基础研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0157-04

电刺激小脑顶核对 AD 大鼠学习记忆能力及海马神经元凋亡的影响

王小林,王永红,罗 晶,程启慧,朱 琼
(重庆医科大学附属第一医院神经内科 重庆市神经病学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究电刺激小脑顶核(Fastigial nucleus electrostimulation,FNS)对阿尔茨海默病(Alzheimer's diseases,AD)模型大鼠学习记忆能力及海马神经元凋亡的影响。方法:40 只 SD 大鼠随机分成四组:Aβ_{1-40}微量注射组(AD 组)、假手术组(SC 组)、Aβ_{1-40}微量注射组 + 电刺激小脑顶核组(FNS 组)和 Aβ_{1-40}微量注射组 + 电刺激齿状核组(DNS 组),采用 Morris 水迷宫检测电刺激小脑顶核对 AD 大鼠认知功能的的影响;通过尼氏染色观察电刺激小脑顶核对 AD 大鼠海马神经元形态的影响;采用 TUNEL 凋亡染色法观察电刺激小脑顶核对 AD 大鼠海马神经元凋亡的影响。结果:与 SC 组比较,AD 组、FNS 组和 DNS 组每天隐匿平台逃避潜伏期明显增长($P<0.05$)、海马 CA1 区 TUNEL 阳性细胞数明显增多($P<0.05$);FNS 组与 AD 组比较,空间学习记忆能力明显改善($P<0.05$),海马 CA1 区 TUNEL 阳性细胞数分别为(22.55 ± 2.74、36.90 ± 4.07)两组比较差异显著($P<0.05$),而 DNS 组无此作用。结论:FNS 可改善 Aβ_{1-40}诱导的 AD 大鼠空间学习记忆障碍,可能与抑制海马细胞凋亡有关。

【关键词】阿尔茨海默病;电刺激小脑顶核;凋亡
【中国图书分类法分类号】R743 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-05

Effect of the fastigial nucleus electrostimulation on the ability of learning and me – mory and the Apoptosis of the neurons in the hippocampal district in ratymodel of Alzheimer's Disease

WANG Xiao-lin etal
(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of the fastigial nucleus electrostimulation on the ability of learning and memory and the Apoptosis of the neurons in the hippocampal district in ratymodel of Alzheimer's D isease induced by β-amyloid (Aβ). *Methods*: Forty rats were randomly divided into:Aβ_{1-40} micro-injection groups(AD), sham-operation roup(SC), Aβ_{1-40} micro-injection and fastigial nucleus stimulation group(FNS), a Aβ_{1-40} micro-injection and corpus dentatum stimulation group(DNS). The effect of fastigial nucleus electrostimulation on learning and memory retention disorder in the model rats was studied by the test of Morris water maze;the brain protection of fastigial nucleus electrostimulation in model rats was observed through pathomorphology changes;the Apoptosis of the neurons in the hippocampal CA1 district was detected by Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling method. *Results*: The escape latency of the place navigation in the AD grou, FNS group and DNS group were singnificiantly longer than that in the SC group ($P<0.05$).The number of apoptotic neurons in the hippocampal CA1 district of the AD group was significantly different from that in the sham injection group($P<0.05$). The AD rats received FNS showed significiant shorter escape latency than AD rats($P<0.05$). The number of apoptotic neurons in the hippocampal CA1 district of the FNS group(22.55 ± 2.74) was significantly different from that of the AD group (36.90 ± 4.07)($P<0.05$). *Conclusions*: FNS can improve the spatial learning and memory dysfunction of AD rat, implying that FNS has the function to restraining the apoptosis of the hippocampal neurons.

【Key words】Alzheimer's disease; Fastigial nucleus Electrostimulation; Apoptosis

阿尔茨海默病(Alzheimer's diseases,AD)是中枢神经系统退行性疾病,其临床主要表现为记忆力的下降及其它认知功能的减退,尤以近事遗忘为主。其基本病理特点为沉积于神经元外的老年斑、位于神经元内的神经原纤维缠结和以基底前脑和海马区为主的神经元数目减少。近年来研究认为细胞凋亡是引起 AD 脑组织中神经元数目减少的重要原因之一[1]。小脑顶核实为镶在小脑白质内的四对小脑

作者介绍:王小林(1982-),男,硕士,
研究方向:认知障碍。
通讯作者:王永红,女,教授,E-mail:Wujiming2000@263.com。
基金项目:重庆市科委自然科学基金(CSTC-2007BB5290)。

核团之一，位于第四脑室顶内，呈卵圆形，内有大、中、小各类细胞，细胞密集于内侧部，有许多纤维经过，呈网状。随着近十几年对 FNS 的深入研究发现：FNS 能抑制细胞凋亡、抑制炎症反应、增加局部脑血流、缩小脑梗死面积等[2-4]。本实验采用大鼠右侧海马注射 $A\beta_{1-40}$ 建立 AD 模型，用以研究电刺激小脑顶核对大鼠学习记忆能力及海马神经元凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要仪器、药品和试剂

大鼠脑立体定位仪（SN-2 型 日本），Morris 式水迷宫（中国医学科学院药物所研制），$A\beta_{1-40}$（美国 Sigma 公司），DAB 显色试剂盒（北京中杉金桥生物技术有限公司），硫堇（北京维达化工有限公司），TUNEL 试剂盒（Roche 公司）。

1.2 实验对象

选 350～400 g 清洁级雄性 SD 大鼠 40 只，分笼喂养。参照《大鼠脑立体定向图谱》[5]，选择右侧海马 CA_1 区为注射靶区，定位点：以前囟为零，旁开 ±2.2 mm（X 轴），前囟后 3.0 mm（Y 轴），颅骨下 2.8 mm（Z 轴）。缓慢注入 5 μmol/μl 的 Aβ 2 μl，留针 5 min，以保证溶液充分弥散，然后缓慢撤针。对照组注入等量生理盐水，缝合伤口，常规饲养。

1.3 实验分组

实验动物适应性喂养 1 周后，采用随机数字表随机分成 4 组：即 $A\beta_{1-40}$ 微量注射组（AD 组）、$A\beta_{1-40}$ 微量注射组 + 电刺激小脑顶核组（FNS 组）、$A\beta_{1-40}$ 微量注射组 + 电刺激齿状核组（DNS 组）和假手术组（SC 组），FNS 组予电刺激器刺激左侧小脑顶核，DNS 组予电刺激器刺激左侧齿状核。

1.4 FNS 方法

参照万东等[6]的方法进行小脑顶核电刺激。将大鼠以俯卧位固定于江湾 II 型大鼠脑立体定位仪上。根据大鼠脑立体定位图谱确定小脑顶核座标：以前囟为零点，头颅矢状位正中线向后 1.4～11.8 mm、旁开 0.8～1.0 mm、深 5.2～5.7 mm。在左侧颅骨上钻孔，插入双极同芯圆针电极（直径 0.1 mm），以刺激左侧小脑顶核。用小脑顶核电刺激仪（由重庆大学理论电气工程研究所研制）进行刺激，刺激电流为频率 50～100 Hz、时程 0.5 ms 的直角方波脉冲，电流强度为 50 mA，每天持续刺激 1 h，连续刺激 12 d。小脑齿状核核座标：以前囟为零点，头颅矢状位正中线向后 1 1.4～11.8 m、旁开 2.9～3.1 m、深 6.4～6.6 mm，其余同 FNS 组。

1.5 Morris 水迷宫测试

给药 28 d 后，采用 Morris 水迷宫法测试大鼠的学习记忆能力。Morris 水迷宫为一不锈钢圆形水池，直径 200 cm、高50 cm，池壁标明 4 个入水点。出入水点将水池等分为 4 个象限：东南（SE）、西南（SW）、西北（NW）和东北（NE），北象限中放置 1 个直径 11 cm，高 29 cm 的平台，检测时水温（26 ± 1）℃室内物品陈设和照明度一致，水迷宫测试为连续 5 d 的定位航行试验（place rest）：平台隐藏于水面下 1 cm，受试动物每天上、下午各进行 4 次测试。将大鼠面向池壁由 4 个入水点顺次放入水中，如果大鼠在 120 s 内找到平台，记录其实际逃避潜伏期。如果在 120 s 未找到平台，由实验者将其引上平台并停留 10 s，逃避潜伏期记为 120 s。

1.6 实验取材

各组实验动物于水迷宫测试后用 3.5% 水合氯醛深麻醉，打开胸腔，暴露心脏，将注射针头插入左心室，剪开右心耳，快速灌注 4℃生理盐水，待右心耳处流出澄清液体，换 4% 多聚甲醛 10 ml/min 灌注到大鼠四肢强直，然后将大鼠断头，快速取出脑组织，放入 4%多聚甲醛中固定，做石蜡切片。

1.7 尼氏染色

切片脱蜡至水，用硫堇染液浸染 20~30 min，水洗，用 95% 酒精分化，无水酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶；光学显微镜观察海马组织形态学变化并拍照。

1.8 TUNEL 凋亡染色及半定量分析

标本制备同上，每个标本取邻近的 2 张切片行 TUNEL 染色。具体操作方法参照试剂盒说明书（Roche 公司），每张切片高倍视野（400 ×）下每部位区 5 个视野计数 TUNEL 阳性神经细胞。

1.9 统计学分析

全部数据采用 SAS9.0 软件包进行统计学处理，计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 描述，多组间比较采用单因素方差分析，重复检测的数据采用重复测定的方差分析。

2 结 果

2.1 电刺激小脑顶核对痴呆大鼠水迷宫逃避潜伏期的影响

4 组大鼠平均潜伏期的比较，见表 1。

2.2 电刺激小脑顶核对痴呆大鼠海马组织病理组织学的影响

光镜下见 SC 组大鼠脑组织海马 CA1 区细胞排列有序，细胞周围组织结构完整，间隙无异常，细胞核清晰，核仁明显，胞体形态正常.核周尼氏小体丰富.细胞突起明显（图 1）。AD、DNS 组大鼠海马 CA1 区细胞排列紊乱，细胞周围组织疏松、水肿，与周围组织有较大间隙，有较多神经元皱缩变形，胞浆浓染，尼氏小体减少或消失（图 2、3）。FNS 组大鼠海马 CA1 区细胞排列较整齐，可见少量变性坏死细胞（图 4）。

2.3 电刺激小脑顶核对痴呆大鼠海马神经元凋亡的影响

TUNEL 染色阳性细胞细胞核呈棕黄色。假手术组大鼠海马 CA1 区偶见 TUNEL 性凋亡细胞（图 5）。在 AD 组可见许多细胞胞核着成棕黄色，不均匀，并呈环指样结构，有的细胞在其核外周可见棕黄色毛刷状结构，部分阳性细胞胞浆也有着色（图 6）。在

FNS 组和 DNS 组也可见到胞核呈棕黄色的阳性细胞(图 7、8)。

3 讨 论

目前制备 AD 模型方法很多,各有其优点,本实验选择的右侧海马进行 Aβ 微量注射建立局部病理模型,简便易行,且针对性强。本研究发现 $A\beta_{1-40}$ 注入大鼠右侧海马 28 d 后,Morris 水迷宫试验中,大鼠出现明显的空间学习记忆障碍。与 SC 组比较,FNS 组大鼠空间学习记忆能力虽低于 SC 组,但较 AD 组显著提高。提示 FNS 能够不同程度的改善 AD

表 1 各组大鼠 5d 水迷宫试验潜伏期比较

组别	n	第 1 d	第 2 d	第 3 d	第 4 d	第 5 d
SC	10	47.95 ± 20.55	28.08 ± 17.85	20.53 ± 17.48	17.40 ± 12.06	14.77 ± 13.04
AD	10	98.25 ± 17.75$^{\#}$	81.40 ± 19.47$^{\#}$	75.03 ± 16.19$^{\#}$	72.50 ± 16.30$^{\#}$	69.35 ± 20.01$^{\#}$
FNS	10	73.68 ± 25.69$^{\triangle\#}$	58.55 ± 18.87$^{\triangle\#}$	45.40 ± 13.99$^{\triangle\#}$	37.98 ± 16.56$^{\triangle\#}$	33.95 ± 16.87$^{\triangle\#}$
DNS	10	97.52 ± 15.02$^{\blacktriangle\#}$	86.28 ± 15.64$^{\blacktriangle\#}$	72.80 ± 17.88$^{\blacktriangle\#}$	69.88 ± 19.61$^{\blacktriangle\#}$	2.72 ± 16.63$^{\blacktriangle\#}$

注:$^{\#}$与 SC 组比较,$P<0.05$;$^{\triangle}$与 AD 组比较,$P<0.05$;$^{\blacktriangle}$与 AD 组比较,$P>0.05$

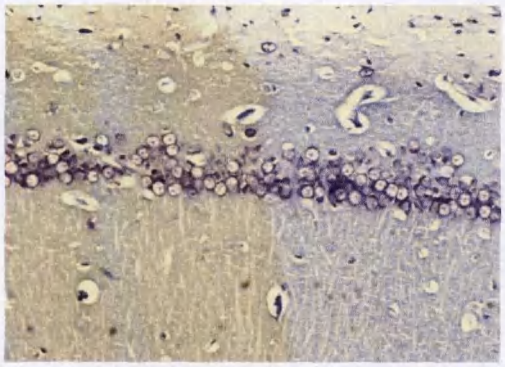


图 1 SC 组海马 CA1 区细胞形态(尼氏染色 ×200)

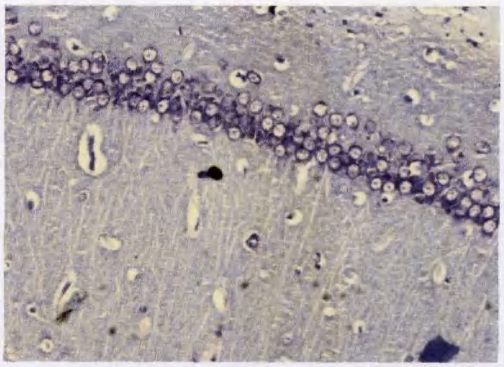


图 2 AD 组海马 CA1 区细胞形态(尼氏染色 ×200)

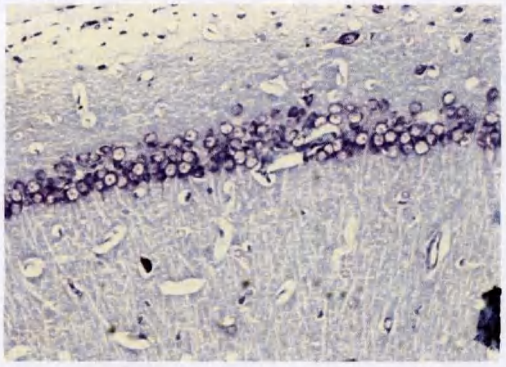


图 3 DNS 组海马 CA1 区细胞形态(尼氏染色 ×200)

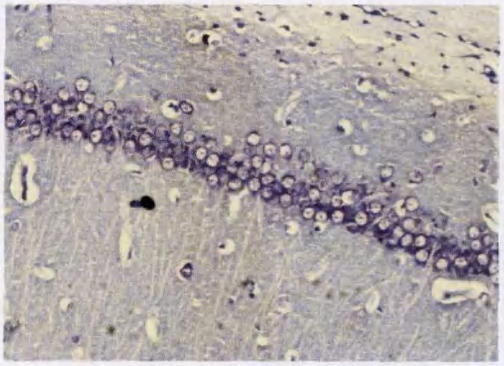


图 4 FNS 组海马 CA1 区细胞形态(尼氏染色 ×200)

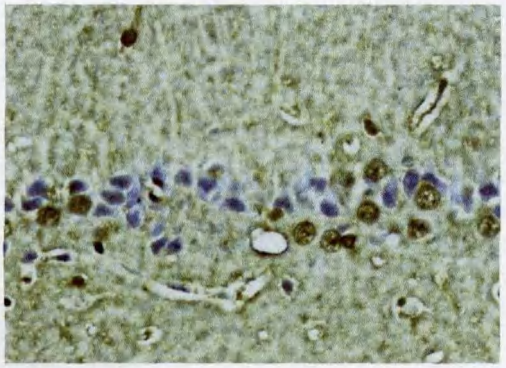


图 5 SC 组海马 CA1 区阳性细胞(TUNEL 染色 ×200)

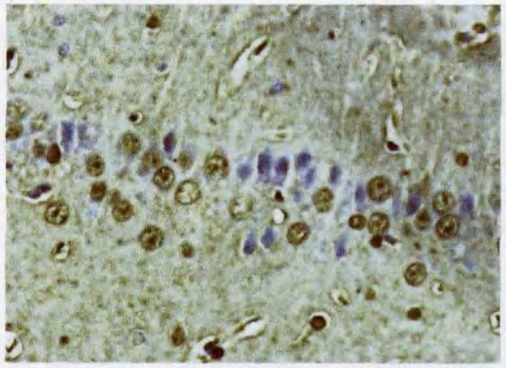


图 6 AD 组海马 CA1 区阳性细胞(TUNEL 染色 ×200)

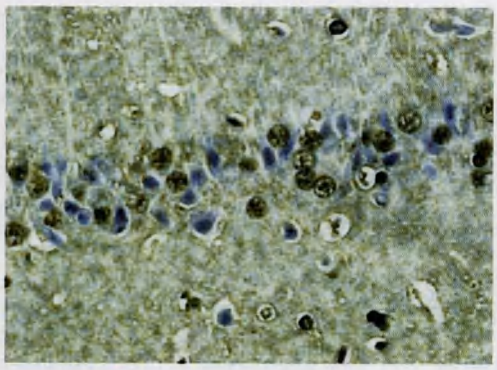


图 7 FNS 组海马 CA1 区阳性细胞（TUNEL 染色 ×200）

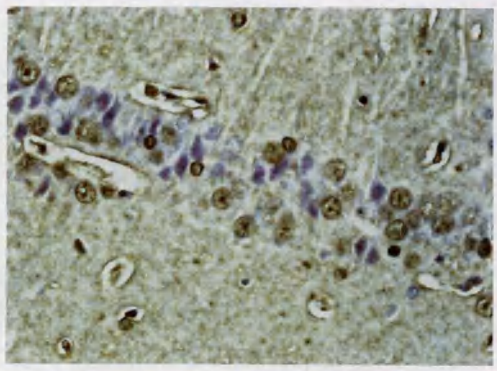


图 8 DNS 组海马 CA1 区阳性细胞（TUNEL 染色 ×200）

表 2 各组大鼠海马 CA1 区阳性凋亡细胞数比较

组别	凋亡细胞数（个）
SC	9.20 ± 2.19
AD	36.90 ± 4.07#
FNS	22.55 ± 2.74#△
DNS	38.15 ± 3.31#▲

注：# 与 SC 组比较，$P<0.05$；△与 AD 组比较，$P<0.05$；▲与 AD 组比较，$P>0.05$

大鼠学习记忆的能力，一定程度上可预防 $A\beta_{1-40}$ 诱发的认知功能下降。

细胞凋亡在 AD 发病机制中的作用是目前研究的中心和热点，研究发现 Aβ 与细胞凋亡和突触的减少关系密切，在培养的神经细胞中加入 Aβ 后，神经细胞出现凋亡小体，并在生化水平上出现了 DNA “梯形带”，呈典型的细胞凋亡特征性改变，其机制可能 Aβ 通过与线粒体膜的结合，从而改变膜的通透性或使得线粒体的关键酶的活性丧失，引起线粒体功能的丧失，内溶物的释放，进而引起氧化应激，最终可导致细胞凋亡[7]。Miguel 等注射 $A\beta_{1-40}$ 至大鼠海马引起 CA 区大量神经元变性，用 TUNEL 法证实其中许多细胞发生了凋亡[8]。本实验从形态学上证实了 $A\beta_{1-40}$ 在脑内可引起神经元的凋亡，支持细胞参与了 AD 发病的观点。本试验结果显示，假手术组海马 CA1 区偶见凋亡细胞，表明正常脑组织一般少有细胞凋亡的发生；而 AD 组凋亡细胞数明显增多。因此可以认为，细胞凋亡是 AD 脑组织损伤的一个标志，在一定程度上反映了其学习和记忆能力受损的程度。

近年来国内外学者研究发现，FNS 可产生广泛的神经保护作用。Ping Zhou 等[9]通过实验证实，通过 FNS 能保护线粒体，增强线粒体排出 Ca^{2+} 能力、阻止 Ca^{2+} 诱导的细胞膜去极化，同时 FNS 能减少细胞色素 C 的释放，阻止凋亡前体蛋白进入线粒体，从而有效抑制经线粒体的细胞编程性死亡。本实验发现，与 AD 组比较，FNS 组大鼠海马 CA1 区凋亡细胞数明显减少，提示 FNS 可通过阻断凋亡而起到神经保护作用。

本实验结果提示 FNS 可能参与神经元凋亡的调控，对 AD 有一定预防和治疗作用。有助于我们拓展并深化对“非药物”方法治疗阿尔茨海默病的认识，弥补药物治疗阿尔茨海默病的不足，拓展阿尔茨海默病治疗和康复的新途径。

参 考 文 献

[1] Jellinger K A. Challenges in neuronal apoptosis[J]. Curr Alzheimer Res, 2006, 3(4):377-391.

[2] Golanov E V, Zhou P. Neurogenic neuroprotection[J]. Cellular and Molecul ar Neurobiology, 2003, 23(4-5):651-663.

[3] 董为伟. 电刺激小脑顶核与中枢神经源性神经保护[J]. 中国工程科学, 2001, 3(11):32-37.

[4] 王小林, 王永红. 电刺源小脑顶核在阿尔茨海默病治疗中的可能价值[J]. 重庆医学, 2008, 37(19):2242-2244.

[5] 包新民, 斯舒云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991.40-45.

[6] 万 东, 罗 勇, 谢 鹏. 电刺激小脑顶核对缺血/再灌注大鼠脑组织内 NF—κB 活性及其活化的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28(10):660-666.

[7] Fuenzalida K, Quintanilla R, Ramos P. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma up-regulates the Bcl-2 anti-apoptotic protein in neurons and induces mitochondrial stabilization and protection against oxidative stress and apoptosis[J]. J Biol Chem, 2007, 282(51):3700 6-37015.

[8] Miguel-Hidalgo J J, Cacabelos R. Beta-amyloid (1-40)-induced neurode generation in the rat hippocampal neurons of the CA1 subfield[J]. Acta Neuropathol (Berl), 1998, 95(5):455-465.

[9] Zhou P, Qian L, Zhou T, et al. Mitochondria are involved in the neurogenic neuroprotection conferred by stimul ation of cerebellar fastigial nucleus[J]. Journal of Neurochemistry, 2005, 95(1):221-229.

（责任编辑：冉明会）