

· 论 著 ·

碱性成纤维细胞生长因子对新生大鼠
缺氧缺血性脑损伤的保护作用

辛颖¹，韩玉昆¹，石玉秀²，宁斌²

(1.中国医科大学第二临床学院儿科 辽宁 沈阳 110003 2.中国医科大学基础医学院组胚教研室 辽宁 沈阳 110001)

[摘 要] 目的 探讨碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)的保护作用。方法 将32只7日龄Wistar大鼠分为4组:假手术组、HIBD组、bFGF治疗组(分大剂量组17.5 μg/kg和小剂量组10 μg/kg),每组8只。后3组动物制成HIBD模型,给予治疗组大鼠连续7 d腹腔注射bFGF,HIBD组腹腔注射等体积生理盐水作为对照。全部大鼠于术后14 d处死,对脑纹状体、皮质的光镜下结构、乙酰胆碱酯酶(AchE)、酸性磷酸酶(ACP)活性变化进行观察和比较。结果 新生大鼠HIBD后皮质、纹状体有选择性神经元坏死及胶质细胞增生,bFGF治疗组上述病变明显减轻;HIBD后纹状体、皮质神经元AchE活性明显下降(-~+),bFGF组AchE活性(+~++)较HIBD组恢复快;HIBD后纹状体神经元ACP活性明显增高(+++),bFGF组ACP活性(+++)变化程度小于HIBD组。但大、小剂量bFGF治疗组未见明显差异。结论 bFGF能通过影响受损神经元的酶物质代谢而加快HIBD新生大鼠神经元的修复。

[关 键 词] 碱性成纤维细胞生长因子,缺氧缺血性脑损伤,新生大鼠
[中图分类号] R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2002)02-0084-03

Effects of Basic Fibroblast Growth Factor on the Recovery of Neurons Following Hypoxic - Ischemic Brain Damage in Neonatal Rats

XIN Ying , HAN Yu - Kun , SHI Yu - Xiu , et al.

Department of Pediatrics , Second Clinical College of China Medical University , Shenyang 110003 ,China

Abstract : Objective To investigate the effects of basic fibroblast growth factor(bFGF) on neurons following hypoxic - ischemic brain damage(HIBD) in neonatal rats. **Methods** Seven - day - old Wistar rats were randomly assigned into a sham operation group , an HIBD group , and 2 bFGF - treated (10 μg/kg and 17.5 μg/kg) HIBD groups (n = 8 for each group). The HIBD model using the carotid ligation were previously established. In the bFGF groups , the rats received bFGF by intraperitoneal injection for 7 days. The rats in the untreated HIBD group were injected with normal saline(NS) intraperitoneally at the same time as the bFGF groups. Micro - morphological features and activities of acetylcholinesterase(AchE) and acid phosphatase(ACP) in the HIBD rats treated with bFGF were compared with those in the untreated HIBD rats. **Results** Two weeks after HI , the brain ipsilateral to the carotid ligation was severely injured , having selective neuronal cell death , gliosis in the striatum and cortex of the untreated HIBD group ; these findings were reduced in the bFGF - treated groups. AchE activity in the damaged neurons of the striatum and cortex obviously decreased in the HIBD group , but was nevertheless higher in the bFGF - treated groups than in the untreated animals. ACP activity in the injured neurons of the ipsilateral striatum increased markedly , but the increase in ACP activity was less in the bFGF groups than in the untreated HIBD group. There were no significant differences in the outcome between the two bFGF dosages. **Conclusions** bFGF may promote the recovery of enzyme activities and the micro - morphological structure of neurons in the striatum and cortex following HI.

Key words : Basic fibroblast growth factor ; Hypoxic - ischemic brain damage ; Neonatal rat

[收稿日期] 2001 - 08 - 03 ; [修回日期] 2001 - 12 - 18
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.39970777)
[作者简介] 辛颖(1965 -) ,女,博士,副教授。

缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是新生儿窒息后的严重并发症,目前尚无特效治疗方法。应用神经营养因子治疗各种神经创伤是目前研究的一个热点问题。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是一种多功能的生物活性物质,可促进神经损伤后修复^[1]。动物实验及临床研究均表明 bFGF 用于治疗 HIBD 具有较好的疗效^[5],但从形态学角度研究 bFGF 促神经修复作用还少见报道。为研究 bFGF 对新生大鼠 HIBD 的保护作用,本研究拟用酶组织细胞化学技术,观察新生大鼠 HIBD 给予 bFGF 治疗后脑内乙酰胆碱酯酶(AchE)、酸性磷酸酶(ACP)活性的变化,探讨 bFGF 促神经修复机制,为临床上应用 bFGF 治疗新生儿 HIBD 提供形态学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物的选择与分组

7日龄 Wistar 大鼠由本院实验动物中心提供,随机分为:假手术对照组、HIBD 组、bFGF 治疗组,后者又分为大剂量组(17.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)及小剂量组(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$),每组 8 只,共 32 只。

1.2 方法

1.2.1 模型建立 参照 Rice 等^[2]的方法。结扎大鼠左侧颈总动脉,恢复 2~4 h 后置于缺氧舱内,输入 8% 氧气+92% 氮气,舱温(36±1)℃,1.5 h 后取出。假手术组只分离左侧颈总动脉,不结扎。bFGF 治疗组在结扎颈总动脉前 30 min 及出缺氧舱后即刻给予 bFGF 腹腔注射,以后每天 1 次,连用 7 d; HIBD 组于相同时间腹腔注射等体积生理盐水作为对照。

1.2.2 取材 各组动物于术后 14 d 断头处死,迅速取脑置于 1% 福尔马林中 4℃ 固定 6 h,再于 20% 蔗糖溶液中 4℃ 过夜。按照大鼠脑组织学图谱,选择前囟 1.7~ -0.3 mm 为切面,将固定好的脑沿冠面制成 25 μm 厚的冰冻切片,每个标本取 8 张。

1.2.3 AchE 和 ACP 活性检测 AchE、ACP 活性均采用组织化学法检测。AchE 组织化学采用 Hedreen 等^[3]推荐的方法。置冰冻切片于孵育液中(37℃,60 min),反应后水洗,常规脱水透明封片。ACP 组织化学采用 Sethi 等^[4]的方法。置冰冻切片于孵育液中,室温反应 60 min。充分水洗,2% 硫化胺显色 1 min,水洗后,常规脱水透明封片。每个标本取 1 张切片进行常规 HE 染色,对照观察。切片置于 Olympus 光镜下镜检。

1.2.4 酶活性判定 根据酶活性反应的分级标准对各组标本的酶反应进行活性观察和分析。AchE 反应结果活性分 3 级:弱阳性(+),浅棕红色,颗粒少;阳性(++),棕红色,颗粒多;强阳性(+++),深棕红色,颗粒多而密集。ACP 反应结果活性分 3 级:弱阳性(+),浅棕色,颗粒少;阳性(++),棕黄色,颗粒多;强阳性(+++),棕黄色,颗粒很多。

2 结果

2.1 HE 染色

HIBD 组左侧大脑皮质、纹状体可见选择性神经元坏死及胶质细胞增生,部分神经细胞固缩、胞浆深染、核浓缩,结构不清;bFGF 组神经细胞变性、坏死较 HIBD 组减轻,但两个剂量组差别不明显。

2.2 AchE 活性的变化

假手术组大鼠 AchE 阳性神经元主要分布于纹状体内,其胞体形态多样,胞核部分染色较浅,胞质中有棕红色的 AchE 阳性反应产物(+++),皮质中可见较多的 AchE 阳性神经纤维,排列较规整(图 1,见封 III)。HIBD 后左脑体积明显缩小,而右脑与假手术组体积近似,左脑纹状体中 AchE 阳性神经元的分布与右脑及假手术组相似,但数量明显减少,胞体略小于假手术组,胞质中颗粒少,着色浅,突起模糊不清(+).皮质中 AchE 阳性神经纤维数量减少,排列紊乱(图 2,见封 III),提示 AchE 活性下降。右脑改变不明显。与 HIBD 组相比,bFGF 组纹状体内 AchE 阳性神经元数量增多,胞体大小接近正常,胞浆内颗粒渐多,着色加深(++),突起清晰可见。皮质内 AchE 阳性神经纤维增多,排列也比较整齐(图 3,见封 III)接近于假手术组,提示 AchE 活性有明显改善。但大、小两个剂量组未见明显差异。

2.3 ACP 活性的变化

假手术组新生大鼠神经细胞的 ACP 阳性反应产物(硫化铅棕黄色颗粒)分布在胞体中,脑内不同部位 ACP 活性不同,皮质和海马的大锥体细胞 ACP 活性较强,颗粒层活性最强,纹状体中 ACP 活性较弱(+),酶反应颗粒细小,均匀分布于胞质内(图 4,见封 III)。HIBD 后左侧皮质、纹状体内 ACP 活性明显增强,酶反应颗粒较多,呈棕黑色,颗粒粗大常聚集成团(+++),细胞核被密集的酶反应颗粒所掩盖,部分细胞核似被酶反应颗粒挤向一侧而呈偏心位(图 5,见封 III)。右脑未见有明显变化。与 HIBD 组相比,bFGF 组 ACP 阳性细胞数减少,染色变浅,颗粒少(++)(图 6,见封 III),提示 ACP 活性降

低,但比假手术组略有增高。

3 讨论

胆碱能神经元与人和动物的学习、记忆、行为等神经活动有密切关系,AchE 尽管不能完全特异地作为中枢胆碱能神经元的标志物,但在前脑基底部 AchE 与胆碱乙酰转移酶(ChAT)高度一致,由于尚无有效的直接显示乙酰胆碱(Ach)的方法,AchE 酶组化仍可作为间接反映 Ach 的一个指标^[6]。由于大鼠脑内胆碱能神经元主要分布于纹状体,且缺氧缺血后纹状体内神经元缺失与胶质细胞增生是人类围生期脑损伤的病理特征之一^[7],故我们选择了纹状体作为主要研究对象。大鼠纹状体胆碱能神经元在胚胎 14 d 出现,但出生时其功能还相当不成熟。如果这期间环境因素发生改变,可能会破坏胆碱能神经元的发育。所以从形态学角度研究围生期 HIBD 对胆碱能神经元发育这一重要过程的影响是十分必要的。本实验结果显示,新生大鼠 HIBD 后纹状体、皮质胆碱能神经元数量减少,胞体略小,AchE 活性减弱,与文献报道相似。

在脑发育及功能维持中,bFGF 具有重要作用,体外实验发现它可促进胆碱能神经元存活^[8],但有关 bFGF 对围生期 HIBD 胆碱能神经元的影响未见报道。本研究发现给予 HIBD 新生大鼠 bFGF 治疗后,纹状体、皮质胆碱能神经元及神经纤维数量增多,AchE 活性增强,提示 bFGF 对 AchE 活性恢复起促进作用,进而说明 bFGF 对损伤的脑内胆碱能神经元起保护和促修复作用。

溶酶体是细胞内起消化功能的细胞器,在细胞内外的物质代谢中起着十分重要的作用。ACP 作为溶酶体的标志酶,其活性变化直接体现溶酶体的功能状态。ACP 含量增高,会改变溶酶体膜脆性及通透性,使溶酶体自噬保护作用增强^[9]。HIBD 后,溶酶体崩解,大量水解酶释放出来,消化分解因损伤而变性的神经元和非神经元细胞。实验中可见新生大鼠 HIBD 后脑内 ACP 活性明显增高,可能与其代谢增强有关。

研究表明 bFGF 对神经元的保护作用存在剂量依赖关系^[1]。我们发现大剂量组保护作用与小剂量组相比无明显差异,可能与研究例数较少或选用的两个剂量比较接近有关。

本研究提示 bFGF 对缺氧缺血后的神经元具有一定的生物活性作用,对损伤神经元有保护和促修复作用。bFGF 能通过影响受损神经元的酶物质代谢途径而起到加快神经修复的作用。

[参 考 文 献]

[1] Nakata N , Kato H , Kogure K , et al. Protective effects of basic fibroblast growth factor against hippocampal neuronal damage following cerebral ischemia in the gerbil[J]. Brain Res , 1993 , 605(2) : 354 - 356 .

[2] Rice JE , Vannucci RC , Brierley JB , et al. The influence of immaturity on hypoxic - ischemic brain damage in the rat[J]. Ann Neurol , 1981 , 9(2) : 131 - 141 .

[3] Hedreen JC , Bacon SJ , Price DL. A modified histochemical technique to visualize acetylcholinesterase - containing axons[J]. J Histochem Cytochem , 1985 , 33(2) : 134 - 140 .

[4] Sethi JS , Tanwar RK. Comparative distribution of acid phosphatase and simple esterase in the mouse neocortex and hippocampal formation [J]. Acta Anat , 1989 , 135(4) : 323 - 329 .

[5] Nozaki K , Finklestein SP , Beal MF , et al. Basic fibroblast growth factor protects against hypoxia - ischemia and NMDA neurotoxicity in neonatal rat[J]. J Cereb Blood Flow Metab , 1993 , 13(3) : 221 - 228 .

[6] Geula C , Mesulam MM. Cortical cholinergic fibers in aging and Alzheimer ' s disease : a morphometric study[J]. Neuroscience , 1989 , 33(3) : 469 - 481 .

[7] Burke RE , Karanas AL. Quantitative morphological analysis of striatal cholinergic neurons in perinatal asphyxia[J]. Ann Neurol , 1990 , 27(1) : 81 - 88 .

[8] Johnston MV and Hudson C. Effects of postnatal hypoxia - ischemia on cholinergic neurons in the developing rat forebrain : choline acetyl - transferase immunocytochemistry[J]. Dev Brain Res , 1987 , 34(1) : 41 - 50 .

[9] Kantner RM and Kirby ML. Changes in acid phosphatase activity in the substantia gelatinosa in response to pain[J]. Brain Res , 1982 , 238(2) : 451 - 456 .

(本文编辑 刘丽旭)

新生大鼠神经干细胞的分离培养

(见正文第 81 页)



图 1 原代培养 3 d 的神经干细胞
($\times 100$)

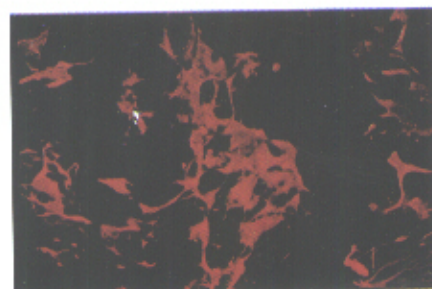


图 2 传代培养的神经干细胞诱导分化
7 d, 免疫荧光染色 MAP-2 阳性($\times 300$)

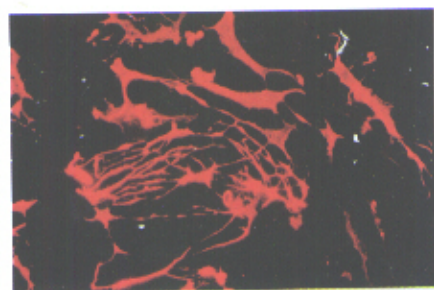


图 3 传代培养的神经干细胞诱导分化
7 d, 免疫荧光染色 S-100 阳性($\times 300$)

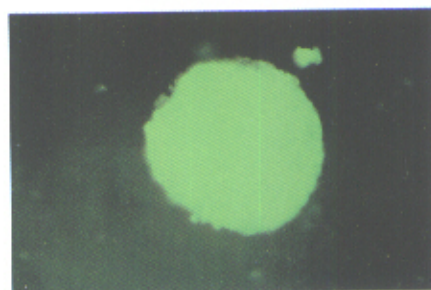


图 4 原代培养的神经干细胞 GFP 转导
24 h($\times 300$)

碱性成纤维细胞生长因子对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用

(见正文第 84 页)

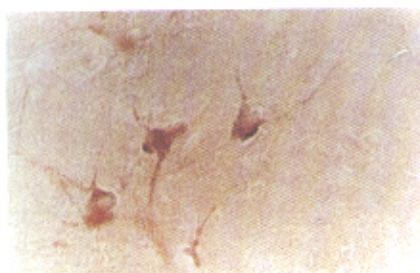


图 1 正常纹状体胆碱能神经元, 胞核
染色较浅, 胞浆中有较多的棕红色颗粒,
突起清晰可见(AChE 染色, $\times 400$)



图 2 HIBD 后 14 d 纹状体, 可见胆碱能
神经元丢失, 胞体及突起均模糊不清, 染
色变浅(AChE 染色, $\times 400$)

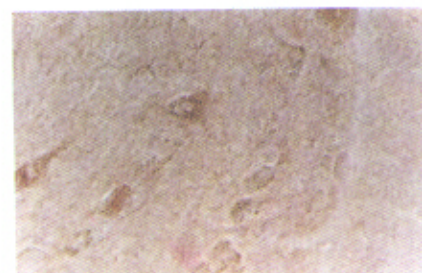


图 3 bFGF 小剂量组, 可见纹状体内胆
碱能神经元, 胞浆内颗粒增多, 突起隐约
可见(AChE 染色, $\times 400$)

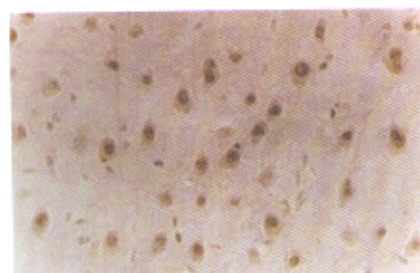


图 4 正常纹状体内 ACP 活性较弱, 酶
反应颗粒细小, 均匀分布于胞质中(ACP
染色, $\times 400$)

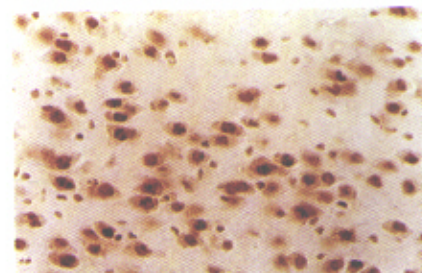


图 5 HIBD 后 14 d, 纹状体 ACP 活性明
显增强, 酶反应颗粒粗大, 呈棕黑色(ACP
染色, $\times 400$)

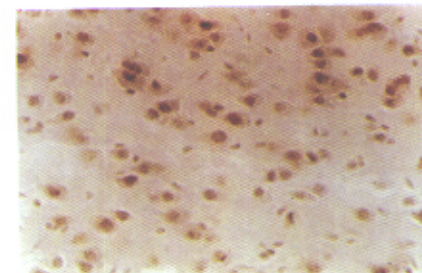


图 6 bFGF 小剂量组, 纹状体 ACP 阳性
细胞数减少, 染色浅, 颗粒少(ACP 染色,
 $\times 400$)