·基础研究·

胶质纤维酸性蛋白及生长相关蛋白-43在低声压次声治疗颅脑外伤大鼠过程中的变化*

黎玉婷[1] 单守勤[2] 何任红[1] 陈楚键[1] 范建中[1,3]

摘要

目的:探讨低声压级次声对大鼠颅脑外伤后胶质纤维蛋白(GFAP)及生长相关蛋白-43(GAP-43)表达的影响。

方法:采用Feeney法制作颅脑外伤模型。将30只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、次声60min组、次声90min组和次声120min组共5组,其中次声3组分别予次声干预60min、90min和120min,连续7天;模型组干预过程中除不开机外,其余过程同次声组。假手术组只打开颅窗,不损伤脑组织,不进行次声干预。7天后处死前行改良神经功能缺损评分(mNSS),然后断头取脑、免疫组化观察损伤脑组织周围GFAP及GAP-43表达变化。

结果:次声3组与模型组的mNSS评分均存在显著差异($P<0.05$),次声3组间的mNSS评分无显著差异($P>0.05$)。免疫组化结果:①5组间的GFAP表达存在显著性差异($P<0.05$),3个次声组与模型组比较均存在显著差异($P<0.05$),3个次声组间GFAP表达无明显差异($P>0.05$);②5组间的GAP-43表达存在显著性差异($P<0.05$),3个次声组与模型组比较均存在显著差异($P<0.05$),3个次声组间GAP-43表达无明显差异($P>0.05$)。

结论:低声压级次声能提高大鼠脑外伤后脑组织GFAP及GAP-43的表达,改善脑外伤大鼠神经功能。

关键词 次声;脑外伤;胶质纤维酸性蛋白;生长相关蛋白-43

中图分类号:R651.1, R454.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2015)-04-0313-05

The dynamic expression of glial fibzillary acidic protein and growth associated protein-43 in rats with traumatic brain injury after being treated by infrasound/LI Yuting, SHAN Shouqin, HE Renhong, et al.// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(4): 313—317

Abstract

Objective: To explore the effect of infrasound on expressions of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and growth associated protein-43(GAP-43) after traumatic brain injury(TBI) in rats.

Method: The model was constructed using the modified Feeney's free falling weight TBI model. Thirty male adult SD rats were randomly divided into sham group (n=6), model group (n=6), 60min infrasound group (n=6), 90min infrasound group (n=6) and 120min infrasound group (n=6). The infrasound group were individually treated with infrasound for 30min, 90min and 120min after operation for 7 days. The model group was treated in the same way except turning off the power. The sham group was not hurted, no intervention. Rats were evaluated with the modified neurological severity score (mNSS) after 7 days, and the brain tissue slices were immunohistochemically stained to observe the expressions of GFAP and GAP-43 around the injury areas.

Result: The mNSS score were different between infrasound groups and model group ($P<0.05$). There was no difference among the infrasound groups ($P>0.05$). Immunohistochemical results: ①The integral optical density (IOD) of GFAP was significantly different among the 5 groups ($P<0.05$); there were significant differences among the infrasound groups and the model group ($P<0.05$); there was no significant difference within the in-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.04.001

*基金项目:全军"十二五"重点课题(BWS11J003)

1 广州南方医科大学南方医院康复理疗科,广州,510515; 2 济南军区青岛第一疗养院; 3 通讯作者

作者简介:黎玉婷,女,硕士研究生,住院医师; 收稿日期:2014-11-03

frasound groups ($P>0.05$). ② The IOD of GAP-43 were significantly different among the 5 groups ($P<0.05$). There were significantly differences among the infrasound groups and the model group ($P<0.05$). There was no significant difference within the infrasound groups ($P>0.05$).

Conclusion: Infrasound can increase the expressions of GFAP and GAP-43 and restore the brain injury and improve the neurological function after TBI in rats.

Author's address Nanfang Hospital, Southern Medical University,Guangzhou, 510515

Key word infrasound; traumatic brain injury; glial fibrillary acidic protein; growth associated protein-43

创伤性颅脑外伤(traumatic brain injury,TBI)已成为目前世界上青壮年伤病致死致残的首位病因。脑外伤后脑组织的损伤及外伤后的继发炎症改变,会出现周围神经凋亡和出血性坏死等病理变化,导致学习、记忆和运动功能障碍等严重后遗症[1],如何最大程度地促进神经功能的恢复,已经成为治疗神经损伤重要的研究方向。次声是指频率低于20Hz的机械振动波[2]。有报道称低声压级次声可产生轻柔的共振作用,从而改善局部血液循环,促进组织修复[3]。本实验将通过研究低声压级次声对大鼠颅脑外伤后胶质纤维蛋白及生长相关蛋白-43表达的影响,观察其对脑组织及神经功能的修复作用,为次声在基础研究和临床应用提供相关理论基础。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

健康SPF级SD雄性大鼠30只,体重200—250g,室温、常湿饲养,普通饲料,自由饮水。将30只SD大鼠随机分为假手术组(n=6)、模型组(n=6)、次声60min组(n=6)、次声90min组(n=6)和次声120min组(n=6)。

1.2 脑外伤动物模型的制备

采用Feeney法制作颅脑外伤模型[4],用1%戊巴比妥钠(30mg/kg)将实验动物腹腔注射麻醉后,将大鼠头部固定于立体定向仪上,常规消毒,沿头正中切开头皮,剥离骨膜,暴露左侧顶骨,于冠状缝后1.5mm、矢状缝旁2.5mm钻一骨孔,咬除颅骨,直至形成一直径为5mm骨窗,显露硬脑膜。在硬脑膜上放置一与骨孔大小吻合的垫片,用20g砝码于30cm高处沿外周导管坠落,致左顶叶脑挫裂伤,硬膜外置明胶海绵止血,骨蜡封闭骨窗,缝合头皮。将实验动物置于37℃恒温板复温,至麻醉清醒后放回笼中。假手术组除了不造成颅脑外伤外,其余步骤同模型组及次声组。

纳入及排除标准:在规定缺血时限内(术后2—3h)按Zea Longa[5]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。1分以上视为造模成功。如未出现右侧肢体瘫痪(0分)或已死亡的动物被排除。随机补充排除标本,保证最终纳入分析的动物共30只。

1.3 处理方法和仪器

次声组按次声干预时间的长短随机分成60min组、90min组、120min组,分别给予次声干预60min、90min、120min,连续7d。模型组干预过程中除不开机外,其余过程同次声组。假手术组只打开颅窗,不损伤脑组织,不进行次声干预。

次声信号参数和处理方法:次声治疗仪Infrasound 8™包括主机和次声声头两部分,主机面板上的输出档位由3种次声频率和强度组成,本实验采用3档进行处理。经第四军医大学等单位研制的"便携式野外低频信号实时测试智能分析系统"对次声信号的实验测试,结果显示,该仪器在3档时输出次声频谱主要集中在4—20Hz,次声主频信号的频谱是随机变化的,声强为79.75—86.11dB[6]。

1.4 疗效评价

术后第7天对纳入分析的实验动物按照改良神经功能缺损评分(modified neurological severity scores, mNSS)[7]进行评分,最后取脑片行HE染色及免疫组织化学染色,观察各组大鼠脑损伤周围组织病理改变及胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)及生长相关蛋白-43(或轴突膜蛋白,growth associated protein-43,GAP-43)表达的变化。

1.5 标本制作

各组动物到达预定时间后,用1%戊巴比妥(40mg/kg)麻醉,切开胸腔,暴露心脏,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250ml生理盐水快速灌注,续用250ml 4%多聚甲醛进行灌注固定,断头取脑,选取损伤区进行连续冠状切片,用同一固定液固定6—8h。常规脱水、透明、石蜡包埋,冠状切片,片厚5μm,备用。

1.6 HE染色

用二甲苯脱去切片中的石蜡,再经由梯度酒精脱去二甲苯,最后入蒸馏水中冲洗,将已进入蒸馏水后的切片放入苏木精水溶液中染色5min,自来水冲洗,入1%的盐酸酒精分色,水洗后酸化伊红复染2min,水洗,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.7 免疫组织化学染色

将制备好的脑组织切片于4℃冰箱中取出,60℃烤箱烘烤2h,将切片依次浸入二甲苯Ⅰ、Ⅱ中脱蜡10min;切片置于梯度酒精中水化各1min,然后置于蒸馏水中待用;将切片放入柠檬酸盐抗原修复液中高温修复抗原2min,室温自然冷却,然后PBS冲洗3次,甩干,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、中性树胶封片。

1.8 图像采集与分析

每个标本各取一张切片,在同等亮度、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,在脑组织损伤周围随机取6个视野,用image-pro plus 6.0图像处理系统(USA Media Cybernetics)计算出每一个视野的累积光密度值(integrated optical density, IOD),最后取平均值。

1.9 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,各组mNSS评分和IOD值采用方差分析,组间两两比较采用LSD法。

2 结果

2.1 神经功能评分

脑外伤术后,模型组、次声60min组,次声90min组,次声120min组大鼠均有神经功能损伤。次声3组与模型组的mNSS评分均存在显著差异($P<0.05$),次声3组间的mNSS评分无显著性差异($P>0.05$)。见表1。

2.2 HE染色结果

假手术组细胞形态结构清楚,排列规整,胞体饱满,核深染,核膜清晰,核仁明显。模型组脑外伤区可见组织结构疏松、细胞排列紊乱,胶质细胞数量稍增多,神经元细胞正常形态消失、部分神经元细胞核固缩,胞体缩小变形。次声各组均可见脑外伤区组织结构紊乱,周围胶质细胞增生,数量较模型组增多,可见炎性浸润。见图1。

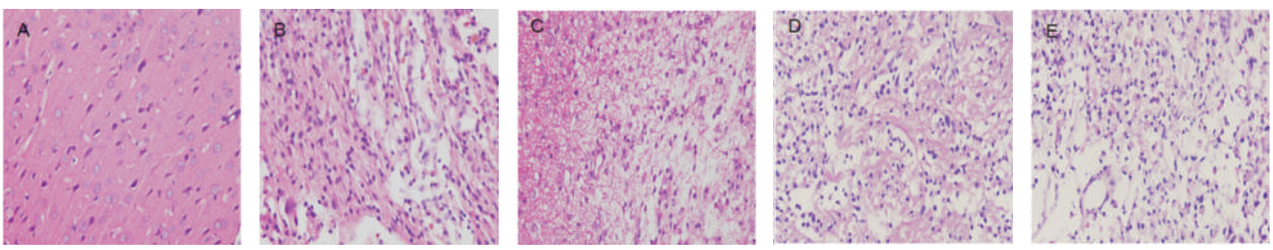
2.3 GFAP免疫组织化学染色结果

在光学显微镜下观察可见,假手术组、模型组及3个次声组脑损伤区周围均有GFAP表达,以次声组最为明显。5组间的GFAP表达存在显著性差异($P<0.05$),3个次声组与模型组比较均存在显著差异($P<0.05$),3个次声组间GFAP表达无明显差异($P>0.05$)。见表1,图2。

2.4 GAP-43免疫组织化学染色结果

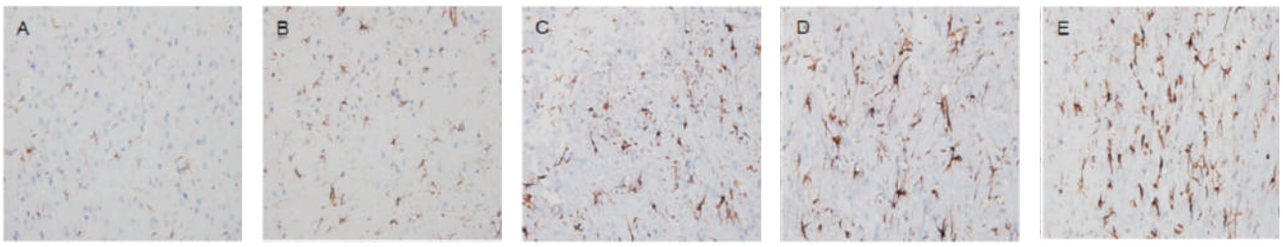
在光学显微镜下观察可见,假手术组、模型组、次声组均有GAP-43表达,以次声组最为明显。5组间的GAP-43表达存在显著性差异($P<0.05$),3个次声组与模型组比较均存在显著差异($P<0.05$),3个次声组间GAP-43表达无明显差异($P>0.05$)。见表1,图3。

图1 各组脑外伤周围脑组织HE染色 (×400)



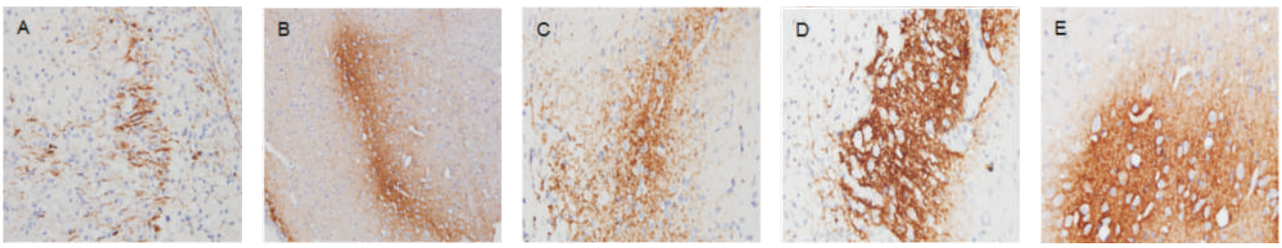
注:A假手术组;B模型组;C次声60min组;D次声90min组;E次声120min组

图2 各组脑外伤周围脑组织GFAP免疫组织化学染色 (×400)



注:A假手术组;B模型组;C次声60min组;D次声90min组;E次声120min组

图3 各组脑外伤周围脑组织GAP-43免疫组织化学染色 (×400)



注:A假手术组;B模型组;C次声60min组;D次声90min组;E次声120min组

表1 各组神经功能评分、累积光密度值 ($\bar{x}\pm s$)

组别	评分	IOD(GFAP)	IOD(GAP-43)
假手术组	-	4952.7700±459.1260	5848±747.95681
模型组	6.50±1.049	13523.93±1777.94	12269.94±1277.52
60min组	4.83±0.753	24215.86±1549.19	27653.74±1262.85
90min组	5.00±0.894	23706.95±1305.82	26853.63±1768.62
120min组	4.67±0.816	24429.28±1210.18	26935.86±1703.29

3 讨论

神经可塑性是目前中枢神经系统损伤后康复的基础,如何促进脑组织及神经修复,从而改善学习、记忆和运动功能,是目前神经康复的研究热点。许多研究显示,卒中后早期进行磁疗等物理因子的干预,可有效促进脑卒中患者功能的恢复[8],但是有关次声对颅脑外伤的治疗作用鲜见报道。

次声是广泛存在于自然环境中的机械振动波,其产生的机械能可转化为热能、生物化学能和生物电能,从而引起组织细胞在分子层面上的改变[9]。低声压级次声即声压强度低于90dB,近年有学者发现,低声压级次声可与生物体产生轻微共振,使有机体抗氧化系统酶活性增强,代偿反应增高,使病态组织内闭塞的血管重新开放,改善病组织内的血液循环,为促进氧气、吞噬细胞、免疫球蛋白等物质,向病变组织输送提供了有利条件[10]。本实验小组前期细胞实验中发现,低声压级次声作用60min,可促进骨髓间充质干细胞(BMSCs)存活素的表达,从而促进BMSCs的增殖,抑制其凋亡[11—12];在动物实验中发现,应用低声压级次声作用于脑缺血再灌注大鼠,120min/d,连续7d,可刺激胰岛素样生长因子-1分泌和促进大鼠脑缺血周围星形胶质细胞表达,从而使大鼠梗死面积缩小,神经症状明显改善[6,13]。

前期的研究中发现连续作用7d可达到较好的治疗结果[6,13—14],故本研究选择连续干预7d。然而次声每天作用时间的长短不同,所得的结果也不同。故本次实验重点研究了次声在60min、90min、120min不同干预时间对脑外伤作用的影响。

颅脑外伤后,脑组织内神经元标志物会发生改变,通过观察这些标志物的变化可以评估颅脑损伤和修复的程度。GFAP是星形胶质细胞骨架的中间丝蛋白,是星形胶质细胞的标志物,参与神经损伤的修复与再生[15]。星形胶质细胞可分泌多种神经营养因子,如神经生长因子、脑源性神经营养因子、血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子等,从而保护受损神经元,增加突触联系,促进神经修复及神经功能恢复。星形胶质细胞还可以维持离子平衡、调节能量代谢、对抗氧化应激[16]。GAP-43是一种轴突膜蛋白,其对神经纤维生长、发育、再生以及突触功

能维持和递质释放都起重要作用[17]。在神经发育和损伤修复中,它对轴突生长和突触建立有重要作用,被认为是神经元发育和再生的内在决定因子。有研究证实,GAP-43的表达增加可促进在体和培养细胞轴突生长[18]。本研究通过观察次声处理后脑损伤周围GFAP、GAP-43表达的影响及次声作用时间长短的关系,结合神经功能评分,进一步证明低声压级次声能够起到脑保护作用及促进神经功能恢复。

本研究中HE染色发现,脑外伤后脑组织损伤周围胶质细胞增多,表明脑外伤后脑组织内存在细胞增生。在免疫组织化学染色中,发现假手术组脑损伤周围见少量GFAP阳性表达,颜色较浅、突起纤细。次声组与模型组GFAP阳性表达明显增多,着色深染,突起增多,次声组尤为明显,但不同时间的次声组GFAP阳性表达却无显著性差异;同样,在GAP-43免疫组织化学染色中,假手术组脑损伤周围GAP-43散在、少量表达,次声各组与模型组GAP-43阳性表达明显增多,次声组阳性表达尤为明显,但不同时间组GAP-43阳性表达无显著性差异;GFAP和GAP-43表达结果表明低声压次声可以促进损伤脑组织内受损神经元的修复。7d后对实验大鼠进行mNSS评分发现,低声压次声处理后大鼠神经功能评分明显降低,显示低声压次声可以提高大鼠的行为功能。

本研究结果发现,次声治疗的3个时间点的mNSS评分、GFAP和GAP-43表达没有显著差异,分析可能为大鼠产生了适应现象。在磁场的相关研究中,有文献报道,极低频磁场作用大鼠30min/d,连续10d时,可影响脑自由基的形成,当作用60min/d,连续10d时,大鼠产生适应现象[19]。因此,我们推测:①低声压级次声作用60min/d,连续7d,可促进大鼠脑外伤区周围GFAP及GAP-43的产生,而当每天作用时间大于60min时,大鼠可产生适应现象。②低声压级次声作用60min/d,连续7d,可促进大鼠脑外伤区周围GFAP及GAP-43的产生,而每天作用时间大于60min时,周期小于7d即可达到同等效果。

次声的作用效果与其频率、声压强度、作用时间、作用次数等参数有关。由于本研究只观察了7d,为了可以更好地了解次声对脑外伤的作用,有必要在下一步的研究中继续观察次声在不同天数对脑外伤作用的影响。

参考文献

[1] Xu F, Yu ZY, Ding L, et al. Experimental studies of erythropoietin protection following traumatic brain injury in rats [J]. Exp Ther Med, 2012, 4(6):977—982.

[2] Leventhall G. What is infrasound[J]? Prog Biophys Mol Biol, 2007, 93(1—3):130—137.

[3] 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.

[4] Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat[J]. Brain Res, 1981, 211(1):67—77.

[5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84—91.

[6] 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.

[7] Chen JL, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous Administration of Human Umbilical Cord Blood Reduces Behavioral Deficits After Stroke in Rats [J]. Stroke, 2001, 32(11): 2682-2688.

[8] Quinn TJ, Paolucci S, Sunnerhagen KS, et al. Evidence-based stroke r-ehabilitation: an expanded guidance document from the european stroke organisation (ESO) guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008[J]. J Rehabil Med, 2009, 41(2):99—111.

[9] Batanov GV. Characteristics of etiology of immediate hypersensitivity in conditions of exposure to infrasound[J]. Radiats Biol Radioecol, 1995, 35(1):78—82.

[10] 彭丽岚,牟翔,袁华,等.低声压级次声对小鼠齿状海马回区巢蛋白表达的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2012,34(11):859—860.

[11] 毕迎立,陈银海,范建中,等.次声对骨髓间充质干细胞生长情况的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2012,34(3):166—170.

[12] 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.

[13] 李德洁,范建中,吴红瑛,等.低声压级次声对大鼠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.

[14] 魏佚,范建中,吴红瑛.脉冲磁场对脑缺血大鼠的作用及其IGF-1表达的变化[J].中国康复医学杂志,2008,23(10):878—883.

[15] Wei OY, Huang YL, Da CD, et al. Alteration of basic fibroblast growth factor expression in rat during cerebral ischemia[J]. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21(4):296—300.

[16] Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes:biology and pathology[J]. Acta Neuropathologica, 2010, 119(1):7—35.

[17] Grasselli G, Strata P. Structural plasticity of climbing fibers and the growth- associated protein GAP- 43[J]. Front Neural Circuits, 2013, (7):25.

[18] Gauthier-Campbell C, Bredt DS, Murphy TH, et al. Regulation of dendritic branching and filopodia formation in hippocampal neurons by specific acylated protein motifs[J]. Mol Biol Cell, 2004, 15(5):2205—2217.

[19] Ciejka E, Kleniewska P, Skibska B, et al. Effects of extremely low frequency magnetic field on oxidative balance in brain of rats[J]. J Physiol Pharmacol, 2011, 62(6):657—661.