

脑源性神经营养因子和 Semaphorin 3A 在大鼠局灶性脑缺血中的表达及葛根素的保护作用

李贯绯¹, 刘 群², 齐中华³

(1. 吉林省人民医院神经内科, 吉林省长春市 130021; 2. 吉林大学第一医院神经内科, 吉林省长春市 130021; 3. 大连医科大学附属第一医院神经内科, 辽宁省大连市 116011)

[关键词] 神经病学; 葛根素的神经保护作用; 免疫组织化学法; 脑缺血; 脑源性神经营养因子; Semaphorin 3A; 葛根素

[摘要] 目的 观察大鼠局灶性脑缺血后脑源性神经营养因子和神经生长抑制因子 Semaphorin 3A (Sema 3A) 的表达, 探讨脑缺血损伤与脑源性神经营养因子、Sema 3A 的关系及葛根素对脑缺血损伤的保护作用。方法 建立 Wistar 大鼠永久大脑中动脉闭塞模型, 应用免疫组织化学法观察不同缺血时间脑源性神经营养因子和 Sema 3A 阳性神经元数的动态改变。结果 脑源性神经营养因子阳性神经元自缺血 6 h 开始增多, 1 天达高峰, 治疗组阳性神经元较缺血组增多 ($P < 0.05$)。Sema 3A 阳性神经元自缺血 6 h 开始增多, 1 天达高峰, 3 天达正常对照组水平, 治疗组阳性神经元较缺血组减少 ($P < 0.05$)。结论 脑缺血后脑源性神经营养因子和 Sema 3A 的表达均有短暂上调, 可能与神经元的损伤修复再生机制有关。葛根素治疗后脑源性神经营养因子的表达增加, Sema 3A 的表达下降, 提示葛根素对脑缺血损伤具有保护作用。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

Study on the Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Semaphorin 3A After Focal Cerebral Ischemia in Rats and the Neuroprotective Effects of Puerarin

LI Guan-Fei, LIU Qun, and QI Zhong-Hua

(Department of Neurology, Jilin Provincial People's Hospital, Changchun 130021, China)

[KEY WORDS] Cerebral Ischemia; Brain-Derived Neurotrophic Factor; Semaphorin 3A; Puerarin; Middle Cerebral Artery; Neuroprotective Effects

[ABSTRACT] **Aim** To observe the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and Semaphorin 3A (Sema 3A) after focal cerebral ischemia, and to study the neuroprotective effects of puerarin. **Methods** The model of focal cerebral ischemia was established by occluding middle cerebral artery (MCAO). Dynamic changes of BDNF and Sema 3A positive neurons at different time were observed with method of immunohistochemistry. **Results** The number of BDNF positive neurons increased after 6 h of ischemia, and reached its peak at the time of 1 d after ischemia. Compared with treatment group and ischemic group, the levels of BDNF were higher ($P < 0.05$); the number of Sema 3A positive neurons increased after 6 h of ischemia, and reached its peak at the time of 1 d after ischemia, then become normal after 3 d. Compared with treatment group and ischemic group, the levels of Sema 3A were lower ($P < 0.05$). **Conclusions** After the attack of cerebral ischemia, the expression of BDNF and Sema 3A may be related to the mechanism of neuronal injury and repairment. Puerarin may have protective effects on ischemic neurons.

脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 是脑中含量较多的神经营养因子之一, 属神经营养因子家族^[1]。BDNF 在脑缺血后神经元损伤和修复过程中发挥着重要作用。Semaphorin 3A (Sema 3A) 作为一种神经生长抑制因子, 可以特异性的引起轴突生长锥萎缩^[2], 可能与神经元死亡和再生有关^[3,4]。因此, 寻求可以提高 BDNF 内源性表达

及抑制 Sema 3A 内源性表达的途径尤其重要。本实验拟用大鼠大脑中动脉线栓法建立缺血模型, 采用免疫组织化学法观察 BDNF 和 Sema 3A 在大鼠局灶性脑缺血后表达的动态变化, 并观察葛根素对其的影响, 探讨 BDNF 和 Sema 3A 与脑缺血的关系及葛根素对缺血性脑损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 药物

葛根素由豆科葛属植物中提取, 成分为 4, 7-二羟基-8-β-D-葡萄糖基异黄酮, 分子式为 C₂₁H₂₀O₉, 其

[收稿日期] 2006-05-08

[修回日期] 2006-10-06

[作者简介] 李贯绯, 硕士, 主要从事脑血管疾病研究, E-mail 为 lgf1117@yahoo.com.cn。刘群, 博士研究生导师, 主要从事脑血管病与神经病理研究。齐中华, 硕士, 主要从事脑血管疾病研究。

原药由广州大日医药公司提供。

1.2 实验动物分组及模型制备

实验选用雄性 Wistar 大鼠, 鼠龄 3~4 个月, 体重 250~300 g, 随机分成正常对照组、假手术组、缺血组和治疗组。缺血组和治疗组又根据缺血时间不同, 分别分为缺血 6 h、1 天、3 天、5 天、7 天和 14 天亚组, 每组 6 只。治疗组在手术后腹腔注射葛根素 0.1 mg/(kg·d), 缺血组给予等量生理盐水代替。大鼠大脑中动脉闭塞模型参照 Zea Longa 等^[5]报道的方法并加以改进。

1.3 标本制作及免疫组织化学法

各组大鼠在观察行为学后, 用多聚甲醛进行灌注, 然后断头取脑。以视交叉及其后 4 mm 处两点冠状切片, 片厚 4 mm, 并固定, 然后常规脱水、透明、浸蜡、包埋, 进行免疫组织化学检测(ABC 法), 应用链霉素、抗生物素一过氧化物酶免疫组织化学染色超敏试剂盒。切片脱蜡入水, 经新鲜配置的 3% H₂O₂ 处理。滴加非免疫性动物血清封闭液, 室温下孵育 20 min。滴加一抗(兔抗鼠多克隆抗体, Boster 产品), 室温下孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次。然后滴加二抗(羊抗兔 IgG-过氧化物酶, Boster 产品), 室温下孵育 10 min。PBS 冲洗 3 次。DAB 显色。

1.4 图像分析及统计学处理

在显微镜下随机选不重叠的 5 个视野, 统计阳性细胞数量。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 脑源性神经营养因子的表达

BDNF 阳性神经元主要见于梗死灶周围皮质和海马区, 免疫阳性颗粒主要位于神经细胞胞质中, 胞质和突起被染成棕黄色, 胞核周围染色较浅, 胞核无

染色。自缺血 6 h 开始增多, 1 天达高峰, 缺血组 3 天达正常对照组水平, 治疗组 BDNF 阳性神经元较缺血组增多($P < 0.05$), 至 7 天达到对照组水平(表 1 和图 1)。

2.2 Sema 3A 的表达

Sema 3A 阳性神经元主要见于梗死灶周围的皮质, 海马区未见 Sema 3A 免疫阳性神经元, 免疫阳性颗粒在神经元的胞膜、胞质和轴突上均可见到。自缺血 6 h 开始增多, 1 天达高峰, 3 天达正常对照组水平, 治疗组 Sema 3A 阳性神经元较缺血组减少($P < 0.05$; 表 2 和图 2)。

表 1. 不同时间点脑源性神经营养因子、Semaphorin3A 免疫阳性表达细胞数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	脑源性神经营养因子	Semaphorin 3A
正常对照组	7.33 ± 1.26	7.13 ± 1.16
假手术组	7.34 ± 1.32	7.16 ± 1.12
缺血组 6 h	12.35 ± 1.36 ^c	20.35 ± 1.36 ^c
1 天	20.14 ± 2.98 ^c	21.54 ± 2.98 ^c
3 天	7.38 ± 1.28	7.18 ± 1.28
5 天	7.27 ± 1.68	7.17 ± 1.68
7 天	7.31 ± 1.01	7.11 ± 1.01
14 天	7.29 ± 0.85	7.13 ± 0.85
治疗组 6 h	15.05 ± 1.56 ^{ac}	17.34 ± 1.27 ^{ac}
1 天	23.35 ± 1.47 ^{ac}	18.03 ± 1.16 ^{ac}
3 天	12.05 ± 1.69 ^{ab}	7.15 ± 1.68
5 天	11.35 ± 1.27 ^{ab}	7.16 ± 1.38
7 天	7.33 ± 1.80	7.13 ± 1.16
14 天	7.28 ± 1.26	7.11 ± 1.29

a 为 $P < 0.05$, 与缺血组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

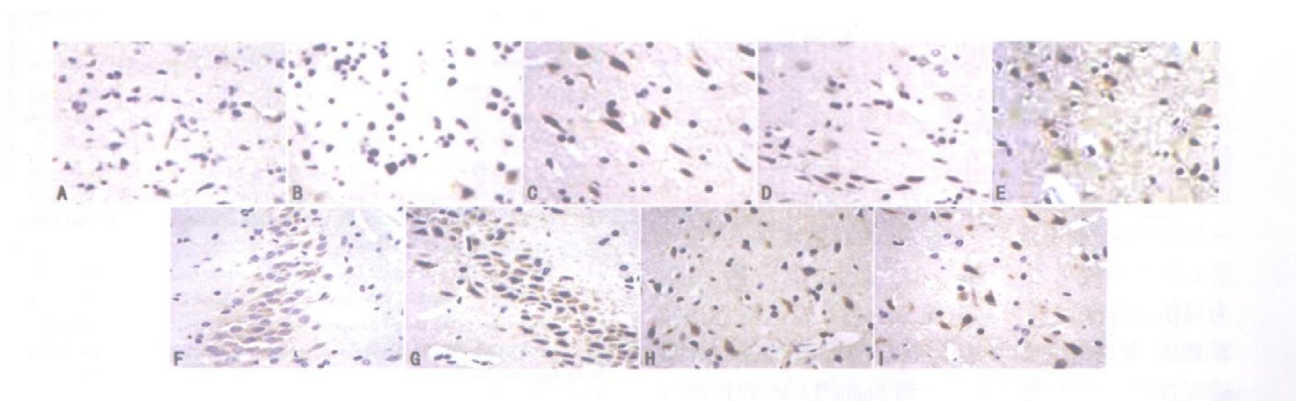


图 1. 脑源性神经营养因子免疫组织化学染色 (200×) A 为正常对照组, B 为缺血 6 h 皮质, C 为治疗 6 h 皮质, D 为缺血 1 天皮质, E 为治疗 1 天皮质, F 为缺血 1 天海马, G 治疗 1 天海马, H 为缺血 3 天皮质, I 为治疗 3 天皮质。

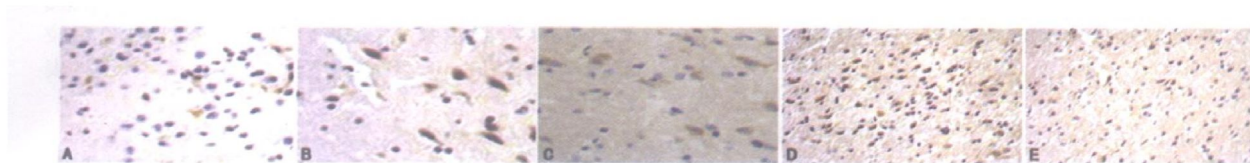


图 2. Sema 3A 免疫组织化学染色 (200×) A 为正常对照组, B 为缺血 6 h 皮质, C 为治疗 6 h 皮质, D 为缺血 1 天皮质, E 为治疗 1 天皮质。

3 讨论

BDNF 是由 Barde 等^[6]从猪脑中首先分离和纯化,可以维持感觉神经元、运动神经元、中脑多巴胺神经元及胆碱能神经元的存活。本研究发现,脑缺血后内源性 BDNF 出现短暂性表达增高,提示可能与抵抗脑缺血损害有关。BDNF 抵抗缺血性脑损伤的机制可能为: ①稳定细胞内钙离子浓度,减少兴奋性氨基酸引起的损伤; ②拮抗一氧化氮介导的细胞毒作用; ③增强抗氧化酶活性,减轻自由基损伤;

④抗细胞凋亡; ⑤增强蛋白激酶 C 活性; ⑥对损伤神经元还具有修复作用,并促进再生。然而,脑缺血后内源性 BDNF 的表达水平偏低,且持续时间亦较短,单纯内源性 BDNF 的上调不足以防治神经细胞死亡,而且由于 BDNF 是大分子蛋白质,不易通过血脑屏障等问题,限制了其使用。目前多将 BDNF 直接注入侧脑室或通过基因工程技术植入脑内表达来提高中枢 BDNF 的供给,其缺点是需采取侵害性给药途径。因此,寻求一条能促进 BDNF 内源性表达的途径尤为重要。通过本实验发现,应用葛根素后 BDNF 的表达时程延长,阳性神经元数量增多,提示葛根素作为一种小分子药物,可通过血脑屏障,可能通过促进 BDNF 的表达起到神经保护作用。

Sema 3A 是一种神经生长抑制因子,是最有效的抑制或排斥轴突生长的分子,属于 Semaphorins 家族^[8]。Sema 3A 可以特异性的引起轴突生长锥萎缩,阻止神经突起的分叉,影响神经突起的方向,阻止轴突进入一定的靶区,阻止轴突终末的形成,并抑制轴突延伸。因此,它在中枢神经系统的持续表达抑制了损伤后 Sema 3A 敏感性神经元的再生。本研究结果发现,脑缺血后 Sema 3A 的表达增加,而在正常对照组和假手术组 Sema 3A 仅有微弱表达,故认为损伤等外来因素可能诱导 Sema 3A 表达增加或重新表达,此时它可能具有抑制成年动物 Sema 3A 敏感性神经元再生的活性。推测 Sema 3A 的表达增加

一方面直接抑制或排斥轴突生长,构成胶质瘢痕分子性屏障;另一方面它可能调节星形胶质细胞的迁移、增殖和分化,促进胶质瘢痕形成,构成胶质瘢痕物理性屏障,胶质瘢痕阻碍新生纤维的通过,影响了中枢神经的再生,不过,它在脑缺血早期的短暂上调并不足以引起神经元的死亡,但它参与传递死亡信号,抑制神经元再生。从不同角度探讨 Sema 3A 与中枢神经系统再生障碍的关系,对深入研究脑缺血神经损伤修复及再生的病理生理机制以及治疗有着重要意义。本实验发现,应用葛根素后 Sema 3A 的表达下降,提示葛根素可能不仅通过上调 BDNF,还可以通过下调 Sema 3A 来促进缺血后神经元损伤修复及再生,因此应用葛根素治疗脑缺血神经损伤具有广阔的前景。关于葛根素如何影响 BDNF 和 Sema 3A 在脑缺血中表达的机制目前还不清楚。

总之,研究脑缺血损伤后 BDNF 和 Sema 3A 的动态改变,有助于对神经元修复再生机制的理解,为临床治疗缺血性脑损伤提供新的思路。如何寻求能提高 BDNF 内源性表达及降低 Sema 3A 表达的有效途径,则是今后需要进一步深入研究的重要课题。

[参考文献]

- [1] 李念金. 神经营养素的临床研究[J]. 中华神经医学杂志, 2006, 5 (7): 754-756
- [2] Dontchev VD, Letourneau PC. Pathways interact in regulating sensory neuronal growth cone motility[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2002, 22 (15): 6 659-669
- [3] Gagliardini V, Fankhauser C. Semaphorin 3A can induce death in sensory neurons[J]. *Mol Cell Neurosci*, 1999, 14: 301-316
- [4] Shirvan A, Ziv I, Fleminger G, Shina R, He Z, Brudo I, et al. Semaphorins as mediators of neuronal apoptosis[J]. *J Neurochem*, 1999, 73: 961-971
- [5] Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91
- [6] Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain[J]. *J EMBO*, 1982, 1: 549-553
- [7] Messersmith EK, Leonardo ED, Shatz CJ, Tessier-lavigne M, Goodman CS, Kolodin AL. Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord[J]. *Neuron*, 1995, 14: 949-959
- [8] Luo Y, Raible D, Raper JA. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones[J]. *Cell*, 1993, 75: 217-227

(此文编辑 文玉珊)