法诱导大鼠单侧海马梗死模型的实验研究[J].*中国康复医学杂志*,2005,20(2):87—89.
- [5] Ohlsson AL, Johansson BB. Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats [J]. *Stroke*, 1995, 26(4): 644—649.
- [6] Johansson BB, Ohlsson AL. Environment, social interaction, and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat [J]. *Exp Neurol*, 1996, 139(2): 322—327.
- [7] 陈运才,姚志彬,陈以慈,等.运动对小鼠小脑皮质和脊髓内突触素年龄变化的影响[J].*解剖学报*,1994,25(3):263—267.

- [8] 洪岸,姚志彬,顾耀铭,等.老年大鼠学习记忆减退与海马结构的突触素改变[J].*解剖学报*,1996,27(2):164—168.
- [9] Briones TL, Suh E, Jozsa L, et al. Behaviorally induced synaptogenesis and dendritic growth in the hippocampal region following transient global cerebral ischemia are accompanied by improvement in spatial learning [J]. *Exp Neurol*, 2006, 198(2): 530—538.
- [10] Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions [J]. *Nature*, 1982, 297(5868):681—683.
- [11] 李玲,潘惠娟.康复训练对双侧海马梗死大鼠学习记忆功能的影响[J].*第四军医大学学报*,2004,25(22):2102—2104.
- [12] 潘惠娟,李玲,杨华,等.行为训练对大鼠海马梗死灶周围及颞叶皮层 NR2B 表达的影响 [J]. *中国康复理论与实践*,2006,12(1): 5—7.
- [13] 江山,李玲,袁华,等.行为学训练对大鼠海马梗死后齿状回区神经干细胞迁移能力的影响 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2006,28(8):510—514.
- [14] Rutishauser U, Acheson A, Hall AK, et al. The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions[J]. *Science*, 1988, 240(4848):53—57.
- [15] Brusés JL, Rutishauser U. Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development [J]. *Biochimie*, 2001, 83(7):635—643.
- [16] Ulfing N, Chan WY. Expression patterns of PSA-NCAM in the human ganglionic eminence and its vicinity: role of PSA-NCAM in neuronal migration and axonal growth [J]? *Cell Tissues Organs*, 2004, 177(4):229—236.
- [17] Kiss JZ. A role of adhesion molecules in neuroglial plasticity [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1998, 140(1—2):89—94.
- [18] Rodrigues CA, Dıogo MM, da Silva CL, et al. Hypoxia enhances proliferation of mouse embryonic stem cell-derived neural stem cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 106(2):260—270.
- [19] Santilli G, Lamorte G, Carlessi L, et al. Mild hypoxia enhances proliferation and multipotency of human neural stem cells[J]. *PLoS One*, 2010, 5(1):e8575.
- [20] 江山,李玲,袁华,等.行为学训练对大鼠海马梗死后齿状回区神经生长因子表达的影响 [J]. *中国康复理论与实践*,2006,13(2): 207—209.
- [21] 马向阳,贾子善,槐雅萍,等.探索学习对局灶性脑梗死大鼠学习记忆和新生血管的影响 [J]. *中国康复医学杂志*,2008,23(12): 1086—1088.
- [22] 马向阳,贾子善,槐雅萍,等.探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围 Flk-1、VEGF 表达的影响[J].*中国康复医学杂志*,2009,24(3):219—221.
- [23] 闫桂芳,高俊淑,李娜,等.探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质 bFGF 表达的影响. *中国康复医学杂志*,2009,24(1): 49—51.