

·基础研究·

脑缺血再灌注后 bFGF 和 FGFR 表达及藻蓝蛋白的干预作用

丁晓洁¹ 王超¹ 孙锋¹ 郭云良²

摘要 目的:观察脑缺血再灌注后神经细胞凋亡和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)及其受体(FGFR)的表达,探讨藻蓝蛋白对脑缺血损伤的干预作用。方法:成年健康雄性 Wistar 大鼠 52 只,应用线栓法建立大脑中动脉阻塞再灌注(MCAO/R)模型,藻蓝蛋白进行治疗,TUNEL 方法观察脑缺血再灌注后神经细胞凋亡,免疫组化检测 bFGF 和 FGFR 的表达。结果:脑缺血再灌注后 6h,皮质区和纹状体区神经细胞凋亡逐渐增加,至第 1d 达高峰,第 3d 开始下降,第 14d 时仍高于假手术组;藻蓝蛋白治疗组凋亡细胞的变化与对照组相似,同一时间点相比较,均显著低于对照组。脑缺血再灌注后皮质区和纹状体区神经元 bFGF 和 FGFR 表达增强,再灌注 6h 神经细胞即出现 bFGF 表达,第 1d 达高峰,后逐渐减弱,至第 14d 仍高于假手术组;藻蓝蛋白组神经细胞 bFGF 和 FGFR 表达的变化趋势与对照组相似,同一时间点比较,均明显高于对照组。结论:藻蓝蛋白可能通过促进 bFGF 和 FGFR 的表达,激活内源性神经保护机制而发挥抗凋亡作用。

关键词 藻蓝蛋白;脑缺血;凋亡;碱性成纤维细胞生长因子;受体

中图分类号: R493.R743.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-04-0316-03

The expressions of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor after cerebral ischemic reperfusion and the protective effects of phycocyanin in rats/DING Xiaojie, WANG Chao, SUN Feng, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007,22(4):316—318

Abstract Objective: To investigate the expression of bFGF and FGFR after focal cerebral ischemia reperfusion and the protective effects of phycocyanin in rats. **Method:** The animal model of middle cerebral artery occlusion reperfusion (MCAO/R) was established using the intraluminal filament occlusion with 52 healthy adult male Wistar rats, and treated by phycocyanin. The apoptosis and the expression of bFGF and FGFR were determined by TUNEL assay and immunohistochemical staining to evaluate the effects of phycocyanin on above indexes. **Result:** In control group, apoptosis-positive cells were preferentially located in cortex and striatum and progressively increased from reperfusion 6h and peaked at the 1st d after reperfusion, then decreased on the 3rd d and still in high level on the 14th d. In treatment group, the time-phase pattern of apoptosis-positive cells were similar to that in control group, but the number of cells was significantly lower than that in control group at the same time points. In the control group, the overexpressions of bFGF and FGFR were mainly in cortex and striatum and began from ischemic reperfusion 6h, reached maximum on the 1st d, then subsided gradually and still in high level on the 14th d. In treatment group, the time-phase pattern of bFGF and FGFR were similar to those in control group, while the bFGF and FGFR-positive cells were significantly more than those in control group at the same time points. **Conclusion:** Phycocyanin might play anti-apoptotic effects by means of over-expressing bFGF and FGFR and activating endogenous neuroprotective mechanism following cerebral ischemic reperfusion in rats.

Author's address Institute of Cerebrovascular Diseases, Qingdao University Medical College, Qingdao, 266003

Key words phycocyanin; cerebral ischemia; apoptosis; basic fibroblast growth factor; receptor

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblastic growth factor, bFGF)是一种具有多种生物学活性的神经营养因子,在神经系统发育及正常神经功能维持方面起着较为重要的作用。正常情况下脑内仅有少量 bFGF 表达,当脑受到各种损害时表达增加,可直接增强缺血神经元的抗损伤能力或间接通过胶质细胞起神经保护效应^[1]。成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptors, FGFRs)是

免疫球蛋白基因超家族成员,属于酪氨酸激酶受体第 4 型,分布在多种细胞膜,在细胞的增殖、分化、血管生成、骨骼形成、伤口愈合和生长发育等进程中起着十分重要的作用。藻蓝蛋白是一种藻蓝胆素蛋白

1 青岛大学医学院第二附属医院,青岛,266042

2 通讯作者:郭云良(青岛大学医学院脑血管病研究所,266003)

作者简介:丁晓洁,女,医学硕士,主治医师

收稿日期:2006-09-04

质,由开链四吡咯化合物和脱辅蛋白通过硫链键结合,具有神经保护作用,增强免疫力和抗炎作用^[2-3]。本文旨在观察藻蓝蛋白对脑缺血再灌注后脑组织 bFGF 及 FGFR 表达的影响,进一步探讨其神经保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组和动物模型的建立

成年健康雄性 Wistar 大鼠 52 只,体重 220—260g,清洁级,由山东大学实验动物中心提供(鲁动质字 20021024)。随机分为假手术组 4 只、对照组 24 只和治疗组 24 只;后两组再分为脑缺血 1h 再灌注 6h、12h、1d、3d、7d、14d 组,每组 4 只。应用线栓法经左侧颈外-内动脉插线建立大脑中动脉闭塞再灌注(middle cerebral artery occlusion reperfusion, MCAO/R)模型。模型成功的标志:动物苏醒后出现左侧 Horner 征、右侧以前肢为重的偏瘫,爬行时向右侧划圈。假手术组除不插线外,其余步骤同实验组。实验中出现呼吸困难、出血过多、死亡,以及术后 2h 仍不能苏醒的动物弃去不用,另取动物补充。

1.2 干预治疗措施

治疗组动物于缺血 1h 再灌注 2h 后立即用藻蓝蛋白混悬液按 100mg/kg 体重灌胃给药(藻蓝蛋白由中国科学院海洋研究所提供),以后每天给予一次藻蓝蛋白混悬液灌胃。对照组动物同步给予等量的生理盐水。假手术组不做处理。

1.3 标本采集

治疗组和对照组动物按规定的再灌注时间点取材,假手术组于术后 1d 取材。以 10%水合氯醛(300mg/kg)腹腔注射麻醉后,仰卧固定,用 4%甲醛溶液经心脏灌注固定后断头完整取脑,置于 4%甲醛溶液后固定 2h,蒸馏水浸泡 4h。切取视交叉后方约 5mm 的脑组织,常规脱水、透明、石蜡包埋。自视交叉后缘连续冠状切片,片厚 5 μ m,每隔 10 张抽取 1 张,粘于多聚赖氨酸处理过的玻片上,室温保存备用。

1.4 细胞凋亡检测

TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供。标本切片常规脱蜡、水化,按试剂盒提供的实验步骤进行操作,DAB 显色。光镜下观察,细胞核出现棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞。高倍镜下(400 倍)在皮质和纹状体区随机各取 4 个视野计数阳性细胞。

1.5 免疫组化检测

兔抗大鼠 bFGF 和 FGFR 单克隆抗体由武汉博

士德生物工程有限公司提供,链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(SP)免疫组化试剂盒由北京中山生物技术有限公司提供。标本切片常规脱蜡、水化,按试剂盒提供的实验步骤进行操作,DAB 显色,光镜下观察,胞浆出现棕色颗粒为阳性着色。高倍镜下(400 倍)在皮质和纹状体区随机各取 4 个视野计数阳性细胞,以均数 \pm 标准差表示。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 细胞凋亡检测

假手术组脑组织可见少数凋亡细胞,对照组于脑缺血再灌注 6h 即在皮质区及纹状体区出现凋亡细胞,随着再灌注时间的延长逐渐增多,至再灌注 1d 达高峰,第 3d 开始下降,至第 14d 时仍高于假手术组。治疗组凋亡细胞的变化规律与对照组相似,同一时间点相比较,均显著低于对照组(表 1,图 1—2,见前置彩色插页 10)。

表 1 脑缺血再灌注后凋亡阳性细胞的定量观察($\bar{x}\pm s$,个/视野)

组别	皮质区		纹状体区	
	对照组	治疗组	对照组	治疗组
假手术组	2.75 \pm 1.28		2.53 \pm 1.36	
再灌注 6h	14.00 \pm 2.16 ^①	10.01 \pm 2.85 ^②	13.25 \pm 2.60 ^①	9.75 \pm 1.98 ^②
再灌注 12h	16.75 \pm 1.83 ^①	12.67 \pm 1.97 ^②	16.13 \pm 2.33 ^①	13.06 \pm 2.08 ^②
再灌注 1d	20.75 \pm 3.10 ^①	16.33 \pm 2.47 ^②	18.50 \pm 2.08 ^①	15.76 \pm 2.39 ^②
再灌注 3d	14.75 \pm 2.50 ^①	10.50 \pm 1.29 ^②	14.25 \pm 2.22 ^①	11.13 \pm 2.03 ^②
再灌注 7d	12.25 \pm 2.07 ^①	7.75 \pm 1.71 ^②	12.01 \pm 1.75 ^①	7.35 \pm 2.06 ^②
再灌注 14d	9.78 \pm 1.78 ^①	5.35 \pm 1.92 ^②	9.35 \pm 1.82 ^①	6.15 \pm 2.05 ^②

①与假手术组比较, $P<0.05$;②与对照组同一时间点相应脑区比较, $P<0.05$

2.2 bFGF 表达

假手术组脑组织 bFGF 有微弱表达。对照组缺血侧脑组织 bFGF 表达增强,主要位于皮质区和纹状体区,脑缺血再灌注 6h bFGF 表达逐渐增强,阳性细胞增多,着色加深,1d 达高峰,之后逐渐减弱,至第 14d 仍高于假手术组。治疗组 bFGF 表达的变化趋势与对照组相似,同一时间点明显高于对照组(表 2,图 3—4,见前置彩色插页 10)。

2.3 FGFR 表达

假手术组脑组织可见到少量 FGFR 阳性细胞,主要位于皮质和纹状体区。对照组缺血再灌注 6h 后 FGFR 阳性细胞数开始增加,1d 达高峰,第 3d 后逐渐减少,至第 14d 时略高于假手术组。治疗组 FGFR 阳性细胞的变化规律与对照组相似,同一时间点相比较均显著高于对照组(表 3,图 5—6,见前置彩色插页 10)。

表2 脑缺血再灌注后bFGF阳性细胞的定量观察 ($\bar{x}\pm s$, 个/视野)

组别	皮质区		纹状体区	
	对照组	治疗组	对照组	治疗组
假手术组	2.13±1.73		2.40±1.68	
再灌注 6h	6.25±2.49 ^①	10.38±4.37 ^{①②}	4.47±1.83 ^①	9.05±2.94 ^{①②}
再灌注 12h	10.75±2.25 ^①	15.50±3.25 ^{①②}	11.25±2.17 ^①	16.25±2.99 ^{①②}
再灌注 1d	15.75±2.18 ^①	20.13±3.56 ^{①②}	16.25±2.52 ^①	20.25±3.40 ^{①②}
再灌注 3d	10.85±3.13 ^①	15.50±3.25 ^{①②}	11.32±2.02 ^①	16.25±3.13 ^{①②}
再灌注 7d	6.88±3.14 ^①	10.50±2.89 ^{①②}	6.73±2.43 ^①	10.71±1.94 ^{①②}
再灌注 14d	4.01±1.71 ^①	8.25±1.26 ^{①②}	4.21±1.82 ^①	8.18±2.14 ^{①②}

①与假手术组比较 $P<0.05$; ②与对照组同一时间点相应脑区比较 $P<0.05$

表3 脑缺血再灌注后FGFR阳性细胞的定量观察 ($\bar{x}\pm s$, 个/视野)

组别	皮质区		纹状体区	
	对照组	治疗组	对照组	治疗组
假手术组	2.75±1.67		2.51±1.54	
再灌注 6h	7.03±1.83 ^①	11.12±2.16 ^{①②}	7.63±1.60 ^①	11.75±2.60 ^{①②}
再灌注 12h	10.25±2.75 ^①	13.75±2.87 ^{①②}	10.95±2.13 ^①	14.50±1.29 ^{①②}
再灌注 1d	13.25±1.78 ^①	16.50±2.98 ^{①②}	14.25±2.63 ^①	18.25±1.71 ^{①②}
再灌注 3d	10.25±2.50 ^①	14.50±2.08 ^{①②}	9.75±2.99 ^①	14.75±1.71 ^{①②}
再灌注 7d	7.25±2.22 ^①	10.12±1.63 ^{①②}	7.07±1.83 ^①	11.50±2.38 ^{①②}
再灌注 14d	5.01±1.41 ^①	7.75±1.71 ^{①②}	5.20±1.33 ^①	7.83±1.85 ^{①②}

①与假手术组比较 $P<0.05$; ②与对照组同一时间点相应脑区比较 $P<0.05$

3 讨论

Spelistes 等^[4]研究发现, MCAO 缺血侧脑区 bFGF 在缺血后 4h 已增高, 24h 增加 4 倍, 第 3d 下降, 第 7—14d 后 bFGF 增高仅局限在脑梗死区; bFGF-IR 表达高峰在缺血后第 3d, 第 7—14d 恢复正常。在梨状皮质, bFGF 和 bFGF-IR 表达仅在缺血第 1d 增高。Iwata 等^[5]则发现, 脑缺血再灌注 6h 后, 梗死皮质周围的 bFGF mRNA 表达非常显著, 第 24—48h 仍持续存在, 至第 5d 消失。Teng 等^[6]在右侧 MCAO 和双侧颈总动脉闭塞再灌注模型中发现, 缺血 60min 缺血皮质周围区 bFGF mRNA 即被诱导, 并逐渐增高, 至再灌注 12—24h 增高 2.5 倍, 然后逐渐下降, 在海马区 bFGF mRNA 水平增高出现在缺血 60min 并一直持续到再灌注 2 周后, 且存在一个不明显的再次增高的过程(72h—4 周), 在 bFGF 表达增高的脑区 bFGF-IR 也是增强的。大鼠全脑缺血早期 bFGF mRNA 表达增强, 24h 达高峰, bFGF 免疫反应(bFGF-1R)无明显变化, bFGF mRNA 在缺血后 7—30d 再次出现表达增强, 同时 bFGF-IR 也急剧增加, bFGFmRNA 与 bFGF-IR 不一致的现象, 可能为缺血早期导致迟发性神经元死亡而出现 bFGFmRNA 翻译障碍, 可减轻神经元的损伤程度。大鼠前脑缺血 20min 后, 海马、皮质及尾壳核等脑区可见 bFGF-IR 增强, 同时这些脑区还出现明显的神经元变性, 提示 bFGF 的表达可能与缺血后的修复有关, bFGF 在损伤组织的自身修复反应方面起重要作用^[7]。本研究显示, 脑缺血再灌注后 6h bFGF、FGFR 的表达即增加, 24h 达高峰, 第 3d 开始下降,

第 14d 表达仍高于正常水平。以上报道均不完全一致, 主要是因为所用动物模型和缺血再灌注的时间以及所观察的部位不同有关, 但总体变化趋势是一致的。

bFGF 广泛存在于中枢及外周神经系统中, 在体内、外对多种神经元有维持生存和促进生长的作用, 并能促进受损神经元的修复和再生。在培养的胎鼠海马神经元中加入 bFGF 可使神经元成活时间增加和轴突延长^[8], bFGF 及其受体 FGFR1 浓度的变化调节着胶质细胞和神经元的生长^[9]。bFGF 对大鼠牵张损伤脊髓的功能恢复有明显的促进作用^[10]。藻蓝蛋白具有促进动物细胞的再生, 清除自由基和抗炎作用^[11]。对海藻氨酸盐和钾诱导损伤的大鼠小脑胶质细胞具有保护作用^[12—13]。本研究表明, 在大鼠脑缺血再灌注后 2h 应用藻蓝蛋白, 缺血皮质和纹状体区凋亡细胞数量较对照组明显减少, bFGF、FGFR 表达显著增强。由此推测, 藻蓝蛋白对神经元的保护作用可能通过以上途径来实现。

参考文献

- [1] Cuevas P, Carceller F, Gimenez GG. Fibroblast growth factor and cerebral edema[J]. *Neurol Res*, 1994, 16(3):181—186.
- [2] Chen HB, Guo YL, Tong ET, et al. Effects of phycocyanin on the expression of Cytochrome C mRNA and Caspase-3 mRNA after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats [J]. *Journal of Shanghai Second Medical University*, 2005, 17(1):26—32.
- [3] 张冬梅, 刘吉东, 陈红兵, 等. 藻蓝蛋白对脑缺血再灌注后 NF- κ B 和 IL-6 表达及神经细胞凋亡的影响 [J]. *中国海洋药物*, 2005, 24(6):6—10.
- [4] Spelistes EK, Caday CG, Do T, et al. Increased expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) following focal cerebral infarction in the rat[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1996, 39(1-2):31—42.
- [5] Iwata A, Masago A, Yamada K, et al. Expression of basic fibroblast growth factor mRNA after transient focal ischemia: comparison with expression of c-fos, c-jun and hsp70 mRNA [J]. *Neurotrauma*, 1997, 14(4):201—210.
- [6] Teng N, Jeannelce, Melody Lee, et al. Induction of basic fibroblast growth factor (bFGF) expression following focal cerebral ischemia[J]. *Brain Res Mol Res*, 1997, 49(2):255—265.
- [7] Martinez G, DiGiacomo C, Sorrenti V, et al. Fibroblast growth factor-2 and transforming growth factor- β immunostaining in rat brain after cerebral postischemic reperfusion [J]. *Neurosci Res*, 2001, 63(2):136—142.
- [8] Aoyagi A, Nishikawa K, Sait H. Characterization of FGF mediated acceleration of aronal bronehiogin cultured rat hippocampal neurons[J]. *Brain Res*, 1999, 661(1):117—123.
- [9] Stachowiak EK, Fang X, Myers J, et al. cAMP-induced differentiation of human neuronal progenitor cells is mediated by nuclear fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR-1)[J]. *Neurochem*, 2003, 84(6):1296—1312.
- [10] 刘雷, 裴福兴, 唐康来, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对牵张性脊髓损伤后神经元凋亡的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2005, 20(1):18—19.
- [11] Bani-Sadr F, Teissiere F, Curie Z, et al. Anti-infection prophylaxis after sexual assault. Experience of the Raymond Poincare-Garches Hospital[J]. *Press Med*, 2001, 30(6):253—258.
- [12] Romay CH, Gonzalen R, Ledon N, et al. C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, antiinflammatory and neuroprotective effects[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2003, 4(3):207—216.
- [13] Rimbau V, Camins A. C-phycocyanin protects cerebellar granule cells from low potassium/serum deprivation-induced apoptosis[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2001, 364(2):96—104.