

胡须刺激对大鼠桶状皮质局灶性脑缺血的神经保护作用

姜 婧^{1,2}, 张云云², 丁新生^{2*}, 李文磊³, 解 渊²

(¹江苏省中西医结合医院神经内科, 江苏 南京 210028; ²南京医科大学第一附属医院神经内科, 江苏 南京 210029; ³江苏省中医院神经内科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 研究胡须刺激对大鼠桶状皮质局灶性脑缺血的神经保护作用及可能机制。方法: 18 只雄性 SD 大鼠先行胡须依赖实验, 训练达标后随机分为假手术组、模型组和胡须刺激组。在显微镜下结扎右侧大脑中动脉 2~3 根分支构建大鼠胡须桶状皮质局灶性脑缺血模型, 胡须刺激组于缺血 3 d 后开始刺激大鼠左侧胡须。造模成功后 3 组大鼠再次行胡须依赖实验直至再次达标, 记录各组所需实验次数, 并于术后 14 d 应用超声多普勒检测缺血区周围的血流量, HE 染色观察缺血脑组织形态结构变化, 免疫组化检测缺血区周围 CD34 的表达情况并测量微血管密度。结果: 与模型组相比, 胡须刺激组能显著减少胡须依赖实验再次达标所需次数($P < 0.01$), 提高缺血区血流量($P < 0.01$), 改善病理组织学, 提高缺血区周围 CD34 阳性细胞的表达, 微血管密度增多($P < 0.01$)。结论: 胡须刺激对大鼠桶状皮质局灶性脑缺血有保护作用, 其机制之一可能与诱导 CD34 的表达上调, 改善脑缺血区的血流灌注有关。

[关键词] 胡须刺激; 桶状皮质; 脑缺血; CD34

[中图分类号] R743

[文献标志码]

A

[文章编号] 1007-4368(2015)01-017-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20150104

Neuroprotection of whisker stimulation against focal barrel cortex ischemia in rats

Jiang Jing^{1,2}, Zhang Yunyun², Ding Xinsheng^{2*}, Li Wenlei³, Xie Yuan²

(¹Department of Neurology, Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028; ²Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ³Department of Neurology, Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect and possible mechanism of whisker stimulation on focal barrel cortex ischemia in rats. **Methods:** Eighteen male Sprague-Dawley rats, which had been trained to reach criteria by completing a whisker-dependent task, were randomly divided into groups of sham-operation, operation and whisker stimulation. The focal ischemia model of whisker-barrel cortex was established by ligating 2~3 branches of the right middle cerebral artery permanently under microscope. The left side whiskers of the whisker stimulation group were stimulated 3 days after ischemia. The vibrissal function of the three groups was evaluated each day after ischemia until rat reached the criteria again. Meanwhile, we record the needed numbers of trials for complete the task. Local cerebral blood flow was assessed by laser Doppler scanner, brain tissue changes were observed with HE staining, the expression of CD34 and microvessel density(MvD) was detected with immunohistochemistry method 14 d after ischemia. **Results:** Compared with the operation group, the whisker stimulation group significantly decreased the number of trials that required to reach criteria ($P < 0.01$), enhanced local cerebral blood flow ($P < 0.01$), detained the pathologic change of ischemic brain, increased the numbers of CD34 positive cells and also MvD ($P < 0.05$). **Conclusion:** Whisker stimulation had protective effects on focal barrel cortex ischemia in rats. One possible mechanism may be that whisker stimulation can increase expression of CD34 and enhance local cerebral blood flow.

[Key words] whisker stimulation; barrel cortex; brain ischemia; CD34

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(01):017-021]

[基金项目] 国家自然科学基金(30971022); 江苏省自然科学基金(BK2008471)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yahoo.com.cn

缺血性脑血管疾病以其高发病率、高致残率和高病死率成为当前严重威胁人类健康的一大类重要疾病。目前除静脉溶栓外,缺乏确切有效的治疗手段^[1]。溶栓治疗虽然有效,但受严格的时间窗限制,只有极少数患者能够获得治疗机会,大多数患者不可避免地遗留神经功能的缺损。

越来越多的临床和动物研究表明,外周刺激和功能锻炼会对中枢神经系统产生“使用依赖”性的功能和组织形态改变,能够减少梗死面积,减轻神经功能缺损,促进脑损伤后的组织重构和功能恢复^[2-4],但其内在神经生物学机制尚不清楚。既往脑缺血研究通常采用的大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)等模型,因其梗死面积大,部位不固定,通常造成多功能区梗死^[5],这样就混淆了卒中后功能恢复所涉及的特定神经回路的研究,不能单一观察外周刺激对缺血灶的影响。胡须桶状皮质脑缺血模型是一个非常理想的研究依赖性外周刺激对中枢神经系统影响的动物模型,它具有明确的胡须-大脑皮层感觉传导通路^[6],容易观察到相应大脑皮层形态和功能上的变化,可以直观地研究脑缺血后血流动力学改变、细胞死亡机制、神经血管再生及外周行为活动对中枢神经组织形态改变的影响,评价神经保护剂的作用。本研究旨在采用脑缺血新模型——胡须桶状皮质脑缺血模型,探讨胡须刺激对胡须桶状皮质缺血后功能的影响及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料

成年雄性 SD 大鼠由中国科学院上海实验动物中心提供[许可证号:SCXK(沪)2007-0005],清洁级,体重 250-300 g。GS-2010 手术显微镜(常州市三能光学设备有限公司),电钻(微型手电钻,直径 40 mm,长度 126 mm),10.0 手术线(上海医菱医疗器械销售公司),多导生理记录仪、TSD 激光多普勒探头、激光多普勒血仪(Biopac 公司,美国),兔抗 CD34 单克隆抗体(BA0532)、即用型 SABC-POD(兔 IgG)试剂盒(SA1022)、DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠胡须依赖实验

大鼠参照 Hoffman 等^[7]提出的胡须依赖实验进行训练,具体实验过程是在一个两纹理分辨装置上完成的。大鼠通过胡须分辨两种纹理后,训练其跳跃到其中一块选择平板上,选择粗糙端平板认为正

确,给予食物奖励;选择平滑端平板认为错误则不给予食物,每日训练 20 次(10 次为 1 轮)。为了防止大鼠使用健侧胡须功能代偿,在本试验中剪掉了大鼠健侧即右侧胡须,迫使大鼠用患侧胡须进行分辨。大鼠一直被训练直至连续 3 轮正确率超过 80%即认为达到标准,同时记录达标所需的实验次数。造模成功后 3 组大鼠按照相同方法再次检测,直至再次达标后停止,同时记录再次达标所需实验次数。

1.2.2 胡须桶状皮质局灶性脑缺血模型的制备

18 只 SD 大鼠行胡须依赖实验训练达标后按随机数字表法随机分为假手术组、模型组和胡须刺激组,每组各 6 只。模型组和胡须刺激组大鼠经 10% 水合氯醛(300 mg/kg,静脉注射)麻醉后,左侧卧位固定于手术台上。在显微镜下靠近眶后切开右颞侧皮肤及颞肌,钝性分离肌肉组织,暴露右侧颞骨,手术电钻在感觉皮质处开一 3~4 mm 的颅窗,保持硬脑膜完整。刺激对侧胡须,激光多普勒血流仪测定刺激前、后局部脑血流,确定桶状皮质支配血管。10 号手术线穿过硬脑膜,结扎胡须桶状皮质周围 2~3 个大脑中动脉的分支。再次刺激对侧胡须,局部血流不再增加,同时结扎双侧颈总动脉 10 min。关闭颅窗,缝合切口。假手术组大鼠给予同样的处理过程,但不结扎大脑中动脉的分支。

1.2.3 胡须刺激

胡须刺激组大鼠,于缺血后第 3 天开始,使用简易振动棒(频率约 140 次/min)反复刮拨大鼠左侧面部所有胡须 15 min,每日 3 次,直至处死。

1.2.4 局部脑血流的测定

脑缺血后 14 d,应用激光多普勒血流仪检测缺血灶周围局部脑血流情况,选择 LDF100C 激光多普勒血流模块,应用 Acqknowledge 软件记录稳定 1 min 后的数值(设定基线为 0)。操作过程由专业人员执行。

1.2.5 HE 染色

脑缺血后 14 d,经 10%水合氯醛(300 mg/kg,静脉注射)麻醉后,经心脏灌注固定后取脑,4%多聚甲醛溶液中再固定 24 h,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋,连续冠状切片,厚 5 μm 。行常规 HE 染色,中性树脂胶封片,光镜下观察受损脑组织形态结构。

1.2.6 微血管密度测定

常规脱蜡至水,以 CD34 抗体为一抗进行免疫组织化学染色,方法参照试剂盒说明书。DAB 显色,苏木素复染,封片镜检。PBS 代替 CD34 一抗作阴性对照。采用 Leica 计算机图像分析系统对组织切片

进行图像分析,参照 Weidner 等^[8]的方法:①CD34 阳性以血管内皮细胞呈棕色或棕褐色染色为标准。微血管计数以被染棕色或棕褐色的单个内皮细胞或内皮细胞簇作为 1 个血管计数。只要结构不相连,其分支结构也计作 1 个血管计数;②每张切片先在低倍光镜下挑选微血管分布最高密度区域,再在 200 倍光镜下计数 5 个不重复热点区域中被 CD34 染成棕色或棕褐色的微血管数,取其平均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS12.0 软件分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,组间比较采用 *q* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠胡须功能测定

造模前 3 组大鼠胡须功能达标所需试验次数无统计学差异($P > 0.05$)。造模后假手术组、模型组、胡须刺激组 3 组大鼠分别再次达标所需次数均

少于造模前(P 均 < 0.01)。与假手术组相比,模型组和胡须刺激组再次达标次数均明显增加 ($P < 0.01$);与模型组相比,胡须刺激组再次达标所需试验次数明显减少($P < 0.01$,表 1)。

2.2 局部脑血流测定

脑缺血后 14 d 应用激光多普勒成像检测缺血局部脑血流情况。模型组和胡须刺激组血流较假手术组明显减少,有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组相比,胡须刺激血流量明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$,表 1)。

2.3 HE 染色

镜下可见假手术组皮层神经元结构正常,核膜清楚,核仁明显,间质致密无水肿。而模型组缺血区神经细胞明显减少,残存神经元细胞胞体缩小,核固缩,胞浆浓缩深染,神经元纤维疏松,组织间水肿显著。胡须刺激组部分神经元固缩,神经元结构相对完整,间质水肿轻(图 1)。

2.4 免疫组化染色

表 1 3 组大鼠缺血前后胡须功能、术后 14 d 局部脑血流和微血管密度值的比较

Table 1 Comparison of vibrissal function, local cerebral blood flow and microvessel density among three groups

($\bar{x} \pm s$)

组别	造模前胡须功能(次)	造模后胡须功能(次)	脑血流(ml/s)	微血管密度
假手术组	226.66 ± 10.95	34.33 ± 5.47*	0.71 ± 0.05	7.04 ± 3.93
模型组	230.00 ± 11.40	148.33 ± 13.03**	0.36 ± 0.03 [#]	28.36 ± 4.79 [#]
胡须刺激组	220.00 ± 10.95	90.66 ± 7.52** ^Δ	0.52 ± 0.05 ^{#Δ}	41.22 ± 5.34 ^{#Δ}

与造模前比较,* $P < 0.01$;与假手术组比较,[#] $P < 0.01$;与模型组比较,^Δ $P < 0.01$ 。

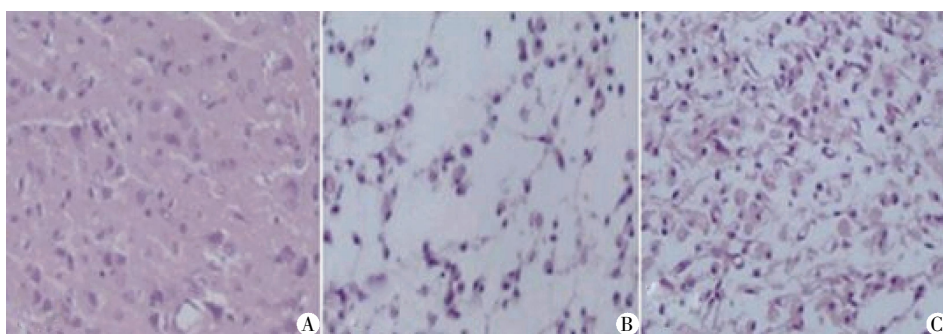
CD34 微血管阳性表达血管内皮细胞呈棕黄色,微血管呈圆形或条索状。假手术组 CD34 阳性表达很少,模型组缺血周边区可见较多 CD34 表达的毛细血管。胡须刺激组可见大量 CD34 微血管阳性表达,且微血管密度明显增多,差异有统计学意义($P < 0.01$,表 1,图 2)。

3 讨 论

胡须是啮齿动物进行探索活动,辨别物体形状、距离,感知周围环境的重要工具,大鼠脑内接收胡须感觉输入的区域桶状皮质是一个神经元规则排布、结构清晰的区域,该区域内的圆柱状结构与对侧面面部胡须分布一一对应,接收单根胡须的感觉传入信号^[6]。因此啮齿动物胡须桶状皮质具有良好的组织学与功能上的拓扑对应关系,为神经系统功能的研究提供了有利条件^[9]。该区域的血供主要由大脑中动脉分支支配^[10],通过结扎其支配血管,制成梗死区域,可以提供一个直接观察单一功能区梗

死后组织形态和功能变化相联系的局灶性脑缺血模型。与其他局灶性脑缺血模型比较,该模型操作较为简便,梗死部位固定、大小均一、重复性好,尤其重要的是,它是一个功能和结构明确的单一功能区的局灶性梗死,单一地接受外周胡须刺激的感觉输入。

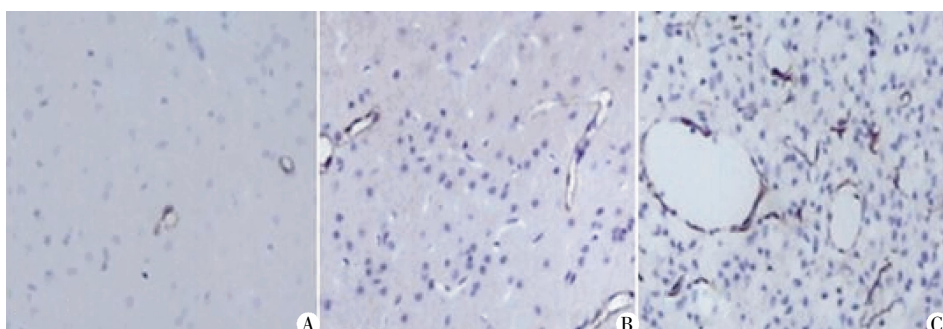
大鼠需要完整的对侧桶状皮层才能完成胡须辨别任务。Hoffman 等^[7]的研究表明初次行胡须依赖实验训练的大鼠脑缺血后达标所需次数明显增加,说明单侧桶状皮层梗死后,对侧胡须功能受到损害。缺血后予以胡须刺激能缩短达标时间,提示胡须刺激能改善缺血后胡须功能。本研究发现,预先训练过的大鼠,脑缺血后再次达标所需次数也明显增加,对侧胡须功能损害亦不可避免,予以胡须刺激亦能促进脑缺血大鼠胡须功能恢复,缩短再次达标次数,Hoffman 等^[7]的研究甚至提示胡须刺激后达标次数几乎接近假手术组,胡须功能改善更为明显。另外本研究还发现,不仅预先训练过的假手术



A:假手术组;B:模型组;C:胡须刺激组。

图 1 脑缺血 14 d 镜下脑组织形态(HE,×200)

Figure 1 Morphological change by HE staining 14 d after ischemia(HE,×200)



A:假手术组;B:模型组;C:胡须刺激组

图 2 脑缺血 14 d 缺血区周围 CD34 表达情况(免疫组化,×200)

Figure 2 Expression of CD34 by immunohistochemical method 14 d after ischemia(IHC,×200)

组大鼠再次达标次数较初次训练时明显减少,而且预先训练过的模型组和胡须刺激组大鼠也较初次训练时减少,胡须功能较前有所增强,提示脑缺血前的预先训练对胡须功能有保护和强化作用,以致缺血后再锻炼能提高功能恢复的效率,Zhang 等^[11]研究提示这种保护作用可能与预先训练能增加局部脑血流有关。

脑缺血后早期恢复半暗带血供、促进新生血管形成和侧支循环重建,有利于改善缺血灶微环境,减少神经元凋亡坏死,因此血管再生成为脑缺血后关键的治疗环节。CD34 抗原是分子量为 105 000~120 000 的高度糖基化 I 型跨膜蛋白,既可以选择性地在人和鼠造血干细胞中表达又可在血管内皮细胞及其他组织中表达,具有黏附、加速血管前内皮细胞聚集形成血管以及调控造血细胞增殖和分化的功能^[12-13]。CD34 可以用来测量缺血组织微血管的密度和面积,检测早期新生微血管的形成,被认为是较敏感和特异的内皮细胞标记物^[14]。研究表明,脑缺血、缺氧可诱导 CD34 及其受体的表达,促进脑缺血微血管形成和侧支循环建立,改善脑组织血供,减少神经元坏死,且有直接保护神经的功能^[15]。本研

究结果表明,胡须刺激能促进脑缺血大鼠胡须功能的恢复,改善缺血脑组织形态,增加缺血局部血流,其可能机制之一是上调 CD34 的表达,促进血管再生,改善局部脑血流,从而对局灶性脑缺血损伤起保护作用,有利于缺血损伤后长期功能性恢复。

外周胡须刺激还能上调其他多种神经血管营养因子表达,如 VEGF、Tie-1、CD31 等^[16],优化胡须桶状皮质的微环境。本研究尚处于初级阶段,更深入的研究应该集中在外周刺激或功能锻炼调节神经血管可塑性的细胞分子机制上,有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Jauch EC, Saver JL, Adams HP Jr, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association [J]. *Stroke*, 2013, 44(3): 870-947
- [2] 刘海燕, 蔺勇, 张扬, 等. 丰富环境干预对短暂性全脑缺血大鼠学习记忆能力的影响[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2011, 28(9): 820-822
- [3] Matsuda F, Sakakima H, Yoshida Y. The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats [J]. *Acta Physiol*, 2011, 201(2):

- 275-287
- [4] Tahamtan M, Allahtavakoli M, Abbasnejad M, et al. Exercise preconditioning improves behavioral functions following transient cerebral ischemia induced by 4-vessel occlusion(4-VO) in rats[J]. Arch Iran Med, 2013, 16(12): 697-704
- [5] Kanemitsu H, Nakagomi T, Tamura A, et al. Differences in the extent of primary ischemic damage between cerebral artery coagulation and intraluminal occlusion models[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(10): 1196-1204
- [6] Woolsey TA, Van der Loos H. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units[J]. Brain Res, 1970, 17(2): 205-242
- [7] Hoffman JR, Greenberg JH, Furuya D, et al. Rats recovering from unilateral barrel-cortex ischemia are capable of completing a whisker-dependent task using only their affected whiskers[J]. Brain Res, 2003, 965(1-2): 91-99
- [8] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer[J]. Am J Pathol, 1995, 147(1): 9-19
- [9] Glazewski S, Benedetti BL, Barth AL. Ipsilateral whiskers suppress experience dependent plasticity in the barrel cortex[J]. J Neurosci, 2007, 27(14): 3910-3920
- [10] Wei L, Craven K, Erinjeri J, et al. Local cerebral blood flow during the first hour following acute ligation of multiple arterioles in rat whisker barrel cortex[J]. Neurobiol Dis, 1998, 5(3): 142-150
- [11] Zhang Q, Zhang L, Yang X, et al. The effects of exercise preconditioning on cerebral blood flow change and endothelin-1 expression after cerebral ischemia in rats[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2014, 23(6): 1696-1702
- [12] Nielsen JS, McNagny KM. CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery[J]. Microcirculation, 2009, 16(6): 487-496
- [13] Gangenahalli GU, Singh VK, Verma YK, et al. Hematopoietic stem cell antigen CD34: role in adhesion or homing[J]. Stem Cells Dev, 2006, 15(3): 305-313
- [14] Ajili F, Kacem M, Tounsi H, et al. Prognostic impact of angiogenesis in nonmuscle invasive bladder cancer as defined by microvessel density after immunohistochemical staining for CD34[J]. Ultrastruct Pathol, 2012, 36(5): 336-342
- [15] 蔡振利, 周 东, 叙树军. 大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型 CD34 表达及巴曲酶对其表达的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2006, 23(1): 97-99
- [16] Whitaker VR, Cui L, Miller S, et al. Whisker stimulation enhances angiogenesis in the barrel cortex following focal ischemia in mice [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2007, 27(1): 57-68
- [收稿日期] 2014-06-23

(上接第 10 页)

- the developing mouse heart with emphasis on E11.5 to E18.5[J]. Toxicol Pathol, 2009, 37(4): 395-414
- [14] van der Heyden MA, Defize LH. Twenty one years of P19 cells; what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation [J]. Cardiovasc Res, 2003, 58(2): 292-302
- [15] Briggs LE, Kakarla J, Wessels A. The pathogenesis of atrial and atrioventricular septal defects with special emphasis on the role of the dorsal mesenchymal protrusion [J]. Differentiation, 2012, 84(1): 117-130
- [16] Moller T, Leren TP, Eiklid KL, et al. A novel BMPR2 gene mutation associated with exercise-induced pulmonary hypertension in septal defects[J]. Scand Cardiovasc J, 2010, 44(6): 331-336
- [17] Kola S, Koneti NR, Golla JP, et al. Mutational analysis of JAG1 gene in non-syndromic tetralogy of Fallot children [J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(23-24): 2232-2236
- [18] Hofmann JJ, Briot A, Enciso J, et al. Endothelial deletion of murine Jag1 leads to valve calcification and congenital heart defects associated with Alagille syndrome[J]. Development, 2012, 139(23): 4449-4460
- [收稿日期] 2014-05-23