

· 基础研究 ·

小脑电刺激对大鼠脑缺血早期神经元线粒体的影响

王健 董为伟 何为

【摘要】目的 观察小脑顶核电刺激预处理对大鼠脑缺血早期神经元线粒体的影响。**方法** 40 只 Wistar 大鼠随机分为 5 组, FNS 预置组分别给予小脑顶核刺激(FNS)预处理 1 h, 1 d 及 7 d 后通过线栓法建立大脑中动脉闭塞(MCAO)模型, 3 h 后取缺血侧大脑组织测定含水量, 并通过电镜观察缺血区神经元线粒体, 分析其体密度(V_v)、面密度(S_v)及比表面(S_s), 结果与假 FNS 组比较。同时设立正常对照组。其他大鼠则应用鹅膏氨酸(BO)预先毁损小脑顶核(FN), 5 d 后再予 FNS, 1 d 后行 MCAO。**结果** 与正常对照组比较, 假 FNS 组 MCAO 后 3 h, 缺血侧脑含水量增加, 神经功能评分降低, 神经元线粒体 V_v 及 S_v 增加, 而 S_s 降低, 两组差异有统计学意义($P < 0.05$); 与假 FNS 组比较, 缺血前 1 d 或 7 d 给予 FNS 预置, 脑含水量下降, 神经功能评分增加, 线粒体 V_v 及 S_v 降低, 而 S_s 增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。预先使用 BO 损毁顶核者, FNS 的预置保护效应则被消除。**结论** 预先小脑顶核刺激, 可抑制大鼠脑缺血早期神经元线粒体的肿胀, 改善缺血区组织水肿, 从而减轻神经功能缺损。

【关键词】 顶核; 脑缺血; 线粒体

Effect of preconditioning electrostimulation of fastigial nucleus on neuronal mitochondrion of rat early after cerebral ischemia WANG Jian*, DONG Wei-wei, HE Wei. * Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of preconditioning electrostimulation of fastigial nucleus (FNS) on the neuronal mitochondrion of rats early after cerebral ischemia. **Methods** Forty Wistar rats were used and divided into 5 groups: a normal control group, a sham FNS group and 3 FNS groups. The FNS of the rats in the FNS groups was conducted for 1 hr, 1 day or 7 days, respectively, before the models of middle cerebral artery occlusion (MCAO) were made with them. Three hours after the model was established, the animals were sacrificed and the water content of the brain of the ischemic side was measured. The neuronal mitochondrion was observed by electron microscope, and its V_v , specific volume (S_v) and specific surface (S_s) were analyzed. The rats in the normal control group were not given any special treatment. For the rats in the sham-FNS group, intrinsic neurons of FN were destroyed with ibotenic acid (BO), and 5 days later, the FN was electrically stimulated, and 1 day later, MCAO models were made. **Results** Three hours after MCAO, the water content of the brain increased and neurological function score decreased in the sham-FNS group, while the V_v and S_v of neuronal mitochondrion increased and the S_s decreased, which were significantly different from those of the normal control group ($P < 0.05$). Electrostimulation of the FN for 1 or 7 days before MCAO significantly alleviated the increase of the water content in brain, increased neurological function score, while reduced the V_v and S_v and increased the S_s as compared with the sham-FNS group ($P < 0.05$). Damage of FN abolished the protective effects of the FNS. **Conclusion** Preconditioning FNS can inhibit neuronal mitochondrial swelling and relieve ischemic brain edema early after cerebral ischemia, thereby alleviate neurological function impairment.

【Key words】 Fastigial nucleus; Cerebral ischemia; Mitochondria

脑缺血后, 缺血区组织很快发生水肿, 并不断进展。临床上, 脑水肿是影响脑梗死患者预后甚至导致患者死亡的主要因素。有效阻止脑水肿的发生及发展, 将有助于减轻缺血性脑损伤。目前认为, 超过数分

钟的细胞内水肿是不可逆损伤的标志。尽管膜电位可在短时间内恢复, 但细胞肿胀及 Ca^{2+} 超载将致使大多数细胞死亡^[1,2], 因此, 抑制缺血早期的细胞内水肿是减轻缺血后组织损伤的关键。小脑顶核电刺激 (fastigial nucleus stimulation, FNS) 被认为是一种很强的脑缺血耐受诱导方法。预先 FNS 1 h, 可使随后 10 d 内大鼠大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 所致梗死灶明显缩小^[3]。本研究主要观察预先 FNS 对大鼠脑缺血早期神经元线粒体肿胀的影响,

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (No. 39730170) 及面上项目 (No. 30040013)

作者单位: 400010 重庆, 重庆医科大学附属第二医院神经内科 (王健); 重庆医科大学附属第一医院神经内科 (董为伟); 重庆大学电工技术研究所 (何为)

旨在为临床应用 FNS 防治卒中后脑水肿提供实验依据。

材料与方法

一、动物及分组

健康雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重 250 ~ 300 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。随机分为 5 组,即正常对照组、假 FNS 组、FNS 预置(1 d)组、FNS 预置(7 d)组及预先用鹅膏氨酸(IFO)损毁小脑顶核(FN)后再以 FNS 预置组(IFO-FNS 组),每组各 8 只。正常对照组大鼠不予任何处理。假 FNS 组大鼠 MCAO 前 1 d 予假 FNS 预处理, FNS 预置(1 d/7 d)组大鼠 MCAO 前 1 d 或 7 d 给予 FNS 预处理,而 IFO-FNS 组大鼠预先损毁 FN 后再予 FNS,1 d 后行 MCAO。

二、小脑顶核电刺激及损毁方法

1. 电刺激 FN 方法:参照 Reis 等^[4]的方法建立。大鼠术前 1 d 禁食,自由饮水。用 3.5% 水合氯醛(350 mg/kg 体重)麻醉,电热毯维持动物体温在 37 ~ 38℃。动物俯卧位,固定于大鼠脑立体定向仪。根据大鼠脑立体定位图谱^[5]确定 FN 座标:以前囟为零点,正中中线向后 11.6 mm,旁开 1.0 mm,深 5.7 mm。在左侧颅骨上钻孔,插入同心圆针电极(直径 100 μm),以刺激左侧 FN。用小脑顶核电刺激仪(由重庆大学电气研究所提供)进行刺激,刺激电流为频率 70 Hz、时程 0.5 ms 的方波脉冲,电流强度 80 μA,调节 FN 刺激部位,以刺激时出现血压增高作为刺激成功的标志,持续刺激 1 h。刺激后拔除针电极,缝合头皮。术后将大鼠置于电热毯上恢复,麻醉清醒后回笼。假 FNS 组操作同前,但插入同心圆针电极后不予通电刺激。

2. 损毁 FN 方法:定位同上,用 0.5 μl 微量注射器分别将 0.2 μl (0.063 μg/μl) 鹅膏氨酸(IFO)注入双侧 FN,注射完毕后留针 5 min,缝合皮肤 5 d 后行下一步实验。尼氏染色证实 FN 处神经元被损毁。

三、脑缺血模型建立

采用经颈内动脉线栓法制成大鼠右侧 MCAO 模型。实验鼠经 3.5% 水合氯醛麻醉后,仰卧位固定在手术台上,经颈正中切口,分离和暴露右侧颈总动脉,再向头端分离暴露出颈内、外动脉,并将颈外动脉结扎。在颈总动脉分叉处剪口,将长度 22 mm,直径 0.22 mm 表面涂有聚氨酯清漆的尼龙线用肝素浸泡后,从颈总动脉分叉处送入颈内动脉约 18 ~ 20 mm 时遇到阻力,作为大脑中动脉栓塞成功的标志。术后约 1 h 大鼠苏醒。术后 3 h 按 Zausinger^[6]六分法评定功能及行为缺陷。

四、脑含水量测定

各组大鼠断头后取缺血前脑部分,用电子天平称重,随后将湿组织置于 100℃ 恒温电热烤箱 48 h 烤干,

再称取干重量,计算脑含水量。

$$\text{脑含水量}(\%) = \left(\frac{\text{组织湿重} - \text{组织干重}}{\text{组织湿重}} \right) \times 100\%$$

五、神经元线粒体电镜观察

缺血 3 h 后,用 3.5% 的水合氯醛深麻醉,经预冷的生理盐水及 1.5% 戊二醛(0.2 M PBS 溶解)灌注固定后,开颅取顶叶皮层少许缺血区组织,用锋利刮胡刀片修成 1 mm × 1 mm × 1 mm 组织块约 5 块。置入 4% 戊二醛固定液(pH = 7.4)中固定 2 h,取出后放入 PBS (0.01 M, pH 7.25 ~ 7.35)中,于 4℃ 下反复冲洗 12 h 以上,1% 锇酸后固定约 2 h,丙酮脱水,国产环氧树脂 618 包埋,解剖显微镜下修整,制成半薄切片和超薄切片。3% 柠檬酸铅 + 0.1% 醋酸铀双重电子染色,Opton EM-10 电镜观察。每个组织块观察 2 个铜网,每个铜网随机拍摄含线粒体的神经元胞质区域 2 张,恒定放大 20 000 倍,图像输入计算机,应用北航 CM-2000B 型生物学图像分析系统对线粒体进行分析处理。

分析指标包括线粒体体密度、面密度及比表面。其计算公式:体密度(V_v) = 某结构成分的体积 V_x / 参照系的体积 V_r ;面密度(S_v) = 某结构成分的面积 S_x / 参照系的体积 V_r ;比表面(S_s) = 膜结构的面积 S_x / 膜结构的体积 V_x 。

六、统计学分析

数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、FNS 预处理对大鼠脑缺血后神经功能的影响(图 1)

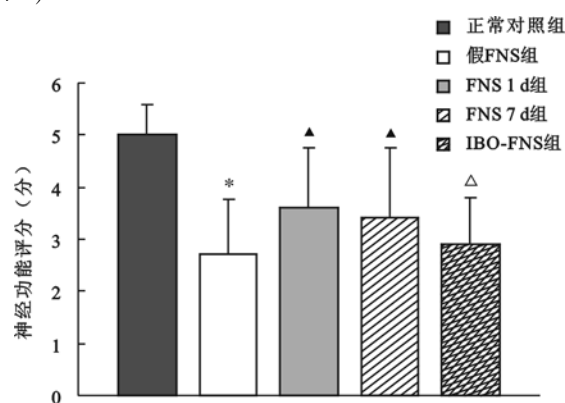


图 1 FNS 预处理对大鼠脑缺血 3 h 后神经功能缺失的影响

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与假 FNS 组比较,▲ $P < 0.05$,△ $P > 0.05$

与正常对照组比较,假 FNS 组大鼠 MCAO 3 h 后神经功能缺失明显,主要表现为左侧前肢固定屈曲内收,拉住鼠尾,可出现向左侧(瘫痪侧)转圈行为,神经功能评分明显降低($P < 0.05$)。缺血前 1 d 及 7 d 分

别予 FNS 预处理,缺血大鼠左侧前肢出现屈曲,但转圈行为不明显,神经功能评分均高于假 FNS 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 FNS 预置能改善缺血后早期神经功能的缺失。而预先毁损 FN 后再以 FNS 预置则对大鼠 MCAO 后神经功能缺失无改善作用。

二、FNS 预处理对大鼠脑缺血后脑含水量的影响(图2)

与正常对照组比较,假 FNS 组 MCAO 3 h 后,缺血区脑组织含水量明显增加($P < 0.05$)。缺血前 1 d 或 7 d 给予 FNS 预处理,则缺血区脑含水量低于假 FNS 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 FNS 预处理可改善缺血后脑水肿。而预先毁损 FN 后再以 FNS 预处理,缺血区脑组织含水量与假 FNS 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

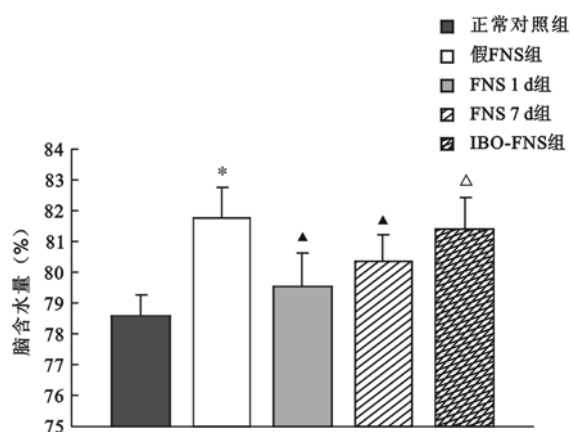


图2 FNS 预处理对大鼠脑缺血 3 h 脑含水量的影响

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与假 FNS 组比较,[▲] $P < 0.05$,[△] $P > 0.05$

三、FNS 对脑缺血早期线粒体病理定量指标的影响

1. 一般超微结构变化:脑缺血后 3 h,与正常对照组比较,假 FNS 组神经元胞浆线粒体肿胀明显,其正常的结构形态消失,可见许多线粒体肿胀空化,而血管周围及神经毡结构则基本正常(图 3~4)。与假 FNS 组比较,预先(1 d 或 7 d)FNS 处理,缺血后的线粒体肿胀程度明显减轻(图 5~6),而预先毁损 FN 后再以 FNS 预置,则线粒体肿胀程度与假 FNS 组类似(图 7)。

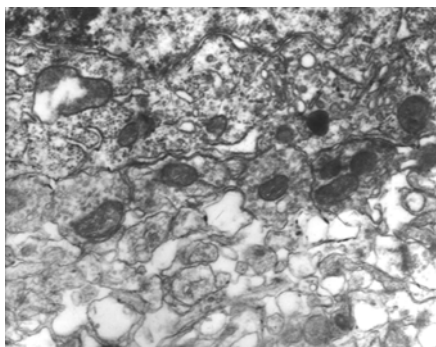


图3 正常对照组的神经元线粒体形态(双重电子染色,×20 000)

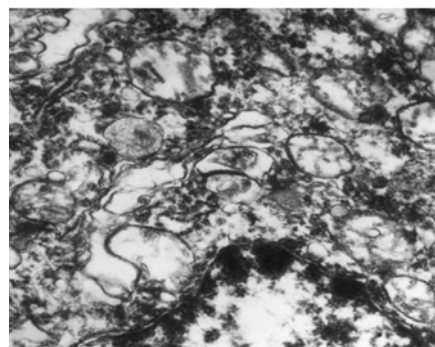


图4 假 FNS 组大部分线粒体肿胀空化(双重电子染色,×20 000)

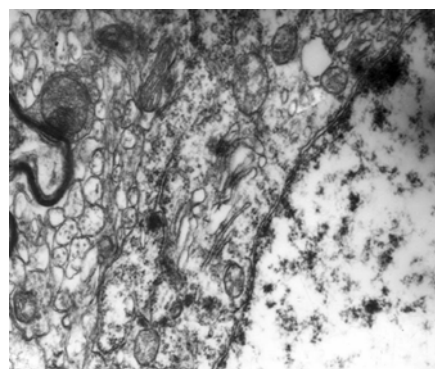


图5 FNS 1 d 组,线粒体肿胀程度较假 FNS 组减轻(双重电子染色,×20 000)

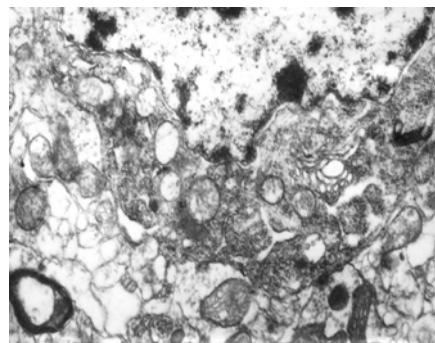


图6 FNS 7 d 组,线粒体肿胀程度较假 FNS 组减轻(双重电子染色,×20 000)

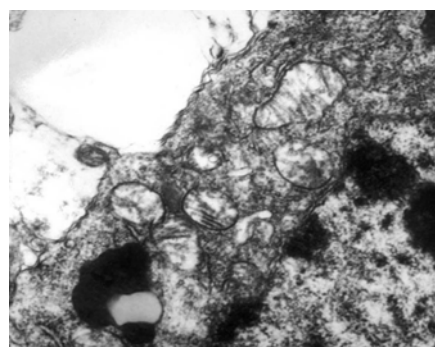


图7 IBO + FNS 组的线粒体肿胀明显(双重电子染色,×20 000)

2. 线粒体的定量病理变化:统计分析结果显示,脑缺血后 3 h,与正常对照组比较,假 FNS 组神经元线粒

体 V_v 和 S_v 明显增加,而 S_s 明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);缺血前 1 d 或 7 d 给予 FNS 预置,缺血早期线粒体的肿胀程度较假 FNS 组明显减轻, V_v 和 S_v 显著降低,而 S_s 显著增高($P < 0.05$);而预先 IBO 损毁 FN 后再予 FNS 预置,则线粒体的上述各指标与假 FNS 组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),提示 FNS 的保护作用通过刺激 FN 得以实现(图 8~10)。

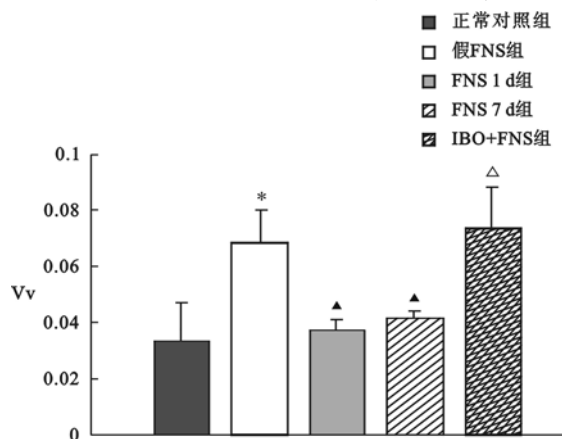


图 8 脑缺血后 3 h 神经元线粒体体密度变化

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与假 FNS 组比较,▲ $P < 0.05$,△ $P > 0.05$

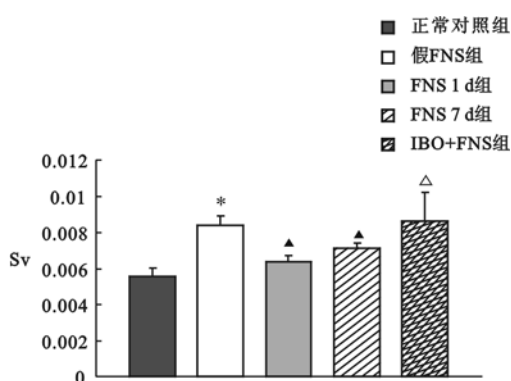


图 9 脑缺血后 3 h 神经元线粒体面密度变化

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与假 FNS 组比较,▲ $P < 0.05$,△ $P > 0.05$

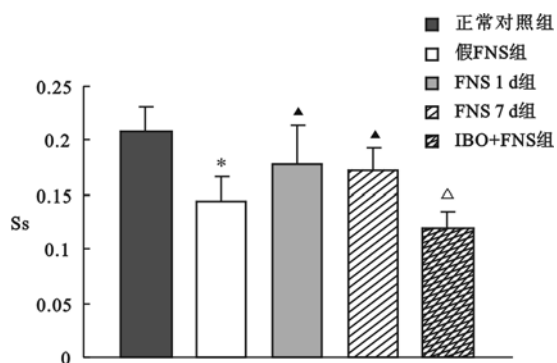


图 10 脑缺血后 3 h 神经元线粒体比表面变化

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与假 FNS 组比较,▲ $P < 0.05$,△ $P > 0.05$

讨 论

本实验通过电镜观察大鼠 MCAO 后早期(3 h)神经元线粒体的肿胀。应用计算机图像分析系统对缺血区神经元线粒体进行形态计量分析,结果发现:大鼠 MCAO 后早期(3 h)缺血区含水量增加,缺血区神经元线粒体肿胀,正常结构形态消失,体密度和面密度增加,比表面减小;而缺血前给予 FNS 处理,可显著抑制脑缺血早期神经元线粒体肿胀,降低缺血区含水量。FNS 预先损毁 FN,则可消除 FNS 的保护效应。实验结果表明,FNS 能抑制缺血早期神经元线粒体肿胀,减轻脑水肿,从而改善缺血所致的神经功能缺失。

线粒体是对缺血、缺氧最敏感的细胞器之一,在细胞死亡或凋亡过程中起关键作用。缺血后,线粒体呼吸链及氧化磷酸化功能受损、ATP 合成减少、胞质 Ca^{2+} 超载、自由基形成、受体介导的死亡信号(Fas、TNF-R)以及凋亡前和抗凋亡 Bcl-2 家族蛋白表达的改变等多种缺血损伤途径,最终将触发线粒体膜通透性跃迁(membrane permeability transition, MPT),而 MPT 可能是缺血神经元死亡的共同分子事件^[7,8]。MPT 的发生使线粒体外膜通透性增加,水和电解质进入线粒体基质,导致基质水肿,线粒体肿胀;伴随内膜去极化,线粒体外腔中蛋白(细胞色素 C、凋亡诱导因子 AIF)等释放,激活 caspase,诱导细胞凋亡^[9,10]。本实验也观察到,脑缺血后早期,神经元线粒体肿胀明显,电镜分析证实线粒体各指标与正常对照组比较,差异有统计学意义。因此,抑制缺血早期细胞线粒体的肿胀,是减轻细胞损伤和组织水肿的关键。

脑缺血早期(3 h)的组织水肿主要为细胞内水肿。本实验发现 FNS 预处理可抑制缺血早期神经元线粒体的肿胀,降低体密度和面密度,增加比表面,抑制缺血区脑含水量的增加。其具体作用机制尚不完全清楚。小脑顶核电刺激是一种典型的条件中枢神经源性神经保护技术,国外及我们的研究均证实,预先电刺激小脑顶核能明显增强脑组织对后续发生的局灶性或全脑性缺血性损伤的耐受程度,并显著缩小梗死体积^[3,11]。

结合文献及本实验结果,我们认为,FNS 对缺血早期神经元的保护可能涉及以下机制:(1)增加缺血半暗带神经元膜电位的稳定性。FNS 已被证实能延长神经元膜上 K^+ -ATP 通道活性,通过超极化电位,降低膜兴奋性,减少突触前兴奋耦联的递质释放,从而减少神经元电活动^[12];同时,FNS 可减少神经元能量消耗,保存脑组织能量,并下调电压依赖性 Na^+ 通道,提高脑对缺血、缺氧的耐受能力。(2)抑制病灶周围去极化波(perinfarction depolarizing waves, PIDs)。PIDs 的反复

出现可使脑缺血半暗带神经元的能量进一步耗竭,缺血性损伤进一步加重^[13]。PIDs 与 K^+ -ATP 通道活性有关,预先 FNS 可延长 K^+ -ATP 通道的开放,也使 PIDs 的产生及传导均受到抑制,减少其数量及频率^[14]。(3)抑制缺血后神经元谷氨酸等兴奋性氨基酸递质的过量释放,抑制 NMDA 受体所介导的兴奋毒性损伤,从而减少 Ca^{2+} 的内流^[15]。

综上所述,小脑顶核受到刺激后,可通过启动自身内源性保护机制,发挥神经保护作用。本实验还发现,预先 FNS 1 h 后,对缺血早期脑水肿抑制效应的时间至少长达 1 周以上,表明 FNS 具有很强的预置保护效应。预先损毁 FN 则可阻断 FNS 的这一效应,进一步证实 FNS 的预置保护作用是通过顶核刺激得以实现。本研究结果为临床应用 FNS 防治卒中后的脑水肿提供了实验依据。

参 考 文 献

- Choi DW. Excitotoxic cell death. J Neurobiol, 1992, 23: 1261-1276.
- Rami A, Volkman T, Agarwal R, et al. Beta2-Adrenergic receptor responsiveness of the calpain-calpastatin system and attenuation of neuronal death in rat hippocampus after transient global ischemia. Neurosci Res, 2003, 47: 373-382.
- Reis DJ, Kobylarz K, Yamamoto S, et al. Brief electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus conditions long-lasting salvage focal cerebral ischemia; conditioned central neurogenic neuroprotection. Brain Res, 1998, 780: 161-165.
- Reis DJ, Golanov EV, Galea E, et al. Central neurogenic neuroprotection: central neural systems that protect the brain from hypoxia and ischemia. Ann N Y Acad Sci, 1997, 835: 168-186.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed,

Orlando Florida: Academic Press, 1998. 66.

- Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, et al. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms. Brain Res, 2000, 863: 94-105.
- Neumar RW. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. Ann Emerg Med, 2000, 36: 483-506.
- Sims NR, Anderson MF. Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke. Neurochem Int, 2002, 40: 511-526.
- Blomgren K, Zhu C, Hallin U, et al. Mitochondria and ischemic reperfusion damage in the adult and in the developing brain. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 304: 551-559.
- Kobayashi T, Kuroda S, Tada M, et al. Calcium-induced mitochondrial swelling and cytochrome c release in the brain: its biochemical characteristics and implication in ischemic neuronal injury. Brain Res, 2003, 960: 62-70.
- Deng ZK, Dong WW. The effect of fastigial nucleus electrical stimulation on the therapeutic window of opportunity for intervention of focal cerebral ischemia. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2003, 83: 1173-1175.
- Golanov EV, Zhou P. Neurogenic neuroprotection. Cell Mol Neurobiol, 2003, 23: 651-663.
- Hartings JA, Rolli ML, Lu XC, et al. Delayed secondary phase of peri-infarct depolarizations after focal cerebral ischemia: relation to infarct growth and neuroprotection. J Neurosci, 2003, 23: 11602-11610.
- Golanov EV, Reis DJ. Neuroprotective electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus attenuates expression of perinfarction depolarizing waves (PIDS) and inhibits cortical spreading depression. Brain Res, 1999, 818: 304-315.
- Glickstein SB, Golanov EV, Reis DJ. Intrinsic neurons of fastigial nucleus mediate neurogenic neuroprotection against excitotoxic and ischemic neuronal injury in rat. J Neurosci, 1999, 19: 4142-4154.

(修回日期: 2004-02-28)

(本文编辑: 熊芝兰)

· 研究简报 ·

恒定磁场抗衰老作用的实验研究

李晓林 李晓梅 陆艳娟 付妍 姚树仁

磁场的生物效应是近年研究探讨的热点之一,随着磁疗技术在临床上的广泛应用,有关磁场对抗生物机体衰老方面的研究也日益增多。我们曾研究过它对生物机体自由基代谢及某些抗氧化酶活性的影响。近年有相关报道进一步证实了磁场具有清除自由基、促进代谢的功能^[1]。脂褐素(lipofuscin)是目前被公认的反映生物衰老的主要指标之一,而自由基对脂褐素的产生具有重要作用。然而,恒定磁场对老龄小白鼠超氧化物歧化酶(SOD)和脂褐素含量变化的影响,至今尚未见有关报道。本研究观察了恒定磁场对老龄小白鼠 SOD 和脂褐素含量

的影响。现报告如下。

材料与方法

一、实验动物

昆明种小白鼠 20 只, 12 月龄, 雌性, 平均体重 52 g。由吉林大学实验动物部提供。随机分为实验组 10 只, 对照组 10 只。

二、磁处理方法

将 5 mm × 3 mm 圆柱形磁片贴在长方形铁箱底部, 箱长 75 cm, 宽 20 cm, 四壁有出气孔, 磁片由哈尔滨磁应用研究所提供, 每片磁感应强度为 200 mT, 由下至上场强逐渐减弱, 梯度为 15 mT/cm, 以上磁场强度采用 CST-11A 型特斯拉计测定。将实验组 10 只小白鼠放入铁箱中进行磁处理, 每日定时曝磁 1 次, 每次 1 h。对照组小白鼠放入同尺寸铁箱中, 底部不贴磁片, 处

作者单位: 130021 长春, 吉林大学基础医学院生物化学与分子生物学实验中心(李晓林、李晓梅、陆艳娟), 解剖科(姚树仁), 物理中心(付妍)