论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1423-04

小脑顶核电刺激对AD模型大鼠学习记忆能力及海马bcl-2、Bax表达影响

罗 晶[1],王永红[1],王小林[1],王继红[2]

(1. 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;2. 重庆医科大学基础医学院生化教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究淀粉样β蛋白(Aβ$_{1-40}$)对大鼠空间学习记忆能力及海马区Bax和bcl-2的表达的影响及小脑顶核电刺激(Fastigial nucleus stimulation,FNS)的干预作用。方法:将Aβ$_{1-40}$微量注射至大鼠右侧海马,制作大鼠AD动物模型。分别予电刺激小脑顶核、齿状核。28 d后进行水迷宫试验,观察各组大鼠空间学习记忆功能改变。免疫组化法检测各组海马CA1区bcl-2、Bax蛋白表达。结果:阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)组与假手术组(SC)比较,每天隐匿平台逃避潜伏期均明显增长($P<0.05$),海马bcl-2阳性细胞光密度明显减少($P<0.05$),Bax阳性细胞光密度明显增高($P<0.05$);小脑顶核电刺激(FNS)组与AD组比较,空间学习记忆能力明显改善($P<0.05$),海马bcl-2阳性细胞光密度明显增高($P<0.05$),Bax阳性细胞光密度明显减少($P<0.05$),齿状核刺激(DNS)组无此作用。结论:FNS可部分改善Aβ$_{1-40}$诱导的AD模型大鼠空间学习记忆障碍,可能是通过促进bcl-2表达和降低Bax表达抑制海马神经细胞凋亡。

【关键词】淀粉样β蛋白;小脑顶核电刺激;凋亡

【中图分类号】R749.16 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-10

Effects of fastigial nucleus stimulation on learning and memory and bcl-2, Bax expression in hippocampus with Alzheimer disease in rats

LUO Jing, et al

(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish rat models with Alzheimer's disease(AD) induced by β-Amyloid1-40, and to observe the effects of Fastigial nucleus stimulation(FNS)on spatial memory and learning ability and the expression of bcl-2 and Bax of hippocampus area in the rats. *Methods*: Aβ$_{1-40}$ was microinjected into CA1 subfield in the right hippocampus of rats.Cerebellar dentate nucleus and fastigial nucleus had been stimulated separately before the model was made.The spatial memory and learing ability of the rats were evaluated by the Morris water maze procedure in 28 days after the injection.The expression of bcl-2 and Bax were determined by immunohistochemistry method. *Results*: The escape latency of the place navigation in the AD group was singnificiantly longer than the sham injection group($P<0.05$).Aβ$_{1-40}$ could reduce the optical density of positive cells of bcl-2($P<0.05$)and increase the optical density of positivecells of Bax($P<0.05$)of hippocampus area.The AD rats receiving FNS showed significiant shorter escape latency than AD rats($P<0.05$). FNS could increase the optical density of positive cells of bcl-2 ($P<0.05$)and reduce the optical density of positive cells of Bax($P<0.05$)of hippocampus area. Dentate nucleus stimulation showed no such effect. *Conclusion*: FNS can partlly improve the spatial learning and memory dysfunction of AD rat.It can inhibit apoptosie and has neuroprotective effect of hippocampal cells by inhibiting the expression of Bax and promoting the expression of bcl-2 of hippocampus area.

【Key words】 Amyloid beta-protein;Fastigial nucleus stimulation;Apoptosis

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是老年人常见的神经系统变性疾病,是老年期痴呆中最常见的一种。目前认为,AD脑内神经元的丢失可能与Aβ诱导的神经元凋亡有关。Tortosa等发现[1],Aβ诱导的神经元凋亡选择性改变凋亡相关基因Bcl-2家族表达,其中Bcl-2,Bax在AD病人海马区均有免疫活性。

近年研究发现[2,3],通过电极,将仿生物电无创

作者介绍:罗 晶(1983-),女,硕士。

研究方向:老年痴呆。

通讯作者:王永红,女,教授,E-mail:wyh0231029@yahoo.com。

基金项目:重庆市科委自然科学基金资助课题(CSTC,2006EB5030)。

引入小脑顶核的小脑顶核电刺激仪对实验性血管性痴呆有治疗和预防作用。电刺激小脑顶核(Fastigial nucleus stimulation,FNS)可启动预防性和治疗性中枢神经保护机制，保护神经组织结构,促进神经功能恢复。本研究旨在研究FNS对$A\beta_{1-40}$诱导的AD模型大鼠空间学习记忆能力的影响及对海马区Bax和bcl-2表达的调节作用,为AD非药物治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性SD大鼠40只,月龄3个月,体重200～250 g,购自重庆医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 $A\beta_{1-40}$(美国Sigma公司),Bax(p-19)(美国Santa Cruz公司)稀释度为1∶200,二抗为生物素标记的羊抗鼠IgG,Bcl-2(N-19)兔抗鼠多抗(美国Santa Cruz公司)稀释度为1∶100,二抗为生物素标记的羊抗兔IgG,二抗SABC免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物饲养及分组 40只SD雄性大鼠随机分为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。

1.2.2 Aβ的孵育 用无菌生理盐水将$A\beta_{1-40}$稀释成10 μg/μl,37℃下孵育1周,使其变为聚集态Aβ。

1.2.3 动物模型的制作 SD大鼠麻醉后固定于脑立体定向仪上,钻开颅骨,切开硬脑膜,按George Paxinos等[4]1998年版《大鼠脑立体定位图谱》,于前囟后3.0 mm,中线右侧2.0 mm处用微量注射器自脑表面垂直进针2.6 mm, 然后将1 μl $A\beta_{1-40}$(10 μg/μl)缓慢注入大鼠右侧海马。假手术对照组切开硬脑膜后即缝合伤口,并在大致相应位置取材和切片。FNS治疗组造模前2 d分别给予FNS 1次(各1 h),DNS治疗组造模前2 d分别给予DNS 1次(各1 h),齿状核定位:前囟后11.6 mm,左旁开3.0 mm,深度6.5 mm;小脑顶核定位:前囟后11.6 mm,左旁开1.6 mm,深度5.6 mm。电刺激为双极同心圆电极(100 μm),强度50 μA,时程0.5 ms,刺激时间1 h。

1.2.4 行为学测试 造模后28 d,采用Morris水迷宫法测定大鼠空间学习记忆能力,平台设于C象限,水平面高于平台1.5 cm,水温控制在22℃～24℃,各组大鼠连续测试5 d,记录120 s内大鼠从入水到爬上平台所需时间即逃避潜伏期时间。训练中,若大鼠120 s内找到平台,让其在平台上停留10 s;若未找到平台,用木棒将其引上平台并让其停留10 s,潜伏期记为120 s。

1.2.5 HE染色及免疫组化检测 水迷宫试验结束后灌注取脑做成蜡块,每只动物连续取带针道的切片15张,片厚5 μm,并分为3套,分别做HE染色、Bax及Bcl-2免疫组化。按SABC免疫组化法说明书操作。DAB显色后,显微镜下观察并摄像,应用Image-pro plus5.0图像分析软件计算平均光密度值(Optical density mean):每只大鼠取3张切片采集免疫组化染色图象,在400倍下,每张切片随机取10个视野进行图像分析,并行平均光密度值测定分析。阴性对照组以PBS替代一抗。

1.2.6 统计学处理 所有指标数据采用EXCEL录入,使用SPSS12.0统计软件分析系统,计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,统计采用方差分析,组间两两比较采用SNK-q检验分析,各组数据均经正态检验及方差齐性检验,检验水准取 $\alpha=0.05$行双侧检验,$P<0.05$认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 水迷宫检测结果

由表1可见,随训练天数的增加,各组平均潜伏期逐渐缩短。AD组大鼠每天隐匿平台逃避潜伏期均明显长于SC组,差异有统计学意义($P<0.05$),FNS组较AD组明显缩短,差异有统计学意义($P<0.05$),DNS组与AD组比较第1～5 d差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 HE染色

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,胞浆着色均匀呈透亮或淡染,胞膜完整。AD组、DNS组大鼠海马CA1区细胞排列紊乱,

表1 各组大鼠水迷宫试验潜伏期比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	第1 d	第2 d	第3 d	第4 d	第5 d
SC	10	39.03 ± 20.95	27.40 ± 18.15	19.50 ± 17.62	16.42 ± 18.44	14.58 ± 14.11
AD	10	98.25 ± 17.75$^{\#}$	83.57 ± 19.58$^{\#}$	73.78 ± 16.13$^{\#}$	72.15 ± 16.12$^{\#}$	69.88 ± 21.88$^{\#}$
FS	10	73.68 ± 25.69$^{\triangle\#}$	58.05 ± 18.53$^{\triangle\#}$	44.10 ± 13.87$^{\triangle\#}$	37.98 ± 17.94$^{\triangle\#}$	33.38 ± 16.60$^{\triangle\#}$
DS	10	97.53 ± 15.02$^{\blacktriangle\#}$	86.48 ± 15.39$^{\blacktriangle\#}$	74.55 ± 18.46$^{\blacktriangle\#}$	72.45 ± 19.93$^{\blacktriangle\#}$	73.40 ± 16.21$^{\blacktriangle\#}$

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

细胞周围组织疏松、水肿，与周围组织有较大间隙，出现细胞死亡留下的空泡，可见多量细胞核深染、固缩，细胞浆强嗜酸性（图1）。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，与AD组、DS组比较有明显减少，细胞水肿较轻（图2）。

2.3 FNS对AD大鼠海马CA1区bcl-2，Bax表达的影响

bcl-2阳性细胞胞浆着棕黄色，假手术组大鼠脑组织海马CA1区可见少数的bcl-2阳性细胞。AD组和DNS组大鼠脑组织海马CA1区bcl-2阳性细胞少，阳性反应弱（图3），FNS组较AD组bcl-2阳性细胞增多（图4）；Bax阳性细胞胞浆染色呈深棕黄色，假手术组大鼠脑组织海马CA1区Bax阳性细胞少，AD组和DNS组大鼠脑组织海马CA1区Bax阳性细胞表达增多，呈强阳性表达（图5），FNS组与AD组比较Bax阳性细胞明显减少（图6）。平均光密度分析结果见表2。

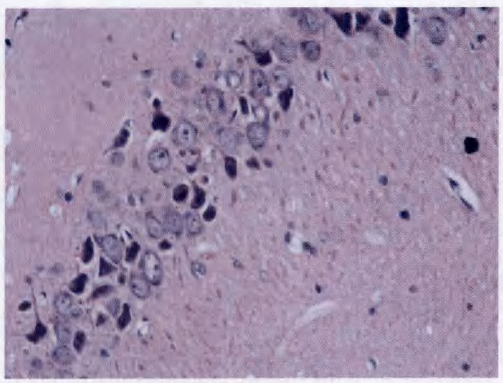


图1 AD组细胞形态（HE染色×400）

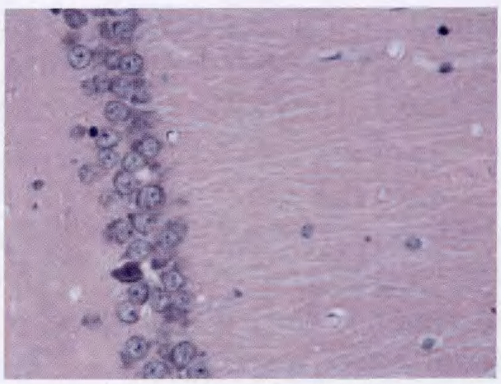


图2 FNS组细胞形态（HE染色×400）

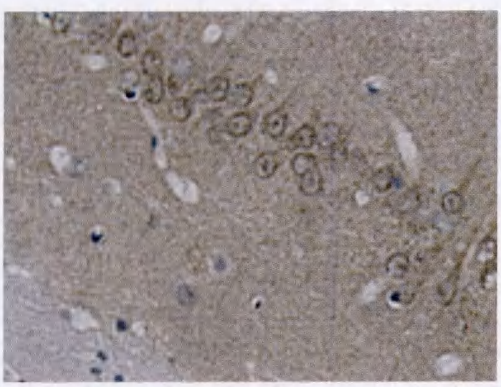


图3 AD组28 d海马bcl-2阳性细胞（DAB染色×400）

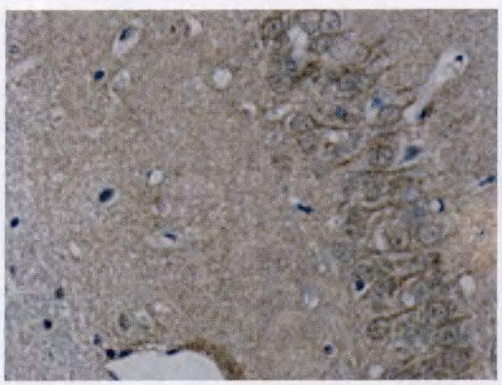


图4 FNS组28 d海马bcl-2阳性细胞（DAB染色×400）

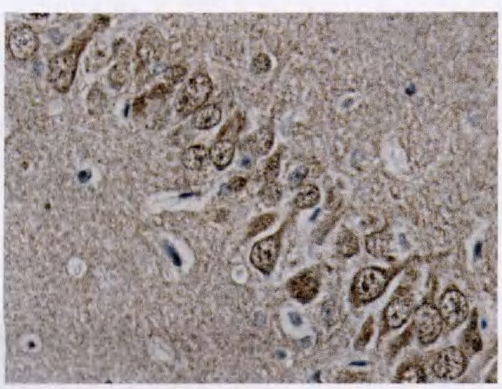


图5 AD组28 d海马Bax阳性细胞（DAB染色×400）

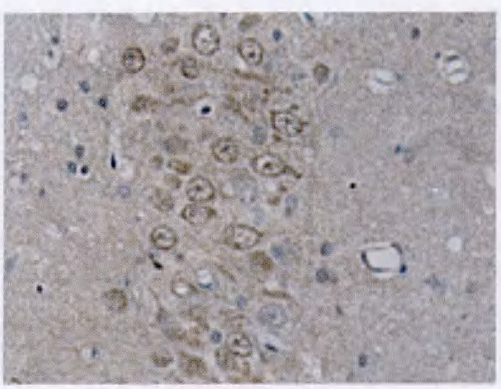


图6 FNS组28 d海马Bax阳性细胞（DAB染色×400）

表2 NS对AD大鼠海马区bcl-2,Bax表达的影响($\bar{x}\pm s$)

	n	SC 组	AD 组	DN 组	FN 组
Bax	10	0.26 ± 0.06	0.67 ± 0.06#	0.68 ± 0.09#▲◇	0.43 ± 0.07#△
bcl-2	10	0.27 ± 0.05	0.20 ± 0.04#	0.19 ± 0.04#▲◇	0.37 ± 0.10#△

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

3 讨 论

随着人口年龄的老化,老年人在人群中比重日益增加,AD作为一种老年人的常见病和多发病,其核心症状认知功能障碍严重影响病人的生活质量,而学习和记忆能力是认知功能损害时最早也是最常波及的部分。本研究发现Aβ_{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。造模前2 d分别给予FNS 1次(各1 h)的大鼠空间学习记忆能力虽低于假手术组,但较AD组显著提高,预刺激DN组则无此作用。提示,FNS对AD大鼠空间学习记忆能力有明显的改善作用,一定程度上可预防Aβ_{1-40}诱发的认知功能下降。谭兴林等[3]在电刺激小脑顶核防治血管性痴呆的实验研究中也发现通过FNS治疗可明显减轻脑缺血11周后血管性痴呆大鼠的学习和记忆障碍。

近年来对FNS启动预防性及治疗性中枢神经源性神经保护机制的研究提示,通过FNS治疗可增加局部脑血流,减轻兴奋性神经毒性作用,保护神经组织结构,促进神经功能恢复[5]。但有关FNS预防和治疗AD的机制尚不明确,本实验发现,大鼠右侧海马Aβ_{1-40}微量注射后28 d,大鼠海马CA1区神经细胞排列紊乱,细胞周围组织疏松、水肿,多量细胞核深染、固缩,细胞浆强嗜酸性,呈凋亡改变。在进一步的研究中发现,与DNS组比较,FNS可抑制AD大鼠海马CA1区Bax的表达,反应性上调bcl-2表达,预刺激齿状核则无此作用。Li Guang-qin等[6]研究小脑顶核电刺激对脑梗塞患者抗凋亡蛋白的影响发现,在脑梗死急性期给予FNS可提高血清及脑脊液中抗凋亡蛋白sAPO-1/Fas,bcl-2的含量。与本文结果相似。

有关AD发病中凋亡机制的研究迄今尚未阐明,Eric等[7]研究表明,Aβ可诱发培养的神经细胞凋亡,并选择性改变凋亡相关基因bcl-2家族表达,其中抗凋亡基因bcl-2表达显著降低,促凋亡基因Bax表达增加。Yu等[8,9]应用作用于Bcl-2家族的药物TX0201治疗注射Aβ_{1-40}的AD大鼠,发现通过调节bcl-2/Bax mRNA的异常表达,大鼠学习和记忆功能均有改善。我们的研究表明FNS对AD大鼠学习和记忆功能有一定改善,并可促进大鼠海马bcl-2表达,抑制Bax的表达。提示FNS可通过阻断凋亡的启动和执行过程,而起到神经保护作用,但AD中一系列凋亡相关基因激活表达的具体机制尚不明确,需进行下一步的实验研究。

本实验结果提示FNS对AD有一定预防和治疗作用,并可能与参与神经元凋亡的调控,其预置性保护作用,可能对老年痴呆高危人群有一级及二级预防作用。

参 考 文 献

[1] Tortosa A,Lopea E,Ferrer I.Bcl-2 and Bax protein expression in Alzheimer's disease[J]. Acta Neuropathol,1998,95(4):407-412.

[2] Fan W F. Effect of electrical stimulation of fastigial nucleus on cognitive ability in rats with vascular dementia[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation,2004,8(34):7821-7823.

[3] 谭兴林,董为伟,杨期东.电刺激小脑顶核防治血管性痴呆的实验研究[J]. 卒中与神经疾病杂志,2004,11(6):349-352.

[4] Paxinos G,Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinate [M]. fourth edition.London: Academic Press,1998.80-89.

[5] Sara B G,Eugene V G,Donald J.R.Intrinsic neurons of fastigial nucleus mediate neurogenic neuroprotection against excitotoxic and ischemic neuronal injury in rat[J]. The Journal of Neuroscience,1999,19(10):4142-4154.

[6] Li Q,Dong W W,Qin F. Effects of electric stimulation in cerebellar fastigiall nucleus on sA PO-1/Fas and Bcl-2 in patients with acute cerebral infarct[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation,2005,9(1):223-225.

[7] Paradis E,Douillard,H Koutroumanis M,et al. Amyloid β peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expression in human neurons[J]. The Journal of Neuroscience, 1996,16(32):7533-7539.

[8] 郁志华,王东建,林水森.调心方有效部位TX0201对类AD模型大鼠学习记忆和细胞凋亡相关基因的影响[J]. 中国中药杂志,2007,32(9):839-842.

[9] 方传勤,周华东,李敬诚.高胆固醇饮食对AD模型大鼠空间学习和记忆的影响[J]. 重庆医学,2007,36(9):849-851.

(责任编辑:关蕴良)