

· 基础研究 ·

探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质 Ng 及 bFGF 表达的影响*

槐雅萍¹ 贾新风¹ 闫桂芳¹ 贾子善^{1,2}

摘要 目的:观察探索学习对局灶性脑梗死大鼠神经颗粒素(Ng)及碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)表达的影响。方法:健康雄性SD大鼠70只,其中60只电凝法造成右侧大脑中动脉阻断(MCAO)模型后,随机分为探索学习组(n=30)和对照组(n=30),假手术组(n=10)仅开颅不电凝大脑中动脉,居于标准笼。探索学习组和对照组分别于术后第1天、7天、14天、28天各组随机选取5只大鼠处死,假手术组分别于7天、28天时随机选取5只大鼠处死,即进行Ng及bFGF免疫组化染色,测定其在脑梗死灶周围皮质的表达情况。结果:探索学习组Ng及bFGF阳性神经元数在第7天、14天、28天明显多于对照组($P<0.01$)。结论:探索学习能促进梗死灶周围皮质Ng及bFGF表达。

关键词 探索学习;脑梗死;大鼠;神经颗粒素;碱性成纤维细胞生长因子

中图分类号:R493,R743 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-03-0216-03

The effects of learning on Ng and bFGF expressions in peri-infarction cortex of rats after unilateral local cerebral infarction/HUAI Yaping, JIA Xinfeng, YAN Guifang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(3): 216—218

Abstract Objective: To study the effects of learning on neurogranin (Ng) and basic fibroblast growth factor(bFGF) expressions in peri-infarction cortex of rats after unilateral local cerebral infarction. **Method:** Seventy male Sprague-Dawley rats were adopted. After the models of MCAO were established by electric coagulation successfully, rats were randomly divided into learning group (n=30, living in maze cages), control group (n=30, every 5 rats as a subgroup living in large standard cages) and Other 10 rats didn't receive electric coagulation at middle cerebral artery, as sham group living in standard cage. At the 1st, 7th, 14th, 28th d after MCAO, in learning group and control group 5 rats were randomly sacrificed separately. In sham group 5 rats were randomly sacrificed separately at the 7th, 28th d after operation. The expressions of bFGF and Ng in peri-infarction cortex were examined by immunohistochemistry staining. **Result:** The number of Ng and bFGF labeled cells in learning group was significantly more than those in control group at 7th 14th and 28th day($P<0.01$). **Conclusion:** Learning could promote expressions of Ng and bFGF in peri-infarction cortex of rats after unilateral local cerebral infarction.

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

Key words learning; cerebral Infarction; rat; neurogranin; 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。学习会增加突触的数量,改变突触的结构^[1],改变啮齿类动物脑内特定区域树突棘的密度^[2]。神经颗粒素(neurogranin,Ng)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)均是可塑性相关分子^[3-4]。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 Ng 及 bFGF 表达的影响,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70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

分为大脑中动脉阻断(middle cerebral artery occlusion,MCAO)模型组60只,假手术组10只。

1.2 制备MCAO模型及分组

参照Bederson等^[5]的方法制备MCAO模型。术后24h随机分为探索学习组30只,手术对照组30只。假手术组10只,不电凝MCA,其余步骤与手术组相同。

1.3 造模后饲养环境

假手术组:饲养于标准笼,每笼5只。手术对照组:饲养于标准笼,每笼5只。探索学习组:15只—

* 基金项目:河北省科技厅资助课题(072761D-137)

1 河北省人民医院康复中心,石家庄,050051

2 通讯作者

作者简介:槐雅萍,女,副教授,硕士

收稿日期:2008-09-23

组饲养于由一个圆笼和一个方笼组成的迷宫笼^[6]。直径 500mm 圆笼与(640×480×120)mm³ 方笼中间通过两通道相连。

1.4 标本的制备

各手术组分别于术后第 1 天、7 天、14 天、28 天随机取 5 只, 假手术组术后第 7 天时随机取 5 只, 第 28 天时随机取 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# 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, 在视交叉处切开, 冠状切取 2mm 厚包含梗死灶区域及左右半球的组织块浸于 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。连续冠状切片, 切片厚 5μm。

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 (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; 热修复 30min; PBS 冲洗 3×3min; 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 (Ng 稀释比例为 1:1000, 购自美国 upstate, bFGF 稀释比例为 1:300, 购自武汉博士德), 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; 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 (中国航空航天大学图像分析中心) 进行分析, 统计梗死灶周围皮质 Ng 及 bFGF 阳性细胞数。

1.7 统计学分析

各组数据以均数±标准差表示, 数据处理采用 SPSS 12.0 统计分析软件统计分析, 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 梗死灶周围皮质 Ng 表达的时程变化

脑梗死后 Ng 表达水平的变化: 在探索学习组可见 MCAO 术后第 1 天梗死灶周围区 Ng 表达减少

(20.20±1.58), 和假手术组 (73.60±2.30) 比较有显著差异 ($P<0.01$), 与对照组 (21.60±2.07) 比较无显著差异 ($P>0.05$)。随时间延长表达逐渐增强。于术后第 14 天达到最高 (39.67±4.22), 然后下降 (29.80±2.80)。在术后第 7 天、14 天、28 天, 探索学习组表达高于对照组 ($P<0.01$) 见表 1, 图 1。

2.2 梗死灶周围皮质 bFGF 表达的时程变化

探索学习组与对照组梗死灶周围皮质在脑梗死后第 1 天 bFGF 阳性细胞即增多分别为 (22.00±1.58) 和 (21.60±2.07), 两组比较差异无显著意义 ($P>0.05$)。第 7 天时梗死灶周围皮质 bFGF 阳性细胞明显增多, 探索学习组 bFGF 阳性细胞数 (40.60±4.40) 显著多于对照组 (24.93±3.17) ($P<0.01$); 随时间延长, bFGF 阳性细胞减少, 着色变浅, 在第 28 天探索学习组 bFGF 阳性细胞仍明显多于对照组, 差异具有显著性 ($P<0.01$), 见表 2, 图 2。

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

时间	探索学习组	手术对照组	假手术组
第 1 天	20.20±3.11	19.60±1.52	—
第 7 天	31.60±4.64 ^{①②}	23.00±3.60 ^①	73.60±2.30
第 14 天	39.67±4.22 ^②	27.00±2.50	—
第 28 天	35.00±2.42 ^{①②}	21.93±2.81 ^①	73.80±1.92

同假手术组比较^① $P<0.01$; 与手术对照组比较^② $P<0.01$

表 2 各组梗死灶周围 bFGF 阳性神经元数比较 ($\bar{x}\pm s$, ×400)

时间	探索学习组	手术对照组	假手术组
第 1 天	22.00±1.58	21.60±2.07	—
第 7 天	40.60±4.40 ^{①②}	24.93±3.17 ^①	6.20±1.92
第 14 天	40.20±4.84 ^②	24.47±3.98	—
第 28 天	29.80±3.80 ^{①②}	16.53±2.33 ^①	6.00±2.12

同假手术组比较^① $P<0.01$; 与手术对照组比较^② $P<0.01$



图 1 第 14 天时梗死灶周围 Ng 表达

(IHC, ×400)



图 2 第 7 天时梗死灶周围 bFGF 表达

(IHC, ×400)

3 讨论

3.1 探索学习环境对梗死灶周围皮质 Ng 表达的影响

Ng 系新近发现的一种由 78 个氨基酸组成的神经元特异性蛋白激酶, 与 GAP-43 同属于 Calpacitin 蛋白家族^[7], 本课题组前期有实验证实, 丰富环境及

探索环境中饲养的大鼠,可以促进局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围 GAP-43 的表达^[8]。Ng 作为一种神经元特异性蛋白,主要在大脑皮质、海马 CA1 和 CA3 区、齿状回、纹状体和杏仁核中高表达,并常见于这些区域的神经元胞体和树突。Li 等^[9]通过一项免疫组化研究表明大鼠大脑中动脉阻塞可导致同侧大脑半球广泛性的 Ng 染色缺失。上述结果提示,Ng 是外伤性和缺血性脑组织损害等多种中枢神经系统疾病引起大脑病理改变所涉及物质基础之一。

本实验结果显示,在大鼠 MCAO 后,第 1 天探索学习组与对照组均出现 Ng 表达的减少,明显少于假手术组($P<0.01$),与 Li 等研究结果一致。近年国外有研究^[10]证实,丰富环境可以增强小鼠海马 CA1 区 Ng 的表达,明显优于标准环境中的小鼠,同时伴随了空间学习记忆能力的增加和 LTP 的增强。探索学习是丰富环境的构成因素之一,本研究发现了探索学习可减轻脑梗死后引发了 Ng 的表达减少。因为 Ng 在神经突触的形成中发挥重要作用^[11],由此推测探索学习减轻脑梗死后引起的 Ng 的表达减少是探索学习促进卒中康复的可能机制之一。

3.2 探索学习环境对梗死灶周围皮质 bFGF 表达的影响

bFGF 是研究创伤修复的重要的因子,是神经营养因子家族的成员,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^[12]。在中枢神经系统的发育、功能维持及损伤修复等方面都有着积极作用^[13]。

本研究发现,MCAO 术后第 1 天梗死灶周围区 bFGF 表达增加,在术后第 7 天、14 天、28 天探索学习组 bFGF 表达均高于对照组及假手术组($P<0.01$),提示探索学习能够诱导梗死灶周围 bFGF 的表达。探索学习诱导 bFGF 表达的增加,可能是通过输入信息的增加,从而诱导胶质细胞分泌 bFGF。Teng 等^[14]报道在正常情况下,脑内仅少量 bFGF 表达,当脑受到各种损害时即可诱导 bFGF 表达。与本试验研究结果一致。以往动物实验证实,大鼠 MCA 永久闭塞后,前三天持续脑室内输注 bFGF,梗死灶可减少 25%,通过其他途径应用也可有同样结果,如静脉应用等,都在半暗带起到神经保护的作用^[15]。本研究提示探索学习能够促进局灶性脑梗死大鼠大脑皮

质 bFGF 的表达增加,由此推测探索学习促进局灶性脑梗死后大鼠梗死灶周围皮质 bFGF 的表达增加是探索学习促进卒中康复的可能机制之一。

参考文献

- [1] Klintsova AY, Greenough WT. Synaptic plasticity in cortical systems[J]. *Current Opinion in Neurobiology*, 1999, 9:203—208.
- [2] 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.
- [3] Johansson BB. Brain plasticity and stroke rehabilitation[J]. *Stroke*, 2000,31(1):223—239.
- [4] Reuss B, von Bohlenund Halbach O. Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system[J]. *Cell Tissue Res*, 2003, 313(2): 139—157.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Gerendasy D. Homeostatic tuning of Ca^{2+} signal transduction by members of the calpacitin protein family [J].*The Journal of Neuroscience Research*, 1999, 58(1):107—119.
- [8] 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.
- [9] Li GL, Farooque M, Lewen A, et al. MAP2 and neurogranin as markers for dendritic lesions in CNS injury. An immunohistochemical study in the rat [J].*Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica*, 2000, 108 (2): 98—106.
- [10] Huang FL, Huang KP, Wu J, et al. Environmental enrichment enhances neurogranin expression and hippocampal learning and memory but fails to rescue the impairments of neurogranin null mutant mice[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(23):6230—6237.
- [11] Huang KP, Huang FL, Jager T, et al. Neurogranin/RC3 enhances long-term potentiation and learning by promoting calcium-mediated signaling [J]. *J Neurosci*, 2004, 24 (47): 10660—10669.
- [12] 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.
- [13] Cheng Y, Ciddy JM, Yan Q, et al. Marked age dependent neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor against neonatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Ann Neurol*, 1997, 41(4): 521—529.
- [14] 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.
- [15] 张通主编.脑卒中的功能障碍与康复[M].北京:科学出版社, 2007.130.