

·基础研究·

低声压级次声对脑缺血再灌注大鼠的突触素和微管相关蛋白表达的影响

何任红¹ 范建中^{1,2} 李德洁¹

摘要

目的:探讨低声压级次声对脑缺血再灌注损伤大鼠治疗后梗死灶周围组织的突触素(SYN)和微管相关蛋白(MAP-2)表达的影响。

方法:线栓法制作脑缺血再灌注模型,18只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、次声组,每组6只。假手术组大鼠大脑中动脉没有栓塞且不进行次声干预,模型组大鼠造模后不行次声干预,次声组大鼠造模成功12h后连续次声干预7d,每天2h。在第8天对大鼠用改良神经功能损害评分法(mNSS)进行神经功能评分,然后心脏灌注取脑、固定、切片进行免疫组化检测SYN和MAP-2。

结果:次声组的大鼠神经功能mNSS评分比模型组明显降低,次声组梗死灶周围组织SYN的累计光密度(IOD)比模型组显著增高($P < 0.01$);次声组梗死灶周围组织MAP-2的染色比模型组强($P < 0.01$)。

结论:低声压级次声能促进脑缺血再灌注大鼠功能恢复的机制之一可能是促进了梗死灶周围组织内的SYN和MAP-2的表达,提高了神经元的可塑性。

关键词 次声;脑缺血再灌注;突触素;微管相关蛋白2

中图分类号:R743.3, R454.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2015)-01-0010-04

Effects of infrasound of low sound-pressure on the expressions of synapsin and microtubule associated protein-2 in cerebral ischemia-reperfusion rats/HE Renhong, FAN Jianzhong, LI Dejie//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(1):10—13

Abstract

Objective: To explore effects of infrasound of low sound pressure on the expressions of synapsin I (SYN) and microtubule associated protein-2 (MAP-2) in cerebral ischemia-reperfusion rats.

Method: Rats of infrasound group (n=6) and model group (n=6) were conducted middle cerebral artery occlusion by thread embolism; the sham (n=6) group hadn't embolism and wasn't treated with infrasound. Rats in infrasound group were treated with infrasound for two hours per day. The neural function scores of each group were scored by using modified neurological severity scores(mNSS) at the 8th day. Then, the rats were executed and brain tissue slices were stained to observe the expression of SYN and MAP-2 around the ischemic sites by immunohistochemical technique.

Result: The mNSS score of infrasound group was higher than that of model group ($P < 0.05$). The expression of SYN in infrasound group was significantly higher than that in model group ($P < 0.01$). The expression intensity of MAP-2 in infrasound group was stronger than that in model group($P < 0.01$).

Conclusion: One of the mechanisms in response to the therapeutic effects of infrasound of low sound-pressure on cerebral ischemia-reperfusion rats may be the improvement of expressions of SYN and MAP-2.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, 510515

Key word infrasound; cerebral ischemia-reperfusion; synapsin; microtubule associated protein-2

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.01.003

1 南方医科大学南方医院康复医学科,广州,510515;2 通讯作者

作者简介:何任红,男,技师;收稿日期:2014-03-27

脑卒中高发病率和高致残率越来越受到学者的关注,如何降低脑卒中患者的致残率改善患者运动功能是当下研究的一个热门领域。物理因子在临床上对治疗脑卒中有重要作用,除了传统的物理因子在临床上得到普遍的应用,越来越多的新的物理因子也逐渐进入临床。次声是指人耳听不见的声波,一般是指频率低于20Hz机械振动波^[1]。有报道称低声压级次声可通过轻柔的共振作用,改善局部循环,增加细胞活力,从而对生物体产生有利作用^[2]。本实验将通过研究低声压级次声对脑缺血再灌注损伤大鼠可塑性影响的相关机制,为将来次声在研究和临床中的应用提供相关理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物:健康SPF级SD大鼠18只,体重230—270g,南方医科大学实验动物中心提供,室温、安静环境、常湿饲养,普通饲料,自由饮水。质量合格证号:SCXK(粤)-2011-0015。

1.1.2 试剂和仪器:次声治疗仪Infrasound 8TM由美国CHI公司研制;日产Olympus光学显微镜;Olympus数码相机;突触素(synapsin, SYN)一抗(Bio-word,美国),微管相关蛋白(microtubule associated protein 2, MAP-2)一抗(Bioword,美国);二抗(山羊抗兔,EnVision, DAKO);Olympus DP controller拍照系统(日本Olympus);image-pro plus 6.0图像处理系统(USA Media Cybernetics)等。

Infrasound 8TM次声治疗仪主要有次声声头和主机两部分组成,输出档位为1,2,3。本实验采用3档处理。经第四军医大学“便携式低频信号实时测试智能分析系统”测试显示,该治疗仪3档位输出次声频率主要是4—20Hz,声强主要是79.75—86.11dB^[3]。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及入组标准:18只SD大鼠随机分成假手术组、模型组、次声组三组。纳入及排除标准:造模2h后按Zeal Longa^[4]5分制评分标准评分:0分,无神经损伤症状;1分,不能伸展对侧前爪;2分,向外侧划圈;3分,向对侧倾倒;4分,不能自发行走,意识丧失;5分以上视为成功。对造模成功大鼠进

行随机入模型组和假手术组,如未出肢体瘫痪(0分)或已死亡的动物被剔除,采用差额补充的方法以保证每组各6只大鼠。

1.2.2 局灶型脑缺血再灌注模型制作:参考Longa^[4]报道的线栓法,线栓采用直径为0.24—0.26mm、长度为4.0cm的尼龙鱼线。以10%水合氯醛(0.45ml/100g)腹腔注射麻醉后,仰卧位固定。手术器械无菌消毒后,分离并暴露右侧颈总动脉及颈内外动脉,线栓由颈外动脉插入颈内动脉,插入大脑中动脉时稍遇阻力,即可停止,进线长度约18mm,2h后拔出线栓实现缺血再灌注,缝合手术切口,手术过程中维持大鼠恒温,安静环境下饲养。假手术组:不插入尼龙线栓塞动脉,余过程同模型组。

1.2.3 各组处理方法:次声组和模型组大鼠制作脑缺血再灌注模型,次声组在脑缺血再灌注12h后每天次声干预2h连续7d,模型组和假手术组在干预过程中次声治疗仪不开机,其余过程同次声组;在各组大鼠干预7d后参照改良神经功能损害评分法(modified neurological severity scores, mNSS)^[5]行神经行为学评分。

1.2.4 标本制作:各组大鼠在第8天用10%水合氯醛麻醉(0.45ml/100g体重),用16号针头穿刺入左心室至主动脉起始部,眼科剪剪开右心耳,先用200ml生理盐水快速冲洗体内血液,然后用4%多聚甲醛250ml进行灌注固定、断头取脑,在视交叉前后1—3mm之间取脑片,然后4%多聚甲醛固定6—8h。进行常规脱水、透明、石蜡包埋,冠状切片,片厚5μm,备用。

1.2.5 免疫组化:切片进行常规透明,梯度酒精脱蜡,采用高压热修复,将切片置于柠檬酸缓冲液(pH=6.0)高压锅煮沸3—5min,3%过氧化氢封闭10min后加入一抗,4℃孵育过夜,复温后加入二抗(EnVision抗兔, DAKO),孵育30min,加入DAB显色,常规脱水透明封片。阴性对照用PBS缓冲液代替一抗,其余步骤相同。

1.2.6 图像采集与分析:一个标本取一张切片,在同亮度、像素、曝光、对比度等条件下采用日本Olympus光学显微镜及Olympus DP controller拍照系统用10×40放大倍数。在脑缺血周围随机取6个视野,用image-pro plus 6.0图像处理系统(USA

Media Cybernetics)计算每一个视野的累积光密度值(integrated optical density, IOD)最后取平均值。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计学软件进行分析,各组数据以均数±标准差表示,神经功能评分采用独立样本 t 检验,各组IOD值采用多样本方差分析。

2 结果

2.1 神经行为学评分

此神经行为学评分与文献^[16]具有同源性,结果显示次声组大鼠行为学评分小于模型组差异,有显著性意义($P<0.05$),表明次声能提高脑缺血大鼠的运动功能,具体数据可参见文献^[16]。

2.2 SYN免疫组化结果

结果显示次声组梗死灶周围组织表达的SYN

比模型组和假手术组高且有显著性差异($P<0.01$),其中次声组表达的SYN高于模型组($P<0.01$),模型组与假手术组相比同样存在显著差异($P<0.01$)。见表1,图1。

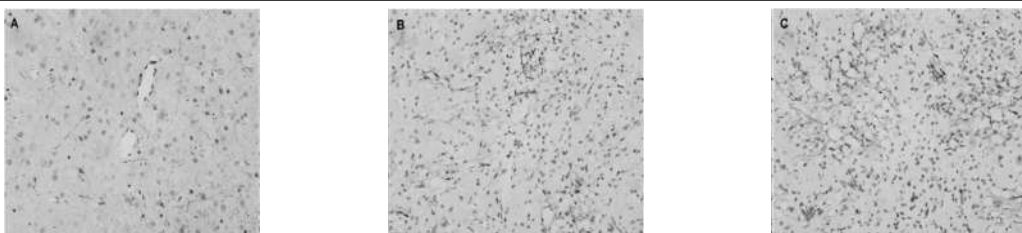
2.3 MAP-2免疫组化结果

由于在次声组和模型组表达量大且差异明显,故我们没有进行一个图像软件的专业处理。从MAP-2染色结果来看,我们可以观察到从次声组依次到模型组、假手术组MAP-2的表达差异明显($P<0.01$),次声组高于模型组($P<0.01$),次声组和模型组表达的MAP-2均比假手术组高($P<0.01$)。见表1,图2。

表1 各组SYN、MAP-2的累积光密度 ($\bar{x}\pm s$)

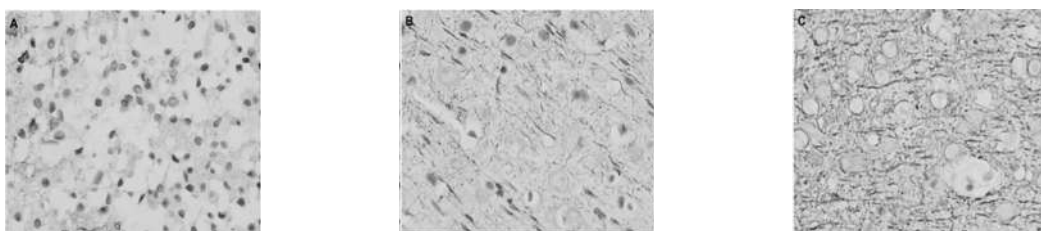
组别	SYN	MAP-2
次声组	27774.14±1885.88	74788.81±6512.33
模型组	17032.87±2388.16	31346.76±2935.91
假手术组	4900.03±341.66	10427.64±1030.57

图1 各组梗死灶周围组织SYN的表达



注:A为假手术组;B为模型组;C为次声组

图2 各组梗死灶周围组织MAP-2的表达



注:A为假手术组;B为模型组;C为次声组

3 讨论

神经元的可塑性是神经康复学的基础,关于神经可塑性的研究也越来越热门。大脑损伤后神经可塑性提高可以改善学习、记忆和运动功能^[6],神经可塑性的结构基础包括SYN和MAP-2。突触是神经元及突起之间神经冲动传导的结构基础,在研究突触过程中发现SYN存在于突触结构中。SYN是一种相对分子质量为 38×10^3 的 Ca^{2+} 结合糖蛋白,分布

于神经元突触小泡和某些内分泌细胞;SYN作为突触小泡的特异性标志蛋白,它的密度和分布可间接反映体内突触的数量和分布情况^[7]。国内学者研究发现,跑台训练和神经生长因子促进脑缺血后功能恢复的一个重要机制是提高了SYN的表达^[8-9],国外学者研究同样发现,运动训练在提高运动功能的同时SYN的表达也提高了^[10]。MAP-2是细胞骨架蛋白的重要组成成分,属于结构性微管相关蛋白家

族,可作为神经元的标志蛋白,在脑损伤的恢复过程中起着重要的作用^[11]。有研究表明,脑缺血后电刺激治疗在提高运动功能同时MAP-2表达增多,神经元树突可塑性增高^[12]。

有学者研究发现,8Hz、130dB的次声能损伤心肌^[2]和引起海马组织细胞内Ca²⁺堆积^[13],从而对机体产生损害。根据我们长期对低声压级次声的研究,我们发现低声压级次声似乎存在不同的作用。低声压级次声是指声压在90dB以下的次声,我们曾应用次声治疗Infrasound 8™产生的低声压级次声作用于脑缺血再灌注损伤大鼠,结果证实了低声压级次声在每天作用2h、连续7d,可明显改善神经症状,缩小梗死面积,并通过刺激IGF-1分泌同时梗死灶周围星形胶质细胞增多,从而起到脑保护作用^[14-15]。在细胞学上,我们证明了次声能提高骨髓间充质干细胞增殖抑制其凋亡,同时验证了次声对骨髓间充质干细胞存在的这种生物学效应与存活素的表达上提有关^[16-17]。本实验进一步探讨低声压级次声对脑缺血再灌注大鼠梗死灶周围脑组织可塑性的影响。

本结果发现,次声组大鼠行为学评分明显比模型组低,表明次声能明显改善脑缺血后大鼠的运动功能。同时,次声组大鼠表达的SYN和MAP-2比模型组也明显增多,说明次声能增加脑缺血后神经元的可塑性促进梗死灶周围组织的功能恢复。我们通过比较模型组与假手术组大鼠表达SYN和MAP-2的情况,结果显示模型组的SYN和MAP-2表达强度均比假手术组的高,说明脑缺血后大鼠存在自然恢复过程,模型组大鼠在恢复过程中梗死灶周围组织的神经元可塑性增强,此结果与国外学者研究的结果一致^[18]。

本研究发现,低声压级次声可改善脑缺血再灌注损伤大鼠的运动功能,同时次声可提高SYN和MAP-2在梗死灶周围组织的表达。初步认为低声压级次声对脑缺血的治疗作用机制之一为提高梗死灶周围组织的可塑性,由于前期研究证明次声干预7d可以对脑缺血大鼠达到最大的治疗效果,故本实验只研究了次声干预7d的时间。SYN和MAP-2在脑缺血恢复过程中,会随着时间的推移有一个动态的变化过程,我们对此变化没有进行研究,故本实验存在一定的局限性需要下一步的相关实验研究。

参考文献

- [1] Leventhall G. What is infrasound?[J]. Prog Biophys Mol Biol, 2007, 93(1—3):130—137.
- [2] Pei Z, Sang H, Li R, et al. Infrasound-induced hemodynamics, ultrastructure, and molecular changes in the rat myocardium[J]. Environ Toxicol, 2007, 22(2):169—175.
- [3] 范建中,鲍勇,易南,等.治疗用次声发生装置的声场特征研究[J].中华物理医学与康复杂志,2007,29(3):213—214.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84—91.
- [5] Chen JL, Yi L, Lei W, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 2001, 32(4):1005—1011.
- [6] Hummel FC, Cohen LG. Drivers of brain plasticity[J]. Curr Opin Neurol, 2005, 18(6):667—674.
- [7] 樊敬峰,吕佩源.突触可塑性相关物质及其在脑缺血后的变化[J].国外医学·脑血管疾病分册,2004,12(5):371—374.
- [8] 刘罡,吴毅,胡永善,等.跑台训练对脑缺血大鼠脑组织超微结构及突触素表达的影响[J].中国康复医学杂志,2008,10(23):872—874.
- [9] 贾杰,胡永善,吴毅,等.神经生长因子对大鼠缺血性脑损伤急性期的疗效研究[J].神经损伤与功能重建,2011,6(1):1—5.
- [10] Pagnussat AS, Simao F, Anastacio JR, et al. Effects of skilled and unskilled training on functional recovery and brain plasticity after focal ischemia in adult rats[J]. Brain Res, 2012, (1486):53—61.
- [11] Dehmelt L, Halpain S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins[J]. Genome Biol, 2005, 6(1):204.
- [12] Adkins-Muir DL, Jones TA. Cortical electrical stimulation combined with rehabilitative training: enhanced functional recovery and dendritic plasticity following focal cortical ischemia in rats[J]. Neurol Res, 2003, 25(8):780—788.
- [13] Liu ZH, Chen JZ, Ye L, et al. Effects of infrasound at 8 Hz 90 dB/130 dB on NMDAR1 expression and changes in intracellular calcium concentration in the hippocampus of rats[J]. Mol Med Rep, 2010, 3(6):917—921.
- [14] 李川,范建中,吴红瑛,等.低声压级次声对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响[J].中国康复医学杂志,2009,24(5):419—422.
- [15] 李德洁,范建中,吴红瑛,等.低声压级次声对大鼠脑缺血再灌注后胶质纤维酸性蛋白表达的影响[J].中国康复理论与实践,2013,19(2):124—128.
- [16] 毕迎力,陈银海,范建中.次声对骨髓间充质干细胞声场情况的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2012,34(3):166—170.
- [17] 何任红,范建中,吴红瑛,等.次声对大鼠骨髓间充质干细胞分泌存活素能力影响的研究[J].中国康复医学杂志,2013,28(7):600—603.
- [18] Huh JW, Raghupathi R, Laurer HL, et al. Transient loss of microtubule-associated protein 2 immunoreactivity after moderate brain injury in mice[J]. J Neurotrauma, 2003, 20(10):975—984.