

本文引用: 杨伟锋, 金保哲, 张新中, 等. 丙戊酸对颅脑损伤大鼠海马成体神经干细胞原位激活的作用[J]. 新乡医学院学报 2016, 33(6): 469-472. DOI: 10.7683/xyxyxb.2016.06.006.

【基础研究】

丙戊酸对颅脑损伤大鼠海马成体神经干细胞原位激活的作用

杨伟锋¹, 金保哲², 张新中², 王磊¹, 周文科², 王仲伟²

(1. 新乡医学院 2013 级硕士研究生, 河南 新乡 453003; 2. 新乡医学院第一附属医院神经外科, 河南 卫辉 453100)

摘要: 目的 观察丙戊酸(VPA)对颅脑损伤后大鼠海马成体神经干细胞(NSC)原位激活的作用。方法 将成年健康 Sprague-Dawley 雄性大鼠 66 只随机分为正常对照组($n=6$)、单纯损伤组($n=30$)和 VPA 治疗组($n=30$)。正常对照组大鼠不做任何处理, 单纯损伤组及 VPA 治疗组大鼠建立闭合性颅脑损伤模型; VPA 治疗组大鼠按每天 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量经腹腔注射给药进行干预, 单纯损伤组大鼠给予腹腔注射等量的生理盐水进行干预, 分别于颅脑损伤后 3、7、14、21、28 d 断头取脑标本, 采用免疫荧光技术检测各组大鼠不同时间点海马齿状回内 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(Edu)阳性细胞数及大鼠海马齿状回内巢蛋白(Nestin)阳性细胞数的变化。结果 单纯损伤组和 VPA 治疗组大鼠海马齿状回内 Edu 阳性细胞数及 Nestin 阳性细胞数于造模后第 3 天开始增高, 于造模后第 21 天达高峰, 在同一时间点单纯损伤组和 VPA 治疗组大鼠 Edu 阳性细胞数及 Nestin 阳性细胞数均高于正常对照组($P<0.01$), 而 VPA 治疗组各时间点 Edu 阳性细胞数及 Nestin 阳性细胞数较单纯损伤组明显增加($P<0.01$)。结论 丙戊酸对颅脑损伤大鼠海马成体 NSC 有原位激活作用。

关键词: 创伤性颅脑损伤; 丙戊酸; 大鼠; 神经干细胞

中图分类号: R394.2 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2016)06-0469-04

Effect of valproic acid on the situ activation of hippocampal adult neural stem cells in brain tissue of rats with experimental traumatic brain injury

YANG Wei-feng¹, JIN Bao-zhe², ZHANG Xin-zhong², WANG Lei¹, ZHOU Wen-ke², WANG Zhong-wei²

(1. Grade 2013 Graduate Student of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 2. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of valproic acid (VPA) on the situ activation of hippocampal adult neural stem cells (NSC) in brain tissue of rats with experimental traumatic brain injury. **Methods** Sixty-six healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group ($n=6$), simple trauma group ($n=30$) and VPA treated group ($n=30$). The rats in normal group were not given any thing. Rat model of closed head injury was established in simple trauma group and VPA treated group. The VPA treated group was interfered by intraperitoneal injecting VPA according to the daily dose of $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; the simple trauma group was intraperitoneal injected the same amount of saline to intervene. All the rats were sacrificed by decapitation at 3, 7, 14, 21, 28 days after brain injury. Immunofluorescence was employed to detect the changes of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (Edu) positive cells and nest protein (Nestin) in hippocampal dentate gyrus of each rats. **Results** The Edu and Nestin positive cells number in the hippocampal dentate gyrus of simple trauma group and VPA treated group were risen within 3 days after the damage and were risen to a peak within 21 days after the damage. At the same time, the number of Edu and Nestin positive cells of the simple trauma group and VPA treated group rats were higher than those of the normal control group; at each time point, the number of Edu and Nestin positive cells increased more significantly in the VPA treated group compared with simple trauma group ($P<0.01$). **Conclusion** VPA has situ activation on hippocampal adult NSC in brain tissue of rats with experimental traumatic brain injury.

Key words: traumatic brain injury; valproic acid; rat; neural stem cells

DOI: 10.7683/xyxyxb.2016.06.006

收稿日期: 2016-01-11

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(编号: 201203069); 河南省教育厅自然科学研究计划资助项目(编号: 12A320012)。

作者简介: 杨伟锋(1977-), 男, 河南禹州人, 硕士研究生在读, 研究方向: 神经再生基础与临床研究。

通信作者: 张新中(1957-), 男, 山西临汾人, 博士, 教授, 主要从事神经再生基础与临床研究; E-mail: xinzhong1957@163.com。

丙戊酸(valproic acid, VPA)是目前临床一线广谱抗癫痫药, 在预防和控制癫痫发作中发挥着主要作用。VPA 是分子量很小的短链脂肪酸, 由 8 个碳原子和脂肪酸支链组成, 能很好地透过血脑屏障。近年来有研究表明, VPA 在治疗脑卒中、阿尔茨海默病、帕金森病等神经系统疾病中有显著疗效^[1-4]。

作者通过制作重型颅脑损伤大鼠模型,造模成功后给予VPA进行干预,于不同时间点取材测定颅脑损伤大鼠脑组织中5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, Edu)细胞及巢蛋白(Nestin)阳性细胞的表达及其动态变化,观察VPA对颅脑损伤大鼠海马成体神经干细胞(neural stem cell, NSC)的原位激活作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康清洁级成年 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 66 只, 体质量 250 ~ 300 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证号: SCXK (京) 2012-0001, 质量合格证号: 11400700108852。

1.2 主要试剂及仪器 鼠自由落体打击器(北京智鼠多宝生物科技有限公司), Edu 组织切片试剂盒(美国 Gene Copoeia 公司), VPA(北京百灵威科技有限公司), Nestin 单克隆抗体(英国 Abcam 公司), 羊抗鼠荧光二抗、4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色反应液(美国 Gene Copoeia 公司), BM-IX 型生物组织包埋机(孝感市宏业医用仪器有限公司), Shan Don Finesse 325 型石蜡切片机(美国 Thermo 公司), 免疫荧光显微镜(ECLIPSE 55i, 日本 Nikon)。

1.3 动物分组及模型制备 健康清洁级成年 SD 雄性大鼠 66 只, 随机分为正常对照组($n=6$)、单纯损伤组($n=30$)和 VPA 治疗组($n=30$)。正常对照组大鼠不做任何处理; 单纯损伤组、VPA 治疗组大鼠以 Feeney 方法^[5-6]制作颅脑损伤模型。将大鼠置于底座, 固定头部。质量分数 10% 水合氯醛麻醉, 剪去大鼠顶枕部毛发, 常规消毒, 在顶枕部的中线偏右约 5 mm 处纵行切约 4 cm 切口, 钝性剥离软组织和骨膜, 充分暴露颅骨。在人字缝前 3 mm、颅骨中线旁 3 mm 处, 钻一直径约 5 mm 的圆形骨孔, 可见硬脑膜, 注意保护其完整完好。大鼠自由落体打击器以 25 g 打击锤从 20 cm 的高处自由落体打击, 造成大鼠闭合性颅脑损伤, 成功后骨蜡封闭骨破损区, 缝合头皮。术后 VPA 治疗组大鼠给予腹腔注入 VPA, 按每天 300 mg · kg⁻¹ 的剂量经腹腔注射给药, 连续给药至处死当天; 单纯损伤组大鼠术后经腹腔给予等量的生理盐水; 术后将大鼠分笼饲养在动物专用饲养室。

1.4 造模大鼠行为学评分及入组标准 参照大鼠神经功能评分(neurological severity scores, NSS)^[7]于术后第 1、4、7、14、21、28 天对各组大鼠神经功能进行评分。包括运动、感觉、反射及平衡能力 4 项, 最高 18 分, 最低 0 分。轻度损害: 1 ~ 6 分, 中度损

害: 7 ~ 12 分, 重度损害: 13 ~ 18 分。入组标准为术后第 1 天评分 5 ~ 15 分。

1.5 取材与制片 按分组给予 Edu 标记(参照说明书): 采用生理盐水溶解 Edu 至 0.5 g · L⁻¹, 按照 50 μg · kg⁻¹ 每只大鼠尾静脉注射 20 μL, 连续注射 2 d。将单纯损伤组及 VPA 治疗组大鼠分别在造模后第 3、7、14、21、28 d 分别取 6 只大鼠, 质量分数 10% 水合氯醛麻醉, 先用肝素化生理盐水 10 U · mL⁻¹ 快速灌注, 然后换 40 g · L⁻¹ 多聚甲醛灌注, 至肢体抽搐, 断头取脑, 冲洗脑表面积血, 40 g · L⁻¹ 多聚甲醛固定过夜, 以视交叉为中心向后取 2 mm 厚的冠状脑片, 充分固定后常规脱水、透明、石蜡包埋, 用石蜡切片机制作厚 5 μm 冠状切片, 每个标本取 3 张片, 行 Edu 及 Nestin 免疫荧光染色^[8]。

1.6 Edu 及 Nestin 免疫荧光染色 采用 Edu 组织切片试剂盒进行 Apollo 染色, 严格按照说明书进行操作, 然后滴加 100 μL 1 × DAPI 染色反应液, 避光, 室温孵育 30 min 后, 弃染色反应液, 无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS) 清洗 1 ~ 3 次, 洗脱 DAPI 反应液, 检测 Edu 阳性细胞。采用柠檬酸盐抗原修复液进行抗原修复后, PBS 清洗 1 ~ 3 次, 山羊血清 37 °C 封闭 30 ~ 60 min, 抗 Nestin 抗体 1 : 50 稀释成工作浓度后孵育一抗, 37 °C 作用 30 min, 0.01 mol · L⁻¹ 磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffered saline with tween-20, PBST) 缓冲液震荡漂洗 3 次, 每次 5 min, 加 1 : 1 000 羊抗鼠荧光二抗, 37 °C 湿盒避光作用 30 min, 0.01 mol · L⁻¹ PBST 避光漂洗 3 次, 每次 5 min, 甘油缓冲液封片。在显微镜上同一视野内分别用 488 nm 和 555 nm 波长进行激发检测。荧光显微镜下观察各组海马区齿状回阳性细胞数, 每只大鼠随机选取海马齿状回区各 3 张切片, 每张切片每高倍镜下计数 5 个视野并拍照, 取其均值作为阳性细胞数^[9]。

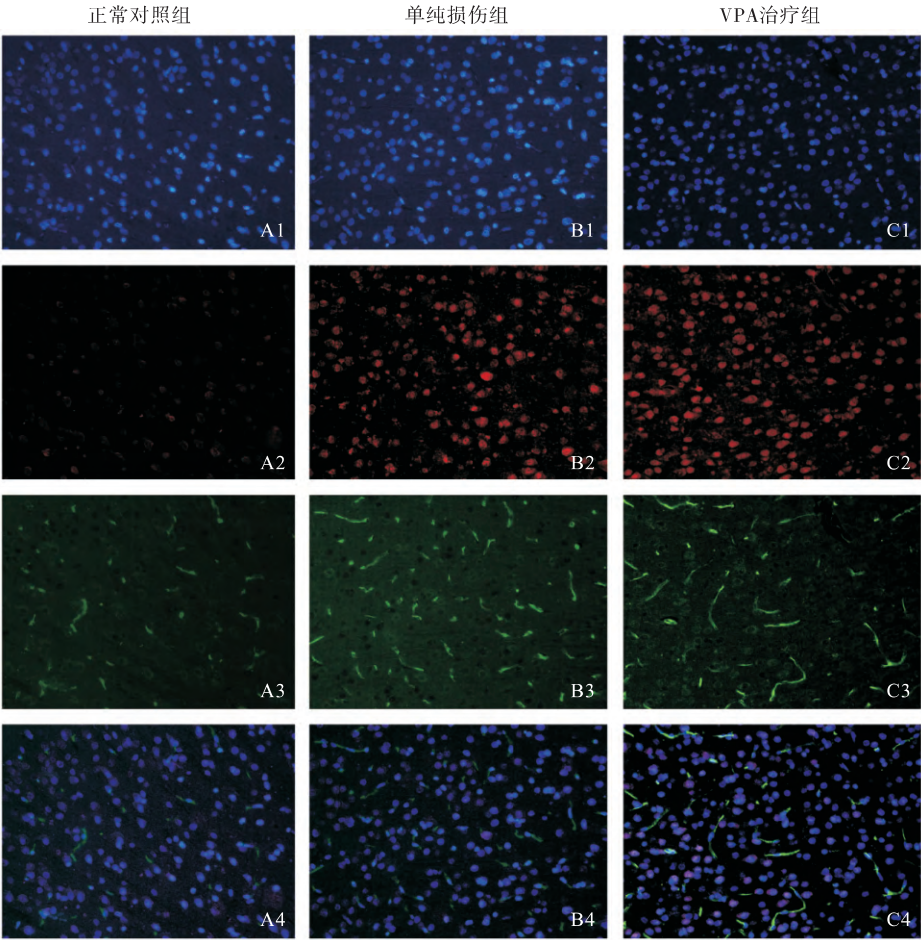
1.7 统计学处理 应用 SPSS 19.0 对数据进行处理, 计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用析因的方差分析进行检验, 组间比较用 LSD 检验方法, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 3 组大鼠脑组织齿状回 Edu 阳性细胞比较 结果见图 1 和表 1。单纯损伤组和 VPA 治疗组大鼠海马齿状回内 Edu 阳性细胞数于造模后第 3 天开始增高, 于造模后第 21 天达高峰, 在同一时间点单纯损伤组和 VPA 治疗组大鼠 Edu 阳性细胞数均高于正常对照组($P<0.01$); 而 VPA 治疗组大鼠各时间点 Edu 阳性细胞数较单纯损伤组明显增加($P<0.01$)。

2.2 3 组大鼠脑组织齿状回 Nestin 阳性细胞比较
结果见图 1 和表 1。单纯损伤组和 VPA 治疗组大
鼠海马齿状回内 Nestin 阳性细胞数于造模后第 3 天
开始增高,于造模后第 21 天达高峰,在同一时间点

单纯损伤组和 VPA 治疗组 Nestin 阳性细胞均高于
正常对照组($P<0.01$);而 VPA 治疗组大鼠各时间
点 Nestin 阳性细胞数较单纯损伤组明显增加($P<$
 0.01)。



A1、B1、C1: DAPI 染色后的细胞核; A2、B2、C2: Edu 阳性细胞; A3、B3、C3: Nestin 阳性细胞; A4、B4、C3: A1 ~ A3、B1 ~ B3、C1 ~ C3 合并图。

图 1 正常对照组与单纯损伤组及 VPA 治疗组 14 d 时 Edu 及 Nestin 阳性细胞数比较

Fig. 1 Comparison of Edu and Nestin positive cells number between normal control group and 14 days of simple trauma group

表 1 各组不同时间点 Edu 和 Nestin 阳性细胞数比较

Tab. 1 Comparison of different time points of Edu and Nestin positive cells number in the different groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | Edu | Nestin |
|----------|---|---------------------------|---------------------------|
| 正常对照组 | | | |
| 造模后 3 d | 6 | 0.53 ± 0.04 | 0.60 ± 0.11 |
| 造模后 7 d | 6 | 0.53 ± 0.04 | 0.60 ± 0.11 |
| 造模后 14 d | 6 | 0.53 ± 0.04 | 0.60 ± 0.11 |
| 造模后 21 d | 6 | 0.53 ± 0.04 | 0.60 ± 0.11 |
| 造模后 28 d | 6 | 0.53 ± 0.04 | 0.60 ± 0.11 |
| 单纯损伤组 | | | |
| 造模后 3 d | 6 | 1.99 ± 0.08 ^a | 1.17 ± 0.18 ^a |
| 造模后 7 d | 6 | 2.20 ± 0.12 ^a | 1.40 ± 0.04 ^a |
| 造模后 14 d | 6 | 2.42 ± 0.08 ^a | 2.00 ± 0.09 ^a |
| 造模后 21 d | 6 | 3.07 ± 0.17 ^a | 2.44 ± 0.24 ^a |
| 造模后 28 d | 6 | 2.79 ± 0.22 ^a | 2.37 ± 0.14 ^a |
| VPA 治疗组 | | | |
| 造模后 3 d | 6 | 3.89 ± 0.16 ^{ab} | 1.48 ± 0.08 ^{ab} |
| 造模后 7 d | 6 | 4.06 ± 0.16 ^{ab} | 2.36 ± 0.18 ^{ab} |
| 造模后 14 d | 6 | 4.59 ± 0.12 ^{ab} | 2.66 ± 0.24 ^{ab} |
| 造模后 21 d | 6 | 6.20 ± 0.11 ^{ab} | 3.37 ± 0.23 ^{ab} |
| 造模后 28 d | 6 | 6.10 ± 0.18 ^{ab} | 3.27 ± 0.18 ^{ab} |

注: 与正常对照组同一时间点比较^a $P<0.01$; 与单纯损伤组同一
时间点比较^b $P<0.01$ 。

3 讨论

动物实验研究证明,颅脑损伤后可诱导海马齿
状回等部位内源性 NSC 的分裂增殖,且多数可分化
为成熟颗粒神经元^[10-11]。但这种由创伤诱导的神
经干细胞再生往往不能改善脑外伤所造成的损害。
VPA 作为组蛋白去乙酰化酶 (histon deacetylase
HDAC) 抑制剂,对中枢神经系统损伤后局部炎症反
应有抑制作用^[8]。近年来,有研究表明,无论在体
外还是在体内,VPA 均具有保护细胞和抗细胞凋亡
的作用^[12]。

Edu 是一种胸腺嘧啶核苷类似物,能够在细胞
增殖时期代替胸腺嘧啶 (T) 渗入正在复制的 DNA
分子中,通过基于 Edu 与 Apollo® 荧光染料的特异
性反应快速检测细胞 DNA 复制活性,适用于细胞增
殖、细胞分化、生长与发育、DNA 修复、病毒复制、细

胞标记示踪等方面的研究。与传统的 5-溴脱氧尿嘧啶核苷相比,其分子量小,更容易穿过细胞膜,能有效在组织间进行渗透,从而实现快速处理组织和器官的切片标本,而且在检测时不需要对本标进行变性处理,不会出现因变性引起 DNA 结构改变,因此,有效保证了 DNA 结构的完整性^[13-15],增加了检测的灵敏度和准确度。Nestin 属于胚胎性第 VI 类中间丝蛋白,主要定位于细胞基质内,在中枢神经系统发育中仅在胚胎期表达,出生后即停止表达^[16-17];未分化和具有分裂能力的神经前体细胞内有丰富的 Nestin 阳性表达,随着其向神经元和神经胶质细胞的进一步分化,Nestin 的表达即逐渐降低,而被星形胶质细胞标志物即胶质纤维酸性蛋白、波形蛋白或神经丝所替代。而颅脑损伤可引起成体脑内 NSC 增殖,表现为 Nestin 表达增高,所以多将 Nestin 用于鉴定损伤后中枢神经系统内 NSC 的增殖变化^[16-17]。因此,本实验以 Edu 和 Nestin 作为观察指标来研究 VPA 对大鼠颅脑损伤后海马齿状回 NSCs 增殖变化的影响。

本实验应用 VPA 作用于颅脑损伤大鼠,于不同时间点观察 Edu 及 Nestin 阳性细胞的表达情况。实验结果显示,应用该药物后 Edu 及 Nestin 阳性细胞数与正常对照组及单纯损伤组比较明显增加;VPA 治疗组大鼠 Edu 及 Nestin 阳性细胞数在应用 VPA 3 d 后比单纯损伤组稍有增加,之后增加渐趋明显,至第 21 天达高峰,28 d 与 21 d 比较不再增加。从而说明 VPA 对颅脑损伤大鼠海马成体 NSC 有原位激活作用,在颅脑损伤前 21 d 应用该药对 NSC 的激活作用明显,之后作用逐渐减弱,这为临床应用用药时间窗的确定提供了参考依据。另外,从实验中也可以看到,颅脑损伤后不管是单纯损伤组还是 VPA 治疗组,海马齿状回 Edu 及 Nestin 阳性细胞数均比正常对照组大鼠明显增加,这说明颅脑损伤对大鼠海马成体 NSC 也有原位激活作用,而且 VPA 与颅脑损伤有协同作用,共同促进大鼠海马成体 NSC 原位激活的作用。但 VPA 促进 NSC 增殖的具体机制以及其动态迁移的过程尚不清楚,还有待于进一步的系统研究。

参考文献:

- [1] 郭熙雄,张美彪.丙戊酸钠治疗急性脑出血临床疗效观察[J].河北医科大学学报,2013,34(5):519-521.

- [2] 檀亚航,张渝,卢永良,等.丙戊酸钠治疗脑缺血机制的研究进展[J].中风与神经疾病杂志,2013,30(10):956-957.
- [3] 陈彩霞,黄寅平,吴震卿.丙戊酸钠合并奥氮平治疗阿尔茨海默病精神行为症状临床观察[J].实用老年医学,2009,23(6):432-433,440.
- [4] 张玉梅,吴雪飞,于德钦,等.在小鼠帕金森病模型中观察丙戊酸钠对多巴胺神经元及 GDNF 表达的影响[J].神经解剖学杂志,2011,27(1):1-7.
- [5] 田贵华,谭纯,姚海江,等.针刺对大鼠颅脑损伤后轴突导向因子 Slit2 表达的影响[J].中华中医药杂志,2011,26(5):1197-1200.
- [6] 刘胜,王诚,刘远新,等.颅脑损伤急性期灌注压变化后引起兔脑神经元凋亡的研究[J].中华实验外科杂志,2009,26(1):127.
- [7] LI S,WEI M,ZHOU Z,et al. SDF-1 alpha induces angiogenesis after traumatic brain injury[J].Brain Res,2012,1444:76-86.
- [8] 金保哲,李武雄,司昊天,等.丙戊酸对大鼠颅脑损伤局部炎症反应的抑制作用[J].中华实验外科杂志,2014,31(9):1910-1912.
- [9] 叶建亚,李聪慧,唐蔚东,等.巢蛋白及性别决定基因高迁移率组蛋白在 SAMP8 小鼠穹隆下器的表达及意义[J].解剖学报,2014,45(2):176-180.
- [10] 林惠,杨万章.丹参注射液对脑梗死大鼠 SVZ 干细胞增殖作用的研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2014,12(3):350-352.
- [11] 王卫东,程毓华,王津存,等.成年大鼠弥漫性脑损伤后海马齿状回神经元再生动态变化的实验研究[J].中国临床康复,2002,6(19):2864-2865.
- [12] 李凌云,秦正红,梁中琴.丙戊酸盐的神经保护作用及其机制的研究进展[J].中国药理学通报,2007,23(3):295-298.
- [13] AMES C P,SMITH J S,PREUL M C,et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in an experimental model of spinal fusion in a radiated area[J].Spine (Phila Pa 1976),2005,30(23):2585-2592.
- [14] COURTES S,VERNEREY J,PUJADAS L,et al. Reelin controls progenitor cell migration in the healthy and pathological adult mouse brain[J].PLoS One,2011,6(5):e20430.
- [15] 转黎,王涛,李明超,等.氯甲基苯甲酰胺和 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷标记示踪大鼠脂肪干细胞的研究[J].中华实验外科杂志,2013,30(8):1701-1703.
- [16] UCHIDA K,OKANO H,HAYASHI T,et al. Grafted swine neuroepithelial stem cells can form myelinated axons and both efferent and afferent synapses with xenogeneic rat neurons[J].J Neurosci Res,2003,72(6):661-669.
- [17] AN Y H,WAN H,ZHANG Z S,et al. Effect of rat Schwann cell secretion on proliferation and differentiation of human neural stem cells[J].Biomed Environ Sci,2003,16(1):90-94.

(本文编辑:杨博 英文编辑:杨博)