

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)16-1467-03

新生鼠脑缺血再灌注后海马 CA1 区突触素的表达及意义

宋文秀¹, 曹云涛², 刘华庆³(¹ 珠海市斗门区遵义医学院第五附属医院儿科, 广东 珠海 519100, 遵义医学院附属医院; ² 儿科, ³ 病理科, 贵州 遵义 563003)

Expression of Syn in hippocampal CA1 region after cerebral ischemia-reperfusion in newborn rats and its significance

SONG Wen-Xiu¹, CAO Yun-Tao², LIU Hua-Qing³¹Department of Pediatrics, 5th Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zhuhai 519100, China, ²Department of Pediatrics,³Department of Pathology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China

【Abstract】 AIM: To observe synaptophysin(Syp) expression in hippocampal CA1 region of 7-day-old Wistar rats after cerebral ischemia-reperfusion. **METHODS:** Immunohistochemical method was used to measure the expression of Syp in the hippocampal CA1 region after reperfusion. **RESULTS:** The expression of Syp in hippocampal CA1 region in cerebral ischemia-reperfusion group increased at 3 d after reperfusion and reached the highest level at 7 d. The corrected optical density(COD) value was significantly higher than that in the sham-operation group ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** Neural plasticity occurs at 3 d and continues to 14 d after cerebral ischemia-reperfusion in newborn rats. Syp is a good index indicating the regeneration of neuron and nervous axons.

【Keywords】 cerebral ischemia; synaptophysin; hippocampal CA1 region; rats, Wistar, animals, newborn

【摘要】目的: 观察新生 Wistar 大鼠脑缺血再灌注后海马 CA1 区突触素的表达. 探讨中枢神经系统的可塑性. 方法: 应用免疫组化方法观察新生鼠脑缺血再灌注后不同时点脑组织突触素的表达. 结果: 缺血再灌注 3 d 突触素表达开始增高, 7 d 达高峰, 14 d 时免疫活性仍高, 其矫正吸光度值与对照组比较有显著性差异($P < 0.01$). 结论: 新生 Wistar 大鼠脑神经细胞损伤后具有修复的可塑性, 其时间持续至缺血再灌

注后 14 d. 突触素检测能较好地反映神经元和轴突的代偿再生情况.

【关键词】 脑缺血; 突触膜糖蛋白; 海马 CA1 区; 大鼠, Wistar; 动物; 新生

【中图分类号】 R72 **【文献标识码】** A

0 引言

突触素(synaptophysin, Syp)是一种与突触结构和功能密切相关的膜蛋白, Syp 作为突触囊泡的一种特异标志性蛋白, 其数量和分布密度可间接反映突触的密度^[1], 突触重建时其表达明显增多, 与神经可塑性密切相关. 近年来, 国内外研究^[2]发现机体在缺血缺氧时, 能反映神经细胞代偿及重塑的 Syp 的表达和生成增加. 我们旨在研究新生鼠脑缺血再灌注后突触素的变化规律, 探讨中枢神经系统的可塑性.

1 材料和方法

1.1 材料 出生后 7 d Wistar 大鼠 70 只(遵义医学院实验动物中心), 体质量 18 ~ 22 g, 雌雄不拘, 随机分为假手术组和缺血再灌注组, 每组 35 只. 1000 u 青霉素 ip 预防感染, 30 g/L 戊巴比妥钠(40 mg/kg) ip 麻醉. 抗 Syp 抗体(即用型): 鼠抗人 mAb(DAKO 公司). Mias99-B 图像分析系统(四川大学图像图形研究所).

1.2 方法

1.2.1 脑缺血模型的制作 ① 假手术组: 分离动物右侧颈总动脉, 不阻断血流; ② 缺血再灌注组: 阻断右侧颈总动脉 45 min 再灌注. 两组均于术后 7 个时间点即 2, 6, 12, 24 h 和 3, 7, 14 d 断头处死动物, 每时间点 5 只, 取右侧大脑半球用 40 g/L 多聚甲醛固定待测. 制模成功标准为结扎右侧颈总动脉后 2 h 对侧(左侧) 肢体活动障碍.

1.2.2 标本制备及 Syp 检测 采用免疫组织化学 Envision 二步法. 取标本固定 24 h, 石蜡包埋, 进行海马 CA1 区、皮层连续冠状切片, 片厚 4 μ m. 切片常规脱蜡和水化, 微波抗原修复 10 min, 室温下自然冷却 20 min, 蒸馏水漂洗后置于 PBS (pH = 7.4) 中, 用 30 g/L 过氧化氢避光孵育 20 min 以阻断内源性过氧化

收稿日期 2004-01-13; 修回日期 2004-03-19

基金项目: 贵州省卫生厅资助项目(D-143), 贵州省教育厅立项

通讯作者: 曹云涛. Tel. (0852) 8608561 Email. cyto827@yahoo.com.cn

作者简介: 宋文秀(1972-) 女(白族), 贵州省盘县人. 硕士生(导师曹云涛) 主治医师. Tel. (0756) 5523616 Email. songwenxiu@163.com

物酶, PBS 漂洗 5 min × 3, 加 20 μL 一抗 4℃ 冰箱孵育过夜, PBS 漂洗 5 min × 3, 加 20 μL 相应的 Envision™ 复合物 37℃ 孵育 30 min, PBS 漂洗 5 min × 3, DAB 显色, 蒸馏水漂洗、复染及封片。以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.3 图像分析 用图像分析系统测量切片海马 CA1 区 Syp 吸光度值(A 值), 每只鼠 5 张切片, 每张切片测 2 次, 每次所测面积大于海马 CA1 区的 50%, 取其平均值作为 Syp 的 A 值, 同时测定同一张切片上胼胝体的 A 值以作为 Syp 的背景值, 用 CA(校正吸光度)值进行比较和分析, CA = 实测值 - 背景值, 以避免染色过程中非特异性染色所造成的误差。

1.2.4 病理学检查 取相应部位切片行 HE 染色, 观察其病理学改变。

统计学处理: 各组 CA 值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用完全随机设计两样本比较的秩和检验分析。P < 0.01 为有显著性差异。

2 结果

2.1 Syp 的表达 Syp 阳性染色呈棕黄色点状或颗粒状沉积, 位于胞质内, 胼胝体、血管和胶质细胞不着色。阴性对照切片未见 Syp 免疫产物。假手术组海马 CA1 区可见 Syp 表达, 免疫反应物颗粒很小, 分布弥散 (Fig 1), 随日龄增加免疫反应物 CA 值逐渐增高, 缺血再灌注组海马 CA1 区 Syp 在脑缺血再灌注 3 d 免疫活性增高, 7 d 达高峰, 14 d 免疫活性仍高, 免疫产物的颗粒较大、密集、染色深 (Fig 2); CA 值高于假手术组, 两组比较均有显著性差异 (P < 0.01, Tab 1)。

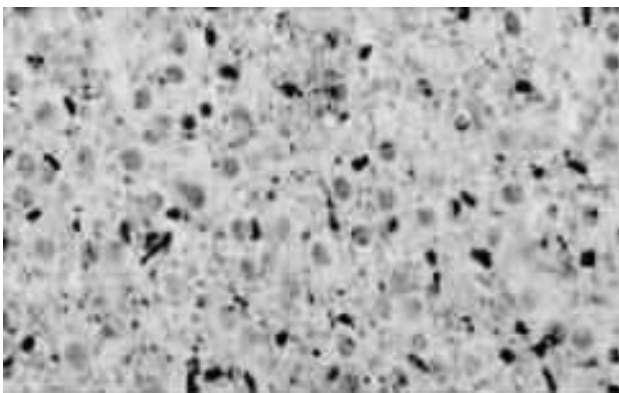


Fig 1 Expression of Syp in hippocampal CA1 region in sham-operation group EnVision ×200

图1 假手术组海马 CA1 区突触素表达

2.2 病理学改变 假手术组未见神经元损伤, 缺血

灌注组大鼠海马 CA1 区神经细胞自缺血 12 h 开始水肿、坏死, 锥体细胞大部分受损, 第 3 日最重, 第 7 日逐渐好转 (Fig 3)。

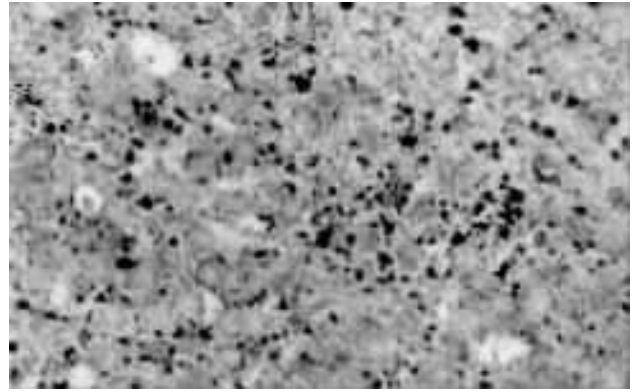


Fig 2 Expression of Syp in hippocampal CA1 region at 7 d after ischemia-reperfusion EnVision ×200

图2 缺血再灌注 7 d 海马 CA1 区突触素表达

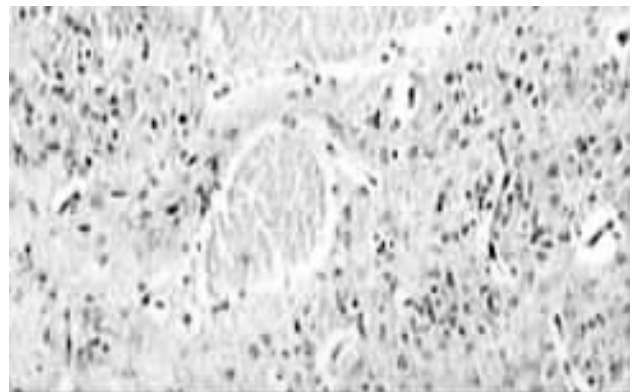


Fig 3 Pathological changes of the brain tissues at 3 d after ischemia-reperfusion HE ×100

图3 脑缺血再灌注 3 d 脑组织病理改变

表1 新生 Wistar 大鼠不同时间点海马 CA1 区 Syp 免疫反应复合物的 CA 值

Tab 1 Gray density of Synaptophysin at different time points in hippocampal CA1 region of 7-day-old Wistar rats (n = 5, $\bar{x} \pm s$)

| Time | Sham-operation | Ischemia-reperfusion |
|------|----------------|-----------------------------|
| 2 h | 3.698 ± 0.022 | 3.720 ± 0.059 |
| 6 h | 4.320 ± 0.010 | 4.300 ± 0.056 |
| 12 h | 4.906 ± 0.019 | 4.846 ± 0.059 |
| 24 h | 5.206 ± 0.182 | 5.250 ± 0.080 |
| 3 d | 6.156 ± 0.013 | 10.762 ± 0.993 ^b |
| 7 d | 7.978 ± 0.008 | 13.140 ± 0.760 ^b |
| 14 d | 8.308 ± 0.008 | 12.010 ± 0.706 ^b |

^bP < 0.01 vs sham-operation group.

3 讨论

Syp 是一种 M_r 38 000 的酸性钙结合糖蛋白,在神经元胞体合成后主要转运至轴突终末,特异性地分布于突触前囊泡膜上。Syp 分布非常广泛,在神经组织如脑、脊髓、视网膜和神经肌接头的突触前成分、肾上腺髓质,以及各类内分泌细胞等都有分布^[3]。免疫电镜研究证实,Syp 位于小圆形或扁形突触囊泡质膜面,光镜下标记的 Syp 颗粒样物实际上是成簇的囊泡,而 95% 以上的新皮质突触前终末均含有这种小突触囊泡^[4]。Syp 作为突触前终末标记物,使用免疫组化方法及图像分析技术检测其免疫阳性物质在给定区域的吸光度值,可以间接评定突触的密度及分布。免疫组化研究证实,Syp 的免疫活性在成熟脑组织中高度集中在突触前轴突末梢内,围绕着神经元和其树突。因此该蛋白被广泛用于标记轴突终末,是突触重建的重要标志。我们的实验结果显示:脑缺血再灌注组与假手术组相比,于再灌注 2, 6, 24 h Syp 的免疫活性未见明显变化 ($P > 0.01$),第 3, 7, 14 日与假手术组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。这与 Kojiro 等^[5]对成年大鼠所做的实验结果一致。Ishimaru 等^[6]通过制备脑缺血模型,检测 Syp 的免疫活性,表明在脑缺血后,海马 CA1 区的突触前的恶化先于 CA1 区的迟发性神经元死亡。神经细胞在受到各种有害因素损伤后,其轴突在失去靶器官后会出现轴突的出芽和形成许多侧枝,其突触前囊泡的数量增加;另外其突触前膜功能也代偿性增加,使 Syp 免疫活性增高。突触素能调节神经元突起延伸以及在中枢神经元中建立极性,分化出轴突。一些细胞因子可以调节神经元突起的延伸,这种调节作用主要是通过 PKA 或者钙调蛋白激酶介导^[7]。有实验表明 cAMP 可促进神经元突起延伸,主要是通过 PKA 磷酸化突触素的一个氨基酸残基而打开神经元突起延伸的开

关^[8]。该研究结果说明新生鼠脑缺血再灌注后神经系统存在可塑性。我们的实验结果为新生儿窒息脑损伤的早期干预,促进神经细胞的代偿,减少神经系统后遗症提供了动物实验依据。

【参考文献】

- [1] Saito S, Kobayashi S, Ohashi Y, et al. Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin contents [J]. *Neuroscience Res*, 1994, 39(1): 57-62.
- [2] Martinez G, Di Giacomo C, Carnazza ML, et al. MAP2, synaptophysin immunostaining in rat brain and behavioral modifications after cerebral postischemic reperfusion [J]. *Dev Neurosci*, 1997, 19(6): 457-464.
- [3] Wiedenmann B, Franke WW. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38 000 characteristic of presynaptic vesicles [J]. *Cell*, 1985; 41(3): 1017-1028.
- [4] Walaas SI, Jahn R, Greengard P. Quantitation of nerve terminal population: Synaptic vesicle-associated proteins as markers for synaptic density in the rat neostriatum [J]. *Synapse*, 1988; 2: 516-520.
- [5] Kojiro K, Statoshi G, Shinji N, et al. Changes of immunoreactivity for synaptophysin following a transient cerebral ischemia in the rat striatum [J]. *Brain Research*, 1993, 616: 320-324.
- [6] Ishimaru H, Casamenti F, Ueda K, et al. Changes in presynaptic proteins, SNAP-25 and synaptophysin, in the hippocampal CA1 area in ischemic gerbils [J]. *Brain Res*, 2001; 903(1-2): 94-101.
- [7] Angers A, Fioravante D, Chin J, et al. Serotonin stimulates phosphorylation of Aplysia synapsin and alters its subcellular distribution in sensory neurons. [J]. *Neurosci*, 2002, 22(13): 5412-5422.
- [8] Kao HT, Song HJ, Porton B, et al. A protein kinase A-dependent molecular switch in synapsins regulates neurite outgrowth [J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5(5): 431-437.

编辑 王 睿

· 期刊文摘 · 人骨髓间质干细胞作为骨、软骨组织工程种子细胞的实验研究

[庞永刚, 崔鹏程, 陈文弦, 曹云新. 细胞与分子免疫学杂志, 2004; 20(3): 306-309]

目的:探讨经体外扩增、诱导分化的人骨髓间质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, hMSC)作为组织工程化骨、软骨种子细胞的可行性。方法:体外分离、培养、扩增 hMSC,以流式细胞仪检测 hMSC 的表面抗原。诱导 hMSC 向成骨细胞、软骨细胞分化。以倒置显微镜和电子显微镜观察细胞的形态,以组织化学、免疫组织化学和 RT-PCR 检测成骨细胞、软骨细胞的特异性标志物。结果:分离得到的细胞可表达 hMSC 的特异抗原,在体外扩增 15 代以上,其形态及表面抗原保持不变。成骨诱导培养的细胞上清液中 ALP 的含量高于对照组 ($P < 0.05$)。成骨及成软骨诱导的细胞形态均由成纤维样梭形向多边形转变。透射电镜观察可见大量扩张的粗面内质网、高尔基体及线粒体。扫描电镜观察可见成骨诱导后的细胞表面有钙盐沉积,成软骨诱导的细胞表面有胶原样突起。成骨诱导培养后,可见碱性磷酸酶(ALP)染色、Ca 结节染色、胶原-I(COL-I)及骨钙素(osteocalcin, OC)免疫组化染色阳性,同时 RT-PCR 检测 COL-I, OC mRNA 表达阳性。成软骨诱导后,甲苯胺蓝染色见细胞周围有大量的异染性基质,免疫组化和 RT-PCR 检测 COL-II 表达阳性。结论:hMSC 在体外可大量扩增。在特定培养液诱导下,可向成骨细胞及软骨细胞转化,可作为骨、软骨组织工程的较理想的种子细胞。