

碱性成纤维细胞生长因子对阿尔茨海默病模型大鼠的影响

周思朗 袁俊抛 袁晓文 袁东林 袁岱军 第一军医大学珠江医院神经内科 广东 广州 510515

摘要 目的 探讨碱性成纤维细胞生长因子 bFGF 对红藻氨酸损毁 Meynert 基底核致阿尔茨海默病模型大鼠学习和记忆能力的影响及脑内胆碱能纤维密度的变化。方法 痴呆组、痴呆治疗组及痴呆对照组大鼠前脑 Meynert 基底核注射红藻氨酸制造阿尔茨海默病模型。正常对照组注射生理盐水。痴呆治疗组造模后 30 min 右侧侧脑室注射 bFGF。痴呆对照组同时注射生理盐水。30 d 后 Y 迷宫测试正常对照组、痴呆组、痴呆对照组及痴呆治疗组大鼠学习和记忆能力。AChE 细胞化学染色并测量基底前脑皮层及海马区 AChE 纤维密度。结果 痴呆组大鼠 Y 迷宫学习及记忆能力较正常对照组下降 $P < 0.01$ 。AChE 纤维密度减低 $P < 0.01$ 。治疗组 Y 迷宫学习及记忆能力较痴呆对照组有改善 $P < 0.01$ 。AChE 纤维密度亦有所增加 $P < 0.01$ 。但没有达到正常对照组水平 $P < 0.01$ 。结论 红藻氨酸前脑 Meynert 基底核可成功制造阿尔茨海默病模型。bFGF 可提高阿尔茨海默病模型大鼠基底前脑皮层及海马区 AChE 纤维密度。改善其 Y 迷宫记忆能力。

关键词 碱性成纤维细胞生长因子, 红藻氨酸, 阿尔茨海默病, 疾病模型, 动物

中图分类号 R742.89 文献标识码 B 文章编号 000-2588(2003)06-0611-03

Effects of basic fibroblast growth factor on rat models of Alzheimer disease

ZHOUSi-lang, CHENJun-pao, TUXiao-wen, CAODong-lin, YUANDai-jun

Department of Neurology, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: Objective To study the effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on the praxiology and cerebral acetylcholinesterase (AChE) fiber density of kainic acid-lesioned rat models of Alzheimer disease (AD). Methods AD models were induced in 30 normal adult rats by damaging the rat nucleus basalis of Meynert (NBM) with kainic acid, and the models were then assigned into 3 groups to receive cerebroventricular infusion with bFGF, saline or nothing for treatment, serving respectively as the treatment group at 30 min, 1, 3 and 7 d after the injury, sham treatment group or injury group. Another 10 rats were used as a control group, which received saline injections into the NBM without further treatment. The learning and memory abilities of the rats were measured through Y-maze test 30 d after the operations, and AChE cytochemical study was conducted to calculate the density of the AChE fibers in the hippocampus and forebrain of the rats. Results In comparison with the injury group, improvement was noted in the memory ability of rats with bFGF treatment and the density of AChE fiber was also significantly increased ($P < 0.01$), but the improvement in both respects failed to reach the normal level ($P < 0.01$). Conclusions AD model can be successfully established by damaging the NBM with kainic acid, and bFGF is beneficial in improving the impaired learning and memory abilities and increasing the density of AChE fibers in the basal forebrain cortex and hippocampus in the models.

Key words: fibroblast growth factor, basic; kainic acid; Alzheimer disease; disease models, animal

阿尔茨海默病 Alzheimer disease AD 是一组以记忆减退和认知障碍为主要特点的临床综合征。其发病机制较为复杂。大多数学者认为基底前脑胆碱能神经元丢失、海马及皮质胆碱能纤维减少是造成 AD 患者学习和记忆障碍的主要原因之一。应用红藻氨酸等兴奋性氨基酸损毁基底核可出现类似结果。碱性成纤维细胞生长因子 bFGF 是一种具有多种生物活性的细胞因子。近来动物实验研究发现在大鼠学习记忆和锻炼过程中 bFGF mRNA 水平上升。bFGF 与神经节苷脂联用时能减少双侧海马伞切断导致的痴呆大鼠在 8 臂迷宫中的失误次数。提示 bFGF 在 AD 治疗中也发挥一定的作用。本研究通过腹腔注射

bFGF 观察 bFGF 对前脑 Meynert 基底核注射红藻氨酸导致痴呆大鼠的行为学及病理学影响。探讨治疗 AD 的新思路。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

红藻氨酸及碘化乙酰硫代胆碱为 Sigma 公司产品。bFGF 为基因公司产品。其他试剂均为国产分析纯。W 等分 Y 型迷宫为张家港生物医学仪器厂产品。脑立体定位仪为美国 Steolting 公司产品。台式牙钻为上海齿科机械厂产品。Leica CM1850 恒冷切片机为德国 Leica 公司产品。

1.2 实验分组

Y 迷宫筛选雄性 SD 大鼠 40 只。由第一军医大学动物实验中心提供。鼠龄 2.5 月。体重 40.5 依

收稿日期 002-11-01

作者简介 周思朗 972 袁东林 湖南益阳人 第一军医大学珠江医院神经内科硕士研究生 电话 020-87192559 表-mail:zhou_silang@sohu.com

38.5 兔随机分成正常对照组、痴呆组、痴呆对照组和痴呆治疗组。每组 10 只。遥实验前各组大鼠体质量、学习能力及记忆能力无显著差异 ($P > 0.05$)。全部大鼠在正常温控光照及自由摄食条件下饲养 1 周后进行手术操作。遥动物经 10% 水合氯醛 (6 ml/100 g b.w.) 麻醉后固定于脑立体定位仪上。遥正常对照组大鼠从 Merynert 基底核注入生理盐水 0.4 ml。痴呆组、痴呆对照组及痴呆治疗组注入红藻氨酸 0.4 ml。痴呆组、痴呆治疗组在手术后 30 min 及损伤后 1 周 d 右侧侧脑室注射含 1.2 μg bFGF 的生理盐水 10 μl。痴呆对照组则同时间仅给予 10 μl 生理盐水。

Y 迷宫筛选学习正常大鼠。Y 迷宫筛选动物数以 20 只鼠龄 2.5 月大鼠尝试次数均数及标准差为依据。选取尝试次数为 14.41 ± 6.63 的大鼠进入实验。

Merynert 基底核的注射方法参照包新民等^[1]编著的大鼠脑立体定向图谱。前凶后 1.6 mm，旁线旁 3.4 mm 标记。牙钻钻开颅骨。微量注射器进针 6.8 mm 注射。注射时间 5 min。留针 15 min。防止液体上溢。

侧脑室注射方法参照包新民等^[1]编著的大鼠脑立体定向图谱。立体定向仪下取前凶后 0.8 mm，旁线旁 1.8 mm 标记。牙钻钻开颅骨。垂直埋入硬膜外导管。深度为硬膜下 3.7 mm。去掉导丝后回抽见脑脊液。将粉固定导管缝合皮肤。以后注射 bFGF 时可拔除导丝。注射器注射。

1.3 方法

1.3.1 大鼠学习记忆测试方法 三等分 Y 迷宫测试。遥在实验前及 Merynert 基底核注射后 30 d 进行遥选。用电压 40 V。一臂为起区。按预定随机顺序轮流作为安全区。遥大鼠在起步区休息 3 min。予以电击使其逃至安全区。灯光持续 15 s。熄灯休息 45 s。再开始下一次操作。遥学习测试。规定大鼠电击后直接逃至安全区为正确反应。以连续 10 次正确反应时所需的训练次数。遥尝试次数。表示尝试次数超过 30 次。以 30 次记数。遥记忆再现测试。遥学习测试完成 24 h 后以同样的方法进行记录。连续检测 10 次。中正确反应次数。遥现次数。遥为记忆成绩。

1.3.2 AchE 细胞化学染色 在大鼠学习记忆测试完

成后。遥 10% 水合氯醛 (6 ml/100 g b.w.) 麻醉后灌注固定。遥固定 4 h。遥脱水至沉底。遥恒冷切片机分别于前凶前 1.8 mm，旁 1.0 mm 之间及前凶后 1.5~4.5 mm 间连续切 30 μm 切片。遥每只动物每隔 500 μm 取 4 张切片。按 Hedree 等^[2]推荐的方法行 AchE 组织化学显色。遥阴性对照反应液不加碘化乙酰硫代胆碱。

1.4 统计学处理

大鼠学习和记忆能力以尝试次数及正确反应次数来表示。遥 AchE 纤维定量分析采用 LD 显微镜及 LQ500+ 图象分析仪。遥测单位面积内的 AchE 密度。遥定量参数为 374693.656 μm² AchE 纤维的覆盖面积。遥取每只大鼠 4 张切片的平均值作为统计数据。遥以上数据采用 SPSS8.0 for Windows 做 ANOVA 处理。遥多重比较用 SNK 法。

2 结果

2.1 bFGF 对痴呆大鼠学习和记忆能力的影响

Y 迷宫测试 3 组大鼠学习和记忆能力见表 1。遥从表 1 可见。遥痴呆组大鼠学习和记忆能力较正常对照组下降 ($P < 0.01$)。遥痴呆治疗组学习和记忆能力较痴呆对照组有改善 ($P < 0.01$)。遥但是没有达到正常对照组水平 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠学习和记忆能力比较 (n=10, \bar{x} 依 D)
Tab.1 Comparison of the learning and memory abilities of rats in different groups (n=10, Mean依D)

Group	Learning ability (times)	Memory ability (times)
Control	14.26依.64	8.36依.75
Injury	23.28依.41**	3.82依.33**
Treatment	18.53依.98***	6.05依.56***
Shamtreatment	22.87依.32**	4.06依.38**

P < 0.01 vs control group; *P < 0.01 vs sham treatment group

2.2 细胞 AchE 结果

痴呆组基底前脑皮层及海马区 AchE 密度较正常对照组显著减少 ($P < 0.01$)。遥尤其是海马区。遥痴呆治疗组与痴呆对照组比较。遥 AchE 纤维密度增加显著 ($P < 0.01$)。遥但是没有达到正常对照组水平 ($P < 0.01$)。遥各组基底前脑皮层及海马区 AchE 密度见表 2。

表 2 各组大鼠前脑及海马 AchE 阳性纤维密度比较 (μm², \bar{x} 依 D)

Tab.2 Comparison of AchE fiber density in hippocampus and forebrain of rats in different groups (μm², Mean依D)

Group	Forebrain	Hippocampus			
		CA1	CA2	CA3	Dentategyrus
Control	21256依425	17845依288	18142依030	22634依535	22476依536
Injury	14364依461**	9670依51**	10878依257**	13565依432**	12696依454**
Treatment	17652依314***	12704依323***	13691依272***	15825依369***	15540依541***
Shamtreatment	14835依502**	9971依118**	11235依45**	14020依230**	13072依376**

P < 0.01 vs control group; *P < 0.01 vs sham treatment group

3 讨论

胆碱能纤维系统溃变是 AD 的经典病理改变之一。AD 患者出现学习和记忆障碍与基底前脑胆碱能神经元的丢失、海马胆碱能神经元减少和胆碱乙酰转移酶活性下降密切相关。并且学习和记忆障碍程度与基底前脑胆碱能纤维系统溃变的程度成正比。有实验表明，L-藻氨酸损毁前脑 Meynert 基底核能使基底前脑皮层及海马区 AchE 密度明显减少。大鼠的学习和记忆能力明显受损。是一种较为理想的痴呆动物模型。以往实验研究表明，FGF 是一种极具临床应用价值的神经营养因子。也是一种生物活性很强的促分裂因子。是治疗神经缺损疾病的希望。我们的实验表明，FGF 可以提高 AD 模型大鼠基底前脑皮层及海马各区 AchE 纤维密度。改善其 Y 迷宫的学习和记忆能力。bFGF 改善胆碱能系统功能机制包括：增加胆碱乙酰转移酶的活力。促使海马胆碱能纤维发芽。直接改善胆碱能系统功能缺陷。促进星型胶质细胞增生。并促使星型胶质细胞分泌神经生长因子。间接改善胆碱能系统的功能。终止淀粉蛋白造成的膜脂质过氧化级联反应。防止 Na⁺/K⁺ATP 酶活力下降和线粒体功能障碍。并增加铜锌过氧化物歧化酶的活力。直接抑制活性氧簇的聚集和脂质过氧化损害。FGF 促进大鼠海马神经元细胞分裂可能是胆碱能系统改善的原因之一。但是以往的研究表明，在对大鼠行为学的影响上，FGF 的作用存在一些分歧。我们注意到，FGF 对大鼠的短期行为学影响较小。这是因为 bFGF 除了直接保护神经细胞外，尚可促进脑源性神经生长因子 mRNA 的表达。及与脑源性神经生长因子一起促使神经环路形成。并可促使星形胶质细胞分泌神经生长因子。

参考文献

Pinilla G. Spatial learning and physical activity contribute to the

- induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognition associated with exercise. *Neuroscience*, 1998, 85(1): 53-61.
- Iwashita A, Hisajima H. Effects of basic fibroblast growth factor and ganglioside GM1 on neuronal survival in primary cultures and on eight-arm radial maze task in adult rats following partial fimbria transection. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1996, 353(3): 342-8.
- 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 36-56.
- Hedreen JC, Bacon SJ, Price DL. A modified histochemical technique to visualize acetylcholinesterase-containing axons. *J Histochem Cytochem*, 1985, 33(2): 134-40.
- Baskin DS, Browning JL, Pirozzolo FJ, et al. Brain choline acetyltransferase and mental function in Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 1999, 56(9): 1121-3.
- Abe K, Saito H. Effects of basic fibroblast growth factor on central nervous system functions. *Pharmacol Res*, 2001, 43(4): 307-12.
- Miyamoto O, Itano T, Fujisawa M, et al. Exogenous basic fibroblast growth factor and nerve growth factor enhances sprouting of acetylcholinesterase positive fibers in denervated rat hippocampus. *Acta Med Okayama*, 1993, 47(3): 139-44.
- Yoshida K, Gage FH. Fibroblast growth factors stimulate nerve growth factor synthesis and secretion by astrocytes. *Brain Res*, 1991, 538(1): 118-26.
- Mark R, Keller J, Kruman I, et al. Basic FGF attenuates amyloid beta-peptide-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impairment of Na⁺/K⁺-ATPase activity in hippocampal neurons. *Brain Res*, 1997, 756(1-2): 205-14.
- Eves EM, Skoczylas C, Yoshida K, et al. FGF induces a switch in death receptor pathways in neuronal cells. *J Neurosci*, 2001, 21(14): 4996-5006.
- Kwon YK. Expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA stimulated by basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in rat hippocampal cell line. *Mol Cell*, 1997, 7(3): 320-5.
- Nakagami Y, Saito H, Matsuki N. Basic fibroblast growth factor and brain-derived neurotrophic factor promote survival and neuronal circuit formation in organotypic hippocampal culture. *Pharmacol*, 1997, 75(4): 319-26.