文章编号:1000-5404(2006)15-1575-03

论著

成年大鼠局灶性脑梗死后齿状回神经元前体细胞的发生研究

谭新杰[1]，胡长林[1]，蔡文琴[2]，杨 忠[2] （[1]重庆医科大学附属第二医院神经内科，重庆 400010；[2]第三军医大学基础医学部神经生物学教研室，重庆市神经科学研究所，重庆 400038）

提 要：目的 初步探讨脑缺血后神经元前体细胞的发生机制。**方法** 建立一侧大脑中动脉缺血再灌注模型，应用神经元前体细胞的标志物DCX(Doublecortin)检测缺血再灌注后不同时相点海马齿状回神经元前体细胞的增殖情况。**结果** 再灌注后第7天梗死侧及非梗死侧齿状回DCX阳性细胞数达到最高峰，与相应假手术组比较，差异有统计学意义($P<0.05$)；同时各个时相点梗死侧与非梗死侧比较，差异均有统计学意义($P<0.05$)；再灌注后第21天双侧齿状回DCX阳性细胞数基本恢复至正常水平。**结论** 局灶性脑缺血可以诱导成年大鼠神经元前体细胞的发生，这对于脑缺血后的神经修复可能起关键性作用；其机制可能是缺血区域产生的一些神经发生调节因子弥散到神经发生区域所致。

关键词：大脑中动脉栓塞；再灌注；神经元前体细胞；齿状回

中图法分类号：R329.21；R363.271；R743.33 **文献标识码**：A

Transient focal cerebral ischemia-induced neurogenesis in dentate gyrus of adult rats

TAN Xin-jie[1], HU Chang-lin[1], CAI Wen-qin[2], YANG Zhong[2] ([1]Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, [2]Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the neurogenesis after focal cerebral ischemia in the dentate gyrus of adult rats and the mechanisms responsible for stroke-induced neurogenesis. Methods Animal models of middle cerebral artery occlusion (MCAO) were established in 16 adult rats, and four of another 8 rats served as normal control and four underwent sham operation. Doublecortin was used to label neuron precursors. The proliferation rate of neuron precursors in the dentate gyrus on day 1, 7, 14, 21 after reperfusion was examined. Results The doublecortin-positive cells in the ipsilateral dentate gyrus and contralateral dentate gyrus reached the highest level on day 7 after reperfusion, up to 2.4-fold higher than that of sham-operated rats ($P<0.05$), then down near to the normal level on day 21 after reperfusion. There was a significant increase of doublecortin-positive cells in ipsilateral dentate gyrus on each time point as compared with contralateral dentate gyrus ($P<0.05$). Conclusion Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat brain can be initiated after focal cerebral ischemia, which may be crucial in brain repair after ischemia.

Key words: middle cerebral artery occlusion; reperfusion; neuronal precursors; dentate gyrus

在成年大鼠脑中的新生神经元主要来源于2个区域：沿着侧脑室的室下区(subventricular zone, SVZ)和齿状回(dentate gyrus, DG)的粒下层(subgranular zone, SGZ)。病理损伤(如脑缺血和癫痫)可以促进粒下层和室下区的神经发生，并诱导神经元前体细胞从吻侧迁移流(rostral migratory stream, RMS)中迁移入病灶区域。这些发现为脑损伤的治疗带来了新的思路。

本实验利用成年大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)缺血再灌注模型，观察局灶性脑梗死对海马齿状回神经元前体细胞发生的影响，并初步探讨其相关机制。

作者简介：谭新杰(1977-)，男，江西省遂川县人，博士，主要从事神经元前体细胞迁移方面的研究，现在贵州省人民医院干部医疗科。电话：(023)63705052，E-mail：txj1012@tom.com

收稿日期：2005-07-04；**修回日期**：2006-03-18

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年雄性 Wistar 大鼠24只，体质量200～250 g，由第三军医大学实验动物中心提供。分为以下各组：假手术对照组（8只）；缺血梗死后1 d组（4只）；缺血梗死后7 d组（4只）；缺血梗死后14 d组（4只）；缺血后21 d组（4只）。假手术组除不栓塞大脑中动脉外其余处理同缺血梗死组。

1.2 主要试剂

羊多抗 Doublecortin 购自 Santa Cruz 公司；SABC 免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂等均购自武汉博士德生物技术公司。

1.3 线栓法制作大鼠 MCAO 缺血再灌注模型

0.4% 戊巴比妥钠（40 mg/kg）腹腔麻醉，取仰卧位，做颈部前正中切口，分离暴露右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉及翼腭动脉，用微动脉夹暂时夹闭颈总动脉、颈内动脉及翼腭动脉，并在颈外动脉近心端、远心端分别穿线，远心端系紧，近心端系1个松结（备线），在颈外动脉的两线间剪1个小口，将一预先制备好的栓线，经小口插入颈外动脉，为防止滑出和出血，将颈外动脉的备用丝线系紧，然后移去颈内动脉处的动脉夹。尼龙线经分叉进入颈内动脉，并继续伸入大脑前动脉近端，此时可遇轻微阻力，深度为（18.5±0.5）mm，这样就阻断了大脑中动脉的血流来源。外留1 cm长尼龙线，缝合皮肤。栓塞2 h后提拉尼龙线至有阻力时止，此时尼龙线已退至颈外动脉切口处，血流再通制成再灌注模型。

按照 Longa 5级神经功能缺陷评分法[1]进行神经功能评价，选取评分1～3级的大鼠进入实验。

1.4 组织固定及冰冻切片的制备

将各组大鼠在不同时相点（1、7、14、21 d）用0.9%生理盐水和4%多聚甲醛灌注后迅速取脑，20%蔗糖脱水直至组织沉底后行冰冻切片（厚度为20 μm）。

1.5 免疫组化染色

组织切片经3% H_2O_2 及正常兔血清封闭后，入一抗 DCX（1∶200）中4 ℃过夜，漂洗后入生物素化兔抗羊 IgG（1∶100，武汉博士德）中37 ℃×3 h，再次漂洗后入 SABC（1∶100，武汉博士德）中37 ℃×2 h，漂洗干净后 DAB 显色，光镜下观察。胞体及突起染色呈棕色为阳性结果；阴性对照用 PBS 代替一抗。

1.6 统计学处理

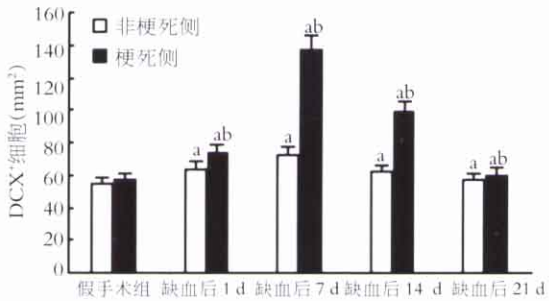
100倍光镜下观察齿状回 DCX 免疫阳性细胞数，每只大鼠选取5个非连续的脑片进行计数。结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行多组均数的方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 齿状回 DCX 免疫阳性细胞数的变化

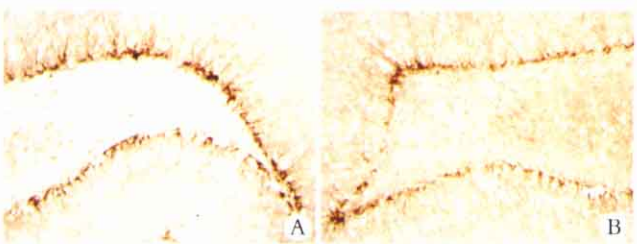
正常鼠脑中 DCX 阳性细胞主要位于海马和室下区，在皮层锥体细胞层有极少的分布。本实验各组大鼠海马齿状回免疫阳性细胞均主要分布于 SGZ。假手术组各时相点鼠脑双侧海马齿状回 DCX 免疫阳性细胞数没有显著差别。在缺血梗死后1 d组双侧齿状回与相应的假手术组比较，DCX 免疫阳性细胞数有轻微的增加。然而，缺血梗死后7 d与相应的假手术组比较，梗死侧齿状回 DCX 免疫阳性细胞数增加了2.4倍，非梗死侧增加了1.3倍。缺血梗死后14 d与相应的假手术组比较，梗死侧齿状回 DCX 免疫阳性细胞数增加了1.7倍，非梗死侧增加不明显。缺血梗死后21 d与相应的假手术组比较，梗死侧及非梗死侧齿状回 DCX 免疫阳性细胞数基本恢复正常。假手术组和缺血梗死1、7、14、21 d组双侧海马齿状回 DCX 阳性细胞数的比较可见图1、2。

随着再灌注时间的延长，梗死侧及非梗死侧齿状回 DCX 免疫阳性细胞数逐渐增多，在再灌注后第7天时达最高峰，并且梗死侧与非梗死侧比较均有显著性差别（$P<0.05$）（图1）。统计结果显示，各时相点模型组鼠脑双侧齿状回与假手术组比较 DCX 免疫阳性细胞数均有显著性差异（$P<0.05$）；模型组梗死侧齿状回与非梗死侧比较 DCX 免疫阳性细胞数也均有显著性差异（$P<0.05$）。



a：$P<0.05$，与假手术组比较；b：$P<0.05$，与非梗死侧比较

图1 假手术组和缺血梗死1、7、14、21 d组海马齿状回 DCX⁺ 细胞数的比较



A：梗死侧；B：非梗死侧

图2 缺血梗死后7 d组大鼠双侧海马齿状回 DCX 阳性细胞（SABC×100）

3 讨论

海马齿状回的粒下层作为神经发生的一个重要区域，每天都要产生成千上万的新生神经元，这个过程在所有哺乳动物的一生中均存在[2]。其中的一些新生神经元可以迁移入粒细胞层，分化为成熟神经元并与已存在的海马神经元形成功能性突触[3]。最近的一

些研究显示将体外培养的神经前体细胞植入成年大鼠脑后，可以分化为与植入点周围神经元的形态和生化特征相一致的神经元，这提示中枢神经系统的神经元前体细胞能够针对成年宿主的内环境做出相应的反应[3,4]。

Doublecortin 是在迁移和分化中的神经元上表达的一种微管相关蛋白，其主要表达在迁移中的神经元胞体和前导突起上以及分化中的神经元轴突上。本实验显示局灶性脑梗死再灌注后海马齿状回有新生神经元产生，呈梭形的胞体和单个的前导突起，符合 O'Rourke等[5]报道的神经元前体细胞的形态特征。假手术组双侧齿状回在相应时相点的 DCX 阳性细胞数基本没有什么变化，这表明齿状回作为神经发生的重要区域，每天都处于稳定的新陈代谢状态。本实验在缺血梗死后 1 d 即可发现齿状回神经元前体细胞数有轻微增加，随着再灌注时间的延长，齿状回的神经元前体细胞逐渐增多，并于第 7 天时达到最高峰，随后又逐渐减少，并于 21 d 后逐渐降至正常水平，这与 Jin 等[6]的研究结果一致。至于在缺血梗死 3 周后 DCX 阳性细胞数下降为正常水平的原因，我们认为可能是缺血区域产生的某些神经发生调节因子逐渐减少甚至消失，以致于弥散到齿状回的浓度极少的缘故。和梗死侧齿状回 DCX 阳性细胞数的剧烈变化相比，非梗死侧的变化相对较轻微，但双侧 DCX 阳性细胞数的发生趋势基本一致。这就有可能进一步证明了我们的猜想：齿状回神经发生的程度与其距离缺血区域的远近有关，从而导致神经发生调节因子浓度的差别。

目前卒中诱导的神经发生的确切分子机制仍未阐明，最近的一个研究通过基因芯片技术显示在 MCAO 后有数个内源性神经发生调节因子如细胞因子、生长因子及转录因子上调[7]；其中一些因子可能从产生其的区域（缺血皮层及纹状体）弥散到神经发生的区域（如海马），从而促进缺血后的神经发生。Yoshimura 等[8]在对脑外伤后内源性成纤维细胞生长因子-2（fibroblast growth factor-2，FGF-2）的研究过程中发现，FGF-2 对于齿状回前体细胞的增殖和分化是必需的。因此研究这些因子的相互作用机制将有助于发现新的药物去诱发内源性的神经发生，从而修复脑损伤。

最近有研究表明，急性神经损伤（如脑缺血和脑外伤）可以增加齿状回前体细胞的增殖速率，即脑缺血和创伤后神经发生的增加可以弥补神经元的丢失，从而促进脑损伤的修复和再生过程[6]。尽管脑缺血可以刺激前体细胞的增殖，但这种内源性反应相对来说还是偏低的，对于替换失去功能的神经元可能还是远远不够的。有研究显示，脑缺血后给予一定的生长因子可以促进缺血诱导的前体细胞增殖，并且在给予恰当的生长因子鸡尾酒后，这种增殖效应能达到最大化，从而有助于缺血后的神经修复[9,10]。

总之，本实验结果表明局灶性脑梗死可以诱导海马齿状回神经元前体细胞的增殖，这可能是中枢神经系统对急性损伤做出内源性反应的一部分，但其确切的分子机制仍需进一步探索。

参考文献：

[1] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84 - 91.

[2] KEMPERMANN G, KUHN H G, GAGE F H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment[J]. Nature, 1997, 386(6624): 493 - 495.

[3] VAN-PRAAG H, SCHINDER A F, CHRISTIE B R, *et al*. Functional neurogenesis in the adult hippocampus[J]. Nature, 2002, 415(6875): 1030 - 1034.

[4] WENNERSTEN A, MEIER X, HOLMIN S, *et al*. Proliferation, migration, and differentiation of human neural stem/progenitor cells after transplantation into a rat model of traumatic brain injury[J]. J Neurosurg, 2004, 100(1): 88 - 96.

[5] O'ROURKE N A, SULLIVAN D P, KAZNOWSKI C E, *et al*. Tangential migration of neurons in the developing cerebral cortex[J]. Development, 1995, 121(7): 2165 - 2176.

[6] JIN K, MINAMI M, LAN J Q, *et al*. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(8): 4710 - 4715.

[7] RAGHAVENDRA-RAO V L, BOWEN K K, DHODDA V K, *et al*. Gene expression analysis of spontaneously hypertensive rat cerebral cortex following transient focal cerebral ischemia[J]. J Neurochem, 2002, 83(5): 1072 - 1086.

[8] YOSHIMURÁ S, TAKAGI Y, HARADA J, *et al*. FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(10): 5874 - 5879.

[9] DEMPSEY R J, SAILOR K A, BOWEN K K, *et al*. Stroke-induced progenitor cell proliferation in adult spontaneously hypertensive rat brain: effect of exogenous IGF-1 and GDNF[J]. J Neurochem, 2003, 87(3): 586 - 597.

[10] 桂　莉，范文辉，李露斯，等. 大鼠骨髓间充质干细胞移植后大鼠脑梗死区超微结构变化的研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(4)：523 - 525.

（编辑　龙　亮）