

Semaphorin 3A 在局灶性脑缺血大鼠脑组织中的表达特征及通络救脑注射液的保护作用*

□唐卉凌** 李澎涛** 张 玮 潘彦舒

Alesheikh Peiman 狄 波 周 莉

(北京中医药大学基础医学院 北京 100029)

李 忻 杨 鑫 (中日友好医院临床研究所 北京 100029)

摘 要:目的:观察局灶性脑缺血损伤后大鼠脑组织中 Semaphorin 3A(Sema 3A)蛋白表达水平,以及通络救脑注射液对该因子表达的影响。方法:以线栓法制作大鼠大脑中动脉缺血模型(MCAO),设正常组、模型组及通络救脑注射液组,分别在造模后 12h、24h、3d、7d,共 4 个时间点采取动物脑组织,测定脑梗死体积及脑组织中 GAP43 的表达水平,及 Sema 3A 的表达部位和蛋白表达水平。结果:通络救脑注射液能够减少脑缺血动物脑梗死体积,与模型组相比均有显著差异。结论:大鼠脑缺血损伤后 Sema 3A 表达增加与神经元的坏死有相关性,通络救脑注射液能够降低其表达水平,对缺血损伤的脑组织发挥保护作用。

关键词:脑缺血损伤 通络救脑注射液 Semaphorin 3A

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.03.010

在神经元发育过程中,某些具有抑制性的诱导因子发挥了非常重要的作用。近 10 余年的研究发现,这些因子在成年动物脑损伤后的神经元轴突再生时同样有抑制作用。尤其是神经生长抑制因子(Semaphorin, Sema)及其受体(NRP)已被证实是体外

实验中神经元轴突再生的主要抑制物和神经元死亡的潜在诱导物^[1-2]。Semaphorin 3(Sema 3)是分泌性的糖蛋白,N 端具有一个信号肽和一个免疫球蛋白样(Immunoglobulin-like)结构,以及由 500 个氨基酸组成的 Sema 保守结构^[3]。在神经发育过程中,Sema 3A 通过诱导生长锥的溃变发挥轴突导向作用^[3-4]。因此,研究者在成年动物脑损伤方面也越来越关注它的

收稿日期: 2010-03-04

修回日期: 2010-04-16

* 科学技术部“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-014):基于脑病治疗的中药复方药理学及药效学评价关键技术研究,负责人:李澎涛;科学技术部国家“十一五”支撑计划(2006BAI08B05-04):基于脑微血管内皮细胞功能物质发现的脑病药物筛选与效应分析新技术,负责人:潘彦舒;教育部科学技术研究重点项目(109023)从内皮-胶质细胞信息网络解析脑络功能及其病理基础,负责人:李卫红。

** 联系人:唐卉凌,博士研究生,主要研究方向:通络药物对缺血性脑血管病的药效学和机制研究,Tel:010-64286190,E-mail:tanghuilingthl@163.com;李澎涛,本刊编委,教授,博士生导师,主要研究方向:中药复方抗缺血性脑血管病的基础研究,E-mail:Lptao@263.net。

作用,如老年痴呆、运动神经元退行性变以及脑缺血损伤等疾病^[1]。本研究通过观察 Sema 3A 在局灶性脑缺血动物脑组织表达部位及表达水平的变化,分析其与神经元损伤的关系,并探索具有解毒通络作用的通络救脑注射液对缺血性脑损伤发挥保护作用的机制和环节。

一、材料与方法

1. 实验动物分组与模型制备

成年 SD 大鼠,体重 280~300g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号为 SCXK(京)2007-0001。随机分为正常组、模型组和通络救脑注射液组,模型组和通络救脑注射液组各设 4 个时间点,分别为脑缺血 12h、24h、3d 和 7d。采用线栓法制作左侧永久性大脑中动脉阻塞模型^[2],待动物苏醒后进行神经功能评分^[3],选取 2 分以上的动物继续实验,确保各组每个时间点 16 只动物。正常组和模型组给与注射用生理盐水 $0.3\text{mL}\cdot 100\text{g}^{-1}$ 腹腔注射,通络救脑注射液组给予 $0.3\text{mL}\cdot 100\text{g}^{-1}$ 腹腔注射。各组于相应时间点断头取脑,分别制备脑组织冰冻切片、脑组织匀浆样本。

2. 脑梗死体积的检测

术后相应时间点断头处死各组动物(5只/组),迅速取出脑组织,将每个大脑切成 2mm 厚的 5 片脑片。投入 1%的四氮唑红(2,3,5-trephenyltetrazolium chloride, TTC)溶液中,室温下避光反应 30min 后,保存在 10%的福尔马林溶液中。对脑片进行扫描,使用图像分析软件测量每个脑片梗死体积和总体积,计算每只动物脑梗死体积百分比,并进行统计学分析。

3. 酶联免疫

Sema 3A 和 GAP43 ELISA 试剂盒购自 EVER SYSTEM BIOLOGY LAB 公司。

4. 免疫荧光的双重标记

微管相关蛋白 2 (MAP-2)、胶质纤维相关蛋白 (GFAP) 和血管内皮钙粘蛋白 (VE-cadherin) 分别是神经元、星形胶质细胞和血管内皮细胞的特异性标志蛋白。兔抗大鼠 Sema 3A 多克隆抗体、小鼠抗大鼠 VE-cadherin 单克隆抗体购自 Santa Crus, 小鼠抗大鼠 GFAP 单克隆抗体购自 CSL、小鼠抗大鼠 MAP-2 单克隆抗体购

自博士德。山羊抗兔 Dylight594 荧光二抗、山羊抗小鼠 Dylight488 荧光二抗购自 Jackson Bio。脑组织冰冻切片以冷甲醇固定后,高压修复,10%山羊血清 PBS 溶液封闭 60min,分别以两种一抗 Sema 3A/VE-cadherin、SEMA 3A/GFAP、SEMA 3A/ MAP-2,及相应的二抗孵育,对目标蛋白 Sema 3A 和不同类型细胞进行荧光双标,甘油封片后使用激光共聚焦显微镜拍摄照片。

5. 统计方法

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), $P<0.05$ 为有显著性差异, $P<0.01$ 为有极显著性差异。

二、结果

1. 脑梗死体积的经时变化及通络救脑注射液的作用

正常组大鼠脑组织未见梗死灶出现,脑缺血各组大鼠脑梗死体积随着缺血时间延长,梗死体积显著增加。与正常组相比,模型组和通络救脑注射液各时间点脑梗死体积均显著升高($P<0.01$);与模型组相比,通络救脑注射液组 4 个时间点脑梗死体积均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)(见表 1),表明通络救脑注射液能够减少脑缺血大鼠的脑梗死体积。

2. 脑组织相关细胞活性因子的表达及通络救脑注射液的作用

脑缺血后脑组织匀浆中 Sema 3A 升高,GAP43 的含量降低;通络救脑注射液能够降低 Sema 3A 含量,升高 GAP43 的含量。

与正常组相比,模型组 3d、7d 和通络救脑组 1d、7d 时,脑组织中 Sema 3A 的含量显著升高。与模型组相比,通络救脑注射液组 3d 时,脑组织中 Sema 3A 的含量显著降低(见表 2);与正常组相比,模型组和通络救脑注射液组各时间点脑组织中 GAP43 含量均显著降低;与模型组相比,通络救脑注射液组 1d 时,脑组织中 GAP43 的含量显著升高(见表 3)。

表 1 脑缺血后脑梗死体积的变化及通络救脑注射液对梗死体积的影响($\bar{x}\pm s$ %, n=5)

组别	缺血前	缺血 12h	缺血 24h	缺血 3d	缺血 7d
正常组	0	-	-	-	-
模型组	-	20.21±11.18**	25.15±7.25**	25.38±4.19**	35.14±88.20**
通络救脑组	-	11.89±7.05***	9.55±3.01***	14.54±5.98***	14.59±8.20***

注:与正常组相比 * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组相比 ☆ $P<0.05$, ☆☆ $P<0.01$ 。

3. 脑缺血后脑组织

Sema 3A 的表达特征

脑缺血后脑内可见神经元、星形胶质细胞和少量血管内皮细胞表达 Sema 3A, 且随着缺血时间延长有增多的趋势。

运用免疫荧光双重标记方法, 分别使用神经元、星形胶质细胞和血管内皮细胞的特异性标志蛋白标记 3 种细胞, 同时标记目标蛋白 Sema 3A, 可以观察到 Sema 3A 的

表达部位及其与 3 种细胞的空间关系(见图 A-L)。结果发现, 与正常组相比, 模型组 MAP-2 表达减少, 以梗死区为甚; 梗死区 GFAP 表达减少, 而梗死周边其表达增加。Sema 3A 在正常脑组织海马和皮层的神经元未见明显表达, 也未见微血管内皮细胞表达(见图 A)。在脑缺血损伤后模型组各时间点 Sema 3A 表达显著增强, 随缺血时间延长有增加趋势。其表达部位主要在两侧皮层和海马的神经元, 并且缺血侧表达水平高于对侧(见图 B-F), 海马的星形胶质细胞也可见较强的表达(见图 I、J), 在缺血 7d 时可见缺血侧阳性表达的微血管(图 K)。通络救脑注射液组也有相似的表达特点, 但未见阳性表达的微血管(图 L)。

三、讨论

脑缺血能够引起轴突损伤、神经元坏死等不可逆的病理变化, 最终导致一系列运动、感觉、语言等功能永久性的丧失, 严重地影响了患者的生存质量。在脑缺血发生过程中, 神经元、轴突以及神经网络中所发生的分子生物学变化机制现在并不完全清楚。在脑缺血白质损伤的研究中发现, 脑缺血后神经元损伤的途径可能是由于轴突膜通透性增高导致钠、钙超载, 胞内蛋白酶活性增高, 但是使用蛋白酶抑制剂并不能取得满意的效果。可能存在这样一种机制, 脑缺血后启动一些包括 Sema 3A 的抑制性因子及信号通路, 阻碍缺血区周边神经元突触进入缺血区, 最终导致缺血区神经元坏死^[1,7]。因此, 封闭这些抑制性因子及其下游通路,

表 2 各组大鼠脑组织匀浆 Sema 3A 含量比较($\bar{x}\pm s$ pg·mL⁻¹, n=8)

组别	缺血前	缺血 12h	缺血 24h	缺血 3d	缺血 7d
正常组	159.63±32.13	-	-	-	-
模型组	-	156.51±18.30	160.89±17.63	173.10±23.63*	195.89±14.36**
通络救脑组	-	164.08±22.37	176.84±19.89*	151.43±7.94*	192.43±24.99*

注: 与正常组相比 *P<0.05, **P<0.01; 与模型组相比 ☆P<0.05, ☆☆P<0.01。

表 3 各组大鼠脑组织匀浆 GAP43 含量比较($\bar{x}\pm s$ pg·mL⁻¹, n=8)

组别	缺血前	缺血 12h	缺血 24h	缺血 3d	缺血 7d
正常组	3.68±0.60	-	-	-	-
模型组	-	1.66±0.57*	1.65±0.59*	1.35±0.70*	2.39±1.40*
通络救脑组	-	1.92±0.95*	2.42±0.97**	1.66±0.52*	2.54±1.41*

注: 与正常组相比 *P<0.05, **P<0.01; 与模型组相比 ☆P<0.05, ☆☆P<0.01。

可能会控制缺血性损伤甚至促进神经再生。已经有研究者从这一方面深入研究并证实, 在脊髓损伤模型中, 阻断 Sema 3A 及其受体 NRP1 之间的结合, 能够发挥神经保护和促进神经再生作用^[8]。有研究者观察到, 成年动物脑缺血损伤后神经元和胶质瘢痕中的某些成分如胶质细胞可见 Sema 3A 的表达^[10-11]。而且, 值得一提的是, 与神经发育过程中的发现相似, Sema 3A 表达增多的部位, 如梗死中心区, 新生神经元无法迁移进入该区域^[14], 也就导致了该区域受损神经元及神经网络无法修复, 以致缺血中心区神经元的最终死亡。

四氮唑红是一种水溶性盐, 它可以与活细胞线粒体内脱氢酶反应, 生成深红色脂溶性物质, 死亡细胞由于线粒体脱氢酶失活而不显色。正常组织染成均匀的深红色, 而梗死区不着色, 为苍白色。药物对脑缺血动物脑梗死体积的影响更能够体现药物对缺血半暗带的保护与挽救。本研究发现, 脑缺血后随着缺血时间的延长, 脑梗死体积不断增大, 反映了脑组织坏死的加重。而通络救脑注射液能够显著减少缺血动物的脑梗死体积, 发挥脑保护作用。此外, 脑缺血损伤后, 可见神经元 MAP-2 阳性细胞减少, 表明神经元大量脱失坏死。而在相同部位可见 Sema 3A 的大量表达, 多表达在 MAP-2 阳性的神经元和 GFAP 阳性的星形胶质细胞, 尤其是缺血侧梗死区和海马部位的神经元大量脱失伴有 Sema 3A 的明显增多。说明脑缺血损伤后神经抑制性因子 Sema 3A 的大量表达与神经元的坏死有相关性。有研究发现, 小鼠脑缺血再灌注损伤

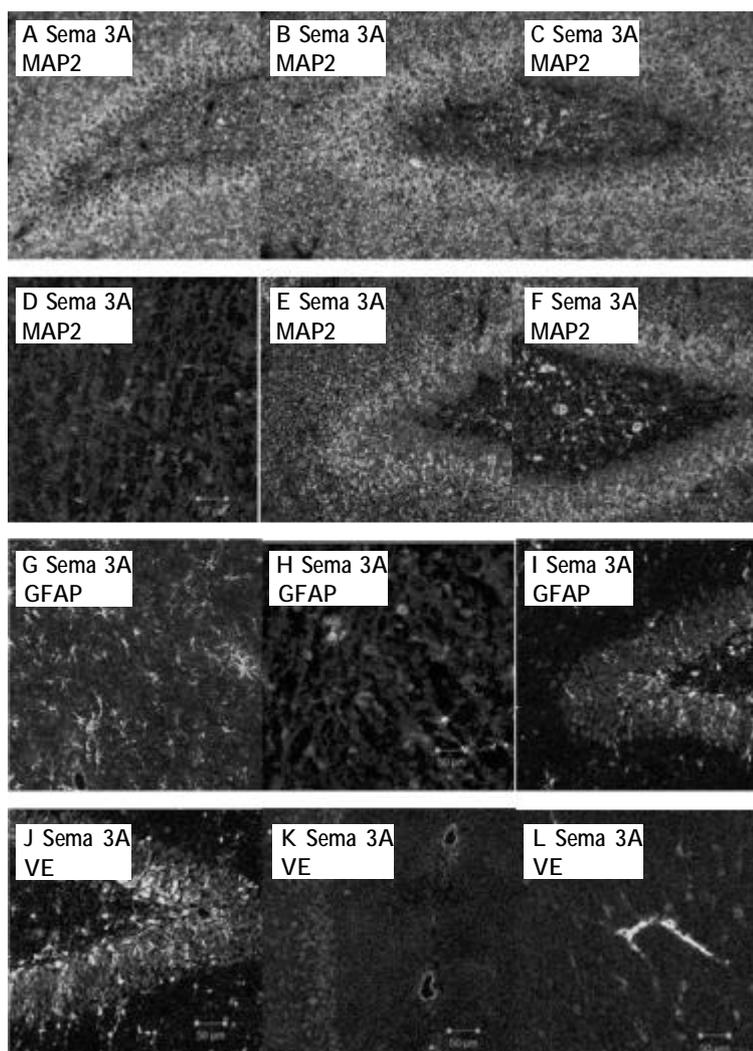


图 A-L 脑缺血后脑组织 Sema 3A 的表达特征

注: A~F: Sema 3A/MAP-2 免疫荧光双重标记。A: 正常脑组织未见 Sema 3A 在神经元有明显表达; B、C: 模型组 3d, 健侧和缺血侧海马齿状回神经元均可见 Sema 3A 的表达, 缺血侧的表达水平高于健侧; D: 模型组 7d 时, 梗死区少见 MAP-2 染色细胞, 表明神经元大量坏死, 并可见 Sema 3A 的表达; E、F: 模型组 7d, 健侧和患侧海马齿状回神经元均可见 Sema 3A 的表达进一步增多。

G~J: Sema 3A/GFAP 免疫荧光双重标记。G: 正常组脑组织未见 Sema 3A 在星形胶质细胞有明显表达; H: 模型组 7d, 梗死区残存少量 GFAP 阳性细胞, 表明大量星形胶质细胞坏死, 并可见 Sema 3A 的表达; I、J: 模型组 7d, 健侧和患侧海马齿状回可见星形胶质细胞表达 Sema 3A。

K、L: Sema 3A/VE-免疫荧光双重标记。K: 模型组 7d, 患侧可见 Sema 3A 在血管内皮细胞上表达; L: 通络救脑注射液组 7d 时, 患侧血管内皮细胞未见 Sema 3A 表达。

后 7d 直至 30d, 都可以观察到 Sema 3A 的表达, 并且表达部位也是在 MAP-2 减少的区域^[14]。本研究中 ELISA 的结果与

免疫荧光的结果一致, 脑缺血后脑组织匀浆中 Sema 3A 也是显著升高的, 而标志神经元再生的蛋白 GAP43 则显著低于正常组。这个结果也证明了神经元损伤程度与 Sema 3A 的表达水平具有相关性。而且缺血性脑损伤后 Sema 3A 的表达不仅仅在神经元, 胶质细胞和微血管内皮细胞也可见其表达。这种因子究竟是由哪种细胞分泌, 对成年动物缺血性损伤及修复过程中的作用还需要进一步的研究和确证。随着神经血管单元概念的提出和研究深入, 研究者们也越来越认识到, 弄清楚神经元、胶质细胞和微血管三者之间的关系, 以及纷繁复杂的相互作用才是解决问题的关键。

以往的研究发现, 通络救脑注射液在体外和体内实验中能够通过多个途径发挥减轻脑缺血性损伤和脑保护作用^[13-15]。本研究发现, 大鼠脑缺血损伤后脑梗死体积增大, 脑组织 Sema 3A 表达增加, MAP-2、GAP43 表达减少, 表明 Sema 3A 表达水平与神经元的坏死有相关性。通络救脑注射液能够降低脑组织 Sema 3A 表达水平, 增加 GAP43 的含量并减少脑梗死体积, 对缺血损伤的脑组织发挥保护作用。这就为明确该药物是如何通过改善微环境而达到阻断损伤和促进修复作用提供了佐证, 为脑病治疗中通络药物作用机制和作用环节的基础研究提供了新思路。

参考文献

- 1 F. De Winter, A. J. Holtmaat, J. Verhaagen, et al. Neurepilin and class 3 semaphorins in nervous system regeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002, 515(1): 115-139.
- 2 A. Shirvan, M. Kimron, V. Holdengreber, et al. Anti-semaphorin 3A antibodies rescue retinal ganglion cells from cell death following optic nerve axotomy. *Biol Chem.* 2002, 277(51):49799-49807.
- 3 R.J. Pasterkamp, A. L. Kolodkin. Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2003, 13(1):79-89.
- 4 Y. Luo, D. Raible, J.A. Raper, et al. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell.* 1993, 75(2):217-227.

- 5 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989,20(1):84-91.
- 6 Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of neurologic examination. *Stroke*, 1986,17(3):472-476.
- 7 Z. He, V. Koprivica. The Nogo signaling pathway for regeneration block. *Annu. Rev. Neurosci*, 2004, 27(3):341-368.
- 8 S. Kaneko, A. Iwanami, M. Nakamura, et al. A selective Sema 3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat. Med*, 2006,12(12):1380-1389.
- 9 V. Gagliardini, C. Fankhauser. Semaphorin III can induce death in sensory neurons. *Mol. Cell Neurosci*, 1999, 14(4-5):301-316.
- 10 A. Bagri, H.J. Cheng, A. Yaron, et al. Stereotyped pruning of long hippocampal axon branches triggered by retraction inducers of the semaphoring family. *Cell*, 2003,113(3):285-299.
- 11 T. Takahashi, A. Fournier, F. Nakamura, et al. Strittmatter, Plexin neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell*, 1999,99(1):59-69.
- 12 Sheng T, Artine Keklikian, Slinn J, et al. Sustained up-regulation of Semaphorin 3A, Neuropilin1, and Doublecortin expression in ischemic mouse brain during long-term recovery. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008,367(1):109-115.
- 13 司银楚, 吴海霞, 许红, 等. 通络救脑注射液对脑缺血大鼠脑皮质梗塞灶 Glu 及其 NMDA 受体表达的影响. *中国医药学报*, 2003, 18 (8): 466-468.
- 14 青雪梅, 李卫红, 侯金才, 等. 通络救脑注射液对脑微血管内皮细胞活性影响的特征. *现代生物医学进展*, 2006, 6(2):15-19.
- 15 王筠, 李澎涛, 侯金才, 等. 通络救脑注射液对氧糖剥夺大鼠脑微血管内皮细胞分泌巨噬细胞炎性蛋白-1 β 的影响. *天津中医药*, 2009, 26(1):12-15.

Effect of Tongluo Jiunao Injection on the Expression of
Semaphorin 3A in Middle Cerebral Artery Occlusion rats
Tang Huiling¹, Li Pengtao¹, Zhang Wei¹, Pan Yanshu¹, Alesheikh Peiman¹,
Di Bo¹, Zhou Li¹, Li Xin², Yang Xin²

(1. Preclinical Medicine College of Beijing University of TCM, Beijing 100029, China;
2. Institute of Clinical Medical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract: This work observed the distribution of Semaphorin 3A (Sema 3A) in middle cerebral artery occlusion (MCAO) rats and the effect of Tongluo Jiunao injection (TLJN) on Sema 3A expression. Three groups were established, including the normal group, the control group, and the TLJN group. The expression of Sema 3A was observed by ELISA and double-immunofluorescent staining 12 h, 1 d, 3 d and 7 d after MCAO. The infarction volume was measured by TTC staining, and the level of GAP43 by ELISA. TLJN decreased the infarction volume and increased the expression of GAP43 compared with the control group. The expression of Sema 3A was increased after MCAO, and significantly decreased 3 d after TLJN injection. The results showed that the expression of Sema 3A may be related with the neuron injury after MCAO, and TLJN may protect the brain by inhibiting the expression of Sema 3A.

Keywords: MCAO, Tongluo Jiunao injection, Semaphorin 3A

(责任编辑:李沙沙,责任译审:张立崑)