

本文引用: 夏翠萍, 蒋春花, 吴勤花, 等. 奥拉西坦通过 SDF-1 α /CXCR4 通路促进脑梗死大鼠神经新生与迁移[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(4): 293-302. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.04.003.

[文章编号] 1007-3949(2024)32-04-0293-10

· 实验研究 ·

奥拉西坦通过 SDF-1 α /CXCR4 通路促进脑梗死大鼠神经新生与迁移

夏翠萍¹, 蒋春花², 吴勤花¹, 周君¹, 乔叶红¹, 张斌¹

1. 上海市奉贤区中心医院神经内科, 2. 上海市奉贤区庄行镇社区卫生服务中心神经内科, 上海市 201400

[摘要] **[目的]** 探究奥拉西坦通过基质细胞衍生因子 1 α (SDF-1 α)/C-X-C 趋化因子受体 4(CXCR4) 通路促进脑梗死大鼠神经新生与迁移的机制。**[方法]** 100 只 SD 大鼠随机分为对照组、脑缺血(CI)组、奥拉西坦(200 mg/kg)组和奥拉西坦(200 mg/kg)+AMD3100(5 mg/kg)组, 每组 25 只。采用电凝法制作局部永久性脑缺血大鼠模型。造模后 1、7、14 天进行神经功能缺损评分, TTC 染色检测脑梗死体积, 尼氏染色检测梗死区细胞存活, Western blot 检测缺血区 SDF-1 α 、CXCR4 蛋白水平。造模后 1~7 天, 连续腹腔注射 BrdU(50 mg/kg), 14 天后, 免疫荧光双标染色检测 SVZ 区 BrdU⁺Nestin⁺、BrdU⁺DCX⁺ 细胞数量。造模前 5 天, 大鼠 SVZ 区注射携带 GFP 的反转录病毒, 14 天后, 免疫荧光双标染色检测梗死区 GFP⁺DCX⁺、GFP⁺MAP-2⁺、GFP⁺GFAP⁺ 细胞数量。将 C17.2 细胞分为对照组、氧糖剥夺(OGD)组、奥拉西坦组(终浓度为 200 mg/L)和奥拉西坦(终浓度为 200 mg/L)+AMD3100(终浓度为 100 μ mol/L)组。采用 OGD 制作细胞缺血模型, 12 h 后, 免疫荧光双标染色检测 BrdU⁺/Nestin⁺、BrdU⁺/MAP-2⁺ 细胞数量, Transwell 实验检测细胞迁移, Western blot 检测细胞培养上清液中 SDF-1 α 、CXCR4 蛋白水平。**[结果]** 动物实验结果显示, 与对照组相比, CI 组大鼠 mNSS 评分升高, 脑梗死体积增大, 梗死区细胞存活数量减少, SDF-1 α 、CXCR4 蛋白水平升高, SVZ 区 GFP⁺DCX⁺、GFP⁺MAP-2⁺、GFP⁺GFAP⁺ 细胞数量增多($P < 0.05$); 与 CI 组相比, 奥拉西坦组大鼠 mNSS 评分降低, 脑梗死体积减小, 梗死区细胞存活数量增多, SDF-1 α 、CXCR4 蛋白水平升高, SVZ 区 GFP⁺DCX⁺、GFP⁺MAP-2⁺、GFP⁺GFAP⁺ 细胞数量增多, 梗死区 GFP⁺DCX⁺、GFP⁺MAP-2⁺、GFP⁺GFAP⁺ 细胞数量增多($P < 0.05$); 与奥拉西坦组相比, 奥拉西坦+AMD3100 组大鼠 mNSS 评分升高, 脑梗死体积增大, 梗死区细胞存活数量减少, CXCR4 蛋白水平降低, SVZ 区 GFP⁺DCX⁺、GFP⁺MAP-2⁺、GFP⁺GFAP⁺ 细胞数量减少($P < 0.05$)。细胞实验结果显示, 与对照组相比, OGD 组细胞 BrdU⁺/Nestin⁺、BrdU⁺/MAP-2⁺ 数量、细胞迁移数增多, 细胞培养上清液中 SDF-1 α 、CXCR4 蛋白水平升高($P < 0.05$); 与 OGD 组相比, 奥拉西坦组细胞 BrdU⁺/Nestin⁺、BrdU⁺/MAP-2⁺ 数量、细胞迁移数增多, 细胞培养上清液中 SDF-1 α 、CXCR4 蛋白水平升高($P < 0.05$); 与奥拉西坦组相比, 奥拉西坦+AMD3100 组细胞 BrdU⁺/Nestin⁺、BrdU⁺/MAP-2⁺ 数量、细胞迁移数减少, 细胞培养上清液中 CXCR4 蛋白水平降低($P < 0.05$)。**[结论]** 奥拉西坦可能通过激活 SDF-1 α /CXCR4 通路, 促进 SVZ 区神经干细胞迁移至缺血区, 以促进脑梗死大鼠神经新生和神经功能恢复。

[关键词] 脑梗死; 奥拉西坦; SDF-1 α /CXCR4 通路; 神经新生; 神经迁移

[中图分类号] R741; R5

[文献标识码] A

Study on oxiracetam promoting neurogenesis and migration in rats with cerebral infarction through SDF-1 α /CXCR4 pathway

XIA Cuiping¹, JIANG Chunhua², WU Qinhu¹, ZHOU Jun¹, QIAO Yehong¹, ZHANG Bin¹

1. Department of Neurology, Fengxian District Central Hospital, 2. Department of Neurology, Zhuanghang Town Community Health Service Center, Fengxian District, Shanghai, Shanghai 201400, China

[ABSTRACT] **Aim** To explore the mechanism of oxiracetam promoting neurogenesis and migration in rats with cerebral infarction through stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α)/C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4) pathway.

[收稿日期] 2023-11-29

[修回日期] 2023-12-14

[基金项目] 上海市奉贤区科委社会类课题(奉科 20211808)

[作者简介] 夏翠萍, 副主任医师, 研究方向为脑血管病, E-mail: xiacuiping695@163cn.com.cn。通信作者张斌, 博士, 主任医师, 研究方向为脑血管病, E-mail: Zhangbin0807@126.com。

Methods 100 SD rats were randomly divided into control group, cerebral ischemia (CI) group, oxiracetam (200 mg/kg) group, and oxiracetam (200 mg/kg)+AMD3100 (5 mg/kg) group, with 25 rats in each group. Electrocoagulation was used to create rat model of local permanent cerebral infarction. After 1, 7 and 14 days of modeling, neurological deficits were scored, TTC staining was used to detect the volume of cerebral infarction, Nissl staining was used to detect cell survival in the infarcted area, Western blot was used to detect SDF-1 α and CXCR4 protein levels in ischemic zone. After 1~7 days of modeling, BrdU (50 mg/kg) was continuously injected intraperitoneally. After 14 days, immunofluorescence double staining was used to detect the number of BrdU⁺Nestin⁺ and BrdU⁺DCX⁺ cells in the SVZ region. 5 days before modeling, retroviruses carrying GFP were injected into the SVZ region. After 14 days, immunofluorescence double staining was used to detect the number of GFP⁺DCX⁺, GFP⁺MAP-2⁺ and GFP⁺GFAP⁺ cells in infarction area. C17.2 cells were divided into control group, oxygen-glucose deprivation (OGD) group, oxiracetam (final concentration: 200 mg/L) group, and oxiracetam (final concentration: 200 mg/L)+AMD3100 (final concentration: 100 μ mol/L) group. OGD was used to create cell CI model. After 12 hours, immunofluorescence double staining was used to detect the number of BrdU⁺/Nestin⁺ and BrdU⁺/MAP-2⁺ cells, Transwell experiment was used to detect cell migration, Western blot was used to detect SDF-1 α and CXCR4 protein levels in cell culture supernatant.

Results Animal experiment results showed: compared with control group, mNSS score in CI group was increased, cerebral infarction volume was increased, the number of surviving cells in infarcted area was decreased, SDF-1 α and CXCR4 protein levels were increased, the number of GFP⁺DCX⁺, GFP⁺MAP-2⁺ and GFP⁺GFAP⁺ cells in SVZ region were increased ($P<0.05$); compared with CI group, mNSS score in oxiracetam group was decreased, cerebral infarction volume was decreased, the number of surviving cells in infarcted area was increased, SDF-1 α and CXCR4 protein levels were increased, the number of GFP⁺DCX⁺, GFP⁺MAP-2⁺ and GFP⁺GFAP⁺ cells in SVZ region were increased, the number of GFP⁺DCX⁺, GFP⁺MAP-2⁺ and GFP⁺GFAP⁺ cells in infarcted area were increased ($P<0.05$); compared with oxiracetam group, mNSS score in oxiracetam+AMD3100 group was increased, cerebral infarction volume was increased, the number of surviving cells in infarcted area was decreased, CXCR4 protein level was decreased, the number of GFP⁺DCX⁺, GFP⁺MAP-2⁺ and GFP⁺GFAP⁺ cells in the SVZ region were decreased ($P<0.05$). Cell experiment results showed: compared with control group, the number of BrdU⁺/Nestin⁺ and BrdU⁺/MAP-2⁺ cells in OGD group were increased, the number of cell migration, SDF-1 α and CXCR4 protein levels in cell culture supernatant were increased ($P<0.05$); compared with OGD group, the number of BrdU⁺/Nestin⁺ and BrdU⁺/MAP-2⁺ cells in oxiracetam group were increased, the number of cell migration, SDF-1 α and CXCR4 protein levels in cell culture supernatant were increased ($P<0.05$); compared with oxiracetam group, the number of BrdU⁺/Nestin⁺ and BrdU⁺/MAP-2⁺ cells in oxiracetam+AMD3100 group were decreased, the number of cell migration, CXCR4 protein level in cell culture supernatant were decreased ($P<0.05$).

Conclusion Oxiracetam may promote the migration of neural stem cells from the SVZ region to the ischemic zone, promoting neurogenesis and functional recovery in rats with cerebral infarction by activating SDF-1 α /CXCR4 pathway.

[**KEY WORDS**] cerebral infarction; oxiracetam; SDF-1 α /CXCR4 pathway; neurogenesis; neuromigration

脑梗死又称缺血性脑卒中,是一种由于脑供血动脉狭窄或闭塞,造成脑供血不足,进而导致脑组织坏死的神经内科疾病,约占所有卒中患者的85%^[1]。临床证实,仅在卒中发病4.5 h内才能够进行溶栓治疗,并且还存在着溶栓不成功和留下神经后遗症等风险^[2]。因此大多数卒中患者无法得到有效的溶栓治疗。神经干细胞(neural stem cell, NSC)具有不断增殖和多向分化的能力,NSC已广泛用于创伤性脑损伤、脑梗死及神经退行性疾病的研究^[3]。由于外源性NSC移植存在免疫排异、存活时间短及来源不足等缺点,未被用于临床治疗。NSC主要存在于侧脑室室管膜下区(subventricular zone, SVZ)和海马齿状回颗粒下区(subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus, SGZ),这两个区域被

认为是神经再生的主要部位,包括NSC的增殖、分化和迁移^[4]。研究显示,脑梗死能够激活SVZ区中NSC的增殖,并使NSC迁移至病灶周围^[5]。然而内源性NSC数量有限,迁移能力低,神经元方向分化少,仅依靠脑缺血刺激增加缺血区的神经元,不足以维持脑梗死后的神经恢复。因此,需要积极有效的方式加强神经新生与迁移,以达到治疗脑梗死的目的。基质细胞衍生因子1 α (stromal cell-derived factor-1 α , SDF-1 α)/C-X-C趋化因子受体4(C-X-C chemokine receptor 4, CXCR4)通路能够参与神经系统发育及神经新生^[6]。研究显示脑缺血后,SDF-1 α 表达增加,SDF-1 α 能够诱导SVZ区神经细胞向缺血区迁移,并促进神经功能恢复,提示血管新生与神经新生密切相关^[7]。因此,寻找能够刺激内源性

NSC 增殖、分化,并向缺血区迁移和归巢,同时能够促进缺血区血管新生的药物和治疗方式是目前神经新生的关注重点。

奥拉西坦是一种新型的吡咯烷酮衍生物,具有激活、保护和修复神经元的功能,可用于脑损伤及其引起的神经功能缺失、记忆与智力障碍的治疗,如帕金森病、阿尔茨海默症、脑梗死、颅脑损伤等^[8]。Jiang 等^[9]发现丁苯酞联合奥拉西坦能够改善脑梗死患者认知功能、促进智力恢复,并降低血清炎症因子水平。Cui 等^[10]发现依达拉奉联合奥拉西坦通过抑制脑梗死大鼠神经细胞凋亡,发挥神经保护作用。从机制上看,奥拉西坦促进血管新生主要与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)有关^[11],促进神经细胞、内皮细胞存活主要与 PI3K/Akt 通路有关^[12]。然而奥拉西坦能否通过调控 SDF-1 α /CXCR4 通路促进脑梗死大鼠神经新生尚不清楚。因此,本研究拟从动物和细胞两个层面探究奥拉西坦对 NSC 增殖、分化和迁移的作用及机制,以期能为药物治疗卒中及脑部疾病的神经新生提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物和细胞

100 只体质量为(220 \pm 20)g 的 SPF 级雄性 SD 大鼠,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004。饲养于室温(22 \pm 2) $^{\circ}$ C、湿度 55% \pm 5%、12 h 光/暗循环环境中,自由饮食饮水,适应性饲养 1 周后用于实验。本研究通过本院动物实验伦理委员会批准(批准号:20210427)。C17.2 神经干细胞,购自长沙艾碧维生物科技有限公司(货号:AW-CNMO82),培养于含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素的 RPMI 1640 培养基中,并置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2 主要试剂与仪器

奥拉西坦注射液购自哈尔滨三联药业股份有限公司(国药准字:H20060070);AMD3100 购自美国 Sigma 公司;溴脱氧核苷尿嘧啶(bromodeoxyuridine, BrdU)、巢蛋白(nestin)、双皮质素(doublecortin, DCX)、微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein-2, MAP-2)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体购自美国 Proteintech 公司(货号分别为:66241-1-AP、19483-1-AP、13925-1-AP、17490-1-AP、16825-1-AP);抗荧光淬灭封片剂购自北京索莱宝生物科技有限公司(货号:S2110);Triton

X-100 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司(货号:DH351-4);Elx800 酶标仪购自美国 BioTek 公司;CM1900 冰冻切片机、DFC310FX 荧光显微镜购自德国 Leica 公司。

1.3 动物模型制作与干预

100 只大鼠随机分为对照组、脑缺血(cerebral ischemia, CI)组、奥拉西坦组和奥拉西坦+AMD3100 组,每组 25 只。采用电凝法制作局部永久性脑缺血大鼠模型,步骤如下:大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后,固定于脑立体定位仪上,对其头部进行备皮、消毒;在顶骨和颞骨交界处切开头皮及颞肌肌膜(切口约 2~3 cm),分离颞肌,使用骨钻在颞弓和颞骨鳞部接合处开出骨窗,剥离颞弓,暴露大脑嗅束和下静脉;在右侧大脑中动脉和下静脉交叉下方位置,使用电凝镊凝闭中动脉(血管表现为瞬间变白);随后缝合大鼠头皮、碘伏消毒,放入保温箱中等待苏醒。对照组大鼠仅暴露中动脉,不进行电凝处理。造模后 24 h,奥拉西坦组、奥拉西坦+AMD3100 组大鼠尾静脉注射相应的奥拉西坦(200 mg/kg)和 AMD3100(5 mg/kg);对照组、CI 组大鼠尾静脉注射等体积 0.9% 氯化钠溶液。每天 1 次,连续注射 7 天。造模后 1、7、14 天进行神经功能缺损评分。随后处死大鼠。

各组随机取 5 只大鼠,在造模后 1~7 天,连续腹腔注射 BrdU(50 mg/kg),1 天 2 次。14 天后取脑组织,免疫荧光双标染色检测 SVZ 区 BrdU⁺Nestin⁺、BrdU⁺DCX⁺表达。

各组随机取 5 只大鼠,在造模前 5 天,采用脑立体定位注射法将携带绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)的反转录病毒注射到大鼠 SVZ 区。步骤如下:大鼠麻醉后固定于脑立体定位仪上,对其头部进行备皮、消毒;在头部正中做矢状切口(切口约 2 cm),去除筋膜,直至找到 Bregma 和 Lambda 两点;以 Bregma 点为中心,确定 SVZ 区,使用骨钻在标记的 2 个注射点钻孔;将携带 GFP 的反转录病毒缓慢注射到脑内(每孔注射 5 μ L,速度 0.5 μ L/min,注射后留针 10 min);随后缝合大鼠头皮、碘伏消毒,放入保温箱中等待苏醒。5 天后造模,14 天后取脑组织,免疫荧光双标染色检测缺血区 GFP⁺DCX⁺、GFP⁺MAP-2⁺、GFP⁺GFAP⁺表达。

1.4 神经功能缺损评分

使用 mNSS 评估各组大鼠在术前、术后第 1、7、14 天后的神经功能。评分主要包括运动、感觉、平衡和神经反射 4 部分。总分 18 分,正常为 0 分,得分越高表示神经功能损伤越严重。mNSS 评分细则见表 1。

表 1. mNSS 评分细则

Table 1. mNSS scoring rules

试验类型	行为症状	评分
运动试验(正常=0;最高=6)	提尾试验(正常=0;最高=3)	3
	前肢屈曲	1
	后肢屈曲	1
	头在30 s内向垂直轴移动>10°	1
	行走试验(正常=0;最高=3)	3
	正常行走	0
	不能直线行走	1
	向患侧转圈	2
	向患侧倾倒	3
	感觉试验(正常=0;最高=2)	触觉试验
视觉试验		1
平衡木试验(正常=0;最高=6)	保持平衡姿势	0
	紧抓平衡木边缘	1
	紧抓平衡木,但一肢体垂落	2
	紧抓平衡木,但两肢体垂落或旋转	3
	尝试平衡,但失败跌落(>40 s)	4
	尝试平衡,但失败跌落(>20 s)	5
	尝试平衡,但失败跌落(<20 s)	6
反射丧失(正常=0;最高=4)	耳廓反射:接触外耳道时摇头	1
	角膜反射:接触角膜时眨眼	1
	惊恐反射:对噪音有运动反射	1
	癫痫、肌阵挛、肌张力障碍	1

1.5 脑缺血区 TTC 染色

1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉大鼠后,断头取脑。脑组织于-80℃冰箱中冷冻10 min,随后制作厚度为2 mm的冠状切片。切片浸入0.5% TTC 溶液中,37℃避光孵育30 min。0.9%氯化钠溶液冲洗后,切片浸入4%多聚甲醛溶液中,4℃固定过夜。拍照,Image J 软件计算脑梗死侧梗死体积。

1.6 脑缺血区尼氏染色

1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉大鼠后,用0.9%氯化钠溶液快速灌注心脏,随后灌注4%多聚甲醛溶液,先快后慢,至大鼠四肢僵硬。取出脑组织,浸入4%多聚甲醛溶液中,4℃固定过夜。用梯度乙醇脱水,二甲苯透明,60℃浸蜡,包埋,冷冻后用切片机切片(厚度为4 μm)。切片经烤片、脱蜡、甲苯胺蓝染色、流水冲洗、95%乙醇分化、脱色至背景清楚。经无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性胶封片,显微镜下观察染色情况,并对存活神经元进行计数。

1.7 SVZ 区、缺血区免疫荧光双标染色

取4%多聚甲醛溶液固定的脑组织,用20%、30%的蔗糖溶液脱水,包埋石蜡,制作厚度为10 μm的冷冻切片。切片经4%多聚甲醛溶液固定,PBS 洗涤,0.03% Triton X-100 通透,PBS 洗涤,盐酸溶液酸化,PBS 洗涤,10%血清封闭1 h,切片滴加 BrdU/Nestin、BrdU/DCX、GFP/DCX、GFP/MAP-2、GFP/Ibal、GFP/GFAP 混合一抗(1:100),4℃孵育过夜,PBS 洗涤,分别滴加 FITC/Cy3 混合标记的二抗(1:150),室温避光孵育1 h,PBS 洗涤,细胞核 DAPI 染色,PBS 洗涤,抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜下观察蛋白荧光情况,Image J 软件对阳性细胞进行计数。

1.8 Western blot 检测

取各组大鼠脑缺血区皮质组织,加入 RIPA 裂解液匀浆,离心后取上清液。使用 BCA 蛋白测定试剂盒检测样品蛋白浓度。各组取等量蛋白,加入上样缓冲液混匀,沸水浴变性10 min。配制分离胶和浓缩胶,将胶板放入电泳槽中,加入电泳缓冲液,将各组待测样品和蛋白 Marker 依次上样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳结束后取出胶板,按照海绵、3层滤纸、分离胶、PVDF 膜、3层滤纸、海绵的顺序,进行电转。转膜结束后取出 PVDF 膜,置于5%脱脂奶粉中室温封闭2 h,TBST 洗涤,加入 SDF-1α、CXCR4 一抗(1:2 000),4℃孵育过夜,TBST 洗涤,加入 HRP 标记的二抗(1:10 000),室温孵育2 h。TBST 洗涤后,加入 ECL 发光液,进行曝光、显影,Image J 软件分析各蛋白条带灰度值。

1.9 细胞模型制作与指标检测

C17.2 神经干细胞分为对照组、氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)组、奥拉西坦组和奥拉西坦+AMD3100 组。采用 OGD 制作细胞缺血模型。将 C17.2 细胞接种于96孔板,常规培养6~8 h,随后 OGD 组、奥拉西坦组、奥拉西坦+AMD3100 组细胞更换为无糖培养基,其中奥拉西坦组、奥拉西坦+AMD3100 组培养基中含相应的奥拉西坦(终浓度为200 mg/L)和 AMD3100(终浓度为100 μmol/L),并将细胞置于37℃、1% O₂ 条件下培养12 h。对照组常规培养12 h。培养结束后,免疫荧光双标染色检测 BrdU⁺/Nestin⁺、BrdU⁺/MAP-2⁺ 细胞数量。Transwell 实验检测细胞迁移,步骤如下:无血清培养基培养各组细胞,接种于 Transwell 小室上室中,下室加入含有10%胎牛血清的培养基,并于37℃孵育24 h;取出小室,拭去未迁移的细胞;4%多聚甲醛固定迁移

的细胞, PBS 洗涤, 0.1% 结晶紫染色, 显微镜下观察并统计穿膜细胞数。收集细胞培养上清液, Western blot 检测上清液中 SDF-1 α 、CXCR4 蛋白水平。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 16.0 进行统计学分析, GraphPad Prism 5.0 软件作图, 实验数据均为计量资料, 均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 奥拉西坦对大鼠神经功能的影响

mNSS 评分显示, 各组大鼠在术前及对照组在术后的 mNSS 评分均为 0。造模 1 天后, CI 组、奥拉西坦组、奥拉西坦+AMD3100 组大鼠 mNSS 评分差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。随着时间的推移, CI 组、奥拉西坦组、奥拉西坦+AMD3100 组大鼠 mNSS 评分均有所降低。造模 7、14 天后, 与 CI 组相比, 奥拉西坦组大鼠 mNSS 评分分别降低了 37.84%、58.06% ($P < 0.05$); 与奥拉西坦组相比, 奥拉西坦+AMD3100 组大鼠 mNSS 评分分别升高了 47.83%、92.31% ($P < 0.05$)。说明奥拉西坦能够改善大鼠神经功能(图 1)。

2.2 奥拉西坦对大鼠脑缺血区神经元存活的影响

TTC 染色结果显示, 与对照组相比, CI 组大鼠

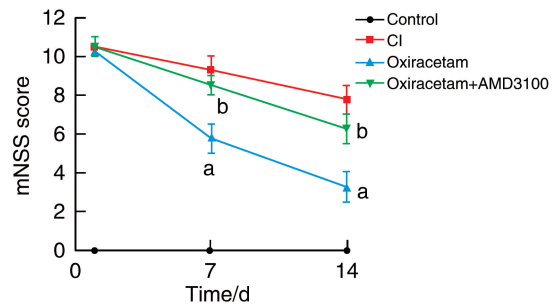


图 1. 奥拉西坦对大鼠神经功能的影响 ($n=25$)

a 为 $P < 0.05$, 与 CI 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与奥拉西坦组比较。

Figure 1. The effect of oxiracetam on neural function in rats ($n=25$)

脑梗死体积增大了 60.82 倍 ($P < 0.05$); 与 CI 组相比, 奥拉西坦组大鼠脑梗死体积减小了 49.87% ($P < 0.05$); 与奥拉西坦组相比, 奥拉西坦+AMD3100 组大鼠脑梗死体积增大了 60.60% ($P < 0.05$; 图 2)。

尼氏染色结果显示, 对照组大鼠神经元胞体呈圆形, 细胞核染色较浅, 神经元无明显变性; 与对照组相比, CI 组大鼠神经元发生变形, 出现水肿, 细胞核染色较深, 轴丘附近尼氏体消失, 神经元存活数量减少了 69.55% ($P < 0.05$); 与 CI 组相比, 奥拉西坦组大鼠神经元损伤明显减轻, 神经元存活数量增多了 128.43% ($P < 0.05$); 与奥拉西坦组相比, 奥拉西坦+AMD3100 组大鼠神经元存活数量减少了 43.78% ($P < 0.05$)。说明奥拉西坦能够促进大鼠脑缺血区神经元存活(图 2)。

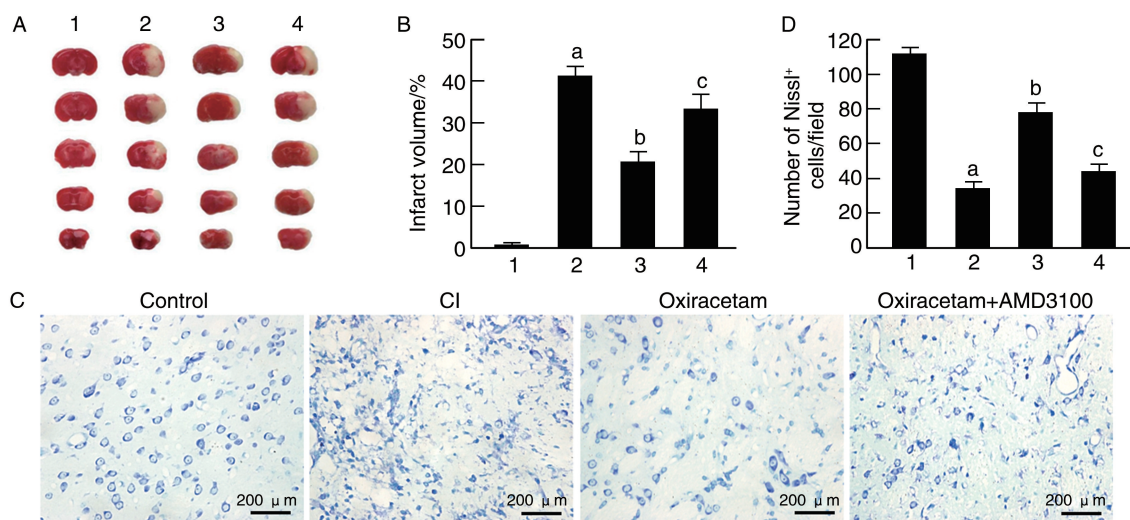


图 2. 奥拉西坦对大鼠脑缺血区神经元存活的影响 ($n=5$)

1 为对照组, 2 为 CI 组, 3 为奥拉西坦组, 4 为奥拉西坦+AMD3100 组。

A 为 TTC 染色检测脑梗死体积 ($20\times$); B 为脑梗死体积定量分析; C 为尼氏染色观察脑缺血区神经元存活情况; D 为尼氏染色阳性细胞数。

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 CI 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与奥拉西坦组比较。

Figure 2. The effect of oxiracetam on neuronal survival in the brain ischemic zone of rats ($n=5$)

2.3 奥拉西坦对大鼠患侧 SVZ 区 NSC 增殖、迁移的影响

Nestin 是 NSC 标志物, DCX 是未成熟神经元标志物, 常用作标记迁移的神经元, BrdU 标记增殖状态的神经元。BrdU⁺/Nestin⁺ 表示增殖的神经元, BrdU⁺/DCX⁺ 表示增殖的、未成熟的神经元。免疫荧光双染色检测结果显示, 与对照组相比, CI 组大鼠 SVZ 区 BrdU⁺/Nestin⁺、BrdU⁺/DCX⁺ 细胞数量分别

增多了 97.90%、137.65% ($P < 0.05$); 与 CI 组相比, 奥拉西坦组大鼠 SVZ 区 BrdU⁺/Nestin⁺、BrdU⁺/DCX⁺ 细胞数量分别增多了 88.34%、109.41% ($P < 0.05$); 与奥拉西坦组相比, 奥拉西坦+AMD3100 组大鼠 SVZ 区 BrdU⁺/Nestin⁺、BrdU⁺/DCX⁺ 细胞数量分别减少了 50.28%、47.75% ($P < 0.05$)。说明奥拉西坦能够促进大鼠患侧 SVZ 区 NSC 的增殖、迁移 (图 3)。

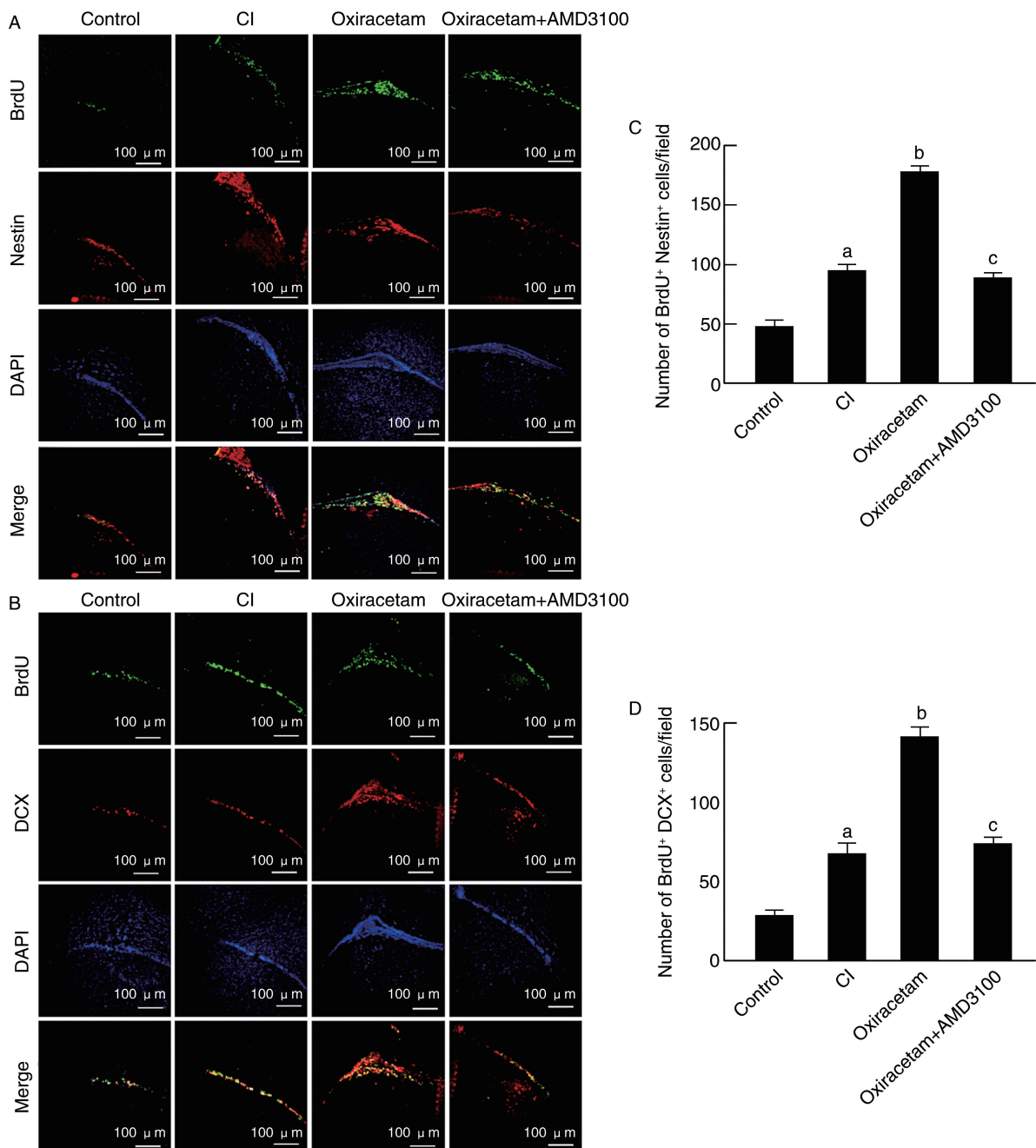


图 3. 奥拉西坦对大鼠患侧 SVZ 区 NSC 增殖、迁移的影响 ($n=5$)

A、B 分别为免疫荧光双染色检测大鼠患侧 SVZ 区 BrdU⁺/Nestin⁺、BrdU⁺/DCX⁺ 细胞数, C、D 分别为 BrdU⁺/Nestin⁺、BrdU⁺/DCX⁺ 阳性细胞数定量分析。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 CI 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与奥拉西坦组比较。

Figure 3. The effect of oxiracetam on proliferation and migration of NSC in the affected SVZ area of rats ($n=5$)

2.4 奥拉西坦对大鼠患侧 SVZ 区 NSC 往缺血区迁移、分化的影响

GFP 标记 SVZ 区增殖的神经元,DCX 标记未成熟的神经元,MAP-2 标记成熟的神经元,GFAP 标记星形胶质细胞。GFP⁺/DCX⁺ 表示 NSC 分化为未成熟的神经元,GFP⁺/MAP-2⁺ 表示 NSC 分化为成熟的神经元,GFP⁺/GFAP⁺ 表示 NSC 分化为星形胶质细胞。免疫荧光双染色检测结果显示,仅在奥拉西坦组缺血区检测到 GFP⁺/DCX⁺、GFP⁺/MAP-2⁺、GFP⁺/GFAP⁺。说明奥拉西坦能够促进大鼠患侧 SVZ 区 NSC 迁移至缺血区,并分化为成熟的神经元和星形胶质细胞(图 4)。

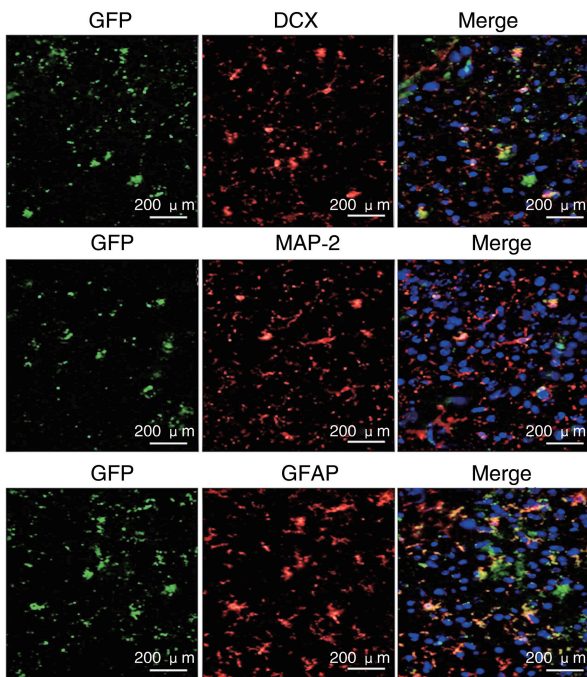


图 4. 奥拉西坦对大鼠患侧 SVZ 区 NSC 往缺血区迁移、分化的影响($n=5$)

Figure 4. The effect of oxiracetam on the migration and differentiation of NSC from the affected SVZ area to the ischemic zone in rats($n=5$)

2.5 奥拉西坦对大鼠缺血区 SDF-1 α /CXCR4 通路的影响

SDF-1 α /CXCR4 通路在介导 NSC 动员、迁移、归巢方面具有重要作用。AMD3100 是 CXCR4 拮抗剂,作用于 CXCR4 介导的趋化性。Western blot 检测结果显示,与对照组相比,CI 组大鼠缺血区 SDF-1 α 、CXCR4 蛋白表达分别升高了 73.33%、540.00% ($P<0.05$);与 CI 组相比,奥拉西坦组大鼠缺血区 SDF-1 α 、CXCR4 蛋白表达分别升高了 234.62%、

184.38% ($P<0.05$);与奥拉西坦组相比,奥拉西坦+AMD3100 组大鼠缺血区 CXCR4 蛋白表达降低了 59.34% ($P<0.05$)。说明奥拉西坦能够激活大鼠缺血区 SDF-1 α /CXCR4 通路(图 5)。

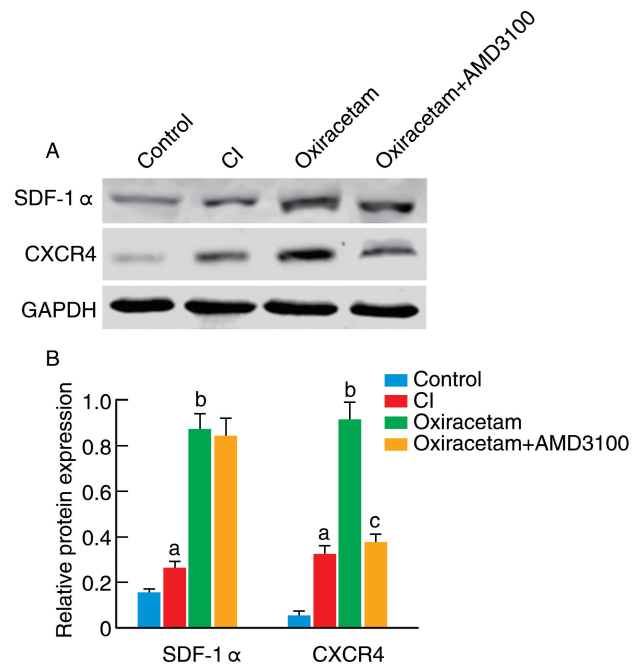


图 5. 奥拉西坦对大鼠缺血区 SDF-1 α /CXCR4 通路的影响($n=5$)

a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 CI 组比较;
c 为 $P<0.05$,与奥拉西坦组比较。

Figure 5. The effect of oxiracetam on SDF-1 α /CXCR4 pathway in the ischemic zone of rats($n=5$)

2.6 奥拉西坦对 C17.2 细胞增殖、分化、迁移的影响

与对照组相比,OGD 组 C17.2 细胞 BrdU⁺/Nestin⁺、BrdU⁺/MAP-2⁺ 数量、细胞迁移数分别增多了 164.86%、181.58%、89.55% ($P<0.05$);与 OGD 组相比,奥拉西坦组 C17.2 细胞 BrdU⁺/Nestin⁺、BrdU⁺/MAP-2⁺ 数量、细胞迁移数分别增多了 167.35%、263.55%、68.50% ($P<0.05$);与奥拉西坦组相比,奥拉西坦+AMD3100 组 C17.2 细胞 BrdU⁺/Nestin⁺、BrdU⁺/MAP-2⁺ 数量、细胞迁移数分别减少了 50.00%、57.58%、53.27% ($P<0.05$)。说明奥拉西坦能够促进 C17.2 细胞的增殖、分化和迁移(图 6)。

2.7 奥拉西坦对 C17.2 细胞 SDF-1 α /CXCR4 通路的影响

Western blot 检测结果显示,与对照组相比,

OGD 组 C17.2 细胞培养上清中 SDF-1 α 、CXCR4 蛋白表达分别升高了 3.50 倍、2.20 倍 ($P < 0.05$)；与 OGD 组相比, 奥拉西坦组 C17.2 细胞培养上清中 SDF-1 α 、CXCR4 蛋白表达分别升高了 1.55 倍、2.00

倍 ($P < 0.05$)；与奥拉西坦组相比, 奥拉西坦 + AMD3100 组 C17.2 细胞培养上清中 CXCR4 蛋白表达降低了 64.58% ($P < 0.05$)。说明奥拉西坦能够激活大鼠缺血区 SDF-1 α /CXCR4 通路(图 7)。

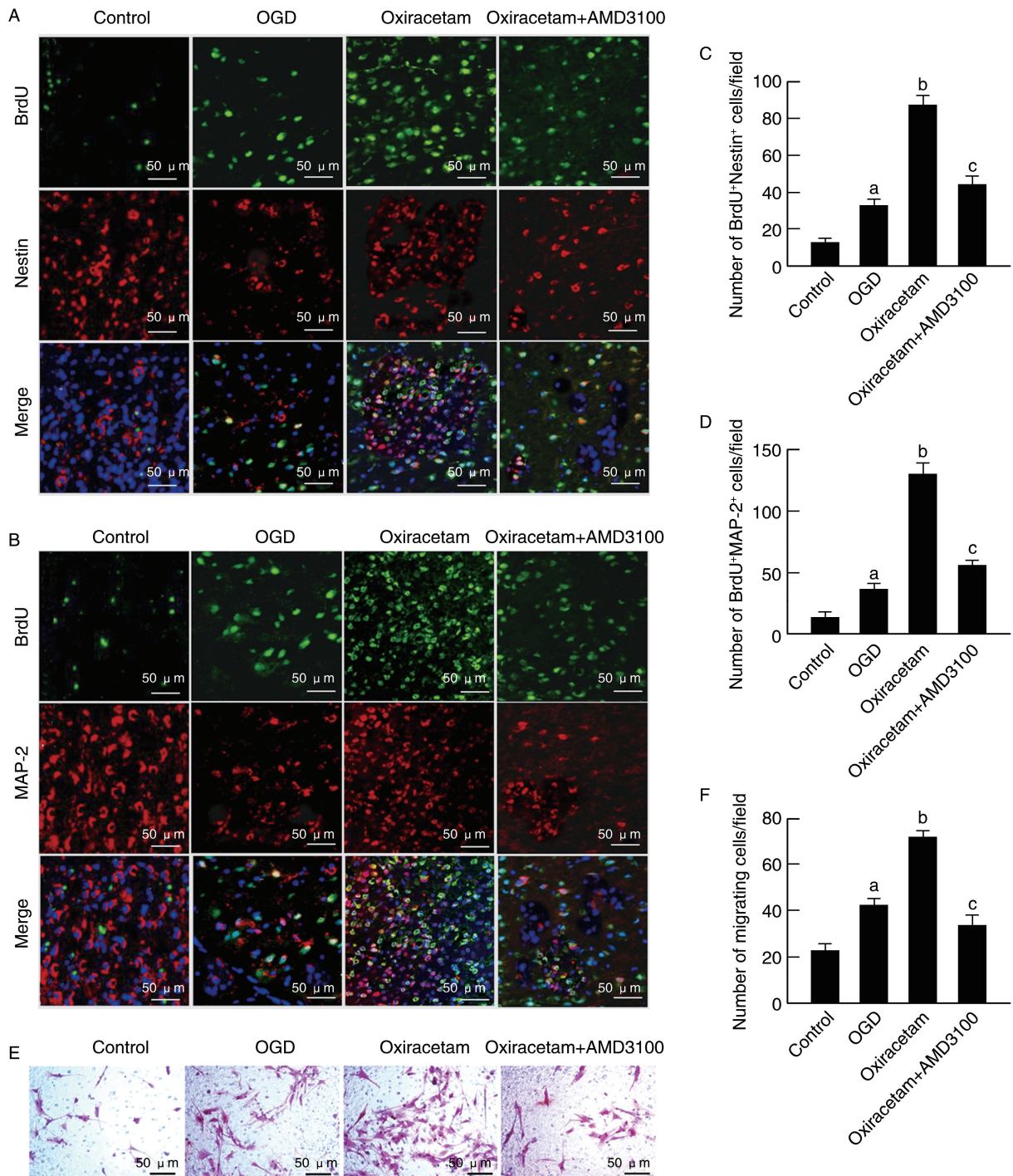


图 6. 奥拉西坦对 C17.2 细胞增殖、分化、迁移的影响 ($n = 3$)

A、B 分别为免疫荧光双标染色检测 BrdU⁺/Nestin⁺、BrdU⁺/MAP-2⁺ 细胞数, C、D 分别为 BrdU⁺/Nestin⁺、BrdU⁺/MAP-2⁺ 细胞数定量分析, E 为 Transwell 实验检测细胞迁移, F 为细胞迁移数定量分析。

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 OGD 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与奥拉西坦组比较。

Figure 6. The effect of oxiracetam on the proliferation, differentiation and migration of C17.2 cells ($n = 3$)

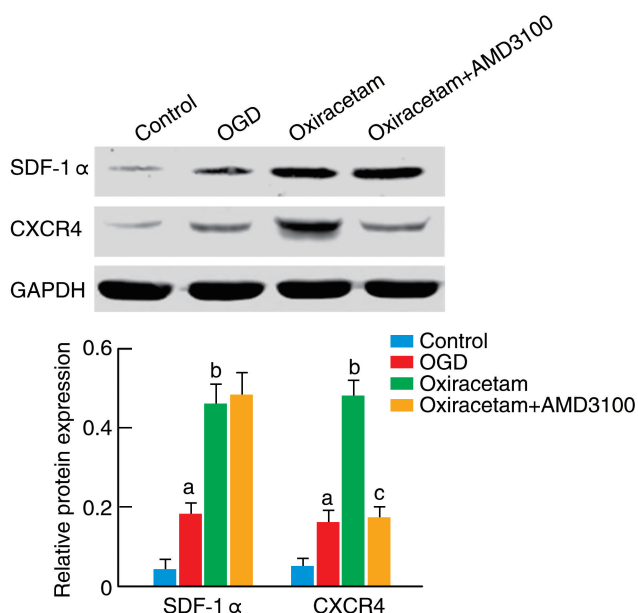


图 7. 奥拉西坦对 C17.2 细胞 SDF-1 α /CXCR4 通路的影响 ($n=3$)

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 OGD 组比较; c 为 $P<0.05$, 与奥拉西坦组比较。

Figure 7. The effect of oxiracetam on SDF-1 α /CXCR4 pathway in C17.2 cells ($n=3$)

3 讨论

脑梗死是因局部脑组织缺血缺氧导致的一种神经功能缺损疾病^[13]。NSC 主要存在于大脑的 SVZ 区和 SGZ 区,大量研究显示,脑缺血后 SVZ 区的 NSC 被激活,NSC 通过不断增殖、迁移到脑缺血区并分化为成熟的神经元,以此来替代缺血区损失的神经元^[14-15]。因此调控 SVZ 区的 NSC 新生对改善脑梗死后神经修复具有重要作用。奥拉西坦具有激活、保护和修复神经元的功能。目前研究仅报道,奥拉西坦能够改善脑梗死患者认知功能,缓解神经症状,降低炎症反应,并减轻缺血侧神经元氧化应激损伤^[16-17]。但奥拉西坦能否促进 SVZ 区的 NSC 迁移到缺血区进行神经再生尚无研究报道。因此,本研究拟探究奥拉西坦对脑梗死大鼠神经新生与迁移的影响。本研究通过电凝法制备大鼠局部永久性脑缺血模型,发现与对照组相比,CI 组大鼠 mNSS 评分升高,梗死体积增大,神经元存活数量减少。相比于线栓法,该造模方式对大鼠脑损伤较小,梗死部位稳定,利于动物长期存活,适合脑缺血后神经功能相关的研究。造模 24 h 后,给与大鼠尾静脉注射奥拉西坦,发现与 CI 组相比,奥拉西坦组大鼠 mNSS 评分降低,梗死体积减小,神经元存活数量增多,说明奥拉西坦能够改善大鼠的认知功能,

并促进神经元存活。

为探究奥拉西坦对缺血区神经新生和迁移的影响,本研究通过腹腔注射 BrdU 标记增殖的细胞,通过检测 SVZ 区 BrdU⁺Nestin⁺、BrdU⁺DCX⁺细胞数量,观察 SVZ 区 NSC 的增殖、迁移情况。结果显示,与对照组相比,CI 组大鼠 SVZ 区 BrdU⁺Nestin⁺、BrdU⁺DCX⁺细胞数量增多,说明脑缺血信号能够激活 SVZ 区 NSC 的增殖、迁移。而奥拉西坦组 SVZ 区 BrdU⁺Nestin⁺、BrdU⁺DCX⁺细胞数量进一步增多,说明奥拉西坦能够显著促进 SVZ 区 NSC 的增殖、迁移。为进一步证明 SVZ 区 NSC 能够迁移至缺血区发挥神经再生作用,本研究通过在 SVZ 区注射携带 GFP 的反转录病毒标记 NSC,通过检测缺血区 GFP⁺DCX⁺、GFP⁺MAP-2⁺、GFP⁺GFAP⁺细胞数量,观察 SVZ 区 NSC 往缺血区迁移、分化的情况。结果显示,仅在奥拉西坦组缺血区存在少量 GFP⁺DCX⁺、GFP⁺MAP-2⁺、GFP⁺GFAP⁺细胞。可能是对照组、CI 组增殖的细胞较少,被 GFP 标记的更少,因此在缺血区检测到 GFP 阳性细胞。说明缺血区新生的神经元部分来源于 SVZ 区,奥拉西坦能够促进 SVZ 区 NSC 增殖、迁移至缺血区,并分化为成熟的神经元。另外,本研究构建了 OGD 的 C17.2 细胞模型,也发现奥拉西坦能够促进 C17.2 细胞增殖、迁移和成熟。

SDF-1 α /CXCR4 通路主要调控 NSC 的存活、增殖和迁移。脑缺血发生后,损伤部位释放 SDF-1 α ,并促进 NSC 的存活和招募,使之向缺血区迁移。已有研究证实,NSC 向 SDF-1 定向迁移,缺血区星形胶质细胞和内皮细胞分泌的 SDF-1 能够吸引表达 CXCR4 的神经母细胞^[18-19]。而在 CXCR4 抑制剂 AMD3100 的作用下,NSC 的迁移受到很大限制^[20]。本研究发现,与对照组相比,CI 组大鼠缺血区 SDF-1 α 、CXCR4 蛋白水平升高,说明缺血区迁移的 NSC 可能是由释放的 SDF-1 α 招募而来;与 CI 组相比,奥拉西坦组缺血区 SDF-1 α 、CXCR4 蛋白水平升高,说明奥拉西坦能够激活 SDF-1 α /CXCR4 通路;与奥拉西坦组相比,奥拉西坦+AMD3100 组缺血区 CXCR4 蛋白水平降低,说明 AMD3100 能够抑制奥拉西坦对 SDF-1 α /CXCR4 通路的激活作用。另外,离体细胞实验显示,奥拉西坦能够促进细胞培养上清液中 SDF-1 α 、CXCR4 蛋白水平表达,而 AMD3100 能够抑制奥拉西坦对 CXCR4 表达的影响。说明奥拉西坦可能通过旁分泌 SDF-1 α 调控 NSC 的增殖、迁移(图 8)。

综上所述,奥拉西坦可能通过激活 SDF-1 α /CXCR4 通路,促进 SVZ 区 NSC 迁移至缺血区,以促进脑梗死大鼠神经新生和神经功能恢复。

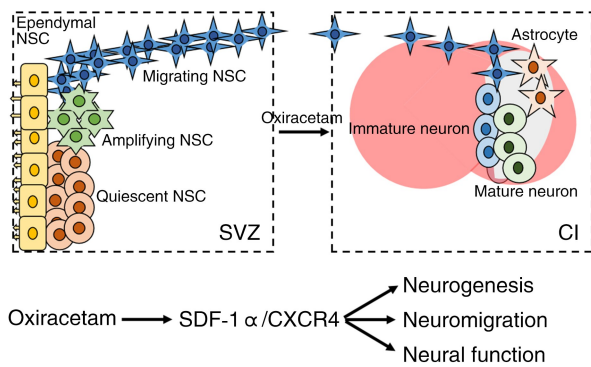


图 8. 奥拉西坦促进脑梗死大鼠神经新生与迁移的可能机制
Figure 8. The possible mechanism of oxiracetam promoting neurogenesis and migration in rats with cerebral infarction

[参考文献]

- [1] 周晓梅, 任孝林, 周芯羽. 颈动脉易损斑块风险模型的构建及与急性脑梗死患者认知障碍和预后的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(7): 606-610.
ZHOU X M, REN X L, ZHOU X Y. Construction of carotid vulnerable plaque risk model and its relationship with cognitive impairment and prognosis in patients with acute cerebral infarction[J]. Chin J Arterioscler, 2022, 30(7): 606-610.
- [2] WANG Z Q, CHE J S. Effectiveness of alteplase intravenous thrombolysis combined with butylphthalide in patients with acute severe cerebral infarction[J]. Folia Neuropathol, 2022, 60(4): 421-426.
- [3] OZ T, KAUSHIK A, KUJAWSKA M. Neural stem cells for Parkinson's disease management: challenges, nanobased support, and prospects[J]. World J Stem Cells, 2023, 15(7): 687-700.
- [4] COUTURIER C P, NADAF J, LI Z R, et al. Glioblastoma scRNA-seq shows treatment-induced, immune-dependent increase in mesenchymal cancer cells and structural variants in distal neural stem cells[J]. Neuro Oncol, 2022, 24(9): 1494-1508.
- [5] ZHANG K Y, YANG Y, GE H F, et al. Artesunate promotes the proliferation of neural stem/progenitor cells and alleviates ischemia-reperfusion injury through PI3K/Akt/FOXO-3a/p27kip1 signaling pathway[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(9): 8029-8048.
- [6] CHAU M J, DEVEAU T C, GU X H, et al. Delayed and repeated intranasal delivery of bone marrow stromal cells increases regeneration and functional recovery after ischemic stroke in mice[J]. BMC Neurosci, 2018, 19(1): 20.
- [7] DENG Y G, GUO F, HAN X H, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation increases neurological function and endogenous neural stem cell migration via the SDF-1α/CXCR4 axis after cerebral infarction in rats[J]. Exp Ther Med, 2021, 22(3): 1037.
- [8] YOUNG D H, HAN S W, KIM J T, et al. Oxiracetam alleviates anti-inflammatory activity and ameliorates cognitive impairment in the early phase of traumatic brain injury[J]. Acta Neurochir (Wien), 2023, 165(8): 2201-2210.
- [9] JIANG W X, YU X D, DENG Y Q. Effect of butylphthalide combined with oxiracetam on cognitive function, intellectual recovery and serum inflammatory factors in patients with cognitive impairment after cerebral infarction[J]. Pak J Med Sci, 2023, 39(2): 485-490.
- [10] CUI X P, YE J X, LIN H, et al. Effects of edaravone combined with oxiracetam on neuronal apoptosis in rats with cerebral infarction through targeting SIRT1/NF-κB inflammatory pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2022, 26(1): 218-224.
- [11] 李婷婷, 赵俊杰, 吴钦娟, 等. 双嘧达莫联合奥拉西坦对皮下缺血性血管性痴呆患者血管内皮生长因子、血红素氧化酶-1、低氧诱导因子-1α 水平的影响[J]. 临床神经病学杂志, 2021, 34(6): 431-435.
LI T T, ZHAO J J, WU Q J, et al. Effect of dipyridamole combined with oxiracetam on serum levels of vascular endothelial growth factor, heme oxygenase-1, hypoxia-inducible factor-1α in patients with subcortical ischemic vascular dementia[J]. J Clin Neurol, 2021, 34(6): 431-435.
- [12] FAN W X, LI X, HUANG L L, et al. S-oxiracetam ameliorates ischemic stroke induced neuronal apoptosis through up-regulating α7 nAChR and PI3K/Akt/GSK3β signal pathway in rats[J]. Neurochem Int, 2018, 115: 50-60.
- [13] 吴挺国, 林慧怡, 林文倩, 等. 铁皮石斛多糖对缺血性脑卒中大鼠脑组织 JAK/STAT3 信号通路的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(3): 225-230.
WU T G, LIN H Y, LIN W Q, et al. Effect of Dendrobium officinale polysaccharide on JAK/STAT3 signaling pathway in brain tissue of ischemic stroke rats[J]. Chin J Arterioscler, 2023, 31(3): 225-230.
- [14] ZHANG K Y, GUO L, ZHANG J P, et al. tDCS accelerates the rehabilitation of MCAO-induced motor function deficits via neurogenesis modulated by the Notch1 signaling pathway[J]. Neurorehabil Neural Repair, 2020, 34(7): 640-651.
- [15] MAHDAVIPOUR M, HASSANZADEH G, SEIFALI E, et al. Effects of neural stem cell-derived extracellular vesicles on neuronal protection and functional recovery in the rat model of middle cerebral artery occlusion[J]. Cell Biochem Funct, 2020, 38(4): 373-383.
- [16] 薛胜男, 张薇, 杨云云, 等. 奥拉西坦联合阿司匹林及氯吡格雷治疗短暂性脑缺血发作患者神经修复功能及炎症指标的影响[J]. 脑与神经疾病杂志, 2023, 31(6): 358-362.
XUE S N, ZHANG W, YANG Y Y, et al. Effect of oxiracetam combined with aspirin and clopidogrel on nerve repair function and inflammatory indicators in patients with transient ischemic attack[J]. J Brain Nerv Dis, 2023, 31(6): 358-362.
- [17] 刘泽晶, 徐丰, 刘勇, 等. 奥拉西坦联合 rTMS 减轻脑缺血再灌注损伤大鼠缺血侧脑皮质神经元氧化应激损伤[J]. 中南医学科学杂志, 2022, 50(2): 162-166.
LIU Z J, XU F, LIU Y, et al. Oxiracetam combined with rTMS alleviating oxidative stress injury of cerebral cortex neurons on the ischemic side of cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. J Univ South Chin, 2022, 50(2): 162-166.
- [18] ZHU C, MAHESULA S, TEMPLE S, et al. Heterogeneous expression of SDF1 retains actively proliferating neural progenitors in the capillary compartment of the niche[J]. Stem Cell Reports, 2019, 12(1): 6-13.
- [19] PALMA-TORTOSA S, HURTADO O, PRADILLO J M, et al. Toll-like receptor 4 regulates subventricular zone proliferation and neuroblast migration after experimental stroke[J]. Brain Behav Immun, 2019, 80: 573-582.
- [20] LUO J, HU X Q, ZHANG L Y, et al. Physical exercise regulates neural stem cells proliferation and migration via SDF-1α/CXCR4 pathway in rats after ischemic stroke[J]. Neurosci Lett, 2014, 578: 203-208.

(此文编辑 文玉珊)