

当归对宫内缺氧新生大鼠神经干细胞增殖、分化的影响*★

陈旭东¹, 赵四敏¹, 华新宇¹, 余 鸿²

Angelica effects on proliferation and differentiation of neural stem cells from neonatal rats with intrauterin hypoxia

Chen Xu-dong¹, Zhao Si-min¹, Hua Xin-yu¹, Yu Hong²

¹Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan Province, China; ²Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Chen Xu-dong★, Master, Lecturer, Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan Province, China Lichenyue3@yahoo.com.cn

Correspondence to: Yu Hong, Master, Professor, Master's supervisor, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Supported by: a Grant of Department of Science and Technology of Sichuan Province, No. [2005]14, 05JY029-103*

Received:2010-01-21
Accepted:2010-04-05

¹漯河医学高等专科学校, 河南省漯河市 462002; ²泸州医学院, 四川省泸州市 646000

陈旭东★, 女, 1974年生, 河南省叶县人, 汉族, 2008年泸州医学院毕业, 硕士, 讲师, 主要从事发育神经生物学的研究。Lichenyue3@yahoo.com.cn

通讯作者: 余鸿, 硕士, 教授, 硕士生导师, 泸州医学院, 四川省泸州市 646000

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:1673-8225(2010)27-05050-04

收稿日期: 2010-01-21
修回日期: 2010-04-05
(20100121005/W·Q)

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have found that intrauterin hypoxia could stimulate proliferation of neural stem cells (NSCs) of neonatal rats. The proliferation reached a peak during 6-hours hypoxia; proliferation also expressed in 9 hours, but the ability began to decline, but the neural stem cells showed necrosis or apoptosis when hypoxia up to 12 hours. However, what effect will have on neural stem cells with the time and day extension?

OBJECTIVE: To study the effect of intrauterin hypoxia on the proliferation and differentiation of NSCs from neonatal rats and the protective role of angelica injection on NSCs under hypoxia.

METHODS: Pregnant Sprague Dawley rats were randomly divided into control group, hypoxia group and angelica group. Pregnant rats from angelica group and hypoxia group were placed in the three-gas incubator from the beginning of pregnant 14th days to make the injured brain neonatal rat model. One hour ago, the pregnant rats of the two groups received injections respectively angelica injection and normal saline through the caudal vein of rats. Hypoxia was not performed in the control group. The remaining was identical to hypoxia group. Their brain tissues of neonatal rats were immediately taken out after childbirth. The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neurone specific enolase (NSE) of neonatal rats was studied with immunohistochemistry and the results were analyzed by image processing system.

RESULTS AND CONCLUSION: ①Expression of GFAP-positive cells in the hippocampus of neonatal rats in the hypoxia group was higher than control group. However, expression of NSE-positive cells was less in the hypoxia group than in the control group. ②Expression of GFAP-positive cells in the hippocampus of neonatal rats was less in the angelica group than in the hypoxia group, whereas expression of NSE-positive cells was higher in the angelica group than in the control group. Results have indicated that hypoxia could stimulate the proliferation of NSCs of neonatal rats and differentiation of NSCs into glial cells. Meanwhile, the number of neuron in hippocampus CA3 area was decreased. The ability of proliferation and differentiation of NSCs into glial cells after hypoxia was attenuated by angelica injection. At the same time, angelica injection could relieve neuron decrement. These suggested that angelica injection has a certain protective effect on nervous system of neonatal rats with intrauterine hypoxia.

Chen XD, Zhao SM, Hua XY, Yu H. Angelica effects on proliferation and differentiation of neural stem cells from neonatal rats with intrauterin hypoxia. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(27): 5050-5053. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 实验小组前期研究发现孕鼠宫内缺氧可刺激胎鼠神经干细胞的增殖, 缺氧 6 h 时增殖达高峰, 在 9 h 也表现增殖, 但能力开始下降。而缺氧达 12 h 时即表现为坏死或凋亡, 但随缺氧天数的延长及时段的不同, 对神经干细胞的影响又如何?

目的: 进一步探讨宫内缺氧对新生大鼠神经干细胞增殖、分化的影响及当归注射液的保护作用。

方法: 孕 SD 大鼠随机分为对照组、缺氧组和当归治疗组。孕 14 d 开始将当归组与缺氧组孕鼠置于三气培养箱中, 制作缺氧性脑损伤新生鼠模型, 此前 1 h 分别给予当归注射液和生理盐水尾静脉注射, 对照组不缺氧, 余同缺氧组。孕鼠分娩后立即取新生鼠大脑组织, 经胶质纤维酸性蛋白、神经元特异性烯醇化酶免疫组织化学染色后行图像分析。

结果与结论: ①缺氧组新生鼠海马胶质纤维酸性蛋白免疫组织化学阳性细胞的表达较相应对照组增加; 而神经元特异性烯醇化酶免疫组织化学阳性细胞的表达较对照组减小。②当归治疗组新生鼠海马胶质纤维酸性蛋白免疫组织化学阳性细胞的表达较相应缺氧组减少; 而神经元特异性烯醇化酶免疫组织化学阳性细胞的表达较对照组增大。结果表明, 一定程度的缺氧可刺激神经干细胞增殖, 并可刺激神经干细胞向神经胶质细胞分化, 以及导致神经元的减少; 当归注射液可减弱由于缺氧导致的神经干细胞的增殖和向胶质细胞分化的能力, 并可缓解神经元的减少, 提示当归可能对缺氧大鼠神经系统有一定的保护作用。

关键词: 当归; 神经干细胞; 缺氧; 增殖; 分化; 大鼠
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.27.025

陈旭东, 赵四敏, 华新宇, 余鸿. 当归对宫内缺氧新生大鼠神经干细胞增殖、分化的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(27):5050-5053. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

宫内缺氧是胚胎发育中的常见症, 是造成脑瘫、癫痫及智力发育迟缓或智力低下的重要

原因^[1], 研究表明新生儿缺氧引起的上述表现与中枢中神经元及神经干细胞的异常改变有关^[2], 研究发现缺氧能诱导神经元死亡, 但却能诱导神经干细胞增殖。实验小组前期研究发现孕鼠宫内缺氧可刺激胎鼠神经干细胞的增殖^[3], 缺氧

6 h 时增殖达高峰, 在 9 h 也表现增殖, 但能力开始下降。而缺氧达 12 h 时即表现为坏死或凋亡, 但随缺氧天数的延长及时段的不同, 对神经干细胞的影响又如何? 在宫内缺氧状态下对神经干细胞的这种研究还未见报道。实验通过建立宫内缺氧模型, 观察在体状态下缺氧对新生大鼠神经干细胞增殖、分化的影响, 并观察中药当归对缺氧状态的调节, 为临床长期观察缺氧对新生鼠的影响和治疗宫内缺氧提供实验和理论依据。

1 材料和方法

设计: 随机对照、细胞分子生物学实验。

时间及地点: 于 2007-07/2008-12 在泸州医学院组胚教研室完成。

材料: 健康成年雌性 SD 大鼠 21 只, 体质量 220~260 g(泸州医学院动物中心提供, 许可证号: 四川省实验动物管理质量第 17 号)。实验过程中对动物处置符合 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[4]。

试剂及主要仪器:

试剂及主要仪器	来源
小鼠抗神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、小鼠抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)	CHEMICON 公司
SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒(棕黄色)	武汉博士德公司
250g/L 的当归注射液(批号 060926)	武汉大学附属第二医院药剂科
OLYMPUS Bx-70 荧光显微镜成像系统	日本 OLYMPUS
德国莱卡切片机、三气培养箱	美国 REVC0 公司

实验方法:

动物配种与分组: SD 大鼠 21 只。分别与一只雄鼠合笼饲养配种, 于第 2 日早晨发现雌鼠阴栓记为妊娠 0 d, 记下日期, 取出雄鼠, 单独饲养雌鼠至孕期 14 d。将孕鼠随机分为: 对照组 5 只、缺氧组 8 只和当归治疗组 8 只。

宫内缺氧模型的制备^[5-7]: 缺氧组孕鼠自孕第 14 d 开始每天 1 次经尾静脉注射生理盐水(连续 7 d), 然后立即放入(氧体积分数 13%, CO₂ 体积分数 0.03%~0.04%, 温度 25 ℃, 相对湿度: 75%~80%)的智能型三气培养箱, 每天上午缺氧 2 h, 连续 3 d(孕期第 14~16 天); 当归治疗组注射当归注射液 2 mL/(kg·d), 1 次/d, 其余同缺氧组; 对照组不缺氧, 余同缺氧组。

取材、石蜡切片与免疫组织化学: 孕鼠分娩后取新生鼠的脑组织, 放入 40 g/L 的中性甲醛固定, 每组随机选取 20 个新生鼠大脑, 然后进行常规石蜡包埋, 经海马冠状

切面切片(片厚 4 μm), 切片脱蜡至水, 各切片作 NSE(1:400)、GFAP(1:600)免疫组织化学染色(常规链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法)。

结果分析与判断: 图像分析采用 Image-Pro Plus6.0 图像分析系统, 在 400 倍下进行观察, 每张切片在海马齿状回颗粒层相同区域选取 3 个 7 cm×4 cm 大小的不同视野用 ImagePro-Plus 6.0(IPP6.0)图像分析软件进行图像分析, 取同 1 切片的 4 张照片的积分吸光度的平均值为该例标本的代表值, 测得每张照片中方框内阳性结果的积分吸光度(IA), 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

主要观察指标: 新生鼠大脑海马 CA3 区 NSE、GFAP 阳性细胞形态学分析及其积分吸光度值的比较。

设计、实施、评估者: 由第二作者设计, 全部作者实施并评估。

统计学分析: 由第二作者用 SPSS 13.0 统计处理软件完成, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较用方差分析, 两两比较用 LSD 法检验。

2 结果

2.1 各组新生大鼠海马 CA3 区 GFAP 阳性细胞染色结果 GFAP 免疫组织化学阳性细胞分布在锥体细胞层, 分子层, 多形细胞层, 胞质染为棕黄色, 对照组阳性细胞浅染, 数量少, 见图 1; 缺氧组阳性细胞染色明显增强, 数量较对照组增多, 见图 2。

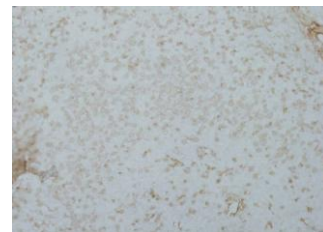


Figure 1 Glial fibrillary acidic protein-positive cells in control group (IHC, x400)
图 1 对照组 GFAP 阳性细胞(IHC, x400)

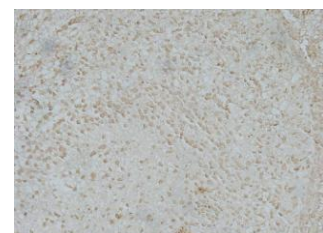


Figure 2 Glial fibrillary acidic protein-positive cells in hypoxia group (IHC, x400)
图 2 缺氧组 GFAP 阳性细胞(IHC, x400)

当归组阳性细胞染色较相应缺氧组减弱, 数量减

少, 见图 3, 各组积分吸光度值见, 见表 1。

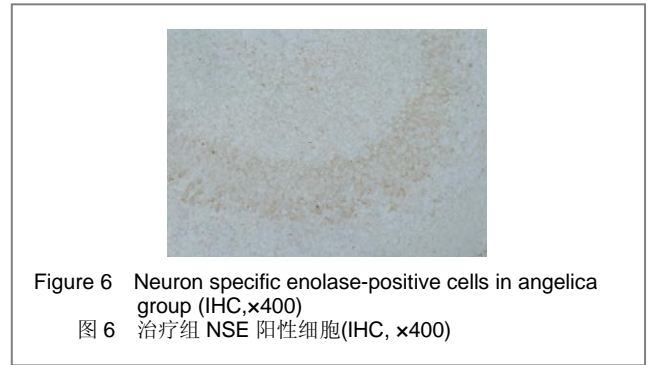
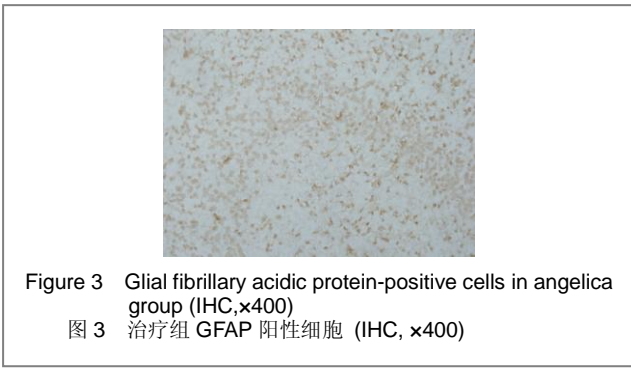
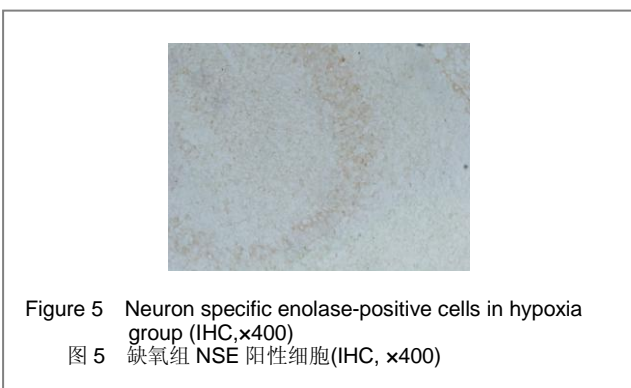
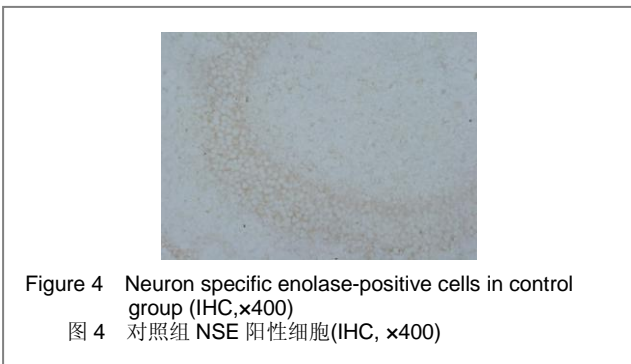


表 1 各组 GFAP、NSE 免疫组织化学阳性细胞 IA 值
Table 1 Integral absorbance (IA) of glial fibrillary acidic protein and neuron specific enolase expression in the cytoplasm of positive cell in each group using immunohistochemistry (x±s, n=20, IA)

Group	Glial fibrillary acidic protein	Neuron specific enolase
Control	7.24±1.78	6.24±1.59
Hypoxia	16.78±4.02 ^a	4.90±1.10 ^a
Angelica	9.78±2.79 ^b	6.92±2.60 ^b

^aP < 0.05, vs. control group; ^bP < 0.05, vs. hypoxia group

2.2 各组新生大鼠海马 CA3 区 NSE 阳性细胞染色结果 对照组 NSE 免疫组织化学阳性细胞分布于锥体细胞层, 分子层, 多形细胞层, 胞质染为棕黄色, 见图 4; 与对照组相比缺氧组阳性细胞染色减弱, 数量减少, 见图 5; 与缺氧组相比当归治疗组阳性细胞染色增强, 数量增多, 见图 6, 各组积分吸光度值见表 1。



3 讨论

神经系统细胞对缺氧是最为敏感的, 因此, 宫内缺氧必然影响胚胎神经系统中神经干细胞的增殖、分化。目前比较成功的宫内缺氧的动物模型是 Bjelke 法^[8], 此法要用剖腹手术和麻醉药, 对胚鼠可能造成新的影响。为便于控制实验条件, 本实验在前期的模型的基础上^[9], 以智能型三气培养箱取代自制的缺氧缸制成的持续低张性缺氧的动物模型^[5-7]。与 Bjelke 法相比, 避免了剖腹手术和麻醉药对实验的干扰。与本实验组的前期方法相比, 避免了氧气, 二氧化碳浓度、温度和湿度波动对实验结果的干扰。

神经干细胞增殖、分化受自身基因调控和外来信号调控两种机制的影响^[10-13]。研究表明低氧作为一种外来信号能促进神经干细胞的增殖和分化, 而神经干细胞的增殖、分化是神经系统损伤修复的关键步骤。Iwai 等^[14]利用沙土鼠脑缺血/再灌注模型, 发现实验组动物 5 d 后海马 Brdu 阳性细胞开始增加, 10 d 左右达高峰, 表明通过改变体内环境可激活自体神经干细胞, 并诱导其增殖、分化来修复损伤。本课题前期研究中观察到缺氧 3 d (2 h/d) 组新生大鼠巢蛋白免疫组织化学反应增强、阳性细胞增多^[5], 提示一定时限、程度的缺氧可以刺激神经干细胞的增殖、分裂, 这与 Yin 等^[15]研究的一定时限 (3 d) 低氧可促进新生鼠的神经干细胞的增殖和分化是基本一致的。

已有研究表明, 胶质细胞活化是中枢神经系统在多种病理生理条件下的常见反应, 胶质细胞通过不同程度的增生与聚集, 分泌神经营养因子和生长因子, 对神经元的分化、功能的维持以及创伤后神经元的可塑性变化有重要的影响^[16-19], 星形胶质细胞在神经系统发育时期具有引导神经细胞迁移到目的地去的作用。目前研究发现, 缺氧时可以刺激缺氧诱导因子, 尤其是缺氧诱导因子 1 在大脑皮质、海马及胎盘有显著增高^[20], 神经系统对低氧最敏感, 即使有缺氧诱导因子 1 的调节, 轻度低氧也可能影响神经元功能^[21]。辛颖等^[22]研究发现, 新生大鼠缺血缺氧后 1 d 即可见 FJB 阳性细胞(变性的神经

元), 3 d 阳性细胞增多, 5 d 达高峰, 同时 GFAP 强表达。本实验结果发现, 缺氧组海马 CA3 区 NSE 阳性物质表达比对照组明显减弱, 说明神经元出现了坏死和/或凋亡, 经神经干细胞分化、补充, 经缺氧后 7 d 的补充修复, 到出生时神经元数量仍然明显少于对照组, 而 GFAP 阳性物质表达则明显增多, 说明缺氧刺激了新生大鼠大脑中神经干细胞向胶质细胞方向分化, 由此推测缺血缺氧作为损伤因素刺激神经干细胞的分化可能是对缺血缺氧损伤的一种保护反应。说明宫内缺氧后星形胶质细胞增殖活化, 来平衡缺氧后对神经系统的损伤而发挥神经保护作用, 这与杨忠等^[23]研究发现 GFAP 在低氧后 3 d 和 7 d 两个时相增多, 且主要分布在新皮质、海马、纹状体及室管膜下层等区域的结果基本一致。

当归为血中圣药, 目前已证明当归对心血管系统、造血系统、免疫系统、抗氧化和清除自由基等方面均有肯定的药理作用^[24-25]。此外, 在神经保护方面, Kang 等^[26]研究发现当归的提取物具有高活性的神经保护作用, 通过多种机制对谷氨酸受体引起的神经损伤起到保护作用, 还能有效的减少过度活化的谷氨酸受体引起 Ca^{2+} 的内流, 除此还有效地增加谷胱甘肽量, 及细胞抗氧化能力和谷胱甘肽过氧化物酶活性, 减少氧化应激引起的细胞损伤。本实验治疗组新生鼠大脑 GFAP 较相应缺氧组新生大鼠的减小, 而 NSE 较相应缺氧组增多, 综上所述, 说明当归注射液减弱了缺氧刺激引起的神经干细胞的增殖和分化, 当归对一定时限的宫内缺氧新生鼠的神经干细胞的增殖和分化有保护作用, 其机制有待进一步研究。

当归可能通过扩张血管、抑制子宫平滑肌收缩, 从而改善胚胎大鼠的缺氧状态, 并通过清除氧自由基, 减少神经干细胞的钙超载, 从而导致神经干细胞内 Nestin 合成减少, 即减弱神经干细胞的增殖。另外当归注射液通过扩张血管、抑制子宫平滑肌收缩, 从而改善胚胎大鼠脑缺氧状态, 改善神经元代谢, 而起到神经保护作用。

4 参考文献

- [1] Ehrenkranz RA, Walsh MC, Vohr BR, et al. Validation of the national insitutes of health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics*.2005;116(6): 1353-1360.
- [2] Michael A, vail der K, Floris G, et al. Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in vitro and in vivo experimental models for hypoxia / ischemia. *Brain Research Reviews*.2008;59(1) 22-33.
- [3] Chen Y,Cao B,Mei XM,et al.Shizhen Guoyi Guoyao. 2009; 20(7): 1642-1644.
陈滢, 曹兵, 梅欣明, 等.不同宫内缺氧时程对胎鼠神经干细胞增殖增殖的影响及当归保护作用[J]. 时珍国医国药, 2009; 20(7): 1642-1644.
- [4] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见.2006-09-30.
- [5] Mei XM,Liu DY,Zhao F,et al.Sichuan Dongwu. 2010; 29(1): 116-119.
梅欣明, 刘敦玉, 赵锋, 等.当归对宫内缺氧新生大鼠大脑皮质神经与VEGFM RNA表达的影响[J].四川动物, 2010, 29(1): 116-119.
- [6] Hesheng Yue,Xudong Chen, Hong Yu,et al. Effect of Angelica sinensis on neural stem cell proliferation in neonatal rats following intrauterine hypoxia. *Neural Regeneration Research*.2008; 3(7):733-736.
- [7] Zhong XM,Chen XD,Zhong M,et al.Shiyong Erke Linchuang Zazhi. 2008; 23(2): 146-156.
钟小明, 陈旭东, 钟梅, 等.宫内缺氧对幼年大鼠神经干细胞增殖及学习记忆能力的影响[J].实用儿科临床杂志, 2008, 23(2): 146-156.
- [8] Bjelk B,Andersson K,Ogren SO,et al.Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission.*Brain Res*.1991;543(1):1-9.
- [9] Yu H,Wu YL,Cheng JY,et al.Shizhen Guoyi Guoyao. 2006; 17(7): 1144-1145.
余鸿, 吴雨岭, 程基焱, 等.当归注射液对宫内缺氧胎鼠大脑皮质神经元的保护作用[J].时珍国医国药, 2006,17(7): 1144-1145.
- [10] Pietras A,Gisselsson D,Ora L,et al.High levels of HIF-2 alpha highlight an immature neural crest-like neuroblastoma cell cohort located in a perivascular niche,*J Pathol*.2008; 214(4):482-488.
- [11] Bourdeaut F,Ribeiro A,Paris R,et al.In neyroblastic tumours,Schwann cells do not harbour the genetic alterations of neuroblasts but may nevertheless share the same clonal origin *Oncogene*.2008; 27(21):3066-3071.
- [12] Wang XL,Yang YJ,Xie M,et al.Proliferation of neural stem cells correlateds with Wnt-3 protein in hypoxic-ischemic neonate rats after hyperbaric oxygen therapy.*Neuroreport*.2007; 18(16):1753-1756.
- [13] Chen ZY,Asavaritikrai P,Prchal JT, et al.Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation.*J Biol Chem* 2007;282(35):25875-25883.
- [14] Iwai M, Hayashi T ,Zhang WR ,et al.Induction of highly polysialylated neural cells adhesion molecule (PSA-NCAM)in postischemia gerbil hippocampus mainly dissociated with neural stem cells proliferation.*Brain Res*.2001; 902(2):288-293.
- [15] Yin YJ, Ju R, Feng ZC. Changes of neural stem cells in neonatal rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*.2005; 43(8): 572- 575
- [16] Mani N, Khaibullina A, Krum JM,et al.Astrocyte growth effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) application to perinatal neocortical explants: receptor mediation and signal transduction pathways.*Exp Neurol*. 2005;192(2):394-406.
- [17] Xu Q, Wang S, Jiang X,et al.Hypoxia-induced astrocytes promote the migration of neural progenitor cells via vascular endothelial factor, stem cell factor, stromal-derived factor-1alpha and monocyte chemoattractant protein-1 upregulation in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(7):624-631.
- [18] Shetty AK, Hattiangady B, Shetty GA,et al.Stem/progenitor cell proliferation factors FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: role of astrocytes.*Glia*.2005;51(3):173-186.
- [19] Krum JM, Mani N, Rosenstein JM.Roles of the endogenous VEGF receptors flt-1 and flk-1 in astroglial and vascular remodeling after brain injury. *Exp Neurol*. 2008;212(1):108-117.
- [20] Trollmann R, Strasser K, Keller S,et al.Placental HIFs as markers of cerebral hypoxic distress in fetal mice.*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.2008; 295(6):R1973-1981.
- [21] Zhou L,Del Villar K, Dong Z, et al.Neurogenesis response to hypoxia- induced cell death.map kinase signal transduction mechanisms.*Brain Res*.2004; 1021(1):8-19.
- [22] Xin Y, GEORGE A. WERTHER, et al.Zhongguo Yike Daxue Xuebao. 2006; 35(1):1-3.
辛颖, GEORGE A. WERTHER, 等.新生大鼠缺血缺氧后不同脑区神经元变性的动态观察[J].中国医科大学学报, 2006, 35(1):1-3.
- [23] Yang Z,Zhang JH,Huang QY,et al.Zhongguo Yingyong Shenglixue Zazhi. 2006; 22(4):393-398.
杨忠, 张金海, 黄庆愿, 等.模拟高原低氧对大鼠脑内神经胶质细胞的影响[J].中国应用生理学杂志, 2006; 22(4):393-398.
- [24] Chan SS,Chen TY,Lin G.Relaxation effects of ligustilide and senkyunolide A,two main constituents of ligusticum Chuan xiong,in rat isolated aorta.*Neuropharmacology*.2007; 111(3):677-680.
- [25] Jia M,Yang TH,Yao XJ,et al.Anti-oxidative effect of Angelica polysaccharide sulphate.*Zhong Yao Cai*.2007;30(2):185-188.
- [26] Kang SY, Kim YC,Decursin and decursin protect primary cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurotoxicity.*J Pharm Pharmacol*.2007; 59(6):863-870.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 四川省科技厅基金资助(川科技[2005]14号, 05JY029-103)

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。