

毛冬青甲素对大鼠脑缺血再灌注后 bFGF、GAP-43 的表达及神经元再生的影响

郑关毅^{1*}, 石旺清^{1,2}, 陈晓东¹, 朱元贵¹, 张静¹, 江琼¹

(1. 福建医科大学附属协和医院, 福建 福州 350001; 2. 福建省莆田市第一医院, 福建 莆田 351100)

摘要: 观察毛冬青甲素 (ilexonin A, IA) 对大鼠脑缺血再灌注后 bFGF、GAP-43 表达及神经元再生的影响, 并探讨其神经保护的机制。通过建立大鼠大脑中动脉阻塞模型 (MCAO), 于脑缺血前及再灌注后给予腹腔注射 IA (20 和 40 mg·kg⁻¹) 至 3、7、14 及 28 天 (1 次/天), 以神经损伤严重程度评分 (neurological severity scores, NSS) 进行神经功能缺损评分, Nissl 和 TUNEL 染色法观察不同时段缺血区周边组织神经元存活和凋亡情况, 蛋白免疫印迹法和免疫荧光双标法检测 bFGF、GAP-43 的表达和神经元的再生。IA 干预后, 大鼠 NSS 评分较模型组明显减少 (3 天和 7 天), TUNEL 阳性神经元减少 (3 天), Nissl 阳性神经元增多 (3 天), 治疗组各时段 bFGF、GAP-43 蛋白的表达水平明显增高, 免疫荧光染色可见缺血周边区皮层有神经元再生, 表现为 Brdu/NeuN 共表达; IA 处理后 Brdu/NeuN 双阳性的细胞明显增加, 以 40 mg·kg⁻¹ 剂量组最为显著。IA 的神经保护机制可能与抑制缺血区周边组织神经元凋亡, 促进 bFGF、GAP-43 的表达和神经元再生有关。

关键词: 毛冬青甲素; 脑缺血再灌注; 神经元再生; 碱性成纤维生长因子; 生长相关蛋白 43

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 09-1065-07

Influence of ilexonin A on the expression of bFGF, GAP-43 and neurogenesis after cerebral ischemia-reperfusion in rats

ZHENG Guan-yi^{1*}, SHI Wang-qing^{1,2}, CHEN Xiao-dong¹, ZHU Yuan-gui¹, ZHANG Jing¹, JIANG Qiong¹

(1. The Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China;

2. The First Hospital of Putian, Fujian Province, Putian 351100, China)

Abstract: This study is to observe the effect of ilexonin A (IA) on the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) and growth associated protein-43 (GAP-43), and neurogenesis after cerebral ischemia-reperfusion in rats and explore its possible mechanism of protecting neuronal injury. Models of middle cerebral artery occlusion (MCAO) were established in SD rats. Before and after two hours ischemia-reperfusion, IA (20 and 40 mg·kg⁻¹) was injected immediately and on 3, 7, 14, and 28 d once a day. The neurological severity was evaluated by neurological severity scores (NSS); neuronal injury in the boundary zone of the infarction area was evaluated by TUNEL and Nissl staining. The expressions of bFGF and GAP-43 and neurogenesis were evaluated by Western blotting and 5-bromodeoxyuridine (Brdu) fluorescence staining, respectively. After treatment with IA, the NSS of treatment groups were lower than that of the models (3 and 7 d). The number of TUNEL positive neurons decreased and Nissl positive neurons increased at the same time (3 d). The expressions of bFGF and GAP-43 increased significantly in the boundary zone of the infarction area when compared to model group. Moreover, IA markedly enhanced the neurogenesis in the brain after ischemia-

收稿日期: 2011-03-03.

基金项目: 福建省教育厅高等学校新世纪优秀人才支持项目 (NCETFJ-0704); 福建医科大学教授学术发展基金 (JS09014).

*通讯作者 Tel: 86-591-87304965, Fax: 86-591-83346181, E-mail: zhenggy2005@sina.com

reperfusion, which revealed an increase of Brdu/NeuN positive cells in the boundary zone of the infarction area. The possible mechanism of protecting neuronal injury of IA may be related to inhibition on neuronal apoptosis, upregulation of bFGF and GAP-43, and neurogenesis in boundary zone of infarction after cerebral ischemia-reperfusion.

Key words: ilexonin A; cerebral ischemia-reperfusion; neurogenesis; basic fibroblast growth factor; growth associated protein-43

有关研究表明,缺血性脑损伤引起内源性神经营养因子水平增加可能与神经再生有关,碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是一种具有多种生物学活性的神经营养因子,广泛分布于成熟和未成熟的中枢神经系统内,能促进神经元存活及突起生长,对维护中枢神经系统正常功能起重要作用^[1],也是潜在的血管内皮细胞丝裂源,可促进损伤后血管内皮细胞的修复。脑缺血后神经元之间功能联系重建是神经功能缺损恢复的重要生物学基础,因此突触可塑性变化尤为重要,生长相关蛋白43(growth associated protein-43, GAP-43)是一种与神经发育、轴突再生和突触重建密切相关的快速转运膜磷脂蛋白,被认为是神经元生长发育和可塑性的分子标记物。毛冬青甲素(ilexonin A, IA)是从活血化瘀中药毛冬青中分离提取的一种五环三萜类化合物,具有改善血液循环、抗血栓形成、抗炎等广泛的药理作用^[2],能有效改善脑梗死患者的神经功能缺损程度,但其作用的分子机制尚不明确。因此,本研究观察IA干预后脑缺血再灌注模型鼠神经功能缺损程度和缺血周边组织神经元凋亡,以及内源性bFGF和GAP-43的表达水平与神经元再生的变化,探讨毛冬青甲素的神经保护作用的机制。

材料与方法

药物及试剂 注射用毛冬青甲素(ilexonin A, IA)注射液购自广东省博罗先锋药业(40 mg/2 mL),产品批准文号:国药准字 Z44023366,产品批号:090101。蛋白免疫印迹检测试剂盒购自美国KPL公司(批号:D0908);兔bFGF多克隆抗体(批号:K0608)和小鼠 β -actin单克隆抗体(批号:L1508)购自Santa Cruz公司;兔GAP-43多克隆抗体(批号:608964)、绵羊Brdu多克隆抗体(批号:625764)和罗丹明标记驴抗绵羊多克隆抗体(批号:606194)均购自Abcam公司;Brdu粉末标记物(批号:049K1018)购自Sigma公司;小鼠NeuN单克隆抗体(批号:LV1519148)购自Chemicon公司;FITC标记山羊抗

小鼠IgG(批号:92464)和山羊抗兔IgG(FITC,批号:85318)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。线栓(直径0.26 mm)购自北京沙东生物技术有限公司。

实验动物和分组 健康Sprague-Dawley雄性大鼠,体重250~300 g,购自中国科学院上海实验动物中心,合格证号:SCXK(沪)2007-0005。自由饮食,室温22~25℃,每日光照12 h。将大鼠随机分成:正常组(未作任何处理),假手术组(手术过程同模型组,不插入线栓),模型组(缺血2 h后再分别灌注3、7、14及28天),IA干预组(20和40 mg·kg⁻¹,缺血2 h后再分别灌注3、7、14及28天)。各组动物数量均为6只,分别于3、7、14和28天后取材。

正常组、假手术组、模型组和IA干预组均于处死动物前7天开始腹腔注射Brdu(50 mg·kg⁻¹,1次/天)。IA干预组缺血2 h前及再灌注后腹腔注射IA(20和40 mg·kg⁻¹)3、7、14及28天(1次/天,至处死动物前1天)。假手术组和模型组注射等体积生理盐水。

动物模型制作 用10%水合氯醛(360 mg·kg⁻¹)麻醉,采用Longa等^[3]的线栓法经右侧颈外-颈内动脉插线栓建立大脑中动脉闭塞(MCAO)再灌注模型。

神经功能缺损评分 以神经损伤严重程度评分(neurological severity scores, NSS)^[4]评估,包括运动试验、感觉试验、横梁平衡试验、反射缺失和不正常运动,总分18分。

标本采集和组织切片的制备 大鼠经10%水合氯醛(360 mg·kg⁻¹)深麻醉后,用4%多聚甲醛200 mL进行左室快速滴注内固定,取出脑组织,冠状切片取视交叉和乳头体之间部分,置于4%多聚甲醛中继续固定24 h。经30%蔗糖常规脱水48 h,放入冻存管中,迅速将管底部投入液氮中,使组织块迅速冷凝,进行冰冻切片,片厚10 μ m,用于Nissl、TUNEL及免疫荧光双标染色。用于蛋白免疫印迹检测的动物经麻醉后,使用4℃生理盐水200 mL进行左室快速灌注、取脑,切取缺血灶周边组织,置于-80℃冰箱保存备用。

Nissl 染色 采用蒸馏水冲洗组织切片, 加入缓冲亚甲蓝染液 10 min, 0.2 mol·L⁻¹ 乙酸盐缓冲液 (pH 4.6) 分色 2 min。阳性染色者胞核淡染, 胞浆呈蓝色, 即存活神经元。

TUNEL 染色 切片用 4% 多聚甲醛固定, PBS 冲洗。细胞凋亡检测试剂盒购自德国 Roche 公司, 产品编号: 11 684 817 910。按说明书操作, DAB 显色, 苏木精复染, 中性树脂封固。PBS 代替一抗作为阴性对照。细胞核中有棕黑色颗粒者为阳性细胞。

蛋白免疫印迹 脑组织加裂解液匀浆后, 离心取上清液, 应用 BCA 法测定提取的蛋白浓度。配制 12% 分离胶进行蛋白 SDS-PAGE 变性电泳, 电泳结束后, 将蛋白电转印至 NC 膜; 1% 脱脂奶粉封闭 1 h; 加兔 bFGF 多克隆抗体 (1:400)、兔 GAP-43 多克隆抗体 (1:1 000) 4 °C 过夜; TBST 洗膜 3×10 min; HRP 标记山羊抗兔 IgG (1:1 000) 室温孵育 2 h; TBST 洗膜 3×10 min, ECL 化学发光法显影。内参照为 β -actin, 实验重复 3 次。计算各条带的密度相对值。

免疫荧光双标 组织切片于室温下晾干, 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 冲洗 3×5 min, 1 mol·L⁻¹ HCl 冰上孵育 10 min, 2 mol·L⁻¹ HCl 室温孵育 10 min, 37 °C 水浴箱孵育 20 min, 立即用 0.1 mol·L⁻¹ 硼酸冲洗, 室温孵育 12 min, PBS (含 0.1% TritonX100) 室温下冲洗 3×5 min, 5% BSA (含 0.01 mol·L⁻¹ PBS 和 0.1% TritonX100) 封闭 1 h, 滴加一抗绵羊 Brdu 多克隆抗体 (1:200)、小鼠 NeuN 单克隆抗体 (1:500), 4 °C 孵育过夜。PBS (含 0.1% TritonX100) 室温下冲洗 3×5 min, 滴加相应 (罗丹明) 标记的驴抗绵羊多克隆抗体 (1:500)、FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:1 000) 二抗室温避光孵育 2 h, PBS (含 0.1% TritonX100) 室温下冲洗 3×5 min, 滴加适量的 DAPI 避光复染 5 min, PBS 冲洗 3×5 min, 晾干、封片、荧光显微镜镜检。PBS 代替一抗作阴性对照, 染色阳性结果为胞核呈红色的为 Brdu 标记的神经元细胞, 胞核呈绿色的为 NeuN 标记的神经元细胞。

统计学处理 每例均在高倍镜下重复观察 3 张切片, 计数缺血区周边组织随机 10 个非连续视野阳性细胞数, Nissl 及 TUNEL 染色取均值, 免疫荧光双标: 计数 Brdu/NeuN 双标阳性细胞数占 NeuN 的比例, 计算双标细胞阳性率。所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS13.0 软件包进行单因素方差分析, 方差齐者组间比较采用 LSD 检验, 方差不齐者进行 Games-Howell 检验。

结果

1 毛冬青甲素对大鼠神经功能缺损评分的影响

脑缺血再灌注后 3 天, 模型组大鼠出现了明显的神经功能缺损情况, 至再灌注第 28 天, 该组大鼠的神经功能缺损评分均有明显降低, 14、28 天与 3、7 天比较有显著差异 ($P < 0.01$)。IA 干预后, 40 mg·kg⁻¹ 剂量组 3、7 天以及 20 mg·kg⁻¹ 剂量组 3 天的神经功能缺损评分均较模型组相应时间点明显降低 ($P < 0.01$), 以 40 mg·kg⁻¹ 剂量组为显著 (表 1), 说明 IA 对大鼠脑缺血再灌注神经功能缺损具有改善作用。

Table 1 Effect of ilexonin A (IA) on neurological severity scores (NSS). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs 3 d and 7 d; ## $P < 0.01$ vs model at corresponding time point

Group	3 d	7 d	14 d	28 d
Control	0	0	0	0
Sham	0	0	0	0
Model	6.50 ± 1.05	5.33 ± 0.82	3.50 ± 1.38**	1.83 ± 1.17**
IA 40 mg·kg ⁻¹	3.67 ± 0.82##	3.17 ± 1.17##	3.00 ± 0.89	1.33 ± 1.21
20 mg·kg ⁻¹	4.50 ± 1.05##	3.83 ± 0.75	3.17 ± 0.98	1.50 ± 1.05

2 毛冬青甲素对大鼠脑缺血区周边组织神经元凋亡的影响

正常组及假手术组未见 TUNEL 阳性细胞, 脑缺血再灌注后 3、7、14 及 28 天, 模型组大鼠缺血区周边组织均出现 TUNEL 阳性神经元, 以 3、7 天最为显著, 而后逐渐减少 (图 1A1~6)。模型组 Nissl 阳性神经元则较正常组及假手术组明显减少, 以 3 天最为显著, 而后有增加的趋势 (图 1B1~6); IA 干预后, TUNEL 阳性神经元 (3 天) 明显减少 (图 1A7, 8), 而 Nissl 阳性神经元 (3 天) 明显增多 (图 1B7, 8), 以 IA 40 mg·kg⁻¹ 剂量组最为显著。见表 2。

Table 2 Effect of ilexonin A (IA) on neuronal apoptosis after cerebral ischemia-reperfusion. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs 14 and 28 d; ## $P < 0.01$ vs control and sham; ^{SS} $P < 0.01$ vs 3 d; ^ $P < 0.05$ vs IA 20 mg·kg⁻¹

Group	Number of positive cells	
	TUNEL	Nissl
Control	0	68.2 ± 6.7
Sham	0	63.8 ± 10.7
Model 3 d	50.3 ± 7.4**	17.8 ± 4.4##
7 d	42.7 ± 4.4**	20.5 ± 3.3##
14 d	32.0 ± 4.5	25.0 ± 2.9##
28 d	12.5 ± 2.7	28.5 ± 4.4##
IA 40 mg·kg ⁻¹ (3 d)	20.8 ± 3.9 ^{SS}	32.7 ± 2.6 ^{SS^}
20 mg·kg ⁻¹ (3 d)	25.0 ± 4.2 ^{SS}	25.5 ± 2.3 ^{SS}

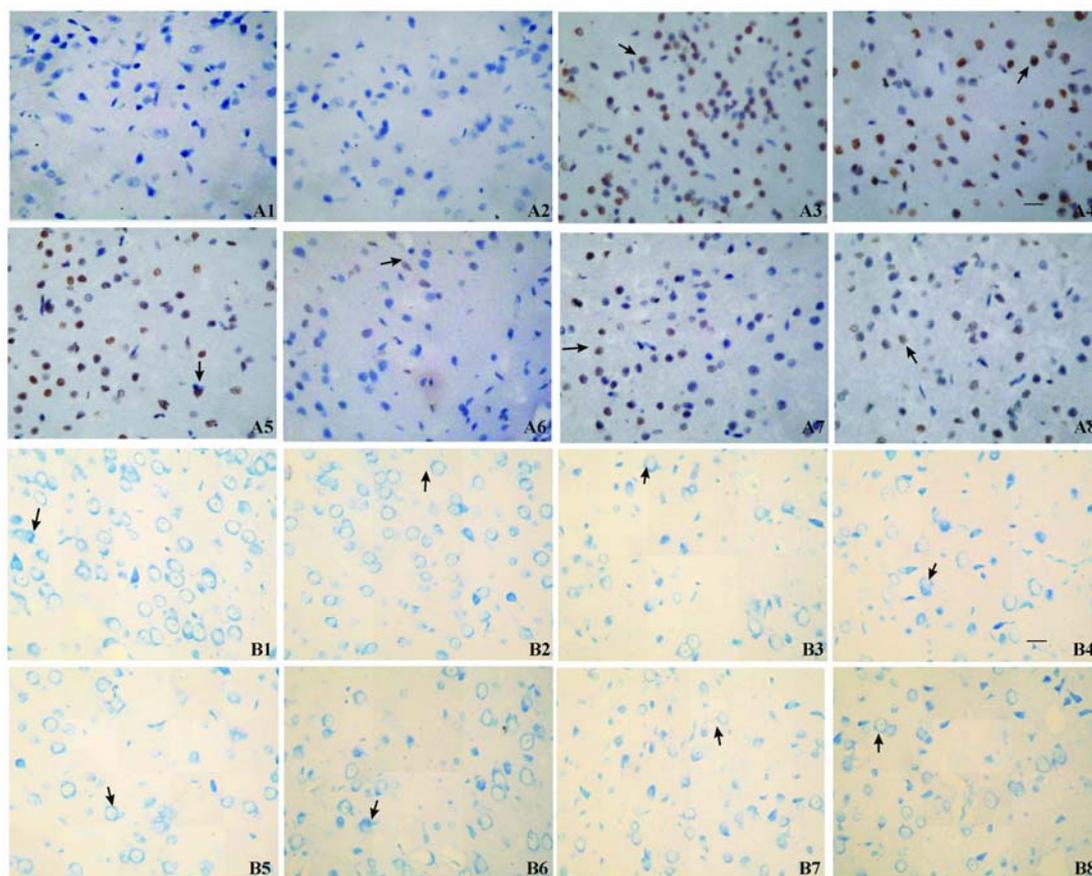


Figure 1 Effect of ilexonin A (IA) on neuronal apoptosis after cerebral ischemia-reperfusion (cortex, $\times 400$). The coronal brain sections were stained with TUNEL (A) and Nissl (B). The arrows head point to the positive neuron. A1, B1: Control; A2, B2: Sham; A3-6, B3-6: Model 3, 7, 14, and 28 d; A7-8, B7-8: IA 40 and 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (3 d). Scale bar: 25 μm

3 毛冬青甲素对大鼠脑缺血区周边组织 bFGF 蛋白表达的影响

结果 (图 2) 表明, 正常组及假手术组的 bFGF 蛋白条带较淡, 模型组于再灌注第 3 天已有表达, 至 7 天达到高峰, 随后其条带密度逐渐降低; IA 干预后可见各时相点条带密度明显增高, 以 IA 40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组较明显, 提示 IA 可诱导缺血再灌注后内源性 bFGF 的持续高表达。

4 毛冬青甲素对大鼠脑缺血区周边组织 GAP-43 蛋白表达的影响

结果 (图 3) 表明, 正常组及假手术组的 GAP-43 蛋白条带较淡, 模型组于再灌注第 3 天亦有表达, 至 7 天时达到高峰, 随后其条带密度逐渐降低; IA 干预后可见各时相点条带密度均有增高, 以 IA 40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组较明显, 提示 IA 可促进 GAP-43 的进一步表达。

5 毛冬青甲素对大鼠脑缺血再灌注后缺血侧皮层新生神经元阳性细胞表达的影响

结果 (图 4) 表明, 正常组及假手术组没有 Brdu、

Brdu/NeuN 阳性细胞表达。模型组自再灌注后第 3 天有少量 Brdu、Brdu/NeuN 表达, 到第 7 天达到高峰, 以后逐渐减弱, 至 28 天仍有表达。IA 干预后各时段 Brdu/NeuN 阳性细胞较模型组有一定程度的增高趋势, 以 IA 40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组较明显。胞核着红色荧光的为 Brdu 阳性细胞, 着绿色荧光的为 NeuN 阳性细胞, 着淡桔黄色的为双标 Brdu/NeuN 阳性细胞。提示 IA 干预对脑缺血再灌注后缺血侧皮层神经元的再生有促进作用。

讨论

缺血再灌注神经元损害的分子机制可能涉及脑组织的能量代谢紊乱, 兴奋性氨基酸毒性、自由基损伤、炎症反应及神经元内钙超载等多个环节并诱导多种基因表达, 最终导致神经元坏死或凋亡。本研究观察到, 脑缺血再灌注后 3、7、14 及 28 天中, 其缺血周边组织神经元凋亡以 3、7 天最为显著, 同时神经功能缺损亦较明显, 与其他时段比较有显著差异 ($P < 0.01$); IA 干预后, TUNEL 阳性神经元 (3 天) 明

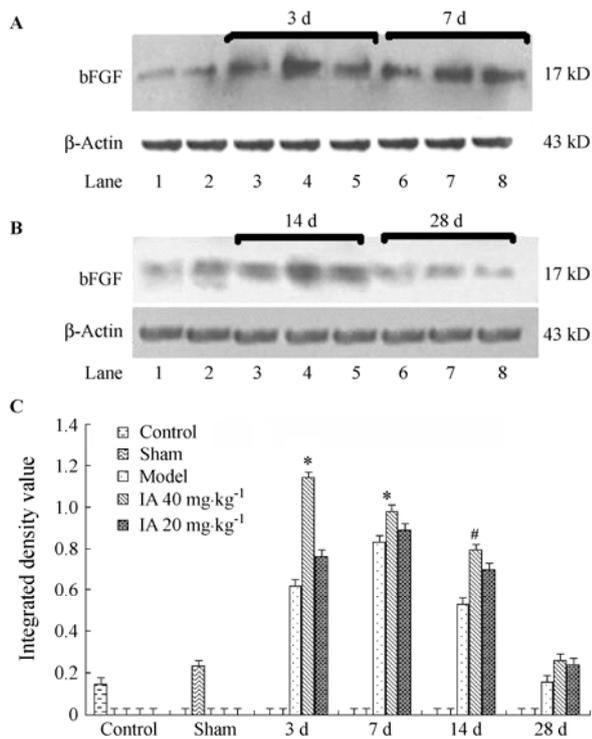


Figure 2 Effect of ilexonin A (IA) on expression of bFGF protein detected by Western blotting with β -actin protein as an internal reference. Lane 1: Control; Lane 2: Sham; Lane 4, 7: IA 40 mg·kg⁻¹; Lane 5, 8: IA 20 mg·kg⁻¹. Lane 3 (A): Model (3 d); Lane 6 (A): Model (7 d); Lane 3 (B): Model (14 d); Lane 6 (B): Model (28 d). A and B: bFGF protein immunoreactivity was enhanced in the boundary zone of the infarction area after reperfusion and peaked at 7 d, then reduced gradually. After the intervention of IA, the expression of bFGF increased, compared to model group at corresponding time points. C: Quantitative analysis of bFGF protein. * $P < 0.05$ vs model at each time point; # $P < 0.05$ vs model at corresponding time point

显减少, Nissl 阳性神经元 (3 天) 明显增多, NSS (3、7 天) 较相应模型组明显降低 ($P < 0.01$), 说明 IA 具有神经保护作用。

以往研究表明, 没食子酸丙酯能够抑制缺血周边组织 SAPK/JNK 及 p38MAPK 的激活^[5], 上调脑源性神经营养因子的表达而起神经保护作用^[6], 作为自我保护的应激反应, 脑缺血后诱导的神经营养因子表达的增强有重要的神经保护作用。传统的观点一直认为, 神经再生 (neurogenesis) 只存在于动物胚胎期或出生后的发育早期, 然而近年来的研究结果表明成年动物也有神经再生, 侧脑室室管膜下区 (SVZ) 和海马齿状回颗粒下层 (SGZ) 是大脑神经细胞再生的主要区域^[7]。除上述脑区外, 成年脊髓和大脑皮质也存在着神经干细胞。神经再生的过程包括以下几个重要内容: 细胞增殖 (proliferation)、迁移

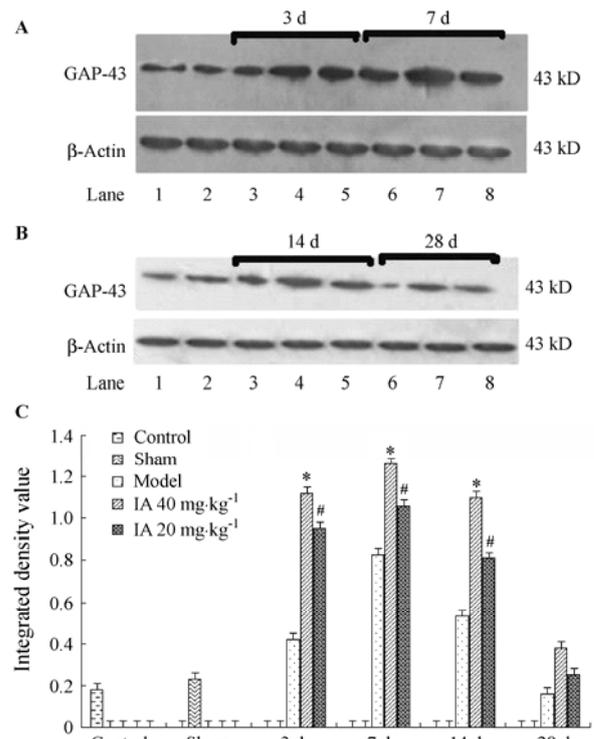


Figure 3 Effect of ilexonin A (IA) on expression of GAP-43 protein detected by Western blotting with β -actin protein as an internal reference. Lane 1: Control; Lane 2: Sham; Lane 4, 7: IA 40 mg·kg⁻¹; Lane 5, 8: IA 20 mg·kg⁻¹. Lane 3 (A): Model (3 d); Lane 6 (A): Model (7 d); Lane 3 (B): Model (14 d); Lane 6 (B): Model (28 d). A and B: GAP-43 protein immunoreactivity was enhanced in the boundary zone of the infarction area after reperfusion and peaked at 7 d, then reduced gradually. After the intervention of IA, the expression of GAP-43 increased, compared to model group at corresponding time points. C: Quantitative analysis of GAP-43 protein * $P < 0.05$ vs model group at each time point; # $P < 0.05$ vs model at corresponding time point

(migration)、分化 (differentiation) 和存活 (survival)。神经元的存活需要足够的神经营养因子维持, 所需要的神经营养因子的种类因神经元的类型和发育阶段不同而异。本研究通过蛋白免疫印迹法显示, 缺血再灌注后 bFGF 早期即可表达, 并于再灌注后第 7 天达到高峰, 之后逐渐减少。通过腹腔注射 IA (40 和 20 mg·kg⁻¹) 进行干预治疗后, 发现 IA 能够诱导 bFGF 的进一步表达, 与模型组各时间点比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 以 3 天 (IA 40 mg·kg⁻¹) 组作用较明显。说明 IA 的早期应用, 可促进脑缺血后内源性神经营养因子 bFGF 早期应激表达, 与及时挽救缺血后神经元的存活、促进神经元的再生及神经功能恢复有关。

神经再生过程中 GAP-43 可能是靠改变生长锥中 G 蛋白的活性影响轴突的生长的; 生长锥是轴突

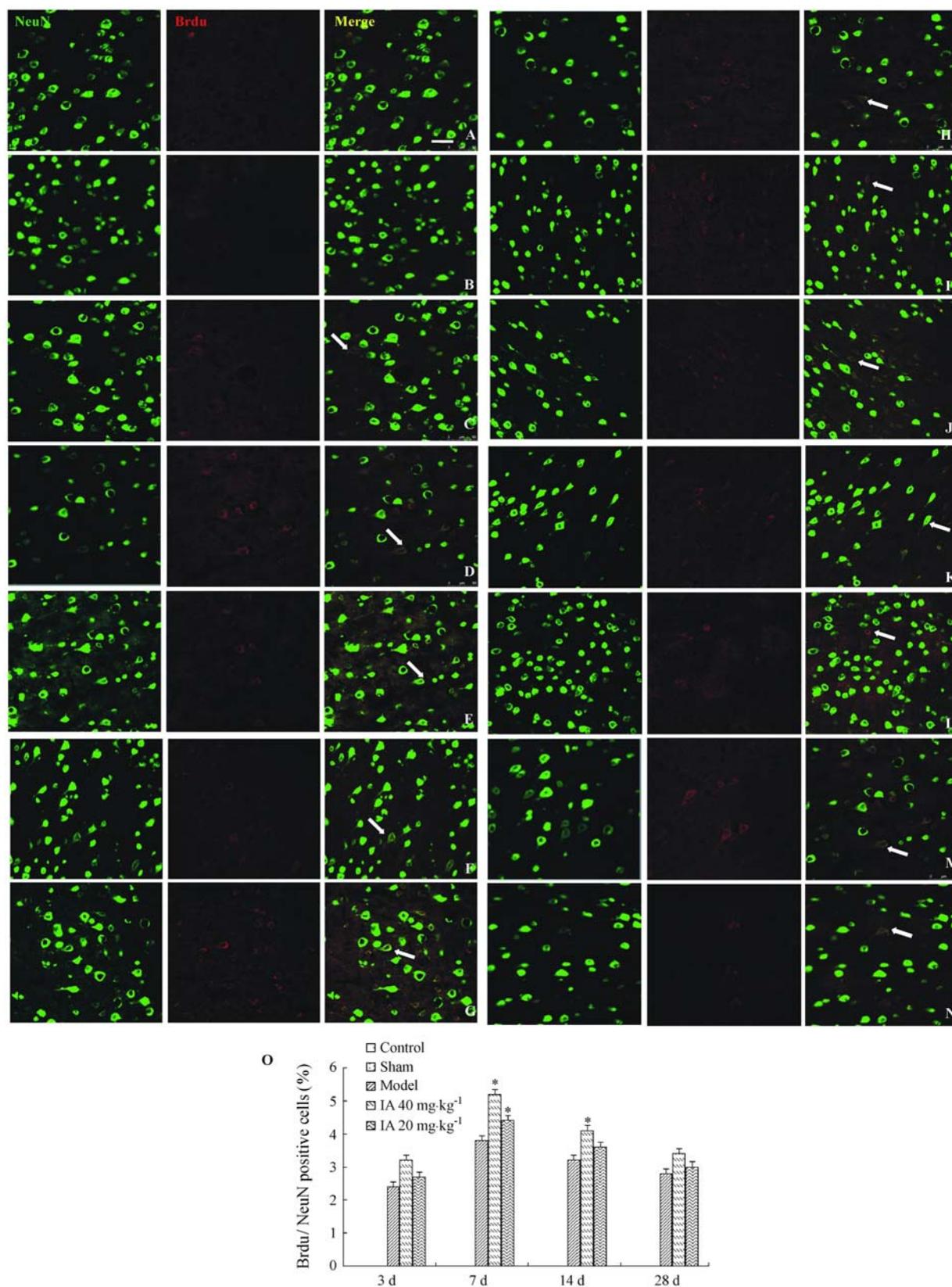


Figure 4 Effect of ilexonin A (IA) on rat ischemic cortex in cerebral ischemia-reperfusion detected by immunofluorescence staining with Brdu (red) and NeuN (green). Arrowheads indicate double-stained cells. A: Control; B: Sham; C, F, I, L: Model 3, 7, 14, and 28 d; D, G, J, M: IA (40 mg·kg⁻¹) 3, 7, 14, and 28 d; E, H, K, N: IA (20 mg·kg⁻¹) 3, 7, 14, and 28 d; O: Quantitative analysis of Brdu/NeuN positive cells. **P* < 0.05 vs model at each time point. Scale bar: 50 μm

生长和延伸的引导, 生长锥中的 G 蛋白与其受体反应产生抑制信号, 导致生长锥停止生长, 而 GAP-43 与 G 蛋白结合后解除抑制信号允许轴突继续生长^[8]。研究表明^[9], GAP-43 mRNA 术后 7 天时表达达到高峰, 14 天时便很快降至接近初始水平。本研究蛋白免疫印迹结果显示, 脑缺血再灌注后 3 天时 GAP-43 即有一定量表达, 7 天时达到高峰; 之后表达逐渐降低, 14 天时仍有表达, 28 天时呈最低表达。与文献报道相似。通过腹腔注射 IA 进行干预治疗后, 发现 IA 能够诱导 GAP-43 的进一步表达, 与模型组各时间点比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 以 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组作用较明显, 结合 3 天后神经功能缺损的逐步改善, 说明脑缺血后突触可塑性的变化可能与 IA 促进 GAP-43 的表达有关。

以往有研究报道, 在大鼠局灶性脑缺血模型中, 可观察到在大脑感觉皮质区 3%~6% 的 Brdu 标记阳性的新生细胞表达特异的神经元标记物, 其余 Brdu 标记阳性的新生细胞则分化为胶质细胞^[10], 提示大脑皮质中可能存在少量神经元再生。本研究通过建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型后腹腔注射 Brdu 标记物, 经不同剂量的 IA 进行干预治疗, 应用免疫荧光双标法初步观察 IA 对脑缺血后不同时间皮层组织神经细胞增殖的影响。结果显示, 脑缺血再灌注后 3 天, 在缺血侧皮层有一定 Brdu 标记阳性细胞表达, 随着缺血时间延长而增加, 到第 7 天增殖细胞达到高峰, 有 5.2% 的 Brdu/NeuN 阳性细胞表达, 到 28 天后下降至 3 天时水平 (略高), 且均较模型组同一时间点明显增多 ($P < 0.05$), 以 IA $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组作用较明显。多数研究者认为皮层本身不具备神经再生功能, 丹酚酸 B 能促进脑缺血后侧脑室下层区域神经元的再生, 并向运动皮层迁移^[11], IA 促进缺血侧皮层 Brdu 标记阳性细胞表达作用可能亦与此有关, 还可能通过上调 bFGF、GAP-43 的表达促进轴突再生及突触的形成, 促进神经元的修复和再生, 最终促进神经功能的恢复。

综上所述, 本研究结果表明, IA 可能通过保护缺血周边组织神经元, 抑制细胞凋亡, 使胶质细胞及神

经元表达 bFGF、GAP-43 上调, 促进神经元的修复和再生而发挥其神经保护作用。

References

- [1] Berry D, Ren J, Kwan CP, et al. Dimeric fibroblast growth factor-2 enhances functional recovery after focal cerebral ischemia [J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2005, 23: 251-256.
- [2] Hua HY, Li YY. Study on pharmacological effect of ilexonin A [J]. *Mod Med J Chin* (中国现代医药杂志), 2006, 8: 137-138.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [4] Chen JL, Li Y, Wang L. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cell after cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 2001, 32: 1005-1011.
- [5] Zheng GY, Chen XC, Du J, et al. Inhibition of propyl gallate on the activation of SAPK/JNK and p38MAPK induced by cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2006, 41: 548-554.
- [6] Lin M, Lin ZY, Chen XC, et al. Effects of propyl gallate on BDNF expression after cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2008, 13: 1109-1115.
- [7] Lledo PM, Alonso M, Grubb MS, et al. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7: 179-193.
- [8] Chen B, Wang JF, Sun X. Regulation of GAP-43 expression by chronic desipamine treatment in rat cultured hippocampal cells [J]. *Biol Psychiatry*, 2003, 53: 530-537.
- [9] Wang G, Liu SQ, Wang SS, et al. Effect of hyperbaric oxygen on the expression of GAP-43 mRNA in the rats cord following spinal cord injury [J]. *Chin J Naut Med Hyperbaric Med* (中华航海医学与高气压医学杂志), 2004, 11: 217-219.
- [10] Gu W, Brannstrom T, Wester P. Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20: 1166-1173.
- [11] Zheng J, Tang MK, Zhang Y, et al. Effect of salvianolic acid B on neural cells damage and neurogenesis after brain ischemia-reperfusion in rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2007, 42: 716-721.