

[文章编号] 1002 - 0179 (2005) 02 - 0297 - 03

# 三七三醇皂苷对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 Nestin 表达的影响

Effects of PTS on Expression of Nestin following Focal Ischemia - Reperfusion in Rats

赵红念<sup>1</sup>, 胡晓松<sup>2\*</sup>, 周东<sup>3</sup>, 周德明<sup>4</sup>, 杨开明<sup>4</sup>

ZHAO Hong - nian, HU Xiao - song, ZHOU Dong, et al.

(1. 云南省大理学院附属医院脑系科, 云南大理 671000; 2. 成都医学院病理教研室, 四川成都 610083; 3. 四川大学华西医院神经内科, 四川成都 610041; 4. 四川大学基础与法医学院人体解剖学教研室, 四川成都 610041)

(1. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Dali College, Dali 671000 China; 2. Department of Pathology, Chengdu Medical College, Chengdu 610083 China; 3. Department of Neurology, West China Hospital, Chengdu 610041, China; 4. Department of Anatomy, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**摘要:** 目的: 了解局灶性脑缺血再灌注后 Nestin 的动态变化, 以及三七三醇皂苷对其表达的影响。方法: 采用改良的线栓法制备大鼠中动脉阻塞 2h、不同再灌注时间段 (3h、6h、12h、24h、48h、72h、7d、14d) 的大鼠短暂局灶性脑缺血模型, 应用免疫组织化学技术检测巢蛋白的表达。结果: 脑缺血再灌注后 24h, PTS (三七三醇皂苷) 组缺血侧 Nestin 即有增加, 并持续至 7d, 较之盐水对照组差异显著, 至再灌注 14d Nestin 表达已明显回落。结论: PTS 可使缺血再灌注大鼠的 Nestin 表达上调, 这可能是其发挥脑保护作用的机理之一。

**关键词:** 三七三醇皂苷; 巢蛋白; 缺血再灌注; 大鼠

[中图分类号] R743.31 [文献标识码] A

**Abstract:** Objective: To study the expression of Nestin and the effect of PTS on it following focal ischemia - reperfusion in the adult rat brain. Methods: The model of acute reperfusion injury after cerebral ischemia in rats was made by middle cerebral artery occlusion. All animals were allowed 2h ischemia and sacrificed after different durations of reperfusion (3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 7d, 14d). The expression of Nestin was detected with an immunohistochemical approach. Results: The number of Nestin - immunoreactive cells at 24h after reperfusion in ischemic side in PTS group started to increase markedly and represent significant difference compared with the N. S group, peaked on 7d and then decreased observably on 14d after reperfusion. Conclusion: The study implies PTS could up - regulate the expression of Nestin, and it might be the one of protective mechanisms of PTS against ischemia - reperfusion injury.

**Key words:** PTS; Nestin; Ischemia - Reperfusion; Rat

(Received date: 2004 - 09 - 27)

巢蛋白 (Nestin) 为一种在神经干细胞中特异表达的类中间丝蛋白<sup>[1]</sup>。在急性脑损伤和缺血时, 反应性星形胶质细胞的形态和数量可发生明显的变化, 并呈强烈的巢蛋白反应, 而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、神经生长及神经修复等作用有关<sup>[2]</sup>, 因此研究脑缺血后星形胶质细胞的变化, 对于脑缺血的治疗以及阐明再灌注损伤的病理生理机制均有重要意义。近来, 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, 具有散瘀止血、消肿定痛的功效。三七三醇皂苷 (PTS) 为三七类新药, 其主要活性成份 Rg1 的含量达 60% 以上, Rg1、R1、Re 三者的含量约达 80%。目前, 有关该药对脑缺血再灌注后星形胶质细胞影响的研究未见报道, 本实验通过预防性给予 PTS 后, 动态观察对大鼠中动脉阻塞 (Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO) 大鼠 Nestin 表达的影响, 以期了解该药的神经保护作用及其作用机制, 为其进一步的临床研究提供实验室资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型制备及分组

作者简介: 赵红念 (1968 年 -), 男, 白族, 云南洱源人, 主治医师, 医学学士。

\* 通讯作者

健康雄性 SD 大鼠, 体重 250 ~ 300 g, 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、颈外动脉近分叉部并充分游离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, 并全层缝合切口。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 (由成都中医药大学华神药业公司提供) 药物 (PTS) 组, 于术前 6d 按 50mg/kg 腹腔注射给药, 每天一次, 术前 2h 再给药一次。(2) 生理盐水 (N. S) 对照组, 药物由生理盐水代替;(3) 假手术 (Sham) 组: 只插线 10mm 左右, 不行其它条件干预。每组又分 3h、6h、12h、24h、72h、7d、14d 共 7 个时间组, 其中 PTS 组和 N. S 组每个时间组各 5 只, Sham 组各 3 只。

1.2 免疫组化法 (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 的磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 300ml, 注毕立即取前囟后约 1.0 ~ 3.0cm 脑组织行后

固定 4 ~ 6h, 石蜡包埋。(2) 小鼠抗大鼠 Nestin (巢蛋白) (1: 1000, Chemicon)、兔抗鼠 GFAP (胶质纤维酸性蛋白) (1: 1500, sigma), 兔抗鼠 PCNA (增殖核抗原) (1: 800, Sigma), 按 SABC 法染色, DAB 显色; 免疫组化双重染色使用 DS - Kit (Santa Cruz, 北京中山公司分装), 按推荐步骤进行, DAB 和 BCIP/NBT 显色。

1.3 图像分析及统计学处理 切片在统一放大倍数 (10 × 10) 下, 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

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。PCNA 阳性细胞着色部位为胶质细胞或神经元胞核, 成卵圆形或椭圆形, 此外血管内皮细胞亦有部分表达。GFAP 表达甚似 Nestin, 但除微血管周围有表达外, 神经元胞浆亦可有少量表达。

### 2.1 Nestin 免疫组化反应 缺血再灌

注3h即可见少量 Nestin 在缺血侧室管膜上皮细胞中表达,但着色较淡。室管膜下区阳性细胞核肿胀,突起较短。缺血再灌注 6h~24h, Nestin 阳性细胞着色较 3h 组加深,胞核肿胀、苏木素着色浅淡、多居边,数目逐渐增多,突起亦明显增长,多指向缺血梗死区,可见少量纤维状阳性细胞。侧脑室外侧壁下方及纹状体等处尤为明显。镜下观察 PTS 组阳性细胞数目较 N. S 组为多,但比较无显著性差异(如图 5)。再灌注 48h~72h, Nestin 阳性细胞数目明显增多,可见较多沿胼胝体长轴平行排列的 Nestin 阳性细胞,突起较长,多伸向缺血梗死区;至再灌注 7d 时(如图 1, 2), Nestin 阳性细胞数目达到高峰,呈围绕梗死区的多层分布,并可见少数 Nestin 阳性细胞突起伸长、交织,但胼胝体处的 Nestin 阳性细胞已明显减少。再灌注 14d 时 Nestin 阳性细胞已明显回落,纤维状细胞比例较前期有所增加,但仍明显可见突起较粗、染色较深的肥大型阳性细胞,胼胝体处已几乎无 Nestin 阳性胶质细胞存在。据观察在再灌注各时间段对照侧室管膜下区、纹状体、胼胝体等部位亦有 Nestin 胶质细胞样表达,随再灌注时间的延长有增多的趋势,但数目较缺血侧明显为少。



图 1. N. S 组再灌注 7d, LV 示侧脑室, CC 示胼胝体, IA 示梗死区。DAB 显色, 苏木素淡染, 100 ×。

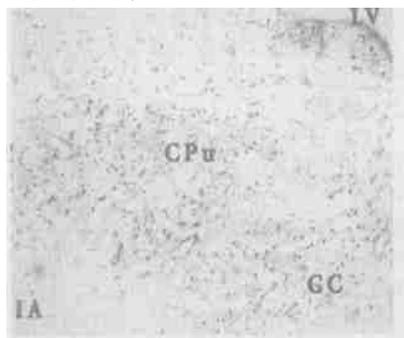


图 2. PTS 组再灌注 7d, LV 示侧脑室, CPu 示尾壳核, CC 示胼胝体, IA 示梗死区。DAB 显色, 苏木素淡染, 100 ×。

## 2.2 免疫双标染色

### 2.2.1 Nestin 与 PCNA 双标染色

再灌注 3h~24h, PCNA 未见着色;再灌注 48h~7d, 可见 Nestin 阳性细胞核被 PCNA 标记(如图 3)者逐渐增多, PTS 组与 N. S 组比较有显著性差异 ( $P <$

0.05)。再灌注 14d 时双标阳性细胞数目已明显减少, PTS 组与 N. S 组比较无显著性差异。



图 3. N. S 组再灌注 72h, LV 示侧脑室, 示 Nestin & PCNA 双标阳性细胞, LA 示侧脑室, DAB & BCIP/ NBT 显色, 400 ×。

### 2.2.2 Nestin 与 GFAP 双标染色

再灌注各时间段均可见 Nestin 与 GFAP 于脑浆的共表达,由于 DAB 显色较 BCIP/ NBT 敏感、充分,可于突起或胞体看到两种显色剂同时着色的情况(如图 4)。PTS 组和 N. S 组比较,各时间段双标记细胞占单标(Nestin 阳性细胞总数)细胞比例除 7d 外无明显差异。

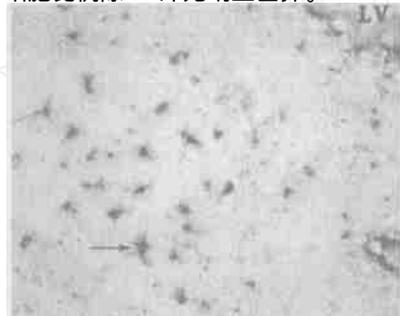


图 4. N. S 组再灌注 72h, 示 Nestin & GFAP 双标阳性细胞, LA 示侧脑室, DAB & BCIP/ NBT 显色, 400 ×。



图 5. 不同再灌注时间段 Nestin 阳性胶质细胞数, PTS 组与 N. S 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

## 3 讨论

近来,随着对 CNS 发育过程和神经干细胞(NSC)生物学研究的不断深入,大量研究表明神经干细胞在神经营养因子和内环境的调控下可对因缺血损伤而造成的神经功能丧失产生代偿和修复作用。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,神经前体细胞在进行神经元和星形胶质细胞的终末分化之后表达下调,并立即表达神经丝(neurofilament, NF)和胶质细胞原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP),因此, Nestin 被认为是神经前体细胞的标志,已广泛用于 NSC 的鉴定。生理情况下,成体

脑内 Nestin 阳性反应仅出现于室管膜上皮、血管内皮和脑室下层<sup>[3]</sup>。本实验发现在缺血再灌注 3h, Nestin 阳性胶质细胞在侧脑室外侧壁即有表达,而此区为成年哺乳类动物 NSC 存在部位之一<sup>[4]</sup>。随着再灌注时间延长,阳性细胞呈染色增强、数目逐渐增多趋势并于 7d 达高峰, PTS 组与 N. S 组比较有显著性差异,提示 PTS 能促进 Nestin 表达;而至 14d, 阳性细胞数目明显回落,这与 Zhang 等<sup>[5]</sup>的结果一致;通过增殖细胞核抗原(PCNA)与 Nestin 双标染色发现,再灌注 48h 前 Nestin 阳性胶质细胞并无增殖现象,而此期 Nestin 与 GFAP 双标染色结果显示,绝大部分 Nestin 阳性胶质细胞为 GFAP 标记,提示此时 Nestin 阳性胶质细胞应为反应性星形胶质细胞;而于此期之后,可见有 Nestin 阳性胶质细胞被 PCNA 标记,随着再灌注时间的延长,双标阳性细胞比例逐渐增高,至 7d 时达到高峰,至再灌注 14d 时双标阳性细胞几近消失,以上结果提示处于静息状态的 NSC 在受到缺血刺激大约 48h 后开始出现增殖。从沿胼胝体长轴分布的 Nestin 阳性胶质细胞数目变化出现的时程来看,增殖并沿该途径向缺血梗死区迁移的 NSC 在再灌注 72h 已明显活跃。

本实验的研究结果表明, Nestin 阳性胶质细胞来源于两个途径,即反应性星形胶质细胞和 NSC。而 Nestin 阳性胶质细胞中 GFAP 阴性标记细胞,功能如何以及是否来源于 NSC 尚待证实。有实验显示在神经胚胎形成阶段,放射状胶质细胞指导有丝分裂后神经元自起源部位脑室区向正在形成的皮质板迁移,在这一阶段,放射状胶质细胞亦呈 Nestin 免疫反应阳性、GFAP 免疫反应阴性<sup>[6]</sup>,当放射状胶质细胞完成了在神经元迁移过程中的作用后就形成了 CNS 的星形胶质细胞。本实验中观察到的 Nestin 阳性而 GFAP 阴性的胶质细胞是否与此种表达 Nestin 的放射状胶质细胞有相似的作用,有待证实。另外,再灌注 7d 时 Nestin + GFAP 双标记细胞比例下降,且 PTS 组和 N. S 组相比,两组间呈现差异,其原因值得进一步研究。另外,反应性星形胶质细胞中 Nestin 阳性胶质细胞与 Nestin 阴性胶质细胞二者功能有何差异、是否为同一种细胞的不同反应时期目前尚未清楚。

有关某些病理条件下,成体脑内 Nestin 表达上调的机制目前仍未明确。有研究发现脑内内源性细胞或炎症细胞可以释放可溶性的生物活性因子,而这种因子可引发 Nestin 相关基因的激活,而神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、睫状神经生长因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)、白介素-1(IL-1)可使 Nestin 表达上调并与胶质细胞形成瘢痕的功能密切相关,因此推测脑缺血再灌注损伤后,可能上述因子表达上调,激活了星形胶质细胞并使之大量表达胚性蛋白-Nestin;另外一种解释是脑缺血所引起的脑细胞广泛的去极

[文章编号] 1002 - 0179 (2005) 02 - 0299 - 02

# 链脲佐菌素诱导大鼠糖尿病肾病模型的方法学探讨

Study on Experimental Diabetic Nephropathy in Rats Induced by Streptozotocin

杨亦彬, 张 翥, 苏克亮, 陈泽君, 黄颂敏 \*

YANG Yi - bin, ZHANG Zhu, SU Ke - liang, et al.

(四川大学华西医院肾内科, 四川成都 610041)

(Department of Nephrology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**摘要:** 目的: 对比观察不同方法对链脲佐菌素 (STZ) 诱导速发型糖尿病肾病 (DN) 模型的影响。方法 wistar 和 SD 大鼠, 空腹或非空腹状态下, STZ 一次腹腔注射, 72h 后监测血糖、尿蛋白以及一般项目, 同时行肾胰病理检查。结果: 空腹 wistar 鼠成模率 62.5%, SD 鼠为 87.5%, 非空腹组成模率是 10%, 未成模鼠小剂量空腹追加 STZ 无一例成模。成模鼠肾胰显示特征性改变。不同时点血糖值差异大, 第二周平均尿蛋白排泄即达 33.48mg/24h。结论: 非空腹鼠成模率极低, SD 鼠成模可能优于 wistar 鼠, 成模前血糖至少连续三天同时点监测, 对早期 DN 的观察最好始于成模后第一周。

**关键词:** 糖尿病肾病; 链脲佐菌素; 动物模型

[中图分类号] R587.1 [文献标识码] A

**Abstract:** Objective: To compare observation of diabetic nephropathy (DN) induced by streptozotocin (STZ) in the different stock rats and condition. Methods: Under the empty or full stomach, DN model in Wistar or Sprague - dawley (SD) rats was induced with STZ once intraperitoneal injection. The changes of blood sugar, proteinuria, and general index were monitored. The tissue sections of renal and pancreas were stained by HE. Results: The rate of developed model in Wistar and SD rats of the empty stomach was 62.5%, 87.5%, respectively, While Wistar rats of the full stomach was 10%. The value of the blood sugar was greatly fluctuant after STZ injection. In developed model, urine protein count exceed 30mg/24h in 2<sup>nd</sup> week, and pathological changes occurred in kidney and pancreas. Failed rats were not duplicated by the low dose STZ reinjection. Conclusion: SD rats may be superior to Wistar rats in ND model induced by STZ, but the rate of developed ND in rats of the full stomach is extremely low. It is essential that 3 day value of the blood sugar is observed continually and changes of early DN are studied in 1<sup>st</sup> week in developed model.

**Key words:** diabetes nephropathy; streptozotocin; animal model

(Received date: 2004 - 08 - 18)

## 糖尿病系继心血管病和肿瘤之后的

作者简介: 杨亦彬 (1962 年 -), 男, 贵州遵义人, 副主任医师, 在读博士。  
\* 通讯作者

第三大非传染病, 其微血管并发症糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 已成为终末期肾衰竭主要原因之一。由于其发病机制尚未完全阐明, 防治也不十分

完善, 因此正确建立较理想的动物模型以深入研究是非常重要的。目前普遍采用链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导糖尿病动物模型<sup>[1,2]</sup>, 但迄今少见该

化, 电位的变化激活了 Nestin 表达的相关基因<sup>[7]</sup>。

在神经胚发育过程中, NSC 可在较短的时间内出现形态、位置、功能和代谢等方面的巨大变化, 因此推测作为其特异标记物的 Nestin 可能与维持 NSC 的某些重要特性, 如分裂、迁移、塑型等功能有关。细胞免疫组化的染色结果显示, Nestin 在突起及生长锥上存在较强的分布, 提示它可能参与了有丝分裂后神经元与靶细胞之间神经联系的建立。脑缺血再灌注损伤后, Nestin 的重新表达可能有增强细胞抗损伤能力、促进损伤灶的修复作用。有报道表明 MCAO 后梗死边缘存在活跃的微血管增殖<sup>[8]</sup>, 本实验也发现在再灌注 3h ~ 7d, PTS 组无论是在缺血侧还是对照侧大脑半球中均有大量微血管型 Nestin 阳性结构存在, 较 Sham 组和 N. S 组均有明显差异, 该结果提示 PTS 有促进新生血管形成的作用, 另外还表明脑缺血损伤后的神经塑型与血管的再生同步进行, 积极活跃的血管发生势必有利于缺血梗死区的结构重建。三七是传统中药之一, 现代药理研究证实具有抗自由基作用, 同时还具

有降低血粘度、抗血小板聚集、扩张血管、降低血脂和改善微循环及抗炎等作用<sup>[9]</sup>。另外, 三七皂苷对缺血再灌注损伤有减轻钙超载、减轻脑水肿、促进再灌注时的神经修复、减轻超微结构损伤和降低缺血再灌注期间死亡率等作用<sup>[10]</sup>。本实验观察到的 PTS 促进 Nestin 表达的作用, 可能与其改善微循环、促进新生血管形成、以及增加 NGF 或类似物的局部浓度从而使促进 Nestin 基因表达等作用有关。

## 4 参考文献:

- [1] Lendahl U, Zimmerman LB, Mc Kay RDG. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein [J]. Cell, 1990, 60: 585 - 595.
- [2] Barres BA. New roles for glia [J]. J Neurosci, 1992, 119 (9): 3685 - 3694.
- [3] Hölmin S, Almqvist P, Lendahl U, et al. Adult nestin expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury [J]. Eur J Neurosci, 1997, 9 (1): 65 - 75.
- [4] Sharp FR, Liu J, Bernabeu R. Neurogenesis following brain ischemia [J]. Brain Res Deb Brain Res, 2002, 134: 23 - 30.

- [5] Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, et al. 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: 33 - 41.
- [6] Rosen GD, Sherman GF, Galaburda AM. Radial glia in the neocortex of adult rats: effects of neonatal brain injury [J]. Dev Brain Res, 1994, 82: 127 - 135.
- [7] Kraig RP, Dong LM, Thisted R. Spreading depression increases immunohistochemical staining of glial fibrillary acidic protein [J]. J Neurosci, 1991, 11 (7): 2187 - 2198.
- [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.
- [9] 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.
- [10] 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.

(收稿日期: 2004 - 09 - 27)