

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01161

Visfatin 对大鼠脑缺血再灌注损伤后 NG2 细胞数的影响

田薇薇, 王培, 缪朝玉*

第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨 visfatin 的神经保护作用是否通过对 NG2 细胞的调节实现。**方法** 采用线栓法制备大鼠中动脉阻塞(MCAO)的局灶性脑缺血再灌注模型。选用 30 只成年雄性 WKY 大鼠, 随机分为假手术(Sham)组、脑缺血模型组、假手术+FK866(visfatin 特异性酶抑制剂)治疗组、脑缺血+FK866 治疗组。后两组给予 FK866 1 mg/(kg·d)灌胃, 连续 14 d。治疗 7 d 后分别进行假手术或 MCAO 手术。手术 7 d 后, 用免疫荧光组织化学法检测各组大鼠大脑内 NG2 阳性细胞数量。**结果** 假手术+FK866 组与假手术组相比, 大鼠脑内 NG2 细胞差异无统计学意义; 脑缺血模型组与假手术组相比, 梗死中心区 NG2 细胞数减少($P<0.01$), 半影区 NG2 细胞数增加($P<0.01$), 对侧区无变化; 脑缺血+FK866 治疗组与脑缺血模型组相比, 以上各区域 NG2 细胞数的改变差异无统计学意义。**结论** 抑制 visfatin 对正常大鼠以及脑缺血再灌注损伤大鼠大脑内 NG2 细胞数目没有明显的影响, visfatin 的神经保护作用可能与 NG2 细胞无关。

[关键词] NG2 细胞; visfatin; 神经保护; 脑缺血; 再灌注损伤

[中图分类号] R 743.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)11-1161-04

Effects of visfatin on NG2 cells following cerebral ischemia/reperfusion injury in rats

TIAN Wei-wei, WANG Pei, MIAO Chao-yu*

Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of visfatin on the NG2 cell number in the brain of normal rats and rats with cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** Transient focal cerebral I/R model was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO) and a monofilament suture *via* intraluminal approach in rats. Thirty adult male Wistar-Kyoto rats were randomly divided into four groups, namely, a sham operation group (Sham), a cerebral I/R model group (MCAO), Sham+FK866 (a specific inhibitor of visfatin) group, and cerebral I/R+FK866 group. Animals in the latter two groups were intragastrically given FK866 (1 mg/[kg·d]) for a consecutive of 14 days; Sham operation or MCAO was performed at the 7th day of FK866 treatment. The NG2 cells were observed by immunofluorescence staining in animal brains at the 7th day after surgery. **Results** There was no significant difference in NG2 cell numbers between the Sham group and Sham + FK866 group. Cerebral I/R model group had significantly less NG2 cells in the core region of infarction ($P<0.01$) and significantly more in the penumbra area ($P<0.01$) compared with the Sham group, with no significant change in the contralateral side. The NG2 cell numbers were not significantly different between the cerebral I/R model group and cerebral I/R + FK866 group in the above mentioned areas. **Conclusion** Inhibition of visfatin shows no noticeable effect on NG2 cell number in the brains of normal and cerebral I/R rats, indicating that the neuroprotective effect of visfatin is not associated with NG2 cells.

[Key words] NG2 cells; visfatin; neuroprotective; brain ischemia; reperfusion injury

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(11): 1161-1164]

Visfatin 是生命活动中十分重要的蛋白分子, 是具有多种重要生理功能, 包括: 促进细胞的增殖分化^[1]、抑制细胞凋亡^[2]、调节胰岛素释放、促进血管

[收稿日期] 2011-04-05 **[接受日期]** 2011-06-09

[基金项目] 国家杰出青年科学基金(30525045), 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)课题(2009CB521902), 上海市优秀学科带头人计划 A 类(10XD1405300), 全国优秀博士论文基金(200369), 国家科技重大专项“重大新药创制”(2009ZX09303-002). Supported by National Natural Science Foundation of China for Distinguished Young Scholars (30525045), National Program on Key Basic Research Project of China (“973” Program, 2009CB521902), Program of Shanghai Leading Scientists (10XD1405300), Foundation for National Excellent Doctoral Thesis (200369), and National Science and Technology Project for “Major Drug Innovation” (2009ZX09303-002).

[作者简介] 田薇薇, 硕士. E-mail: tianwei0109@yahoo.com.cn

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871271, E-mail: cymiao@smmu.edu.cn

新生及促进肿瘤坏死因子(TNF)的合成等^[3]。我们的前期研究已经证实,大鼠脑缺血再灌注损伤后,梗死周围半影区内的 visfatin 表达显著上调;过表达 visfatin 可以减少脑缺血损伤后脑梗死面积,表明 visfatin 在脑缺血损伤时是一种重要的保护因子;进一步研究发现 visfatin 可通过其酶活性,正向调节神经元细胞内 SIRT1 的活力,增强 LKB1 的乙酰化水平,最终激活增强 AMPK 的磷酸化,从而保护神经元对抗缺血损伤^[4]。然而,visfatin 对于神经胶质细胞在脑缺血时的变化是否会有影响目前仍未知。

NG2 细胞是近期发现的一种可能是神经前体细胞的新的细胞系,有报道认为其可分化为胶质细胞和神经元^[5]。既往研究结果表明,大鼠在脑缺血再灌注损伤 7 d 后,梗死周围半影区内,NG2 细胞数量显著增加,其可能参与缺血损伤后的脑组织再生及修复过程^[6],NG2 细胞数目在脑缺血后的上调可能是一种保护作用。在本研究中,我们以大鼠脑缺血模型为研究对象,观察采用外源性的化合物 FK866(visfatin 特异性酶抑制剂)调节 visfatin 后对 NG2 细胞的影响,并对其在脑缺血中的可能作用进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 动物分组、给药 健康成年雄性 12 周 WKY 大鼠 30 只,体质量 250~300 g,由第二军医大学实验动物中心提供,于第二军医大学药学院药理学教研室动物实验室按标准饮食分笼饲养。随机分为 4 组,假手术组 6 只,假手术+FK866(Apoxis S A, Switzerland)组 6 只;脑缺血模型组 9 只,脑缺血+FK866 组 9 只。FK866 治疗组给予 FK866 1 mg/(kg·d)灌胃,连续 14 d(手术前后各 7 d);对照组正常饮水。

1.2 脑缺血再灌注模型制备 大鼠脑缺血再灌注损伤模型制作采用 Kitagawa 线栓法,大鼠用 10%水合氯醛麻醉后,分离出左侧颈总、颈内和颈外动脉,在颈总动脉分叉点近端约 3 mm 处剪一切口,用 4.0 号尼龙线由近端向远端插入颈总动脉、颈内动脉,至大脑中动脉起始段,插入深度约 20 mm 并在稍感阻力时停止。由此造成大鼠局灶性脑缺血,2 h 后拔除尼龙线,开始再灌注。假手术组麻醉后分离出左侧颈总、颈内和颈外动脉,然后缝合。麻醉及手术期间使大鼠肛温保持在 37~37.5℃。

大鼠清醒后,根据 Zea Longa 评分法进行神经行为学评分:0 分,活动正常,无神经功能缺损症状;1 分,不能完全伸展对侧前爪;2 分,行走时,大鼠向对

侧转圈;3 分,行走时,大鼠身体向对侧倾倒;4 分,不能自行行走,意识丧失。评分为 2 分者记入模型组。术后 FK866 治疗组继续灌胃 FK866 7 d。

1.3 标本获取 术后 7 d,将各组大鼠以 10%水合氯醛腹腔注射麻醉,经主动脉先后灌注 4℃生理盐水和 4%多聚甲醛各 300 ml,然后断头取脑,4%多聚甲醛 4℃后固定过夜,15%和 30%蔗糖溶液梯度脱水。选取前凶前后处(Bregma +1.2 mm~-1.2 mm)的脑组织,用冰冻切片连续冠状切取 20 μm 厚的切片。

1.4 NG2 细胞的检测

1.4.1 NG2 的形态观察 采用免疫荧光组织化学间接法,先后加兔抗大鼠 NG2 多克隆抗体(美国 Millipore 公司)、小鼠抗大鼠 GFAP 单克隆抗体(美国 Millipore 公司);PBS 洗涤 3 次之后,加入对应的 Cy3 标记山羊抗兔 IgG 和 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG,在荧光显微镜(CKX-41,日本奥林巴斯)下观察 NG2 阳性细胞的形态。

1.4.2 NG2 阳性细胞计数 根据 GFAP 染色来判断半影区,GFAP 是星形胶质细胞的特异性标志物,梗死半影区星形胶质细胞显著增生,高 GFAP 染色区域表示梗死中心周围的半影区。每只大鼠选取 3 张连续切片,分别在梗死的中心区、半影区和对侧区域随机选取 5 个 200 倍视野,记录 NG2 阳性细胞数量,并计算每只大鼠 NG2 阳性细胞的算术平均数,以个/视野表示。

1.5 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件包对数据进行方差分析。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 NG2 细胞的形态和分布特点 NG2 细胞在正常成年大鼠大脑内广泛分布。从组织结构区分,NG2 细胞主要分布在大脑皮质的分子层、外锥体细胞层和内锥体细胞层,在外颗粒细胞层、内颗粒细胞层和多形层细胞分布较少。在不同区域,NG2 细胞的形态也不相同。在灰质区,NG2 细胞胞体呈圆形或椭圆形,突起短而且丰富,呈放射状从胞体向四周发出;白质区,胞体呈长条状或梭形,突起呈两极发散状态(图 1)。

2.2 梗死半影区 NG2 细胞的变化 在 200 倍显微镜视野下,各组大鼠脑梗死半影区(灰质和白质)每视野内 NG2 细胞的荧光图片和细胞数比较见图 2。假手术组和假手术+FK866 组,术后 7 d 两组视野内 NG2 细胞数差异无统计学意义;脑缺血再灌注 7 d 后,脑缺血组和脑缺血+FK866 组梗死半影区 NG2 细胞数较相应假手术组都增加($P < 0.01$),但是两组

之间差异无统计学意义, 表明 FK866 抑制 visfatin 后对梗死半影区 NG2 细胞数的增加没有影响。

2.3 梗死中心区 NG2 细胞的变化 在 200 倍显微镜视野下, 各组大鼠脑梗死中心区(灰质和白质)每视野内 NG2 细胞数比较见图 3。假手术组和假手术+FK866 组, 术后 7 d 两组视野内 NG2 细胞数差异无统计学意义; 脑缺血再灌注 7 d 后, 脑缺血组和脑缺血+FK866 组梗死中心区 NG2 细胞数较相应假手术组都减少($P < 0.01$), 但是两脑缺血组之间差异无统计学意义, 表明 FK866 抑制 visfatin 后对梗死中心区 NG2 细胞数的减少没有影响。

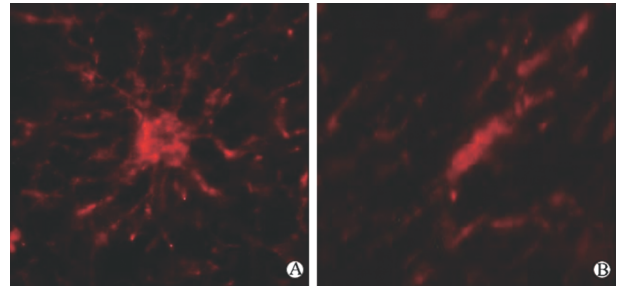


图 1 灰质(A)和白质区(B)NG2 细胞荧光图片
Fig 1 Representative fluorescent images of NG2 cell in the gray matter(A) and white matter(B)

Original magnification: $\times 400$

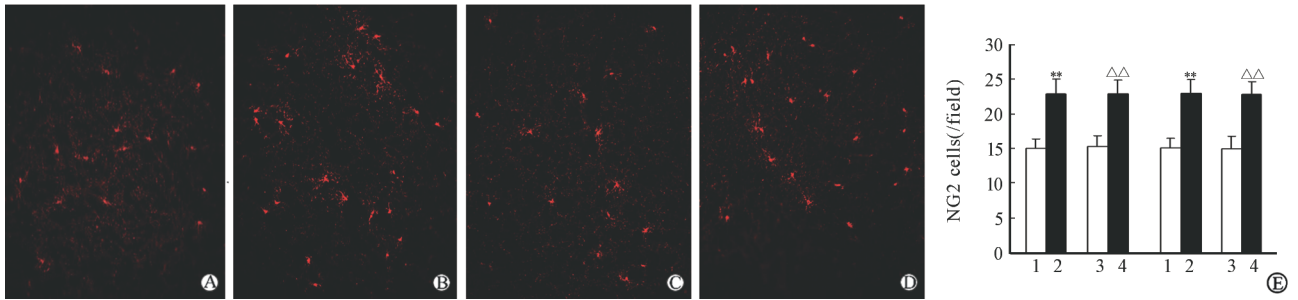


图 2 FK866 对梗死半影区 NG2 细胞的影响

Fig 2 Effect of FK866 on NG2 cells in penumbra region

A-D: Fluorescent images of NG2 cells in penumbra region of sham(A), MCAO(B), sham+FK866(C), and MCAO+FK866(D) groups. Original magnification: $\times 200$. E: NG2 cell number in sham(1), MCAO(2), sham+FK866(3), and MCAO+FK866(4) groups. ** $P < 0.01$ vs sham group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs sham+FK866 group. $n = 6$ (group 1 and group 3), $\bar{x} \pm s$; $n = 9$ (group 2 and group 4), $\bar{x} \pm s$

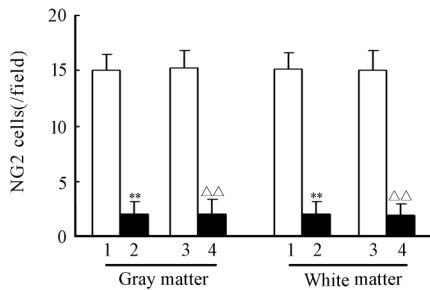


图 3 FK866 对梗死中心区 NG2 细胞的影响

Fig 3 Effect of FK866 on NG2 cells in core region of infarction

NG2 cell number in sham(1), MCAO(2), sham+FK866(3), and MCAO+FK866(4) groups. ** $P < 0.01$ vs sham group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs sham+FK866 group. $n = 6$ (group 1 and group 3), $\bar{x} \pm s$; $n = 9$ (group 2 and group 4), $\bar{x} \pm s$

2.4 梗死对侧区 NG2 细胞的变化 各组大鼠脑梗死对侧区(灰质和白质)每视野内 NG2 细胞数比较见图 4。假手术组和假手术+FK866 组, 术后 7 d 两组视野内 NG2 细胞数差异无统计学意义; 脑缺血再灌注 7 d 后, 脑缺血组和脑缺血+FK866 组梗死对侧区 NG2 细胞数较相应假手术组差异无统计学

意义, 两脑缺血组之间差异也无统计学意义。

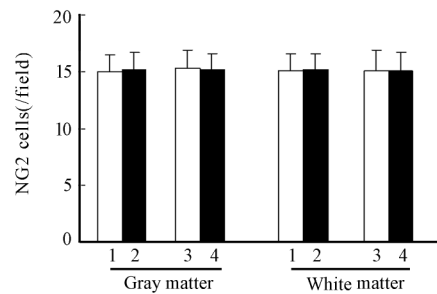


图 4 FK866 对梗死对侧区 NG2 细胞的影响

Fig 4 Effect of FK866 on NG2 cells in contralateral region

NG2 cell numbers in sham(1), MCAO(2), sham+FK866(3), and MCAO+FK866(4) groups. $n = 6$ (group 1 and group 3), $\bar{x} \pm s$; $n = 9$ (group 2 and group 4), $\bar{x} \pm s$

3 讨论

Visfatin 是一个引人注目的蛋白, 它在很多方面都发挥了重要作用, 例如细胞分化、细胞生长、胰岛素分泌和炎症反应等。我们在前期研究中发现 visfatin 在脑组织大量表达, 而且大鼠脑缺血损伤后, 梗

死周围半影区内 visfatin 的表达显著上调,而过表达 visfatin,可以减少 MCAO 后脑梗死面积,表明 visfatin 在脑缺血损伤时是一种重要的保护因子^[4]。而 visfatin 的这种保护作用究竟是通过何种机制来发挥作用的,目前尚未研究清楚。

NG2 细胞广泛分布于发育及成熟哺乳动物的中枢神经系统,具有分化为多种细胞的潜能,在体内可以生成少突胶质细胞、原浆性星形胶质细胞以及某些情况下的神经元,提示它可能是一种新的神经前体细胞^[7]。目前报道的 NG2 细胞的功能特性有:分化和迁移能力;自我更新和不均一分裂能力;与神经元形成兴奋性或抑制性的突触联系;记录到长时程增强 LTP^[8],可能在突触可塑性方面有重要功能。NG2 细胞除了作为可塑性前体细胞群,可能还和神经元联系形成一个独特的神经胶质网络^[9],对于 NG2 细胞的功能和意义目前了解的还不是很清楚,许多问题还有待深入的研究。

NG2 细胞是对中枢神经系统损伤迅速作出反应的细胞类型之一,除缺血性脑损伤外,针刺、脊髓半切伤和兴奋性中毒实验诱导的脱髓鞘等中均可出现 NG2 细胞增殖反应^[10]。已有研究证实,在 SD 大鼠脑缺血再灌注损伤后的第 7 天,梗死周围半影区内的 NG2 细胞数量显著增加,且出现形态学改变,而梗死中心区 NG2 细胞数目明显减少,对侧区数量没有变化^[6]。我们的实验结果也证实了这一点。因为这种反应只出现在损伤区域周围,无论何种机制促使 NG2 细胞快速再进入细胞周期,都必须控制在损伤局部。一种可能性就是邻近的神经元或少突胶质细胞通过 Notch 信号通路保持 NG2 细胞的正常缓慢增殖、损伤或脱髓鞘性病变更会去除这种抑制性信号,使得 NG2 细胞迅速增殖;也可能是信号因子进入损伤的位置引起细胞增殖^[11]。

在预实验中,正常大鼠灌胃 FK866 1 mg/(kg·d),没有发现大鼠有任何异常行为,也没有发现大鼠死亡。我们对治疗组大鼠给予 FK866 饮水,从而抑制 visfatin。首先在假手术组,FK866 组与正常饮水对照组相比未发现大脑中 NG2 细胞数目有任何改变,因此,我们得出 FK866 抑制 visfatin 后对正常大鼠大脑内的 NG2 细胞数目没有影响;在脑缺血再灌注手术组,梗死半影区的 NG2 细胞显著增殖,visfatin 被 FK866 抑制后,并没有影响到半影区 NG2 细胞的增殖,梗死中心区和对侧区的 NG2 细胞数目与对照组相比差异也无统计学意义。

综上所述,visfatin 无论是对于正常状态下大脑内 NG2 细胞的数量,以及脑缺血损伤后梗死中心区、半影区和对侧区内 NG2 细胞的数目,均未发现有统计学意义的作用。虽然在脑缺血损伤半影区 visfatin 和 NG2 细胞有相同的上调变化,但是看来 visfatin 不是脑缺血损伤后 NG2 细胞增殖的一个激活因子。因此,我们初步判断,visfatin 的脑保护作用可能与 NG2 细胞无关。

[参考文献]

- [1] Skokowa J, Lan D, Thakur B K, Wang F, Gupta K, Cario G, et al. NAMPT is essential for the G-CSF-induced myeloid differentiation via a NAD⁺-sirtuin-1-dependent pathway[J]. *Nat Med*, 2009, 15: 151-158.
- [2] Yang H, Yang T, Baur J A, Perez E, Matsui T, Carmona J J, et al. Nutrient-sensitive mitochondrial NAD⁺ levels dictate cell survival[J]. *Cell*, 2007, 130: 1095-1107.
- [3] Van Gool F, Gall M, Gueydan C, Kruijs V, Prevot P P, Bedalov A, et al. Intracellular NAD levels regulate tumor necrosis factor protein synthesis in a sirtuin-dependent manner[J]. *Nat Med*, 2009, 15: 206-210.
- [4] Wang P, Xu T Y, Guan Y F, Tian W W, Viollet B, Rui Y C, et al. Nicotinamide phosphoribosyltransferase protects against ischemic stroke through SIRT1-dependent adenosine monophosphate-activated kinase pathway[J]. *Ann Neurol*, 2011, 69: 360-374.
- [5] Kondo T, Raff M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells[J]. *Science*, 2000, 289: 1754-1757.
- [6] Tanaka K, Nogawa S, Ito D, Suzuki S, Dembo T, Kosakai A, et al. Activation of NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells during post-ischemic reperfusion in the rat brain[J]. *Neuroreport*, 2001, 12: 2169-2174.
- [7] Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, Zhu X. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10: 9-22.
- [8] Ge W P, Yang X J, Zhang Z, Wang H K, Shen W, Deng Q D, et al. Long-term potentiation of neuron-glia synapses mediated by Ca²⁺-permeable AMPA receptors[J]. *Science*, 2006, 312: 1533-1537.
- [9] Wang A, He B P. Characteristics and functions of NG2 cells in normal brain and neuropathology[J]. *Neurol Res*, 2009, 31: 144-150.
- [10] Levine J M, Reynolds R, Fawcett J W. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease[J]. *Trends Neurosci*, 2001, 24: 39-47.
- [11] Tatsumi K, Okuda H, Makinodan M, Yamauchi T, Makinodan E, Matsuyoshi H, et al. Transient activation of Notch signaling in the injured adult brain[J]. *J Chem Neuroanat*, 2010, 39: 15-19.

[本文编辑] 周燕娟, 孙岩