

· 基础研究 ·

脑缺血再灌注损伤后神经细胞巢蛋白
和干细胞因子基因表达

郑青立 龚薇薇 王玲 孙成云 郭云良

【摘要】目的 研究大鼠脑缺血再灌注损伤后神经细胞巢蛋白(nestin)和干细胞因子(SCF)基因表达的变化。**方法** 成年健康雌性SD大鼠36只,以线栓法建立大脑中动脉缺血再灌注模型,随机分为缺血1.5 h再灌注2 h、6 h、12 h、24 h、2 d、3 d、7 d、14 d组和假手术组,每组4只。应用原位杂交技术检测脑缺血再灌注后脑组织 nestin 和 SCF mRNA 的表达。**结果** 假手术组皮质、纹状体和室旁区 nestin mRNA 表达很弱。缺血再灌注后 nestin mRNA 表达,皮质除2 h以外、纹状体除2 h、6 h以外、室旁区除2 h、6 h、14 d以外各时间点均明显高于假手术组。假手术组皮质、纹状体和室旁区 SCF 表达很弱。缺血再灌注后 SCF mRNA 表达,皮质除2 h、6 h、12 h以外、纹状体除2 h、6 h以外、室旁区除2 h、14 d以外各时间点均明显高于假手术组。**结论** 脑缺血再灌注后 SCF mRNA 表达可能具有促进神经干细胞增殖作用。

【关键词】 脑缺血; 巢蛋白; 干细胞因子; 大鼠

The gene expressions of nestin and stem cell factor in neurons after cerebral ischemia-reperfusion in rats

ZHENG Qing-li*, GONG Wei-wei, WANG Ling, SUN Cheng-yun, GUO Yun-liang. * Shandong Qingdao Convalescent Hospital, Qingdao 266071, China

【Abstract】Objective To study the gene expressions of nestin and stem cell factor(SCF) in neurons after ischemia-reperfusion injury in rat brain. **Methods** Thirty-six adult female rats were subject to left middle cerebral artery occlusion for 1.5h and different hours of reperfusion. In site hybridization was used to examine the expression of nestin and SCF mRNA in the rats subjected to 2h, 6h, 12h, 24h, 2d, 3d, 7d, 14d of reperfusion and sham-operation group ($n=4$). **Results** (1) Nestin expression in cortex, striatum and extraventricular zone was weak in the sham-operation group, and increased markedly in the ischemic hemisphere compared with sham-operation group except of reperfusion 2h in cortex, 2h, 6h in striatum, 2h, 6h and 14d in extraventricular zone. (2) SCF expression in cortex, striatum and extraventricular zone was weak in the sham-operation group, and increased markedly in the ischemic hemisphere compared with sham-operation group except of reperfusion 2h, 6h, 12h in cortex, 2h, 6h in striatum, 2h and 14d in extraventricular zone. **Conclusion** It is suggested that SCF expression might enhance the proliferation of neural stem cells following ischemia-reperfusion in rats.

【Key words】 Cerebral ischemia; Nestin; Stem cell factor; Rats

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是中枢神经系统中具有增殖和分化能力的一类细胞,是神经系统发育早期特定的细胞群体,能长久地保持增殖和分化能力^[1]。巢蛋白(nestin)是神经干细胞体外培养常用的分子标记物,它是一种仅存在于神经上皮干细胞的中间丝成分,其表达有特定的时序性。研究表明,缺氧诱导小鼠神经再生;干细胞因子(stem cell factor, SCF)和成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor-2, FGF-2)是缺氧诱导的神经再生的因子;SCF可能刺激整体动物神经再生^[2]。本研究应用原位杂交技术

检测神经干细胞特异性标记物 nestin 和 SCF 表达的变化,以探讨脑缺血再灌注后神经干细胞增殖水平的变化。

材料与方法**一、实验动物和分组**

成年健康雌性SD大鼠36只,体重230~280 g,清洁级,由中国科学院上海实验动物中心提供。应用线栓法经左侧颈外-颈内动脉插线建立左侧大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)再灌注模型,随机分为缺血1.5 h再灌注2 h、6 h、12 h、24 h、2 d、3 d、7 d、14 d组和假手术组,每组4只。假手术组除不插线外,其余步骤同实验组。

二、标本采集和组织切片的制备

各组动物在规定的时间内取材,假手术组于术后

基金项目:山东省自然科学基金项目(No. Y2001C04),山东省卫生厅资助项目(No. 2001CA1DRB1)

作者单位:266071 青岛,山东省青岛疗养院门诊部(郑青立);青岛大学医学院脑血管病研究所(龚薇薇、王玲、孙成云、郭云良)

通讯作者:郭云良

24 h 取材。大鼠在 10% 水合氯醛 (300 mg/kg 体重) 麻醉下,经左心室插管至升主动脉,依次灌入生理盐水 200 ml、4% 多聚甲醛 300 ml,灌注完毕后开颅,于前囟前 2 mm 至前囟后 3 mm 之间取脑,切块厚度 5 mm,置入 4% 多聚甲醛 (含 1/5 000 DEPC) 中固定 2 h,蒸馏水浸泡 4 h。常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡,包埋。于前囟前 1 mm 至前囟后 2 mm 之间连续冠状切片,厚度 7 μ m,粘于经多聚赖氨酸处理后的玻片上,置入 37℃ 烤箱过夜后室温保存,用于 nestin 和 SCF 原位杂交及其对照实验。

三、原位杂交

nestin 和 SCF mRNA 原位杂交试剂盒、DAB 试剂盒均由武汉博士德生物工程有限公司提供。按照试剂盒说明操作,DAB 显色,光镜下观察,细胞浆出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。取部分切片不加探针以 0.1 M PBS 代替,不出现阳性细胞,说明探针特异性强。

四、统计学分析

高倍镜下 ($\times 400$) 在皮层、纹状体和室旁区随机各取 4 个视野计数阳性细胞,各时间点阳性细胞数以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较用 t 检验。

结 果

一、脑缺血再灌注后 nestin mRNA 表达的变化

假手术组皮质、纹状体和室旁区 nestin 表达很弱。实验组缺血侧皮质 nestin 的表达于再灌注 2 h 后开始增高,但与假手术组比较无显著性差异,自 6 h 开始有显著性增高,至 24 h 达高峰,2 d 回落,7 d 又出现最高峰,以后渐降低,14 d 仍较假手术组高;纹状体和室旁区 nestin 的表达规律与皮质区基本一致,但其增高自 12 h 始出现显著性差异;至 14 d 室旁区 nestin 表达已恢复至假手术组水平。具体数据详见表 1。

表 1 脑缺血再灌注后 nestin 表达的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	皮质区	纹状体区	室旁区
假手术组	4	9.25 $\pm$ 2.99	13.25 $\pm$ 2.75	20.25 $\pm$ 3.10
缺血再灌注 2 h	4	14.84 $\pm$ 2.24	12.86 $\pm$ 0.74	19.14 $\pm$ 2.91
缺血再灌注 6 h	4	17.08 $\pm$ 0.95 *	14.67 $\pm$ 1.51	19.08 $\pm$ 0.38
缺血再灌注 12 h	4	19.63 $\pm$ 1.56 *	26.25 $\pm$ 0.54 *	5.69 $\pm$ 0.94 *
缺血再灌注 24 h	4	24.57 $\pm$ 5.75 *	28.47 $\pm$ 5.97 *	38.96 $\pm$ 11.37 *
缺血再灌注 2 d	4	18.00 $\pm$ 0.94 *	16.63 $\pm$ 1.39 *	23.56 $\pm$ 0.31 *
缺血再灌注 3 d	4	47.81 $\pm$ 2.54 *	45.75 $\pm$ 0.71 *	60.25 $\pm$ 1.88 *
缺血再灌注 7 d	4	87.92 $\pm$ 3.19 *	66.42 $\pm$ 4.13 *	98.17 $\pm$ 1.13 *
缺血再灌注 14 d	4	25.32 $\pm$ 8.22 *	34.53 $\pm$ 1.62 *	19.65 $\pm$ 0.33

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$

二、脑缺血再灌注后 SCF mRNA 表达

假手术组皮质、纹状体和室旁区 SCF 表达很弱。实验组缺血侧皮质 SCF 的表达于再灌注 2 h 后开始增

高,但与假手术组比较无显著性差异,自 24 h 开始有显著性增高,2 d 回落,3 d、7 d 增高,7 d 出现最高峰,以后渐降低,14 d 仍较假手术组高;纹状体和室旁区 SCF 的表达规律与皮质基本一致,但纹状体 SCF 增高自 12 h、室旁区自 6 h 始出现显著性差异;至 14 d 室旁区 SCF 表达已恢复至假手术组水平。具体数据详见表 2。

表 2 脑缺血再灌注后 SCF 表达的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	皮质区	纹状体区	室旁区
假手术组	4	14.75 $\pm$ 3.59	17.50 $\pm$ 1.91	41.50 $\pm$ 4.65
缺血再灌注 2 h	4	15.42 $\pm$ 6.24	15.29 $\pm$ 2.06	38.10 $\pm$ 10.03
缺血再灌注 6 h	4	16.88 $\pm$ 4.14	17.13 $\pm$ 3.04	49.50 $\pm$ 5.16 *
缺血再灌注 12 h	4	16.44 $\pm$ 1.14	22.94 $\pm$ 1.25 *	48.94 $\pm$ 1.38 *
缺血再灌注 24 h	4	32.72 $\pm$ 0.40 *	42.38 $\pm$ 0.26 *	58.88 $\pm$ 0.26 *
缺血再灌注 2 d	4	21.63 $\pm$ 2.37 *	28.25 $\pm$ 1.43 *	37.75 $\pm$ 1.37 *
缺血再灌注 3 d	4	66.00 $\pm$ 2.37 *	66.00 $\pm$ 1.14 *	71.06 $\pm$ 3.21 *
缺血再灌注 7 d	4	67.50 $\pm$ 3.07 *	64.44 $\pm$ 4.68 *	83.81 $\pm$ 10.51 *
缺血再灌注 14 d	4	30.63 $\pm$ 1.51 *	38.11 $\pm$ 0.51 *	33.35 $\pm$ 12.16

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$

讨 论

一、脑缺血损伤与神经干细胞增殖

神经干细胞缺乏成熟神经细胞所具有的抗原,而存在一种作为神经外胚层标记物的 nestin (巢蛋白,即神经上皮干细胞蛋白,neuroepithelial stem protein),系早期原始神经细胞的标志,故可应用 nestin 免疫反应确定神经干细胞的存在。

在成年中枢神经系统中,一定数量的神经干细胞以休眠、不增殖状态存活在脑内并受中枢神经系统调控。当中枢神经系统受损或变性时,由于细胞微环境的改变 (如出现某些细胞因子),神经干细胞被激活 (或抑制因子失活),在损伤原位出现或异位增生后,在趋化因子的作用下向损伤部位迁移并分化^[3,4]。也有学者认为,成熟神经细胞的逆向分化是内源性神经干细胞的来源之一。他们认为,在脑缺血或其它神经系统的病理状态下,成熟细胞可发生细胞骨架的胚胎回复,出现胚胎神经上皮细胞特性的再表达。此类细胞可能是星形细胞或少突胶质细胞的前体细胞^[5,6]。Li 等^[7]用 MCAO 法制作大鼠局灶性脑缺血模型,于再灌注后 2、3、6、12 h 和 1、2、3、7、8 d 取脑组织用 Western 印迹法作巢蛋白定量分析,结果显示,nestin 在第 7 天达高峰。这些资料表明,脑缺血后,机体通过诱导内源性神经干细胞增多而对缺血损伤产生代偿性适应性反应。本研究实验组的结果与此基本一致。

二、SCF 能否促进神经干细胞增殖

SCF 是一种细胞活素,它可在心脏和其它器官影

响功能、生长和凋亡,它是心肌愈合中对肥大细胞有力的生长和趋向性因子。而在神经生长因子(NGF)、脑源性生长因子(BDNF)、神经营养素 3(NT-3)等的共同作用下,SCF 可作为神经干细胞的存活因子刺激神经干细胞增殖^[8]。

脑缺血能刺激啮齿类动物增生区神经再生。缺氧增加溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)进入细胞,表达出增殖标志物以及幼稚神经元标记物,而没有证据证实 DNA 破坏或半胱氨酸激酶 3(Caspase-3)的激活。缺氧及干细胞因子刺激 BrdU 进入培养基。SCF 受体在成年大鼠的增生区及培养细胞中均有表达,整体动物给予 SCF 能增加 BrdU 标记的幼稚神经元。有研究表明,缺氧导致小鼠皮质培养细胞神经再生,这种作用是通过分泌 SCF 而出现的,SCF 刺激培养细胞和整体动物皮质侧脑室旁区(SVZ)和海马齿状核颗粒下层(SGZ)神经再生^[2]。还有许多因子可以刺激神经再生,如表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)、脑源性神经生长因子(BDNF)^[9]。有个案报道加入神经生长因子或过度表达该因子可以增加成人大脑整体状态下的神经再生^[10]。另有文献报道,半球缺血触发 SGZ 区的神经再生^[11],局灶性缺血诱发缺血周边区皮质^[12]再生,而局灶性脑缺血与 FGF-2 在海马齿状核^[13]祖细胞的增生有关。

以往有研究显示,小鼠短暂性前脑缺血 15 min 后,齿状回神经干细胞增殖加速,再灌注 3、7 和 10 d 时齿状回和脑室周围区神经干细胞数增加,尤以 7 d 时数量最多^[11]。Zhang 等^[14]报道,成年 MCAO 大鼠除了室下区有神经干细胞外,损伤侧大脑皮质也存在神经干细胞增殖。脑缺血后 2~14 d,大脑皮质神经干细胞增多,7 d 达高峰,28 d 后大量减少。本实验结果显示,实验组缺血侧皮质 SCF 的表达自 24 h 开始有显著性增高,7 d 达最高峰;纹状体和室旁区 SCF 的表达规律与皮质基本一致。本研究中 SCF 表达的时间规律与上述研究中神经干细胞增殖的时间规律基本一致,这两者间存在相辅相成的正相关关系,可以提示 SCF 可能对神经干细胞的增殖具有促进作用。

参 考 文 献

- 1 McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science*, 1997, 276:66-71.
- 2 Jin K, Mao XO, Sun Y, et al. Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *J Clin Invest*, 2002, 110:311-319.
- 3 Liu J, Sharp FR. Ischemia induced neurogenesis in the dentate gyrus: an injury-dependent neuroplasticity. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999, 19:614.
- 4 Tzeng SF, Wu JP. Responses of microglia and neural progenitors to mechanical brain injury. *Neuroreport*, 1999, 10:2287-2292.
- 5 Abe K. Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20:1393-1408.
- 6 Doetsch F, Caille I, Lim DA, et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 1999, 97:703-716.
- 7 Li Y, Chopp M. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat. *Brain Res*, 1999, 838:1-10.
- 8 于炳新. 神经干细胞与缺血性脑损伤. *中国临床神经科学*, 2002, 10:213-215.
- 9 Kirschenbaum B, Goldman SA. Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:210-214.
- 10 Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, et al. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *Neurosci*, 2001, 21:6718-6731.
- 11 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. *Brain Res*, 1999, 831: 283-287.
- 12 Jiang W, Gu W, Brannstrom T, et al. Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20:1166-1173.
- 13 Yoshimura S, Takagi Y, Harada J, et al. FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:5874-5879.
- 14 Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, et al. Proliferation and differentiation of precursor cells in the cortex and subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *J Neurosci*, 2001, 105:33-41.

(修回日期:2004-06-28)

(本文编辑:郭正成)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

在 SCI 杂志发表论文不是梦 《中华物理医学与康复杂志》将助您一臂之力

经反复联系,《中华物理医学与康复杂志》已聘请到有丰富科研设计和 SCI 论文写作与审读经验,且担任多家 SCI 杂志审稿专家与顾问、精通汉语的资深外籍华裔专家为本刊审读员。

凡在本刊发表的论文,都将送交该专家审读。凡经审读认为有潜力在 SCI 杂志上发表者,其作者均将获得由本刊转达的专家审读意见以及如何使该文章达到 SCI 杂志要求的修改建议。本刊还将在论文翻译和确定论文投送的 SCI 杂志等方面提供咨询与帮助。

《中华物理医学与康复杂志》编辑部