文章编号:1000-5404(2013)07-0635-04

论著

养血清脑颗粒对大鼠脑缺血再灌注损伤后轴突再生及RGMa表达的影响

陶 涛,秦新月,徐广会 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科)

[摘要] **目的** 探讨养血清脑颗粒对大鼠脑缺血再灌注损伤后轴突再生的影响及可能的机制。**方法** 成年雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠48只,随机分为假手术组、缺血/再灌注组、生理盐水对照组和养血清脑颗粒治疗组。缺血2周后,采用免疫组织化学及Western blot法检测缺血侧脑皮质及海马排斥性导向因子A(repulsive guidance molecular A,RGMa)蛋白的表达,免疫染色神经微丝蛋白200(NF-200)评估轴突生长。术后2、7、14 d和28 d,采用改良的神经功能缺损评分(modified neurological severity score,mNSS)评估大鼠神经功能。**结果** 同缺血/再灌注组相比,养血清脑颗粒治疗组大鼠缺血侧脑皮质和海马RGMa蛋白表达明显降低($P<0.01$),NF-200蛋白表达增加($P<0.05$),mNSS神经功能评分显著下降($P<0.05$)。**结论** 养血清脑颗粒能促进大鼠缺血再灌注损伤后神经功能的恢复,其机制可能与下调RGMa蛋白的表达,促进轴突再生有关。

[关键词] 养血清脑颗粒;脑缺血再灌注;RGMa;轴突再生;大鼠
[中图法分类号] R285.6; R289.5; R743.31 [文献标志码] A

Effects of Yangxue Qingnao Granule on RGMa expression and axonal regeneration in rats with focal cerebral ischemia reperfusion

Tao Tao, Qin Xinyue, Xu Guanghui (Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of Yangxue Qingnao Granule, a drug based on traditional Chinese medicine, on axonal regeneration in rats after focal cerebral ischemia reperfusion and investigate its potential mechanism. **Methods** Forty-eight adult male Sprague-Dawley rats (SD) were randomly divided into sham-operation group, cerebral ischemia/reperfusion group, vehicle group and Yangxue Qingnao Granule treatment group. After the establishment of cerebral ischemia/reperfusion, Yangxue Qingnao Granule was given the rats at 2 g/kg (i.g.), once per day for 2 weeks. The expression of repulsive guidance molecular A (RGMa) was detected by immunohistochemical assay and Western blotting. NF-200 immunohistochemical staining was used to evaluate axonal regeneration. Neurological function recovery was evaluated by modified neurological severity score (mNSS) at 2, 7, 14 and 28 d after ischemic reperfusion. **Results** The expression of RGMa at protein level in ischemic cortex and hippocampus was significantly lower ($P<0.01$), but that of NF-200 was increased ($P<0.05$) in treatment group than cerebral ischemia/reperfusion group. The rats in Yangxue Qingnao Granule group exhibited a better neurological function recovery ($P<0.05$). **Conclusion** Yangxue Qingnao Granule improves neurological function recovery after focal cerebral ischemia reperfusion in rats, which may be due to its down-regulating RGMa and promoting axonal regeneration.

[**Key words**] Yangxue Qingnao Granule; cerebral ischemia/reperfusion; RGMa; axonal regeneration; rats

Supported by the General Program of National Nature Science Foundation of China (30770762). Corresponding author: Qin Xinyue, Tel: 86-23-89012478, E-mail: qinxinyue@yahoo.com

缺血性脑损伤后常导致严重而且持久的神经功能缺损,这是因为成年哺乳动物中枢神经系统可塑性差,断离的轴突再生困难[1]。近年研究表明,轴突再生抑制因子是妨碍受损神经元再生的关键因素。排斥性导

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30770762)
[通信作者] 秦新月,电话:(023)89012478,E-mail:qinxinyue@yahoo.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130108.1056.012.html(2013-01-08)

向因子A（repulsive guidance molecular A，RGMa）是一种新的轴突再生抑制蛋白，与特异性受体Neogenin结合后激活下游RhoA信号通路介导生长锥的塌陷和轴突再生抑制作用。大鼠大脑中动脉闭塞模型已广泛用于脑缺血病理生理及神经保护的基础研究，本实验采用此模型观察养血清脑颗粒对大鼠神经功能恢复及缺血侧皮质和海马神经微丝蛋白200（neurofilament protein 200，NF-200）及RGMa蛋白表达的影响，探讨其对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用及潜在的机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

清洁级SD大鼠48只，体质量250～280 g，3月龄，由重庆医科大学实验动物中心提供。养血清脑颗粒（天津天士力制药公司，国药准字Z10960082），兔抗RGMa多克隆抗体（英国Abcam公司），鼠抗NF-200单克隆抗体（武汉博士德公司），细胞膜蛋白提取试剂盒（南京凯基公司），通用型S-P检测试剂盒（北京中杉金桥公司）。

1.2 实验方法

1.2.1 大脑中动脉闭塞/再灌注模型的制作 参照本课题组前期的实验方法[2-3]。使用Longa等[4]的5分评分标准对清醒后的大鼠进行神经功能评分：0分和4分以及后续取材发现蛛网膜下腔出血均剔除，并从同批大鼠中随机补足各组动物数。

1.2.2 动物分组及给药 48只SD大鼠根据随机数字表分为假手术组（S组）、缺血/再灌注组（I/R组）、生理盐水对照组（I/R+C组）和养血清脑颗粒组（I/R+YXQ组），每组12只，6只大鼠进行神经功能评分后，用于免疫印迹检测，另6只大鼠用于免疫组化染色。养血清脑颗粒混悬液，在再灌注的同时进行灌胃给药（2 g/kg），每天1次。对照组用等量的生理盐水灌胃。

1.2.3 免疫组织化学染色 术后2周，选取大脑中动脉支配区皮质及海马的石蜡切片。常规脱蜡至水、微波加热修复表面抗原、灭活内源性过氧化物酶、山羊血清封闭后采用特异性一抗NF-200（1∶100）、RGMa（1∶100）4 ℃过夜、参照S-P法试剂盒说明书行DAB显色、苏木精复染、盐酸酒精分化、脱水透明并封片、Olympus显微镜下观察并摄片。用Image Pro-Plus软件对所得图像进行定量分析，每只大鼠选取3张不连续切片，每张切片随机选择缺血灶周围5个不同的视野。

1.2.4 免疫印迹检测RGMa蛋白表达 再灌注2周时，各组大鼠进行神经功能评分后断头取脑，按凯基膜蛋白提取试剂盒说明书分别提取缺血侧皮质及海马膜蛋白。以30 μg蛋白/电泳道上样，10% SDS-PAGE电泳后将目标蛋白转移至0.45 μm的PDVF膜上，5%脱脂牛奶封闭后，加入兔抗RGMa（1∶400）4 ℃孵育过夜，辣根过氧化物酶标记的二抗孵育1 h后，ECL显色并用Bio-Rad凝胶扫描成像仪拍照。采用Quantity One图像软件进行条带分析，RGMa/β-action值表示蛋白表达的相对含量。

1.2.5 行为学评分 参照Chen等[5]提出的mNSS评分对术后2、7、14 d和28 d的大鼠进行神经功能评价，0分为正常，18分为最严重的功能障碍，得分越高神经功能损害越严重。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较行单因素方差分析，两两比较行LSD检验。

2 结果

2.1 免疫组化检测脑缺血再灌注后缺血侧脑组织RGMa蛋白的表达

各组均可见RGMa蛋白阳性表达于神经元细胞膜。S组皮质及海马神经元可见少量RGMa蛋白阳性细胞，呈浅黄色。缺血再灌注第2周，大鼠缺血灶周围皮质及海马RGMa蛋白表达明显增高，与S组相比有显著性差异（$P<0.05$）。给予养血清脑颗粒治疗后，I/R+YXQ组皮质和海马RGMa蛋白的表达明显降低（$P<0.05$）。见图1、表1。

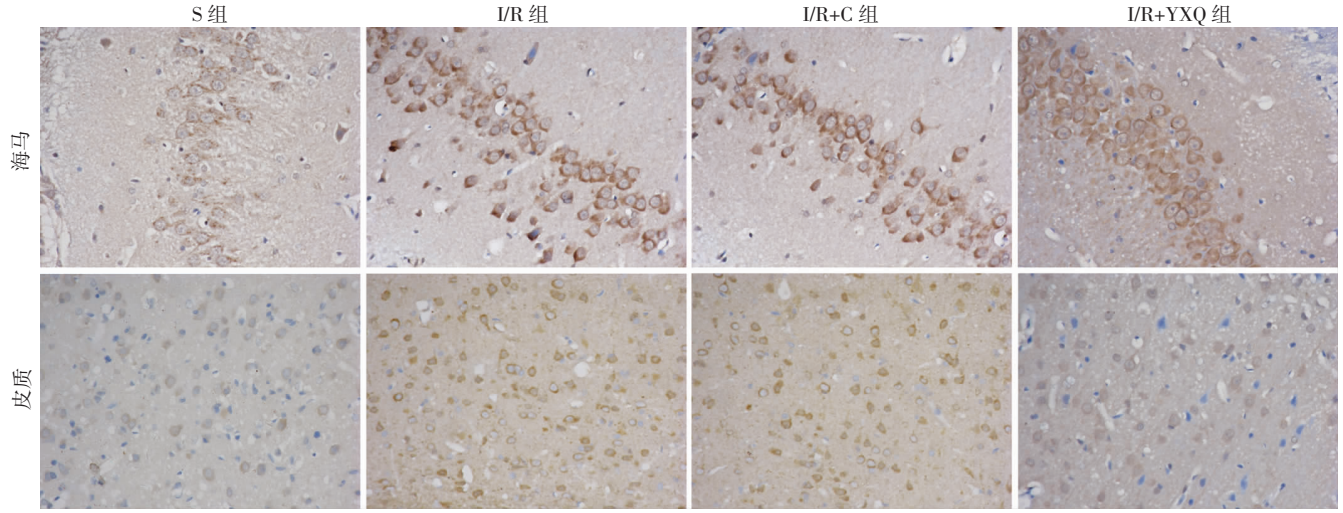


图1 各组大鼠缺血再灌注2周后缺血侧皮质及海马RGMa免疫组化染色观察 （S-P ×200）

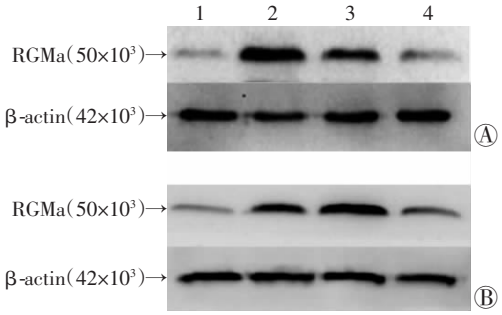
表 1　各组大鼠缺血再灌注 2 周后缺血侧脑组织 RGMa 蛋白的表达（$n=6$, $\bar{x}\pm s$）

组别	RGMa 蛋白的灰度比值		RGMa 蛋白的平均光密度比值	
	皮质	海马	皮质	海马
S 组	0.178 ± 0.033	0.183 ± 0.021	0.180 ± 0.014	0.224 ± 0.031
I/R 组	1.101 ± 0.077[a]	0.748 ± 0.043[a]	0.706 ± 0.085[a]	0.817 ± 0.067[a]
I/R + C 组	1.135 ± 0.047[a]	0.734 ± 0.059[a]	0.694 ± 0.088[a]	0.792 ± 0.056[a]
I/R + YXQ 组	0.564 ± 0.051[ab]	0.562 ± 0.039[ab]	0.392 ± 0.084[ab]	0.402 ± 0.065[ab]

a：$P<0.05$，与 S 组比较；b：$P<0.05$，与 I/R 组比较

2.2　Western blot 检测脑缺血再灌注后缺血侧脑组织 RGMa 蛋白的表达

S 组大鼠缺血灶周围皮质和海马区仅有少量 RGMa 蛋白表达。同 S 组相比，I/R 组皮质和海马 RGMa 蛋白表达显著增高（$P<0.05$），给予养血清脑颗粒治疗后，RGMa 蛋白的表达水平明显下降（$P<0.01$）。见图 2、表 1。



1：S 组；2：I/R 组；3：I/R + C 组；4：I/R + YXQ 组　A：海马；B：皮质

图 2　Western blot 检测各组大鼠缺血再灌注 2 周后缺血侧皮质及海马 RGMa 蛋白的表达

2.3　大鼠缺血侧皮质及海马轴突再生情况

免疫组化染色结果显示，NF-200 蛋白主要阳性表达在神经元胞膜和轴突膜上，S 组皮质（0.203 ± 0.016）及海马神经元（0.261 ± 0.034）可见大量 NF-200 阳性的细胞，轴突较长，排列规则。I/R 组在缺血 2 周时皮质（0.139 ± 0.010）和海马（0.165 ± 0.121）NF-200 阳性细胞突起中断，表达明显减少（$P<0.05$）。IR + YXQ 组缺血侧皮质（0.166 ± 0.011）和海马（0.200 ± 0.016）NF-200 蛋白表达有所增加，与 I/R 组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。见图 3 。

2.4　大鼠神经功能评分

S 组大鼠未出现神经功能缺损症状，缺血后各组 mNSS 评分显著增加，再灌注 2、7 d 后，I/R 组和 I/R + YXQ 组神经功能评分无显著性差异（$P>0.05$）；再灌注 14、28 d 后各手术组神经功能有所恢复，I/R + YXQ 组的 mNSS 评分明显低于 I/R 组（$P<0.05$）。见表 2。

表 2　各组大鼠缺血再灌注后不同时间的神经功能评分比较（$n=6$, $\bar{x}\pm s$）

组别	2 d	7 d	14 d	28 d
I/R 组	10.50 ± 1.05	7.50 ± 1.22	6.83 ± 0.75	5.83 ± 0.75
I/R + C 组	10.83 ± 1.17	7.33 ± 1.03	7.17 ± 1.17	5.50 ± 1.05
I/R + YXQ 组	10.67 ± 1.03	6.50 ± 0.84	4.33 ± 1.03[a]	3.17 ± 0.75[a]

a：$P<0.05$，与 I/R 组比较

3　讨论

养血清脑颗粒是一种中药复方制剂，具有抗氧化、预防血栓、改善软脑膜循环，增加脑血流量等药理作用。近年来，养血清脑颗粒的神经保护作用得到广泛关注。NF-200 是神经元的骨架蛋白，特异性分布在神经元轴突及胞体内。NF-200 在神经元胞体合成后通过轴浆运输至轴突，适应轴突再生的需要，其表达水平

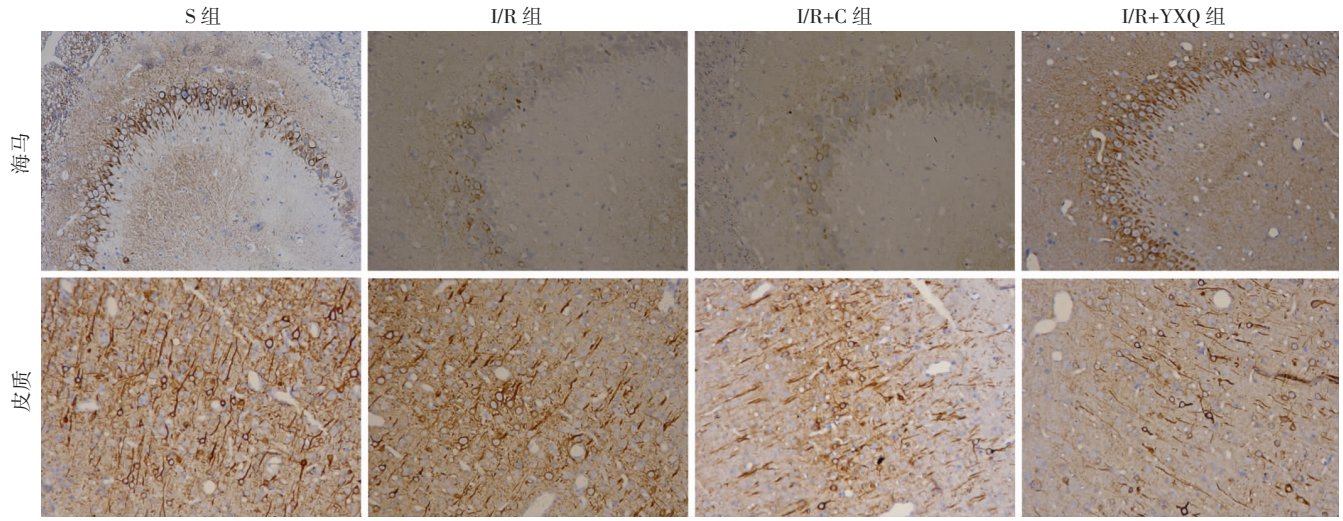


图 3　各组大鼠缺血再灌注 2 周后缺血侧皮质及海马 NF200 免疫组化染色观察　（S-P × 200）

能反映轴突损伤及再生情况[6]。因此本实验采用NF-200的免疫染色作为轴突再生的评价指标。本研究结果表明,养血清脑颗粒能降低大鼠缺血脑组织RGMa蛋白的表达,并增加轴突再生相关蛋白NF-200的表达,促进大鼠神经功能的恢复。Xiong等[7]采用慢性脑缺血模型进行研究发现,养血清脑颗粒通过抑制海马神经元的凋亡、增强胆碱乙酰转移酶的活性,促进大鼠认知功能的改善。我们前期研究发现养血清脑颗粒能减轻缺血再灌注损伤后的炎症反应,下调IL-6及NF-κB等炎性因子。本研究进一步发现,局灶性脑缺血亚急性期,RGMa蛋白在缺血侧皮质和海马仍成高表达,养血清脑颗粒能下调RGMa蛋白的表达,使NF-200蛋白表达增高,促进大鼠神经功能的恢复。因此,养血清脑颗粒下调RGMa表达,促进神经修复,可能与调节脑缺血再灌注损伤触发的炎症反应有关。

RGMa在中枢神经系统中具有介导排斥性轴突导向信号,调节神经管闭合,控制神经元的存活、增殖及分化等作用,从而参与中枢神经系统生长发育的调控过程[8]。近年研究表明,RGMa同时也是一种新的轴突再生抑制因子。人局灶性脑缺血和外伤性脑损伤后,病灶中心及其周围RGMa蛋白的表达升高[9]。成年大鼠脊髓损伤后,病灶周围RGMa蛋白的表达也显著增高,使用RGMa特异性抗体治疗后可促进皮质脊髓束(CST)的轴突再生,从而改善大鼠的神经功能[10]。我们前期研究结果也证实大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后RGMa基因和蛋白在缺血侧皮质和海马持续增高,给予RGMa特异性RNAi后可显著促进轴突再生,改善大鼠的神经功能[11]。Kitayama等[12]进一步研究发现,活化的小胶质细胞抑制神经元轴突生长是通过上调RGMa蛋白实现,给予米诺环素干预后能抑制小胶质细胞的活化,使RGMa表达下调,并促进轴突再生。以上研究表明,脑缺血后神经炎症可能参与调节RGMa蛋白的表达,介导轴突再生抑制作用。

综上所述,养血清脑颗粒对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有神经保护作用,其机制可能与下调缺血侧皮质和海马RGMa蛋白的表达,促进轴突再生,改善大鼠梗死后神经功能的恢复有关。

参考文献:

[1] Akbik F, Cafferty W B, Strittmatter S M. Myelin associated inhibitors: a link between injury-induced and experience-dependent plasticity[J]. Exp Neurol, 2012, 235(1): 43-52.

[2] Zhang G, Zhang J H, Feng J, *et al*. Electrical stimulation of olfactory bulb downregulates RGMa expression after ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Brain Res Bull, 2011, 86(3/4): 254-261.

[3] 黄艳玲, 秦新月, 王恬竹, 等. 马来酸桂哌齐特对大鼠局灶性脑缺血再灌注后白介素-1β、白介素-6的表达及神经功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(6): 596-599.

[4] 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.

[5] Chen J, Sanberg P R, Li Y, *et al*. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. Stroke, 2001, 32(11): 2682-2688.

[6] Tagliaferro P, Javier-Ramos A, Onaivi E S, *et al*. Neuronal cytoskeleton and synaptic densities are altered after a chronic treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN 55, 212-2[J]. Brain Res, 2006, 1085(1): 163-176.

[7] Xiong L, Zhang J J, Sun D, *et al*. Therapeutic benefit of Yangxue Qingnao Granule on cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats[J]. Chin J Integr Med, 2011, 17(2): 134-140.

[8] Severyn C J, Shinde U, Rotwein P. Molecular biology, genetics and biochemistry of the repulsive guidance molecule family[J]. Biochem J, 2009, 422(3): 393-403.

[9] Schwab J M, Monnier P P, Schluesener H J, *et al*. Central nervous system injury-induced repulsive guidance molecule expression in the adult human brain[J]. Arch Neurol, 2005, 62(10): 1561-1568.

[10] Hata K, Fujitani M, Yasuda Y, *et al*. RGMa inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury[J]. J Cell Biol, 2006, 173(1): 47-58.

[11] Feng J, Wang T, Li Q, *et al*. RNA interference against repulsive guidance molecule A improves axon sprout and neural function recovery of rats after MCAO/reperfusion[J]. Exp Neurol, 2012, 238(2): 235-242.

[12] Kitayama M, Ueno M, Itakura T, *et al*. Activated microglia inhibit axonal growth through RGMa[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25234.

(**收稿**:2012-12-17;**修回**:2012-12-31)

(编辑 王小寒)