

神经生长因子对脑缺血再灌注大鼠突触素表达的影响

丰岩清, 郭云良¹, 梁秀龄

(中山医科大学附属第一医院, 广州 510080; 1. 青岛大学医学院脑血管病研究所)

[主题词] 突触素; 神经生长因子; 脑缺血; 再灌注; 大鼠

[摘要] 为研究大鼠脑缺血再灌注后突触素 p38 表达的变化规律及其与神经生长因子的关系, 取大鼠 72 只, 随机分为假手术组、人工脑脊液组和神经生长因子治疗组。采用线栓法建立大脑中动脉缺血再灌注模型, 应用免疫组织化学方法观察 p38 的表达。结果发现, 脑缺血再灌注 3 天后 p38 表达增高, 第 7 天达高峰, 之后逐渐降低, 第 21 天降至对照组水平。应用外源性神经生长因子后, p38 表达较对照组无明显升高 ($P > 0.05$)。提示中枢神经系统损伤后, 神经元具有再生和修复的可塑性, 外源性神经生长因子对 p38 的调节有待于进一步研究。

[中图分类号] R743

[文献标识码] A

The Expression of Synaptophysin after Cerebral Ischemic Reperfusion and Its Relationship with Nerve Growth Factor in Rats

FENG Yan- Qing, GUO Yun- Liang, and LIANG Xiu- Ling

(First Affiliated Hospital, Sun Yat- sen University of Medicine Sciences, Guangzhou 510080, China)

MeSH Synaptophysin; Nerve Growth Factor; Cerebral ischemia; Reperfusion; Rat

ABSTRACT **Aim** To study the expression of synaptophysin (p38) after middle artery occlusion/reperfusion in rats and the influence of nerve growth factor (NGF) on p38. **Methods** 72 adult female rats were divided randomly into 4 groups: false-

operated group, natural recovering group, ACSF group, NGF group. The rats received left middle cerebral artery occlusion of 2 h. The sections of the brains which were subjected 6 h and 1, 3, 7, 14, 21 days of reperfusion, and were processed by immunohistochemistry with antibody against p38. **Results** p38 immunoreactivity was increased at 3rd day, reached its peak at 7th day, and returned almost to the controlled level at 21th day. The expression of p38 were not increased after NGF treatment.

Conclusions It is suggested that there might be neuroplasticity of regeneration and repaignment in central nervous system after stroke. The regulative effect of exogenous NGF on p38 need be further studied.

在受到缺血性刺激时, 神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 在皮层和海马结构中含量增高^[1]。应用 NGF 脑室内注射或海马内注射能够减轻缺血后的迟发性神经元坏死, 保护神经元免受缺血损伤^[2]。突触素 p38 几乎存在于所有的突触囊泡膜上, 在突触重建时, 突触素的表达明显增多, 因此突触素和神经可塑性密切相关。关于脑缺血再灌注后中枢神经系统 p38 的表达, 国内外已有报道。然而, 脑缺血后神经功能恢复与神经出芽之间的关系以及 NGF 对脑缺血后新突触形成的影响报道甚少。本文对此进行了研究。

1 材料和方法

[作者简介] 丰岩清, 男, 30 岁, 山东聊城人, 博士研究生, 研究方向为神经系统遗传病。郭云良, 男, 37 岁, 教授, 硕士生导师, 山东青岛大学医学院脑血管病研究所副所长。

1.1 动物分组

成年健康雌性 Wistar 大鼠 72 只, 体重 240~300 g, 由山东省医科院动物中心提供。随机均分为假手术组、自然恢复组、人工脑脊液 (ACSF) 组和 NGF 治疗组。分别在术后 6 h、1、3、7、14 和 21 d 处死动物取脑, 每个时间点 3 只。术前 2 d NGF 治疗组和 ACSF 组用 7.5 号不锈钢套针进行侧脑室穿刺埋管。穿刺点距前囟后 0.8 mm, 左 1.4 mm, 穿刺深度 3.5 mm, 穿刺后用牙托粉固定, 自然恢复 2 天。NGF 治疗组在术前 2 h 脑室注射 NGF (1 g/L × 0.2 μL/min × 5 min), NGF 的沉降系数为 7 s。ACSF 组同步脑室注射等量的人工脑脊液。假手术组和自然恢复组不做处理, 同步取材。

1.2 大脑中动脉缺血再灌注动物模型的制备

采用 Zea 等^[3] 颈外动脉线栓法制备动物模型, 手术成功的标志为: 手术动物苏醒后提尾右前肢内收屈曲, 爬行时向右侧划圈。假手术组除不插入尼

龙线外,余步骤同前各组。4%多聚甲醛心脏灌注固定,取材范围为前囟前1 mm至前囟后2 mm,标本经脱水、透明,浸蜡、包埋。连续冠状切片(片厚10 μm),在前囟后1 mm内每隔100 μm 连续切5张,其它部位每隔100 μm 取3张。相邻切片分为2套,分别用于免疫组化及Nissl染色,部分切片用于对照实验。

1.3 Nissl 染色

石蜡切片常规脱蜡,将切片放入0.02%的焦油紫染液中,置于37℃温箱中6 h。切片取出后入蒸馏水,用70%的酒精迅速洗去浮色。加入焦油紫分色液中,直到背底无色,细胞呈紫蓝色。

1.4 免疫组织化学方法

抗体为小鼠抗突触素的单克隆抗体(试剂号S5768),购自Sigma公司。石蜡切片常规脱蜡后,经含0.3%过氧化氢的纯甲醇处理30 min,加入含0.3% Triton X100的0.01 mol/L磷酸盐生理盐水缓冲液(pH7.4)浸泡,正常马血清(1:50)室温下孵育30~40 min,以阻断非特异性IgG的结合。然后,切片分别加入小鼠抗p38抗体(1:200,含1%牛血清白蛋白的0.01 mol/L PBS稀释,以下稀释液同),孵育过夜(4℃),再依次加入生物素结合的马抗小鼠IgG(1:200 Vector)和卵白素-生物素过氧化酶复合物(ABC 1:100, Vector),各孵育1 h和2 h(室温)。上述各步骤均在含0.3% Triton X100的0.01 mol/L PBS中充分漂洗(5 min×3次)。反应产物用DAB呈色5 min,自来水充分冲洗,Hanson苏木素复染(部分切片不复染),中性树胶封片。对照实验切片不加一抗,其它步骤相同。

1.5 图像分析和统计学处理

应用VIDAS-21显微图像分析系统测定纹状体背外侧缺血区周围的OD值,同时测定同一张切片上胼胝体或视束的OD值作为背景,p38免疫反应产物的OD值减去背景OD值即p38免疫反应产物的实际光密度值(COD值)。每例标本的被检区各测3张切片,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 大体观察和Nissl 染色

动物在大脑中动脉缺血再灌注24 h后,左侧大脑中动脉供血区脑组织肿胀、苍白,第7 d可见顶叶颗粒状局部脑组织萎缩和脑室扩大,第14 d出现坏死囊腔。Nissl染色可见缺血侧半球梗死灶位于纹状体的背外侧和/或附近的顶叶皮质,自缺血6 h开

始,梗死中心区神经元减少或消失,1 d后梗死面积扩大,周围区逐渐过渡为正常脑组织,对侧半球及假手术组动物双侧半球的相应区域未见梗死灶形成,组织细胞结构与正常脑细胞一致。

2.2 脑缺血再灌注后p38的表达

假手术组在皮层、纹状体和海马处可见p38表达,免疫反应产物颗粒很小,分布弥散,在脑的其他区域表达较弱。从表1(Table 1)可见,在不同的时间点p38表达无显著性差异($P > 0.05$)。自然恢复组在纹状体背外侧梗塞周围区和缺血侧顶叶皮质可见p38表达,第3 d可见升高,第7 d达到高峰,第14 d明显下降,第21 d下降至对照组水平,且在第3~7 d均明显高于假手术组p38水平($P < 0.05$)。

表1. 缺血再灌注对p38免疫反应产物光密度值的影响($\times 100, \bar{x} \pm s$)

时间	假手术组	自然恢复组
6 h	9.52 \pm 0.56	9.86 \pm 0.80
1 d	9.72 \pm 0.25	10.53 \pm 0.30
3 d	9.32 \pm 0.84	23.77 \pm 0.68 ^a
7 d	9.57 \pm 0.11	35.45 \pm 0.40 ^a
14 d	9.50 \pm 0.47	17.93 \pm 0.24 ^a
21 d	9.94 \pm 0.50	11.21 \pm 0.58

a: $P < 0.05$, 与假手术组比较。

2.3 神经生长因子对缺血再灌注后p38的影响

ACSF组在纹状体的背外侧梗死周围区和顶叶皮质区,p38的免疫活性与自然对照组基本一致。脑室注射外源性NGF后各个时间点COD值与自然恢复组比较无显著差异($P > 0.05$)(表2, Table 2)。

表2. 神经生长因子对缺血再灌注大鼠p38免疫反应产物光密度值的影响($\times 100, \bar{x} \pm s$)

时间	ACSF组	NGF组
6 h	9.50 \pm 0.32	10.33 \pm 0.49
1 d	9.68 \pm 0.07	10.61 \pm 0.76
3 d	18.93 \pm 0.16	19.85 \pm 1.42
7 d	3.027 \pm 1.30	3.286 \pm 2.39
14 d	16.95 \pm 1.76	18.60 \pm 0.53
21 d	9.32 \pm 1.12	10.66 \pm 0.59

3 讨论

3.1 脑缺血再灌注和突触素p38的关系

突触素p38是一种分子量为38 kDa的钙结合蛋白,特异性地分布于突触前囊泡膜上。免疫电镜研究证实,p38位于小圆形或扁形突触囊泡膜面,光镜下标记的p38颗粒样物实际上是成簇的囊泡,

而 95% 以上的新皮质突触前终末均含有这种小突触囊泡^[4]。突触素的免疫活性在成熟的脑组织中高度集中在突触前轴突末梢内, 围绕着神经元和其树突分布。因此该蛋白在研究领域被广泛用于标记轴突终末, 是突触重建的重要标志之一。

本实验研究显示, 脑缺血再灌注 6 h 和 1 天, p38 的免疫活性未见明显变化, 第 3 天其免疫活性明显升高, 第 7 天达到高峰, 第 14 天已明显下降, 第 21 天已降到对照组水平, 这与 Kojiro 等^[5]的实验结果一致。关于 p38 免疫活性增高的机理, 目前仍处于猜测阶段, 本文推测 p38 免疫活性的增高可能与突触的重建有关。轴突在失去靶器官后会出现轴突的出芽和形成许多侧枝, 因此其突触前囊泡的数量可能增加。另外也可能与突触前膜功能代偿性增加有关。突触素的表达经过短暂增加后在缺血区逐渐降低, 这种现象可能是因为轴突末梢在半影区未找到靶器官, 其生长自动停止, 突触前囊泡数量下降, 从而突触素的含量下降。

3.2 神经生长因子对缺血再灌注后突触素 p38 表达的影响

神经生长因子作为一种经典的神经营养因子在神经系统内对神经元的生存、分化和生长起着重要作用, 特别在轴突的生长和细胞的存活方面起着非常重要的作用^[6], 而且亦为成熟的中枢及周围神经系统的神经元维持生存及执行正常功能所必需, 并能促进损伤后神经元再生。在成熟脑内新皮层和海马结构 NGF 的含量均很高^[7], 神经系统损伤后, NGF 效应神经元表达 NGF 受体增加^[8], 这可能反应了在损伤修复期对 NGF 的需求增加。另一方面靶区 NGF 的水平也明显升高, 目前研究证实, NGF 能诱导胆碱能神经纤维的出芽及突触小结的肥大^[9, 10]。Lee 等^[11]发现, 在大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型中, 非缺血皮质内 NGF 的免疫活性从缺血第 4 h 开始升高, 在第 3 天开始明显升高, 至第 7 天达到高峰, 至 14 天 NGF 的免疫活性恢复到正常水平; 在半影区 NGF 的免疫活性开始出现短暂的下降, 第 3 天开始恢复, 在第 14 天恢复到正常水平。脑缺血所引起的表达的增高与非缺血区 NGF 的变化一致, 推测局灶性脑缺血后内源性 NGF 可能是 p38 增高的原因之一。正常神经细胞 NGF 的升高导致胞体合成 p38 增多, 并转运至受损的神经末梢参与轴突修复和重建。

国外有人报道, NGF 脑室内输注能够防止 NBM 神经元的变性、坏死^[12], 并能诱导胆碱能神经元的出芽反应^[13]。p38 作为突触前膜和突触囊泡的结构

成分, 为神经出芽反映代表性的结构蛋白, 检测这两种指标, 可以较好的反应神经系统对损伤反应的可塑性, 本实验结果表明, 脑室注射外源性 NGF 后, 各脑区 p38 免疫反应活性有所增强, 提示对中枢神经系统的可塑性无明显作用, 出现这种结果的原因, 可能与 NGF 的应用剂量和应用时间有一定的关系, 也可能与缺血后效应神经元受体表达的多少以及受体对外源性 NGF 的敏感性有关。

参考文献

- [1] Lorez H, Keller F, Ruess G, et al. Nerve growth factor increases in adult rat brain after injury [J]. *Neurosci Lett*, 1989, **98**: 339-344
- [2] Shigeno T, Mima T, Takakura K, et al. Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor [J]. *J Neurosci*, 1991, **11**: 2914-2919
- [3] Zea LE, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, **20**: 84
- [4] Walass SI, Jahn R, Greengard P. Quantitation of nerve terminal populations: synaptic vesicle-associated proteins as markers for synaptic density in the rat neostriatum [J]. *Synapse*, 1988, **2**: 516-520
- [5] Kojiro K, Satoshi G, Shinji N, et al. Changes of immunoreactivity for synaptophysin following a transient cerebral ischemia in the rat striatum [J]. *Brain Research*, 1993, **616**: 320-324
- [6] Barde YA. Trophic factors and neuronal survival [J]. *Neuron*, 1989, **2**: 1526-1534
- [7] Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later [J]. *Science*, 1987, **237**: 1154-1162
- [8] Lee TH, Kato H, Chen ST, et al. The adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 648-652
- [9] Gage FH, Bachelor P, Chen KS, et al. NGF receptor reexpression and NGF-mediated cholinergic neuronal hypertrophy in the damaged adult neostriatum [J]. *Neuron*, 1989, **2**: 1177-1184
- [10] Garofalo L, Ribeiro da SA, Cuello AC. Nerve growth factor-induced Synaptogenesis and Hypertrophy of cortical cholinergic terminals [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 2639-2643
- [11] Lee TH, Kato H, Chen ST, et al. Expression of nerve growth factor and trkA after transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 1998, **1**: 687-697
- [12] Shigeno T, Mima T, Takakura K, et al. Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor [J]. *J Neurosci*, 1991, **11**: 2114-2129
- [13] Gage FH, Bachelor P, Chen KS, et al. NGF receptor reexpression and NGF-mediated cholinergic neuronal hypertrophy in the damaged adult neostriatum [J]. *Neuron*, 1989, **2**: 1177-1184

(此文 2000-03-17 收到, 2000-12-21 修回)

(此文编辑 朱雯霞)