

·基础研究·

神经节苷脂对实验性颅脑外伤大鼠的保护作用及机制*

金 玲¹ 黄民江¹ 李洪亮¹ 江兴林^{1,2} 曹湘玉¹

摘要

目的:通过观察神经节苷脂(GM1)对实验性颅脑外伤大鼠大脑海马区神经巢蛋白(nestin)、神经生长因子(NGF)表达的影响,探讨GM1促进脑神经修复的可能机制。

方法:选择出生7d雄性SD大鼠180只,随机分为三组:空白组(假手术组)60只,无颅脑外伤;对照组60只(颅脑外伤,腹腔注射生理盐水);实验组60只(颅脑外伤,腹腔注射GM1)。分别在术后第0、2、4、8、12、16、24小时不同时间点利用免疫组化方法检测大鼠大脑海马区 nestin、NGF 表达情况和整个实验过程中颅脑外伤动物模型造模情况。

结果:①实验组颅脑外伤造模后自然死亡率10%,明显低于对照组的25%($P < 0.05$);②实验组大鼠大脑海马区的 nestin 第0—24小时表达与对照组比较无显著差异($P > 0.05$),实验组和对照组大鼠大脑海马区的 nestin 第0—24小时表达明显高于空白组,差异有显著性($P < 0.05$);③实验组大鼠大脑海马区 NGF 的表达均明显高于对照组和空白组,差异有非常显著性($P < 0.01$),另外实验组大鼠海马区 NGF 的表达随着时间的增加而调低,至第24小时接近空白组水平但仍高于对照组水平。

结论:预防性地使用GM1不仅可使颅脑外伤模型大鼠大脑海马区NGF表达明显增高,同时能降低颅脑外伤造模大鼠的死亡率,这可能是通过GM1提高实验性颅脑外伤大鼠的NGF表达并延长表达时间来实现的。

关键词 颅脑外伤;神经节苷脂;巢蛋白;神经生长因子;大鼠

中图分类号:R651.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2013)-12-1142-04

The protection effect of ganglion monoglyceride on experimental craniocerebral trauma rats and its mechanism/JIN Ling, HUANG Minjiang, LI Hongliang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(12): 1142—1145

Abstract

Objective: To observe the effect of ganglion monoglyceride (GM1) on experimental craniocerebral trauma rats' hippocampus nestin and nerve growth factor (NGF) expressions, and to explore the possible mechanisms of GM1 promoting nerve repairing.

Method: Of birth 7 days 180 male SD rats were randomly divided into three groups. Blank group (sham group) 60, no craniocerebral trauma. Craniocerebral trauma model 120, were divided into control group 60 (intraperitoneal injection of saline), the experimental group 60 (intraperitoneal injection of GM1). Respectively, at the postoperation at the 0h, 2nd h, 4th h, 8th h, 12th h, 16th h, 24th h different time points rat hippocampus nestin, as well as NGF expressions and the whole experimental process of rats craniocerebral trauma modeling were detected by immunohistochemistry.

Result: ①In experimental group after craniocerebral trauma modeling the rats' natural mortality was 10%, it was significantly lower than the rate 25% in control group ($P < 0.05$). ②In experimental rats' hippocampus ex-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.12.013

*基金项目:湖南省科技厅科技计划项目(2009FJ3200);湖南省中医药管理局科研计划项目(2012124)

1 怀化医学高等专科学校,湖南怀化,418000; 2 通讯作者

作者简介:金玲,女,副教授; 收稿日期:2013-08-02

pressions of nestin at the 0—24h compared with that in control group had no significant difference ($P > 0.05$). But the expressions of nestin at the 0—24h in experimental and control rats hippocampus were significantly higher than that in blank group, there were significant differences ($P < 0.05$). ③Experimental rats' hippocampus had significant higher expression of NGF than that in control and blank group ($P < 0.01$); In the hippocampus of experimental group expression of NGF down-regulated with the time lengthening and at the 24h closed to the level of blank group but was still higher than the level of control group.

Conclusion: GM1 could not only significantly increased craniocerebral trauma rats' hippocampus NGF expression, while reduced mortality of model rats which may be achieved by GM1 increased and extended the expression of NGF of experimental rats.

Author's address Huaihua Medical College, Hunan Province, 418000

Key word craniocerebral trauma; ganglion monoglyceride; nestin; nerve growth factor; rat

颅脑损伤为临床多见,是目前一种高发病、高致残、高死亡的创伤性疾病,其死亡率可高达26%—50%^[1]。本实验采用新生大鼠颅脑外伤模型,观察应用神经节苷脂(ganglion monoglyceride, GM1)后各时相点颅脑外伤大鼠海马区神经细胞神经巢蛋白(nestin)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)表达的变化,了解药物治疗对海马神经细胞的保护作用,初步探讨药物干预对脑损伤大鼠受损神经功能修复的可能机制,为临床应用药物治疗颅脑外伤提供可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物的选择和准备

选取出生7天的健康雄性、体重180—270g的SD大鼠180只。随机分为A、B、C三组,每组60只。给药方式:A组(空白组)、C组(对照组)均按20ml/kg腹腔注射生理盐水,术前连续注射3d,每日1次;B组(实验组)给予浓度为2mg/ml的神经节苷脂(GM1,商品名“申捷”)注射液按20ml/kg腹腔注射,时间同上。

1.2 动物手术与颅脑外伤模型的建立

采用特制的造模打击装置,按高燕等^[2]关于大鼠颅脑外伤模型的制作方法建立动物模型。大鼠造模前禁食8h,实验时将大鼠俯卧位固定于脑立体定向仪上,消毒皮肤,按0.35g/kg以10%水合氯醛腹腔内注射进行麻醉,正中切开头皮后剥离骨膜,充分暴露右顶骨,用牙科钻在冠状缝后1.5mm、中线旁2.5mm处钻一直径5mm的骨窗,并保持硬膜完整。

空白组:不施加砝码撞击即封闭,仅做手术,未

致颅脑外伤。对照组、实验组:用20g砝码于30cm高处坠落,撞击撞杆从而撞击硬膜,致右顶叶中度脑挫裂伤,撞击硬膜后封闭。术后苏醒带回到母鼠处喂养,并确定颅脑外伤模型的建立。至不同时间点进行nestin、NGF检测,并在整个实验过程中观察大鼠的自然死亡情况。

1.3 动物大脑标本取材

手术缝合后,各时间点(第0、2、4、8、12、16、24h)一到,分别在各组大鼠中各提出6只大鼠,以颈动脉取血后处死大鼠,然后取海马组织。取海马组织的方法:断头取脑并切下正中隆起处下丘脑,剪断前联合,切除小脑和脑干,沿大脑矢状裂将大脑半球纵行切开,剥离枕叶内侧丘脑及项叶额叶内侧纹状体,暴露边缘系统,用小药匙轻轻剥离双侧海马组织,放入冻存管,经液氮速冻后,于-80℃保存。所有的标本处理好后,分别称取各份标本2g,加入pH 7.4的PBS 2ml,将标本充分研成匀浆,2000pr/min离心20min,收集上清液,分装后,一份待测,其余冷冻备用。

1.4 神经巢蛋白和神经生长因子检测

采用芬兰352型酶标分析仪,芬兰AC8型洗板机,按NGF酶联免疫分析试剂盒、nestin酶联免疫分析试剂盒(购自北京永辉生物科技有限公司)操作使用说明进行两个因子的测量。即通过包被、加样、加酶标抗体、加底物液显色、终止反应,在酶标仪上于450nm波长处,以空白管调零测定吸光度(OD值)。

1.5 统计学分析

数据用SPSS 16.0软件处理,计量资料采用 t 检验和方差分析,计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 实验组与对照组手术后死亡率的比较

两组手术后建立了颅脑外伤模型,观察研究全程中,实验组60只自然死亡6只,死亡率为10%;对照组60只自然死亡15只,死亡率25%,实验组死亡率明显低于对照组,有显著性差异($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠不同时间点大脑海马区 nestin 表达的测定

实验组大鼠大脑海马区的 nestin 0—24h 表达与对照组比较无显著差异($P > 0.05$)。实验组和对

照组大鼠大脑海马区的 nestin 0—24h 表达明显高于空白组,有显著性差异($P < 0.05$)。见表1。

2.3 各组大鼠不同时间点大脑海马区 NGF 表达的测定

实验组大鼠大脑海马区 NGF 的表达第0—24小时均明显高于对照组,有非常显著性差异($P < 0.01$);第0—16小时明显高于空白组,有显著性差异($P < 0.01$)。另外看出,实验组大鼠大脑海马区 NGF 的表达随着时间的增加而调低,至第24小时降至空白组水平但仍高于对照组水平。见表2。

表1 各组大鼠不同时间大脑海马区 Nestin 表达的变化 (x±s)

组别	例数	第0小时	第2小时	第4小时	第8小时	第12小时	第16小时	第24小时
空白组	6	103.25±5.47	113.20±6.45	106.58±6.23	121.80±7.45	101.24±2.19	105.75±2.35	101.76±3.66
对照组	6	137.30±7.99 ^①	133.38±4.34 ^①	140.23±2.96 ^①	144.40±5.14 ^①	128.66±3.89 ^①	129.28±6.57 ^①	128.46±6.62 ^①
实验组	6	130.74±7.27 ^①	134.75±6.06 ^①	138.67±6.38 ^①	142.75±7.89 ^①	137.72±5.97 ^①	133.26±4.11 ^①	128.54±2.19 ^①

①与空白组比较 $P < 0.05$

表2 各组大鼠不同时间大脑海马区 NGF 表达的变化 (x±s)

组别	例数	第0小时	第2小时	第4小时	第8小时	第12小时	第16小时	第24小时
空白组	6	194.45±11.54	195.58±23.83	237.01±54.09	199.02±98.36	193.95±73.12	208.54±20.46	224.64±35.59
对照组	6	213.88±15.51	250.75±52.21	322.12±52.97	184.65±22.70	203.67±17.12	196.96±16.27	171.84±19.85
实验组	6	378.58±14.57 ^{①②}	350.90±14.09 ^{①②}	323.16±17.03 ^{①②}	295.02±27.63 ^{①②}	274.62±36.28 ^{①②}	272.13±58.94 ^{①②}	223.63±52.58 ^①

①与对照组比较 $P < 0.01$;②与空白组比较 $P < 0.01$

3 讨论

GM1 是一种促进中枢神经系统损伤后修复的药物,是重要的内源性神经营养因子前体增强剂,可以增强神经营养因子活性,具有促进神经生长、恢复神经功能等作用^[3],其具体作用机制还需进一步探索。nestin 是中枢神经系统一种独特的中间丝蛋白^[4],出生后表达很快降低并消失,仅在少数保持神经发生功能的部位有表达。nestin 是反映中枢神经系统损伤最早、快速应答的敏感标志物之一^[5-6],如缺血性脑损伤早期 Nestin 即可在损伤最严重的区域表达最明显,并且可诱导中枢神经系统细胞的原位增殖和神经细胞的再生^[7]。NGF 是最早发现的神经营养因子之一,神经系统中最重要生物活性物质之一,NGF 具有神经元营养和促突起生长双重生物学功能,对神经元的损伤修复和功能恢复有调控作用^[8]。

我们在动物手术与颅脑外伤模型制作中,对实验组与对照组动物造模打击后均于切口内滴注80万U青霉素1ml(用0.9%生理盐水5ml稀释80万U青霉素,平均16万U青霉素/ml),然后骨蜡封闭骨

窗,缝合头皮,从而有效防止颅脑外伤造模术后模型动物的感染致死。空白组不施加打击,仅开颅窗后用骨蜡封闭。但从实验全程看,不论实验组或对照组,都有模型动物的死亡,分析其原因,可能与以下两个方面相关:①本实验在8月份进行,因鼠源紧张,我们购买了30余只180g左右出生7d的SD大鼠,体重相对偏轻,可能体质也偏弱,对打击的耐受性偏低,造模后易出现死亡;②因8月份天气炎热,我们刚开始造模时是保持颅脑外伤模型动物术后在32℃环境中,待苏醒后再带回到母鼠处喂养。当发现造模后模型动物有死亡情况后,将颅脑外伤模型动物术后室温调至37℃,情况好转,这说明颅脑外伤模型动物手术后也只有在37℃的模拟人体恒温条件下才利于存活。而对照组手术后模型动物的死亡率明显高于实验组,有显著性差异($P < 0.05$),这与实验组术前3d连续注射GM1密切相关,GM1既可增强造模时大鼠神经营养因子活性,又可减轻造模时大鼠神经细胞变性、坏死和凋亡,提高脑损伤大鼠造模的成功率。

由本实验结果观察到,实验组和对照组大鼠大脑海马区的nestin表达明显高于空白组,有显著性差异($P < 0.05$),提示外力打击致机械性脑损伤,诱导了神经细胞出现特异性及一过性地表达nestin蛋白^[9],这种nestin表达具有一定的时序性,这与屈建强等^[10]的研究结果基本一致。而实验组大鼠大脑海马区的nestin表达与对照组比较差异无显著性($P > 0.05$),提示造模前保护性用药GM1虽然降低了脑损伤程度,增加了造模的成功率,但GM1对颅脑外伤大鼠大脑海马区的nestin表达似乎无特殊作用。

根据我们的实验结果发现,保护性给药GM1后,实验组大鼠大脑海马区NGF的表达明显高于对照组和空白组,有非常显著性差异($P < 0.01$);同时实验组大鼠大脑海马区NGF的表达随着时间的增加而缓慢调低,至第24小时接近空白组水平但仍高于对照组水平。这提示使用GM1可以提高实验性颅脑外伤大鼠的NGF表达并延长表达时间。这可能是GM1降低了颅脑外伤造模大鼠的死亡率,增加造模成功率的关键原因所在。

参考文献

- [1] 邓磊,钱锁开.颅脑外伤患者预后相关因素分析[J].现代诊断与治疗,2010,21(30):134—136.
- [2] 高燕,孙骏漠,田志雄,等.大鼠自由落体脑外伤模型的制作[J].浙江创伤外科,2004,5(9):283—285.
- [3] 张卿,左萍萍.神经节苷脂GM1神经保护机制的研究进展[J].中国药理学通报,2004,40(4):27.
- [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, 1999, 145(3):503—514.
- [5] Gozal D, Row BW, Gozal E, et al. Temporal aspects of spatial task performance during intermittent hypoxia in the rat: evidence for neurogenesis[J]. Eur J Neurosci, 2003, 18(8):2335—2342.
- [6] Korzhevskii DE, Lentsman MV, Giliarov AV, et al. Ischemic damage-induced nestin synthesis in the rat brain cells[J]. Morfologiya, 2007, 131(1):23—26.
- [7] He Z, Cui L, Meschia JF, et al. Hippocampal progenitor cells express nestin following cerebral ischemia in rats[J]. Neuroreport, 2005, 16(14):1541—1544.
- [8] Chernousov MA, Carey DJ. Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors[J]. Histo Histopathol, 2000, 15(2):593—601.
- [9] Shi M, Wei LC, Cao R, et al. Enhancement of nestin protein-immunoreactivity induced by ionizing radiation in the forebrain ependymal regions of rats[J]. Neurosci Res, 2002, 44(4):475—481.
- [10] 屈建强,贺西京,杨平林,等.成年大鼠液压冲击脑损伤诱导室下区Nestin和GFAP的表达[J].西安交通大学学报(医学版),2004,25(5):436.
- [11] Elmantaser M, McMillan M, Smith K, et al. A comparison of the effect of two types of vibration exercise on the endocrine and musculoskeletal system[J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2012, 12(3):144—154.
- [12] Song GE, Kim K, Lee DJ, et al. Whole body vibration effects on body composition in the postmenopausal Korean obese women: pilot study[J]. Korean J Fam Med, 2011, 32(7):399—405.
- [13] Stolzenberg N, Belavy DL, Rawer R, et al. Whole-body vibration versus proprioceptive training on postural control in post-menopausal osteopenic women[J]. Gait Posture, 2013, 1(2):[Epub ahead of print].
- [14] Zadry HR, Dawal SZ, Taha Z. The relation between upper limb muscle and brain activity in two precision levels of repetitive light tasks[J]. Int J Occup Saf Ergon, 2011, 17(4):373—384.
- [15] Wakeling JM, Nigg BM. Modification of soft tissue vibrations in the leg by muscular activity[J]. J Appl Physiol, 2001, 90(2):412—420.
- [16] 许光旭,顾绍钦,孟殿怀,等.生物谐振规律对步行效率影响的前驱研究[J].中国康复医学杂志,2008,23(12):1092—1094.

(上接第1096页)

- bration training improves flexibility, strength profile of knee flexors, and hamstrings-to-quadriceps strength ratio in females[J]. J Sci Med Sport, 2012, (12):1097—1099.
- [6] 杜广宇,赵文志,何盛为,等.低频振动刺激骨髓基质干细胞修复骨缺损核因子受体激活剂/核因子受体激活剂配体/骨保护素通路变化的体内实验[J].中国组织工程研究,2012,16(10):1725—1728.
- [7] Pioreschi A, Oosthuysen T, Avidon I, et al. Whole body vibration increases hip bone mineral density in road cyclists[J]. Int J Sports Med, 2012, 33(8):593—599.
- [8] Lam TP, Ng BK, Cheung LW, et al. Effect of whole body vibration (WBV) therapy on bone density and bone quality in osteopenic girls with adolescent idiopathic scoliosis: a randomized, controlled trial[J]. Osteoporos Int, 2013, 24(5):1623—1636.
- [9] Bogaerts A, Verschueren S, Delecluse C, et al. Effects of whole body vibration training on postural control in older individuals: a 1 year randomized controlled trial[J]. Gait Posture, 2007, 26(2):309—316.
- [10] Lythgo N, Eser P, De Groot P, et al. Whole-body vibration dosage alters leg blood flow[J]. Clin Physiol Funct Imaging, 2009, 29(1):53—59.