DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.19.028
第25卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 19
2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

文章编号:1000-5404(2003)19-1751-04

论著

大鼠脑栓塞岛叶神经肽Y基因表达及电刺激小脑顶核的干预作用

王艺明[1],刘兴德[2],董为伟[3],罗向东[1],杨宗城[1] ([1]第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038;[2]贵阳医学院附院心内科,贵州 550001;[3]重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016)

提 要:目的 探讨电刺激小脑顶核干预脑栓塞大鼠岛叶神经肽Y基因表达变化。方法 以大鼠右侧大脑中动脉阻塞(MACO)为模型,用免疫组化方法,观察电刺激小脑顶核后随时间变化的神经肽Y在岛叶皮质表达变化。用兴奋毒性物质鹅膏氨酸毁损两侧小脑顶核,观察电刺激小脑顶核对神经肽Y的影响。结果 当电刺激脑栓塞大鼠小脑顶核时,发现岛叶皮质神经肽Y基因表达从第1天起逐渐降低,第3天降低显著,与同时间的假手术组、非刺激组比较差异有显著性($P<0.05$)。毁损小脑顶核后,治疗作用消失。结论 电刺激小脑顶核可降低神经肽Y在脑栓塞大鼠岛叶皮质的表达,这可能是其对抗缺血性脑损伤改善心脏自主神经活性的脑保护作用之一。

关键词:右侧大脑中动脉阻塞;神经肽Y;电刺激;小脑顶核
中图法分类号:R743.33;R363.124;R394-33 文献标识码:A

Effects of electric stimulation of the cerebellar fastigial nucleus on the expression of insular cortex neuropeptide Y in rats with cerebral embolism

WANG Yi-ming, LIU Xing-de, DONG Wei-wei, LUO Xiang-dong, YANG Zong-cheng (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of electric stimulation of the cerebellar fastigial nucleus on the gene expression of neuropeptide Y in the insular cortex after right cerebral embolism in rats. **Methods** Cerebral embolism model was established by right middle cerebral artery occlusion (MACO). The time-dependent changes of neuropeptide Y expression in the insular cortex of MCAO rats were determined after electric stimulation of the cerebellar fastigial nucleus by immunohistochemical method. Cerebellar fastigial nuclei on both sides were damaged by ibotenic acid and the effects of electric stimulation of the cerebellar fastigial nucleus on the gene expression of neuropeptide Y were investigated. **Results** After electric stimulation of the cerebellar fastigial nucleus of MCAO rats, the expression of neuropeptide Y decreased gradually on the 1st day and significantly on the 3rd day as compared with that in groups without stimulation of the cerebellar fastigial nucleus. There was significant difference in effectiveness rate ($P<0.05$). However, after the cerebellar fastigial nucleus was damaged, there was no therapeutic effect. **Conclusion** Electric stimulation of the cerebellar fastigial nucleus can decrease the expression of neuropeptide Y in the insular cortex of MCAO rats. It may play a role in improvement of the autonomic cardiovascular functional disturbances in protection of ischemic neurons of MCAO rats.

Key words: right middle cerebral artery occlusion; neuropeptide Y; electric stimulation; cerebellar fastigial nucleus

脑栓塞患者易出现心脏自主神经功能紊乱,是脑源性猝死的重要原因。通过刺激大鼠岛叶后部的头侧可诱发出快速心律失常和血浆去甲肾上腺素水平升高、心率增加。岛叶皮质损害引起自主神经功能失调在脑栓塞发病机制中起着重要的作用。目前研究[1]显示大鼠脑栓塞后在岛叶皮质及皮质下位点观察到显著的神经化学递质神经肽Y(Neuropeptide Y, NPY)受体的变化,而NPY与心脏自主神经功能紊乱密切相关[2],故认为岛叶NPY变化可能是局灶脑栓塞后自主神经功能紊乱和功能恢复的原因,为了解这个可能的机制和有利于将来的研究,我们用免疫组化染色来观察大鼠脑栓塞后神经肽Y在岛叶随时间变化的基因表达情况。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39370261)
作者简介:王艺明(1964-),女,江苏省海安市人,博士,副主任医师,主要从事应激与脑损伤发生机制方面的研究,发表论文13篇。电话:(023)65398090;E-mail:ymm@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-08-11;修回日期:2003-09-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

脑栓塞后心脏自主神经功能紊乱至今尚无理想的治疗措施，用心率变异分析方法我们初步的临床研究显示[3]，电刺激小脑顶核（Fastigial nucleus stimulation，FNS）对脑栓塞后心脏自主神经功能紊乱具有改善作用。为了提供更多的实验依据，我们采用线栓法制作脑栓塞动物模型，通过免疫组化染色来观察单侧电刺激小脑顶核后神经肽 Y 在岛叶随时间进程的基因表达情况，来评价电刺激小脑顶核对大鼠脑栓塞后心脏自主神经功能紊乱的影响，并阐明其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 健康雄性 Wistar 大鼠 90 只，体质量（250±5）g，分为：①假手术组：假手术后 6 h、1、3、5、10 d 组 5 组（sham 组只在颈内动脉插栓子，但未造成脑栓塞模型），每组 6 只；②梗塞组：大鼠右侧大脑中动脉阻塞后 6 h、1、3、5、10 d 各时相点，各时点又分为非小脑顶核刺激（No fastigial nucleus stimulation，NFNS）和电刺激小脑顶核组，每组 6 只，刺激组用 70 μA 的方波脉冲，50 Hz 的电流持续电刺激小脑顶核 1 h，刺激 1 次，观察其对神经肽 Y 在岛叶随时间进程的基因表达的影响。

1.1.2 实验仪器、设备及试剂 ①主要仪器：电刺激器 重庆大学电工技术研究所研制。②NPY 兔多抗：Sigma Co，分装，SABC 免疫组化染色试剂盒 武汉博士德生物工程有限公司。③DAB 显色试剂盒：武汉博士德生物工程有限公司。④鹅膏氨酸（Ibotenic acid，IBO）：Sigma Co。

1.2 方法

1.2.1 脑栓塞大鼠模型的建立 根据 Nagasawa 等报道的方法，制备插线法大鼠右侧大脑中动脉阻塞（MCAO）模型。经颈正中切口，暴露右侧颈总动脉，在颈总动脉分叉处从颈外动脉逆插尼龙线进入颈内动脉，长度约 16～18 mm，造成右侧大脑中动脉缺血模型。评分标准如下：①无症状或仅有右眼裂变小，0 分；②左前肢屈曲，1 分；③左前肢屈曲＋行进时向左侧划圈，2 分；④不能站立，身体向右侧倾倒，3 分。评分不足 2 分者淘汰，达到 2 分及以上者方纳入研究对象。

1.2.2 组织切片的制备 大鼠经 3.5％水合氯醛深度麻醉后，经灌注、固定、断头取出全脑，最后连续冰冻切片，HE 染色，片厚 10 μm，空气中晾干后置－70 ℃冰箱中备用。

1.2.3 免疫组织化学染色 用即用型 SABC 免疫组化染色方法检测 NPY 的基因表达情况，主要的实验步骤如下（37 ℃恒温水浴箱中进行）：①冰冻切片，PBS 漂洗 5 min。②0.5％ H_2O_2 纯甲醇液室温浸泡 30 min 以灭活内源性过氧化物酶，PBS 漂洗 5 min×3 次。③滴加正常山羊血清封闭液，室温 20 min。甩去多余液体不洗。④滴加即用型 NPY 抗体，37 ℃ 1 h 左右或 4 ℃过夜。0.1 mol/L PBS 洗 2 min×3 次。（一抗的稀释度，孵育时间和温度与染色强度、背景有直接关系。一般来说，阳性染色强度不够时，可提高一抗浓度和延长孵育时间；背景过高时，可降低一抗浓度和缩短孵育时间）。⑤滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG，20～37 ℃ 20 min。0.1 mol/L PBS 洗 2 min×3 次。⑥滴加试剂 SABC，20～37 ℃ 20 min。0.1 mol/L PBS 洗 5 min×4 次。⑦DAB 显色：使用 DAB 显色试剂盒（ED1022）。取 1 ml 蒸馏水，加试剂盒中，A、B、C 试剂各 1 滴，混匀后加至切片。室温显色，镜下控制反应时间，一般在 5～30 min 之间。蒸馏水洗涤。⑧脱水，透明、封片。显微镜观察，并用图像分析软件进行分析。

1.2.4 定位及电刺激 参照本实验室和 Reis 等的方法，将聚酯漆包镍铬丝电极（直径 200 μl）植入小脑顶核（FN），以前囟后缘为 0 点，坐标为向后 11 mm，正中线向左侧旁开 1.1 mm，深 5.7 mm，采用重庆大学电工技术研究所研制的电刺激器，电流刺激强度为 70 μA 的直流方波脉冲（频率 50 Hz，时程 0.5 ms），每次电刺激时间持续 1 h，1 次，为证实电极插在 FN 的有效位置，在预实验中同时作股动脉插管，记录电刺激大鼠小脑顶核前、中、后的血压变化，刺激后作相应部分脑组织连续横切切片，HE 染色，确定电极所在位置者收入。

1.2.5 小脑顶核毁损的方法[4] 定位同电刺激小脑顶核，于双侧所定小脑顶核位置的颅骨上各钻一孔（直径 1.0 mm），用 0.5 μl 微量注射器分别将 0.2 μl（0.063 μmol/μl）鹅膏氨酸注入两侧小脑顶核，留针 5 min 后将其缓慢拔出，然后将皮缝合 5 d 后制作右侧大脑中动脉阻塞模型，根据不同时间点处死后，取小脑作连续横切切片。经甲苯胺蓝染色证实毁损的小脑顶核处神经元数量减少，毁损了小脑顶核的样本纳入实验，否则弃之。

1.2.6 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较用 t 检验，多组间比较采用方差分析，多组间两两比较用 q 检验。

2 结果

2.1 电刺激小脑顶核对脑栓塞大鼠血压的影响

电刺激单侧小脑顶核时，随着刺激电流强度增大，血压的变化较明显，但正常成年大鼠的平均动脉压上升不超过15 mmHg，双侧刺激时，平均动脉压升高 14～17 mmHg，刺激强度为 80 μA 时，平均动脉压升高 18～27 mmHg。停止电刺激小脑顶核后血压逐渐恢复至刺激前水平，刺激强度越大，血压维持在越高的水平，停止电刺激小脑顶核后血压恢复至正常的时间越长，与开始刺激时血压上升的速度和幅度等变化正好相反。刺激强度为 50 μA 时，停止刺激（5 min）后 3～4 min 血压即恢复至刺激前水平。刺激强度为 80 μA 时，停止刺激（9 min）后 8～10 min 血压才恢复至刺激前水平，提示血压恢复的速度也可能与电刺激小脑顶核的时间有关。但对脉压差无明显影响。

2.2 电刺激小脑顶核对脑栓塞大鼠岛叶 NPY 基因表达影响

结果显示脑梗塞后 6 h NPY 表达增加，1 d 后表达显著，3 d 达高峰，10 d 稳定下来，与 sham 组比较，差异有显著性，表明局部脑栓塞后 3 d 是 NPY 表达的高峰时期。经对脑梗死大鼠电刺激小脑顶核刺激 1 h，1 次，观察到岛叶 NPY 基因表达从第 1 天开始降低，3 d 显著降低，一直到 10 d 仍低于未刺激组，两组比较差异有显著性，而小脑顶核刺激组与 sham 组比较，差异不明显，说明电刺激小脑顶核可使脑栓塞大鼠岛叶 NPY 基因表达下调，见表 1。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　电刺激脑栓塞大鼠小脑顶核后 NPY 免疫反应密度变化(1×10^{-2}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of NPY immunoreactivity density in insular cortex after electric stimulation of the cerebellar fastigial nucleus of MCAO rats(1×10^{-2}, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	6 h	1 d	3 d	5 d	10 d
NPY(Sham)	6	45.14±13.01	35.76±8.36 **	20.24±3.47 *	36.31±4.03 *	30.65±8.61 *
NPY(MCAO)	6	54.52±14.61	72.30±28.78	110.61±45.43	84.82±24.52	69.13±20.74
NPY (MCAO+FNS)	6	46.32±12.11	40.12±6.74 **	52.31±11.88 **	45.32±6.09 *	39.42±5.25 *

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* same time MCAO groups

2.3　毁损顶核后 FNS 对梗塞大鼠岛叶 NPY 基因表达的影响

结果显示: 毁损顶核后 2 h 对脑栓塞大鼠进行小脑顶核刺激 1 h, 1 次, 观察 6 h、1、3、5、10 d 组各时间点, 与未毁损顶核组比较, NPY 基因表达未见下调, 差异有显著性($P<0.05$), 说明毁损顶核后电刺激小脑顶核对 NPY 基因表达失去作用, 见表 2。

表 2　毁损顶核后各组 NPY 免疫反应密度变化(1×10^{-2}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of NPY immunoreactivity density in IC after cerebellar FN lesion(1×10^{-2}, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	6 h	1 d	3 d	5 d	10 d
Intact cerebullum FN+FNS	6	38.14±13.06	25.76±8.36 *	15.24±3.47 *	16.31±4.03 *	26.65±8.61 *
Cerebellum FN-lesion+FNS	6	54.21±11.63	70.62±17.98	123.27±3.17	68.33±4.38	49.74±12.21

*: $P<0.05$ *vs* same time control groups

3　讨论

3.1　用岛叶 NPY 基因表达变化来评价脑栓塞大鼠心脏自主神经功能紊乱

内脏感觉的代表区在大鼠岛叶, 在岛叶的内脏感觉代表区和它的输入和输出联接能够使岛叶在脑-心相互作用中起一种关键的作用。

实验室发现电刺激岛叶引起大鼠、猫、狗、猴和人的动脉压、心率、呼吸、立毛、瞳孔扩大、肠蠕动、流涎和肾上腺分泌的变化, 对癫痫患者通过刺激岛叶可引起动脉压和心率的增加已被报道[5], 在年长鼠和右侧脑栓塞大鼠的脑栓塞模型中, 岛叶对脑源性心血管紊乱的影响意义更加深远, 岛叶是引起脑源性心血管和自主神经功能紊乱的中枢。

神经肽 Y(NPY)是 1982 年由 Tatemoto 首先从猪脑中分离出来的一种神经活性肽, 由 36 个氨基酸残基组成, NPY 广泛分布于中枢神经系统、周围神经系统和心血管系统等。近 10 年来的研究表明, 脑血管不仅接受肾上腺素能和胆碱能神经纤维支配, 它还接受多种肽能神经支配。NPY 被认为是迄今为止所发现的在脑血管内含量最高的一种肽, 它与肾上腺素共存于交感神经节内[6], 是交感神经的活性物质, 当交感神经兴奋时, 二者可同时被释放。①NPY 具有直接收缩血管作用。②增强肾上腺素的缩血管作用, 也可以加强多种缩血管物质的作用。③NPY 可调节神经递质释放, 从而达到调节血管舒缩作用。在大鼠体内实验表明, NPY 抑制节后神经刺激时, 交感神经末梢释放 NE, 这一作用是经突触前 α-受体介导的, 具有减弱舒血管物质的作用, 在兔离体脑动脉和冠状动脉, NPY 可使腺苷、乙酰胆碱的舒张曲线右移, 可能 NPY 对脑血管作用主要表现在减弱舒血管物质的血管舒张作用。④NPY 还具有促进血管平滑肌细胞增殖, 主要通过提高细胞内 Ca^{2+} 浓度, 激活蛋白激酶, 进而提高 mRNA 在组织的表达, 促进血管平滑肌细胞的增生。⑤NPY 可经突触前机制抑制迷走神经释放乙酰胆碱。当交感神经受刺激时, 它和 NE 一同释放并抑制心脏对交感神经刺激的反应性, NPY 可持续抑制窦房结、房室结和心房细胞对迷走神经刺激的反应性, 但不影响心脏对外源性 NE 和阿托品的反应, 由此可见, NPY 在脑源性心脏自主神经功能紊乱中有着重要作用。我们的研究显示梗塞后 6 h NPY 表达增加, 1 d 后表达显著, 3 d 达高峰, 10 d 稳定下来, 表明局部脑栓塞后 3 d, 是自主神经紊乱的高峰时期。Cheung 等研究显示脑栓塞岛叶 NPY 受体免疫反映性增加, 我们在临床研究中也提示, 定量反映脑栓塞自主神经活性的心率变异性变化与患者血浆 NPY 浓度变化密切相关, 显示脑源性心脏自主神经功能紊乱越严重, 血浆 NPY 浓度越高, 说明 NPY 与脑源性心脏自主神经功能紊乱密切相关。Margaret 的研究与我们的结果有相似性。为什么脑栓塞后岛叶 NPY 基因表达增加, 可能的机制为脑栓塞后缺血周围局部神经元 NPY 的合成增加, 且脑栓塞后脑水肿的形成与 NPY 的表达增高有关, 因为脑水肿在缺血后数小时出现, 而在缺血后 3 d 达高峰, 与 NPY 表达增加在时间上一致, 并认为 NPY 在岛叶的表达增加可能是一种保护

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

性的反应，与局部脑栓塞的功能恢复相关联。

3.2 电刺激小脑顶核对脑栓塞大鼠岛叶NPY基因表达的影响

Reis等认为脑内存在可以保护其自身生存的机制，其中之一存在于小脑顶核内的神经元。因此，电刺激小脑顶核可能通过小脑顶核激活脑内条件性中枢神源性神经保护(CCNN)机制而产生级联放大的保护作用，文献[3, 7, 8]报道，大鼠脑栓塞后电刺激小脑顶核30 min至1 h，可使缺血脑组织的rCBF明显增加而不伴有脑代谢改变，可减少白细胞浸润，改善脑血液循环，降低脑含水量，降低脑微血管炎症反应，抑制脑栓塞周围去极化波(PIDs)和大脑皮层扩布性抑制(SD)，降低诱生型一氧化氮合酶(iNOS)的表达等。提示电刺激小脑顶核减轻缺血神经元损害的机制是多方面的。

正常情况下，大脑通过自主神经系统和内分泌机制对心血管和自主神经功能进行调节，脑-心相互作用在应答身体剧烈运动、惊恐、环境压力和情绪变化等方面，能协同调节心脏活动和血管舒缩功能，但脑栓塞后能产生心血管和自主神经功能紊乱。临床脑栓塞发作特点是突发性，通常在几分钟内神经缺损达到最大程度，并出现自主神经功能紊乱，Korpelainen[9]研究提示脑栓塞后心脏自主神经功能紊乱，如不经特殊的治疗其功能恢复通常在6个月甚至更长时间，脑源性猝死是最严重的后果，提示岛叶NPY基因表达可能与神经元的恢复相关，或可能是神经病学和引起自主神经功能紊乱的基础。

研究结果显示，对脑栓塞大鼠电刺激小脑顶核后，NPY从第1天开始表达降低，3 d降低显著，一直到第10天仍低于对照组，说明电刺激小脑顶核使NPY表达降低，从而改善了心脏自主神经功能紊乱，电刺激小脑顶核可调节神经递质释放，这些神经递质主要包括乙酰胆碱(Ach)和去甲肾上腺素(NE)。NPY与NE共存于交感神经节内神经元的亚细胞结构中，二者在交感神经节中共存可能意味着交感神经与效应器连接中神经递质作用的改进，所以交感神经受刺激后，NE的释放量和时程可能被抑制和减少。Glickstein[4]认为在副交感神经及其周围神经末梢中，除了VIP/PHI外，还有NPY和Ach的共存，因此使脑血管反应更趋复杂，NPY和Ach在神经末梢竞争性抑制释放，当电刺激小脑顶核时，Ach升高，则可导致NPY的释放减少，从而可推论出电刺激小脑顶核可引起NPY的表达降低，表明自主神经活性得到改善。这个观点对我们的研究有一定的支持作用。因此电刺激小脑顶核可使交感神经活性降低、迷走神经活性增强，从而改善了脑栓塞后心脏自主神经功能紊乱。

我们也认为电刺激小脑顶核抑制了缺血区周围岛叶神经元的NPY的合成，并降低了脑水肿，使NPY的表达下调，从而使脑源性心脏自主神经功能紊乱得到改善，当IBO注入双侧小脑顶核，使其固有神经元发生兴奋毒性损害反应而坏死，则电刺激脑栓塞大鼠的小脑顶核所产生的对抗兴奋毒性及缺血性损害的神经保护作用消失[3]，使神经递质的调节出现障碍，从而使FNS对脑栓塞后自主神经功能紊乱失去改善作用。但进一步的机制尚在研究中。

参考文献：

[1] Cheung R T F, Cechetto D F. Neuropeptide Y-Y1 receptor antisense oligodeoxynucleotide increases the infarct volume after middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Neuroscience, 2000, 98(4): 771—777.

[2] Margaret A, Smith W, Herbert H, *et al*. Cardiac function in neuropeptide Y Y4 receptor-knockout mice[J]. Regul Pept, 2002, 110(1): 47—54.

[3] 董为伟. 电刺激小脑顶核与中枢神经源性神经保护[J]. 中国工程科学, 2001, 3(11): 32—38.

[4] Glickstein S B, Golanov E V, Reis D J. Intrinsic neurons of fastigial nucleus mediate neurogenic neuroprotection against excitotoxic and ischemic neuronal injury in rat[J]. J Neurosci, 1999, 19(10): 4142—4154.

[5] 孙 琳, 李义召, 刘爱芬. 脑出血患者血神经肽Y和神经降压素的研究[J]. 卒中与神经疾病, 2000, 7(3): 147—129.

[6] 罗南萍, 杨道理, 陈 青. 缺血性脑血管病患者血浆和血小板提取液神经肽Y与神经降压素的改变[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(8): 750—751.

[7] Galena E, Glickstem S R, Feinstein D L, *et al*. Stimulation of cerebellar vestigial nucleus inhibits interleukin-β-induced cerebrovascular inflammation[J]. Am J Physiol (Heart Circ. Physiol 44), 1998, 275(6): H2053—H2063.

[8] Golanov E V, Reis D J. Neuroprotective electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus attenuates expression of perinfarction depolarizing wave (PIDs) and inhibits cortical spreading depression[J]. Brain Res, 1999, 818(2): 304—315.

[9] Korpelainen J T, Sotaniemi K A, Huikuri H V, *et al*. Circadian rhythms of heart rate variability is reversibly abolished in ischemic stroke[J]. Stroke, 1997, 28(11): 2150—2154.

（编辑 张 宁）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net