

· 研究简报 ·

电刺激 Meynert 基底核对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区神经元形态及神经生长因子表达的影响

于宁波 滕文慧 王晓亮 邓加平 王乃东

【摘要】目的 观察电刺激 Meynert 基底核(NBM)对血管性痴呆(VaD)大鼠学习记忆能力以及海马 CA1 区神经元形态和神经生长因子(NGF)表达的影响,并初步探讨电刺激 NBM 对 VaD 大鼠认知功能的改善作用及可能作用机制。**方法** 采用随机数字表法将 30 只 SD 大鼠分为假手术组、VaD 组及电刺激组,选用双侧颈动脉永久性结扎术将 VaD 组及电刺激组大鼠制成 VaD 大鼠模型,假手术组大鼠仅分离双侧颈动脉。电刺激组大鼠于制模后埋入颅内电极并给予 NBM 电刺激,电刺激每次持续 30 min,共治疗 14 d。于电刺激治疗结束后 1~3 d 期间每天采用 Morris 水迷宫检测各组大鼠制模后学习记忆能力,于最后 1 次水迷宫检测结束后分别采用尼氏染色及 NGF 免疫组化染色观察各组大鼠海马 CA1 区神经元变化情况。**结果** 实验进行 1,2 及 3 d 时,发现假手术组、电刺激组大鼠逃避潜伏期均较 VaD 组明显缩短($P < 0.05$),并且上述时间点均以假手术组逃避潜伏期缩短幅度较显著,与电刺激组间差异亦具有统计学意义($P < 0.05$)。电刺激组尼氏染色结果与假手术组相似,可见神经元排列较整齐,存活神经元数量较多,且细胞体积较大,尼氏小体丰富,但数量不及假手术组。另外电刺激组 NGF 阳性细胞百分比[(15.133 ± 2.735)%]及假手术组阳性细胞百分比[(19.964 ± 4.065)%]均较 VaD 组[(6.592 ± 2.970)%]明显增大($P < 0.05$)。**结论** 电刺激 NBM 可改善 VaD 大鼠学习记忆功能,其治疗机制可能与上调海马 CA1 区尼氏小体与 NGF 含量有关。

【关键词】 Meynert 基底核; 血管性痴呆; Morris 水迷宫; 神经生长因子

血管性痴呆(vascular dementia, VaD)是指因血管病变引起的获得性智能障碍综合征,主要与缺血性脑血管病变有关。目前临床采用药物治疗 VaD 的疗效并不理想,而脑深部电刺激(deep brain stimulation, DBS)作为一种改善运动功能障碍的干预方法已广泛应用于临床治疗中。近年来有研究表明,DBS 对痴呆患者认知功能亦具有一定改善作用,可作为治疗痴呆的有效手段之一^[1]。目前采用 DBS 治疗 VaD 的适宜电刺激强度、频率、时间及作用机制仍未完全明确。本实验通过观察电刺激大鼠 Meynert 基底核(nucleus basalis of Meynert, NBM)对 VaD 大鼠认知功能的改善作用,初步探讨其可能作用机制,为临床采用 DBS 手段改善 VaD 患者认知功能提供理论基础。现报道如下。

材料与方 法

一、主要实验材料

主要实验动物为 Sprague-Dawley 雄性大鼠 30 只,体重 300~400 g;主要实验仪器包括 Morris 水迷宫、SP-6N 型大鼠脑立体定位仪(日本 Narishige 公司)、8EN-7203 型电刺激仪(日本产)、冰冻切片机(德国 Sartorius 公司产)、电子天秤(德国 Sartorius 公司产)、Fluoview FV500 型激光共聚焦扫描显微镜(日本 Olympus 公司产)、电热恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司产)等。

二、分组及 VaD 模型制备

采用随机数字表法将上述 SD 大鼠分为假手术组、VaD 组及电刺激组,每组有 10 只大鼠。参照 Olsson 等^[2]介绍的方法将 VaD 组及电刺激组制成 VaD 大鼠模型,选用 8% 水合氯醛按

每千克体重 800 mg 腹腔注射麻醉后,以仰卧位将大鼠固定于实验台上,去除颈部皮毛,经常规消毒后行颈正中切口,钝性分离颈动脉,采用手术线结扎双侧颈动脉后缝合切口,待大鼠清醒后置入动物房饲养。假手术组大鼠只分离出双侧颈动脉并不结扎,其饲养环境与 VaD 组及电刺激组相同。

三、颅内电极埋入及电刺激

于制模后第 7 天时参照实验动物图谱^[3]将 VaD 组、电刺激组大鼠固定于立体定位仪上,按照如下参数(前囟后 1.5 mm,左侧旁开 2.8 mm,深度 7.6 mm)进行立体定位,选用牙科钻磨一个约 2 mm 圆孔并埋入电极,采用牙托粉及 502 胶固定电极。待大鼠清醒后放回笼内,持续饲养 7 d 后进行电刺激。电刺激时确定大鼠处于清醒状态,将电刺激仪与颅内电极相连,设定电刺激参数如下:刺激时程 0.5 ms,刺激频率 50 Hz,刺激强度 200 μ A,每次刺激 30 min,每天刺激 1 次,持续刺激 14 d^[4];VaD 组大鼠只将电刺激仪与颅内电极相连,期间并未给予电刺激。

四、Morris 水迷宫检测

于电刺激完成后次日开始进行 Morris 水迷宫测试,随机选取 Morris 水迷宫任意一个象限顶点将大鼠放入水迷宫中,记录大鼠找到平台的时间为逃避潜伏期,若不能在 90 s 内找到平台,则由实验人员用手引导大鼠爬上平台,允许大鼠在平台上停留 10 s,然后将大鼠放回鼠笼内;间隔 20 min 后再选取剩余任意一个象限顶点将大鼠置入水迷宫内,重复检测其逃避潜伏期。大鼠共完成东、南、西、北 4 个象限顶点位置的探索为 1 次完整训练,每天训练 1 次,连续训练 3 d,记录其逃避潜伏期。

五、组织标本处理及染色

于最后 1 次水迷宫检测结束后将各组大鼠用 8% 水合氯醛麻醉,从左心室插管进行生理盐水灌注以清除体内血液(以肝脏呈现白色为止),随后采用 4% 多聚甲醛液进行灌注固定,断头取脑后置于 4% 多聚甲醛液中固定,再放入 30% 蔗糖液中沉

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2014.03.017

作者单位:266000 青岛,青岛大学医学院附属医院(于宁波、滕文慧、王乃东);青岛市立医院(王晓亮);日照市人民医院(邓加平)

通信作者:王乃东,Email:wangnaidong163@163.com

淀脱水,用冰冻包埋剂包埋,行海马 CA1 区连续冠状切片,片厚 15 μm。每只大鼠取 6 张切片,其中 2 张进行尼氏染色,剩余 4 张进行免疫组织化学染色。

尼氏染色参照文献[5]介绍的步骤,将切片置入蒸馏水中洗涤 2 min × 2 次,加入尼氏染色液(37 ℃)孵育 20 min,再经蒸馏水洗涤 30 s × 2 次,置入 95% 乙醇中约 5 s,经 95% 乙醇脱水 2 min × 2 次后,再加入 1% 酸化伊红室温孵育 3 min,经 95% 乙醇脱水 2 min × 2 次,二甲苯透明 5 min,随后采用中性树胶封片待检。免疫组化染色主要步骤如下:将切片置入含 0.3% H₂O₂ 甲醛溶液(37 ℃)中孵育 30 min 以灭活内源性过氧化物酶,经 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered solution,PBS)冲洗 5 min × 3 次,再经微波抗原修复;采用 10% 正常山羊血清(37 ℃)孵育 1 h,吸去羊血清后加入 NGF 一抗(美国 Santa cruz 公司,1:50,采用 0.01 mol/L PBS 液稀释),于 4 ℃ 湿盒内过夜;再经 PBS 液冲洗 5 min × 3 次,滴加生物素标记的二抗工作液,37 ℃ 孵育 30 min,经 PBS 液冲洗 5 min × 3 次后,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液,37 ℃ 孵育 30 min;经 PBS 液冲洗 5 min × 3 次后,采用二氨基联苯胺(DAB)显色 10 ~ 15 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,采用中性树胶封片待检。

六、统计学分析

本研究所得计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 版统计学软件包进行数据分析,各组大鼠 Morris 水迷宫检查结果比较采用重复测量方差分析,海马 CA1 区阳性细胞数量比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠水迷宫检查结果比较

通过 Morris 水迷宫检查发现,实验进行 1,2 及 3 d 时,假手术组、电刺激组逃避潜伏期均较 VaD 组明显缩短($P < 0.05$),并且上述时间点均以假手术组逃避潜伏期的缩短幅度较显著,与电刺激组间差异亦具有统计学意义($P < 0.05$),上述结果提示电刺激 NBM 能提高 VaD 大鼠学习及记忆功能。各组大鼠 Morris 水迷宫检查结果详见表 1。

二、各组大鼠海马 CA1 区尼氏染色结果比较

通过观察改良尼氏染色结果发现,假手术组神经元排列整齐而致密,细胞体积大,尼氏小体非常丰富;VaD 组神经元排列紊乱疏松,存活神经元较少、细胞体积较小,尼氏小体数量明显

表 1 各组大鼠 Morris 水迷宫检查结果比较

组别	只数	逃避潜伏期(s, $\bar{x} \pm s$)		
		电刺激结束后第 1 天	电刺激结束后第 2 天	电刺激结束后第 3 天
假手术组	10	35.875 ± 3.357 ^{ab}	23.635 ± 2.249 ^{ab}	12.292 ± 0.726 ^{ab}
VaD 组	10	63.786 ± 3.030	45.173 ± 4.245	29.44 ± 1.901
电刺激组	10	56.702 ± 3.524 ^a	32.333 ± 2.871 ^a	16.778 ± 1.092 ^a

注:与 VaD 组相同时间点比较,^a $P < 0.05$;与电刺激组相同时间点比较,^b $P < 0.05$

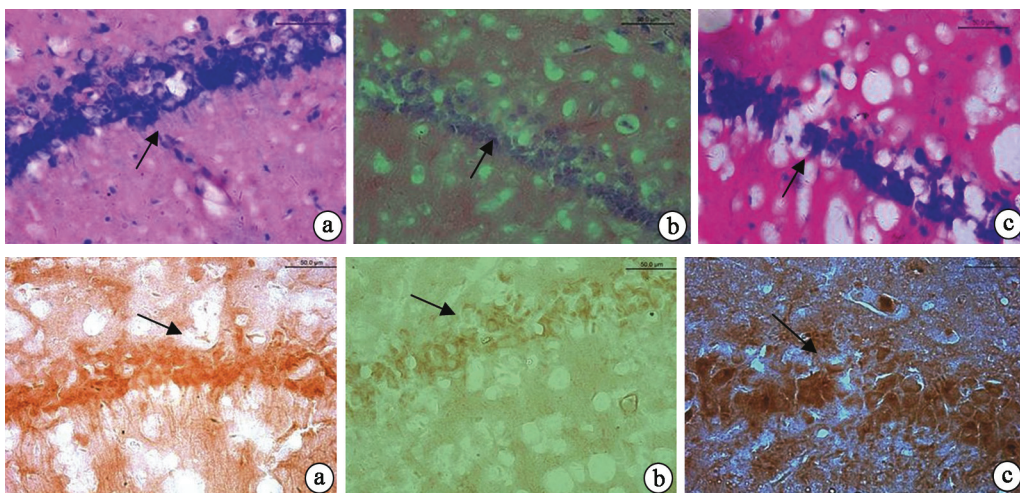
减少;电刺激组尼氏染色结果与假手术组类似,可见该组神经元排列较整齐,存活神经元数量较多,且细胞体积较大,尼氏小体较丰富,但数量不及假手术组。具体情况详见图 1。

三、各组大鼠 NGF 免疫组化染色结果比较

通过观察免疫组化染色结果发现,各组大鼠海马 CA1 区 NGF 阳性神经元染色均以胞浆内有棕黄色物质沉积为主,也有部分胞膜及核膜着色,可显示神经元轮廓。进一步分析发现,3 组大鼠中以 VaD 组 NGF 阳性细胞面积百分比[(6.592 ± 2.970)%]最小,电刺激组 NGF 阳性细胞百分比[(15.133 ± 2.735)%]及假手术组阳性细胞百分比[(19.964 ± 4.065)%]均较 VaD 组明显增大($P < 0.05$),并且以假手术组的增大幅度较显著,与电刺激组间差异亦具有统计学意义($P < 0.05$)。各组大鼠 NGF 免疫组化染色结果详见图 2。

讨 论

目前 VaD 发病率随人口老龄化进展呈现逐年上升趋势,严重影响老年患者生活质量及生命健康,临床针对 VaD 患者尚无特效治疗措施,亟待找寻新的的手段治疗 VaD 患者,以进一步提高疗效,促进患者早日回归家庭及社会。DBS 是一种利用立体定向技术进行精确定位并在脑内特定靶区植入刺激电极,采用高频电刺激改变相应核团兴奋性,从而达到改善神经功能的治疗方法。早在 20 世纪 50 ~ 70 年代 DBS 就已经应用于治疗慢性疼痛^[6],目前 DBS 在治疗帕金森病患者运动功能障碍、肌张力障碍、难治性强迫症以及难治性癫痫等方面^[7]均获得广泛应用,尤其是在改善帕金森病患者运动障碍方面具有显著疗效。另外有研究发现,早期给予痴呆患者 DBS 治疗可提高其脑皮质代谢率,并抑制其认知功能进行性下降^[8],提示 DBS 可能对治疗痴呆具有重要作用。



注:a 为假手术组,b 为 VaD 组,c 为电刺激组,箭头示尼氏小体染色

图 1 各组大鼠海马 CA1 区尼氏染色结果比较(尼氏染色, ×400)

注:a 为假手术组,b 为 VaD 组,c 为电刺激组,箭头示 NGF 阳性染色

图 2 各组大鼠海马 CA1 区 NGF 阳性表达比较(免疫组化染色, ×400)

目前临床普遍认为,选择合适的电刺激靶点对 DBS 疗效具有决定性作用。本研究通过永久性结扎大鼠双侧颈总动脉制作 VaD 动物模型,该制模操作能造成大鼠慢性脑低灌注压及认知功能下降^[9],能较好模拟人类 VaD 症状。本研究所选取的电刺激靶点为 NBM,发现 VaD 大鼠经电刺激后,其 Morris 水迷宫逃避潜伏期较 VaD 组大鼠明显缩短,提示电刺激 NBM 可改善 VaD 大鼠学习及认知功能。相关解剖资料显示,大鼠 NBM 区域神经元绝大部分为胆碱能神经元,主要投射纤维至大脑皮质^[10]。Daniel 等^[11]研究表明,以 NBM 为治疗靶点,通过改变该区域内胆碱能神经元兴奋性对改善机体认知功能障碍具有重要作用。已有研究证实,电刺激 NBM 可增强大鼠行为相关记忆能力 (behavioral associative memory)^[12],同时还能促使大鼠完成包括社会转交食物偏好实验 (social transmission of food preference, STFP)^[13] 以及双相主动逃避实验 (two way active avoidance)^[14-15] 等行为学测试,进一步表明电刺激大鼠 NBM 可提高其学习、记忆功能。

机体海马是与认知功能相关的重要脑区,同时也是学习记忆的高级大脑中枢,它直接参与信息贮存与处理过程。海马 CA1 区神经元存活数量直接影响神经元突触可塑性,对信息处理及传递具有重要作用^[16],该部位神经元对缺血、缺氧十分敏感。尼氏小体是神经元糙面内质网的核糖体,其含量高低是反映神经细胞功能活性的重要指标之一。本实验结果显示,与假手术组比较,VaD 组大鼠海马 CA1 区神经元数量显著减少,同时神经元内尼氏小体数量亦较少;而给予 NBM 电刺激后,发现 VaD 大鼠海马 CA1 区神经元数量及尼氏小体含量均显著增多。上述结果表明,电刺激 NBM 可降低缺血对海马 CA1 区神经元的损伤,同时还能提高神经元功能活性,进一步证实电刺激 NBM 对海马 CA1 区缺血受损神经元具有保护作用。

NGF 是最早发现的神经营养因子,主要由以胆碱能神经支配的海马区及额叶皮质区细胞分泌,NGF 对神经元发育、成熟、存活等均具有重要作用。近年来报道指出,NGF 对因各种原因造成的认知功能障碍均有一定改善作用。如有学者研究发现,NGF 能通过抑制基底前脑胆碱能神经元数量减少,从而提高机体学习能力^[17];并且 NGF 对缺血、缺氧造成的神经元损伤也具有明显保护作用^[18]。既往有研究表明,电刺激 NBM 能促使正常大鼠脑皮质细胞分泌 NGF 量增加^[19]。本研究也得到类似结果,如 VaD 模型大鼠经电刺激 NBM 后,发现其海马 CA1 区 NGF 表达量较 VaD 组大鼠显著增加,进一步证明电刺激 NBM 能促进 VaD 大鼠海马 CA1 区 NGF 表达,从而发挥营养脑神经、促进缺血受损神经元存活等功效,有助于机体认知功能改善及神经功能恢复。

综上所述,本研究结果表明,电刺激 NBM 可增强 VaD 大鼠海马 CA1 区 NGF 表达,促使海马 CA1 区尼氏小体含量及神经元存活数量增多,有助于 VaD 大鼠认知功能改善,其确切作用机制目前仍未明确,还需进一步研究探讨。

参 考 文 献

- [1] Hardenacke K, Kuhn J, Lenartz D, et al. Stimulate or degenerate: deep brain stimulation of the nucleus basalis Meynert in Alzheimer dementia [J]. World Neurosurg, 2013, 80(3):35-43.
- [2] Olsson Y, Brun A. Fundamental pathological lesions in vascular dementia [J]. Acta Neurol Scand Suppl, 1996, 168(1):31-38.
- [3] Goard M, Dan Y. Basal forebrain activation enhances cortical coding of natural scenes [J]. Nat Neurosci, 2009, 12(11):1444-1449.
- [4] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [J]. Nat Protoc, 2006, 1(2):848-858.
- [5] 郭以河, 赵梅兰, 彭瑞云, 等. 尼氏小体染色方法的改进及其在神经病理学研究中的应用 [J]. 实用医学杂志, 2003, 10(6):605-606.
- [6] Hosobuehi Y, Adams JE, Rutkin B. Chronic thalamic stimulation for the control of facial anesthesia dolorosa [J]. Arch Neurol, 1973, 29(3):158-161.
- [7] 王乃东, 赵永波, 陈英辉. 低频脑深部电刺激对大鼠杏仁核点燃的抑制作用及其相关机制探讨 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2007, 29(5):296-299.
- [8] Smith GS, Laxton AW, Tang-Wai DF, et al. Increased cerebral metabolism after 1 year of deep brain stimulation in Alzheimer disease [J]. Arch Neurol, 2012, 69(9):1141-1148.
- [9] 刘汇波, 叶翠飞, 李斌, 等. 双侧颈总动脉结扎对大鼠学习记忆功能和海马组织形态学的影响 [J]. 基础医学与临床, 1998, 18(4):54-58.
- [10] Pombero A, Bueno C, Saglietti L, et al. Pallial origin of basal forebrain cholinergic neurons in the nucleus basalis of Meynert and horizontal limb of the diagonal band nucleus [J]. Development, 2011, 138(19):4315-4326.
- [11] Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, et al. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies [J]. Prog Neurobiol, 2002, 68(3):209-245.
- [12] McLin DE 3rd, Miasnikov AA, Weinberger NM. Induction of behavioral associative memory by stimulation of the nucleus basalis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(6):4002-4007.
- [13] Boix-Trelis N, Vale-Martínez A, Guillazo-Blanch G, et al. Effects of nucleus basalis magnocellularis stimulation on a socially transmitted food preference and c-Fos expression [J]. Learn Mem, 2006, 13(6):783-793.
- [14] Montero-Pastor A, Vale-Martínez A, Guillazo-Blanch G, et al. Nucleus basalis magnocellularis electrical stimulation facilitates two-way active avoidance retention in rats [J]. Brain Res, 2001, 900(2):337-341.
- [15] Montero-Pastor A, Vale-Martínez A, Guillazo-Blanch G, et al. Effects of electrical stimulation of the nucleus basalis on two-way active avoidance acquisition, retention, and retrieval [J]. Behav Brain Res, 2004, 154(1):41-54.
- [16] 黄新武, 李国春, 熊玉霞, 等. 大鼠血管性痴呆模型动物中海马神经元凋亡和蛋白表达的研究 [J]. 神经解剖学杂志, 2011, 27(3):331-334.
- [17] Dekker AJ, Gage FH, Thal LT. Delayed treatment with nerve growth factor improves acquisition of a spatial task in rats with lesions of the nucleus basalis magnocellularis: evaluation of the involvement of different neurotransmitter system [J]. Neuroscience, 1992, 48(1):11-16.
- [18] 刁士元. 神经生长因子对大鼠局灶性脑缺血再灌注后细胞凋亡的影响 [J]. 临床神经病学杂志, 2004, 17(6):450-451.
- [19] Hotta H, Uchida S, Kagitani F. Stimulation of the nucleus basalis of Meynert produces an increase in the extracellular release of nerve growth factor in the rat cerebral cortex [J]. J Physiol Sci, 2007, 57(6):383-387.

(修回日期:2014-01-13)

(本文编辑:易浩)