

有氧运动和黑果枸杞多糖对慢性脑缺血小鼠的干预及 Notch 通路相关因子的组织差异表达

陈伟, 陈嘉勤, 毛海峰, 周柏存, 屈红林, 李娣, 张钟元, 彭琪

(湖南师范大学体适能与运动康复湖南省重点实验室, 湖南省长沙市 410012)

[关键词] 有氧运动; 黑果枸杞多糖; 脑缺血; Notch 信号通路; 相关性

[摘要] **目的** 观察有氧运动(SW)与黑果枸杞多糖(LRM)对慢性脑缺血小鼠的干预作用以及 Notch 通路相关因子在脑和血液组织差异表达的比较分析。**方法** 50 只雄性 KM 小鼠, 构建慢性脑缺血损伤模型, 随机分为模型组(M 组)、干预组[包括 SW 组、LRM 组、LRM+SW 组、阳性对照组(BLDJ 组)], 干预组分别进行中等强度有氧运动和/或黑果枸杞多糖(200 mg/kg)灌胃。设假手术组(SO 组, 10 只)。各组进行神经行为学评估; Nissl 染色进行脑组织显微结构形态学观察; 免疫组化检测相关因子的蛋白表达水平; 实时荧光定量技术检测脑组织和血液中 Notch 通路相关因子的表达。**结果** 脑组织损伤得分 M>SW>LRM>BLDJ>LRM+SW>SO ($P<0.05$)。M 组脑组织神经元结构出现大面积损伤, LRM+SW 组干预效果最佳 ($P<0.01$)。SO 组小鼠脑 Notch1、Jagged1、NCX1、SYP 阳性表达最高, 干预组阳性表达均高于 M 组 ($P<0.01$, $P<0.05$); LRM+SW 组阳性表达较 LRM 组合 BLDJ 组高 ($P<0.01$)。干预组调节神经细胞修复相关因子在组织和血液中的表达明显高于 M 组 ($P<0.01$), 其中 LRM+SW 组表达水平最高。Notch1、Jagged1、NCX1 在组织和血液中的表达呈正相关, 且在组织中的表达含量高于血液中的表达 ($P<0.05$)。**结论** 有氧运动与黑果枸杞多糖对小鼠慢性脑缺血引发的脑损伤有明显缓解作用, 能不同程度促进神经元修复, 且两者联合效果更为显著, 其作用可能是通过调节 Notch 通路中相关神经修复因子的表达, 从而抑制脑损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The effect of aerobic exercise and Lycium ruthenicum murr polysaccharide on chronic cerebral ischemia in mice and differential expression of Notch pathway tissue

CHEN Wei, CHEN Jia-Qin, MAO Hai-Feng, ZHOU Bai-Cun, QU Hong-Lin, LI Di, ZHANG Zhong-Yuan, PENG Qi
(Hunan Provincial Key Laboratory of Physical Fitness and Sports Rehabilitation, Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410012, China)

[KEY WORDS] Aerobic exercise; Lycium ruthenicum murr; Cerebral ischemia; Notch signaling pathway; Correlation

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of aerobic exercise and Lycium ruthenicum murr(LRM) polysaccharides on chronic cerebral ischemia and the differential expression of Notch channel related factors in brain and blood tissue.

Methods 50 male KM mice were used to construct the model of chronic cerebral ischemia. They were randomly divided into model group (M group), and the intervention group including SW group, LRM group, LRM + SW group, positive control group (BLDJ group). The mice in the intervention group were treated with moderate intensity aerobic exercise and / or Lycium ruthenicum Murr polysaccharides (200 mg / kg). False surgery group (SO group). Neurobehavioral assessment was performed in each group; Nissl staining was used for brain tissue microstructure morphological observation; immunohistochemistry was used to detect the protein expression level of related factors. Real-time fluorescence quantitative technique was used to detect the expression of Notch pathway-related factors in brain tissue and blood. **Results** Brain tissue injury score was M group> SW group> LRM group> BLDJ group> LRM + SW group> SO group ($P<0.05$). Brain

[收稿日期] 2016-11-15

[修回日期] 2017-03-16

[基金项目] 湖南省卫生厅重点科研计划课题(B2015-166)

[作者简介] 陈伟, 硕士研究生, E-mail 为 chen125wei@qq.com。通讯作者陈嘉勤, 博士, 教授, 研究方向为体育学, E-mail 为 chenjqin2010@sina.com。

tissue neuronal structure of M group had a large area of injury, LRM + SW group had the best effect ($P < 0.01$). The expression of Notch1, Jagged1, NCX1 and SYP in the SO group was the highest, the positive expression in the intervention group was higher than that in the M group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The positive expression of LRM + SW group was higher than that of LRM group ($P < 0.01$). The intervention group regulating the expression of nerve cell repair related factors in tissues and blood was significantly higher than the M group ($P < 0.01$), and the LRM + SW group had the highest level of expression. Notch1, Jagged1, NCX1 are positively correlated with tissue and blood, and the expression in the tissue is higher than the expression in the blood ($P < 0.05$). **Conclusion** Aerobic exercise and Lycium ruthenicum Murr polysaccharides have a significant reduction in brain damage caused by chronic brain ischemia in mice, which can promote neuronal repair to varying degrees, and the combined effect between the two is more significant. Its role may be through the regulation of Notch channel related nerve repair factor expression, thereby inhibiting brain injury.

慢性脑缺血损伤是指各种原因引发的长期脑血流灌注不足,最终可导致持久或进展性的认知与神经功能障碍,是全球致死和致残的首位原因^[1]。脑缺血损伤的临床主要治疗思路是集中在脑神经细胞的保护和修复方面。

有氧运动康复训练作为一种简单、易行、经济的临床康复治疗手段,能增强抗氧化能力、抑制神经毒性物质;促进血管生成素与内皮生长因子激活以及血管再生^[2]等,其作用已越来越受到临床科研工作者的重视。黑果枸杞为中国特有的茄科枸杞属多年生灌木植物,在中国吐鲁番和七角井盆地底部较集中。藏医用于治疗心热病、心脏病、月经不调等病症^[3],其多糖成分对细胞免疫和体液免疫功能具有良好的促进作用,能减轻脑组织因缺血造成的神经、血管损伤^[4],但其作用机制仍未明了。

近年来,Notch 通路与慢性脑缺血损伤发生的机制联系成为研究热点,是一条影响细胞命运的、保守而重要的信号转导通路,多种细胞因子在脑缺血致脑神经损伤中起着重要作用,与脑代谢障碍以及脑组织损伤中神经元的修复、血管的再生有着密切相关^[5]。探讨 Notch 信号通路及其相关因子在减轻慢性脑缺血损伤中的可能分子机制,为慢性脑缺血的损伤干预治疗提供更合理、有效的途径。

本研究构建了小鼠慢性脑缺血损伤模型,通过有氧运动、黑果枸杞多糖(LRM)及二者联合干预,观察对小鼠脑缺血损伤的影响以及脑和血液相关细胞因子的差异表达,探讨两种不同组织 mRNA 表达的相关性,期望为脑缺血损伤疾病的临床康复应用提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物及分组

成年健康雄性 KM 小鼠,体重 18~22 g,由湖南

斯莱克景达实验动物中心提供(许可证 SCXK(Xiang)2011-0003),适应性喂养 1 周。将 50 只构建脑缺血模型成功的小鼠随机均分为模型组(M 组)、干预组[包括有氧运动组(SW 组)、LRM 组、LRM+SW 组、阳性对照组(BLDJ 组)],每组 10 只。设假手术组(SO 组)10 只小鼠为空白对照。各组小鼠分笼饲养,室温 23~25℃,相对湿度 40%~60%;自由进食、饮水,采用国家标准啮齿类动物饲料(湖南斯莱克景达实验动物中心提供)饲养。

1.2 动物模型构建

M 组、SW 组、LRM 组、LRM+SW 组、BLDJ 组小鼠均参照 Yoshizaki 等^[6]右颈动脉结扎法构建脑缺血模型。具体操作:购入小鼠适应性喂养 3 天,以 1%戊巴比妥钠(500 mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠。将小鼠仰卧于手术板上,系四肢及门齿,络合碘颈部皮肤消毒,在两前肢直线上方沿腹正中线切 1.5 cm 长的皮肤切口,分离皮下脂肪、筋膜、肌肉直至气管,用眼科镊于气管左侧下方分离出右颈总动脉,套线,完全结扎颈总动脉,消毒,缝合切口。小鼠放回饲养笼中,让其自然苏醒,同时用红外取暖器给大鼠取暖。

1.3 干预方案

建模成功后,SW 组采用游泳训练,游泳桶直径 70 cm,水深 30 cm,水温 28℃,SW 组、LRM+SW 组第 1~3 天适应性游泳 30 min,第 4~6 天每天递增 10 min,逐渐延长至 60 min,持续 1 周。保持该运动强度直至第 6 周,每周休息 1 天。若小鼠漂浮于水面不动,则用小木棒驱赶,使其运动,游泳结束后用毛巾擦干小鼠毛发。LRM 组、LRM+SW 组按人与小鼠体表面积折算等效剂量 LRM 经口灌胃,每天(下午 4 时)灌胃 1 次,剂量 0.4 mL/次(浓度为 200 mg/kg),共 6 周。BLDJ 组采用阳性药胞磷胆碱钠,配置浓度为 200 mg/kg,每天(下午 4 点)灌胃 1 次。M 组不进行干预。

1.4 黑果枸杞多糖提取纯化

黑果枸杞多糖提取:称取一定量粉碎的黑果枸杞,溶剂采用蒸馏水,固液质量比为 1:10;提取温度 90℃;采用微波辅助提取的方法,通过水提,真空浓缩提取液,再经过醇沉、Sevag 法脱蛋白、离心分离、二次醇沉纯化分离干燥后得到枸杞多糖。然后采用 DEAE-纤维素柱层析法分离多糖蛋白复合物,DEAE-32 纤维素粉经溶胀、漂洗、氢氧化钠浸泡、水洗后,装柱,加样、洗脱,获得多糖蛋白复合物 LBPF1-5 各组分^[7]。

1.5 动物一般神经行为学观察

根据 Clark 等^[8]神经功能评分方法,根据症状表现程度分为 5 个等级,分别计分为 0、1、2、3、4 分。建模成功后,进行 1 次神经行为学评估,6 周后干预结束再进行 1 次神经行为学评估,对小鼠步态、攀爬能力、转圈、胡须反应、眼睛、耳朵、毛发等情况进行综合评分,观察并记录。

1.6 样品采集与处理

6 周后,各组小鼠禁食过夜,用 1%戊巴比妥钠(500 mg/kg)麻醉,采用灭菌镊子摘眼球进行取血,收集血液于 5 mL 抗凝管中,4℃、6000 r/min 离心 10 min,小心吸取上层血清 500 μL,用离心管分装并用吉玛磁珠法提取 RNA,冷冻保存于-70℃。随后小鼠脱颈椎,用手术剪小心撬开颅骨,再从大脑下方托出整个脑组织(去除与大脑相连的嗅球、小脑和脑干),肉眼及光镜下观察小鼠软脑膜处小血管吻合支的密度及直径;前脑左右各取部分(约黄豆大小)置于 1 mL Trizol 溶液中待取 RNA;脑中后部分置于 4%多聚甲醛溶液(0.1 mol/L,pH=7.4)中进行固定 24 h 以上,石蜡包埋。

1.7 病理学观察

取厚约 5 μm 的全脑冠状切面,二甲苯脱蜡 2 次(每次 10 min),梯度酒精复水,蒸馏水冲洗后,将切片置于 1% 甲苯胺蓝(1 g:100 mL 蒸馏水)中 40℃ 染色 15 min,蒸馏水再次冲洗,70% 乙醇洗片(15 s),80% 乙醇洗片(30 s),95% 乙醇洗片(4 min 左右,视观察情况而定),镜下观察,100% 乙醇脱水 3 次(1 min、5 min、10 min),二甲苯透明 3 次(3 min、5 min、10 min),中性树胶封片,光学显微镜(×200)下观察脑组织神经细胞结构及受损情况。

1.8 Realtime-PCR 检测 Notch 通路相关细胞因子表达

1.8.1 脑组织和血液总 RNA 提取 脑组织

mRNA 提取采用 Trizol 法。血液 mRNA 提取采用磁珠法。磁珠法试剂盒由吉玛公司提供(GenePharma™ 磁珠法总 RNA 提取试剂盒),根据说明书操作提取。

1.8.2 反转录 去除基因组 DNA 反应:冰上配制反应混合液 Master Mixm。添加试剂 5×gDNA Eraser Buffer 2.0 μL,gDNA Eraser 1.0 μL,分装,每管加入 RNase Free dH₂O 和 Total RNA 至 10 μL(最后加 RNA 样品),室温反应 30 min。

反转录反应:置于冰上操作,添加下列总试剂(按反应数+2 的量配制)RNase Free dH₂O 4.0 μL、5×Prime Script Buffer 2(for Real time)4.0 μL、RT Primer Mix 1.0 μL、PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μL,分装 10 μL 到每个反应管中,轻柔混匀,37℃ 孵育 15 min,逆转录合成的 cDNA 可直接用于 PCR 的应用程序或存储在-20℃ 少于 1 周。

1.8.3 Real-time PCR 仪器:ABI 7900HT,试剂:SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara) 试剂盒。根据 Gene Bank 核酸数据库中血管各因子 cDNA 序列,Notch1、Jagged1、NCX1、SYP、CaBP-D28k、GAPDH 基因引物均由上海生工生物工程技术有限公司设计合成,引物均购于上海生工公司。

引物合成序列如下:Notch1 上游引物为 5'-GAT GGC CTC AAT GGG TAC A-3',下游引物为 5'-TCG TTG TTG ATG TCA CA-3';Jagged1 上游引物为 5'-AAT CGC ATC GTA CTG CCT T-3',下游引物为 5'-GTG TCA TTA CTG GAA TCC CA-3';NCX1 上游引物为 5'-ATG CTT CGA TTA AGT CTC CCA-3',下游引物为 5'-AAT GGG CAA GAT CAC CCC T-3';SYP 上游引物为 5'-AGA CAT GGA CGT GGT GAA TCA-3',下游引物为 5'-ACT CTC CGT CTT GTT GGC AC-3';CaBP-D28k 上游引物为 5'-GGC TTC ATT TCG ACG CTG A-3',下游引物为 5'-ACG TGA GCC AAC TCT ACA A-3'。

1.8.4 PCR 数据统计 将各样本值代入公式:表达量=2^{-ΔΔCt},其中 ΔΔCt=[目的基因 Ct 值(样本组)-管家基因 Ct 值(样本组)]-[目的基因 Ct 值(校正组)-管家基因 Ct 值(校正组)]。

1.9 统计学分析

应用 SPSS19.0 软件包进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用双侧 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异具有非常显著性。

2 结果

2.1 神经行为学评估

由表 1 可见,建模后各组得分无明显差异,说明干预前各组小鼠脑神经功能损伤处于同一水平。6 周后,干预组神经行为学得分较建模后得分明显偏低($P<0.01$)。相比 M 组,各干预组得分明显降低($P<0.01$),LRM+SW 组干预效果最佳($P<0.05$)。

2.2 全脑外观观察

相比 M 组,各干预组脑损伤程度减小,M 组左右脑组织严重不对称,右侧出现大面积萎缩灶,且脑膜血管稀疏,有坏死现象;SW 组脑组织有明显萎缩症状,但程度相对减轻;LRM 与 BLDJ 组脑血管清晰可见,缺血灶相对显著减少,但右脑外侧存在小面积萎缩;LRM+SW 组右脑以及冠状面形态对称性仅次于 SO 组,血管密集清晰可见,萎缩面积也逐渐变小,颜色鲜亮;SO 组基本无任何萎缩症状(图 1)。

表 1. 各组小鼠神经行为学评估得分比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1. Comparison of neurobehavioral scores in each group($\bar{x}\pm s, n=10$)

分组		局灶性神经 功能评分	一般神经 功能评分
M 组	建模后	10.21±1.94	5.82±0.92
	6 周后	11.53±2.41 ^b	7.03±1.24 ^b
SW 组	建模后	11.83±1.25	5.64±0.58
	6 周后	3.44±0.15 ^{ac}	3.10±0.26 ^{ac}
LRM 组	建模后	10.25±1.53	4.98±0.39
	6 周后	4.01±0.24 ^{ac}	2.44±0.31 ^{ac}
BLDJ 组	建模后	11.08±1.37	5.17±0.28
	6 周后	3.27±0.51 ^{ac}	2.38±0.27 ^{ac}
LRM+SW 组	建模后	10.79±1.25	5.59±0.62
	6 周后	2.42±0.31 ^{ac}	1.82±0.20 ^{ac}

a 为 $P<0.01$,与 M 组 6 周后比较;b 为 $P<0.05$,c 为 $P<0.01$,与同组建模后比较。

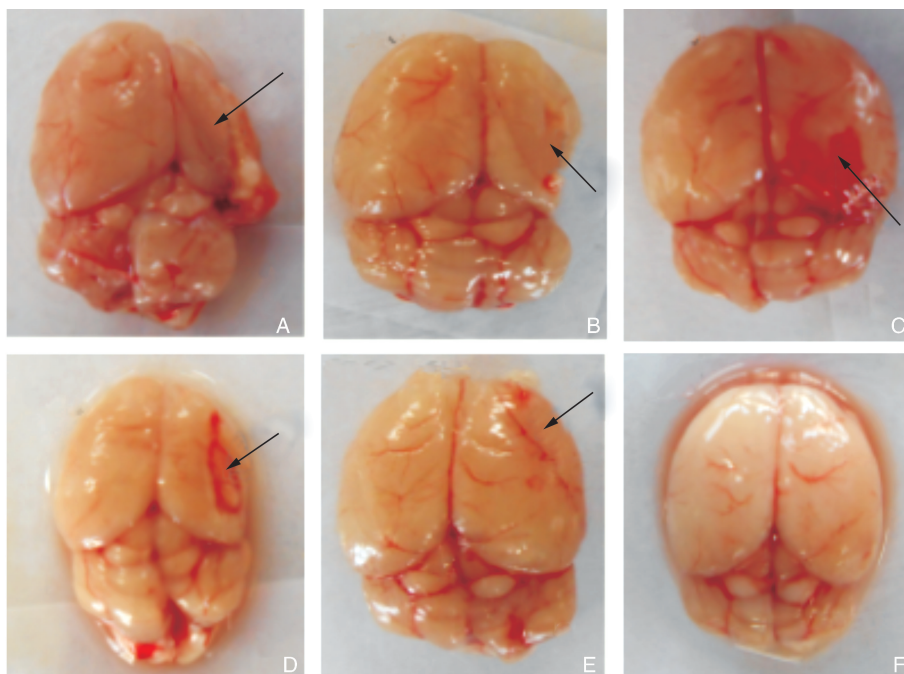


图 1. 小鼠全脑外观图 A~F 分别为 M 组、SW 组、LRM 组、BLDJ 组、LRM+SW 组和 SO 组。箭头所示为缺血区域或者脑组织萎缩。

Figure 1. Mouse whole brain appearance

2.3 脑组织形态学观察

M 组小鼠脑组织神经元结构出现大面积的损伤,Nissl 小体的数量少且分布不均匀甚至消失;SW 组、LRM 组和 BLDJ 组病理变化较 M 组减轻,损伤面积变小,但排列不齐,Nissl 小体的数量稀疏且神经元结构出现不同程度的损伤;LRM+SW 组无明显损伤,Nissl 小体数量多、排列有序,结构基本正常

(图 2)。

2.4 脑组织 Notch1、Jagged1、NCX1、SYP 免疫组化检测结果

各干预组 Notch1、Jagged1、NCX1、SYP 蛋白表达水平均高于 M,且 LRM+SW 组表达最高($P<0.01$),阳性表达面积依次是 SW<LRM<BLDJ<LRM+SW<SO(图 3,表 2)。

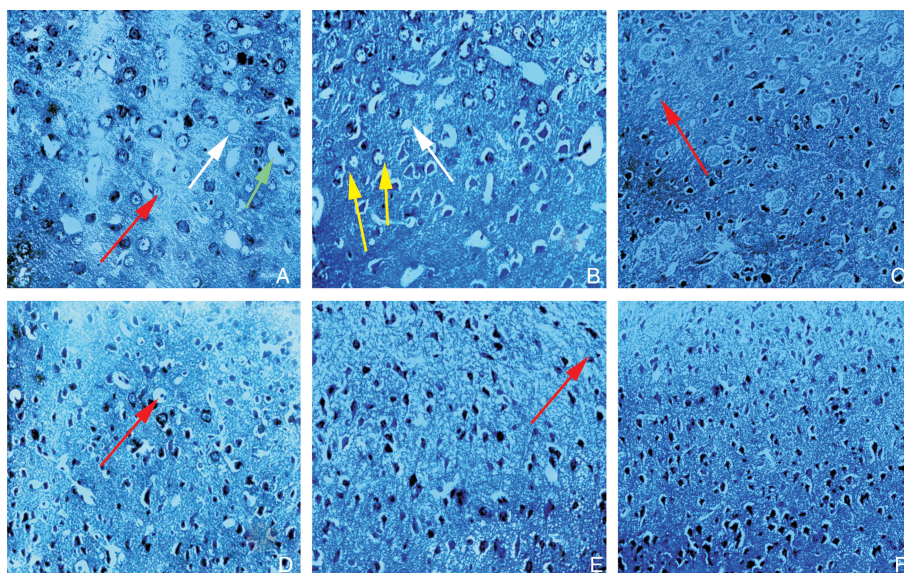


图 2. 各组小鼠脑组织病理切片 Nissl 染色图(×200) A~F 分别为 M 组、SW 组、LRM 组、BLDJ 组、LRM+SW 组和 SO 组。红色箭头为核固缩;白色箭头为空泡;绿色箭头为核裂症;黄色箭头为核坏死。

Figure 2. Nissl staining chart of histopathological sections of each group of mice brain tissue(×200)

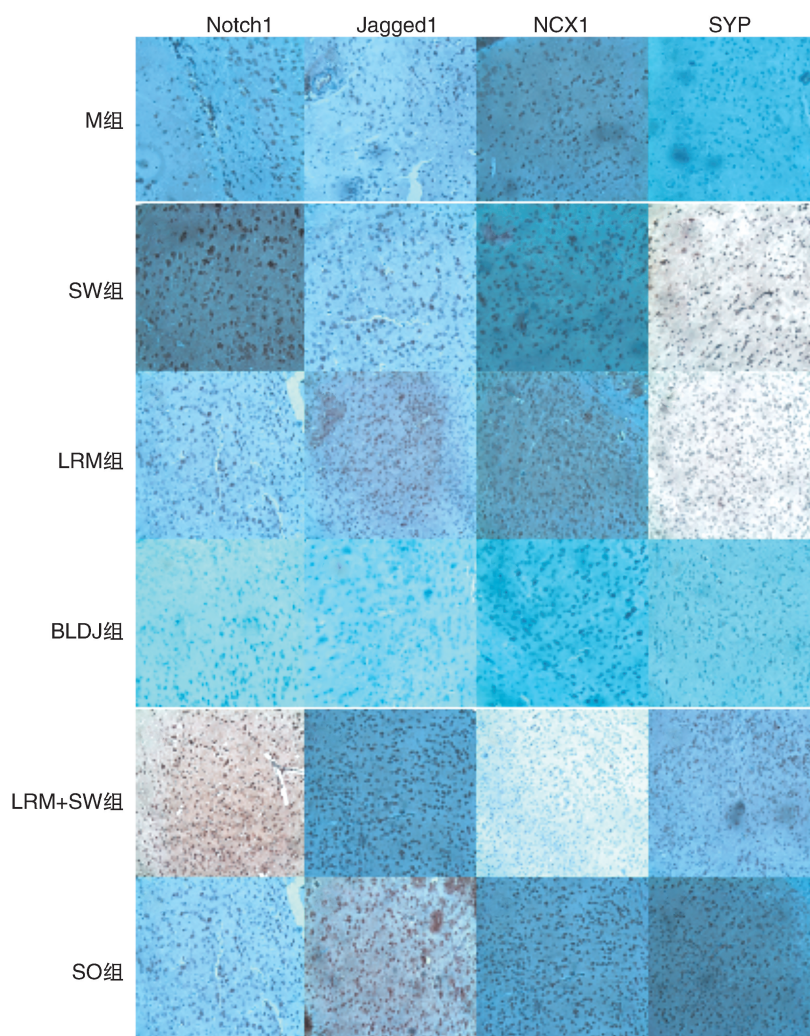


图 3. 各组小鼠脑组织中相关因子免疫组织化学染色结果(×200)

Figure 3. Immunohistochemical staining of related factors in brain tissue of each group(×200)

表 2. 各组小鼠脑组织 Notch1、Jagged1、NCX1、SYP 免疫组化阳性表达的比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)Table 2. Immunohistochemical positive expression of Notch1, Jagged1, NCX1, SYP in the brain tissue of each group($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

分 组	Notch1 (%)	Jagged1 (%)	NCX1 (%)	SYP (%)
M 组	12.40±1.21	10.44±0.33	13.73±1.09	12.58±1.17
SW 组	22.11±1.08 ^a	21.26±1.27 ^a	19.17±1.73 ^a	20.46±1.51 ^a
LRM 组	26.37±1.76 ^{ab}	27.42±1.84 ^{ab}	20.18±1.29 ^a	25.82±1.47 ^{ab}
BLDJ 组	24.74±0.98 ^a	20.08±2.42 ^a	23.92±1.81 ^a	24.35±1.53 ^a
LRM+SW 组	35.37±1.51 ^{abc}	37.23±1.40 ^{abc}	40.23±1.280 ^{abc}	41.82±1.570 ^{abc}
SO 组	43.24±1.71 ^{abcd}	38.47±1.81 ^{abc}	45.18±2.31 ^{abcd}	46.14±1.83 ^{abcd}

a 为 $P<0.05$, 与 M 组比; b 为 $P<0.05$, 与 BLDJ、SW 组比; c 为 $P<0.05$, 与 LRM 组比; d 为 $P<0.05$, 与 LRM+SW 组比。

2.5 Notch 通路相关细胞因子血液及脑组织 mRNA 表达

脑组织中, M 组 Notch1、Jagged1、NCX1、SYP、CaBP-D28k mRNA 表达量最低, 但高于在血液组织中的表达; SO 组表达最高, 各干预组与 M 组差异具有非常显著性 ($P<0.01$); LRM+SW 组各因子表达量均高于 BLDJ 组、LRM 组 ($P<0.05$), 相比 BLDJ 组, LRM 组中 Jagged1、NCX1、SYP 表达差异具有显著性

($P<0.05$; 表 3)。

血液中, 相比 M 组, 各干预组小鼠在血液中 Notch1、Jagged1、NCX1、SYP、CaBP-D28k mRNA 表达量均高于模型组 ($P<0.05$); LRM+SW 组表达最高 ($P<0.01$); 相比 BLDJ、LRM 组, LRM+SW 组各因子表达量差异具有显著性 ($P<0.05$); LRM 组 Jagged1、SYP mRNA 表达量均高于 BLDJ 组 ($P<0.05$; 表 3)。

表 3. 各组小鼠脑组织及血液中 Notch1、Jagged1、NCX1、SYP、CaBP-D28k mRNA 的表达量($\bar{x}\pm s$, $n=10$)Table 3. Expression of Notch1, Jagged1, NCX1, SYP, CaBP-D28k mRNA in brain tissue and blood of each group($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

分 组		Notch1	Jagged1	NCX1	SYP	CaBP-D28k
M 组	脑组织	1.17±0.04	1.07±0.05	1.10±0.02	1.09±0.03	1.02±0.15
	血液	1.21±0.03	1.26±0.10	1.15±0.07	1.08±0.06	2.09±0.18
SW 组	脑组织	2.53±0.41 ^a	1.76±0.10 ^a	2.29±0.20 ^a	1.75±0.05 ^a	2.75±0.15 ^a
	血液	1.63±0.18 ^a	1.38±0.05 ^a	1.83±0.20 ^a	1.48±0.03 ^a	4.46±0.16 ^a
LRM 组	脑组织	2.01±0.18 ^a	3.07±0.09 ^{ab}	2.64±0.10 ^{ab}	2.25±0.04 ^{ab}	1.91±0.03 ^a
	血液	2.02±0.08 ^{ab}	2.09±0.13 ^{ab}	1.21±0.10 ^a	2.59±0.18 ^{ab}	6.82±0.14 ^{ab}
BLDJ 组	脑组织	2.87±0.28 ^a	3.01±0.14 ^a	2.94±0.20 ^{ab}	2.17±0.07 ^a	2.46±0.17 ^a
	血液	1.71±0.11 ^a	1.68±0.24 ^{ab}	2.04±0.09 ^{ab}	2.48±0.17 ^{ab}	6.48±0.27 ^{ab}
LRM+SW 组	脑组织	4.34±0.31 ^{abc}	3.78±0.160 ^{abc}	4.53±0.39 ^{abc}	3.88±0.11 ^{abc}	3.98±0.39 ^{abc}
	血液	3.68±0.21 ^{abc}	2.24±0.41 ^{abc}	2.32±0.28 ^{abc}	3.31±0.05 ^{abc}	7.20±0.26 ^{abc}
SO 组	脑组织	6.26±0.27 ^{abcd}	5.07±0.19 ^{abcd}	4.89±0.20 ^{abcd}	5.24±0.13 ^{abcd}	5.63±0.21 ^{abcd}
	血液	4.86±0.19 ^{abcd}	4.71±0.29 ^{abcd}	3.84±0.14 ^{abcd}	5.23±0.31 ^{abcd}	10.24±0.28 ^{abcd}

a 为 $P<0.05$, 与 M 组比; b 为 $P<0.05$, 与 SW 组比; c 为 $P<0.05$, 与 BLDJ、LRM 组比; d 为 $P<0.05$, 与 LRM+SW 组比。

2.6 Notch 通路相关细胞因子血液及脑组织 mRNA 表达相关性

由表 4 可知, 小鼠脑组织中 Notch1、Jagged1、NCX1 mRNA 的表达量均高于血液中的表达量 ($P<0.01$)。通过分析小鼠脑组织与血液中 Notch1、Jagged1、NCX1、SYP、CaBP-D28k 因子表达量的相关程度, 结果表明 Notch1、Jagged1 二者具有高度的相关关系 ($r>0.75$), 且其相关性系数的假设检验都具有统计学意义 ($P<0.05$), NCX1 因子在脑组织和血液组织中

小时出中度相关关系 ($r>0.5$, $P<0.05$); SYP、CaBP-D28k 在血液与脑组织中表达无相关性 ($r<0.5$)。

3 讨 论

3.1 KM 小鼠慢性脑缺血损伤模型

慢性脑缺血是指各种原因引发的长期脑血流灌注不足, 为临床上常见的脑损伤之一, 是阿尔茨海默病、血管性痴呆和Binswanger病等多种疾病发

表 4. 小鼠脑组织与血液 Notch1、Jagged1、NCX1、SYN、CaBP-D28k mRNA 表达的相关性

Table 4. Correlation between brain tissue and expression of Notch1, Jagged1, NCX1, SYN, CaBP-D28k mRNA in mouse brain

指标	血液	脑组织	相关系数
Notch1	2.10±1.02	3.65±0.88 ^a	0.86
Jagged1	1.78±0.10	2.52±0.15 ^a	0.82
NCX1	1.83±1.01	2.24±0.96 ^a	0.61
SYN	2.38±0.15	2.68±0.21	0.34
CaBP-D28k	4.48±1.02	4.78±1.58	0.15

a 为 $P < 0.05$, 与血液比较。

展过程中的一个共同病理过程^[9]。近年关于脑缺血的发病机理、病理变化及其防治的实验研究也越来越多,理想的慢性脑缺血导致脑损伤动物模型是实验研究是否取得进展的关键因素之一。何金婷^[10]通过培养 PC12 细胞氧糖建立氧糖剥夺神经细胞来建立脑损伤模型,其耗时长且工程量大;也有研究利用敲除基因制作脑缺血模型^[11],但与人类慢性脑缺血所致脑损伤的病理过程相差较远。本文参考 Yoshizaki 等^[6]单侧颈总动脉闭塞模型(rUC-CAO)方法并加以改良,此模型死亡率低,利用了小鼠后交通动脉发育不良,通过永久结扎右颈动脉使小鼠同侧脑半球慢性缺血^[12]。模型构建后,小鼠右眼出现半闭,其颜色由深红转变为苍白色。经 Clark 神经功能评分、Nissl 染色和 TTC 染色检测缺血情况良好,说明建模成功。经数百例动物实验证明,本模型是一种简便易行、形成率高且死亡率低,能较好模拟人类慢性脑缺血致脑损伤发病特征的理想小鼠模型。

3.2 Nissl 染色形态学变化

Nissl 体主要存在于神经元的树突以及身体,正常生理情况下,脑组织内尼氏小体大而数量多,说明神经细胞合成蛋白质功能较强;若受到一些因素(如缺氧、缺血、炎症)导致脑组织或神经细胞不同程度损伤时,尼氏小体变化显著,可作为神经元损伤标志^[13]。本实验中 LRM 对慢性脑缺血小鼠的神经元损伤有明显的改善作用,能有效保护神经元。SW 也有相同作用,但保护程度弱于 LRM,两种联合干预效果更佳。

3.3 Clark 神经行为学评估

脑缺血模型的神经行为学评估目前有许多种评判标准,其内容主要包括四肢运动、身体形态、外观、神经反射等多个方面进行评判。Bederson 等^[14]

评分操作简单易行应用广泛,但是没有呈现外观(如眼睛、毛发等)的变化,有较大的局限性。参考 Clark 评分并加以改良,从局灶和一般功能两个方面的功能障碍上进行评价,更能详细反映小鼠神经损伤情况,故采用此方法作为本实验的神经行为学指标。结果表明,相比 M 组,干预组得分明显降低。LRM 和 SW 能有效缓解神经功能的恶化,或能提高此模型小鼠神经功能的恢复,且联合干预方式效果更优于单独干预。

3.4 Notch 信号转导通路相关细胞因子差异表达与慢性脑缺血损伤

3.4.1 Notch 信号转导通路 脑缺血是脑功能衰退和代谢障碍导致的一个病理过程,传统观念认为,成年哺乳动物中枢神经系统不可再生,神经元的损伤和神经功能的丧失难以修复,神经功能的重建几乎不可能^[15],只要能促进脑组织神经元的修复和血管再生,就可以减轻或治愈慢性脑缺血导致的脑损伤。文献^[16]报道,Notch 信号通路主要由受体、配体、CSL-DNA 结合蛋白组成,是一条较慢的依靠转录反应激活的信号通路。当配体和相邻细胞的 Notch 受体结合后,Notch 受体被蛋白酶体切割,由胞内段(NICD)释放入胞质,并进入细胞核与转录因子 CSL 结合,形成 NICD/CSL 转录激活复合体,从而激活 HES、HEY、HERP 等转录抑制因子家族的靶基因,调节基因表达,发挥生物学作用。研究表明,Notch 信号的产生是通过相邻细胞的 Notch 配体与受体相互作用,从而扩大并固化细胞间的分子差异,最终决定细胞命运,影响神经元、血管形成和形态发生^[17]。本实验结果显示,与 M 组相比,各干预组血液与脑组织中 Notch1、Jagged1 mRNA 的表达上调($P < 0.05$),其蛋白水平表达也增加,说明 LRM、SW 能够激活 Notch 信号通路,改善慢性脑缺血小鼠脑损伤的程度,促进神经功能的恢复,且 LRM+SW 效果最佳,此结果与神经行为学评估和 nissl 染色结果一致,其作用机制可能是通过调节 Notch 信号传导通路相关因子的表达实现的。

3.4.2 Notch 信号转导通路相关细胞因子在脑和血液中组织的相关性表达 存在于人和动植物体液中细胞外的循环 RNA,其来源包括内源性循环 RNA 和外源性循环 RNA。内源性循环 RNA 可能通过细胞凋亡后释放或细胞主动分泌而来^[18]。据报道,循环 RNA-蛋白质复合物可以用作敏感和有效的肿瘤标志物,但是没有关于在脑缺血损伤循环 RNA 的报道。研究发现血清 Notch1、Jagged1 在极大程度上调控着神经干细胞的分化,神经元细胞和

血管增加后血清中 Notch1、Jagged1 基因的表达水平才会升高^[19]。本实验研究表明,慢性脑缺血损伤小鼠脑组织中 Notch1、Jagged1 的因子表达量比血液中的表达量高($P<0.05$),且其表达量存在高度的相关关系($r>0.90$);NCX1 在血液与脑组织中表达具有中度相关($r>0.50$),SYP、CaBP-D28k 在两组织中无相关性,也不具显著差异,以上实验结果显示:Notch1、Jagged1、NCX1 为一种较好的分子标记,可通过外周血测量来跟踪脑损伤的病理变化情况。

综上所述,黑果枸杞多糖和有氧运动能够激活 Notch 信号通路中相关神经修复因子的表达,均能使慢性脑缺血致脑损伤小鼠的症状减轻,达到对脑组织损伤的保护,且联合干预效果最佳。但此结果的出现,到底是促进了神经细胞的再生还是延缓了神经细胞的损伤,因果关系不是很清楚,其确切影响机制有待更深入的探讨。

[参考文献]

- [1] Li DJ, Li YH, Yuan HB, et al. The novel exercise-induced hormone irisin protects against neuronal injury via activation of the akt and ERK1/2 signaling pathways and contributes to the neuroprotection of physical exercise in cerebral ischemia[J]. *Metabolism*, 2017, 68(3): 31-42.
- [2] 刘雨佳,李娜,石丽君,等. 有氧运动抑制衰老大鼠脑动脉平滑肌 STOC/BKCa 功能下调[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(7): 650-651.
- [3] 郭音. 有氧运动与黑果枸杞多糖改善小鼠阻塞性黄疸致肝损伤的研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2016: 1-2.
- [4] 马玉婷. 黑果枸杞酒渣花色苷和多糖制备及其功能研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学, 2012: 4-5.
- [5] Zhang HP, Sun YY, Chen XM, et al. The neuroprotective effects of isoflurane preconditioning in a murine transient global cerebral ischemia-reperfusion model: the role of the notch signaling pathway[J]. *Neuromolecular Med*, 2014, 16(7): 191-204.
- [6] Yoshizaki K, Adachi K, Kataoka S, et al. Chronic cerebral hypoperfusion induced by right unilateral common carotid artery occlusion causes delayed white matter lesions and cognitive impairment in adult mice[J]. *Exp Neurol*, 2008, 210(2): 585-591.
- [7] 李娜. 枸杞中色素、枸杞黄酮及枸杞多糖提取工艺的研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2010: 47-53.

- [8] Clark WM, Lessov NS, Dixon MP, et al. Monofilament intraluminal middle cerebral artery occlusion in the mouse[J]. *Neurol Res*, 1997, 19(6): 641-648.
- [9] Zhao Y, Gong CX. From chronic cerebral hypoperfusion to alzheimer-like brain pathology and neurodegeneration[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(12): 101-110.
- [10] 何金婷. Notch 通路在脑缺血损伤中的作用及信号转导机制研究[D]. 吉林长春: 吉林大学, 2012: 18-19.
- [11] 冯乐霄,陈涛,刘文博,等. Homer1a 基因敲除对小鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的作用[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 9(15): 1 614-615.
- [12] 赵秀芹,毛文静,李世英,等. 丁苯酞对局灶性脑缺血再灌注大鼠海马 CA1 区神经细胞凋亡 SIRT1 及 PGC-1 α 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 26(8): 775-776.
- [13] Xu WS, Sun X, Song CG. Bumetanide promotes neural precursor cell regeneration and dendritic development in the hippocampal dentate gyrus in the chronic stage of cerebral ischemia[J]. *NRR*, 2016, 11(5): 745-751.
- [14] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986, 17(5): 472-476.
- [15] Kim S, Chin YW, Cho J. Protection of cultured cortical neurons by luteolin against oxidative damage through inhibition of apoptosis and induction of heme oxygenase-1[J]. *BP B*, 2017, 40(3): 256-265.
- [16] 王金祥,周芳,朱光旭,等. Notch 信号通路介导血小板源生长因梓 AA 诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(9): 887-888.
- [17] Xin G, Tao S, Li JH, et al. Electroacupuncture in the repair of spinal cord injury: inhibiting the notch signaling pathway and promoting neural stem cell proliferation[J]. *NRR*, 2015, 3(10): 395-396.
- [18] Liu J, Xue J, Zhang HC. Oning expression and purification of cold inducible RNA-binding protein and its neuroprotective mechanism of action[J]. *BR*, 2015, 15(4): 189-195.
- [19] Cheah M, Andrews MR. Targeting cell surface receptors for axon regeneration in the central nervous system. john van geest centre for brain repair[J]. *NRR*, 2016, 11(12): 1 884-887.

(此文编辑 朱雯霞)