

bFGF 在大鼠脑弥漫性轴索损伤中的脑保护作用

李红旗 张玉芝 高荣丰 张战波 程 钢

[摘要] 目的 观察碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)在大鼠脑弥漫性轴索损伤(DAI)中的保护作用。方法 选择健康雄性 SD 大鼠 40 只,随机分为正常对照组(5 只)、DAI 损伤组(25 只)和 bFGF 组(5 只)。DAI 生理盐水组(5 只),DAI 损伤组大鼠按伤后存活时间又分为第 6h、12h、24h、72h 及 7d 组。用免疫组织化学方法检测大鼠脑皮层 bFGF 的表达,并分析其表达水平变化特点。bFGF 治疗组处理同 DAI 损伤组,在脑损伤前 2h 向右侧脑室穿刺注射 bFGF 10 μ l。结果 DAI 后 6h 出现 bFGF 表达,12h 表达增加,72h 达高峰,7d 后仍维持较高水平,DAI 损伤组 72h 组与其他各时限比较有高度显著性差异($P < 0.01$)。HE 染色结果显示,DAI 损伤组脑皮层神经元数量明显减少,与 DAI 生理盐水组相比,各时间点 bFGF 治疗组损伤的神经元数量减少($P < 0.05$)。结论 bFGF 在大鼠脑弥漫性轴索损伤中有明显的脑保护作用。

[关键词] 弥漫性轴索损伤;碱性成纤维细胞生长因子;免疫组织化学

Neuroprotective effect of bFGF on cerebral diffuse axonal injuries of rats LI Hong-qi, ZHANG Yu-zhi, GAO Rong-feng, et al. Department of Neurosurgery, Hebei Provincial Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Forces, Shijiazhuang 050081, Hebei, China

[Abstract] **Objective** To observe the neuroprotective effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) on cerebral diffuse axonal injuries (DAI) of rats. **Methods** 40 male SD rats were randomly divided into control group, DAI injury group, bFGF group and DAI saline group. According to the survival time of rats, DAI injury group were divided into five groups, the 6h, 12h, 24h, 72h and 7th day group. The changes of bFGF expression in cerebral cortex were detected by immunohistochemical method from 6h to 7d after DAI. Two hours before DAI, bFGF 10 μ l was injected into right ventricle in bFGF group. **Results** The bFGF expression appeared at 6h after DAI, increased at 12h, reached the highest level at 72h, and kept in a high level at 7d. There were obvious differences between 72h group and other groups in DAI injury group ($P < 0.01$), cerebral cortex neurons were obviously decreased by HE staining. In each time group, injured neurons were decreased in bFGF group combined with DAI injury group ($P < 0.05$). **Conclusions** bFGF has obvious neuroprotective effect on cerebral diffuse axonal injuries of rats.

[Key words] diffuse axonal injuries (DAI); basic fibroblast growth factor (bFGF); immunohistochemistry

中图分类号:R651.1 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2003)07-0414-02

近年来,碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)已成为神经再生的研究热点。研究表明, bFGF 广泛分布于成熟和未成熟的中枢神经系统内,主要由神经元、巨噬细胞和胶质细胞产生^[1]。bFGF 是否也参与脑弥漫性轴索损伤(diffuse axonal injuries, DAI)后的神经元自我保护及修复过程,目前尚少见报道,主要由于以往无理想的 DAI 模型。我们在研制大鼠脑弥漫性轴索损伤模型的前提下,探讨了在 DAI 后不同时间点大鼠脑 bFGF 表达的意义^[2]。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组 选择健康雄性 SD 大鼠 40 只(第四军医大学实验动物中心提供),体重(250 \pm 20)g,随机分为正常对照组(5 只)、DAI 损伤组(25 只)和 bFGF 治疗组(5 只)、DAI 生理盐水组(5 只)。损伤组再

分为损伤后第 6h、12h、24h、72h 及第 7d 等 5 个观察时限,每 1 时限各 5 只。bFGF 治疗组:处理分组同 DAI 损伤组,在脑损伤前 2h 用立体定向的方法向右侧脑室穿刺注射 bFGF 10 μ l (Sigma 公司)。治疗对照组注射生理盐水。于笼中喂养。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制作 大鼠用 10g/L 戊巴比妥钠按 40mg/kg 对大鼠行腹腔注射麻醉,然后固定于大鼠 DAI 装置上^[3],待其苏醒时按动装置,使其头部在 30ms 内旋转 90°,使脑组织受到角加速度损伤,制成头颅侧向旋转脑损伤模型。损伤后严密观察,保持呼吸道通畅,于笼中喂养。

1.2.2 免疫组织化学检测 DAI 损伤组在各个时间点进行如下处理:每组大鼠均用 10g/L 戊巴比妥钠按 40mg/kg 腹腔注射麻醉,迅速开胸暴露心脏,剪破右心耳,左心室切口置管至升主动脉,生理盐水 100ml 快速冲洗,随后用 4g/L 多聚甲醛溶液(4 $^{\circ}$ C, pH7.4)灌注 400ml,灌注完毕后立即断头剥离全脑,浸入 10g/L 多聚甲醛溶液中 6h,然后以清水冲洗 4h,标本常规脱水、

作者单位:1. 050081 石家庄,武警河北总队医院神经外科(李红旗、高荣丰、张战波、程钢);2. 050082 石家庄,白求恩国际和平医院(张玉芝)。作者简介:李红旗(1964-),男,河北廊坊市人,副主任医师,主要研究方向:DAI 的基础及临床救治研究。

浸蜡,石蜡切片厚 5 μ m,捞片后置于烤箱 58 $^{\circ}$ C—60 $^{\circ}$ C, 30 min 取出,切片脱蜡至水行免疫组织化学测定(武汉博士德生物工程公司提供),柠檬酸缓冲液中电炉加热 100 $^{\circ}$ C 持续 10 min,自然冷却,滴加一抗为小鼠 bFGF-FmAb 抗体(博士德 1:100)4 $^{\circ}$ C 孵化 24h,滴加二抗为生物素化山羊抗小鼠 IgG(博士德 1:100)37 $^{\circ}$ C 30 min,滴加 SABC 复合物 37 $^{\circ}$ C 30 min,DAB 显色,玻片脱水、透明、中性树胶封片。0.01 mol/L PBS 代替一抗做阴性对照,正常脑组织为正常对照组。

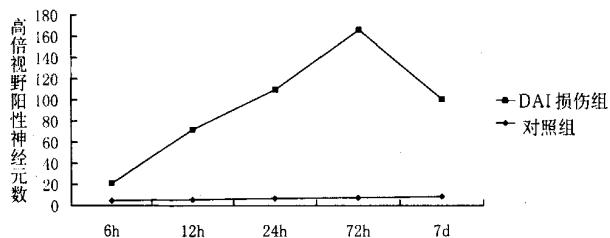
1.3 bFGF 阳性结果判定 以胞浆中出现棕黄染色为阳性,无棕黄染色为阴性。各个时间段中以细胞阳性染色的百分数为阳性率。在光学显微镜下($\times 400$),以显微计数尺,计算室上区大脑皮层 1 mm² 区域内的阳性细胞数。

1.4 统计学方法 数据以($\bar{x} \pm s$)表示;利用 SPSS 10.0 软件包进行分析;组间比较采用 *t* 检验;DAI 损伤组内各组比较采用方差分析。

2 结果

DAI 伤后 12h 大脑皮层 bFGF 表达增加,伤后 72h 达峰值,第 7d 仍维持较高水平。阳性神经元表达数在损伤后 72h 组与各时限比较有明显显著差异($P < 0.01$,见附图)。额顶区大脑皮层损伤的神经元呈阳性表达,整个细胞呈棕黄色。正常对照组大鼠大脑皮层 bFGF 只有弱表达。

HE 染色结果显示,损伤后 12h 大鼠额顶区皮层神经元均可见到胞浆粉红、核浓染,胞体皱缩,神经元细胞突起成屈曲螺旋状变形,变形神经元主要分布于大脑皮层、胼胝体、脑干。伤后第 12h、24h、72h、7d,额顶区皮层损伤神经元数量与 DAI 生理盐水组相比,bFGF 治疗组损伤的神经元数量明显减少($P < 0.05$,见附表)。



注:DAI 损伤组 72h 与各时限组比较, $P < 0.01$

附图 bFGF 在正常组及 DAI 损伤组各时限的表达
(个/0.1mm², $\bar{x} \pm s$)

附表 各组损伤神经元数比较 (个/0.1mm², $\bar{x} \pm s$)

组别	6h	12h	24h	72h	7d
DAI 生理盐水组	4.9 \pm 1.5	5.8 \pm 1.4	6.8 \pm 1.5	7.5 \pm 1.9	8.4 \pm 2.1
bFGF 组	4.1 \pm 1.2 ^a	4.2 \pm 1.5 ^a	4.0 \pm 1.2 ^a	4.4 \pm 1.6 ^a	3.8 \pm 1.3 ^a

注:与 DAI 生理盐水组比较,a: $P < 0.05$

3 讨论

由 Gospodarowicz 等^[4]发现了 bFGF。在中枢神经系统内,bFGF 在保护神经元免受各种因素所致的神经元变性和死亡中发挥着重要作用^[5]。对用锝放射性标记的 bFGF 检测发现,bFGF 不能通过正常的血脑屏障,但当脑组织受到各种损伤时,bFGF 则能通过血脑屏障而发挥其神经保护作用^[6]。Aoyagi 等在培养的胎鼠海马神经元中加入 bFGF,神经元的存活时间延长,轴突延长^[7]。Ernfors 等的研究结果表明,bFGF 在大脑皮层区表达较高^[8]。

本研究结果显示,在大鼠 DAI 损伤后 24h 大脑皮层 bFGF 表达明显增多,以 72h 达到高峰,伤后第 7d 仍维持在较高水平。DAI 后 bFGF 表达阳性神经元在大脑皮层呈弥漫性分布,bFGF 在各时间点表达有明显差异,在颅脑损伤后的一系列细胞反应及神经功能恢复过程中发挥重要作用;经病理学观察,bFGF 治疗组大脑皮层损伤的神经元明显减少,且可见到损伤后修复的神经元明显增多。

[参考文献]

[1] Grothe C, Unsicker K. Basic fibroblast growth factor in the hypoglossal system: specific retrograde transport, trophic, and lesion-related responses[J]. Neurosci Res, 1992, 32(3): 317—328.

[2] 李红旗,章翔,费舟,等.碱性成纤维细胞生长因子在大鼠脑弥漫性轴索损伤中的表达[J].第四军医大学学报,2001,22(23):2205—2206.

[3] 贺晓生,易声禹,章翔,等.脑弥漫性轴索损伤装置的研制和应用[J].第四军医大学学报,1998,19(1):87—89.

[4] Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweiger L. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor[J]. Endocrine Rev, 1987, 8(2): 95—104.

[5] Dai Z, Peng HB. Presynaptic differentiation induced in cultured neurons by local application of basic fibroblast growth factor[J]. J Neurosci, 1995, 15(8): 5466—5475.

[6] Teng NL, Jeanmie L, Melody L. Induction of basic fibroblast growth factor (bFGF) expression following focal cerebral[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1979, 49: 2655—2566.

[7] Aoyagi A, Nishikawa K, Saito H. Characterization of bFGF-mediated acceleration of axonal branching in cultured rat hippocampal neurons[J]. Brain Res, 1994, 661(1): 117—126.

[8] Ernfors P, Lonnberg P, Ayer LC. Developmental and regional expression of basic fibroblast growth factor mRNA in rat central nervous system[J]. J Neurosci Res, 1990, 27(1): 10—19.

(收稿日期:2002-12-31 修回日期:2003-06-13)