

中图法分类号: R722.6
学 号: 2015384

学校代码: 10661
密 级: 公开



遵义医学院

硕士学位论文

(专业型学位)

人参皂苷 Rd 对新生鼠脑室周围白质软化模型

脑白质区 CX47 和 Nestin 表达的影响

**The effects of GSRd on the expression of CX47 and Nestin in
the white matter of the neonatal rat model
with periventricular leukomalacia**

姓 名:	黄 倩
专 业:	儿 科 学
研究方向:	早产儿脑损伤
导 师:	曹云涛
培养单位:	遵义医学院

2018 年 05 月

遵义医学院硕士研究生 学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。学位论文中除了特别加以标注和致谢的地方外，不包含其他人或其它机构已经发表或撰写过的研究成果。其他同志对本研究的启发和所做的贡献均已在学位论文中作了明确的说明并表示了谢意。

学位论文作者签名：黄倩

签字日期：2018年5月31日

遵义医学院学位论文版权使用授权书

本人完全了解遵义医学院有关保留、使用学位论文的规定，即：遵义医学院有权保留并向有关部门或机构送交学位论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权遵义医学院可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以公布学位论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存学位论文，即：遵义医学院具有学位论文的数字化制品复制权，信息网络传播权和汇编权。保密的学位论文在解密后适用本授权书。

学位论文作者签名：黄倩

导师签名：

黄倩

签字日期：2018年5月31日

签字日期：2018年5月31日

目 录

1. 论文：人参皂苷 Rd 对新生鼠脑室周围白质软化模型脑白质 CX47 和 Nestin 表达的影响

中英缩略词对照表·····	1
中文摘要·····	2
英文摘要·····	4
前言·····	6
材料与方法·····	8
结果·····	12
讨论·····	19
结论·····	22
参考文献·····	23
2. 综述·····	27
3. 致谢·····	36
4. 作者简介·····	37

中英文缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
CNS	Central nervous system	中枢神经系统
CX47	connexin47	缝隙连接蛋白 47
GSRd	Ginsenoside Rd	人参皂苷 Rd
Nestin	nestin	巢蛋白
Olig	Oligodendrocyte	少突胶质细胞
OPCs	Oligodendrocyte precursor cells	少突胶质细胞前体细胞
PBS	Phosphate Buffer solution	磷酸盐缓冲液
PVL	periventricular leukomalacia	脑室周围白质软化

人参皂苷 Rd 对新生鼠脑室周围白质软化模型脑 白质 CX47 和 Nestin 表达的影响

中文摘要

目的 选用 3 日龄新生 SD 大鼠建立脑室周围白质软化 (Periventricular leukomalacia, PVL) 模型, 检测其脑室周围白质巢蛋白 (nestin)、缝隙连接通道蛋白 47 (CX47) 的表达, 以探讨人参皂苷 Rd (Ginsenoside Rd, GSRd) 对新生 SD 大鼠 PVL 模型动物脑室周围白质 nestin、CX47 表达的影响。

方法 分离并结扎 3 日龄新生 SD 大鼠左侧颈总动脉, 再吸入 8%O₂+92%N₂ 的混合气体 1h 制作新生 SD 大鼠 PVL 模型, 随机分为人参皂苷 Rd 实验组、PVL 模型组, 同时设立假手术组。制模术后 3 天、7 天、14 天分别从三组中随机选取 8 只老鼠取脑组织进行 HE 染色观察脑组织病理改变, 免疫组织化学动态检测三组模型动物脑室周围白质 nestin、CX47 不同时间点表达的变化。

结果

1、三组新生 SD 大鼠脑组织大体观察及 HE 染色病理改变

假手术组制模术后 3 天、7 天、14 天脑组织形态结构正常, 脑室无扩大; PVL 模型组、人参皂苷 Rd 实验组病变主要在脑白质区、海马区、内囊、胼胝体、外囊区等; PVL 模型组、人参皂苷 Rd 实验组术后 3 天出现脑组织细胞间隙增宽, 组织结构疏松, 神经纤维出现筛网状坏死及空洞形成, 可见少量的小胶质细胞增生; 术后 7 天细胞水肿明显, 排列不规则, 细胞核中可以看到细胞核浓缩、破裂及溶解, 脑室周围的白质水肿、疏松, 筛网状坏死及空洞明显较术后 3 天减轻, 病变以条索状、点状坏死及囊状坏死为主; 术后 14 天可见侧脑室明显扩大, 小胶质细胞明显增多, 胶质瘢痕形成; 两组相比较, 人参皂苷 Rd 实验组相对 PVL 模型组脑损伤程度轻。

2、三组新生 SD 大鼠脑室周围白质 CX47 的表达

制模术后 3 天、7 天、14 天新生 SD 大鼠脑白质区 CX47 的表达随大鼠日龄的增加表达呈上升趋势, 其中人参皂苷 Rd 实验组最高、假手术组其次, PVL 模型组最少, 经方差分析 $P < 0.05$; 三组间各个时点 CX47 表达两两比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3、三组新生 SD 大鼠脑室周围白质 nestin 表达

假手术组随着日龄增加 nestin 的表达逐渐降低, 人参皂苷 Rd 实验组及 PVL 模型

组制模术后 3 天、7 天、14 天脑白质区 nestin 的表达随日龄增加表达逐渐增多, 以人参皂苷 Rd 实验组表达最多、PVL 模型组介于两者之间、假手术组最少, 三组间经方差分析 $P < 0.05$; 制模术后 3 天、7 天、14 天三组间 nestin 表达两两比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论

- 1、选择出生后 3 天新生 SD 大鼠成功建立新生鼠脑室周围白质软化模型。
- 2、人参皂苷 Rd 可以减轻 PVL 模型动物脑组织损伤, 减轻侧脑室扩大程度, 提示人参皂苷 Rd 对新生鼠脑室周围白质软化模型具有一定的保护作用。
- 3、人参皂苷 Rd 可促进脑室周围白质区 CX47、nestin 的表达, 提示人参皂苷 Rd 可促进对新生鼠脑室周围白质软化模型动物的受损神经细胞再生及髓鞘形成。

关键词: 人参皂苷 Rd; 脑室周围白质软化; 缝隙连接通道蛋白 47; 巢蛋白; 新生鼠

The effects of GSR-d on the expression of CX47 and Nestin in the white matter of the neonatal rat model with periventricular leukomalacia

Abstract

Objective: The neonatal rat model with periventricular leukomalacia (PVL) were made in three-day-old SD rats, and detecting the expression of nestin and connexin47 (CX47) in the white matter in order to investigate the effects of GSR-d on the expression of CX47 and nestin in the white matter of the neonatal rat model with periventricular leukomalacia.

Methods: The PVL model was set up in three-day-old neonatal SD rats by shearing left arteria carotis communis and then breathing 8%O₂+92%N₂ for one hour, which were randomly divided into PVL model group and the GSR-d trial group, and the sham operation group was made also. The pathological change of brain was investigated with microscope at the day 3, day 7 and day 14 after the operation, the expression of CX47 and nestin in the white matter of the neonatal rat model with PVL were tested by immunohistochemistry staining and image quantitative analysis in the three groups.

Results:

1. Hematoxylin-eosin staining of three groups of brain pathological changes

There were no changes in the sham operation group at the day 3, day 7 and day 14 after operation, the morphological structure was normal in the brain, no enlargement of the ventricles were observed. In the PVL model group and GSR-d trial group, the lesions were mainly in the white matter area, hippocampus, internal capsule, corpus callosum, and external capsule area. At day 3 after operation, in the PVL model group and the GSR-d trial group, there was a widening of the intercellular space, the tissue structure was loose, and the nerve fibers appeared screen-like necrosis and vacuolar formation, a small amount of microglial proliferation could be seen. cells edema and the loose, cells were derangement, necrosis was observed; at 7th day post operation, the nucleus could be seen to be karyopyknosis, broken and dissolved in the nucleus, white matter edema around the ventricle, loosening, mesh-like necrosis, and empty cavities were less than at day 3 after operation. The lateral ventricles were significantly enlarged at day 14 after operation, the glial cells were significantly increased, and glial scars formed, but there were still malacia

and irregular structure.the degree of brain injury of the GSR-d treatment group was mild than the PVL model group.

2.The expression of CX47 in periventricular white matter of three groups

Accompany with the day increasing ,the expression of cx47 of the sham operating group at different time points decreased gradually.The expression of CX47 of GSR-d trial group is more than other tow groups, the second is the PVL model group, the sham operation group is the least. there is a significantly difference in three groups($P < 0.05$).

3.The expression of nestin in periventricular white matter of three groups

Accompany with the day increasing ,the expression of nestin of the sham operating group decreased gradually ,meanwhile the expression of nestin in the PVL model group and GSR-d trial group gradually increased respective .Comparing three groups; the expression of nestin in periventricular white matter of the GSR-d trial group is maximum , the second one is the PVL model group,the sham operation group minimum ; there is a significantly difference in three groups at all time pionts($P < 0.05$).

Conclusion:

1. The PVL model was set up in three-day-old newborn SD rats by shearing left arteria carotis communis and then breathing 8%O₂+92%N₂ for one hour,the the pathological presents of brain was similar with the periventricular leukomalacia,its suggested the PVL model of neonatal rat was made successful.

2. Ginsenoside-Rd could relieve the pathological damage of brain in the neonatal rat model with periventricular leukomalacia, reduce the degree of enlarge of the lateral ventricle, suggesting that ginsenoside -Rd has protective effect on neonatal rats with periventricular leukomalacia model.

3. Ginsenoside-Rd could enhance the expression the expression of CX47 and nestin in periventricular white matter of model rats with periventricular leukomalacia ,its suggesting that ginsenoside-Rd may be involved in the regeneration of neurocytes and promoted myelin sheath format.

Key Words:Ginsenoside-Rd, periventricular leukomalacia, connexin47,nestin, newbornrats

前 言

1 早产儿脑室周围白质软化的危害

早产儿脑白质损伤包括两种类型,一种是脑室周围出血性梗死,另一种是脑室周围白质软化,而脑室周围白质软化(periventricular leucomalacia, PVL)是早产儿缺氧缺血性脑损伤中最常见类型^[1、2]。早产儿的脑组织尚未发育完善,其脑组织具有与成熟儿脑组织不同的解剖学特征,易导致脑室周围白质软化^[3、4]。PVL大部分发生在体重低且胎龄小于32周的早产儿,且胎龄越小、出生体重越低,发生率则越高。目前对于早产儿脑白质损伤的治疗尚无有效方法,预防脑室周围白质软化的发生是减少早产儿脑损伤及神经系统后遗症的关键^[5]。1962年Banker和Larroche提出了脑室周围白质软化(periventricular leucomalacia)一词^[6],并报道了脑室周围白质病变组织学演变过程^[7]。研究表明:PVL发生的关键因素是脑缺血缺氧和炎症反应^[8],当两个因素同时或分别发生时,激活兴奋性毒性神经递质、自由基等有害物质,进一步损伤少突神经胶质细胞前体(pre-oligodendrocytes, pre-OLs),最终导致PVL发生^[9]。缺氧缺血主要是因为早产儿的脑白质区血管发育不完善,调节能力差以及此区域血管的扩张反应能力低下,当发生脑损伤时,此区域处于一个低血供状态^[10];发生炎症反应时,自由基、兴奋性氨基酸增多,少突神经胶质细胞前体(pre-OLs)受损是导致早产儿PVL的关键靶细胞,缺血时产生的自由基极易损伤该细胞^[11-15]。

在少突胶质细胞成熟的各个阶段,均有不同的标志物^[16]。CX47特定的表达于少突胶质细胞,与髓鞘基因平行调节,这表明少突胶质细胞中表达的CX47在髓鞘形成中占主要作用^[17、18]。巢蛋白(nestin)为神经干细胞的特征性标志物,仅在胚胎发育早期的神经上皮表达,出生后表达逐渐停止,在成年脑组织中仅有少量表达。同时nestin可作为中枢神经系统损伤的最早、快速应答的敏感指标。当中枢神经系统受到损伤时,迁移至周围的炎症细胞可能释放某些因子,这些因子可能会触使基因活化,导致nestin大量表达。有学者认为,在损伤区域nestin的大量表达可能会提高受损细胞对缺氧的耐受性,并增强细胞的适应性及抵抗力^[19、20]。

2 人参皂甙-Rd 研究现状

人参已分离提取出40余种人参皂苷单体。人参皂苷Rd(Ginsenoside Rd, GSRd)是近几年分离提取出的一种单体。GSRd在全身的各个系统均可发挥作用,其中有些药理作用与其他人参皂苷单体的药理作用相同,但是随着对其的深入探索发现

GSRd 具有许多不同于其它单体的药理作用^[21]。这些独特的药理作用为 GSRd 进一步开发成为临床用药提供了不可缺少的线索。GSRd 众多的药理作用中神经保护作用则是本研究最为关注的一点^[22]。相关研究表明 GSRd 可以将神经干细胞球分化为星形胶质细胞,可以减少活性氧簇的数量,提高超氧化物歧化酶活性,稳定膜电位,从而抑制氧化应激损伤^[23];改善脑缺血再灌注损伤后的神经功能评分,减少脑梗死面积,还可以抑制钙离子大量内流,减轻兴奋性氨基酸的损伤作用^[24]。文献报道, GSRd 在脑卒中防治研究中已进入三期临床实验,有望为脑缺血缺氧患者治疗提供更好的方法。综上所述: GSRd 对中枢神经系统有一定的保护作用,但是目前对新生鼠脑室周围白质软化模型中的研究未见报道^[25-29]。

3 早产儿 PVL 模型研究现状

迄今为止, PVL 动物模型暂无公认的模型,有缺血低氧模型、缺血低氧再灌注模型、宫内感染模型、病态低氧模型;而最常见的是缺血缺氧模型,以 Rice-模型最为经典,即单侧颈总动脉结扎联合低氧进行缺氧。人类足月新生儿脑组织的发育与新生鼠相对应的时间是生后 7 天,人类最容易发生脑室周围白质软化的时间是 28 周,而与之对应的新生鼠是生后 2-3 天^[30-32]。主要的制作方法是结扎出生后第 3 天的新生大鼠单侧或双侧颈总动脉,并将其放置在一个相对低氧的环境中,即吸入 8%O₂ 和 92%N₂ 混合气体进行缺氧来制作早产儿 PVL 动物模型,但是结扎双侧颈总动脉,死亡率高,常导致实验无法进行,故本实验中主要是通过结扎单侧颈总动脉^[33-35]。

综上所述,本实验通过选取生后 3 天 SD 新生大鼠制造新生鼠 PVL 模型,并予人参皂苷 Rd 腹腔注射进行干预,制模术后 3 天、7 天、14 天动态监测脑组织病理变化及 CX47、nestin 的表达来了解脑白质的损伤情况,探讨人参皂苷 Rd (GSRd) 对新生鼠脑室周围白质软化模型脑组织中 nestin、CX47 表达的影响,探讨人参皂苷 Rd 是否具有减轻新生鼠脑室周围白质损伤的神经保护作用,从而为临床防治早产儿脑室周围白质软化提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验器材

实验对象：15 只雌性 SD 大鼠及 8 只雄性 SD 大鼠，从第三军医大学实验动物中心购买，生产许可证：scxk（渝）2012-0005。本实验均在本学校实验室完成，大鼠由该校的医学与生物学实验室动物房喂养，雌雄比例 2:1 合笼交配，待其产出小鼠后，选取生后 3 天 SD 大鼠作为实验对象，性别不限，室温环境，湿度适中，本实验经过本学校动物伦理委员会批准。

1.2 实验设备和器材

主要实验设备及公司名称

实验设备	公司名称
自制小型缺氧仓	大小约60cm×60cm×60cm
92%N ₂ +8%O ₂ 混合气体	贵州省贵阳申建气体公司提供
石蜡包埋机	德国Leica公司
HE全自动染色机	德国Leica公司
石蜡切片机	德国Leica公司
HE全自动染色机	德国Leica公司
DM2500显微镜	德国Leica公司
XSP-C203光学显微镜	日本Olympus公司
修复用微波炉	格兰仕集团
纯水+超纯水处理系统	MiliQA公司（USA）
冰箱	韩国三星公司
电子恒温箱	上海跃进医疗器械产
图像摄取软件 Leica Application suite	德国Leica 公司
Image-pro Plus 6.0图像分析软件	美国Media Cybeenetics

主要实验试剂及公司名称

实验试剂	公司名称
人参皂苷-Rd	南通飞宇生物有限公司
Cx47	Thermo scientific
Nestin	北京博奥森生物有限公司
SABC免疫组化试剂盒（SA1020）	博士德生物
通用型山羊血清	北京中杉金桥生物技术有限公司
鼠兔通用型二抗	上海基因科技有限公司
苏木素染色剂	上海基因科技有限公司
DAB显色试剂盒（AR1022）	博士德生物
4%多聚甲醛	都市科龙化工厂
柠檬酸盐缓冲液	北京中杉金桥生物技术有限公司
磷酸盐缓冲液（PBS）	北京中杉金桥生物技术有限公司

1.3 试剂配制方法

PBS 缓冲液: 1 袋 (23.48g) 磷酸盐缓冲液+2ml 蒸馏水, 稀释混匀;

磷酸盐修复液: 1 袋 (6.46g) 柠檬酸盐修复液+2ml 蒸馏水稀释混匀;

DAB 显色液: 30-40ulC1 液体+1000ulC2 液体, 避光放置, 现配现用;

CX47 抗体配制: 5ul CX47 抗体+495ul 现配 PBS 缓冲液, 现配现用;

Nestin 抗体配制: 1ul nestin 抗体+499ul 现配 PBS 缓冲液, 现配现用;

1.4 实验方法

1.4.1 实验对象分组

选取生后 3 天 SD 大鼠 72 只 (体重 6 ± 2 g), 采取随机数字法分为三组, 即 PVL 模型组、GSR-d 实验组和假手术组, 每组各 24 只, 术后均由自己的母鼠自由喂养。

1.4.2 PVL 模型的制备方法

PVL 模型组、GSRd 实验组及假手术组三组新生大鼠均予 10%水合氯醛(剂量为:20ul/kg)腹腔注射麻醉, 待其失去知觉后, 取仰卧位并予无菌医用胶布固定于无菌操作台上, 选取颈部正中为切口, 并以该切口为中心, 予 2%碘伏向四周消毒大鼠颈部皮肤, 沿切口逐层钝性分离皮下组织找到并游离出颈总动脉, 再予 4-0 丝线分别结扎左侧颈总动脉近端与远端, 结扎后从中间离断, 结扎颈总动脉时动作轻柔, 避免损伤周围的神经、血管及其它组织, 整个手术时间控制在 5-10min, 术中注意保暖, 一般将体温控制在保持在 36°C — 37°C , 术后将其放回母鼠身边恢复 1h 左右。然后将 GSRd 实验组、PVL 模型组放入自制透明低氧舱给予 8%O₂+92%N₂ 缺氧 1 小时。通过观察新生鼠的反应, 当新生鼠出现烦躁不安、四处乱窜、点头样抽搐及皮肤青紫等表现, 则提示缺氧时间足够。假手术组在整个过程当中则只是切开皮肤后钝性分离出左侧颈总动脉, 不结扎, 也不予缺氧。在整个制模过程中, GSRd 干预组死亡 5 只, PVL 模型组死亡 8 只, 而假手术组通过钝性分离左侧颈总动脉后无一只老鼠死亡。实验过程中死亡的新生鼠采用随机方式从另外的新生鼠中选取补充。

1.4.3 给药时间及剂量

给药时间: 缺血缺氧后恢复半小时

药品配制: GSRd 1ml+9ml 生理盐水

PVL 模型组: 腹腔注射 0.9%生理盐水 (0.2ml/g); GSRd 实验组: 腹腔注射 GSRd 配置液 (0.2ml/g);

假手术组：腹腔注射同等容积 0.9%生理盐水(0.2ml/g)；

三组新生鼠给药的间隔时间为 24 小时，连续给药 3 次；

1.4.4 三组脑组织标本及切片制作

术后 3 天、7 天、14 天分别从三组新生大鼠中，随机选取 8 只，予 4%的甲醛穿心，断头取脑的方式迅速取出大脑组织并将其待放入 4%多聚甲醛溶剂中固定 24 小时，再经过冲洗、脱水、硬化、浸透后再进行性包埋，最终行大脑侧脑室周围组织连续冠状切片，隔五选一，每个脑组织标本不少于 9 张切片，HE 染色切片用普通载玻片捞片，免疫组化切片则用多聚赖氨酸处理过的切片捞片，将玻片置于装置中，放入 90℃烤箱烘烤，免疫组化组 1 小时，HE 染色组 20 分钟。

1.5 脑室周围组织病理形态学观察

1.5.1 HE 染色具体步骤

- ① 二甲苯中脱蜡两次，每次的时间为 15 分钟；
- ② 无水乙醇 4 分钟，从高浓度到低浓度(95%乙醇-80%乙醇-75%乙醇-50%乙醇)依次浸泡 1 分钟；
- ③ 双蒸水冲洗两次，每次 3 分钟；
- ④ 苏木素复染 5 分钟；
- ⑤ 自来水轻轻冲洗 2 分钟
- ⑥ 1%盐酸酒精分化 10 秒；
- ⑦ 自来水冲洗 2 分钟；
- ⑧ 伊红溶液 10 秒；
- ⑨ 自来水冲洗 30s；
- ⑩低浓度到高浓度在放入乙醇浸泡，依次为 75%乙醇 3 分钟、95%乙醇数秒、无水乙醇 3 分钟×2 次；
- ⑪二甲苯浸泡两次，每次 3 分钟；
- ⑫中性树脂封片，待干片后光学显微镜下观察结果；

1.5.2 CX47、nestin 免疫组化

参照说明书及相关文献完成免疫组化。Cx47、nestin 被选为本实验的两个检测指标，通过两个指标的表达情况来了解脑室白质损伤程度，根据两个指标表达的结果推断 GSRd 对两者的表达是否有影响。CX47 试剂购买于 Thermo scientific 公司，nestin

购买于北京博奥森生物有限公司, 阴性对照选用 PH7.3PBS 代替一抗, 两种抗体的实验步骤均相同, 仅添加一抗及二抗有所区别。CX47 稀释比例为: 1:100, 而 nestin 稀释比例为: 1:500。

1) 免疫组化检测 CX47

石蜡切片依次放入二甲苯 I、二甲苯 II、无水乙醇、95%乙醇、80%乙醇、75%乙醇、50%乙醇常规脱蜡至脱水; 3%H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶; 柠檬酸盐完成微波修复; 滴加封闭液并放入 25℃温箱孵育 20min; 滴加 CX47 抗体 (1:100), 4℃冰箱过夜 18-20 小时, 阴性对照组采用现配制的 PBS 代替 CX47 抗体; 将过夜 18-20 小时后的标本取出然后在放入 37℃温箱复温 30 分钟; 滴加鼠兔通用型二抗; DAB 镜下显色; 苏木素试剂复染; 1%盐酸酒精分化分化; 乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。待干片后于光学显微镜下观察结果。

2) 免疫组化检测 nestin

Nestin 与 CX47 的免疫组化步骤基本一致, 仅将滴加一抗步骤中的 CX47 抗体更换为 nestin 抗体, nestin 抗体比例为 1:500, 但是在滴加二抗的过程中, 将鼠兔通用型二抗换为北京博奥龙兔免疫技术有限公司的生物素标记山羊抗小鼠 IgG, 同样, 阴性对照组采用现配制的 PBS 代替 nestin。

1.6 免疫组化标本图像处理及分析

Leica DM2500 光学显微镜用于切片镜下观察, Image-Pro Plus6.0 细胞图像分析软件用于完成图像采集并处理数据, 整个过程保证在相同实验条件下进行。检测 CX47、nestin 免疫组化切片, 每只新生鼠脑组织石蜡块取 2 张切片, 每张切片采集前先校正背景, 选择 8 张阳性细胞表达最丰富视野的图片, 200 倍下计算 IOD 值, 整个过程保证在相同实验条件下进行。

1.7 统计学方法

选用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 数据以均数±标准差表示, 三组相同时间点以及每组不同时间点的免疫组化累积光密度值 (IOD) 若通过统计学分析具备方差齐的性质, 使用 LSD 法进行两两比较, 若不具备方差齐的性质, 则采用单因素方差分析进行两两比较, $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 新生鼠 PVL 模型制作后大体观察

2.1.1 PVL 模型组、GSRd 实验组两组新生 SD 大鼠的观察结果

GSRd 实验组和 PVL 模型组在缺氧初期,大鼠开始出现呼吸急促,随着缺氧时延长,大鼠呼吸变得更急促,出现烦躁不安、四处乱窜的表现,且伴有轻微的点头样抽搐,缺氧时间快接近 1 小时的时候,可见大鼠烦躁加重、皮肤青紫、点头样抽搐、四肢抖动;整个缺氧过程持续约 1 小时。假手术组则无需进行缺氧,该组大鼠均无皮肤发绀、点头样抽搐、四肢抖动等表现。整个实验过程中 PVL 模型组死亡 8 只, GSR-d 实验组死亡 5 只,假手术组无死亡。

2.1.2 三组新生 SD 大鼠的生长发育情况

在实验的过程中,实验的 SD 大鼠逐渐长大,但是在整个生长发育过程中, PVL 模型组大鼠出现体重增长慢,毛发稀疏,少动,眼裂小,不能睁眼,自我调节能力差; GSR-d 治疗组以上表现均较 PVL 模型组轻,生长发育介于 PVL 模型组与假手术组之间。假手术组则同正常小鼠生长。

2.1.3 三组新生大鼠脑组织 HE 染色结果

假手术组制模术后 3 天、7 天、14 天脑组织形态结构正常,脑室无扩大,细胞与细胞之间排列紧密,细胞核圆,且随着 SD 大鼠的成长三个时间点的差异并不大;而 PVL 模型组、GSRd 治疗组则出现病变,病变主要在脑白质区、海马区、内囊、胼胝体、外囊区等, PVL 模型组、GSRd 实验组术后 3 天可见细胞间隙增宽,但增宽不明显,组织结构疏松,神经纤维出现筛网状坏死及空洞形成,可见少量的小胶质细胞增生;术后 7 天细胞水肿明显,且排列不规则,细胞核中可以看到细胞核浓缩、破裂及溶解,脑室周围的白质水肿、疏松,筛网状坏死及空洞明较术后 3 天时减轻,以条索状、点状坏死及囊状坏死为主;术后 14 天可见侧脑室明显扩大,小胶质细胞明显增多,且胶质瘢痕形成。但是 GSRd 实验组相对 PVL 模型组脑损伤较轻。见图 1,图 2,图 3。

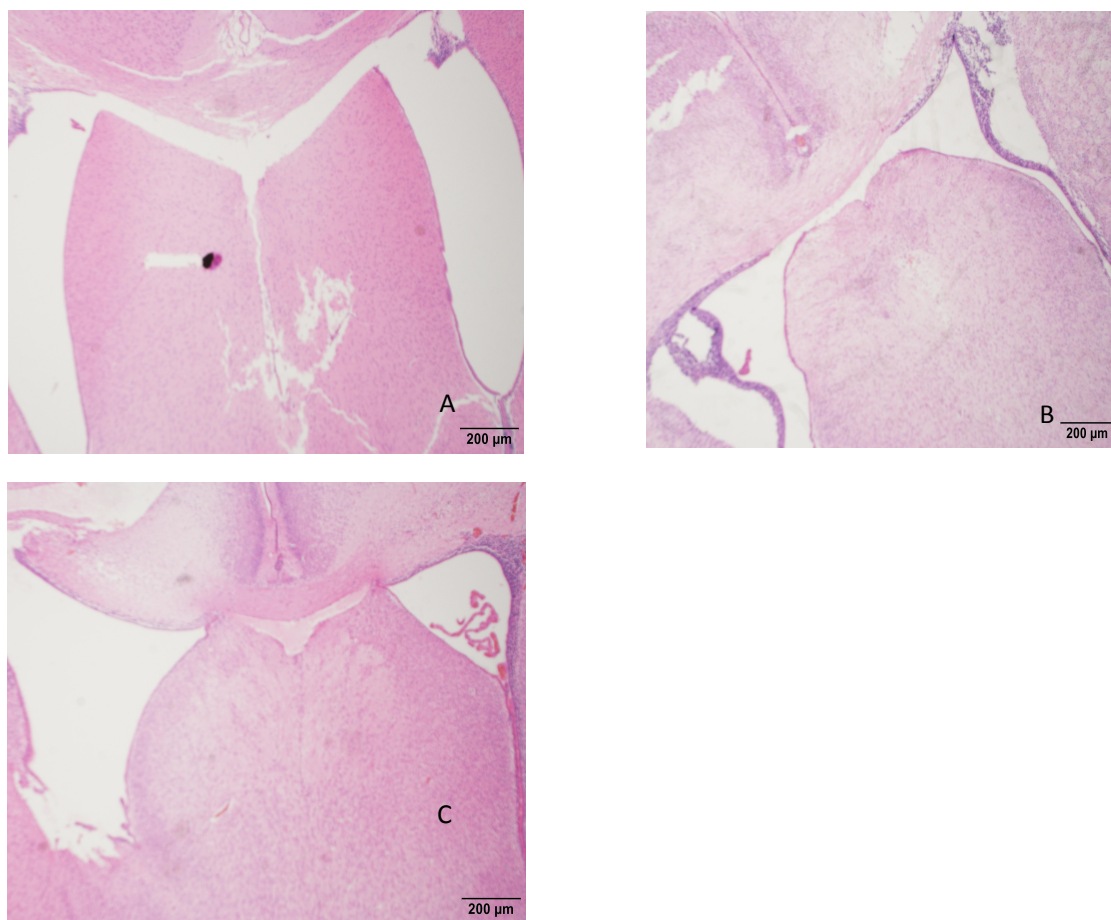


图 1: A-C 为三组侧脑室的改变 (HE $\times$ 10), A 为假手术组, B 为人生皂苷实验组, C 为 PVL 模型组, 假手术组两侧脑室对称, 人生皂苷 Rd 实验组左侧脑室较右侧稍增大, PVL 模型组左侧侧脑室较右侧明显增大, 人参皂苷实验组左侧侧脑室增大无 PVL 模型组明显。

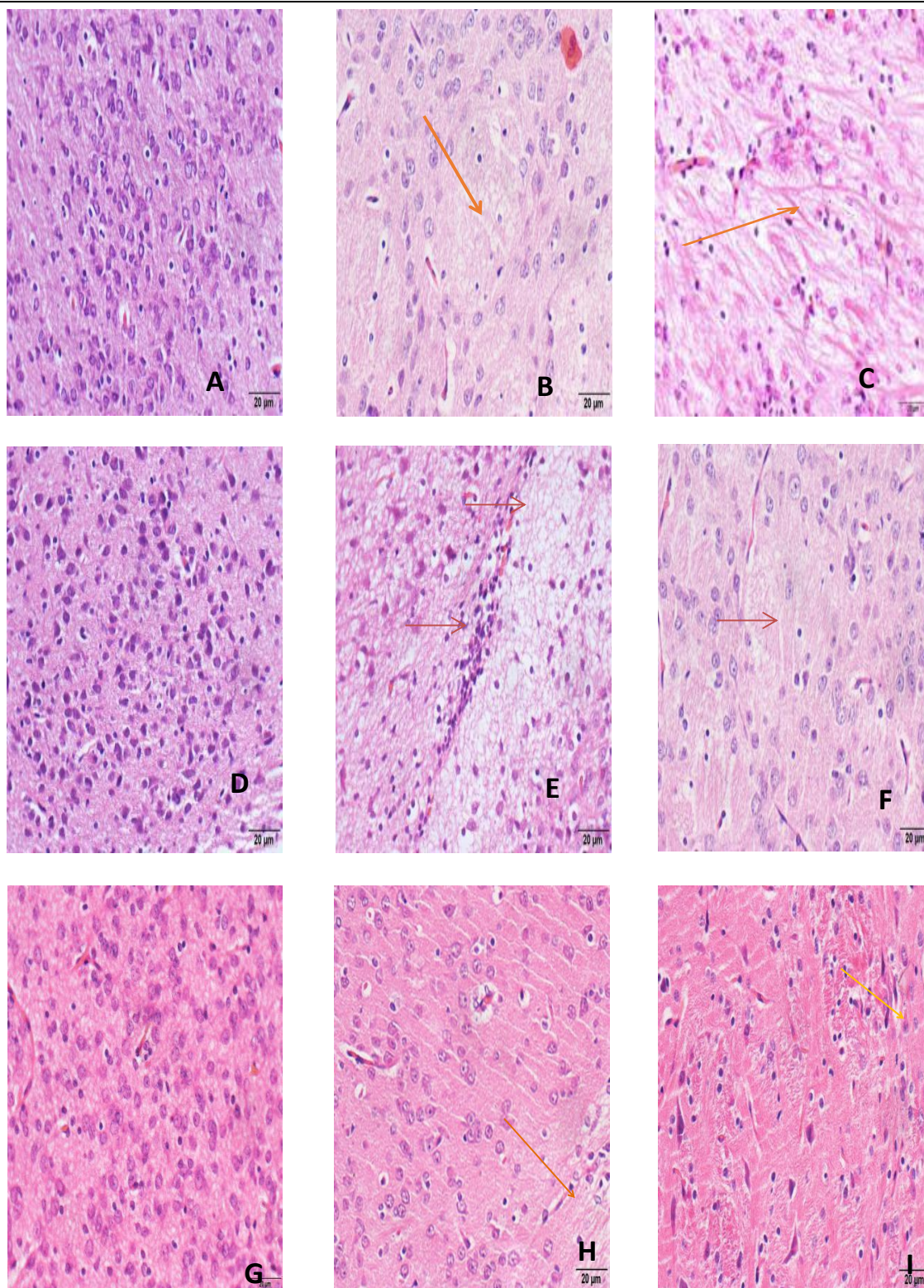


图 2: A-C 为术后 3 天脑室周围白质病理病理改变 (HE $\times$ 400), D-E 为术后 7 天脑室周围白质病理病理改变 (HE $\times$ 400); G-I 为术后 14 天脑室周围白质病理病理改变 (HE $\times$ 400); A、D、G 为假手术组, B、E、H 为人参皂苷实验组, C、F、I 为 PVL 模型组, B、C、E、F、H、I 可见细胞排列紊乱, 组织结构疏松; B 可见囊性坏死, 箭头所示为囊腔; C 可见纤维走行紊乱; E 可见小胶质细胞聚集, 如箭头所示; F 可见坏死增多; H、I 中可见胶质瘢痕形成, 但 I 较 H 病变更多。

2.1.4 三组新生 SD 大鼠脑室周围白质 CX47 的表达

表达 CX47 的阳性细胞胞浆呈棕黄色，阴性对照组未见棕黄色物质，人参皂苷实验组、PVL 模型组及假手术组均可见阳性细胞的表达，如图 5、图 6、图 7，且随日龄的增加，阳性表达产物逐渐增多。在假手术组制模术后 3 天、7 天及 14 天脑组织内充满大量胞浆呈棕黄色的染色，且随日龄的增加而表达相应增多；PVL 模型组阳性产物的表达也随着日龄的增加表达逐渐上升，但是阳性细胞分布稀疏，阳性表达相对较少；人参皂苷 Rd 实验组的阳性产物表达较 PVL 模型组及假手术组均增多。分析三组 CX47 阳性表达的结果，且经过方差分析差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1、图 3。

表一 三组少突胶质细胞标志物 CX47IOD ($\times 10^3$) 值 ($\bar{X} \pm S$)

分组	术后 3 天	术后 7 天	术后 14 天	F	P
PVL 模型组	31.37 $\pm$ 0.85	33.21 $\pm$ 0.64	36.40 $\pm$ 0.70	83.37	0.00
假手术组	32.84 $\pm$ 11.73	34.91 $\pm$ 0.87	36.98 $\pm$ 1.12	68.74	0.00
GSRd 实验组	34.25 $\pm$ 0.78	36.82 $\pm$ 0.83	38.08 $\pm$ 0.80	97.832	0.00
F 值	35.17	77.25	15.73		
P	0.00	0.00	0.00		

注：同一时间点组间两两比较 $P < 0.05$ ，同组不同时间点两两比较 $P < 0.05$

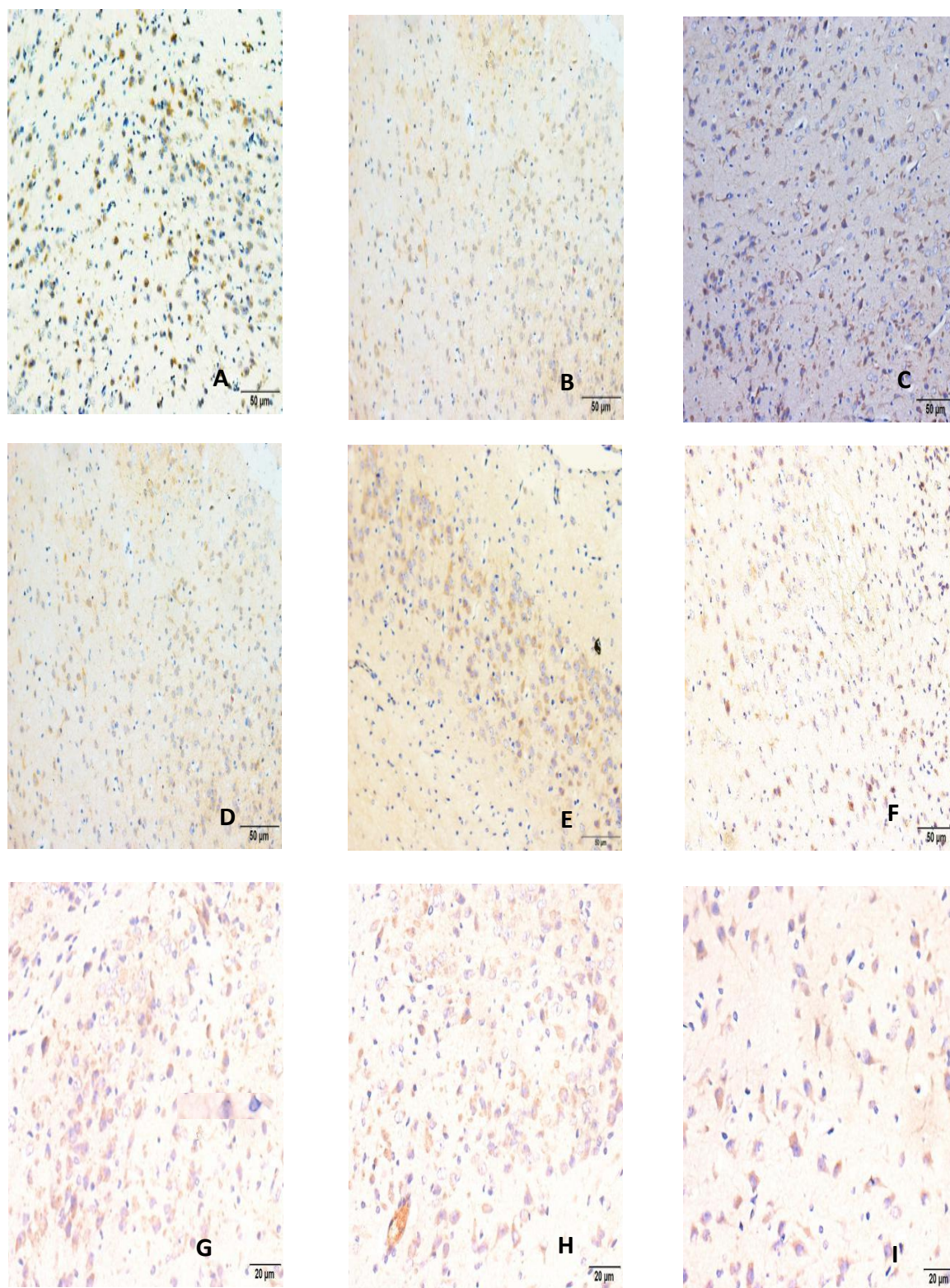


图 3: A-C 为术后 3 天脑室周围白质 CX47 的表达 (SP $\times$ 200); D-F 为术后 7 天脑室周围白质 CX47 的表达 (SP $\times$ 200); H-I 为术后 14 天脑室周围白质 CX47 的表达 (SP $\times$ 400); A、D、G 为人参皂苷 Rd 实验组, B、E、H 为 PVL 模型组, C、F、I 为假手术组, 细胞胞浆呈棕黄色为阳性细胞。

2.1.5 三组新生 SD 大鼠脑室周围白质 nestin 的表达

Nestin 表达阳性细胞，着色部位在细胞胞浆、突起部分，且着色部位呈棕黄色，而阴性对照未见棕色染色，如图 8、图 9、图 10，在假手术组，且随着日龄的不断增长，脑组织不断发育成熟，阳性表达逐渐下降。而在 PVL 模型组及 GSRd 干预组中，nestin 的表达随日龄的增加而上升。PVL 模型组可以看到较假手术组而言阳性表达多；GSRd 干预组则阳性表达较前两组均高，可见阳性表达充满脑组织。最终分析三组 nestin 阳性表达的结果，且经方差分析差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2、图 4。

表二 三组少突胶质细胞标志物 nestin IOD 值 ($\bar{X} \pm S$)

分组	术后 3 天	术后 7 天	术后 14 天	F 值	P
GSRd 实验组	9596.50 ± 242.39	11097.12 ± 751.80	12985.00 ± 710.24	14.29	<0.05
PVL 模型组	7659.37 ± 64.42	8694.87 ± 150.93	9586.00 ± 68.82	593.11	<0.05
假手术组	5878.00 ± 37.97	4583.62 ± 189.79	3877.12 ± 204.72	311.36	<0.05
F 值	1309.59	396.70	922.67		
P	<0.05	<0.05	<0.05		

注：同一时间点组间两两比较 $P < 0.05$ ，同组不同时间点两两比较 $P < 0.05$

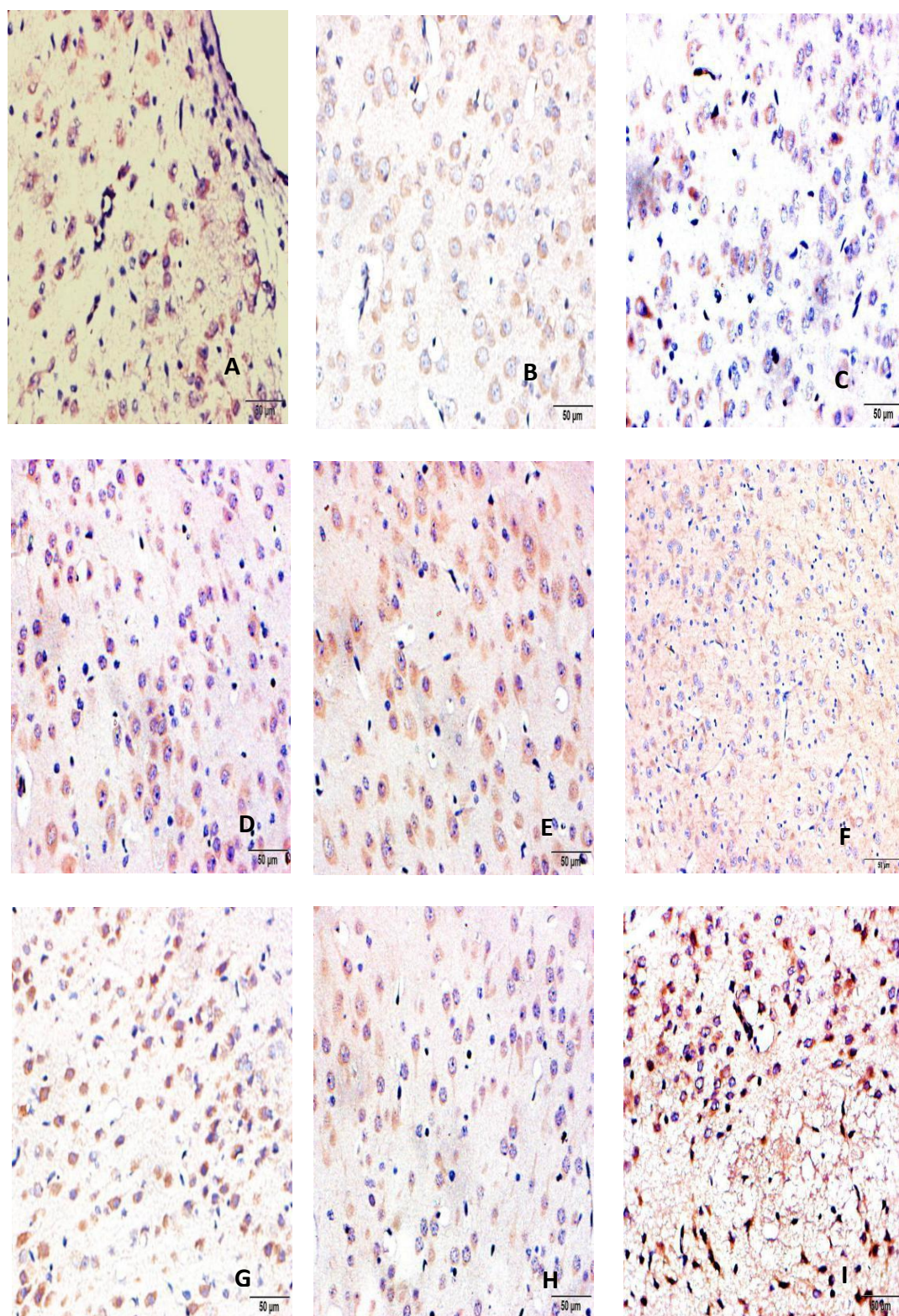


图3: A-C为假手术组术后3天、7天、14天脑室周围白质 nestin 的表达 (SP×200); D-F 为人参皂苷 Rd 实验组术后3天、7天、14天脑室周围白质 nestin 的表达 (SP×200); G-I 为PVL模型组术后3天、7天、14天脑室周围白质 nestin 的表达 (SP×200); A、D、G为术后3天, B、E、H为术后7天, C、F、I为术后14天; 细胞胞浆及突起呈黄色为阳性细胞。

3 讨论

早产是新生儿死亡的首要原因,随着新生儿急救水平的提高,早产儿的存活率也在随之上升,但是部分存活者留有神经系统后遗症,给社会和家庭带来极大的负担^[37]。早产儿脑损伤主要包括两种形式,一是脑室周围白质软化,二是脑室周围出血性梗死^[1, 2]。脑室周围白质软化为早产儿脑损伤最主要的形式,其主要是缺氧缺血、炎症两大因素引起的。早产儿 PVL 发生与早产儿脑血管发育的特点有关,脑室周围白质的血供主要是大脑前、中、后动脉长穿通支和短穿通支,这些血管的远端在早期尚未发育完善,且侧支循环建立少,其次是血管的舒缩调节能力有限,从而导致在缺血再灌注时脑白质相对其它区域仍然处于一个血供相对较少的区域,还有一个原因是脑白质脑血流自主调节机制受损,增加了低血压时脑白质边缘区域缺血的危险^[4]。当发生炎症反应时,自由基、兴奋性氨基酸增多及细胞因子分泌增加及炎症细胞的迁移,而这些均具有毒性损伤作用,少突胶质细胞对这些毒性作用极其敏感^[7]。32 周以前的早产儿脑白质区主要以少突胶质细胞前体细胞为主,作为脑室周围白质软化的靶细胞,当缺氧缺血或者是炎症反应发生时均会使少突胶质细胞受损,从而导致脑白质损伤。

人类胎儿 24-32 周为髓鞘形成的主要时期,新生鼠生后 3-7 天相当于人类胎龄 23-36 周;刚出生的新生鼠以神经干细胞为主,生后 3-7 天以少突胶质细胞前体细胞及不成熟的少突胶质细胞为主,未髓鞘化的少突胶质细胞对各种损伤极为敏感,故早产儿容易发生脑室周围白质软化^[38],生后 3 天 SD 大鼠神经发育特点符合人类早产儿的神经发育特点,有研究表明选用生后 3 天 SD 大鼠可以成功建立脑室周围白质软化的动物模型;目前比较公认的早产儿脑室周围白质模型制作方法是通过对结扎新生鼠双侧或单侧颈总动脉,然后在吸入低浓度氧。但是通过阅读相关文献提示结扎双侧颈总动脉存活率低,不利于本实验的进行。因此本实验选择生后 3 天新生 SD 大鼠通过分离并结扎左侧颈总动脉,在吸入 8%O₂+92%的混合气体来制造 PVL 模型。试验中观察 SD 大鼠随着日龄的增加,出现了生长发育、运动落后,毛发稀疏、左侧眼裂变小,病理切片 HE 染色出现组织结构疏松、细胞排列紊乱、囊性坏死、小胶质细胞浸润、胶质瘢痕形成以及左侧脑室扩大等病理改变,以上均证实符合早产儿脑室周围白质软化的改变,表明新生鼠 PVL 模型制备成功^[38]。

中草药中的名贵药材人参可以分离提取出许多单体,目前发现的有 40 余种,而人参皂苷 Rd 则是其中一种,其化学活性强,分子量相对小,且脂溶性高,易于透过

血脑屏障^{[19][39]}，相关研究报道，人参皂苷 Rd 在中枢神经系统中的作用有以下几点：促进神经干细胞分化为神经胶质细胞；减少活性氧簇的形成，增强抗过氧化物的活性；抑制小胶质细胞的激活以及诱导一氧化氮和环氧合酶的表达，减轻炎症损伤；增强大鼠脑梗死后心血管的生长；促进小胶质细胞分泌 BDNF 等作用^[22-24]，且人参皂苷 Rd 已用于脑卒中的三期临床实验^[39]。

两个紧密相连的细胞通过相同或者不相同的两种缝隙连接蛋白可以形成一个中空亲水性通道，也就是缝隙连接通道，缝隙连接在中枢神经系统中是不可缺少的，其功能包括：传递物质及信息、参与神经元的发育与再生及对抗有害物质。CX47 是属于缝隙连接蛋白中的一种，CX47 特定的表达于少突胶质细胞，与髓鞘基因平行调节，并且发现部分 CX47 与 CX32 在少突胶质细胞中共同存在，但是当敲除 CX47 后则不能正常的进行髓鞘化^[40-44]。CX47 作为本实验的一个检测指标，通过分析该蛋白在不同组及不同时间点的表达来了解脑室周围白质软化的损伤程度，根据实验的相关数据分析，可以看到在人参皂苷 Rd 的干预作用下，CX47 阳性产物表达较 PVL 模型组及假手术组多。且两两比较均具有统计学意义，这表明脑室周围白质软化中 CX47 的表达下调可能是由于少突胶质细胞损伤引起的，从而导致髓鞘化障碍及髓鞘发育延迟。在人参皂苷 Rd 的干预下，CX47 的表达逐渐增多，推断出人参皂苷 Rd 可能对脑室周围白质软化动物模型具有一定的神经保护作用^[34-37]。

Nestin 是一种中间丝蛋白，是中枢神经系统发育过程中神经干细胞及神经前体细胞的特异性标志物之一，广泛用于神经干细胞的鉴定^[46-48]。在正常的脑组织中，nestin 的阳性表达主要在侧脑室脉络丛、脑室管膜下区、海马齿状回等区域，且在成熟的脑组织中 nestin 的表达逐渐减少，而当脑组织出现缺氧缺血时，可诱导中枢神经细胞的原位增殖及神经细胞的再生^[49-50]。在正常的脑白质区，仅有少量的 nestin 表达。但通过本实验，可以看到，在 PVL 模型中，nestin 大量表达，且在人参皂苷 Rd 的干预下 nestin 阳性表达产物较 PVL 模型组及假手术组均增多，推测人参皂苷 Rd 可以促进神经干细胞的再生，起到神经保护作用。

本实验通过检测脑室周围白质区 CX47、nestin 的表达，结合脑组织的病理改变，推测人参皂苷 Rd 对脑室周围白质软化可能具有一定的神经保护作用。它可能是通过促进少突胶质细胞再生，是髓鞘能正常形成，也可能是促进神经干细胞再生，从而分化为神经元及各种少突胶质细胞，最后减轻脑组织的损伤，但本实验只是初步探讨人

参皂苷 Rd 是否具有神经保护作用，具体的保护机制有待我们进一步去探讨。

4 结论

(1) 选择生后 3 天 SD 大鼠通过结扎左侧颈总动脉并缺氧成功建立新生鼠脑室周围白质软化模型。

(2) 人参皂苷 Rd 可以减轻 PVL 模型动物脑组织的损伤, 减轻侧脑室扩大程度, 提示人参皂苷 Rd 对新生鼠脑室周围白质软化模型具有一定的保护作用。

(3) 人参皂苷 Rd 可促进脑室周围白质区 CX47、nestin 的表达, 提示人参皂苷 Rd 对脑室周围白质软化动物模型的髓鞘形成及神经再生有一定的促进作用。

参考文献

- [1] Liu J, Li J, Qin GL, et al. Periventricular leukomalacia in premature infants in mainland China[J]. *Amer J Perinatol*, 2008, 25(09):535-540.
- [2] Serenius F, Källén K, Blennow M, et al. Neurodevelopmental Outcome in Extremely Preterm Infants at 2.5 Years After Active Perinatal Care in Sweden[J]. *JAMA*, 2013, 309(17):1810-1820.
- [3] Inder TE, Warfield SK, Wang H, et al. Abnormal cerebral structure is present at term in premature infants[J]. *Pediatrics*, 2005, (2):286-294.
- [4] Malhotra A, Yahya Z, Sasi A, et al. Does fetal growth restriction lead to increased brain injury as detected by neonatal cranial ultrasound in premature infants?[J]. *Paediatr Child Health*, 2015, 51(11):1103-1108.
- [5] Kinney H C, Haynes R L, Gang Xu MD PhD, et al. Neuron deficit in the white matter and subplate in periventricular leukomalacia[J]. *Annals of Neurology*, 2012, 71(3):397-406.
- [6] BANKER BQ, LARROCHE JC. Periventricular leukomalacia of infancy. A form of neonatal anoxic encephalopathy[J]. *Arch Neurol*, 1962;7:386-410.
- [7] Wang S, Fan GG, Xu K, et al. Altered microstructural connectivity of the superior and middle cerebellar peduncles are related to motor dysfunction in children with diffuse periventricular leukomalacia born preterm: a DTI tractography study[J]. *European Journal of Radiology*, 2014, 83(6):997-1004.
- [8] 何柳芳, 陈惠金. 感染/炎性反应对早产儿脑室周围白质软化发生的影响[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2008, 23(6):472-474.
- [9] Resch B, Volleard E, Maurer U, et al. Risk factors and determinants of neurodevelopmental outcome in cystic periventricular leukomalacia[J]. *Eur J Pediatr*, 2000, 159(9):663-670.
- [10] Volpe JJ, Kinney HC, Jensen FE, et al. The developing oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature infant[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2011, 29(4):423-440.
- [11] Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. Anatomic analysis of blood vessels in germinal matrix, cerebral cortex, and white matter in developing infants[J]. *Pediatric Research*, 2004, 56(1):117-124.
- [12] Billiards SS, Haynes RL, Folkerth RD, et al. Myelin abnormalities without oligodendrocyte loss in periventricular leukomalacia[J]. *Brain pathology*, 2008, (2):153-163.
- [13] Back SA. Perinatal white matter injury: the changing spectrum of Pathology and emerging insights into pathogenetic mechanisms[J]. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2006 2006;12(2):129-40.
- [14] 许全梅, 熊曼, 胡勇, 等. 缺氧缺血未成熟新生鼠脑少突胶质细胞髓鞘化障碍致脑白质损伤的作用[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2012, 27(22):1740-1744.
- [15] Haynes R L, Folkerth R D, Keefe R J, et al. Nitrosative and Oxidative Injury to Premyelinating Oligodendrocytes in Periventricular Leukomalacia[J]. *Neuropathol Exp Neurol*, 2003, 62(5):441-450.
- [16] Altevogt BM, Kleopa KA, Postma FR, Scherer SS, Paul DL. Connexin29 is uniquely distributed

- within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems[J]. *Neurosci*, 2002;22:6458-6570.
- [17] Ahn M, Lee J, Gustafsson A, Enriquez A, Lancaster E, Sul JY, Haydon PG, Paul DL, Huang Y, Abrams CK, Scherer SS. 2008. Cx29 and Cx32, two connexins expressed by myelinating glia, do not interact and are functionally distinct[J]. *Neurosci Res* 86:992-1006.
- [18] Morita M. Perilesional nestin-expressing reactive astrocytes in a novel brain injury model (photo injury)[J]. *Neuroscience Research*, 2010, 68(1):e350.
- [19] Peng H, Zhou H, Xiong Y. Effect of basic fibroblast growth factor on nestin expression in neonatal rats following hypoxic-ischemic brain damage[J]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2006 Jun;8(3):235-238.
- [20] 周超群, 周珮. 人参皂苷 Rd 的研究进展[J]. *中草药杂志*, 2009,(5): 832-836.
- [21] 鲁瑶, 彭娜, 路志红, 等. 人参皂甙-Rd 预先给药对大鼠脑的保护作用[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2009, 8(6):496-499.
- [22] 姬利, 张钦军, 冯国栋. 人参皂甙 Rd 对大鼠脑缺血后丘脑远隔损害的保护作用研究[J]. *神经解剖学杂志*, 2017, 33(6):731-734.
- [23] 张琛, 叶瑞东, 韩军良等. 人参皂甙 Rd 对皮层神经元兴奋性毒性损伤后胞内游离钙的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2010, 26(2):112-118.
- [24] Ren K, Chao J, Ma P, et al. Ginsenoside Rd alleviates mouse acute renal ischemia/reperfusion injury by modulating macrophage phenotype[J]. *Ginseng Res*, 2016 Apr;40(2):196-202.
- [25] Xie Z, Shi M, Zhang C, et al. Ginsenoside Rd Protects Against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury Via Decreasing the Expression of the NMDA Receptor 2B Subunit and its Phosphorylated Product.[J]. *Neurochemical Research*, 2016, 41(8):1-11.
- [26] 赵海波, 张云霞, 韩军良等. 人参皂甙 Rd 在脑缺血亚急性期的脑保护效应[J]. *神经解剖学杂志*, 2013, 29(1):6-12.
- [27] 惠娟, 曾联婷, 赵永, 史明, 韩军良. 人参皂甙 Rd 对成年大鼠脑梗死后新生血管生长的影响[J]. *神经解剖学杂志*. 2015,(1): 13-18.
- [28] Craig A, Ning LL, Beardsley DJ, et al. Quantitative analysis of perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human[J]. *Experimental Neurology*, 2003, 181(2):231-240.
- [29] Hagberg H, Peebles D, Mallard C. Models of white matter injury: Comparison of infectious, hypoxic - ischemic, and excitotoxic insults[J]. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2002;8(1):30-38.
- [30] Jantzie L L, Talos D M, Selip D B, et al. Developmental regulation of group I metabotropic glutamate receptors in the premature brain and their protective role in a rodent model of periventricular leukomalacia[J]. *Neuron Glia Biology*, 2011, 6(4):277-288.
- [31] Jantzie L L, Hu M Y, Park H K, et al. Chloride cotransporter NKCC1 inhibitor bumetanide protects against white matter injury in a rodent model of periventricular leukomalacia[J]. *Pediatric Research*,

- 2015, 77(4):554-562.
- [32] Back S A, Luo N L, Borenstein N S, et al. Arrested oligodendrocyte lineage progression during human cerebral white matter development: dissociation between the timing of progenitor differentiation and myelinogenesis[J]. Neuropathol Exp Neurol. 2002 Feb;61(2):197-211.
- [33] Richard W I Cooke Laurence J Abernethy. The sequelae of neonatal brain injury[J]. Paediatrics and child health, 2010, 20(8):374-381.
- [34] Li X, Ionescu A V, Lynn B D, et al. Connexin47, connexin29 and connexin32 co-expression in oligodendrocytes and Cx47 association with zonula occludens-1 (ZO-1) in mouse brain[J]. Neuroscience, 2004, 126(3):611.
- [35] Chaban Y H, Chen Y, Hertz E, et al. Severe Convulsions and Dysmyelination in Both Jimpy and Cx32/47 (-/-) Mice may Associate Astrocytic L-Channel Function with Myelination and Oligodendrocytic Connexins with Internodal Kv Channels[J]. Neurochemical Research, 2017, 42(6):1-20.
- [36] Chen N, Wang J, Jiang Y, et al. Different Mutations of Gap Junction Connexin 47 Lead to Discrepant Activation of Unfolded Protein Response Pathway in Pelizaeus-Merzbacher-Like Disease[J]. Neuropediatrics, 2017, 48(06):426-431.
- [37] 刘明花, 韦红. 早产儿脑室周围白质软化发病机制的研究进展[J]. 儿科药学杂志, 2011, 17(1):57-59.
- [38] 李清香, 曹云涛. Apelin-36 对新生鼠脑室周围白质软化模型脑白质 MBP 和 NG2 表达影响[D]. 遵义, 遵义医学院, 2016: 1-50.
- [39] 朱廷廷, 李甫, 陈斌, 等. 人参叶的皂苷成分[J]. 应用与环境生物学报, 2016, 22(1):70-74.
- [40] 谭燕, 刘鸣. 急性缺血性脑卒中神经保护剂治疗的随机对照试验证据[J]. 中华神经科杂志, 2004, 37(4):349-350.
- [41] Parenti R, Cicirata F, Zappalà A, et al. Dynamic expression of Cx47 in mouse brain development and in the cuprizone model of myelin plasticity[J]. Glia, 2010, 58(13):1594-1609.
- [42] Volpe J J, Kinney H C, Jensen F E, et al. The developing oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature infant[J]. Int J Dev Neurosci. 2011 Jun;29(4):423-40.
- [43] Maglione M, Tress O, Haas B, et al. Oligodendrocytes in mouse corpus callosum are coupled via gap junction channels formed by connexin 47 and connexin32[J]. Glia, 2010, 58(9):1104-1117.
- [44] Wasseff S K, Scherer S S. Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling[J]. Neurobiology of Disease, 2011, 42(3):506-513.
- [45] Gao W L, Tian F, Zhang S Q, et al. Epidermal growth factor increases the expression of Nestin in rat reactive astrocytes through the Ras-Raf-ERK pathway[J]. Neuroscience Letters, 2014, 562(11):54-59.
- [46] Huang YL, Wu CM, Shi GY et al. Nestin serves as a prosurvival determinant that is linked to the cytoprotective effect of epidermal growth factor in rat vascular smooth muscle

- cells[J]. Biochem. 2009;146(3):307-315.
- [47] Petricevic J, Forempoher G, Ostojic L, et al. Expression of nestin, mesothelin and epithelial membrane antigen (EMA) in developing and adult human meninges and meningiomas[J]. Acta Histochemica, 2011, 113(7):703-711.
- [48] Neradil J, Veselska R. Nestin as a marker of cancer stem cells. Cancer Sci. 2015 ;106(7):803-11.
- [49] Li Y, Chopp M. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat[J]. Brain Research, 1999, 838(1-2):1-10.
- [50] 彭好, 周宏, 熊英. 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后神经干细胞巢蛋白表达的变化[J]. 中国新生儿科杂志, 2006, 21(4):213-216.

综 述

少突胶质细胞中缝隙连接的研究进展

黄 倩 综述 曹云涛 审校

1 缝隙连接

缝隙连接 (Gap junction) 是广泛存在于组织细胞间的一种特殊结构, 它也是一种细胞连接形式, 在所有的组织细胞中仅有骨骼肌细胞、血细胞和精子之间不存在缝隙连接, 其余的均存在缝隙连接^[1]。

缝隙连接是两个紧密相连的细胞通过相同或者不相同的两种缝隙连接蛋白形成的一个中空亲水性通道, 这是目前公认的可以直接进行细胞间物质交换及信息传递的直接通道。组成缝隙连接的单位主要是连接小体, 这种连接小体是由 6 个结构相同的缝隙连接蛋白 (connexin, Cx) 形成的六聚体组成^[2]。缝隙连接蛋白这种特殊类型的膜蛋白主要构成细胞间隙连接的基本结构和功能。到目前为止, 在哺乳动物中发现的缝隙连接蛋白约有 21 种^[3], 但仅仅有 11 种在中枢神经系统中表达: 神经元上主要表达的是 CX32、CX36、CX26, 其中以 CX36 最为常见; 星形胶质细胞上表达的最多的是 CX43, 除此之外还有 CX30、CX45、CX40、CX32, 少突胶质细胞中最先发现的是: CX32、CX29, 而 CX47 是近年来发现在中枢神经系统中特定表达于少突胶质细胞中的, 但是 CX29 不形成功能性的缝隙连接通道, 且据相关文献报道, CX32 表达于少突胶质细胞的胞体, CX29 可能表达于成熟的髓鞘, 而 CX47 的和 CX32 共同表达于少突胶质细胞的胞体^[4-7]。

缝隙连接在中枢神经系统中的发挥着至关重要的作用^[8], 是神经元与胶质细胞之间维持各自功能所不能缺少的, 通过阅读相关文献, 了解到在癫痫、脱髓鞘疾病、缺血缺氧等疾病中, 缝隙连接将会受到一定的损伤。

2 缝隙连接在中枢神经系统中的功能

2.1 缝隙连接的开放或闭合是由 Ca^{2+} 、PH 等相关因素控制的^[9]。在这些因素作用下, 维生素、无机盐、离子、环磷腺苷(cAMP)等信息分子、氨基酸、葡萄糖等小分子量的物质, 都可以借助缝隙连接在相邻细胞间进行双向流动, 从而维持细胞的营养代谢, 使其能正常的进行增殖分化, 并在相应的组织中发挥其功能^[10]。

2.2 参与细胞间信息传递

在中枢神经系统中,相邻两个细胞间的缝隙连接蛋白形成一个通道,通过这个通道,两个细胞之间可以进行性信息传递,且这种信息传递具有传导快,阻抗低,延搁时间短的特点。在某一应激情况下,其中一个细胞受到刺激,其离子电位改变并通过两者之间形成的缝隙连接迅速将离子或其他调节信号传递给另一细胞,这种同步化机制对完成机体的整体功能具有重要作用^[11]。

2.3 参与神经元的发育与再生

研究表明,在中枢神经系统中,神经元与神经元之间也存在缝隙连接,两者之间形成缝隙连接的连接蛋白主要是 CX36; Cx36 在哺乳动物的中枢神经系统中表达先呈上升趋势,后随着年龄的增长,表达逐渐下降,在成年时期呈一个低表达水平。但是在以神经元损伤为主的疾病中,如癫痫、脑外伤, CX36 的表达明显上升,则缝隙连接参与了神经元的发育^[12-13]。

2.4 对抗有害物质的作用

在某一应激情况下,细胞可能会遭到严重损害,而这以损害的细胞可以快速的通过缝隙连接向周围细胞排出有害物质,减少其对细胞的损害。而相邻的细胞也可以通过缝隙连接向受损的细胞提供营养物质,帮助功能的迅速恢复。通过缝隙连接,可以将受损细胞的损伤程度缩小到最小,同时,也可能使其加重,也就是当细胞受损比较严重时,产生的有害物质过多,缝隙连接通道可能关闭从而限制有害物质的扩散^[14, 15]。中枢神经细胞中的胶质细胞虽不能形成动作电位,但由于缝隙连接通道的存在,使各种离子、小分子等物质在胶质细胞间进行交换。在一定范围内星形胶质细胞与少突胶质细胞之间通过缝隙连接形成网络维持神经系统内环境稳定发挥关键作用,尤其是在调节内外的 PH 值、K⁺和谷氨酸水平上,这种中枢神经系统神经胶质细胞之间的缝隙连接很可能参与了炎症引起的中枢神经系统疾病^[16]。近年来发现,脑梗死后神经元损伤过程中,胶质细胞活化扮演着重要的角色^[17, 18],胶质细胞间缝隙连接在缺血状态下仍然有部分开放^[19]。有研究发现,脑缺血提高缝隙连接的开放,通过缝隙连接阻断剂生胃酮的干预减小了脑缺血或再灌注后的脑损伤。

3 少突胶质细胞中的缝隙连接蛋白

少突胶质细胞中主要存在的缝隙连接蛋白有: CX32、CX29 及 CX47,其中 CX32 是最早被检测出的缝隙连接蛋白,它在髓鞘发育、沃勒变性和轴突再生时表达。敲除 CX32 的转基因大鼠髓鞘稍稀疏,神经传到速度明显下降。曾有研究表明,尽管少突

胶质细胞表达 CX32, 但是敲除 CX32, 中央髓鞘的形成所受影响不是很大, 为了探索该矛盾现象, 发现了 CX47 特定的表达于少突胶质细胞, 与髓鞘基因平行调节。并且发现 CX47 与表达在星形胶质细胞中的 CX43 形成异形偶联通道, 即 CX47/CX43, 星形胶质细胞和少突胶质细胞之间就是通过该通道来传递两者之间的细胞信号, 并通过此来维持细胞内和细胞间的离子平衡。在 mice 中将 CX47、CX43 一并敲除, 可以从中发现少突胶质细胞的数量明显减少, 且呈现髓鞘空泡化的病理状态, 因此 CX47 对中枢神经系统中的髓鞘形成具有一定的保护和维持作用^[20-22]。

每一个少突胶质细胞上有不少于 100 种以上的缝隙连接蛋白表达^[23], 并且在中枢神经系统中, 少突胶质细胞中大部分的缝隙连接蛋白主要与星形胶质细胞上的缝隙连接蛋白相偶联形成缝隙连接^[24]。CX32 是 CX47 被认为是形成异源缝隙连接的主要少突胶质细胞连接蛋白^[25]。少突胶质细胞与星形细胞之间主要的信息交换、物质传递主要是由表达于少突胶质细胞上的 CX47 介导的^[26]。

在中枢神经系统中, 包裹轴突的髓鞘是由少突胶质细胞形成的, 少突胶质细胞在缺血缺氧及炎症等影响下, 数量会有所下降, 从而会导致髓鞘形成障碍。此时特定表达在少突胶质细胞中的 CX47 的表达也会下降, 相关研究表明, 星形胶质细胞通过 CX47 可以明显调控少突胶质前体细胞的细胞周期和细胞增殖数量, 但是其机制不详, 不过这是研究髓鞘再生的关键点, 值得我们深入研究^[27-29]。脑室周围白质软化模型主要是以少突胶质细胞受损为主, 成功建立脑室周围白质软化模型, 并取其脑组织检测 CX47 的表达, 得出的结论是其表达明显下降, 这可能与髓鞘形成障碍有至关重要的作用^[30-31]。

少突胶质细胞前体细胞是一类多潜能干细胞, 具有高度增殖特性的功能, 在特定条件下也能分化为神经元、星形胶质细胞^[32], 但是少突胶质细胞前体细胞分化为少突胶质细胞及其它神经细胞的能力是有限的, 如果能在特定条件下使其大量增殖, 并向少突胶质细胞方向分化那对髓鞘修复具有很大的作用^[33]。星形胶质细胞是中枢神经系统中最多、最主要的大胶质细胞^[34], 其构成了少突胶质细胞前体细胞最主要的外环境, 且通过分泌或间接接触, 星形胶质细胞可以通过 CX47 调控少突胶质细胞前体细胞增殖分化, 但是具体机制尚不清楚。近几年来相关研究表明: 星形胶质细胞通过 CX47 上调少突胶质细胞前体细胞 S1PR3 以及介导 Ca^{2+} /ERK1/2 磷酸化通路促进少突胶质细胞前体细胞增殖^[33]。

少突胶质细胞中的缝隙连接蛋白的表达对髓鞘功能至关重要。因为编码 CX32 和 CX47 的基因: GJB1、GJC2 突变都可以使 CX32、CX47 的表达异常,从而使少突胶质细胞数量下降,最终导致严重的人类髓鞘相关疾病。如 GJC2 突变可引起引起佩梅样病^[36],而 GJB1 突变导致了 X-连锁脱髓鞘周围神经病变 Charcot-Marie-Tooth 1 型^[37]。这些髓鞘疾病均与少突胶质细胞中缝隙连接蛋白有关。

4 脱髓鞘疾病

脱髓鞘疾病(Demyelinating Diseases)是一大类病因不相同,临床表现各异,但有类同特征的获得性疾病,其特征的病理变化是神经纤维的髓鞘脱失而神经细胞相对保持完整^[38]。髓鞘是由髓鞘细胞的细胞膜构成,中枢神经的髓鞘细胞是少突胶质细胞的细胞膜构成,周围神经纤维的髓鞘是施万细胞的细胞膜构成。髓鞘的作用是保护神经元,并加速神经冲动的传导。在髓鞘遭到破坏时,传导速度减慢。神经传导也受温度的影响,在髓鞘脱失时体温升高可引起传导阻滞。少突胶质细胞是中枢神经的髓鞘形成细胞,包绕神经纤维的轴突而形成髓鞘,主要的功能是参与和维持髓鞘。近年来随着对神经系统疾病研究的深入发现在细胞与细胞之间存在着缝隙连接蛋白也参与了髓鞘的形成和维持,缝隙连接蛋白组成了缝隙连接的细胞间通道^[39-41]。佩梅样病是一种婴幼儿期起病的遗传白质脑病,属于常染色体隐性遗传病,其是 GJC2 突变所致疾病。该病在早期的时候主要表现为眼球震颤、肌张力低于正常水平,病情逐渐演变加重,将会出现惊厥及周围神经系统损伤,且主要表现为逐渐加重的痉挛性瘫痪^[42]。PMLD 主要的致病基因是 GJC2,该基因编码的是缝隙连接蛋白 47(connexin 47, Cx47),而这个蛋白主是由 439 个氨基酸组成的^[43、44]。GJC2 突变后,基因突变编码异常的蛋白质,该蛋白质沉积在少突胶质细胞的内质网中,而不可以转运至细胞膜,从而导致 CX47 和 CX43 偶联的失败,也就影响了中枢神经系统中星形胶质细胞与少突胶质细胞之间信号的传递,使得少突胶质细胞的功能丧失,最终导致髓鞘形成障碍^[45-47]。且编码 CX47 的蛋白主要在少突胶质细胞的内质网中进行,基因突变后编码的异常也在内质网中,这就干扰了蛋白质的正确折叠,并激活了未折叠蛋白反应,最终导致少突胶质细胞功能障碍^[49、50]。但是目前 CX47 突变体是如何干扰少突胶质细胞功能从而影响髓鞘形成障碍的机制尚不明确,有待我们进一步去研究。

5 展望

在中枢神经系统中,少突胶质细胞是唯一可以形成髓鞘的细胞,当遇到缺氧缺血、

炎症等危险情况时少突胶质细胞会受到严重损害,根据损害程度,少突胶质细胞的数量会相应的下降,CX47 特定的表达于少突胶质细胞中,随着少突胶质细胞的减少,CX47 的表达也会随之下降。导致髓鞘形成减少以及髓鞘形成障碍。最终会出现与髓鞘形成障碍相关的疾病,而从缝隙连接入手去研究其在髓鞘形成作用及其机制可为对脱髓鞘疾病的治疗寻找一个新的靶点。

参考文献

- [1] Harris AL. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules [J]. Prog Biophys Mol Biol, 2007,94(1-2): 120-143.
- [2] De Maio A, Vega VL, Contreras JE. Gap junctions, homeostasis, and injury[J]. Journal of Cellular Physiology, 2002, 191(3):269–282.
- [3] Lee IH, Lindqvist E, Kiehn O, et al. Glial and neuronal connexin expression patterns in the rat spinal cord during development and following injury [J]. Comp Neurol, 2005, 489(1):1-10.
- [4] Kleopa KA, Orthmann JL, Enriquez A, et al. Unique distributions of the gap junction proteins connexin29, connexin 32, and connexin 47 in oligodendrocytes.[J]. Glia, 2004, 47(4):346-357.
- [5] Nagy JI, Ionescu A V, Lynn BD, et al. Connexin 29 and Connexin 32 at oligodendrocyte and astrocyte gap junctions and in myelin of the Mouse Central Nervous System[J]. J Comp Neurol, 2003 Sep 22;464(3):356-370.
- [6] Altevogt BM, Kleopa KA, Postma FR, et al. Connexin 29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. [J]. Neurosci, 2002,22(15):6458–6570.
- [7] Ahn M, Lee J, Gustafsson A, et al. Cx29 and Cx32, two connexins expressed by myelinating glia, do not interact and are functionally distinct[J]. Neurosci Res. 2008;86(5):992-1006.
- [8] Condorelli DF, Trovato-Salinaro A, Mudo G, et al. Cellular expression of connexins in the rat brain: neuronal localization, effects of kainate-induced seizures and expression in apoptotic cells [J]. Eur J Neurosci, 2003, 18(7):1807-1827.
- [9] Dere E, Zlomuzica A. The role of gap junctions in the brain in health and disease [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2012, 36(1):206-217.
- [10] Paemeleire K. Calcium signaling in and between brain astrocyte and endothelial cells [J]. Acta Neurol Belg, 2002,102(3): 137-140.
- [11] Kielian T, Esen N. Effects of neuroinflammation on gila-glia gap junctional intercellular communication: a perspective [J]. Neurochem Int, 2004, 45(2-3):430-434.
- [12] Meister M, Wong RO, Baylor DA, et al. Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina [J]. Science, 1991, 252(5008): 939-943.
- [13] Belousov AB, Fontes JD. Neuronal gap junctions: making and breaking connections during development and injury [J]. Trends Neurosci, 2013, 36(4): 227-236.
- [14] Hamzei-Sichani F, Davidson KG, Yasumura T, et al. Mixed Electrical-Chemical Synapses in Adult Rat Hippocampus are Primarily Glutamatergic and Coupled by Connexin-36 [J]. Front Neuroanat, 2012, doi: 10.3389.
- [15] De Maio A, Vega VL, Contreras JE. Gap junctions, homeostasis, and injury [J]. Cell Physiol, 2002, 191(3):269-282.
- [16] Kielian T. Glial Connexins and Gap Junctions in CNS inflammation and disease[J]. Journal of Neurochemistry, 2008, 106(3):1000-1016.

- [17] Nedergaard M, Dirnagl U. Role of glial cells in cerebral ischemia [J]. *Glia*, 2005, 50(4): 281-286.
- [18] Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis [J]. *Glia*, 2005, 50(4): 427-434.
- [19] Zhang L, Li YM, Jing YH, et al. Protective effects of carbenoxolone are associated with attenuation of oxidative stress in ischemic brain injury [J]. *Neurosci Bull*, 2013, 29(3): 311-320.
- [20] Frantseva MV, Kokarovtseva L, Naus CG, et al. Specific gap junctions enhance the neuronal vulnerability to brain traumatic injury [J]. *Neurosci*, 2002, 22(3): 644-653.
- [21] Maglione M, Tress O, Haas B, et al. Oligodendrocytes in mouse corpus callosum are coupled via gap junction channels formed by connexin 47 and connexin 32 [J]. *Glia*, 2010, 58(9): 1104-1117.
- [22] Wasseff S K, Scherer S S. Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling [J]. *Neurobiol Dis.*, 2011, 42(3): 506-513.
- [23] Odermatt B, Wellershaus K, Wallraff A, et al. Connexin 47 (Cx47)-deficient mice with enhanced green fluorescent protein reporter gene reveal predominant oligodendrocytic expression of Cx47 and display vacuolized myelin in the CNS [J]. *Neurosci*, 2003, 23(11): 4549-4559.
- [24] Rouach N, Avignone E, Mèze W, et al. Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system [J]. *Biol Cell*. 2002 Nov; 94(7-8): 457-475.
- [25] Shi G, Degen J, Teubner B, et al. The murine gap junction gene connexin36 is highly expressed in mouse retina and regulated during brain development [J]. *FEBS letters*, 1998, 428(1): 27-31.
- [26] Kamasawa N, Sik A, Morita M, et al. Connexin-47 and connexin-32 in gap junctions of oligodendrocyte somata, myelin sheaths, paranodal loops and Schmidt-Lanterman incisures: implications for ionic homeostasis and potassium siphoning [J]. *Neuroscience*, 2005, 136(1): 65-86.
- [27] Zlomuzica A, Tress O, Binder S, et al. Changes in object recognition and anxiety-like behaviour in mice expressing a CX47 mutation that causes Pelizaeus-Merzhauser-like disease [J]. *Neurosci*, 2012, 34(2-3): 277-287.
- [28] 吴波, 郭树章, 任先军. 少突胶质前体细胞体外增殖与分化的实验研究 [J]. *脊柱外科杂志*, 2009, 7(2): 104-107.
- [29] 李真, 刘兆雨, 徐丹等. 星形胶质细胞通过 CX47 促进少突胶质前体细胞增殖 [J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 35(12): 21-29.
- [30] 秦川, 渠文生. 脑白质低灌注损伤后星形胶质细胞缝隙连接蛋白 43 的表达变化 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2016, 19(16): 44-46.
- [31] 许全梅, 熊曼, 胡勇, 等. 缺氧缺血未成熟新生鼠脑少突胶质细胞髓鞘化障碍至脑白质损伤的作用 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2012, 27(22): 1740-1744.
- [32] Barateiro A, Fernandes A. Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(9): 1917-1929.

- [33] 张冠宇, 孙平新, 李文林. 少突胶质细胞前体细胞移植治疗中枢神经系统脱髓鞘疾病的研究进展[J]. 第二军医大学学报, 2017, 38(1):7-14.
- [34] 沈维高, 何欣, 王振江. 星形胶质细胞的生物学功能及其与疾病的关系研究进展[J]. 北华大学学报(自然), 2008, 9(6):501-509.
- [35] 刘兆雨, 王尚, 徐丹, 等. 星形胶质细胞调控少突胶质前体细胞增殖机制研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2017(10):4030-4035.
- [36] 解温品, 雷志礼. 缝隙连接及脑组织中缝隙连接通讯的研究进展[J]. 武警医学, 2009, 20(9):849-850.
- [37] Sargiannidou I, Kagiava A, Bashiardes S, et al. Intraneural GJB1 gene delivery improves nerve pathology in a model of CMT1X.[J]. Annals of Neurology, 2015, 78(2):303-316.
- [38] 邱伟, 胡学强. 神经系统炎性脱髓鞘疾病治疗进展[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2017, 24(2):81-84.
- [39] 林晓静, 赵廷宝, 刘少君. 少突胶质前体细胞与髓鞘形成及再生的研究进展[J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(7):786-789.
- [40] 陈鹏慧, 蔡文琴. 少突胶质前体细胞中中枢神经系统相关功能研究进展[J]. 生理科学进展, 2012, 43(4):275-278.
- [41] Mekhail M, Almazan G, Tabrizian M. Oligodendrocyte-protection and remyelination post-spinal cord injuries: a review.[J]. Progress in Neurobiology, 2012, 96(3):322-39.
- [42] 季涛云, 姜玉武. 佩梅病及佩梅样病[J]. 中国实用儿科杂志, 2009, 24(7):522-524.
- [43] Zlomuzica A, Tress O, Binder S, et al. Changes in Object Recognition and Anxiety-Like Behaviour in Mice Expressing a Cx47 Mutation That Causes Pelizaeus-Merzbacher-Like Disease[J]. Developmental Neuroscience, 2012, 34(2-3):277-287.
- [44] Uhlenberg B, Schuelke M, Rüschemdorf F, et al. Mutations in the gene encoding gap junction protein alpha 12 (connexin 46.6) cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease[J]. Am J Hum Genet, 200, 75(2):251-260.
- [45] Chaban YHG, Chen Y, Hertz E, et al. Severe Convulsions and Dysmyelination in Both Jimmy and Cx32/47 -/- Mice may Associate Astrocytic L-Channel Function with Myelination and Oligodendrocytic Connexins with Internodal Kv Channels[J]. Neurochem Res, 2017 42(6):1747-1766.
- [46] Chen N, Wang J, Jiang Y, et al. Different Mutations of Gap Junction Connexin 47 Lead to Discrepant Activation of Unfolded Protein Response Pathway in Pelizaeus-Merzbacher-Like Disease[J]. Neuropediatrics, 2017, 48(6):426-431.
- [47] Henneke M, Combes P, Diekmann S, et al. GJA12 mutations are a rare cause of Pelizaeus-Merzbacher-like disease[J]. Neurology, 2008, 70(10):748-754.
- [48] Wang J, Wang H, Wang Y, et al. Two novel gap junction protein alpha 12 gene mutations in two Chinese patients with Pelizaeus-Merzbacher-like disease[J]. Brain Dev, 2010,

32 (3): 236-243.

- [49] Maglione M, Tress O, HaasB, et al. Oligodendrocytes in mouse corpus callosum are coupled via gap junctionchannels formed by connexin47 and connexin32[J]. *Glia*,2010,58(9):1104-1117.
- [50] Shimojima K1, Tanaka R, Shimada S,et al. A novel homozygous mutation of GJC2 derived from maternal uniparental disomy in a female patient with Pelizaeus-Merzbacher-like disease[J].*Neurol Sci*, 2013,15;330(1-2):123-126.

致 谢

时光荏苒，转眼间我的硕士生涯就快要结束了。在论文完成的最后，我不经想起从我踏硕士研究生生涯的那天到现在我的导师、轮转科室的各个老师、同学和朋友对我的帮助，对于他们，我有太多的感谢和感恩，而这些则是用语言所不能表达完的。

首先，感谢我的导师曹云涛教授，他是一位慈祥、平易近人的老师。本课题正是在他的深切关怀和悉心指导下完成的。他严肃认真的科学态度、精益求精的工作作风，深深的感染和激励着我。从课题的选择到整个实验的顺利完成都离不开曹老师悉心的指导和不懈支持。在此，我再次对我的恩师曹老师致以崇高的敬意。在未来的道路上，曹老师永远是我的指明灯。

其次，感谢我的师兄雷贤明、师姐杨洁、李清香及何晴，在我这两年的学习生涯中，谢谢你们的指导和鼓励，谢谢你们在实验出现问题的时候给出的建议与指导；感谢我的同门田红、师妹姚露露，谢谢你们俩在我忙碌的时候给予的帮助，同时还要感谢实验室的伙伴对我实验的帮助与指导；感谢在这两年中陪伴在我身边的朋友，有你们我的研究生生涯才更有意义；我还要感谢我在临床轮转中遇到的每一位老师，感谢你们在我临床学习中的谆谆教诲，还要感谢我的父母及家人对我的无私关爱和养育之恩！

最后，我要感谢在我生命中出现的每一个人，有你们，这两年多的酸甜苦辣中，我才能勇敢的迈出步伐，走向未来。

作者简介

姓名：黄倩 性别：女 出生日期：1990.01 籍贯：贵州省毕节市

最后学历（学位）：医学学士 毕业院校：遵义医学院

工作经历：无

在学期间参加的研究项目：人参皂苷-Rd 对新生鼠脑室周围白质软化模型
脑组织中 CX47、nestin 表达的影响

发表论文、著作、申请专利：无