

# 探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质巢蛋白及神经生长因子表达的影响\*

槐雅萍<sup>1</sup> 杨永轩<sup>3</sup> 贾子善<sup>1,2</sup> 郭宗成<sup>4</sup> 贾新风<sup>5</sup>

**摘要** 目的:观察探索学习对局灶性脑梗死大鼠巢蛋白(nestin)及神经生长因子(NGF)表达的影响。方法:健康雄性SD大鼠70只,其中60只以电凝法造成右侧大脑中动脉阻断(MCAO)模型后,随机分为探索学习组(n=30)居于探索笼,对照组(n=30)每5只一组群居于标准笼,假手术组(n=10)仅开颅不电凝大脑中动脉,居于标准笼。探索学习组和对照组分别于术后第1天、第1周、第2周、第4周各组随机选取5只大鼠处死,假手术组分别于MCAO第1周、第4周时随机选取5只大鼠处死,即进行巢蛋白及NGF免疫组化染色,测定其在脑梗死灶周围皮质巢蛋白及NGF的表达情况。结果:探索学习组巢蛋白及NGF阳性神经元数在MCAO术后第7天、第14天明显多于手术对照组( $P < 0.05$ )。结论:探索学习能促进梗死灶周围皮质巢蛋白及NGF的表达。

**关键词** 探索学习;脑梗死;大鼠;巢蛋白;神经生长因子

中图分类号:R493,R741 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-11-0977-04

**The effects of learning on nestin and nerve growth factor expressions in peri-ischemic cortex of rats after unilateral local cerebral infarction/HUAI Yaping, YANG Yongxuan, JIA Zishan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2009,24(11):977-980**

**Abstract Objective:** To study the effects of learning on nestin and nerve growth factor (NGF) expressions in peri-ischemic cortex of rats after unilateral local cerebral infarction. **Method:** Seventy male Sprague-Dawley rats were adopted. After the models of middle cerebral artery occlusion (MCAO) were established by electric coagulation successfully, the rats were randomly divided into learning group(n=30, living in exploratory cages) and control group (n=30, every 5 rats as a group living in large standard cages). Other 10 rats without coagulation as sham group lived in standard cage. At the 1st, 7th, 14th, 28th d after MCAO, every 5 rats in learning group and control group were randomly sacrificed separately. At the 7th, 28th d after operation 5 rats in sham group were randomly sacrificed separately. The expressions of nestin and NGF in peri-ischemic cortex were examined by immunohistochemistry staining. **Result:** The nestin and NGF labeled neuron cells in learning group were more than those in control group at the 7th and 14th d after MCAO( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Learning could enhance nestin and NGF expressions in peri-ischemic cortex of rats after unilateral local cerebral infarction.

**Author's address** Dept. of Rehabilitation Medicine, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang, 050051

**Key words** learning; cerebral infarction; rat; nestin; nerve growth factor

探索学习是指动物主动去接受新的信息而改变自身行为、适应新环境的过程,不断用新记忆取代旧记忆的过程<sup>[1]</sup>,主要用于训练动物的学习、记忆、空间辨别、觅食等本能行为能力,促进受损的行为学功能的恢复。贾子善等<sup>[2-4]</sup>的研究表明,探索学习能明显促进脑梗死大鼠的行为学恢复。近十几年来,人们发现在成年脑组织内存在具有多种分化潜能的神经干细胞(neural stem cell, NSC),正常情况下处于静息状态,当其所处的微环境发生改变或在外来信号的刺激下,能自我更新,并在一定条件下分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞,参与神经系统的修复,这表明了中枢神经系统(central nerve system, CNS)具有一定修复潜能。巢蛋白(nestin)被认为是NSC的标志,已广泛用于NSC的鉴定。神经生长因

子(nerve growth factor, NGF)具有促进神经细胞生长同时可以诱导NSC迁移的作用。本文拟观察探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质巢蛋白及NGF表达的影响,探讨探索学习影响脑梗死后功能恢复的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

\* 基金项目:河北省科技攻关课题(07276101D-3)

1 河北省人民医院康复医学科,石家庄,050051

2 通讯作者

3 北京仁和医院神经内科

4 河北省人民医院神经内科

5 天津大港医院康复科

作者简介:槐雅萍,女,副主任医师,副教授

投稿日期:2009-01-14

清洁级雄性 SD 大鼠 70 只,3—4 月龄,体重 230—260g,购自华中科技大学同济医学院实验动物学部。合格证号 SCXK(鄂)2004-0007。将动物随机分为大脑中动脉阻断 (middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型组 60 只,假手术组 10 只。

## 1.2 制备 MCAO 模型及分组

参照 Bederson 等<sup>[5]</sup>的方法制备 MCAO 模型。术后 24h 随机分为探索学习组 30 只,手术对照组 30 只。假手术组 10 只,不电凝 MCA,其余步骤与手术组相同。

## 1.3 造模后饲养环境

假手术组:饲养于标准笼,每笼 5 只。手术对照组:饲养于标准笼,每笼 5 只。探索学习组:每组 15 只饲养于由一个圆笼和一个方笼组成的迷宫笼<sup>[6]</sup>。直径 500mm 圆笼同 640mm×480mm×120mm 方笼中间通过两通道相连(圆笼:中间由丝网分隔,一侧为进食区,一侧为饮水区;方笼:由丝网分隔形成通道宽 80mm×80mm 的迷宫,迷宫由易到难,每周变换 1 次)。

## 1.4 标本的制备

各手术组分别于术后第 1 天、7 天、14 天、28 天随机取 5 只,假手术组术后第 7 天随机取 5 只,第 28 天随机取 5 只。用 10%水合氯醛腹腔内注射麻醉后固定于手术台,剪开胸腔,暴露心脏,用 9 号针头插入左心室,灌注生理盐水,待右心耳膨起,剪开右心耳让血液流出,至右心耳流出液为无色透明时开始用 4%多聚甲醛灌注固定,先快后慢,每只大鼠约需 300ml,总量在 20—30min 内灌完。固定后立即剖颅取脑,在视交叉处切开,冠状切取 2mm 厚包含梗死灶区域及左右半球的组织块浸于 4%多聚甲醛中再固定 4h。经常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。连续冠状切片,切片厚 5 $\mu$ m。

## 1.5 SP 法检测巢蛋白和 NGF 表达

组织切片常规脱蜡,水化。PBS 冲洗 3 次,每次 3min (3×5min,下同);0.3%过氧化氢室温孵育 10min,消除内源性过氧化物酶;PBS 冲洗 2×3min;热修复 30min;PBS 冲洗 3×3min;滴加溶液 A(蛋白阻断液),室温孵育 10min,减少非特异性背景染色;PBS 冲洗 3×3min;滴加一抗(巢蛋白稀释比例为 1:400,NGF 稀释比例为 1:400,均购自北京中杉金桥),置 20%甘油湿盒 4℃恒温过夜;PBS 冲洗 3×3min;滴加溶液 B(生物素标记的二抗),室温孵育 10min;PBS 冲洗 3×3min;滴加溶液 C(过氧化物酶标记的链霉菌抗生素蛋白),室温孵育 10min;PBS 冲洗 3×3min;DAB 显色;自来水充分冲洗;苏木素复

染;梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。PBS 代替一抗做阴性对照。

## 1.6 图像处理

每只大鼠选取 3 张切片,每张切片选取 3 个 10×40 倍视野,用多功能真彩色细胞图像分析管理系统(美国 Media Cybernetics 公司 Image-Pro Plus)计数阳性细胞数目。

## 1.7 统计学分析

各组数据以均数±标准差表示,数据处理采用 SPSS 12.0 统计分析软件统计分析,所有数据进行正态性及方差齐性检验后,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 梗死灶周围皮质巢蛋白表达的时程变化

巢蛋白阳性细胞胞体较大呈椭圆或纺锤形,胞质呈棕褐色,有少量突起,细胞核较大。梗死灶周围皮质巢蛋白阳性细胞密集。假手术组皮质神经元胞浆未见巢蛋白阳性细胞。探索学习组与手术对照组梗死灶周围皮质巢蛋白阳性细胞数在脑梗死后第 1 天即有增加,第 7 天达到高峰,染色最深,第 14 天和 28 天阳性细胞逐渐减少,染色变淡。脑梗死后第 7 天和第 14 天,探索学习组大鼠梗死灶周围皮质巢蛋白阳性细胞较手术对照组明显增多 ( $P<0.05$ )(见表 1,图 1)。

### 2.2 梗死灶周围皮质 NGF 因子表达的时程变化

NGF 阳性细胞胞质呈棕褐色。手术对照组及探索学习组 NGF 阳性细胞主要存在于梗死灶周围。假手术组中,NGF 在皮质低水平表达,阳性细胞少。探索学习组与对照组梗死灶周围皮质在脑梗死后第 1 天即出现 NGF 阳性细胞,第 7 天数量达到高峰,染色加深,此时探索学习组已明显高于对照组 ( $P<0.05$ )。此后两组 NGF 的表达均呈逐渐下降趋势,至第 14 天,探索学习组阳性细胞数仍高于对照组 ( $P<0.05$ ),至第 28 天两组间差异已无显著性意义,但仍高于对照组 ( $P<0.05$ )(见表 2,图 2)。

## 3 讨论

### 3.1 探索学习环境对梗死灶周围皮质巢蛋白表达的影响

表 1 各组梗死灶周围巢蛋白阳性神经元数比较( $\bar{x}\pm s, \times 400$ )

	假手术组 (n=5)	手术对照组 (n=5)	探索学习组 (n=5)
第 1 天	-	14.40±2.85 <sup>①</sup>	14.27±2.63 <sup>①</sup>
第 7 天	1.00±0.97	44.47±3.11 <sup>①</sup>	52.25±3.58 <sup>①②</sup>
第 14 天	-	32.80±2.65 <sup>①</sup>	37.40±2.26 <sup>①②</sup>
第 28 天	1.33±0.90	12.80±2.71 <sup>①</sup>	13.27±2.79 <sup>①</sup>

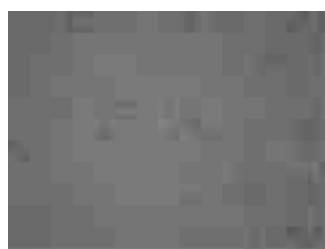
①同假手术组比较  $P<0.01$ ;②同手术对照组比较  $P<0.05$

表2 各组梗死灶周围 NGF 阳性神经元数比较( $\bar{x}\pm s, \times 400$ )

	假手术组 (n=5)	手术对照组 (n=5)	探索学习组 (n=5)
第1天	-	12.93±2.81 <sup>①</sup>	12.87±3.20 <sup>①</sup>
第7天	8.27±1.53	42.47±3.11 <sup>②</sup>	63.20±3.57 <sup>②③</sup>
第14天	-	29.20±2.46 <sup>②</sup>	39.93±2.96 <sup>②③</sup>
第28天	8.73±2.19	13.00±3.09 <sup>①</sup>	13.13±2.61 <sup>①</sup>

同假手术组比较:① $P<0.05$ , ② $P<0.01$ ; 同手术对照组比较:③ $P<0.05$

中间丝蛋白的表达和变化与细胞分化方向和分化阶段密切相关。巢蛋白是一种新近发现的第六类中间丝蛋白, 这种蛋白在哺乳动物胚胎期 CNS 的神经前体细胞内大量表达, 动物出生后其表达很快降低并消失。但在少数仍保持神经发生功能的部位(如大脑室管膜下区、嗅球、海马齿状回)仍有表达。这些



假手术组



手术对照组

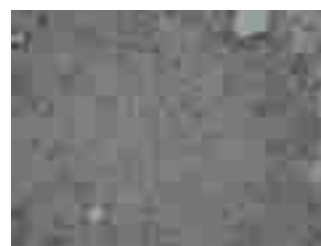


探索学习组

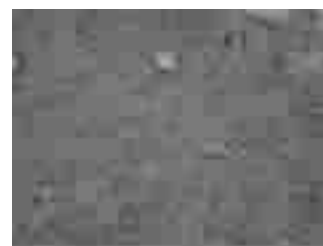
图1 巢蛋白在梗死灶周围的皮质表达

(SP染色,  $\times 400$ )

假手术组



手术对照组



探索学习组

图2 NGF 在梗死灶周围的皮质表达

(SP染色,  $\times 400$ )

巢蛋白阳性细胞都具有分化和增殖的能力, 提示巢蛋白可能参与调节这些细胞分化与增殖的功能。

随着 Reynolds 在成体脑内发现了 NSC<sup>[6-7]</sup>, 人们愈来愈认识到, NSC 在脑损伤修复中起到了非常重要的作用。大量研究表明, NSC 在神经营养因子和内环境的调控下可对因缺血损伤而造成的神经功能丧失产生代偿和修复作用<sup>[8-9]</sup>。在脑缺血的早期即可诱导巢蛋白的表达, 从而在脑损伤的修复中发挥主要作用<sup>[10]</sup>, 在损伤最重区域巢蛋白阳性细胞数目最显著, 故巢蛋白可作为 CNS 损伤时最早、快速应答的敏感标志物; 另一方面, 巢蛋白是 NSC 的特异性标记蛋白, NSC 具有多分化潜能, 可以分化成神经元和胶质细胞, 并能自我更新。巢蛋白的高表达可能预示了 NSC 的激活, 从而在脑损伤的修复中发挥重要作用。本实验显示, 探索学习组大鼠梗死灶周围皮质巢蛋白阳性细胞的数量在造模后第7天、第14天明显多于手术对照组, 提示探索学习可能通过增强脑梗死大鼠巢蛋白的表达, 促进 NSC 分化, 从而有利于行为学的恢复。脑缺血不仅可激活 NSC, 使 NSC 增殖分化, 而且也可使缺血灶周围的某些成熟神经元逆转为 NSC。Li 等<sup>[11]</sup>的实验表明, 局灶脑缺血后第6—12小时, 缺血灶中心区的星形细胞开始表达, 随

着时间的推移, 缺血灶及周边区小胶质细胞、单核细胞也表达巢蛋白。更为有趣的是, 缺血灶附近的一些神经元也呈现巢蛋白阳性。显然这些巢蛋白阳性 NSC 并非来源于室管膜下区和齿状回等区, 因为他们具有成熟神经元和胶质细胞的特征, 提示这种逆向转化的存在。本实验发现, 除大脑室管膜下区、海马齿状回外, 海马 CA1—4 区、缺血灶周围皮质也可见巢蛋白的表达。推测为脑缺血损伤可能刺激脑内成熟的间质细胞或星形胶质细胞返回到 NSC 状态, 重新分化成受损最严重的细胞类型 (主要是神经元), 并迁移至损伤的脑区, 从而发挥修复和重排神经网络的作用<sup>[12]</sup>。脑损伤后, 巢蛋白的重新表达与神经营养因子的释放有关<sup>[13]</sup>, 而不同环境刺激后, 各种神经营养因子的表达水平也不同<sup>[14]</sup>。因此, 探索学习诱导局灶性脑梗死大鼠海马巢蛋白的表达, 可能是探索学习促进脑梗死后功能恢复的机制之一。

### 3.2 探索学习环境对梗死灶周围皮质 NGF 表达的影响

NGF 是神经系统最重要的生物活性分子之一, 促进发育中的感觉神经元及交感神经元的存活及分化, 营养成熟的神经元, 维持其正常的生物学功能, 参与损伤神经再生和功能修复, 并且参与维系神经、

免疫和内分泌系统之间的平衡。CNS 受到损害时,迅速表达 NGF 及其受体,表达的细胞包括:特定的神经元、局部的星形胶质细胞、小胶质细胞及侵入的炎性细胞。应用 NGF 及其他生长因子能使成熟的受损神经元轴突生长,缺乏 NGF 轴突就不生长,提示 NGF 可以促使轴突克服周围环境中阻止轴突生长的因素<sup>[15]</sup>。脑组织在受到损伤后,如缺血、缺氧、损伤、癫痫、中毒等,均可见到 NGF 在脑中表达增多。脑缺血性损伤时,许多研究均发现脑组织中 NGF 的表达增多,且对脑缺血损伤有一定的保护和治疗作用<sup>[16-17]</sup>。NGF 广泛而持久的高表达可能与 CNS 可塑性及神经功能恢复有关。本实验中,造模后探索学习组和对照组梗死灶周围皮质的 NGF 表达均高于假手术组,这是因为脑梗死本身促进了 NGF 的表达,这是神经系统对损伤应激的保护性反应。实验中,我们还观察到,随着时间的推移,探索学习组的 NGF 逐渐高于对照组,这说明探索学习可以增强 NGF 的表达,这也证明了探索学习可以增强脑损伤后的自我保护及修复能力。Cattaneo 等<sup>[18]</sup>的研究发现,加入 bFGF 进行培养的神经前体细胞在有 NGF 的环境中能够继续增殖,而去除 NGF 之后,这些神经前体细胞停止增殖、分化为神经元,提示 NGF 与其他一些神经营养因子共同调节神经前体细胞的增殖和分化过程。国内施英唐等<sup>[19]</sup>的研究发现,体外培养的 NSC 可以向 NGF 源方向迁移,并且越靠近 NGF 源的 NSC,其迁移现象越明显。他们还发现,在迁移过程中,NSC 逐渐分化成为成熟的神经元,其巢蛋白的表达逐渐消失。这些结果表明 NGF 可以促进 NSC 的迁移过程,并对其分化也起到了非常重要的作用。

### 参考文献

- [1] 高俊淑,李阔,李娜,等. 探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质 BDNF 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志,2007,22(7):584—585.
- [2] 贾子善,李阔,槐雅萍,等. 不同环境干预对局灶性脑梗死大鼠行为学恢复的影响 [J]. 中国康复医学杂志,2007,22 (7):578—580.
- [3] 槐雅萍,贾新风,闫桂芳,等.探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质 Ng 及 bFGF 表达的影响[J].中国康复医学杂志,2009,24 (3):216—218.
- [4] 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,(3):219—221.
- [5] Bederson JB, Pitits LH, Tsun M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986,17(3): 472—476.
- [6] Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes[J]. J Neurosci, 1992, 12: 4565—4574.
- [7] Reynolds BA, Seiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. Science, 1992, 255: 1707—1710.
- [8] Larsson E, Mandel RJ, Klein RL, et al. Suppression of insult-induced neurogenesis in adult rat brain by brain-derived neurotrophic factor[J]. Exp Neurol, 2002,177(1):1—8.
- [9] Teramoto T, Qiu J, Plumier JC, et al. EGF amplifies the replacement of parvalbumin-expressing striatal interneurons after ischemia[J]. Clin Invest, 2003,111(8):1125—1132.
- [10] Liu J, Solway K, Messing RO, et al. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils [J]. Neurosci, 1998,18(19):7768—7778.
- [11] Li Y, Chopp M. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat [J]. Brain Res, 1999,838(1-2):1—10.
- [12] Abe K. Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000,20(10): 1393—1408.
- [13] Lai C, Feng L. Neuregulin induces proliferation of neural progenitor cells via PLC/PKC pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004,319(2):603—611.
- [14] Mohammed AH, Zhu SW, Darmopil S, et al. Environmental enrichment and the brain [J]. Prog Brain Res, 2002,138:109—133.
- [15] Raner MS, Priestley JV, McMahon SB. Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord [J]. Nature, 2000,403(6767):312—316.
- [16] Ishida A, Kawakami H, Yasuzumi F, et al. Gene therapy for cerebral infarction (cerebral ischemia) [J]. No To Shinkei, 2002,54(3):213—219.
- [17] 胡志云,王洪津,姜长斌,等. 脑缺血再灌注后海马谷氨酸和神经生长因子的表达 [J]. 大连医科大学学报,2005,27 (3):170—173.
- [18] Cattaneo E, McKay R. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor [J]. Nature, 1990, 347:762—765.
- [19] 施英唐,马骥,袁崇刚. 神经生长因子诱导神经干细胞定向迁移[J]. 解剖学报,2004,35:22—25.