

脑室周围白质软化新生大鼠脑组织 ephrin-B3 表达及神经细胞凋亡

肖琴, 陈娟, 吴艳秋

(四川大学华西第二医院儿科, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 建立新生大鼠脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL)模型,探讨PVL新生大鼠脑组织 ephrin-B3 mRNA 表达以及神经元凋亡的变化及意义。**方法** 采用2日龄SD清洁级大鼠,通过结扎右侧颈总动脉并吸入6%氧气4h建立PVL模型,分别于模型后0,8,24,48,72h,7d处死,同时设立相应假手术对照组。脑组织苏木精-伊红染色检测病理变化;DAPI染色检测细胞凋亡,荧光定量RT-PCR检测 ephrin-B3 mRNA 表达。**结果** 新生大鼠PVL后,脑组织 ephrin-B3 mRNA 在缺氧缺血后表达增加,与对照组比较,在8,24,48,72h和7d有统计学意义($P < 0.05$),脑组织细胞凋亡在缺氧缺血后明显增加,与对照组相比,在8,24,48,72h有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 新生大鼠PVL时,脑组织 ephrin-B3 mRNA 表达显著增加,脑组织细胞凋亡明显增加, ephrin-B3 可能是神经细胞凋亡的重要因素之一。 [中国当代儿科杂志,2007,9(4):321-323]

[关键词] 脑室周围白质软化;ephrin-B3;凋亡;新生大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)04-0321-03

Expression of ephrin-B3 mRNA and cellular apoptosis in the brain of neonatal rats with periventricular leukomalacia

XIAO Qin, CHEN Juan, WU Yan-Qiu. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Chen J, Email: chenjuan2000@163.com)

Abstract: Objective To study the changes of ephrin-B3 mRNA expression and cellular apoptosis in the brain of neonatal rats with periventricular leukomalacia (PVL) and to explore the possible role of ephrin-B3 in the pathogenesis of PVL. **Methods** Two-day-old SD rats were randomly assigned to two groups: PVL and control. PVL model was prepared by right common carotid artery ligation followed by 4-hr 6% oxygen exposure. The control group, without ligation of the artery and hypoxia treatment, was sham operated. The rats were then sacrificed and brain tissues were collected at 0, 8, 24, 48 and 72 hrs and at 7 days of hypoxic-ischemia (HI). Hematoxylin and eosin staining was used for pathologic studies. Real time RT-PCR was applied to detect brain ephrin-B3 mRNA expression. DAPI staining was applied to detect neuronal apoptosis. **Results** The brain ephrin-B3 mRNA expression increased significantly in the PVL group at 8, 24, 48 and 72 hrs and at 7 days of HI compared with that of the control group ($P < 0.05$). The apoptotic cells in the brain of the PVL group were significantly more than that of the control group at 8, 24, 48 and 72 hrs of HI ($P < 0.05$). **Conclusions** ephrin-B3 mRNA expression and cellular apoptosis in the brain increased significantly in neonatal rats with PVL, which suggests that ephrin-B3 may participate in the pathogenesis of PVL in neonatal rats.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(4):321-323]

Key words: Periventricular leukomalacia; ephrin-B3; Apoptosis; Neonatal rats

脑室周围白质软化(PVL)是早产儿常见的脑损伤类型,随着早产儿救治率及存活率的大大提高,PVL的发生率也明显升高,它可以导致神经系统严重后遗症。髓鞘相关抑制因子(myelin-associated inhibitor factors, MAIFs)的发现及其作用机制的研究成为PVL损伤后神经再生研究的热点。尤其是它的一个新成员—ephrin-B3的重要作用成为目前

关注的焦点,有研究^[1]发现 ephrin-B3 表达于髓鞘少突胶质细胞,其抑制活性等同于P75介导的Nogo-66, MAG, OMgp的活性,以 ephrin-B3 为切入点,对于中枢神经系统(CNS)再生缺失潜在机制的理解具有重要的意义。本研究在建立未成熟大鼠缺氧缺血性脑损伤(PVL)模型,采用荧光定量RT-PCR和DAPI荧光染色的方法检测对照组和实验组不同时

[收稿日期]2007-05-07; [修回日期]2007-06-15

[作者简介]肖琴,硕士研究生。主攻方向:新生儿脑损伤。

[通讯作者]陈娟,博士,副教授,四川大学华西第二医院新生儿科,邮编610041。

间点脑组织 ephrin-B3 mRNA 的表达变化,以及神经元细胞凋亡的变化,探讨两者在 PVL 中的作用及两者之间可能的关系,为早产儿 PVL 损伤抑制机制的研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

2 日龄 SD 大鼠由四川大学实验动物中心提供, ephrin-B3 引物、GAPDH 引物,购自上海生物工程有 限公司, Trizol, 购自美国 MRC 公司, Taq DNA 聚合 酶购自立陶宛 MBI 公司, DAPI 购自北京中杉金桥 生物技术有限公司。

1.2 实验动物及模型制作

208 只 2 日龄 SD 大鼠乳鼠,分为 2 组,实验组 (PVL 组) 110 只,对照组(假手术组) 98 只,缺氧缺血后实验组死亡 14 只,对照组死亡 2 只。采用 Back 等^[2]方法建立 PVL 模型。分别于 0, 8, 24, 48, 72 h, 7 d 处死(每组各时点 8 只),苏木精-伊红染色观察新生大鼠 PVL 时脑组织病理学改变。

1.3 4,6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 染色检测细胞凋亡

DAPI 染色检测细胞凋亡是最近报道的一种简 易可靠方法^[3]。脑组织切片常规脱蜡至水, DAPI 染 色液覆盖切片组织标本,常温下放置 30 min。以 PBS 液冲洗切片 3 次,每次 5 min。荧光显微镜下 (×400) 观察计数并采图,随机选择 10 个视野,分 别计数 100 个细胞中凋亡细胞的百分率。

1.4 荧光定量 RT-PCR 检测 ephrin-B3 mRNA

ephrin-B3 引物设计 (146bp): ephrin-B3F: 5'- ATGAAGGTGCTTCTGCGAGT-3'; ephrin-B3R: 5'-CT- GTTGGGCTCACCTGCTAT-3'。

以 GAPDH 作标准校正,计算产物相对量。 mRNA 的相对含量根据公式 $Fold\ change = 2^{-\Delta(\Delta Ct)}$, $\Delta Ct = Ct(target) - Ct(GAPDH)$, $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct(treated) - \Delta Ct(untreated)$ 计算。操作按照试剂盒说 明书进行。

1.5 统计学分析

凋亡检测结果用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采 用 SPSS11.0 统计软件,采用单因素方差分析,成组 设计的两样本均数比较的 *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠脑组织病理学改变

苏木精-伊红染色光学显微镜下发现:对照组纹

状体细胞排列有序、胞核大、胞浆少,实验组缺氧缺血 8 h 可见纹状体内细胞胞体肿胀、细胞稀疏、间隙 增宽(见图 1)。

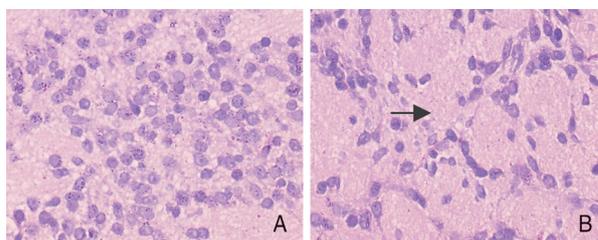


图 1 两组脑组织光镜下病理学改变(苏木精-伊红染色 ×400)。A: 对照组 8 h 纹状体排列整齐,胞核大,胞浆少;B: 实验组 8 h 纹状体细胞胞体肿胀,细胞稀少,间隙增宽。

2.2 各组大鼠不同时间点细胞凋亡情况

活细胞为弥散均匀蓝色荧光,凋亡细胞核及胞 浆内出现浓染致密的颗粒块状亮蓝色荧光(图 2)。 与对照组相比,实验组胼胝体和纹状体的凋亡细胞 均在缺氧缺血后 8 h 开始增加($P < 0.05$), 48 h 达 到高峰,72 h 开始降低,7 d 与对照组相比差异无统 计学意义($P > 0.05$), (见图 3)。

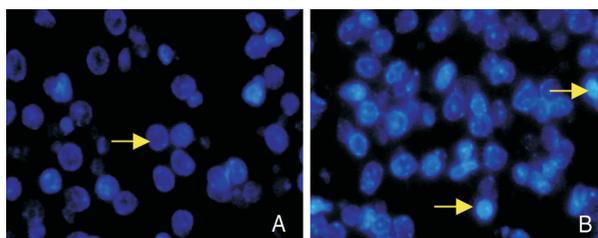


图 2 两组脑组织细胞凋亡情况(DAPI 染色 ×400)。A: 对照组细胞凋亡,细胞呈均匀蓝色荧光,胞核、胞浆有浓染的颗粒 块,箭头所指为活细胞;B: 实验组细胞凋亡与对照组比较,凋亡细胞 明显增加,箭头所指为凋亡细胞。

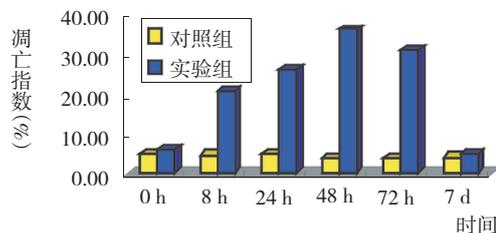


图 3 两组不同时间点凋亡指数变化

2.3 各组大鼠不同时间点 ephrin-B3 mRNA 水平

对照组和实验组 ephrin-B3 mRNA 扩增产物的 相对含量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 以中位数表示。结果显示,实验组 0, 8, 24, 48, 72 h 和 7 d ephrin-B3 mRNA 相对含量均 较对照组升高,其中 8, 24, 48, 72 h 和 7 d, 均 $P < 0.05$, 差异有统计学意义,而 0 h 与对照组之间无统 计学差异($P > 0.05$)。实验组各组间 ephrin-B3 mRNA

NA 相对含量两两比较均 $P < 0.05$, 差异有统计学意义。见图 4。

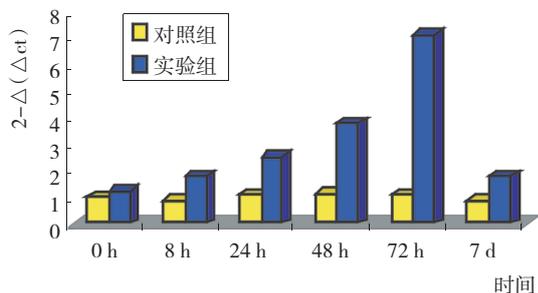


图 4 两组 ephrin-B3 mRNA 相对含量表达

3 讨论

早产儿脑损伤主要为脑白质损伤,而 PVL 是早产儿最常见的脑白质损伤形式。病理改变表现为:局灶性脑室周围白质囊性变、凝固性坏死或弥漫性脑白质少突胶质细胞(oligodendrocyte, OL)凋亡、坏死^[4,5]。本实验苏木精-伊红染色发现,实验组缺氧缺血侧脑组织在 8 h 后出现病理学改变,纹状体内细胞胞体肿胀、细胞稀疏、间隙增宽,病变程度随时间加重,48 h 纹状体内细胞排列紊乱、结构不清尤为严重,提示不成熟脑白质对缺氧缺血具有易损性。未成熟的脑细胞较成熟脑细胞更易于凋亡,在不成熟脑白质中仅有凋亡性神经元死亡^[6],本实验缺氧缺血后 8 h,病变侧脑白质可见大量凋亡细胞,以纹状体、胼胝体较为明显,与对照组相比,凋亡指数明显增大,缺氧缺血后 48 h,实验组凋亡指数达到最高,然后逐渐减低,至缺氧缺血后 7 d 接近对照组水平,这与文献报道^[6]的缺氧缺血后 48 h 是少突胶质细胞凋亡高峰期一致,并且与本实验苏木精-伊红染色所示病理改变的严重程度相对应。因此细胞凋亡是新生大鼠脑白质损伤的重要机制之一。

ephrin-B3 是 Eph 家族蛋白成员之一,它是一种轴突导向因子,在最近的研究中, Benson 等^[1]提出 ephrin-B3 也是一种髓鞘相关抑制因子(MAIFs),仅表达限于中枢神经系统髓鞘少突胶质细胞,出生后 5 d 开始小鼠 ephrin-B3 在脊髓和胼胝体的白质表达增加,本实验通过荧光定量 RT-PCR 测定新生大鼠脑白质 ephrin-B3 mRNA 的表达变化,发现 ephrin-B3 mRNA 在正常新生鼠脑组织中表达量极少,这与文献报道一致,但从生后 2 d 到 9 d, ephrin-B3 mRNA 表达无明显增加趋势,这与文献报道不一致,原因可能为:①实验动物不同:本实验以新生 2 日龄大鼠为研究对象,而文献报道是以新生小鼠为研究对象;②检测方法不同:本实验采用的是荧光定量

RT-PCR 这样一种半定量的方式对 ephrin-B3 mRNA 进行检测,而文献报道采用的是形态学的方法:组织切片进行 X 半乳糖染色后镜下观察 ephrin-B3 的表达情况。

有研究提出^[1]: ephrin-B3 对 Nogo, MAG, OMgp, p75 敲除小鼠的皮质脊髓束再生抑制发挥作用可能是迄今为止未被发现的一个重要机制。Yiu 等^[7]发现 ephrin-B3 的受体之一: EphA4, 和 NgR1/p75 一样都可以激活小 GTP 酶 RhoA, 引起生长锥的塌陷,表明它们有共同的信号途径,也充分说明了 ephrin-B3 在中枢神经系统再生抑制中的重要作用。本实验采用荧光定量 RT-PCR 检测 ephrin-B3 mRNA 水平,结果显示 ephrin-B3 mRNA 在缺氧缺血后 8 h 开始升高,72 h 达到高峰,7 d 开始下降,但仍高于正常水平,可见 ephrin-B3 mRNA 在缺氧缺血脑损伤后高表达与脑损伤严重程度一致,提示 ephrin-B3 参与了 PVL 过程中神经细胞的损伤及再生抑制,和文献中报道 ephrin-B3 参与 CNS 轴突再生抑制的结论相符。本实验还表明,在缺氧缺血后实验组脑白质 ephrin-B3 mRNA 水平和细胞凋亡都呈现一个先上升后下降的趋势,提示 ephrin-B3 与细胞凋亡之间存在一定的关系,但二者高峰时间不一致,推测这除了 ephrin-B3 的作用,还存在其他凋亡相关因素,有待深入研究。

从本研究结果可以得到一个启示:如果能拮抗 ephrin-B3 的作用,则可以从减少生长锥塌陷和减少细胞凋亡两个方面减轻神经细胞损伤及促进再生,为 PVL 治疗奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] Benson MD, Romero MI, Lush ME, Lu QR, Henkemeyer M, Parada LF. ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth [J]. PNAS, 2005, 102(30): 10694-10699.
- [2] Back SA, Han BH, Luo NL, Chricton CA, Xanthoudakis S, Tam J, et al. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia [J]. Neuroscience, 2002, 22(2): 455-463.
- [3] 罗小丽,毛萌,周晖,孙小妹,李胜富. 脑源性神经营养因子对体外培养大鼠胚胎皮质神经元缺氧的保护作用[J]. 四川大学学报(医学版), 2006, 37(3): 373-377.
- [4] Cai Z, Pang Y, Xiao F, Rhodes PG. Chronic ischemia preferentially causes white matter injury in the neonatal rat brain [J]. Brain Res, 2001, 898(1): 126-135.
- [5] Tsuji M, Wilson MA, Lange MS, Johnston MV. Minocycline worsens hypoxic-ischemic brain injury in a neonatal mouse model [J]. Exp Neurol, 2004, 189(3): 58-65.
- [6] 陈惠金. 早产儿脑室周围白质软化的研究进展[J]. 实用儿科临床杂志, 2004, 19(2): 83-86.
- [7] Yiu G, He Z. Signaling mechanisms of the myelin inhibitors of axon regeneration [J]. Curr Opin Neurobiol, 2003, 13(5): 545-551.

(本文编辑:吉耕中)