论著

文章编号:1000-5404(2006)21-2160-03

生长相关蛋白在缺氧缺血性脑损伤新生大鼠海马中的表达变化

鲁利群,赵聪敏,蒲昭霞 (第三军医大学新桥医院儿科,重庆 400037)

提 要:目的 研究7日龄新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)后海马神经组织生长相关蛋白(growth-associated protein,GAP-43)及其mRNA的表达变化。**方法** 按Rice法制备SD大鼠HIBD模型,并以正常新生大鼠为对照。以免疫组织化学和RT-PCR法检测不同时相点海马组织GAP-43及其mRNA的表达。**结果** 新生大鼠HIBD后海马GAP-43及其mRNA表达较同日龄正常大鼠明显增高,表达高峰分别在损伤后第2周和第3周。**结论** 新生大鼠HIBD后海马GAP-43及其mRNA表达增高,可能与海马损伤后修复有关。

关键词: 脑缺血;脑缺氧;生长相关蛋白;海马;大鼠

中图法分类号: R322.81; R743.31; R741.02 **文献标识码:** A

Expression of growth-associated protein in hippocampus of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

LU Li-qun, ZHAO Cong-min, PU Zhao-xia (Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the expression of growth-associated protein-43 (GAP-43) in the hippocampus of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** HIBD was established by the method of Rice in 48 SD rats aged 7 days and another 48 matched normal rats served as control. Immunohistochemistry and RT-PCR were respectively used to detect the expression of GAP-43 protein and mRNA in all rat hippocampus on day 8, 10, 14, 21, 28, 35 after HIBD ($n=8$ at each time point for each group). **Results** The expression of GAP-43 protein and mRNA in hippocampus was obviously increased in HIBD rats as compared with normal rats, the peak of GAP-43 protein appeared at 3rd week, and the peak of mRNA at 2nd week. **Conclusion** The expression of GAP-43 protein and mRNA increased in the hippocampus of rats following HIBD, which was possibly related to the recovery of injured hippocampus.

Key words: cerebral hypoxia; cerebral ischemia; growth-associated protein; hippocampus; rat

生长相关蛋白(growth-associated protein-43,GAP-43)是神经元特异性蛋白,与神经发育、轴突再生和突触重建密切相关。随着脑的发育成熟,GAP-43的表达逐渐降低,当出现脑损伤后,其表达又会增高[1,2]。关于发育期脑损伤后,如缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD),GAP-43在海马的表达情况,目前尚缺少相关报道。本实验拟采用免疫组织化学法和RT-PCR法,观察新生大鼠HIBD后,不同时相点海马GAP-43及其mRNA表达的变化,旨在探讨这些变化与海马神经损伤修复间的关系。

作者简介: 鲁利群(1971-),女,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事发育期脑损伤的早期干预方面的研究。电话:(023)68755602

通讯作者: 赵聪敏,电话:(023)68755602

收稿日期: 2005-10-31;**修回日期:** 2006-06-15

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 新生7日龄SD大鼠98只(由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),雌雄不限,体质量12~16 g,随机分为正常对照组和HIBD组,每组48只,每组又分为生后8、10、14、21、28 d、35 d 6个时相点,每个时相点8只大鼠。

1.1.2 主要试剂 小鼠抗大鼠GAP-43单克隆抗体(Sigma公司),S-P免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒(北京中杉生物技术公司)。RT-PCR试剂盒、Trizol RNA提取液(TaKaRa生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作 HIBD模型按Rice[3]法制作。大鼠乙醚吸入麻醉后,作颈部正中切口,分离并结扎左侧颈总动脉,随后放入氧浓度为8%的氧氮混合气缺氧舱内(缺氧舱置于

37℃恒温水浴箱中),以 0.5 ~ 1 L/min 气流量缺氧 2 h,出现自发或夹尾左旋则证明模型制作成功。

1.2.2　免疫组织化学法检测 GAP-43 阳性反应产物　　分别取各时相点正常和 HIBD 新生大鼠,开胸由左心室向主动脉插管,用温生理盐水和 4% 多聚甲醛(0.1 mol/L PBS,pH 7.4,4℃)灌注进行冲洗及内固定,取脑组织置于上述多聚甲醛固定液中,外固定 36 ~ 48 h(4℃)。常规石蜡包埋切片,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。切片脱蜡至水后,按 S-P 免疫组化试剂盒说明书进行操作,DAB 显色,苏木精复染,以细胞膜出现棕黄色颗粒为阳性反应产物。GAP-43 的标记强度用光密度(OD)值表示。应用图像分析系统测定海马各区 GAP-43 的 OD 值,同时测定同一张切片上视束的 OD 值作为背景,GAP-43 的 OD 值减去背景的 OD 值得到矫正 OD(COD)值,即 GAP-43 免疫反应产物的实际光密度值。用 COD 值进行比较分析,以避免非特异性染色所造成的误差。

1.2.3　RT-PCR 法检测 GAP-43mRNA 表达　　由深博生物有限公司合成引物,预期扩增产物长度为 405 bp。以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参,预期扩增产物长度为 289 bp。分别取各时相点正常和 HIBD 新生大鼠海马组织 80 ~ 100 mg,采用 Trizol 试剂提取总 RNA,测 $D(260)/D(280)$ 于 1.7 ~ 2.0 之间,取 RNA 各 1 μg,按 RT-PCR 试剂盒说明书进行逆转录和基因扩增,循环次数为 34 次,GAP-43 和 GAPDH 的退火温度分别为 58 ℃和 53 ℃。以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。经凝胶图象分析系统,对 RT-PCR 产物的电泳条带进行光密度分析,结果以所测定的目的条带的光密度值与内参条带的光密度值之比(OD ratio,GAP-43/GAPDH)表示。

1.3　统计学处理

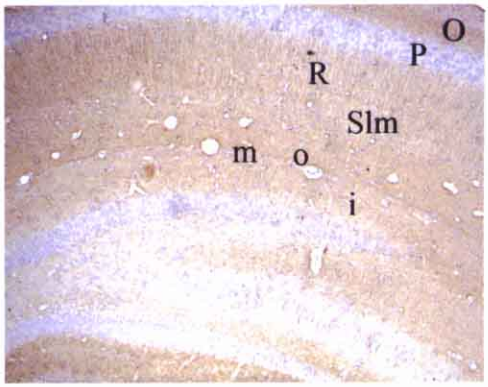
所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 软件包进行分析,组间比较采用 t 检验。

2　结果

2.1　形态学观察结果

正常新生大鼠生后 8 d,海马 GAP-43 免疫反应产物主要分布在白质,灰质神经元胞体周围也有分布。生后 10、14、21 d,白质和灰质上均有较多分布,锥体细胞的细胞质及主树突干不着色,棕黄色颗粒状阳性反应产物沉积于胞体及主树突干周围,颗粒细胞膜、神经胶质细胞膜及神经纤维网上也有大量沉积。生后 28 d 及 35 d,GAP-43 阳性反应产物以密集分布于神经纤维网为主。分布范围主要在 CA1 区的 SO、SR、SL 及 SM,CA3 区的 SO、SR 及 SM,DG 区的 SM,而 CA3 区 SL 及 DG 门区的苔藓纤维中阳性反应产物着色很淡,分子层内带染色较深,中外带染色较浅。

7 日龄新生大鼠 HIBD 后 1 d,海马 GAP-43 阳性产物较同日龄正常大鼠无明显增多或减少,分布范围也与之相似。损伤后 3 ~ 7 d,GAP-43 阳性颗粒明显增多。损伤后 14 ~ 21 d,在灰质和白质,棕黄色阳性颗粒粗大、染色深且分布密集,尤其以海马 CA1 区、CA3 区和 DG 区最为明显,棕黄色阳性反应产物表达最强最多。直至 HIBD 后 28 d,其分布密度开始降低(图 1)。



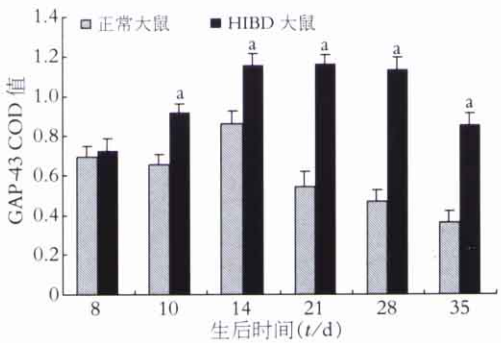
始层(O),放射层(R),腔隙层(Slm),锥体细胞层(P);分子层内带(i)、中带(m)、外带(o)

图 1　生后 21 d HIBD 大鼠海马 CA1 区和 DG 区 GAP-43 免疫组织化学染色　(S-P × 100)

2.2　图像分析结果

生后 14 d,正常新生大鼠海马 GAP-43 阳性反应产物着色最强最多,COD 值最高,生后 21 d COD 值开始明显降低,至 28 d 及 35 d,仍继续降低。

新生大鼠 HIBD 后 3、7、14、21、28 d,海马 GAP-43COD 值明显高于同日龄正常大鼠,差异非常显著($P < 0.01$),而损伤后 1 d(即生后 8 d),差异不显著($P > 0.05$),GAP-43 最高 COD 值在损伤后 14 ~ 21 d(即生后 21 ~ 28 d),表达高峰持续时间较同日龄正常大鼠长(图 2)。

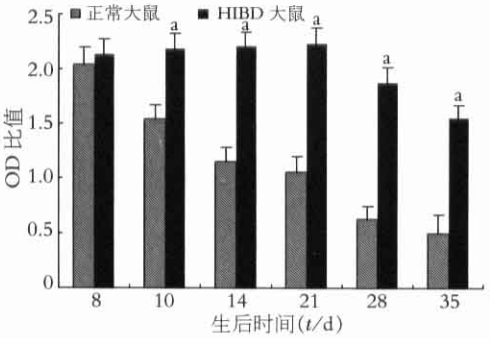


a: $P < 0.01$,与正常大鼠比较

图 2　不同日龄正常和 HIBD 新生大鼠海马 GAP-43 的矫正光密度值(COD 值)

2.3　凝胶成像分析结果

在正常新生大鼠海马中,GAP-43 mRNA 于生后 7 d 表达量最高,14 d 时已下降约一半,至生后 21 d 时仍维持在此水平,28 d 时其表达量已降至最初的 1/4,直到 35 d;相比正常新生大鼠,除 HIBD 后 1 d 其表达量尚无明显改变外($P > 0.05$),损伤后 3、7、14、21、28 d,其海马 GAP-43mRNA 的含量明显增加,差异非常显著($P < 0.01$)。其中,HIBD 后 3 d 时表达量开始升高,HIBD 后 7 ~ 14 d,表达量最高,21 d 开始降低,至 28 d 时降低已很明显(图 3)。



a: $P<0.01$,与正常大鼠比较

图3 不同日龄正常和HIBD新生大鼠海马GAP-43 mRNA/GAPDH mRNA的光密度比值

3 讨论

GAP-43主要存在于已分化定型并开始轴突生长的神经元中,位于突触前膜,在膜上与钙调蛋白(CaM)结合,参与G蛋白的相互作用以及神经递质的释放,并作用于胞吞/胞吐过程。能诱导生长锥的生长和促进膜扩展,其表达水平调节着生长锥的形态和轴突的长出,与海马长时程增强密切相关,是研究神经可塑性的分子标志[4]。出生后1~5周,随着神经元轴突生长、延长,直到突触结构形成和功能成熟,大鼠脑组织中GAP-43及其mRNA呈持续性表达[5]。本实验对不同日龄正常新生大鼠的动态研究显示,GAP-43在海马各区均有分布,随着日龄增加,分布的主要范围由白质转移到灰质,GAP-43及其mRNA的表达量逐渐降低,蛋白表达高峰在生后2周左右,而mRNA表达高峰在生后1周左右,均与文献[5,6]报道相吻合。

对众多脑损伤模型的研究显示,损伤后GAP-43在脑中的表达会出现短暂增高(3~14 d),继而降至正常水平,增高原因与神经细胞死亡后GAP-43释放以及反应性神经突触再生有关[2,7]。但也有学者发现损伤后GAP-43表达并无变化,甚至出现降低现象,认为是损伤抑制了GAP-43的合成[8]。本实验研究结果显示,新生大鼠HIBD后,与同日龄正常大鼠比较,HIBD3d以后,海马GAP-43表达明显增加,于损伤后第3周达高峰,GAP-43阳性反应产物着色最强。GAP-43mRNA表达量也增加明显,于损伤后第2周达高峰。其原因可能如下:①神经元GAP-43的表达与逆行信号的刺激有关,在发育和损伤的神经元中,逆行信号由胞体或损伤局部产生,再返回胞体刺激GAP-43的表达[9]。HIBD新生大鼠既处于发育期,又伴有脑损伤,因此这种逆行信号可能既来自胞体,又来自损伤局部,变得非常强大,使刺激增强且刺激时间延长,GAP-43及其mRNA表达明显增多,高峰持续时间也较长。②损伤后1~3 d,损伤刺激了未受损神经元的代偿机制,使其合成GAP-43及其mRNA增加,但增加的量尚不明显($P>0.05$)。损伤后3 d,代偿机制继续增强,使GAP-43的合成量明显增加($P<0.01$),直到高峰,然后随着代偿机制的减弱,表达量也逐渐降低。研究证实,海马CA1区、CA3区对缺血缺氧较敏感,而DG区是神经发生的主要区域。本实验显示,新生鼠HIBD后,这3个区域GAP-43表达增多最明显,推测其代偿机制也较强。海马是学习记忆的功能区,尤其是CA1区、CA3区和DG区在学习记忆活动中发挥着重要作用。本实验GAP-43及其mRNA在HIBD新生大鼠海马表达的增强,不仅说明发育早期脑损伤后,海马组织的自我修复非常活跃,而且也提示与学习记忆相关的可塑性得到增强,如果此时能利用其增强的可塑性进行早期干预,将有利于学习记忆功能的恢复。

参考文献:

[1] HSU J Y, STEIN S A, XU X M. Temporal and spatial distribution of growth-associated molecules and astroglial cells in the rat corticospinal tract during development [J]. J Neuronsci Res, 2005, 80(3): 330-340.

[2] FARINA V, GADAU S, LEPORE G, *et al*. Growth-associated protein expression in the frontal and occipital cortices of callosotomized rats [J]. Funct Neurol, 2004, 19(3): 181-184.

[3] RICE J E 3rd., VANNUCCI R C, BRIERLEY J B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat [J]. Ann Neurol, 1981, 9(2): 131-141.

[4] DE-MOLINER K L, WOLFSON M L, PERRONE-BIZZOZERO N, *et al*. Growth-associated protein-43 is degraded via the ubiquitin-proteasome system [J]. J Neurosci Res, 2005, 79(5): 652-660.

[5] KAWASAKI T, NISHIO T, KAWAGUCHI S, *et al*. Spatiotemporal distribution of GAP-43 in the developing rat spinal cord: a histological and quantitative immunofluorescence study[J]. Neurosci Res, 2001, 39(3): 347-358.

[6] KARIMI-ABDOLREZAEE S, VERGE V M, SCHREYER D J. Developmental down-regulation of GAP-43 expression and timing of target contact in rat corticospinal neurons[J]. Exp Neurol, 2002, 176(2): 390-401.

[7] BUFFO A, CARULLI D, ROSSI F, *et al*. Extrinsic regulation of injury/growth-related gene expression in the inferior olive of the adult rat [J]. Eur J Neurosci, 2003, 18(8): 2146-2158.

[8] O'DRISCOLL C M, GORMAN A M. Hypoxia induces neurite outgrowth in PC12 cells that is mediated through adenosine A2A receptors [J]. Neuroscience, 2005, 131(2): 321-329.

[9] DANI J W, ARMSTRONG D M, BENOWITZ L I. Mapping the development of the rat brain by GAP-43 immunocytochemistry [J]. Neuroscience, 1991, 40(1): 277-287.

(编辑 王 红)