

次声作用后大鼠 CA1 区 GLAST mRNA 表达变化*

全武军¹ 费舟^{1,2} 章翔¹ 张磊¹ 晁晓东¹

摘要 目的: 研究次声作用后大鼠 CA1 区 GLAST(谷氨酸转运蛋白亚型 I)mRNA 表达水平变化及其意义。**方法:** SD 大鼠 80 只随机分为对照组及次声作用 1、7 和 14 次组, 将大鼠暴露于 8Hz 130dB 次声, 2h/次/d, 按上述规定次数在次声压力仓内作用后, 采用原位杂交、实时定量 PCR 法检测 CA1 区的 GLAST mRNA 表达变化情况。**结果:** 与对照组 GLAST mRNA 比较, 8Hz、130dB 的次声作用 1 次后, GLAST mRNA 表达水平即发生了上调, 7 次组显著上调, 14 次组则略有恢复, 但表达水平仍高于对照组。**结论:** 次声脑损伤后, 谷氨酸在细胞外堆积, 产生神经毒性, 可能与谷氨酸转运蛋白下调, 重吸收障碍有关。上调 GLAST 或促进其核酸表达可能对次声脑损伤后脑组织有保护作用。

关键词 次声; 脑损伤; 谷氨酸转运蛋白

中图分类号: R454, R493 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2007)-11-0961-03

Alterations of expressions of GLAST's mRNA in CA1 of rats after infrasonic damage/TONG Wujun, FEI Zhou, ZHANG Xiang, et al.// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(11): 961—963

Abstract Objective: To study the alterations of expressions of GLAST's mRNA in CA1 of rats brain after infrasonic damage so as to probe into the function of GLAST in infrasonic damage. **Method:** Eighty SD rats were randomized into four groups: control group and 1-time, 7-time, 14-time infrasonic damage groups. Rats were exposed to 8Hz 130dB infrasonic damage, as 2h/time/d. Expression of GLAST's mRNA were detected by hybridization in situ method and realtime PCR method. **Result:** Expressions of GLAST's mRNA had a tendency of up-regulation after infrasonic damage. It showed that in 1-time group there was up regulation of GLAST's mRNA compared with that of control group. In 7-time and 14-time group, the up-regulation of GLAST was more severe than that of control group. **Conclusion:** The increase of glutamate produce the neurotoxicity and may be concerned with the down regulation of GLAST after infrasonic brain damage. The down-regulation of GLAST may lead to the disorder of glutamate's reabsorption and result in secondary brain damages. Therefore the up-regulation of GLAST's mRNA may provide protection effect for the brain after infrasonic damage.

Author's address Military Neurosurgery Institute of Chinese PLA, Department of Neurosurgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an, 710032

Key words infrasound; brain damage; GLAST's mRNA

次声是一种频率低于 20Hz 的弹性波。1966 年, 法国学者 Gavreau 首先提出次声的性质及其生物学效应问题。其作用的基本原理是直接引起机体组织及脏器的共振, 产生一系列的生物学效应。在次声引起的各脏器结构与功能损伤中, 中枢神经系统的损伤最为明显, 较早地出现功能障碍^[1]。谷氨酸是中枢神经系统广泛存在、含量最高的氨基酸, 对大脑皮质具有广泛而强烈的兴奋作用, 是脑内最具代表性的兴奋性神经递质之一, 它与神经元的发育和死亡, 突触的传递和可塑性及一些神经疾病的发生密切相关^[2-4]。颅脑损伤后, 细胞外谷氨酸蓄积, 可引起神经细胞的多种急、慢性病理损害。目前认为, 细胞外没有使谷氨酸代谢失活的酶, 而使谷氨酸在神经系统灭活的唯一途径是通过神经细胞的再摄取和吸收, 其中起主要作用的是谷氨酸转运蛋白^[5-6]。因此, 谷氨酸转运蛋白的表达变化在神经元损伤机制中起

着重要作用。本实验拟研究次声作用后谷氨酸转运蛋白亚型 I GLAST mRNA 表达变化规律, 探讨其在次声脑损害中的作用, 为次声脑损伤机制及寻求相应的保护手段提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

成年雄性 SD 大鼠 80 只, 体质量(180±15)g, 由第四军医大学实验动物中心提供 [许可证号: SCXK

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370364)

1 解放军第四军医大学西京医院神经外科, 全军神经外科研究所, 西安市长乐西路, 710032

2 通讯作者: 费舟(第四军医大学西京医院神经外科, 全军神经外科研究所, 西安市 710032)

作者简介: 全武军, 男, 硕士, 主治医师

收稿日期: 2007-05-29

(军)2002-005]。次声模型采用第四军医大学与航天工业部 41 所共同研制的次声压力仓制备。实验用 GLAST 引物及 Oligo(DT)引物由上海生工合成。Taq 酶购自 TaKaRa 公司,TRzol 试剂、凝胶回收试剂盒购自 SIGMA 公司,TOPO TA Cloning 试剂盒、SuperScript II 反转录酶购自 Invitrogen 公司,质粒回收试剂盒购自 QIAGEN 公司,DNA 纯化回收试剂盒购自天根生物制品公司,地高辛标记 NTP 及抗体、T7、SP6 酶购自罗氏公司。实时定量 PCR 仪为美国伯乐公司生产。

1.2 方法

1.2.1 实验模型的制备:将动物随机分为正常对照组、次声作用 1、7 及 14 次共 4 组,每组 20 只,其中原位杂交、实时定量 PCR 各 10 只。实验用 8Hz、130dB 的次声,除对照组每日按规定次数在次声压力仓内滞留 2h 而无次声作用外,其余各组按上述规定次数每日在次声压力仓内全身作用 2h。各组动物在次声作用后 1h 内进行脑组织标本取材。

1.2.2 原位杂交法:RNA 探针的制备:取正常大鼠脑海马组织,匀浆抽提总 RNA。用 GLAST mRNA 特异引物:5' TCCTGCCTCTCCTCTACTTC 3' 5' GTCCAAAATTCAGGTCAAAAG 3' 经过反转录、质粒回收、酶切线性化、DNA 纯化回收、体外转录等步骤合成地高辛标记的反义及正义 RNA 探针备用。原位杂交:试验动物用 1%戊巴比妥钠(40mg·kg⁻¹)腹腔麻醉,用 DEPC 处理 0.01mol·L⁻¹ 的 PBS 和 4%多聚甲醛 400ml 进行心室灌注固定,取脑组织后经 4%多聚甲醛后固定 12h,30%DEPC 处理的蔗糖溶液脱水至沉底,海马 CA1 部位冰冻切片,片厚 25μm。挑取脑片用 DEPC-PBS 和 DEPC-5xSSC 液清洗。配制杂交液。将脑片放入杂交液中 55℃预杂交 1h 后加入反义 RNA 探针(终浓度为 0.5μg·ml⁻¹) 55℃进行杂交 20h。用正义探针做阴性对照。冲洗脑片,用 RNA 酶 A 消化未结合的探针,漂洗后,将脑片放入抗体稀释液,按 1:2000 比例加入地高辛抗体,室温下孵育 18h。

用 NBT/BCIP 进行呈色,根据显色情况适时终止反应,漂洗后裱片、干燥、透明、封片。用 Scion Image 图像分析系统进行灰度分析。

1.2.3 实时定量 PCR 法:取各实验组动物海马组织,匀浆后提取总 RNA,反转录合成 cDNA 并以其为模板,用 GLAST 特异引物、Taq 酶、SYBR Green I 进行定量 PCR 反应。用 10 倍稀释的质粒为模板进行 PCR,制作标准曲线,根据样品 Ct 值和标准曲线对样品起始模板 cDNA 进行相对定量分析,以反映 GLAST mRNA 表达变化趋势。采用 β-actin 作内参。

1.3 统计学分析

各组数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用多个样本均数比较的方差分析及多重比较的 LSD-*t* 检验进行统计学分析。*P*<0.05 认为差异具有显著性意义。

2 结果

原位杂交脑片中 GLAST mRNA 阳性信号位于星形胶质细胞和颗粒细胞胞浆,为蓝紫色颗粒状沉淀,阳性信号呈局灶或弥漫状分布,正义探针未出现阳性信号(图 1,见后置彩色插页 2)。用 Scion Image 图像分析系统测定各组大鼠 CA1 区 GLASTmRNA 阳性信号的平均灰度值(平均灰度值的范围为:0—255,灰度值越小,mRNA 表达越高)。实时定量 PCR 采用相对定量法,根据 Ct 值与起始模板量对数值的反比线性关系,通过已知浓度标准品的标准曲线,确定未知样品的起始浓度(表 1)。两种检测方法所得到的 GLAST mRNA 表达变化趋势一致(图 2—3),即与对照组 GLAST mRNA 比较,8Hz、130dB 的次声作用 1 次后,GLAST mRNA 表达

表 1 大鼠 CA1 区 GLAST mRNA 表达变化原位杂交和实时定量 PCR 结果 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	灰度分析	定量结果
对照组	10	154±5.3	142.5±0.81
1 次组	10	136±5.9 ^①	176.8±1.43 ^①
7 次组	10	98.3±6.5 ^②	254.6±0.94 ^②
14 次组	10	118.3±6.4 ^①	182.4±1.24 ^①

与对照组相比:①*P*<0.05;②*P*<0.01



图 2 质粒标准曲线及样品扩增曲线及溶解曲线

A 为 GLAST 质粒标准曲线,斜率-0.315,相关系数 0.998,B 为 β-actin 质粒制作标准曲线,斜率-0.298 相关系数 0.993

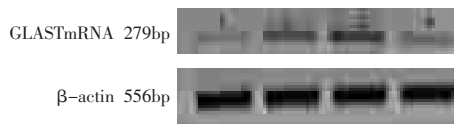


图3 GLAST和 β -actin RT-PCR电泳结果

1—4分别为对照组、1次、7次、14次组

水平即发生了上调,7次组显著上调,14次组则略有恢复,但表达水平仍高于对照组。

3 讨论

次声广泛存在于自然界和人工环境中,具有传播距离远、不易察觉和难于防护等特点,越来越受到环境保护、职业卫生和军事医学研究领域的关注。机体脏器如中枢神经系统的固有频率为8—12Hz,在次声作用下可发生共振效应,可造成一系列形态和功能改变。以往研究表明,次声作用后可造成细胞超微结构的改变,如神经元胞核形态不规则,核膜变形,染色质边集,核固缩,胞浆中有大量微丝形成,细胞器数目明显减少,线粒体肿胀,嵴断裂、减少、消失、空泡样变^[7-8]。谷氨酸作为哺乳类动物中枢神经系统中最重要的兴奋性递质之一,正常情况下,大部分存在于细胞内,仅少量存在于细胞间隙,胞膜两侧浓度差可达数千倍^[9]。这种较高的浓度差有赖于谷氨酸转运蛋白来维持。病理情况下,谷氨酸转运蛋白数量或活性下降,可造成细胞外谷氨酸蓄积过多,产生神经毒性作用。GLAST为重要的谷氨酸转运体亚型,在中枢神经系统中分布广泛,主要在神经胶质细胞中表达,其在谷氨酸摄取过程中起着重要作用^[10-11],有文献报道,GLAST突变小鼠中枢神经系统对谷氨酸摄取功能明显减弱并对损伤刺激的敏感性增强^[12]。

对谷氨酸转运体GLAST的研究,以往多为蛋白水平的检测,用原位杂交和实时定量PCR方法对核酸水平进行检测的报道很少。本结果显示,与对照组比较,在次声作用1次后,GLAST mRNA即发生上调,连续作用7次后,其表达明显上调,14次后略有恢复。其原因可能是脑组织在次声损伤后,出现细胞结构损害、能量代谢障碍、氧自由基增多等改变,引起谷氨酸转运蛋白活性下降,细胞外谷氨酸蓄积过多。在损伤刺激下,胶质细胞GLAST mRNA表达增多,以增加谷氨酸转运蛋白的数量,促进对谷氨酸

的清除能力,防止发生进一步的神经毒性损伤。随着损伤刺激时程的增加,14次组GLAST mRNA表达下降趋势,可能与细胞受损严重、能量供应不足及机体适应等因素有关。本结果显示,谷氨酸转运蛋白GLAST在细胞损伤中发挥着重要作用,若在脑组织发生损伤后及时上调GLAST和加强其mRNA表达,可能会对脑组织有保护作用。

参考文献

- [1] 陈景藻. 次声的产生及生物效应. 医药卫生科学技术进展[M]. 北京: 军事医学科学出版社,1997.194—197.
- [2] 李爱林, 只达石, 黄惠玲. 谷氨酸的兴奋性毒性与脑创伤[J]. 国外医学·神经病学神经外科学分册, 2005, 32(3):231—234.
- [3] Banner SJ, Fray AE, INCE PG. The expression of the glutamate re -uptake transporter excitatory amino acid transporter1 in the normal human CNS and in motor neurone disease[J]. Neuroscience, 2002, 109(1): 27—44,.
- [4] Suarez I, Bodega G, Fernandez B. Modulation of glutamate transporters glast, glt -1 and eaac1 in the rat cerebellum following portocaval anastomosis [J]. Brain Research, 2000,859: 293—302.
- [5] Northington FJ, Traystman RJ, Koehler RC. Regional and cellular expression of glial and neuronal glutamate transporter proteins in ovine fetal brain [J]. Neuroscience, 1998, 85 (4): 1183—1194.
- [6] 黄月明, 侯水宏. 谷氨酸转运蛋白与神经系统疾病 [J]. 国外医学·神经病学与神经外科学分册, 2002,29(6):547—550.
- [7] 费舟, 章翔. 次声作用后鼠脑超微结构和血脑屏障改变 [J]. 中华物理医学与康复杂志,1999,21(3):134—135.
- [8] Fei Zhou, Zhang Xiang, Lu Peiling, et al. The changes and significance of cerebral ultrastructure and the expression of heat shock protein 70 in cortex after infrasonic damage [J]. J Low Freq Noise Vib, 2000, 19(2):93—99.
- [9] Ottersen OP, Zhang N. Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum [J]. Neuroscience, 1992,46(3):519—534
- [10] Berger UV, Hediger MA. Comparative analysis of glutamate transporter expression in rat brain using differential double in situ hybridization[J]. Anat. Embryol, 1998, 13—30.
- [11] Fei Zhou, Zhang Xiang, Li Shuhe, et al. The changes and significance of TXA2 and PGI2 metabolism after rat infrasonic brain damage[J]. J Low Freq Noise Vib, 2001,20(1):33—37.
- [12] Watase K, Hashimoto K. Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice [J]. Eur J Neurosci,1998, 10:976—988.