

· 基础研究 ·

亚低温处理大鼠脑缺血再灌注损伤后神经干细胞增殖的动态变化

吴国祥 李承晏 刘春英 夏军

【摘要】 目的 探讨亚低温处理大鼠脑缺血再灌注损伤后缺血侧脑组织神经干细胞(NSC)增殖的动态变化。**方法** 采用大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型,大脑中动脉阻塞 2 h,再灌注损伤 3,7,11,14,18,28 d,用免疫组织化学方法分别检测假手术组、对照组和亚低温组缺血侧脑组织 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)阳性细胞数。**结果** 假手术组缺血侧脑组织存在少量 BrdU 阳性细胞,亚低温组在缺血再灌注损伤 3,7,11,14,18,28 d 时缺血侧脑组织 BrdU 阳性细胞数均明显多于对照组,且亚低温组缺血侧脑组织 NSC 的增殖高峰期较对照组延长。**结论** 亚低温可促进大鼠脑缺血再灌注损伤后缺血侧脑组织 NSC 的进一步增殖。

【关键词】 脑缺血再灌注损伤; 亚低温; 神经干细胞

Changes in neural stem cell proliferation after rat cerebral ischemia/reperfusion injury is treated with mild hypothermia WU Guo-xiang*, LI Cheng-yan, LIU Chun-ying, XIA Jun. * Department of Neurology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】 Objective To study changes in neural stem cell proliferation in ischemic brain tissue after cerebral ischemia/reperfusion injury treated with mild hypothermia. **Methods** The middle cerebral arteries (MCA) of Sprague-Dawley rats were occluded for 2 hours, then reperused for 3, 7, 11, 14, 18 and 28 days. Using immunohistochemical staining, the bromodeoxyuridine (BrdU)-positive cells in the brain tissue of the operationally intervened side were examined in a sham-operation group, a control group, and in rats treated using mild hypothermia. **Results** There were a few BrdU-positive cells in the sham-operated rats, but there were obviously more in the mild hypothermia group than in the control group. The peak period for proliferation of neural stem cells in the ischemic brain tissue was longer in the mild hypothermia group than that in the control group. **Conclusion** Mild hypothermia may promote proliferation of neural stem cells in ischemic brain tissue after cerebral ischemia/reperfusion injury.

【Key words】 Cerebral ischemia, reperfusion injury; Hypothermia; Neural stem cells

有研究表明,成年哺乳动物脑内存在神经干细胞(neural stem cell, NSC),且一定的生理或病理刺激可引起 NSC 的增殖和分化,从而促进脑缺血后神经功能的恢复^[1]。近年来,虽然对亚低温的脑保护作用进行了较多的研究,但是多局限在缺血半暗带的保护上^[2],而有关亚低温对大鼠脑缺血再灌注损伤后 NSC 的增殖是否有促进作用的研究很少。本实验采用大鼠大脑中动脉闭塞再灌注损伤模型,观察亚低温处理大鼠脑缺血再灌注损伤后缺血侧脑组织 NSC 增殖的动态变化。

材料与方法

一、动物与分组

健康 SD 大鼠 78 只,雌雄不限,体重为 170 ~ 230 g,由湖北省医药工业研究所实验动物中心提供,并随机分为假手术组、对照组及亚低温组。假手术组

6 只,栓线仅插入 8 mm,使大脑中动脉起始部不致阻塞;对照组脑缺血 2 h 再灌注损伤 3,7,11,14,18,28 d,每时间点 6 只,共 36 只;亚低温组脑缺血 2 h 再灌注损伤 3,7,11,14,18,28 d,并在脑缺血后立即开始诱导亚低温且持续 14 h,每时间点 6 只,共 36 只。对照组与亚低温组在脑缺血再灌注损伤各相应时间点的次日深度麻醉大鼠并断头取脑。

二、动物模型制作和亚低温处理

采用改良的线栓法制作大鼠大脑中动脉闭塞再灌注损伤模型^[3]。脑缺血后立即将大鼠置于温控环境中以诱导亚低温,诱导时间约为 30 min,且使大鼠体温稳定地控制在(33 ± 1)℃,持续 14 h,并自然复温至正常体温。

三、5-溴脱氧尿嘧啶核苷标记和标本制备

3 组大鼠在处死前 1 d 每隔 8 h 腹腔注射 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(bromodeoxyuridine, BrdU)(50 mg/kg 体重, Sigma 公司产品)1 次,共 3 次,于第 3 次注射后 8 h 立即深度麻醉大鼠,并经心脏先后灌注肝素化的生理盐水和 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 值

作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院神经内科(吴国祥、李承晏、刘春英),康复医学科(夏军)

7.4)各 500 ml 后断头取脑,并将其置于 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 值 7.4)中固定;取缺血侧皮质、海马、侧脑室旁的脑组织块,常规脱水、浸蜡、包埋和切片,片厚约 8 μm 。

四、免疫组织化学染色

石蜡切片经常规脱蜡水化后,用过氧化物酶阻断剂来阻断内源性过氧化物酶的活性,PBS 冲洗后再用 S-P 试剂盒(Sigma 公司产品)标记缺血脑组织中处于增殖状态的 NSC(BrdU 阳性细胞),具体操作方法参照 S-P 试剂盒说明书,显微镜下细胞内有棕褐色颗粒者为 BrdU 阳性细胞,每张切片上对梗死灶周边皮质、海马、侧脑室旁脑组织分别选择 3 个具有代表性的 1 mm² 视野,计数 BrdU 阳性细胞数,并计算其均数。

五、统计学分析

数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 F 和 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

3 组不同部位、时间点 BrdU 阳性细胞数比较见表 1~3。

由表 1 可见,假手术组未见 BrdU 阳性细胞;亚低温组各时间点缺血侧梗死灶周边皮质的 BrdU 阳性细胞数均明显多于对照组($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$);亚低温组缺血侧梗死灶周边皮质的 NSC 增殖高峰期(14 d)较对照组(7 d)延长。

从表 2,3 可以看出,对照组各时间点缺血侧海马、

侧脑室旁脑组织的 BrdU 阳性细胞数均较假手术组明显增多($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$);亚低温组各时间点缺血侧海马、侧脑室旁脑组织的 BrdU 阳性细胞数均显著多于对照组($P < 0.01$);亚低温组缺血侧海马、侧脑室旁脑组织的 NSC 增殖高峰期(14 d)均较对照组(7 d)延长。

讨 论

研究表明,亚低温能降低脑细胞的新陈代谢和氧耗,诱导脑组织的缺血耐受现象,提高缺血脑组织的缺血耐受力,减少氧自由基、一氧化氮、兴奋性氨基酸的产生和钙超载形成,从而上调抑凋亡基因及下调促凋亡基因来发挥其抗缺血半暗带的损伤神经细胞凋亡作用^[2]。近年研究提示,在成年大鼠脑内存在 NSC,且主要位于海马齿状回颗粒下区和侧脑室下区^[1,4],并因其具有自我增殖和分化的特性而促进大脑的可塑性,最终修复受损的神经功能。目前利用 NSC 治疗脑梗死的主要方法有促进内源性 NSC 激活和 NSC 移植^[4,5],而前者可避免细胞移植手术的创伤性和细胞移植后可能存在的致瘤性。有研究表明,某些药物应用于大鼠脑缺血再灌注损伤后可在一定程度上刺激缺血侧脑组织 NSC 的增殖,从而发挥其修复受损神经细胞的作用^[6]。但众所周知药物均有一定的副作用,而物理疗法可以避免药物带来的副作用,因此能否使用物理疗法如亚低温来促进大鼠脑缺血再灌注损伤后缺血侧脑组织 NSC 的增殖成为本研究的主题。

表 1 3 组不同时间点缺血侧梗死灶周边皮质的 BrdU 阳性细胞数比较(个/mm², $\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	BrdU 阳性细胞数					
		3 d	7 d	11 d	14 d	18 d	28 d
假手术组	6	—	—	—	—	—	—
对照组	36	34.8 ± 2.2	87.5 ± 6.4	74.7 ± 5.6	50.8 ± 3.4	32.7 ± 1.9	26.5 ± 3.1
亚低温组	36	45.7 ± 4.9*	144.8 ± 8.2 [#]	154.5 ± 7.6 [#]	168.8 ± 7.8 [#]	149.6 ± 8.3 [#]	107.2 ± 4.3 [#]

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

表 2 3 组不同时间点缺血侧海马的 BrdU 阳性细胞数比较(个/mm², $\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	BrdU 阳性细胞数					
		3 d	7 d	11 d	14 d	18 d	28 d
假手术组	6	8.2 ± 0.6	7.5 ± 0.4	7.7 ± 0.3	8.8 ± 0.8	8.6 ± 0.5	7.6 ± 0.3
对照组	36	16.4 ± 3.1*	53.8 ± 4.5*	42.7 ± 3.9*	31.5 ± 3.2*	20.7 ± 1.6*	11.5 ± 2.4 [△]
亚低温组	36	34.8 ± 4.9 [#]	100.8 ± 6.4 [#]	114.5 ± 6.8 [#]	132.6 ± 5.9 [#]	107.6 ± 6.8 [#]	52.7 ± 4.7 [#]

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$,[△] $P < 0.05$;与对照组比较,[#] $P < 0.01$

表 3 3 组不同时间点缺血侧侧脑室旁脑组织的 BrdU 阳性细胞数比较(个/mm², $\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	BrdU 阳性细胞数					
		3 d	7 d	11 d	14 d	18 d	28 d
假手术组	6	13.8 ± 1.4	11.7 ± 1.1	12.7 ± 1.5	12.8 ± 2.1	11.3 ± 1.2	13.5 ± 2.0
对照组	36	25.3 ± 2.3*	89.7 ± 5.7*	78.2 ± 6.9*	53.2 ± 3.7*	36.1 ± 2.5*	17.3 ± 1.3 [△]
亚低温组	36	51.2 ± 2.8 [#]	130.5 ± 7.6 [#]	149.5 ± 8.5 [#]	160.7 ± 6.8 [#]	138.8 ± 6.1 [#]	92.7 ± 4.8 [#]

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$,[△] $P < 0.05$;与对照组比较,[#] $P < 0.01$

BrdU 是胸腺嘧啶脱氧核苷类似物,在细胞有丝分裂的 S 期整合入新合成的 DNA,故 BrdU 阳性细胞可被视为处于增殖状态的 NSC。本实验通过观察脑缺血再灌注损伤后各相应时间点内源性 NSC 的增殖水平来间接反映脑缺血再灌注损伤后一段时间内 NSC 的内源性激活情况。本实验结果显示,假手术组海马和侧脑室旁脑组织存在少量的 NSC,而对照组各时间点缺血侧梗死灶周边皮质、海马和侧脑室旁脑组织 NSC 的增殖均明显较假手术组活跃,这与以往的文献报道^[7]相符。本实验结果还显示,亚低温组各时间点缺血侧梗死灶周边皮质、海马和侧脑室旁脑组织 NSC 的增殖均明显较对照组活跃,且亚低温组缺血侧梗死灶周边皮质、海马和侧脑室旁脑组织 NSC 的增殖高峰期均较对照组长,这表明亚低温可从时间、空间和数量上进一步促进大鼠脑缺血再灌注损伤后缺血侧脑组织 NSC 的增殖,而亚低温是如何刺激缺血侧脑组织 NSC 的增殖目前还不清楚,可能的机制有:(1)由于脑缺血本身在一定程度上能刺激内源性 NSC 增殖,而亚低温处理后可相对降低上述处于增殖状态的 NSC 的氧耗和新陈代谢,从而增强其缺氧耐受力,保存更多的处于增殖状态的 NSC;(2)可稳定缺血侧脑组织 NSC 膜内外的水、电解质、酸碱平衡和减轻缺血侧脑组织的炎症反应,从而进一步优化 NSC 增殖所要求的微环境;(3)可调节机体应激反应产生的与 NSC 增殖有关的细胞因子活性和基因水平,从

而刺激缺血侧脑组织 NSC 增殖。目前关于亚低温促进缺血侧脑组织 NSC 增殖的具体机制还不明确,有待于今后进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Komitova M, Zhao LR, Gido G, et al. Postischemic exercise attenuates whereas enriched environment has certain enhancing effects on lesion-induced subventricular zone activation in the adult rat. *Eur J Neurosci*, 2005, 21: 2397-2405.
- 2 吴国祥, 李承晏, 李涛, 等. 亚低温对大鼠脑缺血再灌注损伤后 Bcl-2, Bax 和 c-fos 蛋白表达及损伤神经细胞凋亡的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24: 605-607.
- 3 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 1992, 119: 493-501.
- 4 Haas S, Weidner N, Winkler J. Adult stem cell therapy in stroke. *Curr Opin Neurol*, 2005, 18: 59-64.
- 5 Szentirmai O, Carter BS. Genetic and cellular therapies for cerebral infarction. *Neurosurgery*, 2004, 55: 283-286.
- 6 Shyu WC, Lin SZ, Yang HI, et al. Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony stimulation factor-stimulated stem cells. *Circulation*, 2004, 110: 1847-1854.
- 7 Jin K, Minami M, Lan JQ, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 4710-4715.

(修回日期:2006-05-06)

(本文编辑:松 明)



神思
SYNTHESIS

SL-100 型激光治疗仪

镇痛抗炎新选择

半导体激光治疗仪临床适应证:

- 带状疱疹及后遗神经痛
- 促进各种创面、溃疡面愈合(糖尿病、术后、下肢静脉曲张)
- 腰背部疼痛
- 湿疹

技术特点:

- 1、对人体组织穿透性好、最深可达 7cm,治疗效果明显。
- 2、为非侵入性外照射,无创伤,无痛苦,使用寿命长。
- 3、有更好的价格性能比。

请在医生指导下使用

全国 24 小时免费咨询电话: 8008606660 服务电话: 0531-86515050
传真: 0531-86515050-888
<http://www.shensiyiliao.com>
E-mail: shensiyiliao@163.com
地址: 济南市高新东区舜华路 1 号齐鲁软件园 F 座 B516 室 邮编: 250101

山东神思医疗设备有限公司出品