文章编号:1000-5404(2009)09-0809-04

论著

高压氧治疗后血管性痴呆大鼠梨状皮层神经发生和血液供应变化

张 涛[1],王舒楠[2], 王景周[1],王 强[3],王 勇[3],罗跃嘉[4] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]神经内科,[2]放射科,[3]高压氧科,重庆 400042;[4]中国科学院心理健康重点实验室,北京 100101)

摘 要:目的 探讨血管性痴呆(vascular dementia ,VD)大鼠高压氧治疗后梨状皮层(piriform cortex, Pir)神经发生及血液供应情况。**方法** SD 雄性成年大鼠分为正常组、血管性痴呆组(VD 组)、血管性痴呆高压氧治疗组(HBO 组;高压氧治疗 10 d),每组 10 只,CT 灌注成像技术检测各组大鼠 Pir 区局部脑血流量(regional cerebral blood flow,rCBF)、局部脑血容量(regional cerebral blood volume, rCBV)和平均通过时间(mean transit time,MTT),穿梭箱系统检测大鼠学习记忆功能,免疫组化技术研究 Pir 区 Nestin 及 doublecortin(DCX)表达情况。**结果** VD 组较正常组大鼠 Pir 区 CBF 下降,CBV 增加,MTT 延长;HBO 组较 VD 组 Pir 区 CBF 上升,局部 CBV 下降,MTT 缩短;HBO 组 Pir 区 CBF、CBV、MTT 各值与正常组接近; Pir 区 Nestin 阳性细胞主要位于 layer Ⅱ 和 layer Ⅲ,阳性表达强度:HBO 组 > VD 组 > 正常组; Pir 区 DCX 阳性细胞成条带状,主要位于嗅裂(rf)和杏仁裂(af)之间 layer Ⅱ,阳性表达强度:正常组 > HBO 组 > VD 组;HBO 组穿梭箱 AAR 比率(49.5 ±9.3)% 较 VD 组(27.5 ±7.9)% 显著增高($P < 0.01$);VD 组大鼠 AAR 比率(27.5 ±7.9)% 显著低于正常组(87.5 ±7.9)%($P < 0.01$)。**结论** 高压氧治疗能够改善 VD 大鼠认知功能障碍并促进 Pir 区神经发生,此可能和高压氧治疗提高 VD 大鼠 Pir 区血液供应有关。

关键词: 血管性痴呆;梨状皮层;神经发生;高压氧;CT 灌注
中图法分类号: R-332; R459.6; R749.13 **文献标识码:** A

Neurogenesis and blood supply in piriform cortex in vascular dementia rats after hyperbaric oxygen therapy

ZHANG Tao[1], WANG Shu-nan[2], WANG Jing-zhou[1], WANG Qiang[3], WANG Yong[3], LUO Yue-jia[4] ([1]Department of Neurology, [2]Department of Radiology, [3]Department of Hyperbaric Oxygen, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 40042; [4]Key Laboratory of Mental Health, Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Objective To explore the neurogenesis and blood supply in the piriform cortex of rat with vascular dementia after hyperbaric oxygen therapy. **Methods** SD male rats (at the age of 2 months) were inflicted by permanent ligation of bilateral carotid arteries (2VO). In 30 d after the surgery, the animals having a percentage less than 60% in active avoidance response (AAR) in shuttle box testing were identified as suffering from vascular dementia (VD). Twenty VD rats were divided randomly into 2 groups: VD group and hyperbaric oxygen group [HBO group, in a tank of 95% oxygen under a pressure of 2.02×10^5 Pa (2ATA), 120 min/d, for 10 d]. Another 10 normal rats served as control. In 10 d after the treatment, all rats undertook shuttle box testing for their ability of learning and memory. Their regional cerebral blood flow (rCBF), regional cerebral blood volume (rCBV) and mean transit time (MTT) in the piriform cortex were measured by CT perfusion imaging. The expressions of Nestin and doublecortin (DCX) in the piriform cortex were detected by immunohistochemical staining. **Results** There was significant difference in AAR rate of shuttle box testing between HBO group and VD group [(49.5 ±9.3)% *vs* (27.5 ±7.9)%, $P < 0.01$]; Significant difference was also seen in AAR rate between VD group and NC group [(87.5 ±7.9)%, $P < 0.01$]. In VD group, the rCBF was declined, rCBV elevated, and MTT was delayed in comparison with the normal control. While hyperbaric oxygen therapy improved rCBF, decreased rCBV, and shortened MTT compared with VD group. The values of rCBF, rCBV and MTT in HBO group were close to those in normal control. In the piriform cortex,

基金项目: 重庆市自然科学基金(2008AC5119)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2008AC5119)
作者简介: 张 涛,男,湖南省涟源市人,硕士研究生,医师,主要从事血管性痴呆方面的研究。E-mail: wave169@sina.com
通信作者: 王景周,电话:(023)68757844,E-mail: wangjzjm@163.com
收稿日期: 2008-11-10;**修回日期:** 2009-02-19

Nestin$^+$ cells mostly located in the layer Ⅱ and layer Ⅲ, and the intensity of positive cells was HBO group > VD group > normal control; DCX$^+$ cells were arrayed as a belt mostly in the layer Ⅱ between amygdaline fissure (af) to rhinal fissure (rf). **Conclusion** HBO therapy enhances the ability of learning and memory and promotes neurogenesis in the piriform cortex of VD adult rats,

Key words: vascular dementia; piriform cortex; neurogenesis; hyperbaric oxygen; CT perfusion

2006 年 Pekcec 等[1]证实成年 SD 大鼠梨状皮层(piriform cortex, Pir)存在持续而少量的神经发生。Pir 起源于古皮质,同海马区一样属于边缘系统,其功能复杂,已知与嗅觉、心血管、呼吸等内脏调节活动功能有关。此外,隋南等[2]1995 年发现:梨状皮层与人类的空间认知功能密切相关。既然 Pir 区存在神经发生,Pir 区的功能又和认知功能密切相关,那么血管性痴呆(vascular dementia, VD)后梨状皮层神经发生的情况如何? 大量临床研究证实高压氧治疗能够明显改善血管性痴呆患者的认知功能。高压氧治疗是否能够改善血管性痴呆患者和动物梨状区的神经发生和认知功能,以及其可能的机制是什么? 针对以上疑问,本研究对血管性痴呆大鼠进行高压氧治疗,通过观察大鼠梨状皮层神经发生和血流量变化,探讨高压氧治疗后血管性痴呆大鼠认知功能改善的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

2 月龄 SD 雄性大鼠 50 只,体质量 200 ~ 250 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供;电脑控制的穿梭箱系统由第三军医大学大坪医院野战外科研究所第五研究室研制[3];高压氧仓为第七〇一研究所制造的"氧宝"牌婴儿高压氧氧仓,型号 YLC0.5/1A 型;美国 GE 公司生产 Light-Speed 64 层螺旋 CT 机;Nestin 一抗购自武汉博士德公司,DCX (doublecortin)一抗购自 ABCAM 公司;SABC 免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 血管性痴呆大鼠模型制作 采用双侧颈总动脉永久性结扎(2-VO 法)制造 VD 动物模型[4]。手术前进行穿梭箱训练,连续训练 7 d,每天 2 次。手术后 30 d,采用电脑控制的穿梭箱系统检测大鼠认知功能,主动回避反应(AAR 比率) < 60% 入组。

1.2.2 实验分组 分为正常组、血管性痴呆组(VD 组)和血管性痴呆高压氧治疗组(HBO 组)。造模术后 30 d,VD 大鼠采用穿梭箱系统检测认知功能,挑选出符合条件的大鼠 20 只,分为 VD 组和 HBO 组,每组 10 只。HBO 组随即高压氧连续治疗 10 d,正常组(n = 10)和 VD 组不进行高压氧治疗。10 d 后 3 组动物一同进行穿梭箱检测,CT 灌注成像检查,标本取材用于免疫组化检测。

1.2.3 HBO 组高压氧治疗方案 氧仓内氧气压力 2.02 × 10^5 Pa(2ATA),氧气浓度 > 95%,120 min/次(升压 15 min,稳压 90 min,降压15 min),1 次/d,连续治疗 10 d。

1.2.4 穿梭箱检查方法 参考刘彦等[3]穿梭箱检查设置参数:灯光刺激 5 s,电刺激 10 s,电刺激强度 50 mA,每次穿梭检查间隔 1 min,每次实验 20 次光、电循环。大鼠在灯光刺激时间内完成穿梭动作称主动回避反应(active avoidance response, AAR)。实验中大鼠的学习记忆能力以完成 AAR 的次数与测试总次数(20 次)的比值(AAR 比率)代表。

1.2.5 CT 扫描技术和图像分析 常规扫描正、侧定位像后尾静脉注射对比剂欧乃派克,注射速度 0.2 ml/s,总剂量 2 ml。扫描管电压 80 kV,管电流 100 mA,矩阵 512 × 512,FOV 9.6 cm,层厚 1.25 mm,扫描时间 50 s。原始数据在 AW4.2P 工作站上利用 Perfusion3 软件进行图像处理。左右 Pir 中心区各设定 2 个相同大小(2 mm^2)的观测兴趣区(region of interest, ROI),分别测定其局部脑血流量(regional cerebral blood flow, rCBF)、局部脑血容量(regional cerebral blood volume, rCBV)和平均通过时间(mean transit time, MTT),计算出包含梨状皮层的各层 ROI 相关值的平均值。

1.2.6 大鼠脑组织免疫组化染色 常规麻醉、固定、取材、切片及免疫组化操作。DCX 采用冰冻切片染色[能较好地显示 DCX 阳性细胞树(轴)突],冰冻切片片厚 20 μm,DCX 一抗浓度 1∶1 000;Nestin 采用石蜡切片染色(能更好地显示 Nestin 阳性细胞),石蜡切片片厚 4 μm,微波修复,Nestin 一抗浓度 1∶50。

1.2.7 脑组织细胞计数 高倍镜(10 × 40)下计数大鼠 Pir 区 DCX 阳性细胞总数。每例标本计数 6 张切片,双侧计数,计算单侧平均值;在 Pir 区神经干细胞表达核心区域高倍镜下计数 4 个不重叠视野内 Nestin 阳性细胞数,取平均值,得到每个视野内 Nestin 阳性细胞数,每例标本计数 6 张切片取平均值。相邻 2 张切片至少相距 100 μm。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行非参数统计分析和单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠穿梭箱检查结果

HBO 组穿梭箱 AAR 比率[(49.5 ± 9.3)%]较 VD 组[(27.5 ± 7.9)%]显著增高(P < 0.01);VD 组大鼠 AAR 比率显著低于正常组(87.5 ± 7.9)%(P < 0.01);3 组 AAR 比率:正常组 > HBO 组 > VD 组。

2.2 各组大鼠 CT 灌注成像脑 Pir 区血供比较

VD 组较正常组大鼠 Pir 区 CBF 下降,CBV 增加,MTT 延长;HBO 组较 VD 组 Pir 区 CBF 上升,局部 CBV 下降,MTT 缩短;HBO 组 Pir 区 CBF、CBV、MTT 各值接近于正常组,2 组间无显著差异(P > 0.05,表 1)。

表 1　各组大鼠 CT 灌注成像脑 Pir 区血供情况($\bar{x} \pm s$)

组别	CBF(ml · min^{-1} · 100 g^{-1})	CBV(ml/100 g)	MTT(t/s)
正常组	179.76 ± 19.37	5.869 ± 1.279	2.026 ± 0.027
VD 组	139.46 ± 14.82[a]	8.963 ± 1.862[a]	2.848 ± 0.813[a]
HBO 组	175.42 ± 22.95[b]	6.038 ± 1.123[b]	2.238 ± 0.241[b]

a:$P<0.01$,与正常组比较; b:$P<0.01$,与 VD 组比较

2.3　各组大鼠梨状皮层 DCX 阳性细胞表达情况

大鼠脑冠状切片示 DCX 阳性细胞主要位于 rf 和杏仁裂 af 之间梨状皮层 layer Ⅱ (superficial cellular layer),成条带状。DCX 阳性细胞分布不均,大部分分布于 layer Ⅱ 靠近杏仁裂的一侧,主要集中于 rf 和 af 之间 layer Ⅱ 下三分之一分界点附近。越靠近嗅裂,阳性细胞越少,嗅裂以上几乎未见。杏仁裂处有阳性细胞,甚至杏仁裂内侧附近仍存在少量阳性细胞。正常组 DCX 阳性细胞表达较 HBO 组和 VD 组多,阳性表达强烈,阳性细胞有较多和较长的树(轴)突,突触间相互交联;VD 组 DCX 阳性数非常少,散在少量,且阳性细胞树(轴)突少、短,罕见有树(轴)突间的相互交联;HBO 组 DCX 阳性细胞表达情况界于正常组和 VD 组之间。3 组大鼠阳性细胞数比较,正常组 > HBO 组 > VD 组(图 1,表 2)。

2.4　各组大鼠梨状皮层 Nestin 阳性细胞表达情况

大鼠脑冠状切片上见,Nestin 阳性细胞主要位于梨状皮层 layer Ⅱ 和 layer Ⅲ (deep cellular layer),在 layer Ⅱ 阳性细胞表达更强烈,而在梨状皮层 layer Ⅰ (plexiform layer) 几乎未见阳性细胞。越往嗅裂阳性细胞越少,表达强度越弱,而往杏仁裂一侧仍有较多较强表达。梨状皮层可见 3 种形态的 Nestin 阳性细胞,笔者将其归纳为以下 3 型:a 型,蝌蚪型,细胞较小,阳性表达强,成块状表达于细胞质;b 型,彗星型,细胞较大,阳性表达强度中等,阳性如 1 ~ 2 个彗尾表达于细胞质;c 型,戒指型,阳性表达弱,细胞大,阳性似纱绸般轻薄模糊地表达于细胞质。HBO 组梨状皮层可见较多特征性的 a 型阳性细胞和大量 b 型细胞(图 2C)。VD 组可见大量 b 型阳性细胞和少量 c 型阳性细胞(图 2B)。正常组可见大量 c 型阳性细胞和少许 b 型细胞(图 2A)。另外,杏仁核有较梨状皮层更多的 Nestin 阳性细胞表达,但以 b 型细胞为主,未见特征性的 a 型阳性细胞。3 组大鼠阳性细胞数比较,HBO 组 > VD 组 > 正常组(表 2)。

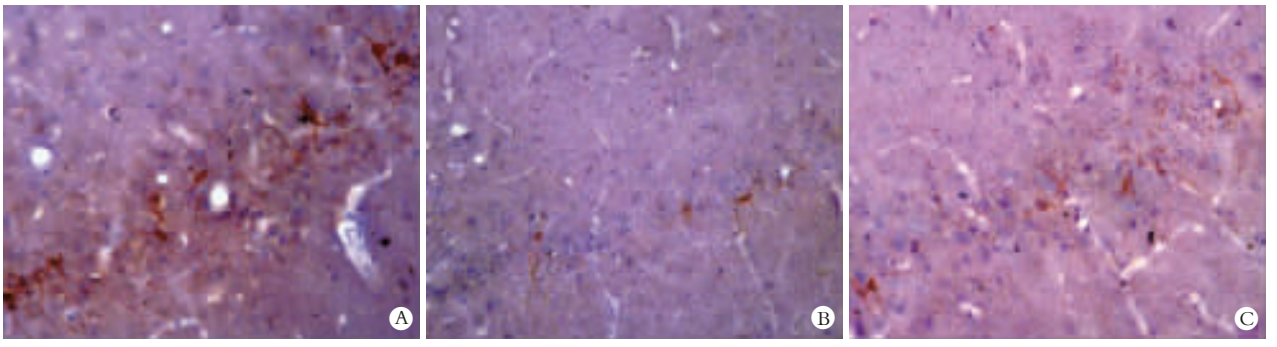
表 2　各组大鼠脑 Pir 区 DCX 和 Nestin 阳性细胞表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	DCX 阳性细胞数(个/单侧 Pir 区)	Nestin 阳性细胞数(个/高倍镜视野)
正常组	36.56 ± 2.83	39.77 ± 4.06
VD 组	9.94 ± 2.10[a]	50.98 ± 3.59[a]
HBO 组	20.74 ± 2.86[ab]	70.31 ± 5.67[ab]

a:$P<0.01$,与正常组比较; b:$P<0.01$,与 VD 组比较

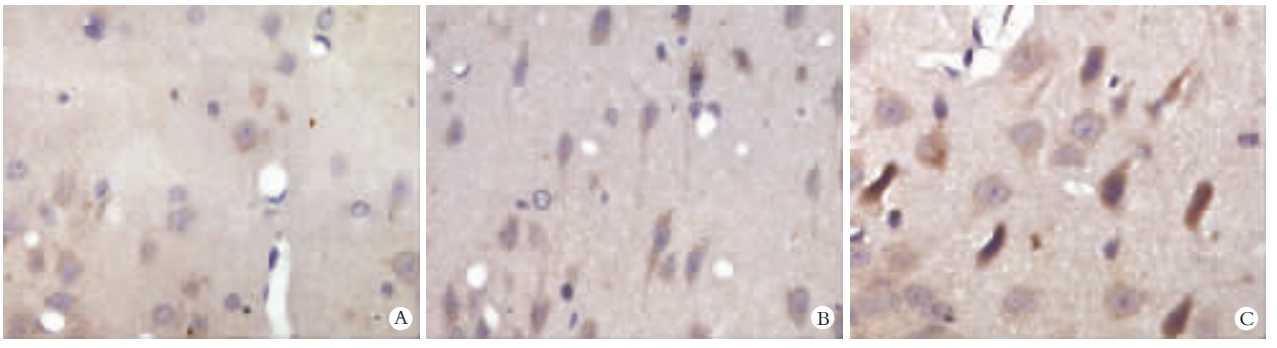
3　讨论

Nestin 是研究神经干细胞的经典标记物。本实验研究发现 Pir 区至少存在 3 种不同形态的 Nestin 阳性细胞。3 种细胞阳性表达强度不同,形态差异较大,能反映神经干细胞增殖强弱和分化时程的细微变化。a 型 Nestin 阳性细胞代表早期的新生的神经干细胞,细胞小而多,阳性染色深,呈块状表达于胞浆;c 型



A: 正常组　阳性细胞多,排列成带状,位于 layer Ⅱ; B: VD 组　阳性细胞少; C: HBO 组　阳性细胞较多

图 1　各组大鼠梨状皮层 DCX 阳性细胞表达　(SABC × 400)



A: 正常组　阳性细胞较少,c 型为主,遍布于 layer Ⅱ 和 layer Ⅲ; B: VD 组　阳性细胞较多,b 型阳性细胞为主; C: HBO 组　阳性细胞多,大量 b 型和较多特征性的 a 型

图 2　各组大鼠梨状皮层 Nestin 阳性细胞表达　(SABC × 400)

Nestin 阳性细胞代表处于分化较晚期的神经祖细胞，细胞大而少，阳性染色浅而模糊，呈丝绸状环绕细胞表达；b 型 Nestin 阳性细胞代表分化处于 a 型和 c 型之间的神经祖细胞，细胞中等大小，阳性染色强度中等，呈彗尾状表达于细胞质。历俊华等[5]证实：Nestin 不仅是神经干细胞的重要标志，同时也出现在神经干细胞分化的早期，且随着细胞分化逐渐成熟其表达显著下降。这说明越分化早期的神经祖细胞 Nestin 表达越强烈。本实验结果和此观点结论相吻合。本实验发现梨状皮层 Nestin 阳性细胞数表达情况：HBO 组 > VD 组 > 正常组。HBO 组阳性细胞表达最多，阳性表达最强烈，可见较多特征性的 a 型细胞，a 型细胞阳性深染，成块状表达，细胞小。说明 HBO 治疗 VD 后神经干细胞增殖强烈，数量多，大多数干细胞为新增殖产生或处于干细胞分化的早期阶段，故细胞较小，Nestin 表达强烈，阳性深染。正常组阳性细胞数量最少，阳性表达弱，以 c 型细胞为主，c 型细胞阳性淡染成丝绸状，模糊表达，细胞较大。这说明正常组神经干细胞增殖较少，新生神经干细胞少，故阳性表达弱，模糊淡染，细胞较大。VD 组阳性细胞数量中等，阳性表达强度中等，b 型阳性细胞较多，b 型细胞如带彗尾的彗星，细胞中等大小。VD 组染色情况居 HBO 组和正常组之间。说明 VD 组的神经干细胞增殖较正常组强而较 HBO 组弱。说明缺血后神经干细胞的增殖增强，HBO 治疗进一步促进了缺血后神经干细胞增殖。总之，VD 后神经干细胞增殖加强，HBO 治疗 VD 后神经干细胞增殖更强。

DCX 是在迁移和分化中的神经元上表达的一种微管相关蛋自，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。主要分布在 4 个神经发生相关区域：室下区、海马齿状回、吻侧迁移流、澙球，在皮层也有少量表达[6]。目前 DCX 被广泛用于神经发生中干细胞迁移和分化的研究。它是研究成体神经发生的合适标记物，它只短暂表达于增殖的神经前体细胞和成神经细胞，与传统的研究神经发生采用 BrdU 和其他成熟神经元标记物双标相比有较大的优势[7]。更可贵的是，研究证实：DCX 可以定量反映神经发生的水平高低和强度变化，是研究神经发生的有效工具[8]。本实验发现 VD 组较正常组 Pir 区 DCX 阳性数量少，突起少而短，且突起间交联少。阳性数量少说明 VD 大鼠 Pir 区神经发生受到抑制，阳性细胞突起少而短说明干细胞向成熟神经元方向分化受到抑制，突起间交联少可能影响 Pir 区神经元功能的发挥。HBO 组较 VD 组 Pir 区阳性数量多，突起多而长，且突起间交联丰富，这说明高压氧治疗能够促进 Pir 区神经发生，并可能由此改善 Pir 区神经元功能。由于 Pir 区与空间认知功能相关，而血管性痴呆患者的重要表现是空间认知和记忆功能下降。故我们推测血管性痴呆的发病可能与 Pir 区神经发生受到抑制有关。另外，为何血管性痴呆大鼠 Pir 区神经干细胞增殖加强而神经发生受到抑制？笔者认为神经干细胞增殖是缺血刺激后的代偿反应，由于缺少血液供应提供神经发生微环境的相关因子或因素，神经干细胞分化受到抑制。高压氧治疗可能一方面进一步刺激 VD 大鼠神经干细胞的增殖，另一方面通过增强 Pir 区血液供应，改善神经发生微环境，或者通过影响其他未知因素促进神经干细胞的分化，从而促进 VD 大鼠神经发生。

近年 CT 灌注成像技术得到了快速发展。它能够无创性评价活体感兴趣区血液供应相关指数。本研究采用该技术对比观测大鼠脑 Pir 区血液供应情况，发现 VD 组较正常组 Pir 区局部血流量下降，平均通过时间延长（表明血流速度慢）。说明 VD 大鼠 Pir 区血供情况差。由于脑血管有自动舒缩功能以拮抗这种缺血状态，VD 大鼠 Pir 区血管舒张，局部血容量增加。本实验结果显示 HBO 组较 VD 组 Pir 区局部血流量上升，平均通过时间缩短，局部血容量下降，CBF、CBV、MTT 各值接近于正常组。这些说明高压氧治疗 VD 后 Pir 区血液供应得到改善，此可能和刺激 HBO 组大鼠 Pir 区神经发生有关。同时 HBO 治疗组大鼠 Pir 区存在围绕血管周围较多特征性的代表早期的、新生的 a 型 Nestin 阳性细胞的现象也是一个佐证。

参考文献：

[1] Pekcec A, Loscher W, Potschka H. Neurogenesis in the adult rat piriform cortex[J]. Neuroreport, 2006,17(6): 571 - 574.

[2] 隋 南，翁旭初，高 扬，等. 梨状皮层或苍白球损毁对大鼠空间认知能力的影响[J]. 心理学报, 1995, 27(4): 428 - 433.

[3] 刘 彦，何庆华，廖维宏，等. 微机控制的穿梭箱双向主动回避反应实验系统[J]. 中国应用生理学杂志，1999，15(4): 366 - 368.

[4] Ni J, Ohta H, Matsumoto K, *et al*. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats[J]. Brain Res, 1994, 653(1 - 2): 231 - 236.

[5] 历俊华，安沂华，张绍东，等. 巢蛋白在已分化的神经干细胞中表达时程的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(9): 838 - 839.

[6] 谭新杰，胡长林，蔡文琴. 微管相关蛋白 Doublecortin 在成年大鼠神经元前体细胞发生中的表达[J]. 解剖学杂志, 2006, 29(5): 601 - 603.

[7] Brown J P, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn C M, *et al*. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis[J]. J Comp Neurol, 2003, 467(1): 1 - 10.

[8] Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, *et al*. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis[J]. Eur J Neurosci, 2005, 21(4): 1 - 14.

（编辑 邓强庭）