DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.09.022
第24卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 9
1048 2002年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)09-1048-04

全脑缺血大鼠海马CA1区神经元凋亡和神经生长因子的保护作用

熊建琼,文 亮 (第三军医大学附属西南医院急救部ICU,重庆 400038)

提 要:目的 研究大鼠全脑缺血再灌注后海马CA1区P75NTR、Bcl-2、Bax表达及细胞凋亡的变化及神经生长因子(NGF)对它们的影响,进一步探讨该区神经元短暂脑缺血后产生凋亡及NGF对神经元保护作用的可能机制。方法 通过四血管闭塞法建立大鼠全脑缺血-再灌注模型,侧脑室注射NGF,免疫组织化学法检测P75NTR、Bcl-2、Bax表达的情况,TUNEL法检测神经元凋亡。结果 对照组海马CA1区无P75NTR、Bcl-2阳性染色和凋亡细胞,可见少量Bax表达,再灌注后该区Bcl-2始终阴性表达,Bax则表达增加,出现P75NTR阳性表达和细胞凋亡;在NGF给药组,再灌注后海马CA1区Bcl-2出现阳性染色,而Bax及P75NTR的表达则明显降低,细胞凋亡亦明显减少。结论 再灌注后海马CA1区P75NTR、Bax的表达增加可能是神经元产生凋亡的机制之一,NGF抑制脑缺血后细胞凋亡的作用可能是通过对其受体的调节,从而调节Bcl-2和Bax的表达来实现的。

关键词:神经生长因子;凋亡;P75NTR;Bcl-2;Bax;脑缺血
中图法分类号:R322.81;R329.28;R743.31 文献标识码:A

Neuronal apoptosis and protective effect of nerve growth factor in hippocampal CA1 region after cerebral ischemia in rats

XIONG Jian-qiong, WEN Liang (Department of Emergency, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism underlying apoptosis and protective effect of nerve growth factor (NGF) in hippocampal CA1 region after cerebral ischemia/reperfusion. Methods Wistar rats were inflicted with four-vessel occlusion for global ischemia, and those in NGF group were given intraventricular injection of NGF after ischemia. Immunohistochemistry staining was used to detect P75NTR, Bcl-2 and Bax, and TUNEL method to detect apoptosis. Results The expression of Bax was positive, while the apoptosis and the expressions of P75NTR and Bcl-2 were negative in normal control. After ischemia/reperfusion, the expression of Bcl-2 was still negative, while the expression of P75NTR and Bax increased and reached its summit in day 3. TUNEL-positive neurons were seen in day 2 and reached a peak in day 3. In NGF group, the expression of Bcl-2 was increased, while the expression of Bax, P75NTR and TUNEL positive cells were obviously decreased. Conclusion These findings suggest that the increased expression of P75NTR and Bax in hippocampal CA1 region after cerebral ischemia/reperfusion may be one of the main reasons for apoptosis after ischemia. Intraventricular NGF might have protective effect on neuronal apoptosis after cerebral ischemia via regulation the expression of Bcl-2 and Bax by regulated NGF receptor.

Key words: nerve growth factor; apoptosis; P75NTR; Bcl-2; Bax; cerebral ischemia

近年来的一些研究显示细胞凋亡是脑缺血再灌注后神经细胞损伤中与细胞坏死不同的一种形式,许多细胞因子对神经细胞凋亡起调控作用,其中神经生长因子(NGF)与神经细胞凋亡的关系十分密切。本实验应用大鼠全脑缺血再灌注模型,观察全脑缺血再灌注后海马CA1区P75NTR、Bcl-2、Bax表达的变化及神经元凋亡的情况,以及侧脑室注射NGF后对它们的影响,旨在进一步探讨缺血致神经元凋亡的机制以及NGF对缺血受损神经元保护作用的可能机制,为临床脑缺血损伤后的治疗提供实验指导。

1 材料与方法

1.1 动物模型

健康雄性Wistar大鼠,体重250~300 g,由第三军医大学实验动物中心提供。使用随机数字表法将大鼠随机分为对照组(10只)、脑缺血组(Ⅱ)及缺血给药组(Ⅲ)。脑缺血组大鼠采用改良Pulsinelli法[1]制备四血管闭塞大鼠全脑缺血10 min再灌注模型;缺血给药组大鼠在烧灼椎动脉后,按照Bures图谱于侧脑室(A 1.5,L 1.5,H 3.0)埋置不锈钢导管(外径0.6 mm)一个,于缺血后5 min,1 d,2 d侧脑室内注射NGF 10 μg;对照组仅暴露双侧翼孔及颈动脉,各血管不行闭塞,侧脑室埋管,注入等量生理盐水。再灌注时间为1、2、3、5、7 d,每个时相点10只大鼠。

1.2 取材切片

大鼠在相应时间点杀死,经左心室灌注,生理盐水冲净血液后,以4 ℃4%多聚甲醛液灌注固定,灌注后迅速断头取脑。冷冻切片的准备:将脑组织置于20%蔗糖液中(4%低聚甲醛配制)12~24 h(4 ℃),冷冻切片,片厚30 μm。石蜡切片:将脑组织置灌注液中后固定6 h(4 ℃),常规石蜡包埋、切固,片厚5 μm。

1.3 海马CA1区神经元P75NTR的免疫组织化学染色

将冷冻切片与P75单抗1∶50(购自Calbiochem公司)4 ℃孵育过夜,按ABC试剂盒提供的方法操作(ABC试剂盒购自中山试剂公司),DAB显色,甲基绿复染,封片,观察。

1.4 海马CA1区神经元Bax和Bcl-2的免疫组织化学染色

石蜡切片经微波炉修复抗原10 min,分别与bcl-2抗血清1∶100、bax抗血清1∶800(均购自中山试剂公司)4 ℃孵育过夜,

作者简介:熊建琼(1970—),女,重庆市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事缺血性脑损伤及修复的研究。电话:(023)65318301—73046

收稿日期:2001-12-29;修回日期:2002-01-29

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

按 ABC 试剂盒提供的方法操作(ABC 试剂盒购自中山试剂公司), DAB 显色, 用苏木精复染, 封固, 观察。

1.5　TUNEL 法原位检测细胞凋亡

应用荧光标记的终末脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TdT-mediated dUTP nick end labelling, TUNEL), 按凋亡试剂盒所示步骤进行染色, DAB 显色, 封固, 观察。

1.6　统计学处理

免疫组织化学染色结果和 TUNEL 法结果用 CAMIS 007 型真彩医学图像分析系统进行处理, 每张切片随机取 5 个视野, 以积分光密度表示, 取 5 个视野均值作为结果, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。图像分析结果进行双因素方差分析。

2　结果

2.1　P75NTR 的免疫组织化学变化

对照组, 海马 CA1 区神经元未见 P75NTR 染色, 脑缺血再灌流后第 1 d, 该区神经细胞即有 P75NTR 的表达, 与对照组相比有非常显著差异($P<0.01$), 并逐渐增加, 第 3 天时达峰值, 见图 1, 随后逐渐下降, 但至再灌流后 7 d, 仍可见到阳性染色。在 NGF 给药组, 未能阻止再灌流后 P75NTR 的表达, 与对照组相比有非常显著差异($P<0.01$), 但与缺血组相比, 却明显降低了其表达水平, 与缺血组相比有非常显著差异($P<0.01$)。



图 1　再灌注后 3 d 海马 CA1 区 P75NTR 阳性染色细胞数目最多, 染色最强　(ABC×200)

Fig 1　Maximal strongly-stained P75NTR positive neurons in hippocampal CA1 region in day 3 after reperfusion　(ABC×200)

2.2　海马 CA1 区 Bcl-2 的变化

对照组, 海马 CA1 区未见 Bcl-2 阳性染色存在, 再灌流后各时相点均未见 Bcl-2 的阳性染色; 在 NGF 给药组, 再灌流后 1 d 海马 CA1 区神经元即可见到有 Bcl-2 的表达, 与缺血组相比有非常显著差异($P<0.01$), 并随时间延长逐渐增高, 于第 3 天达到高峰, 见图 2, 与缺血组相比有非常显著差异($P<0.01$), 之后逐渐降低, 于再灌流后 7 d 消失。

2.3　海马 CA1 区 Bax 的变化

对照组鼠海马 CA1 区可见到少量 Bax 阳性染色的神经元存在, 缺血再灌流后 1 d Bax 表达即轻度增加, 其后随再灌流时间的延长逐渐升高, 至第 3 天 Bax 表达最高, 见图 3。与对照组相比有非常显著差异($P<0.01$), 之后逐渐下降, 于第 7 天恢复至对照组水平。NGF 给药组, 并不能阻止 Bax 的升高, 与对照组相比有显著差异($P<0.01$), 但却明显降低了 Bax 的升高程度, 与缺血组相比有非常显著差异($P<0.01$)。



图 2　缺血给药后第 3 天海马 CA1 区 Bcl-2 阳性染色最强　(ABC×200)

Fig 2　Hippocampal CA1 neurons with strongest Bcl-2 staining in NGF group in day 3 after reperfusion　(ABC×200)

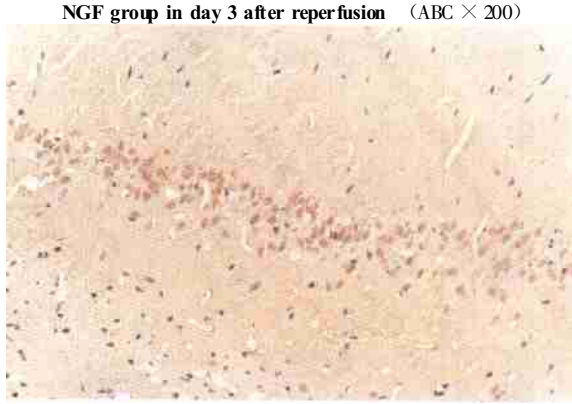


图 3　再灌注后第 3 天海马 CA1 区 Bax 阳性染色最强　(ABC×200)

Fig 3　Most strongly Bax stained neurons in hippocampal CA1 region in day 3 after reperfusion　(ABC×200)

2.4　海马 CA1 区细胞凋亡的观察

对照组海马 CA1 区无细胞凋亡存在, 缺血再灌注 2 d 可见海马区出现凋亡细胞, 与对照组相比有非常显著差异($P<0.01$), 但反应较弱, 至第 3 天时凋亡细胞数目最多, 染色最强, 见图 4。其后逐渐减弱, 第 7 天消失; NGF 给药组未能阻止再灌注后凋亡的发生, 与对照组相比有非常显著差异($P<0.01$), 但却明显减少了凋亡细胞的数目, 与缺血组相比有非常显著差异($P<0.01$)。



图 4　再灌注后 3 d 海马 CA1 区可见大量细胞凋亡　(TUNEL×200)

Fig 4　Massive apoptotic neurons in hippocampal CA1 region in day 3 after reperfusion　(TUNEL×200)

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

表1 大鼠全脑缺血再灌注及 NGF 给药后海马 CA1 区 P75NTR、Bcl-2、Bax 及细胞凋亡的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Expressions of P75NTR, Bcl-2, Bax and neural apoptosis and effect of NGF after cerebral ischemia/reperfusion($\bar{x}\pm s$)

Target	Group	Control	Time after cerebral ischemia/reperfusion				
			1 d	2 d	3 d	5 d	7 d
P75NTR	Ⅱ	0	11.58±2.70**	19.24±2.76**	27.80±2.25**	7.11±1.31**	4.70±0.72**
	Ⅲ	0	7.52±1.19△△**	9.23±2.11△△**	11.44±0.92△△**	6.3 ±1.44**	4.54±1.93**
Bcl-2	Ⅱ	0	0	0	0	0	0
	Ⅲ	0	2.38±0.39△△**	4.11±1.14△△**	6.05±0.36△△**	1.69±0.34△△**	0
Bax	Ⅱ	2.20±0.18	7.43±0.72*	12.48±0.97**	21.86±2.20**	4.69±0.53	1.96±0.87
	Ⅲ	2.20±0.18	4.37±0.41△	8.69±1.42△*	12.36±1.33△△**	2.61±0.40	2.44±0.57
Apopsis	Ⅱ	0	0	7.88±1.58**	37.49±6.82**	2.21±0.17**	0
	Ⅲ	0	0	4.73±0.5△**	25.21±6.65△△**	1.52±0.36**	0

Ⅱ: Group of cerebral ischemia/reperfusion; Ⅲ: Group of intraventricular injection of NGF after ischemia; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* Group Ⅱ

3 讨论

缺血性脑损伤的机制和防治一直是该领域研究的热点。由于海马 CA1 区神经元对缺血具有选择性敏感,短暂性脑缺血即可导致该区神经元的迟发性死亡,所以海马 CA1 区成为缺血性脑损伤研究的一个典型脑区。近年来随着研究的深入,人们发现短暂脑缺血后海马 CA1 区出现神经元的死亡与细胞凋亡密切相关,有学者认为短暂脑缺血后海马 CA1 区神经元出现的迟发性死亡是细胞凋亡的过程。缺血致神经元凋亡的确切机制目前还不清楚。神经生长因子对神经元具有营养和保护作用,可减轻脑缺血后海马组织的迟发性神经元死亡。

3.1 TUNEL 法检测凋亡细胞的特异性

检测细胞凋亡的方法很多,其中,TUNEL 法就是用终末脱氧核苷酸转移酶,将生物素、荧光素或地高辛标记的核苷(如 Biotin-dUTP, DIG-dUTP, Fluorescene-dUTP)联结到 DNA(单链或双链)的 3′-OH 末端,从而检测凋亡的方法。凋亡的片段 DNA 含 3′-OH 末端,而坏死的 DNA,因被溶酶体核酸酶溶解,故 DNA 的末端 5′-OH,不能用 TUNEL 法检出,TUNEL 法具有检测快,特异性强,灵敏度高,可以原位检测细胞凋亡等优点,是目前最受青睐的方法之一。所以本实验采用 TUNEL 法检测细胞凋亡。

3.2 再灌注后海马 CA1 区 P75NTR 表达及细胞凋亡的变化

P75NTR 是低亲和力神经营养因子受体(Neurotrophin Receptor, NTR),能与目前已知的神经营养因子家族的所有成员以低亲和力结合,其在发育中的神经系统中广泛存在,但在生后水平降低,至成年时,中枢神经的前脑基底、苍白球、尾状核有表达,但海马区无 P75NTR 表达。有实验发现直接的组织损伤能导致 P75NTR 的表达。如在成年大鼠小脑损伤后 1 d,小脑 Purkinje 细胞就出现 P75NTR 的再表达[2]。然而,在脑缺血/再灌注损伤中它是否有表达及变化规律却研究甚少。在本实验中,我们观察了大鼠全脑缺血 10 min 再灌注 1、2、3、5、7 d 的大鼠,实验显示:在对照组海马 CA1 区神经元无 P75NTR 表达,此时无细胞凋亡存在,再灌注后 1 d 就可见到 P75NTR 的阳性染色,再灌注后 2 d P75NTR 表达增强,出现细胞凋亡,再灌注后 3 d P75NTR 表达达峰值,细胞凋亡亦达峰值,之后 P75NTR 的表达及细胞凋亡均逐渐减弱。近年来研究发现,P75NTR 属肿瘤坏死因子受体家族,在无 NGF 高亲和力受体 trkA 存在时,它具有介导细胞凋亡的作用,而且凋亡的水平与 P75NTR 的表达水平呈正相关[3],但其介导细胞凋亡的详细机制还不清楚。而正常成体鼠和缺血后鼠海马 CA1 区均无 trkA 表达[4],因此,脑缺血再灌注后海马 CA1 区出现 P75NTR 的单独表达,此时它作为死亡信号分子,可能参与了该区细胞凋亡的发生。再灌注后海马 CA1 区 P75NTR 表达增加的机制目前还不清楚,尚需进一步研究。

3.3 再灌注后海马 CA1 区 Bcl-2、Bax 及细胞凋亡的变化

Bcl-2 和 Bax 都是与凋亡密切相关的基因,它们的作用是相互拮抗的[5],Bcl-2 能抑制细胞凋亡,而 Bax 则介导细胞凋亡。当 bcl-2 过量时,形成 Bcl-2 同源二聚体,细胞受到保护;当 Bax 过量时,形成 Bax 同源二聚体,细胞则趋向凋亡。Bcl-2 的抗凋亡活性是通过与 Bax 组成异源二聚体,从而阻止 Bax 介导凋亡的作用。因此,在凋亡刺激因子作用下,这两种蛋白的比例决定了细胞是凋亡还是存活。本实验显示,对照组海马 CA1 区无 Bcl-2 阳性染色和凋亡细胞,可见少量 Bax 表达,大鼠全脑缺血再灌注后该区 Bcl-2 始终阴性表达,而 Bax 则表达增加,并于再灌注后第 3 天达峰值,细胞凋亡于再灌注后第 2 天出现,3 d 达峰值。提示再灌注后海马 CA1 区 Bcl-2 始终阴性表达,而 Bax 则表达增加,可能参与了该区神经元凋亡的发生。

3.4 NGF 对再灌注后海马 CA1 区神经元凋亡的保护作用

NGF 是一种靶源性细胞因子,对神经细胞的生存、发育、修复及神经功能的维护具有重要的作用,既往的研究表明,NGF 能显著减轻缺血后海马 CA1 区的 DND,本实验显示侧脑室注射 NGF 后,海马 CA1 区 Bcl-2 表达明显增加,P75NTR、Bax 表达明显降低,细胞凋

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

亡明显减少，表明 NGF 可能通过对 P75NTR 及 Bcl-2、Bax 的调节而抑制脑缺血后神经细胞凋亡。

外源性 NGF 对缺血后神经细胞凋亡的调控机制目前尚不清楚。有研究显示撤除血清后的细胞凋亡能被 NGF 抑制，同时这些细胞的 Bcl-2 显著增加，而 Bcl-2 的反义核酸能抑制 NGF 诱导的 Bcl-2 的增加，同时 NGF 对细胞的保护作用也被取消[7]。NGF 必须与受体结合才能启动其生物效应，而 NGF 受体分为高亲和力受体 trkA 和低亲和力受体 P75NTR，P75NTR 的功能复杂，在 trkA 存在时，它协同 trkA 共同转导 NGF 的生物效应，促进神经元的存活和生长；当 trkA 不存在时它则具有介导细胞凋亡的作用。在正常成体鼠脑海马组织内不存在 trkA 和 P75NTR，缺血再灌注后仍无 trkA 的表达，而 P75NTR，如实验所示，出现阳性表达，而在侧脑室注射 NGF 后，NGF 可上调 P75NTR 及 trkA 水平[6]，使神经元对 NGF 具有反应性。结合本实验，我们推测，NGF 可能通过对其受体 trKA 及 P75NTR 的调节使神经元对 NGF 具有反应性，而 NGF 与受体结合后通过某种途径上调 Bcl-2 的表达，抑制 Bax 的表达，从而抑制了神经元凋亡的发生。而我们实验发现在侧脑室注射 NGF 后 P75NTR 水平比缺血组降低，可能是注射 NGF 后神经元损伤减轻，P75NTR 的升高程度降低，及 NGF 上调其受体表达，这两方面综合效应的结果。对于 NGF 与受体结合后是通过何种途径来调节 Bcl-2 和 Bax 表达的，还有待进一步研究。

参考文献：

[1] Pulsinell W A, Brierley J B. A new model of bilateral hemispheril ischemia in the unanesthetized rat[J]. Strike, 1997, 10(0): 267－269.
[2] Martinez M R, Fernandez A P, Bentura M L, *et al*. Subcellular localization of low-affinity nerve growth factor receptor immunoreactive protein in adult rat purkinje cells following traumatic injury[J]. Exp Brain Res, 1998, 119(1): 47－57.
[3] Effert A, Sieverts H, Ikegaki N, *et al*. P75 mediated apoptosis in neuroblastoma cells is inhibited by expression of trkA[J]. Med Pediatr Onclo, 2000, 35(6): 573－576.
[4] Merlio J P, Emfors P, Kokaia Z, *et al*. Increased production of the TrkA protein tyrosine kinase receptor after brain insults[J]. Neuron, 1993, 10(2): 151－174.
[5] Stanley J K. Regulators of cell death[J]. TIG, 1995, 11(3): 101.
[6] Kitzman P H, Perrone T N, Lemaster A M, *et al*. Level of p75 receptor expression in sensory ganglia is modulated by NGF level tn the target tissue [J]. J Neurobiol, 1998, 35(3): 258－270.
[7] Katoh S, Mitsui Y, Kitani K, *et al*. Nerve growth factor rescues PC12 cells from apoptosis by increasing amount of Bcl-2[J]. Neurosci Lett, 1997, 23(2): 71－74.

（编辑　陈聪连）

文章编号：1000-5404(2002)09-1051-02

个案与短篇

海蓝组织细胞综合征 2 例报告

Report of 2 cases of sea-blue histiocytic syndrome

于冬梅，阎晓初　（第三军医大学附属西南医院病理研究所，重庆 400038）

例 1，女性，33 岁，右上腹隐痛 9 月加重 2 月，无明显诱因，不伴有畏寒、发热、无低热、盗汗，一直未予特殊治疗。1 月后，发现左上腹部包块，质硬，触之有轻微痛感，并出现头昏，乏力。查体：发育正常，营养中等，全身皮肤无黄染，浅表淋巴结不肿大，心肺正常，肝右肋下 2 cm，左上腹扪及巨脾 1 线 10 cm，2 线 10 cm，3 线 10 cm，腹水征(－)，血红蛋白 125 g/L，白细胞 3.6×10^9/L，红细胞 4.25×10^{12}/L，血小板 35×10^9/L，骨髓涂片：有核红细胞增生活跃，血小板形态未见异常，可见类海蓝组织细胞，B 超检查，脾脏显著增大，CT 示巨脾。

大体检查：切除脾脏一个，大小为 19 cm×14 cm×10 cm，切面可见数个灰白色结节，花生米大。肝脏组织灰红色花生米大组织 1 块。

光镜检查：送检脾脏组织内见脾小体减少，可见弥漫分布的组织细胞，胞浆淡染，核呈圆形，大小较一致，部分核偏位，见图 1。肝脏组织见肝细胞部分浊肿变性，部分肝窦内见有少量组织细胞。

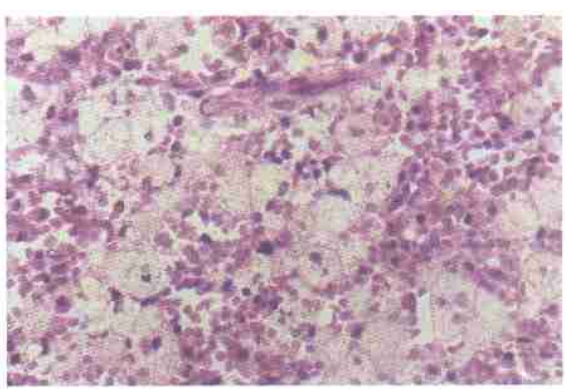


图 1　海蓝组织细胞综合征，脾脏切片内多见个海蓝组织细胞　(HE×400)

细胞组织化学染色：姬姆萨染色阳性，胞浆内见蓝色颗粒，PAS 染色弱阳性，苏丹Ⅲ染色阳性。

病理诊断：脾、肝海蓝组织细胞综合征。

（下转 1055 页）

作者简介：于冬梅(1950－)，女，山东省青岛市人，硕士，主任医师，教授，主要从事肿瘤病理方面的研究，发表论文 20 余篇。电话：(023)68754432

收稿日期：2002-03-21；修回日期：2002-06-11

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