

·基础研究·

磁场对大鼠脑缺血再灌注后胶质纤维酸性蛋白表达的影响*

黎玉婷¹ 何任红¹ 范建中¹ 吴红瑛^{1,2}

摘要

目的:探讨磁场对大鼠脑缺血再灌注后胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达的影响。

方法:线栓法制作大鼠中动脉闭塞(MCAO)脑缺血2h再灌注模型。将24只雄性SD大鼠随机分成模型组(n=12)、磁疗组(n=12),每组再分为3d、7d两个亚组,每组6只。磁疗组在缺血再灌注12h后予磁场处理(0—10.5mT,频率50Hz,20min/次,1次/d)。模型组干预过程中除不开机外,其余过程同磁疗组。在治疗3d、7d后(处死前)对大鼠进行神经功能缺损评分(mNSS),脑组织切片采用免疫组织化学染色方法观察脑缺血周围GFAP表达变化。

结果:磁疗7d组大鼠mNSS评分较模型组降低($P<0.05$);磁疗组脑缺血周围GFAP免疫组织化学染色反应阳性细胞计数增加($P<0.05$)。

结论:磁疗可促进大鼠脑缺血再灌注后GFAP的表达,促进脑组织修复。

关键词 磁场;缺血/再灌注;胶质纤维酸性蛋白

中图分类号:R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2015)-05-0428-04

Effects of magnetic field on expression of glial fibrillary acidic protein after cerebral ischemia/reperfusion in rats/LI Yuting,HE Renhong,FAN Jianzhong, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30 (5): 428—431

Objective:To explore the effect of magnetic field on the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) after cerebral ischemia/reperfusion in rats.

Method:The model of cerebral ischemia/reperfusion in rats was induced with intraluminal middle cerebral artery occlusion (MCAO) with nylon monofilament suture. Twenty-four male adult SD rats were randomly divided into model group (n=12) and magnetic therapy group (n=12), then each group was randomly divided into 3d and 7d subgroups, with 6 rats in each subgroup. The magnetic therapy group was treated with pulsed magnetic field(0—10.5mT, 50Hz, 20min/times, 1 times/d) after operation, the model group was treated in the same way but turning off the power. Both groups were evaluated with the modified neurological severity score (mNSS) at 3d and 7d after treatment (before being executed), and brain tissue slices were immunohistochemically stained to observe the expression of GFAP around the ischemic sites.

Result:Compared to the model group, in 7d magnetic therapy subgroup the mNSS scores decreased significantly ($P<0.05$), and the number of GFAP increased significantly($P<0.05$).

Conclusion:Pulsed magnetic field can increase the expression of GFAP after cerebral ischemia/reperfusion in rats, and promote the tissue repair.

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

Key word pulsed magnetic; ischemia/reperfusion; glial fibrillary acidic protein

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.05.004

*基金项目:广东省自然科学基金(S2012010009116)

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:黎玉婷,女,住院医师; 收稿日期:2014-05-25

缺血性脑卒中是一种常见的脑血管疾病,具有高发病率、高致残率的特点^[1]。如何保护神经细胞,最大程度地减轻脑缺血和再灌注所带来的损伤,提高生存率、减轻后遗症,一直是研究的热点。磁场广泛存在于自然环境中,作为一种物理因子已被广泛应用,研究发现,磁场具有改善血液循环、抑制自由基、影响神经细胞中 Ca^{2+} 流动、控制炎症和免疫反应等作用^[2]。胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)是脑内成熟星形胶质细胞中主要的中间纤维蛋白,是细胞骨架蛋白,GFAP在星形细胞中有丰富而特异性的表达,是星形细胞活化的客观标志蛋白,对于维持星形胶质细胞形态结构的稳定至关重要并决定着星形胶质细胞对神经损伤反应的程度^[3]。本实验将通过研究磁场对大鼠脑缺血再灌注后胶质纤维酸性蛋白的表达影响,探讨磁场对脑缺血再灌注损伤保护与GFAP表达变化的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

健康SD雄性大鼠24只,SPF级,体重200—250g,室温、常湿饲养,普通饲料,自由饮水。采用随机分组方法。将24只大鼠按1—24标号,任意抽取12个编号,作为对照组,其余的为实验组。

1.2 脑缺血动物模型的制备

参照Longa^[4]报道的线栓法并加以改进,线栓采用直径0.24—0.26mm、长度为4.0cm的尼龙鱼线。3%戊巴比妥(30mg/kg)腹腔注射麻醉后,仰卧位固定,无菌消毒,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,手术过程中维持肛温37℃左右,安静环境下饲养。

纳入及剔除标准:在规定缺血时限内(术后2—3h)按Zea 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。1分以上视为造模成功。如未出现左侧肢体瘫痪(0分)或已死亡的动物被剔除。随机补充剔除标本,保证最终纳入分析的动物共24只。

对造模成功大鼠随机分成模型组和磁疗组,每

组分3d、7d两个亚组,每个亚组各6只。磁疗组的各亚组分别在缺血再灌注12h后连续给予磁场干预(0—10.5mT,频率50Hz,20min/次,1次/d)。模型组干预过程中除不开机外,其余过程同磁疗组。

1.3 处理方法和仪器

用脉冲磁疗仪(GMC-B型脉冲磁疗仪,解放军总医院研制)于脉冲磁疗组动物术后2h即行磁疗处理。异名磁极对置于大鼠头部,磁矩7—10cm,磁场强度1档(0—10.5mT),频率50Hz,20min/d,磁疗后即行相应指标检测。

1.4 神经功能评分

术后第3天、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 score, mNSS)^[5]进行评分。

1.5 标本制作

各组动物到达预定时间后,用3%戊巴比妥(30mg/kg)麻醉,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,在视交叉前后1—3mm之间取脑片,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 GFAP免疫组织化学染色

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%过氧化氢封闭后加入GFAP(1:800)一抗(Abcam,兔抗大鼠),4℃孵育过夜,复温后加入二抗(山羊抗兔,EnVision,DAKO),孵育30min,加入DAB显色(具体操作见DAKO说明书),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。

1.7 图像采集与分析

高倍镜下观测各组切片中的免疫组织化学染色反应阳性细胞,在脑缺血周围随机取6个视野,计算每个视野免疫组织化学染色反应阳性细胞计数,所得的阳性细胞数取平均值。

1.8 统计学分析

采用SPSS19.0统计学软件,采用方差分析方法进行分析, $P<0.05$ 作为显著差异检验标准。

2 结果

2.1 神经功能评分

模型组和磁疗组动物均有神经功能损伤,清醒后,可见右眼眼裂变小,站立不稳,爬行时左后肢拖步并向右侧旋转。随着时间的延长,两组动物行为均有所改变。模型7d组评分低于模型3d组,有显著性差异($P<0.05$);磁疗7d组得分低于磁疗3d组,有显著性差异($P<0.05$);磁疗7d组得分低于模型7d组,有显著性差异($P<0.05$),见表1。

2.2 免疫组织化学染色结果

在20×10光学显微镜下观察,模型组及磁疗组脑缺血区周围均有GFAP表达,脑缺血再灌注第7天时,模型3d组大鼠大脑脑缺血区周围GFAP免疫组织化学染色反应阳性细胞计数与磁疗3d组相比有显著性差异($P<0.05$);模型7d组大鼠大脑脑缺血区周围GFAP免疫组织化学染色反应阳性细胞计数与磁疗7d组相比有显著性差异($P<0.05$);模型3d组大鼠大脑脑缺血区周围GFAP免疫组织化学染色反应阳性细胞计数与模型7d组相比有显著性差异($P<0.05$)。磁疗3d组大鼠大脑脑缺血区周围GFAP免疫组织化学染色反应阳性细胞计数与磁疗7d组相比有显著性差异($P<0.05$),见表2,图2—3。

表1 各组神经功能评分 ($\bar{x}\pm s$)			
组别	第3天	第7天	P
模型组	10.12±1.472	8.17±1.169	0.027
磁疗组	9.33±1.751	6.33±1.211	0.007
P	0.394	0.025	

表2 各组GFAP阳性细胞计数 ($\bar{x}\pm s$)			
组别	第3天	第7天	P
模型组	143.33±9.750	265.17±8.635	0.000
磁疗组	96.33±11.165	208.33±8.335	0.000
P	0.000	0.000	

3 讨论

脑卒中具有高发病率、高病死率、高致残率的特点,给家庭、社会带来沉重负担^[6]。缺血性脑卒中病理生理十分复杂,包括兴奋毒性机制,炎症通路,氧化损伤,离子失衡,细胞死亡,血管发生和神经保护等^[7]。然而目前的治疗主要通过溶栓及药物来重建脑血流,减少缺血、缺氧对神经元的损伤,最大限度缩小梗死范围。但是脑缺血再灌注后会引发一系列

图2 各组GFAP免疫组织化学染色 (×100)

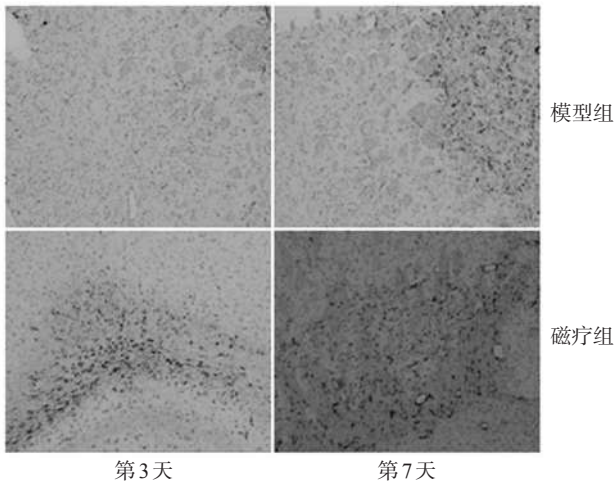
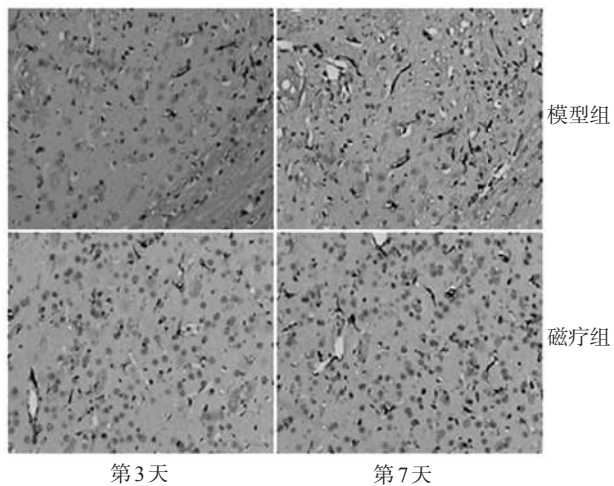


图3 各组GFAP免疫组织化学染色 (×200)



的层级反应,如微环境的紊乱、血脑屏障的破坏、自由基代谢障碍、钙离子超载、炎症反应、线粒体稳定性的改变、细胞凋亡加速以及神经结构改变等破坏作用^[8]。有研究证实脑缺血再灌注后3h凋亡细胞少量增加,随着再灌注时间的延长,至再灌注后3—7d,凋亡细胞数量达高峰,海马颗粒和锥体细胞层以及大脑皮质均可见大量的凋亡细胞,凋亡细胞周围分布较多的坏死细胞,72h时坏死细胞数量已明显增多^[9]。故如何保护神经细胞,最大程度地减轻脑缺血和再灌注所带来的损伤,提高生存率、减轻后遗症,一直是研究的热点。

磁场作为一种应用广泛的物理因子,已被众多研究证实对脑缺血再灌注损伤有较好的保护作用。

磁场能减少炎症区白细胞数量,控制内皮素、白细胞介素等细胞因子的产生,从而减轻梗死区神经细胞的再灌注损伤,并且磁刺激可保护神经组织,促进神经纤维的再生^[10-12]。研究发现,磁场能够通过增加胰岛素样生长因子的表达^[13]、改善缺血部位微循环、清除自由基、促进神经生长因子产生等机制而起到缺血再灌注损伤后神经保护作用^[14-15]。

有文献报道,康复训练可促进脑缺血大鼠行为功能的改善^[16-17],本实验观察到磁疗亦有此作用。大鼠脑缺血再灌注损伤经磁场处理后神经行为学改变结果提示,模型7d组与模型3组比较,评分降低,差异有显著性意义;而磁疗7d组与模型7d组评分相比,评分明显降低,差异有显著性意义;磁疗7d组与磁疗3d组评分相比差异有显著性意义;提示第7天时两组大鼠均有不同程度的神经功能恢复,脑缺血再灌注的大鼠未经治疗也有自主修复、缓慢恢复神经功能的能力,但磁疗的介入可以进一步促进组织修复,改善脑缺血再灌注损伤,使总体神经功能改善程度要优于模型组。

GFAP是成熟星形胶质细胞的特异性蛋白,是构成胶质细胞的重要骨架成分,与中枢神经系统的早期发育密切相关^[18]。星形胶质细胞是中枢神经系统中最多的细胞类型,约占正常成年人脑细胞总数的40%^[19]。胶质细胞能够支持和引导神经元的迁移,形成神经元胞体和纤维的支架;当中枢神经受损而变性时,小胶质细胞能够变成巨噬细胞,清除变性的神经组织碎片,参与神经损伤的修复与再生;星形胶质细胞能够摄取谷氨酸和 γ -氨基丁酸等某些递质,从而转变为谷氨酰胺而转运到神经元内,从而消除这类递质对神经元的作用^[20-21]。除此之外,星形胶质细胞可以维持离子平衡、调节能量代谢、对抗氧化应激,还可分泌多种神经营养因子,如血管内皮生长因子、脑源性神经营养因子、神经生长因子、碱性成纤维细胞生长因子等,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^[22]。GFAP被认为是星形胶质细胞的特征性标志,对于维持星形胶质细胞形态结构的稳定至关重要,并决定着星形胶质细胞对神经损伤反应的程度。脑梗死后梗死灶周围GFAP表达增高,增生的星形胶质细胞在脑梗死后脑组织的修复过程中起着重要作用^[23-24]。本研究

中我们通过免疫组织化学染色方法观察脑缺血灶周围GFAP表达变化来反映磁场对脑缺血再灌注后星形胶质细胞变化。根据实验结果我们发现,脑缺血7d的模型组及磁疗组脑缺血组织周围GFAP表达明显增多,磁场干预组尤为显著。表明脑缺血再灌注后的损伤在磁场作用下可明显改善,可能是在磁场作用下促进脑缺血组织周围星形胶质细胞增殖、活化,从而分泌多种神经营养因子参与神经修复,从而促进脑缺血后大鼠神经症状恢复。

本次研究探讨了磁疗促进GFAP的表达,降低大鼠神经功能评分,从而促进脑组织修复,改善脑缺血再灌注损伤,起到脑的保护作用,至于其具体的作用机制以及不同强度、不同频率及不同时间的作用效果如何,还有待于今后更进一步的研究。

参考文献

- [1] Mayo NE, Wood-Dauphince S, Cote R, et al. Activity, Participation, and quality of life 6 months poststroke[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2002, 83(8): 1035—1042.
- [2] 张华, 杨飞虎, 刘顺达, 等. 低频交流电磁疗法对脑梗死后焦虑的疗效观察[J]. 中国康复, 2011, 18(06): 421—422.
- [3] 李德杰, 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, 2012, 19(02): 124—128.
- [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. The modified neurological severity score, mNSS[J]. Stroke, 2001, 32(11): 2682—2688.
- [6] Thorsén AM, Holmqvist LW, de Pedro-Cuesta J, et al. A randomized controlled trial of early supported discharge and continued rehabilitation at home after stroke: five-year follow-up of patient outcome[J]. Stroke, 2005, 36(2): 297—303.
- [7] 陈力学, 姜利人, 刘宝松, 等. 全脑缺血再灌注后神经元凋亡的时相和分布特征[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(6): 531—534.
- [8] Deb P, Sharma S, Hassan KM. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis[J]. Pathophysiology, 2010, 17(3): 197—218.
- [9] Macias MY, Battocletti JH, Sutton CH, et al. Directed and enhanced neurite growth with pulsed magnetic field stimulation[J]. Bioelectromagnetics, 2000, 21(4): 272—286.
- [10] Greenebaum B, Sutton CH, Vadula MS, et al. Effects of pulsed magnetic fields on neurite out growth from chick (下转第436页)