维普资讯 http://www.cqvip.com

345-347

④

文章编号：0253-3626(2000)04-0345-03

碱性成纤维细胞生长因子抗局灶性脑缺血/再灌注引发神经细胞凋亡作用的实验研究

R743.3/0.2

杨 琴[1]，胡常林[2]

（1. 重庆医科大学临床学院神经内科 重庆 400016；2. 重庆医科大学第二临床学院神经内科 重庆 400010）

摘 要：目的 观察碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)抗局灶性脑缺血/再灌注引发神经元凋亡作用。方法 采用线栓法制备大脑中动脉缺血/再灌注模型。术后首次即刻分别腹腔注射bFGF和生理盐水，以后每天一次，连用7天。TUNEL法原位检测缺血后第1、2、3、5、7天脑石蜡切片含DNA碎片的凋亡细胞。结果 正常组、假手术组、缺血组对侧半球每张切片有0～8个凋亡细胞，缺血/再灌注后缺血区凋亡细胞明显增多，缺血48h达高峰，以后逐渐降低，第7天仍可见凋亡细胞。bFGF组凋亡细胞数显著低于缺血/再灌注生理盐水对照组。结论 缺血/再灌注后缺血区神经元发生了凋亡，bFGF具有抗凋亡作用。

关键词：缺血/再灌注；凋亡；碱性成纤维细胞生长因子

中国图书分类法分类号：R741 **文献标识码**：A **收稿日期**：1999-12-21

Experiment study of basic fibroblast growth factor reducing neuronic apoptosis following cerebral ischemia/reperfusion in rat

YANG Qin, et al

(Department of Neurology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University, 400016)

Abstract : **Objective** To ascertain the effect of basic fibroblast growth factor(bFGF) reducing neuronic apoptosis. **Methods** The animal models of the right middle cerebral artery ischemia/reperfusion was established by suture method *in adult wistar rats*. The bFGF(100 μg/kg) *in physiological saline*, or *physiological saline* alone, was injected intraperitoneally immediately after cerebral ischemia, then once daily, for 7 days. We measured brain apoptotic cells exhibiting DNA fragmentation in paraffin sections with the method of a terminal deoxynucleotidyltransferase(TdT)- mediated dUTP- fluorescein nick end- labelling (TUNEL) after ischemia 2 hour/reperfusion for the first,second, third, fifth and seventh day. **Results** There were 0～8 apoptotic cells per section in normal or sham-operated groups. After cerebral ischemia/reperfusion, the apoptotic neuron number increased significantly in the ischemic region. After 48h, the apoptotic nouron decreased gradually, up to the seventh day, there were also apoptotic neuron. The number of apoptotic neurons in the bFGF- treated group differed signifficantly from that in the non-treated control group ($P<0.05$). **Conclusion** This study suggested that ischemia/reperfusion may induce neuronic apoptosis and bFGF shows the effect of reducing neuronic apoptosis.

Key Words : Ischemia/reperfusion; Apoptosis; Basic fibroblast growth factor

细胞凋亡是细胞内外因素激活细胞本身自杀程序而引起的一种生理性死亡。近年的研究发现细胞凋亡是缺血过程中神经元损害的重要现象之一，其参与了梗塞的发生与发展[1,2]。因此抑制凋亡的发生与发展则能减轻脑损害。

碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是18KD的阴离子活性多肽，具有多种生物活性。它能促进体外培养的神经元的存活及突起生长；拮抗兴奋性氨基酸毒性、细胞内Ca^{2+}超载、自由基等引起的对神经元的损害，并可减小脑梗塞体积[3,4]。推测bFGF减轻脑损害的机制之一可能是bFGF阻抑神经细胞的凋亡。因此我们采用缺血/再灌注脑缺血模型，并以bFGF进行治疗以评价bFGF拮抗神经细胞凋亡的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

成年Wistar大白鼠，体重250g～300g，鼠龄3个月，由重庆医科大学实验动物中心提供。术前12h禁食，自由饮

作者介绍：杨 琴（1970- ），女，住院医师，硕士

维普资讯 http://www.cqvip.com

水。bFGF购自广州微观生物工程有限公司，In SituCell Death Detection Kit，AP和NBT/BCIP显色试剂盒系德国Boehringer Manmheim公司产品，其余试剂均为国产分析纯。石蜡切片机系德国产品。

1.2 动物模型及分组

3.5%水合氯醛(0.35g/kg)腹腔注射麻醉，采用经颈外动脉插入线栓法制备右侧大脑中动脉闭塞模型。缺血2h，拔除栓子再灌注22h、46h、3d、5d、7d，即形成缺血/灌注模型[4]。动物随机分为正常组、假手术组、缺血/再灌注对照组及缺血/再灌注治疗组。对照组腹腔注射生理盐水，治疗组以bFGF100μg/kg溶于生理盐水腹腔注射，每组各时间点分别为5只动物。于缺血后首次即刻给药，以后每天一次，连用7天。

1.3 切片制备及凋亡观察

在预定的时间进行左心室插管，4%多聚甲醛灌注固定，断头取脑，于前联合水平冠状切取厚2mm的脑片，继续固定过夜。石蜡包埋、切片（5μm）。

凋亡细胞原位观察系采用脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP荧光素缺口末端标记法（TUNEL）[5]。简言之，切片经常规脱蜡、入水，蛋白酶K（20μg/ min 10mMTris/HCl，pH7.4～8.0)消化，TUNEL反应混合液(50μl)和Converter-AP液（50μl）分别孵化，NBT/BCIP显色液（50μl）显色。阳性对照片加DNaseI，阴性对照片加无末端转移酶的标记液。正常细胞核DNA3'-OH末端数目少，此技术不能使细胞着色。凋亡细胞的DNA是碎片，含较多3'-OH末端，此技术能使含DNA碎片的凋亡细胞呈蓝紫色。凋亡细胞的定量参照Charriant-Marlangue描述的方法进行计数[7]。

1.4 统计处理

所有数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用非配对t检验。

2 结　果

阳性对照片可见弥散分布的大小不等、形态各异的蓝紫色细胞；阴性对照片未见蓝紫色细胞。正常组、假手术组两侧半球及缺血对侧半球可见散在极少量蓝紫色细胞，缺血/再灌注组的缺血区可见大量的蓝紫色细胞。在油镜下见到蓝紫色细胞染色质浓集呈新月形、环形、块状小体甚至形成核碎片；而凋亡小体形态多样，有椭圆形、月牙形、圆形、不规则形。在梗塞区与正常组织交界处凋亡细胞最多，在梗塞中心区仅可见少量散在的蓝紫色细胞。

定量观察发现所有正常组、假手术组两侧半球及缺血鼠对侧半球每张切片有0～8个凋亡细胞。缺血/再灌注后缺血区凋亡细胞显著增多，缺血24h，缺血对照组为1605.0±122.3/切片，治疗组为1012.0±94.3/切片；缺血48h分别为1997.0±135.9和1177.0±133.0/切片，此时达高峰，之后逐渐降低，第7天仍有凋亡细胞存在，分别为560.0±82.8和285.0±80.2/切片。bFGF治疗组各时间点显示凋亡细胞显著低于缺血/再灌注对照组（$P<0.005$，见表1）。

3 讨　论

凋亡是一种生理性死亡。此种死亡与坏死在形态及生化上有本质区别。在形态上，凋亡是染色质固缩，核裂解，形成颗粒状、新月形、环形；细胞浆浓缩，细胞膜突出形成质膜小泡，脱落，形成含有细胞器及被核酸内切酶降解的DNA片段的颗粒，这种颗粒被称之为凋亡小体。在生化方面，细胞核内DNA在内源性核酸内切酶作用下，于核小体间将DNA切割成185bp～200bp的短片断，此种短片断有3'-OH末端[8]。TUNEL法就是用终末脱氧核苷酸转移酶，将生物素、荧光素或地高辛标记的核苷联结到DNA的3'-OH末端，而坏死的DNA，因被溶酶体核酸酶消化，DNA的末端为5'-OH，不能用TUNEL法检出。TUNEL法具有检测快、特异性强、灵敏度高、可原位观察细胞凋亡的分布、进行解剖定位及定量或半定量研究等优点。这一方法是目前最受研究者欢迎的一种方法[6]。

本研究发现正常组、假手术组的两侧半球及缺血后对侧半球脑组织有少量散在分布的凋亡细胞，这是神经细胞的生理性死亡。在缺血/再灌注区凋亡细胞明显增多，再灌注48h达高峰，之后逐渐减少，第7天仍有凋亡细胞存在。这表明缺血/再灌注诱发了细胞凋亡。梗塞中心内侧边界可见大量的凋亡细胞，这是中心灶与半影区移行部位，说明缺血性病变引起的神经元凋亡主要发生于半影区与中心区移行部位。凋亡细胞形态、分布与Li或Charriant-Marlangue等人的报告基本一致[2,7]。而凋亡细胞数量与Li等人报告的有一定差别，数量明显多于Li所报告，我们正继续寻找此差别的原因。另外，Li等

表1　bFGF对MCA缺血/再灌注后神经细胞凋亡的影响

组别	例数	IR1d	IR2d	IR3d	IR5d	IR7d
对照组	5	1605.0±122.3*	1997.5±135.9	1282.0±148.6*	755.0±70.0*	560.0±82.8*
bFGF组	5	1012.0±94.3**	1177.0±133.0**	860.0±86.4**	432.0±76.0**	285.0±80.2**

**：$P<0.005$与同一时间点对照组比较。*：$P<0.05$与缺血/再灌注48h比较。IR:ischemia/reperfusion, d:day.

维普资讯 http://www.cqvip.com

人仅观察了缺血/再灌注24h～48h 的情况，观察时间短，尚不能说明48h以后数天的情况。研究观察到缺血/再灌注后48h 凋亡细胞最明显，直至再灌注第7天仍有凋亡细胞出现。说明诱发细胞凋亡的因素此时仍在发挥作用。因此，至少在缺血/再灌注第7天时，仍需采取阻抑凋亡发生的措施。

自1990年GOTO发现缺血可引起神经元凋亡以来，很多学者都致力于这方面的研究[1]。结合我们的观察，可肯定脑缺血/再灌注引起缺血区神经细胞的凋亡。同时结合我们以前的脑梗塞体积测定结果亦表明凋亡参与梗塞的形成，凋亡的程度亦决定了缺血梗塞范围的大小。提示从防治凋亡的角度去探索缺血性梗塞的治疗是减轻脑缺血性损害的另一重要途径。

研究发现缺血后给予bFGF，能很好地防止脑缺血/再灌注区神经细胞的凋亡。这与bFGF能阻止血管内皮细胞和胚鼠多巴胺能神经元的凋亡相一致[9,10]。凋亡参与梗塞的形成，而bFGF能减少梗塞体积，减轻缺血性脑损害。因此，bFGF的脑保护作用机制之一很可能是通过抗凋亡作用实现的。

bFGF抗凋亡的机制可能有：(1)直接营养神经元。神经营养因子在神经细胞的发育、生长中起重要作用，其不足或缺乏则大量神经细胞元发生凋亡。bFGF能促进培养的神经元的存活及突起生长[3]，阻止胚鼠多巴胺能神经元的凋亡[9]。本研究亦发现bFGF治疗后神经细胞的凋亡明显减少，均支持上述看法。(2) 改善局部脑血流量(rCBF)。凋亡和坏死是细胞死亡的一个连续过程。弱刺激引起凋亡、强刺激引起坏死，介于二者之间的刺激则凋亡和坏死并存[11]。Li发现凋亡细胞随缺血时间延长而增加。而我们发现凋亡细胞在再灌注48h 后随再灌注时间延长而减少。表明凋亡与局部血流量的高低有关。bFGF是血管内皮细胞的促有丝分裂原、能促进血管增生、同时又能扩张血管[12]。我们在另一项实验中已观察到bFGF能增加rCBF，减小梗塞体积。rCBF的增加，系梗塞体积减小的重要因素之一。因而bFGF抗凋亡的主要因素之一可能就是改善rCBF、使半影区缺血程度减轻。(3)稳定Ca^{2+}稳态。细胞内Ca^{2+}超载、是神经元死亡的最后共同通路。它不仅引起细胞坏死，而且能触发神经元凋亡机制。Ca^{2+}依赖的核酸内切酶可能参与核小体间DNA消化、形成寡聚核小体。细胞内Ca^{2+}升高还可增加氧自由基合成，引起细胞死亡基因的激活。bFGF与受体特异结合后，激活酪氨酸酶而影响谷氨酸受体蛋白和Ca^{2+}缓冲蛋白的表达，阻止细胞内Ca^{2+}的升高，从而发挥抗凋亡作用[4]。

目前大量研究认为凋亡是由基因控制，并且发现很多新的基因[13]。bFGF是否影响与凋亡有关的基因的表达而发挥抗凋亡作用，是继续深入研究的重要课题之一。

参 考 文 献

[1] Goto K, Ishige A, Sekiguchi K, et al. Effects of cycloheximide on delayed neuronal death in rat hippocampus[J]. Brain Res,1990:534:299-302.

[2] Li Y, Chopp M, Garcia JH, et al. Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 1995;26:1252-1258.

[3] Walicke PA. Basic and acidic fibroblast growth factors have trophic effects on neurons from multiple CNS regions[J]. J Neurosci,1988;8:2618-2627.

[4] Cheng B,Mattson MP;Growth factors protect neurons against excitotoxic/ischemic damage by stabilizing calcium homeostasis[J].Stroke.1993;24(suppl I):I-136-I-140.

[5] Langa EZ, Weinstein PR, Car;son S,et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989;20:84-91.

[6] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation[J]. J Cell Biol, 1992;119:493-501.

[7] Charriant-Marlangue C, Margaill I. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis[J]. J Cereb Blood Flow Metab,1996;16:186-194.

[8] Dickson DW. Apoptosis in the brain physiology and pathology[J]. Am J Pathol, 1995;16:1040-1043.

[9] Michael Zawada W, Kirschman DL, John Colen J, et al. Growth factors rescue embryonic dopamine neurons from programmed cell death[J].Exp Neurology, 1996;140:60-67.

[10] Haimovitz-Friedman A,Balaban N,Mcloughlin M,et al. Protein kinase C mediated basic fibroblast growth factor protection of endothelial cells against radiation-induced apoptosis [J]. Cancer Res.1994;54:2591-2597.

[11] Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, et al. Apoptosis and necrosis:two distinct events induced respectively by mild and intense insults with N- methyl- D- aspartate or nitric Oxide/ Superoxide in cortical cell culture[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995;92:7162-7166.

[12] Rosenblatt S, Irikura K, Caday CG,et al. Basic fibroblast growth factor(bFGF) dilates rat pial arterioles[J]. J Cereb Blood Flow Metab,1994;14:70-74.

[13] Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC,et al. Apoptosis: molecular regulation of cell death[J]. Eur J Biochem,1996;236:1-12.