

# 三七三醇皂苷对局灶性脑缺血再灌注大鼠细胞增殖的影响

Effect of PTS on Expression of Cell Proliferation Following Focal Cerebral Ischemia - reperfusion in Rats

胡晓松<sup>1</sup>, 周德明<sup>1</sup>, 周东<sup>2</sup>, 杨开明<sup>1</sup>, 梅妍<sup>1</sup>, 周鸿鹰<sup>1</sup>

HU XIAO - Song<sup>1</sup>, ZHOU De - ming<sup>1</sup>, ZhOU Dong<sup>2</sup> et al.

(1. 四川大学华西医学中心人体解剖学教研室, 四川成都 610041; 2. 四川大学华西医院神经内科, 四川成都 610041)

(1. Department of Anatomy, West China School of Preclinical and Forensic medicine, Sichuan University, Chengdu 610041,

2. Department of Neurology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**摘要:** 目的: 了解局灶性脑缺血再灌注后梗死区周围细胞增殖的动态变化, 以及三七三醇皂苷 (PTS) 对其表达的影响。方法: 采用改良的线栓法制备大鼠中动脉阻塞 (MCAO) 2h、不同再灌注时间 (3d、7d、14d、28d) 的大鼠短暂局灶性脑缺血 (transient focal cerebral ischemia) 模型。应用 5 - 溴脱氧尿嘧啶 (5 - bromodeoxyuridine, Brdu) 和 Brdu/Nestin 免疫双标记法观察再灌注损伤后 3、7、14、28d 时大鼠神经前体细胞的增殖情况。结果: 脑缺血再灌注后 14d 细胞增殖水平达到峰值, 至再灌注 28d 细胞增殖水平已明显回落, 但仍较正常水平高。PTS 组细胞增殖水平于再灌注后 7d~28d 均较相同时间段对照组增强 ( $P < 0.05$ )。再灌注 7、14d, PTS 组 Brdu + /Nestin 阳性细胞比例高于 N. S 组 ( $P < 0.05$ )。结论: PTS 可促进缺血再灌注后细胞的增殖水平。

**关键词:** 三七三醇皂苷; 增殖; 缺血再灌注; 5 - 溴脱氧尿苷; 巢蛋白

[中图分类号] R28; R972

[文献标识码] A

**Abstract:** Objective: To explore the change of cell proliferation and the effect of PTS on it after focal ischemia reperfusion around the infarct area. Method: The model of acute reperfusion injury after cerebral ischemia in rat was made by middle cerebral artery occlusion. All animals were allowed 2h ischemia and sacrificed after different durations of reperfusion (3, 7, 14, 28d). Bromodeoxyuridine (Brdu) and the double - label immunohistochemical method with Brdu and Nestin were used to observe the change of cell proliferation in the adult rat brain. Results: The level of cell proliferation peaked at 14d after middle cerebral artery occlusion (MCAO) reperfusion, and decreased obviously but higher than that of normal at 28d. In contrast, the level of cell proliferation in the PTS groups up - regulated as compared with the controls ( $P < 0.05$ ) from 7 to 28d after reperfusion. The ratio of Brdu - labeling Nestin positive cells increased remarkably at 7, 14d after reperfusion. Conclusion: PTS could enhance the level of cell proliferation after MCAO reperfusion.

**Key Words:** PTS; Proliferation; Ischemia - Reperfusion; Brdu; Nestin

(Received date: 2004 - 02 - 24)

许多研究表明, 在成年哺乳动物包括人的中枢神经系统的某些部位存在神经干细胞, 它们在一定的生理和病理条件下可以发生增殖, 并能分化成神经元和胶质细胞, 这显示了中枢神经系统具有自我修复的潜能。脑缺血是引起神经功能障碍的常见疾病, 因此研究脑缺血后体内神经干细胞的反应, 具有重要的临床意义。近年来, 中药在脑缺血治疗中的作用逐渐得到重视, 三七为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 的干燥根, 是我国特产的珍贵药材, 具有散瘀止血、消肿定痛的功效。目前临床用三七有效成份治疗脑血管意外后遗症已取得一些疗效<sup>[1,2]</sup>; 三七三醇皂苷 (PTS) 主要活性成份人参三醇皂苷 Rg1 的含量达 60% 以上, Rg1、R1、Re 三者的含量约达 80%。本实验应用 Brdu/Nestin 免疫双标记法, 观察了大鼠脑缺血再灌注损伤后不同时段梗死区周围的增殖细胞的来源和分布情况及 PTS 对其的影响, 现报道如下。

## 1 材料与与方法

**1.1 动物模型制备及分组** 健康雄性 SD 大鼠, 体重 250~300g, 由四川大学实验动物中心提供。采用改良的线栓法

制备动物脑缺血再灌注模型。大鼠术前 12h 禁食不禁水, 以 5% 水合氯醛腹腔内注射麻醉 (6ml/kg), 置仰卧位, 于颈部行长约 25.0mm 常规纵行切口。暴露并钝性游离右侧颈总动脉 (CCA)、颈内动脉 (ICA) 及颈外动脉 (ECA), 结扎 CCA 近心端、颈外动脉近分叉部及颈内动脉分支翼腭动脉 (PPA)。在 CCA 上距其末端约 3.0mm 处剪一小口, 用长 6cm、直径 0.26mm 尼龙线沿颈内动脉 (ICA) 方向插入约 19.0 ± 0.5mm, 然后于 ICA 近心端结扎该动脉, 全层缝合切口, 并留置长约 4cm 的尼龙线于体外。缺血 2h 后拔出阻塞线约 10mm 实现再灌注。动物随机分为: (1) 三七三醇皂苷 (由成都华神集团股份有限公司制药厂提供) 药物 (PTS) 组; (2) 假手术 (Sham) 组: 只插线 10mm 左右, 不行其它条件干预。每组又分 3d、7d、14d、28d 共 4 个时间组, 其中 PTS 组、N. S 组每个时间组各 5 只, Sham 组各 3 只。

**1.2 免疫组化染色** (1) 固定、取材、切片: 动物在麻醉后开胸, 经升主动脉插管, 先用生理盐水 150ml 冲去血液, 继而灌注含 4% 多聚甲醛的 0.1mol/l 的磷酸缓冲液 (pH7.4) 300ml, 注毕立即取前脑约 2.0~4.0cm 脑组织行后固定 4~6h, 行石蜡包埋。(2) 切片经脱蜡水化后, 依次入 50% 甲酸胺/2 × SSC 中 (65℃, 2h); 2N HCl

(37℃, 40min); 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30min; 20% 正常山羊血清 (1h, 37℃), 加入小鼠抗 Brdu (1:150, 北京中山公司) 37℃ 孵育 90min 后, 4℃ 过夜; 二抗、三抗 37℃ 各孵育 1h 后, DAB 显色。阴性对照用正常血清代替一抗; 免疫组化双重染色采用洗脱法, 使用 DS - Kit (Santa Cruz, 北京中山公司分装), 一标兔抗鼠 Nestin (1:1000, Chemicon)、二标小鼠抗 Brdu, 按推荐步骤进行, DAB 和 BCIP/NBT 显色。

**1.3 PTS 及 5 - 溴脱氧尿嘧啶 (Brdu) 给药** PTS 组大鼠于再灌注术后按 50mg/kg 腹腔注射给药, 每天一次, 直至取材; N. S 组大鼠, 药物由生理盐水代替; 各缺血组大鼠达规定时限前 1d, 腹腔注射 Brdu (50mg/kg, Sigma) 2 次, 间隔 3h, 最后 1 次注射后 24h 大鼠在麻醉下, 断头取脑。

**1.4 图像分析及统计学处理** 切片在统一放大倍数 (10 × 10) 下, 于梗死区周围随机选 10 个视野, 输入图像分析系统, 记取平均阳性细胞数, 所得数据用 SPSS 软件进行统计学处理。实验结果行方差分析, 两两比较用 q 检验。

## 2 结果

Sham 组脑组织神经毡致密、神经元核仁及尼氏体清楚。苏木素染色缺血梗死区镜下呈现神经组织完全破坏, 神经元核固缩、深染, 核仁、异染色质消失, 脑质少、着色深, 呈杆形或梭形, 与周围组织之间有明显的间隙。胶质细

作者简介: 胡晓松 (1972 年 -), 男, 青海西宁人, 在读硕士。工作单位: 青海医学院

胞和微血管内皮细胞全部坏死出现很多细胞死亡留下的空泡。BrdU 阳性标记物为圆形、卵圆形或椭圆形、呈深褐色、境界清晰。Sham 组 BrdU 阳性细胞主要分布在室管膜、室管膜下区 (SEZ) 及海马齿状回 (GZ)、血管内皮细胞, 且数目少、分散。再灌注 3d, BrdU 阳性细胞增多, 在 SEZ 呈簇状分布, 而于缺血中心区及缺血边缘区呈散落分布, 部分血管内皮细胞被明显标记。PTS 组与 N. S 组间无明显差异。缺血周边区于再灌注 7 天、14d, 可见 BrdU 阳性细胞数目急剧增多并达高峰, 至 28d 时增长幅度下降, 尤以 N. S 组明显 (如图 3)。

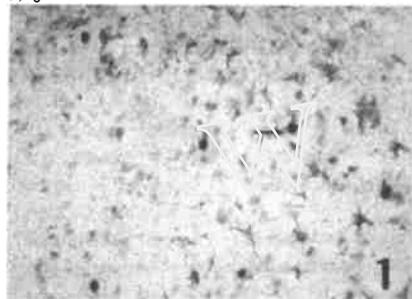


图 1: N. S 组再灌注 7d, 示梗死区周围 BrdU 标记的 Nestin 阳性细胞, DAB & BCIP/ NBT 显色,  $\times 200$

Nestin 及双标染色: N. S 组和 PTS 组中 Nestin 阳性细胞镜下可见两种类型: 一种类似星形胶质细胞, 着色部位在胞质和突起, 此种细胞镜下又可呈现胞体较小、突起长而纤细的纤维状细胞和胞体肿胀、突起粗短、深染的肥大细胞两种形态; 另一种阳性结构为小血管和微血管的内皮细胞, 另外脑室脉络膜和室管膜上皮亦有表达。Sham 组未见胶质细胞样 Nestin 表达, 仅见少量小血管和微血管内皮细胞呈阳性反应。N. S 组和 PTS 组可见 Nestin 围绕梗死区呈环行分布。再灌注 3d 可见梗死区周围 BrdU<sup>+</sup>/Nestin 阳性细胞 (如图 1, 2), 于再灌注 7d 时, Nestin 阳性细胞明显增多, 同时为 BrdU 标记的阳性细胞数目达顶峰 (如图 4), 围绕梗死区散在分布。此后 BrdU 阳性细胞数目逐渐回落, Nestin 阳性细胞数目亦明显减少, 至再灌注 28d, BrdU<sup>+</sup>/Nestin 阳性细胞数已明显回落。

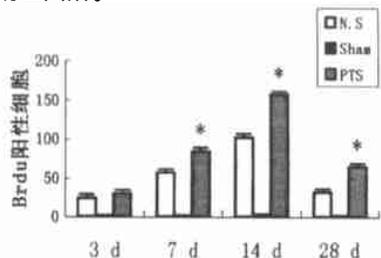


图 3 局灶性脑缺血再灌注后缺血区 BrdU 阳性细胞数变化, 与 N. S 组比较: \*  $P < 0.05$

### 3 讨论

近来有人发现, 脑缺血不仅可以激

活侧脑室的室管膜下区 (Subependymal zone of lateral ventricular, SEZ) 和海马齿状回 (dentate gyrus, DG) 的神经干细胞 (NSC), 而且可以使缺血灶周围的某些成熟细胞逆转为 NSC。5 - 溴脱氧尿苷 (BrdU) 是一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物, 在细胞增殖周期的 S 期嵌入细胞核 DNA 中, 因而 BrdU 阳性细胞可被看作具有增殖活性的细胞。但由于脑梗死所致的血脑屏障破坏及动物模型制作过程中的手术损伤刺激均可以引起脑内炎性细胞增殖, 因此脑梗死后增殖的细胞既有炎性细胞也有神经前体细胞。巢蛋白 (Nestin) 于神经胚胎形成阶段在神经内皮干细胞中呈特异性、一过性表达, 被认为是 NSC 的标志, 已广泛用于 NSC 的鉴定。但脑缺血损伤后, 反应性胶质细胞可呈现强烈的巢蛋白反应<sup>[3]</sup>, 因此应用 BrdU/Nestin 免疫双标记法可确定增殖细胞的来源及神经干/前体细胞的数目和分布情况。

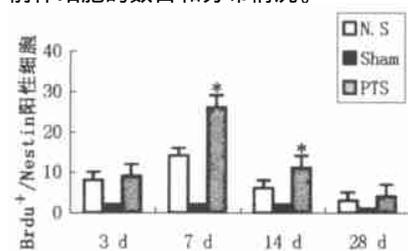


图 4: 局灶性脑缺血后梗死区周围 BrdU 标记 Nestin 阳性细胞变化, 与 N. S 组比较: \*  $P < 0.05$

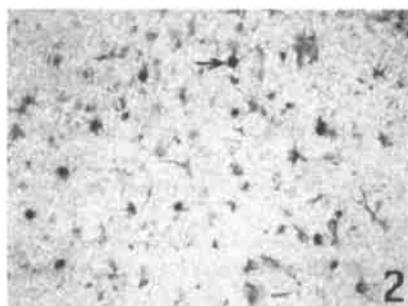


图 2: PTS 组再灌注 7d, 示梗死区周围 BrdU 标记的 Nestin 阳性细胞, DAB & BCIP/ NBT 显色,  $\times 200$

本实验发现无论是 N. S 组还是 PTS 组, 脑缺血再灌注后 3d, 在梗死灶周围或对照侧 BrdU 阳性标记细胞, 即增殖细胞就已出现, 提示局灶性脑梗死不仅可以使同侧细胞增殖, 而且对激活对侧细胞增殖也有作用。另外在缺血中心区亦有散在分布的增殖细胞, 但此类细胞并无 Nestin 着色, 推测可能是侵入的炎性细胞。增殖细胞数目于再灌注后 14d 达到高峰, 除梗死区周围, 于齿状回、胼胝体等处亦可见明显增多的增殖细胞, 其中部分为 Nestin 阳性细胞, 但其数目较 7d 时有所下降。有研究证实次级祖细胞对 Nestin (neuroepithelial stem protein) 呈阴性<sup>[4]</sup>, 故此推测 NSC 的增殖在缺血后 7d 时最为显著, 此后神经干因继续分化而失去 Nestin 表达表型, 但仍保持着细胞增殖的特性。由于本实

验未做 BrdU/ GFAP、BrdU/ NeuN 染色, 尚无法证实神经前体细胞最终分化为神经元还是神经胶质细胞。

SEZ 处的 NSC 正常情况下是相对静止的, 诱导或刺激其发生增殖、分化的因素中, bFGF (basic fibroblast growth factor, bFGF) 的作用尤为令人注目, bFGF 作为刺激 NSC 增殖的重要的丝裂原, 可以诱导相对静止的 SEZ 干细胞进入细胞周期<sup>[5]</sup>若将 bFGF 注入成年鼠的侧脑室内, 则可促进 NSC 增殖及新生细胞数量的增加<sup>[6]</sup>, 本研究显示, 给予 PTS 后, SEZ、梗死区周围的 Nestin 阳性细胞数目均明显增多, 染色加深, 表象改变更加显著, 结果提示 PTS 能促进 NSC 的增殖。其机理可能是 PTS 通过提高 NSC 丝裂原 bFGF 或类似物的浓度而加速了 NSC 的增殖。当然, 由于脑缺血可引起星形胶质细胞反应, 反应性星形胶质细胞除表达 Nestin 外, 也表达 NSE, 这可能是由于反应性胶质细胞去分化, 变成双向潜能的干细胞 (Neuron/ Astrocyte precursor cell), 表达神经元和胶质细胞表型, 因此发生增殖的 NSC 也可能是由于神经胶质细胞逆转而来的, 但其中未发生增殖的 Nestin 阳性胶质细胞是否与 NSC 的迁移有关尚有待证实, 由于反应性星形胶质细胞与维持脑损伤后内环境的稳定、促进血管再生、神经生长等作用有关<sup>[7]</sup>, 因此可以推测此类细胞对脑缺血后的神经修复有利。另外, 在脑缺血后在梗死区周围存在活跃的微血管增殖<sup>[8]</sup>, 本实验也发现在各时间段, PTS 组的梗死侧和对照侧的 Nestin 阳性微血管结构均较相应的 N. S 组者为多, 提示 PTS 可能还有促进脑缺血后微血管形成的作用。

### 4 参考文献:

- [1] 侯安会. 三七的临床运用和实验研究概要 [J]. 中医药信息, 1999, 6 (1): 21 - 24.
- [2] 张英鸽, 刘天培. 人参皂甙对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1994, 8 (1): 12 - 18.
- [3] Li Y, Chopp M. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in rat [J]. Brain Res, 1999, 838 (1 - 2): 1 - 10.
- [4] Buylal A, Manuel J. Neurogenesis in Adult Subventricular Zone [J]. The Journal of Neuroscience, 2002, 22 (3): 629 - 634.
- [5] Chinason BJ, Tiopepe V, Morshead CM, et al. Adult mam2 malian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal have neural stem cell characteristics [J]. The Journal of neuroscience, 1999, 19: 4462 - 4471.
- [6] Gage FH. Mammalian neural stem cells [J]. science, 2000, 287: 1433 ~ 1438.
- [7] Barres BA. New roles for glia [J]. J Neuroscience, 1992, 119 (9): 3685 - 3694.
- [8] Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, et al. Brain microvessels: factors altering their patency after the occlusion of a middle cerebral artery (Wistar rat) [J]. Am J Pathol, 1994, 145: 728 - 740.

(收稿日期: 2004 - 02 - 24)