

不同环境对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质 GFAP、GAP-43 表达的影响*

李 阔¹ 高俊淑² 李 娜² 贾子善^{1,3}

摘要 目的:观察不同环境对局灶性脑梗死大鼠胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和生长相关蛋白-43(GAP-43)表达的影响。**方法:**SD 大鼠 95 只,采用电凝法造成右侧大脑中动脉阻断(MCAO)模型后,随机分为独居组(n=20)、社交组(n=30)、探索学习组(n=20)、丰富环境组(n=20)、假手术对照组(n=5)。于不同时点分批处死大鼠,用免疫组化染色观察梗死灶周围皮质 GFAP 和 GAP-43 阳性细胞数。**结果:**梗死灶周围皮质 GFAP 和 GAP-43 阳性细胞数第 1d 时即增多,1—4 周时探索学习组和丰富环境组阳性细胞数目明显多于独居组和社交组;社交组 1—4 周时 GFAP 阳性细胞数多于独居组,1—2 周时 GAP-43 阳性细胞数多于独居组;第 4 周时 GFAP 阳性细胞数,丰富环境组高于探索学习组。**结论:**丰富环境、探索学习及社会交往均能促进梗死灶周围皮质 GFAP 和 GAP-43 表达。

关键词 丰富环境;探索学习;脑梗死;大鼠;胶质纤维酸性蛋白;生长相关蛋白-43

中图分类号: R743.3,R49 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2007)-07-0581-03

Effects of different environmental intervention on GFAP and GAP-43 expression in rats after unilateral local cerebral infarction/LI Kuo,GAO Junshu,LI Na,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2007, 22(7):581—583

Abstract Objective: To observe effects of different environmental intervention on GFAP and GAP-43 expression in rats after unilateral local cerebral infarction. **Method:** After making the model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) by electric coagulation successfully, 95 male rats were randomly divided into individual living group(n=20), social communication group(n=30), learning group(n=20), enriched environment group(n=20) and sham operated group(n=5). The rats were randomly sacrificed at different time points. The expression of GFAP and GAP-43 in peri-ischemic cortex were examined by immunohistochemistry staining. **Result:** The number of GFAP labeled cells and GAP-43 labeled cells in peri-ischemia cortex in enriched environment group and learning group were higher than that in other two groups ($P<0.01$ or $P<0.05$), it was also higher in social communication group than that in individual living group ($P<0.01$ or $P<0.05$). **Conclusion:** Enriched environment, learning and social communication could enhance GFAP and GAP-43 expression in rats after unilateral local cerebral infarction.

Author's address Rehabilitation Center, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang, 050051

Key words enriched environment; learning; cerebral infarction; rat; glial fibrillary acidic protein; growth associated protein-43

目前认为脑卒中后的功能恢复与脑的可塑性有关,胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)与生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)均是可塑性相关分子^[1]。有证据表明丰富环境可促进脑梗死大鼠的行为学恢复^[2],但其对 GFAP 与 GAP-43 表达的影响尚不清楚。本文拟观察不同环境对 GFAP 与 GAP-43 表达的影响,探讨环境影响功能恢复的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 95 只,3—4 月龄,体重 230—260g,购自华中科技大学同济医学院实验动物学部。将动物随机分为 MCAO 模型组 90 只,假手术

对照组 5 只。

1.2 制备 MCAO 模型及分组

模型制备方法同于文献[11]。术后 24h 随机分为独居组 20 只,社交组 30 只,探索学习组 20 只和丰富环境组 20 只。假手术对照组,不电凝 MCA,其余步骤与手术组相同。

1.3 造模后饲养环境

假手术对照组:饲养于标准笼,每笼 5 只。独居

* 基金项目:河北省卫生厅资助课题(03025)

1 河北省人民医院康复中心,石家庄,050051

2 河北省人民医院神经二科

3 通讯作者:贾子善(河北省人民医院康复中心,050051)

作者简介:李阔,男,在读硕士研究生

收稿日期:2007-04-02

组:饲养于标准笼,一鼠一笼。社交交往组:饲养于标准笼,每笼 5 只。探索学习组:15 只大鼠饲养于由一个圆笼和一个方笼组成的迷宫笼^[1]。直径 500mm 圆笼同 640mm×480mm×120mm 方笼中间通过两通道相连(圆笼:中间由丝网分隔,一侧为进食区,一侧为饮水区;方笼:由丝网分隔形成通道宽 80mm×80mm 的迷宫,迷宫由易到难,每周变换一次)。

丰富环境组^[2,4]:饲养于大小为 815mm×610mm×450mm 的丰富环境笼^[1]。在笼子边高 150mm 处沿两侧各放一 70mm 宽木板,两块木板通过 25mm 宽的平衡木连接;一侧通过楼梯连接笼底;另一侧通过滑梯连接笼底,并在高 220mm 处沿一角放一斜板。铁链和秋千悬于笼中;各种小木块以及各种小的玩具每周更换 1 次。同时给予声音及光照刺激。

1.4 标本的制备

社交组于造模后 1 天、3 天各取 5 只,假手术对照组于造模后 1 周时取 5 只,其他各实验组分别于造模后 1 周、2 周、3 周、4 周各组随机取 5 只,用 10% 水合氯醛腹腔内注射麻醉后固定于手术台,剪开胸腔,暴露心脏,用 9# 针头插入左心室,灌注生理盐水,待右心耳膨起,剪开右心耳让血液流出,至右心耳流出液为无色透明时开始用 4% 多聚甲醛灌注固定,先快后慢,每只大鼠约需 200ml,总量在 20—30min 内灌完后立即剖颅取脑在视交叉处切开后浸于 4% 多聚甲醛中再固定 4h。经常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,做 5μm 厚连续切片备染。

1.5 免疫组化染色

石蜡切片常规脱蜡至水。充分水洗后将切片浸入 0.01M 枸橼酸盐缓冲液(pH6.0),电炉加热至沸腾后断电,间隔 5min 后,反复 1 次,冷却后 0.1M PBS 洗涤 2 次进行抗原热修复;滴加正常山羊血清封闭液,室温 20min,甩去多余液体,不洗;滴加稀释一抗(GFAP 为 1:300,GAP-43 为 1:150;购自武汉博士德),4℃过夜;PBS 洗 3 次,滴加生物素化二抗(1:200),37℃ 20min;PBS 洗 3 次;滴加 SABC,37℃ 20min,PBS 洗 4 次;DAB 显色,蒸馏水洗涤、脱水、透明、中性树胶封片。PBS 代替一抗做阴性对照。

1.6 图像处理

每只大鼠选取 3 张切片,每张切片选取 3 个高倍视野,用 CMIAS8 真彩色病理图像分析系统(中国航天航空大学图像分析中心)进行分析,统计梗死灶周围皮质 GFAP、GAP-43 阳性细胞数。

1.7 统计学分析

各组数据以均数±标准差表示,数据处理采用 SPSS12.0 统计分析软件统计分析,组间比较采用单

因素方差分析。

2 结果

2.1 梗死灶周围皮质 GFAP 表达的时程变化

GFAP 的阳性表达定位于星形胶质细胞胞浆和突起,呈棕色。假手术对照组大鼠可见星形胶质细胞呈静止型,仅在皮质可见少量 GFAP 阳性细胞散在分布(17.27±3.28),表现为胞体小,突起细,数量少;而 MCAO 各组大鼠梗死灶周围可见星形胶质细胞呈反应型,表现为 GFAP 阳性细胞数量明显增多,细胞体积增大,突起多而粗大,且 GFAP 阳性反应加深。

缺血后 1 天 GFAP 阳性细胞数目增多(23.07±4.08),胞体增大,纤维增粗,部分反应性星形胶质细胞出现少量空泡。3 天时阳性细胞数继续增多(33.80±3.05),到 1 周时各组阳性细胞表达均达高峰,呈现胞体明显增大,突起增粗增长,阳性细胞成簇分布。然后各组均出现表达下降的趋势,但丰富环境组和探索学习组下降趋势较缓。1—4 周时探索学习组和丰富环境组阳性细胞数目明显多于独居组和社交组($P<0.01$ 或 $P<0.05$),社交组多于独居组($P<0.01$ 或 $P<0.05$),第 4 周时丰富环境组表达明显高于探索学习组($P<0.01$)(见表 1)。

表 1 各组梗死灶周围皮质 GFAP 阳性细胞数比较

(x±s, ×400)				
组别	1 周	2 周	3 周	4 周
独居组	35.53±5.73	32.73±3.51	29.73±4.35	27.00±2.33
社交交往组	41.27±3.95 ^②	36.53±6.83 ^①	34.27±5.51 ^②	29.87±4.41 ^①
探索学习组	44.87±3.83 ^{②③}	44.20±4.71 ^{②④}	41.40±3.09 ^{②④}	35.73±2.63 ^{②④}
丰富环境组	45.13±3.60 ^{②③}	44.47±3.09 ^{②④}	43.67±4.40 ^{②④}	39.93±2.40 ^{②④⑤}

与同独居组比较:① $P<0.05$,② $P<0.01$;与同社交交往组比较:③ $P<0.05$,④ $P<0.01$;与同探索学习组比较:⑤ $P<0.01$ 。

2.2 梗死灶周围皮质 GAP-43 表达的时程变化

假手术组皮质可见部分 GAP-43 阳性神经元(11.40±2.29),其胞体周边和主树突内呈淡棕色的 GAP-43 染色。MCAO 后 1 天梗死灶周围皮质 GAP-43 阳性神经元开始增多(17.27±3.28),3 天时达(19.33±3.92),除独居组外,余各组在 2 周时达高峰,且染色明显加深。除独居组术后第 1 周时同假手术组比较差异无显著性意义($P=0.115$),各手术组其他各时间点同假手术组比较差异均有显著性意义。各组之间比较,丰富环境组和探索学习组各时间点 GAP-43 表达均明显优于其他组($P<0.01$);社交交往组术后第 7—14 天时明显优于独居组($P<0.01$);虽然丰富环境组阳性神经元稍高于探索学习组,但两组比较差异无显著性意义(见表 2)。

表 2 各组梗死灶周围皮质 GAP-43 阳性

组别	细胞数比较 (x±s, ×400)			
	1 周	2 周	3 周	4 周
独居组	13.27±2.89	15.40±2.61	22.60±5.19	16.73±3.58
社会交往组	23.00±3.02 ^①	34.67±4.12 ^①	24.93±3.79	18.13±4.09
探索学习组	31.20±3.14 ^{①②}	38.87±4.72 ^{①②}	28.60±2.61 ^{①②}	23.27±2.71 ^{①②}
丰富环境组	43.40±3.46 ^{①②}	53.20±5.72 ^{①②}	34.27±3.08 ^{①②}	25.13±3.46 ^{①②}

①同独居组比较 $P<0.01$; ②同社交组比较 $P<0.01$ 。

3 讨论

星形胶质细胞是中枢神经系统的主要支持部分,它具有广泛分布的突起,构成神经组织的网架。正常生理条件下,它对神经元起到营养、支持、保护作用,并积极参与神经元的电生理活动。

缺血性脑损伤后星形胶质细胞活化数量增多,由常态转变为反应态,其标志蛋白 GFAP 表达增加,通过星形胶质细胞膜上 5-羟色胺等受体以及形成或分泌的神经生长因子等活性物质,来稳定缺血组织的形态学完整性,从而有利于减轻脑损伤、促进修复^[9]。本实验发现在标准笼中饲养的脑梗死大鼠梗死灶周围皮质胶质纤维酸性蛋白阳性细胞增多,同以往的研究结果一致。在损害因素的作用下星形胶质细胞发生显著的肥大和增生性改变,与由于病灶区白细胞、单核巨噬细胞的浸润,小胶质细胞的激活,脑水肿的形成和大量神经元死亡,尤其是神经元的死亡释放大量的谷氨酸和钾离子有关。星形胶质细胞的数量增加被认为是由于损害因素诱导远离区域的星形胶质细胞随增生的血管迁移到病灶区,以及诱导胶质前体细胞分化形成星形胶质细胞所致^[6]。

脑损伤后期星形胶质细胞的反应与神经轴突的再生有关^[7],细胞培养的研究也证实了星形胶质细胞对轴突生长具有促进作用^[8],但此作用有赖于淋巴细胞和巨噬细胞的参与及营养因子的表达。星形胶质细胞也可影响突触可塑性,发挥其对神经信息的调节作用,有研究提示星形胶质细胞的变化特异性与学习记忆过程有关^[10]。本实验中 GFAP 阳性细胞数,丰富环境组>探索学习组>社交组>独居组;GAP-43 阳性细胞数也呈相似的改变。GAP-43 广泛存在于神经组织中,特别是在生长、分化及再生的轴突末端含量极高,对神经纤维生长、发育、再生以及突触功

能维持和递质释放都起着重要作用^[10]。在局灶性脑缺血时,GAP-43 蛋白质持续性表达,并且与大鼠的行为学恢复密切相关。故本文研究结果提示星形胶质细胞增生可促进 GAP-43 表达,从而有利于神经轴突的再生和新突触形成,这可能是丰富环境、探索学习和社会交往促进脑梗死后功能恢复的机制之一。不同环境因素对 GFAP 和 GAP-43 表达的影响不同,可能与其对脑的刺激不同有关,确切机制有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Johansson BB. Brain plasticity and stroke rehabilitation [J]. Stroke, 2000,31(1): 223—239.
- [2] Biernaskie J, Corbett D. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury [J]. J Neurosci, 2001, 21: 5272—80.
- [3] Bederson JB, Pitlis LH, Tsun M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986,17(3): 472—476.
- [4] Johansson BB, Belichenko PV. Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22: 89—96.
- [5] Nawashiro H, Brenner M, Fukui S, et al. High susceptibility to cerebral ischemia in GFAP-null mice [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000,20:1040.
- [6] 雷万龙,袁群芳,姚志彬.局灶脑缺血区星形胶质细胞可塑性变化的研究[J].神经解剖学杂志,2000,16(2):123—126.
- [7] Dusart I, Marty S, Peschanski M. Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS. II. Astrocytes [J]. Neuroscience, 1991,45:541—554.
- [8] Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, et al. S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke [J]. Stroke, 1998,29:730—737.
- [9] 寇盛斌,吕来清,潘三强. 大鼠在学习记忆时内侧隔核星形胶质细胞 GFAP 表达的变化[J]. 解剖学研究, 2004, 26(4): 245—246.
- [10] Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity [J]. Trends Neurosci, 1997, 20(2): 84—91.
- [11] 贾子善,李阔,槐雅萍,等.不同环境干预对局灶性脑梗死大鼠行为学恢复的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(7):578—580.