

探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质 bFGF 表达的影响*

闫桂芳¹ 高俊淑² 李娜² 贾子善^{1,3}

摘要 目的:观察探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)表达的影响。**方法:**SD 大鼠 75 只,采用电凝法造成右侧大脑中动脉阻断(MCAO)模型后,随机分为独居组(n=20),社交组(n=30),探索学习组(n=20),假手术对照组(n=5)。于不同时间分批处死大鼠,用免疫组化染色观察梗死灶周围皮质 bFGF 阳性细胞数。**结果:**梗死灶周围皮质 bFGF 阳性神经元明显增加。探索学习组 bFGF 阳性神经元数量在各个时间点均明显高于独居组($P<0.001$ 或 $P<0.01$),在第 7 天、14 天时多于社交组($P<0.001$);独居组在第 7 天、14 天、21 天时 bFGF 阳性神经元数量低于社交组($P<0.01$)。**结论:**探索学习及社会交往均能促进梗死灶周围皮质 bFGF 表达。

关键词 探索学习;社会交往;脑梗死;大鼠;碱性成纤维细胞生长因子

中图分类号:R743 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-01-0049-03

The effect of learning on bFGF expression in rats after unilateral local cerebral infarction/ YAN Guifang, GAO Junshu, LI Na, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(1):49—51

Abstract Objective: To study the effect of learning on bFGF expression in rats after unilateral local cerebral infarction. **Method:** After making the model of MCAO by electric coagulation successfully, 75 male SD rats were randomly divided into individual living group (n=20), social communication group (n=30), learning group (n=20) and sham operated group (n=5). The rats were randomly sacrificed at different time points. The expression of bFGF in peri-ischemic cortex was examined by immunohistochemistry staining. **Result:** The number of bFGF labeled cells in learning group was higher than those in other two groups at the 7th and 14th d ($P<0.001$), and was higher than those in individual living group at the 21st and 28th d ($P<0.01$). The number of bFGF labeled cells in individual living group was lower than those in social communication group at the 7th, 14th and 21st d ($P<0.01$). **Conclusion:** Learning and social communication could enhance bFGF expression in periischemic cortex after unilateral local cerebral infarction in rats.

Author's address Rehabilitation Center, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang, 050051

Key words learning; social communication; cerebral infarction; rat; basic fibroblast growth factor

探索学习是指动物主动去接受新的信息而改变自身行为、适应新的环境、不断用新的记忆取代旧的记忆的过程。学习可促进局灶性脑梗死大鼠行为学恢复^[1],增加 BDNF 及 GAP-43 表达^[2-3]。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)属于成纤维细胞因子家族成员,可促进细胞增生分化和血管生成,阻止细胞凋亡,修复损伤组织^[4],在学习记忆与突触可塑性中起重要作用^[5]。本研究观察探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质 bFGF 表达的影响,以探讨探索学习影响脑梗死后功能恢复的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 75 只,3—4 月龄,体重 230—260g,购自华中科技大学同济医学院实验动物

学部(合格证号 SCXK(鄂)2004-0007)。将动物随机分为 MCAO 模型组 70 只,假手术对照组 5 只。

1.2 制备 MCAO 模型及分组

参照 Bederson 等^[6]的方法制备 MCAO 模型。大鼠用 10%水合氯醛(0.35ml/100g 体重)腹腔内注射麻醉,以左侧侧卧位固定于手术台,剃除右侧颞顶部鼠毛。常规消毒后,在右眼与右耳之间切开皮肤,分离颞肌,暴露颞骨翼板,术中避免损伤面神经、面部主要动脉、静脉、眼外肌及泪腺和颧弓。在手术显微镜下,用牙钻经颞骨翼板钻至硬脑膜,暴露大脑中动脉后,用小咬骨钳向下咬去部分颅骨,暴露大脑中动

* 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中心,石家庄,050051

2 河北省人民医院神经二科

3 通讯作者

作者简介:闫桂芳,女,硕士,副主任医师

收稿日期:2008-05-14

脉近端,用电凝器凝闭嗅束近端至大脑下静脉之间的一段大脑中动脉,然后依次缝合颞肌及皮肤。腹腔内注射 0.2 万 IU 青霉素以预防感染。术后 24h 随机分为独居组 20 只,社交组 30 只,探索学习组 20 只。假手术对照组,不电凝 MCA,其余步骤与手术组相同。

1.3 造模后饲养环境

假手术对照组:饲养于标准笼,每笼 5 只。独居组:饲养于标准笼,一鼠一笼。社交交往组:饲养于标准笼,每笼 5 只。探索学习组:10—15 只大鼠饲养于由一个圆笼和一个方笼组成的迷宫笼。直径 500mm 的圆笼同 640×480×120mm 的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)。

1.4 标本的制备

社交组于造模后第 1 天、第 3 天各取 5 只,假手术对照组于造模后 1 周时取 5 只,其他各试验组分别于造模后 1 周、2 周、3 周、4 周各组随机取 5 只,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 200ml,总量在 20—30min 内灌完后立即剖颅取脑在视交叉处切开后浸于 4%多聚甲醛中再固定 4h。经常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,做 5μm 厚连续切片备染。

1.5 免疫组化染色

组织切片常规脱蜡,水化。PBS 冲洗 3 次,每次 3min; 0.3%过氧化氢室温孵育 10min,消除内源性过氧化物酶;PBS 冲洗 3min,2 次;热修复 30min;PBS 冲洗 3min,3 次;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 3min,3 次;滴加一抗(bFGF 为 1:300,购自北京中杉),置 20%甘油湿盒 4℃恒温过夜;PBS 冲洗 3min,3 次;滴加溶液 B(生物素标记的二抗),室温孵育 10min;PBS 冲洗 3min,3 次;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 3min,3 次;DAB 显色;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。PBS 代替一抗做阴性对照。

1.6 图像处理

每只大鼠选取 3 张切片,每张切片选取 3 个高倍视野,用 CMIAS8 真彩色病理图像分析系统进行

分析,统计梗死灶周围皮质 bFGF 阳性细胞数。

1.7 统计学分析

各组数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据处理采用 SPSS12.0 统计分析软件,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

假手术组大鼠大脑皮质可见较少的 bFGF 阳性神经元 (31.53±3.34),其胞体和突起内呈棕色的 bFGF 染色。在社交交往组可见 MCAO 术后第 1 天梗死灶周围区 bFGF 阳性神经元增加 (53.47±4.61),和假手术组比较有显著性差异 ($P<0.05$),术后第 3d 达高峰(64.47±3.56),然后逐渐减少。在术后各时间点探索学习组 bFGF 阳性神经元数量均高于独居组 ($P<0.001$ 或 $P<0.01$),于术后第 7 天、第 14 天高于社交组 ($P<0.001$),社交交往组于术后第 7 天、第 14 天、第 21 天多于独居组 ($P<0.01$)见表 1,图 1(见前置彩色插页)。

表 1 各组梗死灶周围 bFGF 阳性神经元数比较($\bar{x} \pm s$, ×400)

时间点	独居组	社交交往组	探索学习组
第 7 天	40.73±3.10	45.33±3.39 ^②	56.13±3.78 ^{①③}
第 14 天	32.20±3.21	36.27±3.17 ^②	44.67±3.72 ^{①③}
第 21 天	31.53±3.14	35.87±4.39 ^②	36.13±3.14 ^②
第 28 天	29.93±2.71	31.73±3.37	33.53±3.11 ^②

同独居组比较:① $P<0.001$,② $P<0.01$;同社交组比较:③ $P<0.001$

3 讨论

bFGF 属于成纤维细胞因子家族成员,是由 154 个氨基酸组成的 18kD 的阴离子多肽类生长因子,于 1984 年被首次分离纯化,当时它是从牛的脑组织和脑垂体中作为成纤维细胞的有丝分裂原分离出来的。bFGF 的受体广泛分布于神经元、胶质细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞和内皮细胞等多种细胞中,其中尤以神经元中含量最为丰富。bFGF 与其受体结合,能产生广泛的细胞效应,促进细胞增生分化和血管生成,阻止细胞凋亡,修复损伤组织^[4]。

丰富的外部环境刺激及功能训练可以增加神经营养因子的产生,保持突触的持续可塑性,从而改善脑卒中造成的各种功能缺失的恢复^[12-13]。本研究发现, MCAO 术后第 1 天梗死灶周围区 bFGF 表达增加,术后第 3 天达高峰,这同 Elizabet 的研究 MCAO 后 bFGF 蛋白表达高峰在第 3 天^[7]相一致。本研究显示探索学习组 bFGF 表达高于社交组和独居组,社交组高于独居组,提示探索学习和社会交往均能够促进梗死灶周围 bFGF 的表达。这可能是探索学习和社会交往促进脑卒中后功能恢复的机制之一。

bFGF 具有神经营养因子的作用,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。在正常情况下, 脑内仅少量 bFGF 表达, 当脑受到各种损害时即可诱导 bFGF 表达^[8], 以往动物试验研究发现, bFGF 对外伤性脑损伤导致的认知障碍具有治疗作用^[14]。缺血损伤模型中, 给予外源性碱性成纤维细胞因子也可减轻缺血性神经损伤。Wen^[15]等在脑缺血模型中发现缺血范围外的脑组织通过回路网出现广泛的二次性损伤; 轴索损伤或切断, 导致神经末端供给的神经营养因子中断, 神经元发生逆行变性和坏死, 而 bFGF 可防止这种逆行性变, 从而使神经元得到保护。碱性成纤维细胞因子对缺血性脑损伤的保护机制可能有: ①拮抗兴奋性氨基酸毒性, 维持细胞内钙稳态。bFGF 与受体特异结合后, 激活酪氨酸激酶影响谷氨酸受体蛋白、钙离子结合蛋白等表达而稳定钙稳态, 拮抗缺氧、兴奋性氨基酸、自由基等的损害而保护神经元。②增强抗氧化酶活性, 抑制诱导型一氧化氮合酶的表达, 抗自由基损伤。③修复受损神经元: 离体和活体研究均表明 bFGF 能促进神经元的存活及突起生长。④抗细胞凋亡: 神经营养因子不足或缺乏会使大量神经细胞发生凋亡, 体外培养的神经细胞在低浓度或无血清培养状态下一般不易存活, 但加入 bFGF 后不仅其存活延长而且神经轴突明显长出, 说明 bFGF 有通过直接营养神经元, 发挥抗细胞凋亡的作用^[9]。⑤改善局部脑血流量: bFGF 是血管内皮细胞的促有丝分裂原, 能促进血管增生, 引发新生血管的生成, 同时又能扩张血管。在缺血早期(缺血后 30min) bFGF 就能改善脑血流量, 此时不可能有新生的或开放的毛细血管, 因而其改善脑血流量可能的主要是扩张血管。有研究显示, 在缺血后第 3、5、7 天, bFGF 组脑血流量仍显著高于对照组, 此时脑血流量的改善可能主要是毛细血管增生和关闭状态的脑微血管开放而引起。因此, bFGF 在脑梗死早期可能以扩张血管为主, 在梗死后期以促血管增生为主, 使未开放微血管开放而明显改善 MCAO 周围半暗带脑血流量。

业已发现学习可增加突触的数量, 改变突触的结构和啮齿类动物脑内特定区域树突棘的密度^[10-11]。但学习促进 bFGF 表达的机制尚不清楚, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 李阔, 高俊淑, 李 娜, 等. 不同环境对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质 GFAP、GAP-43 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22 (7):581—583.
- [3] 高俊淑, 李 阔, 李 娜, 等. 探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质 BDNF 表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22 (7):584—585.
- [4] 李欣欣, 戴德哉. 碱性成纤维细胞因子对脑缺血的保护作用[J]. 药理学进展, 2003, 27(1):23—26.
- [5] Reuss B, von Bohlen und Halbach O. Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system[J]. Cell Tissue Res, 2003, 313(2): 139—57.
- [6] Bederson JB, Pitlis LH, Tsun M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472—476.
- [7] Elizabeth K, Cornelio G, Tuyen Do, et al. Increased expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) following focal cerebral infarction in the rat [J]. Molecular Brain Research, 1996, 39: 31—42.
- [8] Teng N, Jeannie Lee, Melody Lee, et al. Induction of basic fibroblast growth factor (bFGF) expression following focal cerebral ischemia [J]. Brain Res Mol Res, 1997, 49:255—265.
- [9] Rosenblatt S, Irlura K, Caday CG, et al. Basic fibroblast growth factor (bFGF) dilates rat pial arterioles[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1994, 14(1):70—4.
- [10] Klintsova A Y, Greenough W T. Synaptic plasticity in cortical systems[J]. Current opinion in Neurobiology, 1999, 9:203—208.
- [11] O'Malley A, O'Connell C, Murphy KJ, et al. Transient spine density increases in the mid-molecular layer of hippocampal dentate gyrus accompany consolidation of a spatial learning task in the rodent[J]. Neuroscience, 2000, 99(2): 229—232.
- [12] 刘罡, 吴毅, 吴军发. 脑卒中后大脑可塑性的研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(1): 87—90.
- [13] 张国庆. 丰富环境对于中枢神经系统可塑性的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(3): 280—283.
- [14] Mc Dermott R. Delayed administration of basic fibroblast growth factor (bFGF) attenuates cognitive dysfunction following parasagittal fluid percussion brain injury in the rat [J]. Neurotrauma, 1997, 14(4):191—200.
- [15] Wen TC, Matsuda S, Yoshimura H, et al. Protective effect of basic fibroblast growth factor heparin and neurotoxic effect of platelet factor 4 on ischemic neuronal loss and learning disability in gerbils[J]. Neuro-science, 1995, 65(2):513—21.