DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.17.021
第25卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 17
2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

文章编号:1000-5404(2003)17-1549-03

论著

老龄大鼠慢性脑灌注不足对海马区神经元的影响

高 东,王景周,姚国恩,周中和,张莉莉 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

提 要:目的 初步探讨海马CA1区神经细胞凋亡与丢失在血管性痴呆形成中的作用。方法 采用Pulsinelli四血管阻断(4-vessel oldusion,4VO)改良法建立血管性痴呆大鼠模型,穿梭箱系统检测大鼠的学习记忆能力。应用免疫组化法检测海马CA1区caspase-3蛋白的表达,TUNEL法测定神经细胞的凋亡。应用甲苯胺蓝染色计数CA1区残余大锥体细胞。结果 4VO 3 d组大鼠CA1区caspase-3蛋白的表达及TUNEL阳性细胞最多,随后逐渐减少,2周组与对照(CO)组相比仍有非常显著差异($P<0.01$),而4周组基本达稳定状态,与CO组相比无显著差异($P>0.05$)。4VO各组大鼠CA1区大锥体细胞丧失率随术后时间的延长逐渐增加,大鼠CA1区大锥体细胞丧失率与AAR比率呈非常显著负相关($r=-0.979$,$P<0.01$)。结论 海马CA1区神经细胞凋亡可导致大锥体细胞严重丢失,CA1区大锥体细胞的丢失是血管性痴呆形成的重要病理学基础之一。

关键词:血管性痴呆;海马CA1区;凋亡;caspase-3蛋白;认知功能障碍
中图法分类号:R338.2^{+}6;R749.1^{+}3 文献标识码:A

Relation between neuron apoptosis in hippocampus CA1 region and the pathogenesis of vascular dementia

GAO Dong, WANG Jing-zhou, YAO Guo-en, ZHOU Zhong-he, ZHANG Li-li (Department of Neurology, Daping Hospital, Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the roles of neuron apoptosis and loss in CA1 region in the pathogenesis of vascular dementia. **Methods** A rat model of vascular dementia was established by means of modified Pulsinelli 4-vessel occlusion (4VO). The learning and memory capacity of rats and the expression of caspase-3 protein in CA1 region were tested by computer-controlled initiative avoidance response shuttle-box system and immunohistochemistry, respectively. Neuron apoptosis in CA1 region was determined by TUNEL technology. Oluidine blue staining was used to count the remained pyramidal cells and calculate the loss rate of neurons so as to make a related analysis in accordance with the learning and memory capacity of rats. **Results** Caspase-3 and TUNEL positive cells in CA1 region increased to the highest level in 4VO 3 d group and then decreased gradually. The number of caspase-3 and TUNEL positive cells in CA1 region in 4VO 2 w group was obviously more than that in the control group (CO) ($P<0.01$) and came to a stable state in 4VO 4 w group but compared with that in CO group, no significant difference was found ($P>0.05$). The loss rate of pyramidal cells in 4VO group in CA1 region increased in a time-dependent manner. There was an obviously negative correlation between AAR ratio of the tested rats and loss rate of pyramidal cells in CA1 region ($r=-0.979$, $P<0.01$). **Conclusion** The apoptosis of neuron may lead to serious loss of pyramidal cells in CA1 region. The loss of pyramidal cells in hippocampus CA1 is an important pathological mechanism of the formation of vascular dementia.

Key words: vascular dementia; hippocampus CA1 region; apoptosis; caspase-3 protein; cognition dysfunction

血管性痴呆(Vascular dementia, VD)是指由于各种脑血管病引起的脑功能障碍而产生的获得性智能损害综合征,其确切的发病机制尚不明确。海马CA1区是海马结构中与人类学习记忆功能关系最为密切的功能亚区,具有对缺血的选择易损伤性[1]。研究认为CA1区神经元的迟发性死亡与细胞凋亡关系密切[2]。本实验采用Pulsinelli四血管阻断(4-vessel oldusion,4VO)改良法建立血管性痴呆动物模型,应用穿梭箱主动回避反应系统检测大鼠的学习记忆能力,观察实验大鼠海

基金项目:重庆市科委资助项目(1999-2001)
作者简介:高 东(1972-),男,辽宁省本溪市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事血管性痴呆发病机制等方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)68757343
收稿日期:2002-12-04;修回日期:2003-01-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

马CA1区神经细胞的丢失及CA1区caspase-3蛋白表达与细胞凋亡的情况。初步探讨海马CA1区神经细胞凋亡与丢失在血管性痴呆形成中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康老龄Wistar大鼠60只，月龄12~15个月，体质量298~410 g，雌雄不拘。随机分为对照组(Control)及四血管阻断(4VO)3 d、1周、2周、4周、2个月共6组，每组10只。4VO 3 d、1周、2周、4周，2个月组大鼠分别在术后3 d、1周、2周、4周，2个月时处死，对照组在术后各时相点处死2只。组间鼠龄、性别、体质量无统计学差异。

1.2 Pulsinelli4VO改良模型[3,4]制作

10%水合氯醛(0.5 ml/100 g，腹腔注射)麻醉。大鼠取颈前部正中切口，钝性分离双侧颈总动脉，穿"4"号线备用，缝合颈部皮肤。然后取颈背部正中切口，沿第一颈椎翼小孔烧灼双侧椎动脉，阻断血供。24 h后再以微动脉夹反复夹闭双侧颈总动脉，每次5 min，间隔1 h，共3次。对照组除不烧灼双侧椎动脉，不夹闭双侧颈总动脉外，其余处理同4VO各组。

1.3 大鼠学习记忆能力测试

采用第三军医大学野战外科研究所研制的微机控制的穿梭箱主动回避反应系统。该系统以灯光为条件刺激，足底电击为非条件刺激。如大鼠在灯光刺激后即能完成穿梭动作称主动回避反应(Active avoidance reaction，AAR)，而经电刺激后才能完成穿梭动作称被动回避反应(Passive avoidonce reaction，PAR)。大鼠的学习记忆能力以完成AAR的次数与测试总次数(20次)的比值即AAR比率代表[5]。大鼠在模型制作前均经穿梭箱训练7 d，AAR比率大于或等于80%者入选。4VO各组大鼠在测定指标前，进行穿梭箱测试。

1.4 海马CA1区大锥体细胞丢失的检测

采用甲苯胺蓝染色计数CA1区残余大锥体细胞，结果以大锥体细胞丧失率(Loss rate，LR)表示：

$$\text{大锥体细胞LR}=\frac{\text{CO组大锥体细胞数}-\text{4VO组残余大锥体细胞数}}{\text{CO组大锥体细胞数}}\times 100\%$$

1.5 海马CA1区caspase-3蛋白及凋亡细胞的测定

Caspase-3蛋白的检测采用免疫组化法(caspase-3多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司)；凋亡细胞的测定采用TUNEL法(TUNEL试剂盒购自Boehringer Mannheim公司)。

1.6 统计学分析

利用图像分析仪400倍光镜下，随机观察并计数左右半球各3个不重复CA1区视野caspase-3蛋白及TUNEL阳性细胞数目，计算平均值。各组数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用单因素方差分析和相关性检验。

2 结果

2.1 各组大鼠海马CA1区大锥体细胞的丢失情况及大鼠的穿梭箱成绩

4VO各组大鼠CA1区大锥体细胞LR随术后时间的延长逐渐增加，4周组大锥体细胞LR基本稳定，与2月组比较无显著差异($P>0.05$)。4VO 3 d及1周组大鼠的AAR比率与CO组相比已明显下降($P<0.01$)，2周及4周组下降更为明显($P<0.01$)，4周组与2月组比较无显著差异($P>0.05$)，见表1。

表1 各组大鼠海马CA1区大锥体细胞LR及AAR比率(%)($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 AAR ratio and loss rate of pyramidal cells in CA1 region in each group(%，$\bar{x}\pm s$)

	CO	3 d	1 week	2 week	4 week	2 month
LR	0	10.52±2.94	25.59±4.18	41.22±8.81	65.20±4.25	65.18±3.15
AAR	90.33±7.19	70.33±6.67*	69.67±6.94*	57.67±9.61*	43.67±9.35*	45.00±9.82*

*：$P<0.01$ *vs* control

2.2 各组大鼠海马CA1区caspase-3蛋白及TUNEL阳性细胞的表达

CO组海马CA1区仅见极少量caspase-3及TUNEL阳性细胞。4VO 3 d组大鼠与CO组相比，CA1区caspase-3及TUNEL阳性细胞明显增加($P<0.01$)，随后逐渐减少，2周组与CO组相比仍有非常显著差异($P<0.01$)，而4周组及2月组与CO组相比无显著性差异($P>0.05$)，见表2。

表2 各组大鼠海马CA1区caspase-3蛋白及TUNEL阳性细胞数(n，$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Number of caspase-3 and TUNEL positive cells in CA1 region in each group(n，$\bar{x}\pm s$)

	CO	3 d	1 week	2 week	4 week	2 month
Caspase-3	2.83±1.29	34.81±3.74*	23.95±2.93*	14.95±3.07*	3.17±1.23	2.66±0.58
TUNEL	2.35±0.84	23.88±2.75*	15.73±2.51*	9.10±2.11*	2.37±1.29	2.72±1.41

*：$P<0.01$ *vs* control

2.3 海马CA1区caspase-3蛋白的表达与细胞凋亡的相关性分析、大鼠AAR比率与CA1区大锥体细胞LR的相关性分析

Caspase-3蛋白与细胞凋亡之间呈非常显著正相关($r=0.997$，$P<0.01$)；大鼠AAR比率与CA1区大锥体细胞LR呈非常显著负相关($r=-0.979$，$P<0.01$)。

3 讨论

细胞凋亡(Apoptosis)是指为维持内环境稳定，由基因控制的细胞自主的有序的死亡，包括生理性的程

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

序性死亡(Programmed cell death)及由外来因素(生理性和病理性)诱发的细胞自杀(Suicide), 其确切机制尚不十分清楚。Caspases 蛋白酶家族作为特异的死亡信号转导分子, 因其均在门冬氨酸后切割底物而得名 caspase (Cysteine-asparate protease)。Caspase-3 是 caspases 家族的核心成员, 在蛋白酶级联切割过程中, caspase-3 处于核心位置, 其表达与激活在神经细胞的凋亡中具有重要作用[6]。

本实验采用的 Pulsinelli 4VO 改良大鼠模型实质上是大鼠全脑反复缺血再灌注模型。海马结构尤其是 CA1 区对缺血缺氧具有选择易损伤性, 缺血后可发生迟发性神经元死亡, 这种现象被认为主要是细胞凋亡所致[2,7]。以往的实验主要围绕脑缺血急性期(一般在 7 d 内)海马 CA1 区神经细胞凋亡的变化规律与发生机制进行研究。本实验研究结果显示 4VO 3 d、1 周、2 周组大鼠海马 CA1 区 TUNEL 阳性细胞明显多于对照组($P<0.01$), 4 周组 TUNEL 阳性细胞数基本稳定在对照组水平。实验结果还显示 CA1 区 caspase-3 蛋白的表达与 TUNEL 阳性细胞的变化规律一致, 两者呈显著正相关, 说明 CA1 区神经细胞的凋亡与 caspase-3 蛋白的表达与激活有关。海马 CA1 区凋亡神经细胞的持续存在可能是大锥体细胞大量丢失的主要原因。是什么原因导致海马 CA1 区 caspase-3 蛋白的持续表达及凋亡神经细胞持续存在近 4 周呢? 最近有研究发现海马区一氧化氮(NO)在 4VO 术后 2 周出现二次表达高峰, 并且认为 NO 表达的增加与诱导型一氧化氮合酶(iNOS)后期的表达与激活有关[8]。NO 表达的增加是不是 CA1 区凋亡神经细胞持续存在的主要原因呢? 还有其他的始动因素及发生机制存在吗? 这些问题尚有待进一步研究。

海马及其周围皮层是外显记忆神经通路的重要组成部分[9,10]。Lorente 根据大锥体细胞的形态, 将海马分成 CA1、CA2、CA3、CA4 几个亚区。CA1 区是海马的主要功能亚区, 相当于 Sommer's 段。从海马结构的生理功能上讲, 其主要功能亚区(如 CA1 区)神经细胞的丢失可能会导致严重的学习记忆障碍。赵建新等[11]采用反复全脑缺血再灌注模拟血管性痴呆小鼠模型, 发现小鼠海马结构的病理改变与学习记忆功能密切相关, 并认为海马 CA1 区锥体细胞的迟发性死亡可能是缺血性脑血管病导致痴呆的主要原因。我们采用甲苯胺蓝染色对海马 CA1 区锥体细胞层内的大锥体细胞进行计数分析, 结果显示: 4VO 3 d 组大鼠海马 CA1 区大锥体细胞数已开始下降, 4 周组大锥体细胞 LR 稳定时已达 65.20%。同时, 4VO 组大鼠的 AAR 比率在术后随时间的延长逐渐降低, 在 2 周及 4 周下降更为明显($P<0.01$), 至 4 周后才达到稳定状态, 4 周与 2 月比较无显著差异($P>0.05$)。实验结果还表明 CA1 区大锥体细胞的丢失与 AAR 比率有明显的相关性, 即 CA1 区神经细胞丢失越多, AAR 比率越低。因此, 可以得出这样的结论: 海马 CA1 区神经细胞的丢失直接与大鼠的学习记忆功能相关, 可能是血管性痴呆形成的重要病理学基础。

当然, 学习记忆并非只是某一部位的突触联系, 而是由多种神经网络共同参与的复杂智力过程[12]。因此, 海马 CA1 区神经细胞的凋亡与丢失可能仅是血管性痴呆形成的病理学基础之一。

参考文献:

[1] Araki T, Kato H, Kogure K. Selective neuronal vulnerability following transient cerebral ischemia in the gerbil: distribution and time course[J]. Acta Neurol Scand, 1989, 80(6): 548-553.

[2] Nitatori T, Sato N, Waguri S, *et al*. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the cerebral hippocampus following transient ischemia is apoptosis[J]. J Neurosci, 1995, 15(2): 1001-1011.

[3] Pulsinelli W A, Brierley J B. A new model of bilateral hemisphere ischemia in the unanesthetized rat[J]. Stroke, 1979, 10(3): 267-272.

[4] 贾健民, 贾健平, 刘多三, 等. Wistar 大鼠全脑反复缺血再灌注动物模型及行为学研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 1992, 9(2): 71-73.

[5] 刘　彦, 何庆华, 廖维宏, 等. 微机控制的穿梭箱双向主动回避反应实验系统[J]. 中国应用生理学杂志, 1999, 15(4): 366-367.

[6] Friedlander R M, Yuan J. ICE, neuronal apoptosis and neurodegeneration [J]. Cell Death Differ, 1998, 5(10): 823-831.

[7] Iwai T, Hara A, Niwa M, *et al*. Temporal profile of nuclear DNA fragmentation in situ in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia [J]. Brain Res, 1995, 671(2): 305-308.

[8] 许丹芸, 游国雄, 苗建亭, 等. 脑缺血及血管性痴呆形成过程中一氧化氮机制的实验研究[J]. 中华老年医学杂志, 1999, 18(4): 240-243.

[9] Laroche S, Davis S, Jay T M. Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation[J]. Hippocampus, 2000, 10(4): 438-446.

[10] Sakurai Y. Dependence of functional synaptic connections of hippocampal and neocortical neurons on types of memory[J]. Neurosci Lett, 1993, 158(2): 181-114.

[11] 赵建新, 田元祥, 李国明, 等. 脑缺血再灌注拟血管性痴呆小鼠皮层及海马细胞病理形态学动态观察[J]. 中风与神经疾病杂志, 2000, 17(4): 200-202.

[12] 高　东, 王景周, 姚国恩, 等. 海马 CA1 区与皮层神经元凋亡与血管性痴呆发病机制的实验研究[J]. 中国行为医学科学, 2002, 11(3): 252-254.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net