

· 实验研究 ·

碱性成纤维生长因子对 HIBD 新生大鼠脑组织 nestin 表达的影响

彭好¹, 周宏², 熊英¹

(1. 四川大学华西第二医院儿科, 四川 成都 610041; 2. 自贡市第四人民医院儿科, 四川 自贡 643000)

[摘要] 目的 碱性成纤维生长因子(bFGF)对缺氧缺血脑损伤(HIBD)的重要修复作用已引起国内外学者普遍关注,但 bFGF 对于增强脑损伤后神经再生和修复能力的机制尚不完全清楚。巢蛋白(nestin)是一种中间丝蛋白,是胚胎神经干细胞的特征性标记,神经系统发生病变或损伤引起再生时可诱导其再表达。该研究旨在探讨外源性 bFGF 对 HIBD 新生大鼠脑组织 nestin 表达的影响及 bFGF 对新生大鼠 HIBD 后的神经修复机制,为临床应用 bFGF 奠定理论基础。方法 84 只新生 7 日龄 SD 大鼠,分为 3 组,每组 28 只:①假手术组;②缺氧缺血组;③ bFGF 干预组。结扎大鼠左侧颈总动脉和行 8% 低氧暴露制备新生大鼠 HIBD 模型。假手术组仅游离左颈总动脉但不结扎和行缺氧处理。bFGF 干预组大鼠缺氧缺血后立即给予 bFGF 腹腔注射,4 000 U/kg,每天 1 次。每组再随机分为缺氧缺血后 3, 12, 24 h, 3, 7, 14 d 组处死,每组 4 只。采用 SABC 免疫组化方法检测 nestin 蛋白的表达。结果 假手术组 nestin 蛋白在海马、室管膜弱表达,在皮质不表达。nestin 蛋白在大鼠缺氧缺血脑损伤后的表达增强, nestin 蛋白 7 d 达高峰。经 bFGF 干预后 nestin 蛋白表达较缺氧缺血组增高,缺氧缺血后 1 d 时有统计学差异,持续至 14 d ($P < 0.05$)。结论 外源性 bFGF 可以明显增加新生大鼠缺氧缺血脑损伤后 nestin 蛋白表达,在缺氧缺血脑损伤后的神经元再生与修复中发挥一定保护作用。 [中国当代儿科杂志, 2006, 8 (3): 235-238]

[关键词] 缺氧缺血;脑损伤;碱性成纤维生长因子;nestin;新生大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)03-0235-04

Effect of basic fibroblast growth factor on nestin expression in neonatal rats following hypoxic-ischemic brain damage

PENG Hao, ZHOU Hong, XIONG Ying. Department of Pediatrics, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Email: hao_peng126@126.com)

Abstract: Objective Basic fibroblast growth factor (bFGF) might have a role in the restoration and regeneration of injured neurons following hypoxic-ischemic brain damage (HIBD), but its mechanism has not been fully elucidated. Nestin is an intermediate filament protein expressed in dividing cells during the early stages of CNS development, but it can be reinduced in adults during regeneration of injured neurons after CNS injury. This study investigated the effect of exogenous bFGF on nestin expression in neonatal rats following hypoxia-ischemia (HI) and to explore the possible mechanism. **Methods** Eighty-four 7-day-old SD rats were randomly assigned into a Sham-operation group, a HIBD group and a bFGF intervention group ($n = 28$ each). HIBD was induced by ligation of the left carotid artery along with 8% oxygen exposure in neonatal rats from the latter two groups. The Sham-operation group was not subjected to HI. The bFGF intervention group received an intraperitoneal injection of bFGF daily (4 000 U/kg). Each group was randomly subdivided into groups sacrificed immediately, at 3, 12 and 24 hrs and 3, 7 and 14 days after HI ($n = 4$). The expression of nestin in the cerebral cortex, hippocampus and extraventricular zone was examined with immunohistochemical staining and image quantitative analysis. **Results** Nestin was weakly expressed in the hippocampus and extraventricular zone and not expressed in the cortex in the Sham-operation group. The nestin in the cortex, hippocampus and extraventricular zone was significantly increased after HIBD, peaking at 7 days. bFGF treatment increased the nestin expression in the cortex, hippocampus and extraventricular zone and statistical differences were observed from 1 to 14 days after HI when compared with the untreated HIBD group. **Conclusions** Exogenous bFGF can up-regulate the nestin expression in neonatal rats following HIBD. The effects of restoration and regeneration of bFGF on injured neurons may be associated with increased nestin expression in neonatal rats. [Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8 (3): 235-238]

[收稿日期] 2005-11-30; [修回日期] 2006-02-09

[作者简介] 彭好,女,硕士,主治医师。主攻方向:新生儿系统疾病。现在川北医学院附属医院儿科。

[通讯作者] 熊英,女,教授,四川大学华西第二医院儿科。邮编:610041。

Key words: Hypoxia-ischemia brain damage; Basic fibroblast growth factor; Nestin; Neonatal rats

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)具有较高的病死率和神经系统后遗症发生率。目前对HIBD的治疗强调完善的支持疗法和积极的对症处理,迄今为止尚无特效治疗方法。大量研究提示神经营养因子可能与中枢神经系统(central nervous system, CNS)创伤后的神经功能恢复有关,并证明碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)参与正常脑发育的调节、促进神经细胞的再生和分化。而作为神经干细胞特异性抗原的巢蛋白(nestin)在神经系统发生病变或损伤引起再生时存在着广泛的表达,因此nestin已作为神经系统发生病变或损伤引起再生时一种研究手段^[1]。本研究在建立HIBD动物模型的基础上,探讨缺氧缺血脑损伤后nestin表达的变化及bFGF干预对其表达的影响,探讨bFGF促神经再生机制,为临床应用bFGF治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

新生7日龄SD大鼠,性别不限,体重12~16 g,共84只,由华西医科大学动物实验中心提供;自制常压缺氧舱(40 cm×50 cm×60 cm,有2个2 cm×2 cm小孔与外界相通,钠石灰吸收舱内水分和CO₂);婴儿暖箱;氮氧混合气(8%氧气);兔抗鼠nestin多克隆抗体为一抗(博士德公司提供),bFGF(广州暨南大学生物工程研究所提供)。

1.2 方法

1.2.1 新生大鼠HIBD模型制备 结扎大鼠左侧颈总动脉,术后2 h置入自制常压缺氧舱,该容器置于婴儿暖箱中,舱温(36±1)℃,以2 L/min速度输入含8%氧气和92%氮气混合气体,持续2 h^[2]。假手术组仅游离左颈总动脉但不结扎或行缺氧处理。

1.2.2 治疗观察 84只大鼠随机分bFGF干预组28只、缺氧缺血组28只及假手术组28只。28只bFGF干预组鼠缺氧缺血后立即给予bFGF腹腔注射,4 000 U/kg,每天1次;缺氧缺血组28只鼠缺氧缺血后立即腹腔注射等量生理盐水做对照。每组再随机分为缺氧缺血后0, 3, 12, 24 h; 3, 7, 14 d组处死,每组4只。

1.2.3 标本采集和组织切片的制备 各组动物在规定的时间取材。将大鼠用乙醚深度麻醉后,

10 mL注射器插入左心室,同时剪开右心房进行灌注,灌注速度先快后慢。先用生理盐水约50 mL,待流出液变清后,再用4%多聚甲醛(0.1 MPBS溶液)30~50 mL缓慢灌注。随后迅速断头取出脑组织,4%多聚甲醛0.1 MPBS中浸泡24 h或过夜后组织脱水石蜡包埋,进行石蜡切片。各组织均以视交叉和乳头体中部为切面行冠状面连续切片,切片厚度6 μm。

1.2.4 免疫组织化学染色 以1:200稀释的兔抗鼠nestin多克隆抗体为一抗,按免疫组织化学SABC(博士德公司提供)染色方法进行染色。常规做苏木素-伊红染色。

1.2.5 结果判定 选取病变常见部位—脑皮质和海马、室管膜下区,切片在统一放大倍数(10×40)下,随机选5个视野,计平均阳性细胞数。

1.3 统计学处理

每时间点阳性细胞数用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各时点不同干预组之间的比较采用单因素方差分析,均数间的两两比较采用 q 检验。数据均采用SPSS 11.5统计软件进行分析。

2 结果

2.1 苏木素-伊红染色

缺氧缺血组缺氧缺血侧脑组织水肿明显,在缺氧缺血后1 d达到高峰,3 d时有梗死灶形成。梗死灶内局部神经元坏死、消失,胶质细胞增生,炎性细胞浸润。缺氧缺血侧海马区细胞排列紊乱,可见细胞丢失、死亡。部分大鼠整个左半球均有改变。bFGF干预组在缺氧缺血后早期的组织学表现同HIBD处理组,损伤后7 d和14 d组仅见部分神经细胞空泡样变,间质疏松明显减轻。

2.2 nestin免疫细胞化学

正常7日龄大鼠nestin阳性细胞主要位于室管膜下区及海马齿状回,其他部位未见阳性细胞。缺氧缺血脑损伤后随着时间的推移nestin阳性细胞在室管膜下及海马反应性增加,海马CA1, CA2, CA3区均有表达。同时在缺氧缺血侧皮质区域也可见到大量的nestin阳性细胞,表现为星形胶质细胞的形态特征,胞体肥大,胞浆丰富,缺氧缺血后7 d最明显,14 d降低。缺氧缺血对侧亦有nestin阳性细胞,但少于缺血侧。缺氧缺血组皮质nestin表达与假手术组相比12, 24, 72 h; 7 d均有统计学差异

($P < 0.05$)。海马、室膜下区与假手术组相比 24、72 h, 7 d 有统计学差异($P < 0.05$)。bFGF 干预组 1 ~ 14 d nestin 阳性细胞在缺氧缺血侧室管膜下及海马组织、皮质区域更加明显,比同时相点的缺氧缺血组有明显增加($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 bFGF 干预组和缺氧缺血组不同时间、不同部位 nestin 阳性细胞数的变化 (CN/mm², $\bar{x} \pm s$)

时间	缺氧缺血组			bFGF 干预组		
	皮质	海马	室膜下	皮质	海马	室膜下
即刻	2.70 ± 1.17	12.00 ± 1.59	11.85 ± 1.73	2.75 ± 0.44	11.95 ± 1.73	11.9 ± 1.94
3 h	3.95 ± 0.53	12.15 ± 2.11	12.25 ± 0.81	4.40 ± 1.76	13.30 ± 2.00	13.65 ± 2.28
12 h	13.30 ± 1.76	13.80 ± 1.10	14.10 ± 3.08	15.10 ± 0.87	15.15 ± 1.84	15.20 ± 1.83
24 h	37.85 ± 1.15	37.90 ± 5.68	35.50 ± 7.22	51.05 ± 1.65 ^a	50.40 ± 8.33 ^a	52.65 ± 9.50 ^a
72 h	61.89 ± 3.97	67.35 ± 6.80	62.75 ± 7.24	74.97 ± 4.98 ^a	83.70 ± 7.81 ^a	83.25 ± 7.40 ^a
7 d	88.50 ± 3.45	100.65 ± 8.10	96.75 ± 5.75	96.69 ± 6.71 ^a	107.70 ± 7.10 ^a	104.40 ± 7.40 ^a
14 d	5.20 ± 1.10	13.10 ± 0.48	15.25 ± 2.10	37.45 ± 3.38 ^a	26.45 ± 4.70 ^a	35.10 ± 3.50 ^a

a 与缺氧缺血组比较, $P < 0.05$

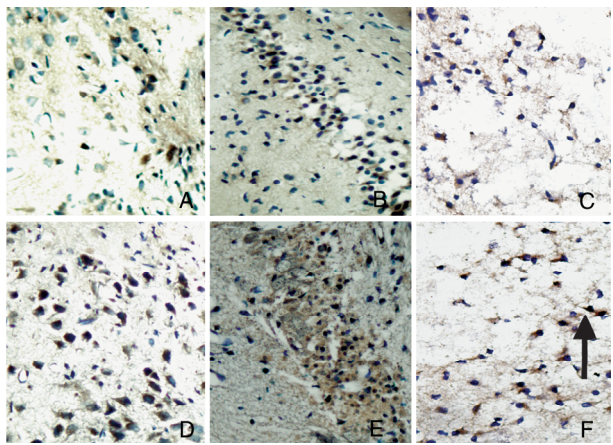


图 1 缺氧缺血组与 bFGF 干预组 7 d 新生大鼠脑组织室管膜、海马、皮质 nestin 表达 (×40) A~C: 缺氧缺血 7 d 室管膜、海马、皮质 nestin 表达; D: bFGF 干预 7 d 组室管膜 nestin 表达, nestin 阳性细胞 (DAB 黄色) 较缺氧缺血组明显增加; E: bFGF 干预组 7 d 海马 nestin 表达, nestin 阳性细胞 (DAB 黄色) 较缺氧缺血组明显增加; F: bFGF 干预组 7 d 皮质 nestin 表达, nestin 阳性细胞 (DAB 黄色) 较缺氧缺血组明显增加, 部分细胞呈典型星状 (箭头所示)。

3 讨论

巢蛋白 (nestin) 是一种新近发现的中间丝蛋白, 是胚胎神经干细胞的特征性标记, 在人胎脑中已发现其表达于室管膜下区和海马^[3], 出生后表达很快降低^[4], 但在脑室管膜下区和海马齿状回仍有表达^[5]。

本实验发现, 正常对照组的 nestin 阳性细胞主要集中在室管膜下区、海马很小的一片区域, 且染色较淡, 胞体较小。当新生大鼠缺氧缺血后, 脑内很多区域表达 nestin。除室管膜下区和室管膜、海马出现 nestin 阳性表达增加外, 在缺血侧大脑皮质也出

现广泛表达。健侧脑组织也可见到阳性细胞, 但少于缺血侧。表达高峰期为缺氧缺血后 7 d, 14 d 已降低。表达的细胞类型多为星形胶质细胞, 其表达模式与脑损伤后胶质细胞反应很相似。由此推测 HIBD 时诱导 nestin 表达的机制可能与诱导胶质细胞反应性增生相似, 胶质细胞反应可能参与了 HIBD 时 nestin 表达。同时室管膜下区、海马正常时存在神经干细胞, 缺血脑损伤可诱导神经干细胞的原位增殖^[6], 因此神经干细胞的原位增殖可能参与了 HIBD 时室管膜下区、海马 nestin 表达。本实验发现缺氧缺血组皮质 nestin 表达增加的时间早于室管膜下区、海马。由此推测 HIBD 时不同部位 nestin 的表达机制不完全相同, HIBD 时 nestin 的表达可能是神经干细胞增殖及胶质细胞反应共同作用的结果。

碱性成纤维生长因子 (bFGF) 作为最重要的神经营养因子和有丝分裂原, 能促进神经前体细胞增殖、分裂, 能直接营养神经元、神经胶质细胞。生理情况下, 正常脑组织有基础性 bFGF 表达, 脑损伤时能刺激内源性 bFGF 分泌增加, 从而促进神经系统损伤的再生和修复。本实验发现 bFGF 处理组在脑缺氧缺血后 1 ~ 14 d 的 nestin 阳性细胞比非 bFGF 处理组明显增多, 且有统计学意义 ($P < 0.05$), 而其胞体的大小、形态却没有变化, 说明 bFGF 能够明显促进 HIBD 时 nestin 阳性细胞数量的增加。由于神经干细胞增殖及胶质细胞反应参与了 HIBD 时 nestin 的表达, 而 bFGF 是神经干细胞增殖强有力的丝裂原^[7], 刺激神经干细胞增殖呈浓度依赖性^[8]。除损伤的原位给予外源性 bFGF 有显著效外, Black 等^[9,10]报道幼鼠皮下注射 bFGF 能刺激包括海马神经生发区域神经干细胞增殖, 若注入 bFGF 的中和

抗体,则可使神经生发区域的 DNA 合成降低 50%。因此 bFGF 促进 HIBD 时海马、室管膜下区 nestin 阳性细胞数量增加的机制推测可能与促使神经干细胞存活、增殖并分化有关。同时 bFGF 又是胶质细胞的有丝分裂原。脑缺血后 bFGF 系统的活化能够迅速促进星形胶质细胞肥大、增生与迁移,形成反应性星形胶质细胞。而 nestin 蛋白在病理条件下存在于反应型星形胶质细胞^[11],是反映星形胶质细胞激活的敏感标志。因此 bFGF 可通过促进星形胶质细胞肥大、增生与迁移,形成反应性星形胶质细胞从而促进 nestin 阳性细胞数量的增加。总之,bFGF 无论是通过促进神经干细胞的增殖、分化,还是促进胶质细胞反应都能促进缺氧缺血脑损伤后神经系统的修复与再生。

[参 考 文 献]

- [1] Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organization[J]. *Histol Histopathol*, 2005, 20(2): 665-671.
- [2] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic ischemic brain damage in the rat[J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2): 131-141.
- [3] 周细中,封志纯,王斌,安舰,李进. 人胎脑 Nestin 阳性神经元的发育[J]. *中国当代儿科杂志*, 2003, 5(4): 311-313.

- [4] Wei Lc, Shi M, Chen LW, Cao R, Zhang P, Chan YS. Nestin containing cells express glial fibrillary acidic protein in the proliferative regions of central nervous system of postnatal developing and adult mice[J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, 139(1): 9-17.
- [5] Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, Chopp M. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia[J]. *Neuroscience*, 2001, 105(1): 33-41.
- [6] Kokaia Z, Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults[J]. *Curr Neurobiol*, 2003, 13(1): 127-132.
- [7] Emsley JG, Mitchell BD, Kemkemann G, Macklis JD. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells[J]. *Prog Neurobiol*, 2005, 75(5): 321-341.
- [8] 刘媛,龙在云,曾琳,伍亚民,陈恒胜,廖维宏. 不同培养条件对神经干细胞分化的影响[J]. *中国临床康复*, 2003, 7(31): 4228-4230.
- [9] Tao Y, Black IB, Diccico-Bloom E. Neurogenesis in neonatal rat brain is regulated by peripheral injection of basic fibroblast growth factor (bFGF)[J]. *J Comp Neurol*, 1996, 376(4): 653-663.
- [10] Cheng Y, Black IB, DiCicco-Bloom E. Hippocampal granule neuron production and population size are regulated by levels of bFGF[J]. *Eur J Neurosci*, 2002, 15(1): 3-12.
- [11] Zhang Q, Qin H, Lang B, Liu H, Han H, Ju G. Different regions of the mouse nestin enhancer may function differentially in nestin expression in an NSC-like cell line and astrocytes[J]. *Neurosci Lett*, 2005, 379(2): 90-95.

(本文编辑:吉耕中)