

慢性脑缺血对老龄大鼠学习记忆能力和星形胶质细胞的影响

常文广¹, 滕军放²

[摘要] 目的 观察慢性脑缺血对老龄大鼠学习记忆能力和星形胶质细胞的影响。方法 50 只 Wistar 健康老龄大鼠随机分为假手术组和模型组,采用 Morris 水迷宫检测各组大鼠学习记忆能力的变化;采用免疫组化法观察胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)在各组大鼠额叶皮质和海马的表达。结果 与假手术组比较,模型组大鼠的学习记忆功能明显下降,GFAP 标记的星形胶质细胞大量增生、肥大。结论 慢性脑缺血的病理机制中涉及星形胶质细胞的增殖和形态改变,且可能与学习记忆能力下降有关。

[关键词] 脑缺血;学习记忆;胶质原纤维酸性蛋白;大鼠

Effect of Chronic Cerebral Hypoperfusion on Abilities of Learning and Memory and Astrocytes in Aged Rats CHANG Wen-guang, TENG Jun-fang. The Department of Neurology, the Center Hospital of Xinxiang, Xinxiang 453000, Henan, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of chronic cerebral hypoperfusion on abilities of learning and memory and astrocytes in old rats. **Methods** 50 Wistar rats were randomly divided into the sham group and model group with 25 animals in each group. All animals were assessed with Morris water maze to test the changes of abilities of learning and memory. The expressions of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the frontal lobe and hippocampus were observed immunohistochemically. **Results** Compared with the sham group, the scores of Morris water maze decreased in the model group, while the astrocytes marked by GFAP proliferated and enlarged significantly. **Conclusion** Proliferation and morphological changes of astrocytes are involved in pathological mechanism of chronic cerebral hypoperfusion, which might be associated with the decrease of ability of learning and memory.

Key words: cerebral hypoperfusion; learning and memory; glial fibrillary acidic protein (GFAP); rat

[中图分类号] R743.3 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)06-0524-02

[本文著录格式] 常文广,滕军放.慢性脑缺血对老龄大鼠学习记忆能力和星形胶质细胞的影响[J].中国康复理论与实践,2008,14(6):524-525.

慢性脑缺血是指各种原因导致的长期脑灌注不足,使脑组织结构和生化过程发生变化,其病理过程不仅包括神经元的变化,而且存在神经胶质细胞的变化。本研究观察慢性脑缺血对学习记忆能力和胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)标记的星形胶质细胞的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组 健康 Wistar 大鼠 50 只,雌雄不拘,12~14 月龄,体重 450~550 g,由河南省郑州大学实验动物中心提供。随机将动物分为假手术组(A 组)和模型组(B 组),每组 25 只,2 个月后进行行为学评定。

1.2 动物模型制作 参照 De la Torre 等的方法^[1]制作慢性脑灌注不足动物模型:大鼠术前 12 h 禁食,4 h 禁水;用 10%水合氯醛 0.3 ml/100 g 腹腔注射麻醉,保证手术期间有自主呼吸;仰卧固定,颈部去毛消毒后正中切开,分离出双侧颈总动脉,双重丝线结扎,间断缝合皮肤。术后送到通风的动物房饲养。假手术组除

不结扎双侧颈总动脉外,余处理同动物模型制作。

1.3 Morris 水迷宫测定 水迷宫为 $\varnothing 150$ cm、高 50 cm 的圆形水池,水深 30 cm,用加热器使水温保持在 22℃~26℃,迷宫底部和内壁用黑漆涂黑,上方安置摄像机,并与安装有处理软件的电脑相连。圆形水池分成 4 个象限,以 $\varnothing 10$ cm、高 29 cm 的圆形平台为大鼠搜寻目标,平台顶低于水面 1 cm。试验时固定于 4 个象限的任一象限。

定位航行试验:历时 5 d。第 1 天让大鼠自由游泳 2 min,从第 2 天起,每天分上、下午两段,每段训练 4 次,训练时选择 4 个不同象限为入水点,将大鼠面向池壁放入水中,观察并记录其寻找并爬上平台所需时间(逃避潜伏期)。如果大鼠在 120 s 内未找到平台,将其引至平台,潜伏期记为 120 s。每次训练间隔 60 s,记录第 5 天的逃避潜伏期时间。

空间搜索试验:第 6 天第 5 次训练时撤除平台,然后任选 1 个入水点将大鼠面向池壁放入水中,测其在 120 s 内跨过原平台所在位置的次数。

1.4 GFAP 测定 行 Morris 迷宫测试后,大鼠以 10%水合氯醛 0.3 ml/100 g 腹腔注射麻醉,4%多聚甲醛经主动脉插管灌注固定,取脑后置于 4%多聚甲醛中固定 24 h,取视交叉至小脑的冠状切面,洗涤、脱水、

作者单位:1. 新乡市中心医院神经内科三病区,河南新乡市 453000;2. 郑州大学第一附属医院神经内科,河南郑州市 450052。作者简介:常文广(1975-),男,河南辉县市人,主治医师,硕士研究生,主要研究方向:脑血管病。

透明、浸蜡、包埋,冠状位切片,片厚 3~4 μm 。GFAP 兔抗人多克隆纯化 IgG 抗体(1:100) SABC 法染色, DAB 显色,步骤按说明书进行。GFAP 在细胞质以及突起上呈棕黄色为阳性。应用 Q550c 型 Leica 彩色病理图像分析仪(德国产),Qwin 软件分析系统测量平均灰度值。

1.5 统计学方法 计量资料均以($\bar{x}\pm s$)表示,使用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析和最小差异性(LSD) t 检验。

2 结果

2.1 一般情况 动物麻醉清醒后均出现不同程度的精神萎靡,反应迟钝,进食减少。术后 1 d, A 组大鼠精神恢复,反应灵敏,进食增多;B 组大鼠均表现运动减少、不能进食、反应迟钝,部分大鼠共济失调。3~5 d 后,B 组大鼠精神、反应、进食逐渐恢复,1 周后接近正常。A 组大鼠死亡 2 只,B 组死亡 6 只。

2.2 Morris 水迷宫测定 B 组大鼠逃避潜伏期长于 A 组,跨过平台的次数少于 A 组(均 $P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 Morris 水迷宫测定结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	逃避潜伏期(s)	跨过平台次数
A 组	23	12.89 \pm 5.66	7.6 \pm 0.54
B 组	19	105.43 \pm 13.67	1.8 \pm 0.42
t		3.551	2.971
P		<0.0005	<0.0025

2.3 大鼠额叶皮质和海马中 GFAP 的表达 B 组大鼠额叶皮质和海马中 GFAP 的表达多于 A 组(均 $P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠不同脑区 GFAP 灰度值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	额叶皮质	海马
A 组	23	117.64 \pm 2.21	114.34 \pm 2.36
B 组	19	130.00 \pm 1.80 ^a	128.00 \pm 2.12 ^a
t		2.021	2.423
P		<0.025	<0.01

3 讨论

1992 年,De la Torre 首次通过永久性结扎大鼠双侧颈总动脉制作出慢性脑缺血动物模型^[1]。由于该动物模型操作简便、重复性好,且完全结扎双侧颈总动脉缺血程度基本相同,使实验的各组间和个体间均具有很高可比性,在医学科研领域被广泛采纳。Morris 水迷宫排除了动物在完成作业过程中留下的排泄物及分泌物的影响,广泛用于学习记忆功能研究。

星形胶质细胞是脑内最多的一种胶质细胞,充满神经元的间隙。星形胶质细胞有许多功能:①与毛细

血管接触,参与血脑屏障组成;②作为中介,在神经元和毛细血管间进行物质交换,参与神经元的物质代谢;③分隔和绝缘神经元的传导;④作为神经组织的骨架;⑤修复损伤神经元,形成胶质瘢痕等。GFAP 属于细胞骨架的一种中间细丝蛋白,只存在于星形细胞中,是该类细胞的特异性蛋白^[2],可作为星形细胞敏感的标记物^[3]。

一般说来,星形胶质细胞的增生是其对神经细胞损害的反应或直接对致病因子的反应。在急、慢性脑损伤情况下,星形胶质细胞活化,表现为细胞肿胀、肥大、突起增多和延长,GFAP 免疫组化染色表达增强,其生理作用可能对损伤有保护作用^[2]。但损伤后 GFAP 过高水平表达将有利于胶质瘢痕的形成^[4],影响神经纤维的传导和突触的构建^[5,6]。本实验结果提示,慢性脑缺血 2 个月后星形胶质细胞反应性过度增生,且增生广泛,可能是学习记忆功能受损的机制之一。

慢性脑缺血的病理机制可能涉及多个方面,临床上单纯的神经元保护并不能取得预期的效果。因此,充分考虑胶质细胞反应所起的作用可能会提供一种新的思路。

[参考文献]

- [1] De la Torre JC, Fortin T, Park GA, et al. Chronic cerebrovascular insufficiency induces dementia-like deficits in aged rats[J]. Brain Res, 1992, 582(2): 186-195.
- [2] Nawashiro H, Messing A, Azza M N. Mice lacking GFAP are hypersensitive to traumatic cerebrospinal injury[J]. Neuroreport, 2001, 9(8): 1691-1696.
- [3] Dietrich WD, Truettner J, Zhao W, et al. Sequential changes in glia fibrillary acidic protein and expression following parasagittal fluid percussion brain injury in rats[J]. J Neurotrauma, 2005, 16(7): 567-581.
- [4] Pekny M, Johansson CB, Eliasson C, et al. Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin[J]. J Cell Biol, 2003, 145(3): 503-514.
- [5] Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, et al. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function[J]. Trends Neurosci, 2006, 29: 570-577.
- [6] Liesi P, Kauppila T. Induction of type IV collagen and other basement membrane associated proteins after spinal cord injury of the adult rat participate in formation of the glial scar[J]. Exp Neurol, 2002, 173: 31-45.

(收稿日期:2007-09-13)