

# 探索学习对局灶性脑梗死大鼠 PSA-NCAM、nAChR 表达的影响\*

张东<sup>1</sup> 槐雅萍<sup>1</sup> 闫桂芳<sup>1</sup> 贾子善<sup>1,2</sup>

## 摘要

**目的:** 通过建立局灶性脑梗死大鼠模型,给予探索学习环境干预,观察探索学习环境对脑梗死大鼠海马齿状回区多唾液酸神经细胞黏附因子(polysialylated neural cell adhesion molecule,PSA-NCAM)、烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor,nAChR)表达的影响,进一步阐明康复环境对神经系统损伤恢复的作用机制。

**方法:** 健康雄性SD大鼠120只,随机选取80只采用电凝右侧大脑中动脉法(MCAO)制造局灶性脑梗死模型,40只仅开颅不电凝大脑中动脉。手术组大鼠随机分为:社交组(n=40)、探索学习组(n=40),假手术组(n=40)。各组大鼠于术后第1天、3天、7天、14天、28天随机选取5只处死,利用免疫组化技术观察大鼠海马颗粒细胞层nAChR、PSA-NCAM表达情况。

**结果:** MCAO术后第1天模型组较假手术组PSA-NCAM阳性细胞数明显增多( $P<0.05$ ),MCAO术后第14、28天探索学习组较社交组PSA-NCAM、nAChR阳性细胞数明显增多( $P<0.05$ );MCAO术后第1天假手术组大鼠颗粒细胞层nAChR阳性细胞数明显多于手术组大鼠。

**结论:** 探索学习对于局灶性脑梗死大鼠海马齿状回区颗粒细胞层PSA-NCAM、nAChR表达均有促进作用。

**关键词** 探索学习;脑梗死;记忆;多唾液酸神经细胞黏附因子;烟碱型乙酰胆碱受体

中图分类号:R743,R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2010)-02-0123-04

**Effects of exploring-learning on the expressions of PSA-NCAM and nAChR in dentate gyrus of adult rats after unilateral local cerebral infarction/ZHANG Dong, HUAI Yaping, YAN Guifang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(2): 123—126**

## Abstract

**Objective:** To study the influence of exploring-learning environment on expressions of polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) and nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) in rats after local cerebral infarction and to elucidate the mechanism of restoring the damage of nervous system.

**Method:** One hundred and twenty male Sprague-Dawley rats were adopted, and 80 rats were randomly selected to establish the model of local cerebral infarction by electric coagulation MCAO. The rats were randomly divided into social communication group, exploring-learning group and sham operated group (n=40 in each group). At the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 28<sup>th</sup> d, 5 rats in each group were randomly sacrificed separately in each group. The expressions of PSA-NCAM and ACHR in dentate gyrus were examined by immunohistochemistry staining.

**Result:** At the 1<sup>st</sup> d, the PSA-NCAM positive cells in two operated groups were more obvious than those in sham-operated group ( $P<0.05$ ). At the 14<sup>th</sup>、28<sup>th</sup> d, the PSA-NCAM and nAChR positive cells in the exploring-learning group were more obvious than those in social communication group ( $P<0.05$ ). At the 1<sup>st</sup> d, the nAChR labeled cells in sham-operated group were more obvious than those in operated group( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** Exploring-learning could enhance the expressions of PSA-NCAM and nAChR in dentate gyrus of rats

\* 基金项目:河北省科技攻关课题(07276101D-3); 1 河北省人民医院康复医学科,石家庄,050051; 2 通讯作者  
作者简介:张东,女,在读硕士; 收稿日期:2009-05-15

after local cerebral infraction.

**Author's address** Dept. of Rehabilitation Medicine, People's Hospital of Hebei Provincial, Shijiazhuang, 050051

**Key words** exploring-learning; cerebral infarction; memory; polysialylated neural cell adhesion molecule; nicotinic acetylcholine receptor

大量试验研究表明在成年动物的海马齿状回、侧脑室下区、嗅球等部位仍然存在神经再生能力<sup>[1-3]</sup>,海马是一个具有可塑性的脑区,海马齿状回是成体脑内主要干细胞池。研究表明海马齿状回每日可产生大量新生神经元<sup>[4]</sup>,这些新生神经元能够迁移并整合到海马颗粒细胞层回路中,在学习记忆中发挥作用<sup>[5]</sup>,成年哺乳动物海马这些新生的细胞成熟后可成为具有功能的神经元<sup>[6-7]</sup>。运动和学习可以促进神经干细胞增殖、分化和迁移。多唾液酸神经细胞黏附因子 (polysialylated neural cell adhesion molecule, PSA-NCAM)是新生细胞及其迁移能力的重要标志物,也可以提高大鼠的学习记忆能力,乙酰胆碱是参与学习记忆的重要神经递质,可以促进新生神经细胞的存活,烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)可以作为衡量乙酰胆碱表达水平的标准。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组与模型制作

健康雄性SD大鼠120只,随机选取80只采用电凝法引起右侧大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO)制造局灶性脑梗死模型,40只仅开颅不电凝大脑中动脉。手术组大鼠随机分为:社交组 (n=40, 5只一笼居于标准笼), 探索学习组 (n=40, 10只一笼居于探索学习环境), 假手术组 (n=40, 5只一笼居于探索学习环境)。

### 1.2 探索环境的环境设置

探索学习环境是指:一个圆笼和一个方笼组成的迷宫笼<sup>[8]</sup>。直径500mm圆笼同640mm×480mm×120mm方笼中间通过两通道相连(圆笼:中间由丝网分隔,一侧为进食区,一侧为饮水区;方笼:由丝网分隔形成通道宽80mm×80mm的迷宫,迷宫由易到难,每周变换一次)。

### 1.3 标本制备

各实验组于术后第1天、3天、7天、14天、28天随机选取5只大鼠,用10%水合氯醛腹腔内注射麻

醉后固定于手术台,剪开胸腔,暴露心脏,用9号针头插入左心室,灌注生理盐水,待右心耳膨起,剪开右心耳让血液流出,至右心耳流出液为无色透明时开始用4%多聚甲醛灌注固定,先快后慢,每只大鼠约需300ml,总量在20—30min内灌完。固定后立即剖颅取脑,在视交叉与乳头体之间切开后浸于4%多聚甲醛中,固定4h。经常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。连续冠状切片,切片厚5μm。

### 1.4 免疫组化染色方法

PSA-NCAM、nAChR免疫组织化学染色:各例石蜡包埋组织均取5μm切片分别做PSA-NCAM、AChR免疫组化染色,一张用PBS代替一抗做阴性对照。采用SP法进行免疫组化染色。

步骤如下:组织切片常规脱蜡,水化;PBS冲洗3次,每次3min(3×3min,下同);0.3%过氧化氢室温孵育10min,消除内源性过氧化物酶;PBS冲洗2×3min;滴加溶液A(蛋白阻断液),室温孵育10min,减少非特异性背景染色;PBS冲洗3×3min;滴加一抗:抗体稀释液稀释一抗,PSA-NCAM(北京博奥森产品)稀释比例为1:400, nAChR(北京博奥森产品)稀释比例为1:300。置20%甘油湿盒4℃恒温过夜;PBS冲洗3×3min;滴加溶液B(生物素标记的二抗),室温孵育10min;PBS冲洗3×3min;滴加溶液C(过氧化物酶标记的链霉菌抗生素蛋白),室温孵育10min;PBS冲洗3×3min;DAB显色:1ml双蒸水中滴加A、B、C液各一滴,混匀;镜下控制显色时间,自来水充分冲洗;苏木素复染;梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

### 1.5 图像处理与统计学分析

每只试验取3张PSA-NCAM典型反应的海马组织切片,每张切片在高倍镜下(×400倍),选取海马齿状回区颗粒细胞层视野进行PSA-NCAM、nAChR阳性细胞计数,所有数据均以均数±标准差表示,数据处理采用SPSS13.0统计分析软件统计分析,所有数据进行正态性及方差齐性检验后,组间比较采用单因素方差分析, P<0.05为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 梗死灶同侧大鼠海马齿状回颗粒细胞层 PSA-NCAM 阳性细胞表达情况

PSA-NCAM 主要表达于新生神经细胞的细胞膜和新生或者处于发育状态的树突和轴突周围,免疫组化染色呈棕黄色。第 1 天假手术组大鼠海马齿状回区颗粒细胞层 PSA-NCAM 阳性细胞少,表达弱,阳性细胞数明显少于手术组大鼠 ( $P<0.05$ );探索学习组与社会交往组相比,在第 1、3、7 天 PSA-NCAM 阳性细胞数无显著性差异 ( $P>0.05$ ),但在术后第 14、28 天前者阳性细胞数明显多于后者 ( $P<0.05$ );探索学习组、社会交往组与假手术组相比在术后第 3、7、14、28 天阳性细胞数均明显增多 ( $P<0.05$ )。术后第 1 天、第 3 天假手术组与手术组均偶见 PSA-NCAM 阳性轴突,且轴突短小,第 7—28 天 PSA-NCAM 阳性轴突逐渐增多且逐渐延长,排列逐渐整齐,整合到苔藓层纤维组织中,而社会交往组

表1 各组大鼠梗死灶同侧海马齿状回区 PSA-NCAM、nAChR 表达情况 ( $\bar{x}\pm s$ )

	探索学习组	社会交往组	假手术组
<b>PSA-NCAM 表达情况</b>			
第 1 天	9.67±0.47 <sup>①</sup>	9.67±0.65 <sup>③</sup>	7.78±0.46
第 3 天	10.22±0.46 <sup>①</sup>	10.00±0.62 <sup>③</sup>	8.00±0.47
第 7 天	12.22±0.32 <sup>①</sup>	11.33±0.37 <sup>③</sup>	8.56±0.33
第 14 天	16.44±0.38 <sup>①②</sup>	12.11±0.58 <sup>③</sup>	8.67±0.28
第 28 天	21.00±0.41 <sup>①②</sup>	16.44±0.44 <sup>③</sup>	10.89±0.42
<b>nAChR 表达情况</b>			
第 1 天	19.44±0.56 <sup>①</sup>	19.22±0.57 <sup>③</sup>	29.00±0.91
第 3 天	19.78±0.62 <sup>①</sup>	19.22±0.64 <sup>③</sup>	29.22±0.89
第 7 天	21.11±0.54 <sup>①</sup>	20.00±0.44 <sup>③</sup>	23.44±0.29
第 14 天	25.22±0.46 <sup>①②</sup>	22.22±0.42 <sup>③</sup>	30.00±0.07
第 28 天	29.11±0.48 <sup>②</sup>	23.44±0.29 <sup>③</sup>	30.22±0.57

①与假手术组比较  $P<0.05$ ; ②与社会交往组比较  $P<0.05$ ; ③与假手术组比较  $P<0.05$

PSA-NCAM 阳性轴突较探索学习组少且短(表 1)。

### 2.2 梗死灶同侧海马齿状回区颗粒细胞层 nAChR 表达情况

术后第 1 天手术组颗粒细胞层乙酰胆碱受体阳性细胞较假手术组少 ( $P<0.05$ )。探索学习组与社会交往组相比第 1、3、7 天乙酰胆碱受体阳性细胞数无明显差异 ( $P>0.05$ ),但在第 14、28 天前者阳性细胞数明显多于后者 ( $P<0.05$ );探索学习组与假手术组相比在第 3、7、14 天明显要少 ( $P<0.05$ ),但第 28 天两

组相比无显著性差异 ( $P>0.05$ );社会交往组与假手术组相比在术后第 3、7、14、28 天 nAChR 阳性细胞数明显减少 ( $P<0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 探索学习环境对 PSA-NCAM 的影响

PSA-NCAM 是多聚唾液酸神经细胞黏附因子,主要在胚胎发育过程中表达,但在成年后一些具有神经可塑性的脑区如脑室下区、嗅球、海马齿状回区等也有少量表达<sup>[9-10]</sup>。PSA 是较大的分子且带有大量负电荷,从而降低了细胞之间的黏附作用,有利于神经系统组织形态学的形成及重塑,如细胞的迁移,突触的发生和轴突的生长等<sup>[11]</sup>。

PSA-NCAM 是神经细胞迁移能力的重要标志<sup>[12]</sup>,也可以作为新生非成熟细胞的重要标志<sup>[13]</sup>。并且在成熟动物脑内表达 PSA-NCAM 的组织表现出了高度的可塑性,PSA-NCAM 是提高中枢神经系统可塑性的重要分子<sup>[9]</sup>,PSA-NCAM 还可以提高中枢神经系统的适应性反应,如海马区长时程电位的形成<sup>[14]</sup>,记忆的产生<sup>[15]</sup>,丘脑神经胶质细胞的可塑性<sup>[16]</sup>,损伤导致的神经萌发<sup>[17]</sup>和功能的恢复等<sup>[18]</sup>。

本试验结果表明术后第 1 天手术组大鼠海马齿状回颗粒细胞层有大量 PSA-NCAM 阳性细胞表达,说明缺血可以促进颗粒细胞层 PSA-NCAM 的表达,这与以往的研究结果相一致<sup>[9]</sup>。居于探索学习环境中的大鼠颗粒细胞层 PSA-NCAM 阳性细胞数较社会交往组大鼠明显增多。

### 3.2 探索学习环境对 nAChR 的影响

乙酰胆碱是中枢神经系统的重要递质,是记忆痕迹形成的神经递质,是长期记忆形成的生理基础。皮质和海马的神经递质主要来自于基底前脑,研究表明乙酰胆碱含量随认知活动的改变而发生改变<sup>[20]</sup>,Ach 是海马的主要神经递质,海马主要与工作记忆有关,尤其在空间工作记忆 (spatial working memory) 的获得、储存和提取中发挥重要作用<sup>[21]</sup>,乙酰胆碱受体可以作为衡量乙酰胆碱水平的标准。

已有研究表明,具有神经再生功能的脑区如齿状回区 (dentate gyrus, DG) 和嗅球 (olfactory bulb, OB) 等,均受基底前脑的胆碱能神经支配<sup>[22]</sup>,并且这些脑区的新生神经元还大量表达 nAChR<sup>[23]</sup>。Naoko<sup>[13]</sup>

研究表明乙酰胆碱可以促进新生神经细胞的存活。

本实验结果表明, MCAO 术后的大鼠 nAChR 表达少于假手术组, 可能与突触联系的远隔损伤效应有关, 居于探索学习环境中的大鼠梗死灶同侧海马齿状回颗粒细胞层 nAChR 受体表达较社会交往组明显增多。

PSA-NCAM 与 nAChR 表达均增多可能是探索学习环境促进局灶性脑梗死大鼠功能恢复的重要分子学机制。

### 参考文献

- [1] Altaman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb[J]. *J Comp Neurol*,1969,137(4):433—457.
- [2] Doetsch F, Alvarez-Buylla A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1996,93(25):14895—14900.
- [3] Kaplan MS, Hinds JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs [J]. *Science*, 1977,197(4308):1092—1094.
- [4] Christie BR, CaMORON HA. Neurogenesis in the adult hippocampus[J]. *Hippocampus* ,2006,16:199—207.
- [5] Kempermann G. Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis[J]. *J Neurosci*,2002 ,22(3):635—638.
- [6] Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus [J]. *J Comp Neurol* 2001,435(4): 406—417.
- [7] Doetsch F, Hen R. Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2005,15(1):121—128.
- [8] 贾子善,李阔,槐雅萍,等.不同环境干预对局灶性脑梗死大鼠行为学恢复的影响[J].*中国康复医学杂志*,2007,22(7):578—580.
- [9] Kiss JZ, Rougon G. Cell biology of polysialic acid [J]. *Curr Opin. Neurobiol*,1997,7(5): 640—646.
- [10] Kiss JZ, Troncoso E, Djebbara Z, et al. The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2001, 36(2—3):175—184.
- [11] Rutishauser, U. Polysialic acid and the regulation of cell interactions[J]. *Curr Opin Cell Biol*,1996, 8(5):679—684.
- [12] Iwai M, Hayashi T, Zhang WR, et al. Induction of highly polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in postischemic gerbil hippocampus mainly dissociated with neural stem cell proliferation [J]. *Brain Res*,2001,902(2):288—293.
- [13] Kaneko N, Okano H, Sawamoto K. Role of the cholinergic system in regulating survival of newborn neurons in the adult mouse dentate gyrus and olfactory bulb [J]. *Genes Cells*, 2006,11(10):1145—1159.
- [14] Muller D, Wang C, Skibo G, et al. PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity [J]. *Neuron*, 1996,17(3): 413—422.
- [15] Sandi C, Merino JJ, Cordero MI, et al. Modulation of hippocampal NCAM polysialylation and spatial memory consolidation by fear conditioning [J]. *Biol Psychiatry*, 2003,54 (6):599—607.
- [16] Theodosis DT, Piet R, Poulain DA, et al. Neuronal, glial and synaptic remodeling in the adult hypothalamus: functional consequences and role of cell surface and extracellular matrix adhesion molecules[J]. *Neurochem Int* ,2004, 45(4):491—501.
- [17] Muller D, Stoppini L, Wang C, et al. A role for polysialylated neural cell adhesion molecule in lesion-induced sprouting in hippocampal organotypic cultures [J]. *Neuroscience*,1996, 61,441—445.
- [18] Troncoso E, Muller D, Korodi K, et al. Recovery of evoked potentials, metabolic activity and behavior in a mouse model of somatosensory cortex lesion: role of the neural cell adhesion molecule (NCAM) [J]. *Cereb Cortex*, 2004,14(9):332—341.
- [19] Heng JM, Barnett JP, Mohr B, Bennett M, et al. Stroke pathophysiology, Diagnosis and Management [M]. 辽宁科学技术出版社, 2001. 65.
- [20] Pepeu G, Giovannini MG. Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes[J]. *Learn Mem*,2004,11(1): 21—27.
- [21] Bonini JS, Da Silva WC, Bevilacqua LR, et al. On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory [J]. *Neuroscience*,2007, 147(1): 37—45.
- [22] Changeux JP, Bertrand D, Corringier PJ, et al. Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement[J]. *Brain Res Brain Res Rev*,1998,26:198—216.
- [23] Quik M, Polonskaya Y, Gillespie A, et al. Localization of nicotinic receptor subunit mRNAs in monkey brain by in situ hybridization[J]. *J Comp Neurol*,2000, 425(1):58—69.