维普资讯 http://www.cqvip.com



论 著 文章编号:0253-3626(2007)12-1256-04

# 成年大鼠缺氧性脑损伤后亚临床发作及胶质原纤维酸性蛋白的表达

陈 秀,吴万福,胡长林

(重庆医科大学附属第二医院神经内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨缺氧性脑损伤后亚临床癫痫发作及其与胶质原纤维酸性蛋白的关系。方法:成年雄性 SD 大鼠,随机分为对照组与缺氧组,以 8%氧氮混合气体缺氧,通过监测大鼠脑电活动,又将缺氧大鼠分成亚临床发作组与非亚临床发作组、分别用 Nissle 染色、免疫组织化学和免疫蛋白印迹等技术观察皮层、海马的神经病理学改变以及检测海马组织胶质原纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein,GFAP)表达。结果:大鼠缺氧损伤后部分大鼠出现尖波、尖慢波和棘波,痫样放电的发生率为 19.67%。较非亚临床发作组,亚临床发作组海马 CA1 、CA3 区、颞叶皮质神经元脱失明显($P<0.05$)。亚临床发作组 GFAP 表达明显增强,以海马为著,与非亚临床发作组比较差异有显著性($P<0.05$)。结论:成年大鼠缺氧性脑损害后可出现痫样放电,并与脑内 GFAP 表达增加和神经元脱失有关。

【关键词】缺氧性脑损伤;亚临床发作;胶质纤维酸性蛋白;神经元脱失

【中国图书分类法分类号】R742.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-04-25

# Expression of GFAP in adult rats hippocampus of onset subclinical seizures following hypoxic brain damage

*CHEN Xiu,et al*

(*Department of Neurology,the Second Affiliated Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To explore the mechanism of early onset subclinical seizures following hypoxic brain injury. *Methods*:SD male adult rats were assigned randomly to control rats and rats exposed to global hypoxia by 8% oxygen nitrogen atmosphere. According to electroencephalogram recording seizure discharge,hypoxic rats were divided into subclinical seizures group and non-subclinical seizures group,then the changes in neuropathology and the expression of GFAP in cortex and hippocampus of rat brain were studied by Nissle-staining 、immunohisochemistry and western-blot. *Results*:Subclinical seizures occurred in 19.67% rats following hypoxia. Compared with non-subclinical seizure group,neuronal loss of hippocampal CAl and CA3 region as wel as temporal cortex were distinct in subclinical seizure group($P<0.05$). Meanwhile,the expresssion of GFAP in subclinical seizure group was stronger than that of non- subclinical seizure group,especially in hippocampal area($P<0.05$). *Conclusion*:Onset subclinical seizures occured following hypoxic injury in adult rats,which may be related to increased GFAP expression and neuronal loss following hypoxic brain damage .

【Key words】 Hypoxic brain injury;Subclinical seizure;GFAP;Neuronal loss

临床上缺氧性脑损伤如呼吸衰竭、溺水、严重贫血、窒息及中毒、麻醉手术意外等均可引起不同程度的脑损害,即缺氧性脑病。其临床表现复杂多样,严重时出现意识障碍、癫痫发作甚至死亡。临床观察发现此类癫痫发作程度严重、持久、类型多样,而且对常用的抗癫痫药物几乎没有反应[1],即使联合用药效果也差。反复痫性发作可加重缺氧性脑损伤,二者之间形成恶性循环,增加了死亡率与致残率。缺氧后致痫机制并不清楚,相关的报道大多数是基于临床研究,而动物实验研究较少。因此,我们检测了大鼠缺氧性脑损伤后亚临床癫痫发作(Subclinical seizure)及其与胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein,GFAP)的关系。

作者介绍:陈 秀(1970- ),女,主治医师,博士研究生,主要研究方向:缺氧性脑损伤与癫痫。

## 1 材料和方法

### 1.1 成年大鼠缺氧性脑损伤模型的建立

维普资讯 http://www.cqvip.com



成年雄性 SD 大鼠，体质量 150～200g，（第三军医大学实验动物中心提供）。参考国内外缺氧方法[2,3]进行适当改进，大鼠置于自制密闭玻璃缺氧箱中，持续充以 8%氧氮混合气体，流量为 0.5L/min，通气 10min 后开始计时，直至大鼠出现四肢失去张力，呼吸暂停，将大鼠取出置于空气中，记录其缺氧维持时间，每日 1 次，连续进行 3 次，箱内二氧化碳和水蒸气分别用钠石灰和氯化钙吸收。用氧浓度仪监测，维持缺氧箱内的氧浓度在 8%±0.5%左右。采用脑电图、Nissle 染色评价动物模型。

1.2 大鼠脑电活动记录及动物分组

记录大鼠缺氧前 20min、末次缺氧后 2h 脑电活动。亚临床发作以电生理记录到痫样放电为标准[4,5]，即出现棘波、尖波或高波幅慢波放电。大鼠分为缺氧组和对照组，缺氧组 71 只大鼠缺氧处理后，根据脑电记录有无痫样放电分别纳入亚临床发作组（Subclinical seizures group）和非亚临床发作组（Non-subclinical seizures group）。对照组（Control group）7 只雄性 SD 大鼠，将其置于同一容器，持续充以空气，其余条件相同。

1.3 标本采集及处理

对照组，亚临床发作组和非亚临床发作组大鼠分别在缺氧处理完后当天、第 14 天和 28 天，用 4%多聚甲醛经心脏灌注固定，取脑置于 25%蔗糖脱水，然后行冠状位冰冻切片。

1.4 Nissle 染色

将切片放入 0.1%甲苯胺蓝内，60℃×3min；乙酸酒精分色 10s 左右，镜下控制反应；脱水，透明、封片，光镜观察。

1.5 免疫荧光化学

将切片用 3%$H_2O_2$ 和正常山羊血清封闭后，加入鼠 GFAP 单抗（1:400 Neo-Maker 公司）后 4℃过夜，后续操作采用免疫荧光化学方法，荧光显微镜下观察，阳性细胞发红光。阴性对照采用 PBS 分别取代一抗。

1.6 GFAP 蛋白免疫印记分析

亚临床发作组、非亚临床发作组 14 天、28 天与对照组大鼠快速断头取脑，冰上分离海马，匀浆，15000g 离心 15min（4℃）留上清液，用 Bradford 法进行蛋白定量。蛋白样品采用 10%的 SDS-PAGE 进行电泳，然后半干转至 PVDF 膜作免疫反应。用 5%脱脂奶粉室温封闭 2h，然后依次加入鼠 GFAP 单抗（1:1000，Neo-Maker 公司）37℃孵育 2h，4℃过夜，生物素化的羊抗鼠 IgG（1:1000，武汉博士德公司）37℃孵育 2h，SA/HRP（1:1000，武汉博士德公司）37℃孵育 2h，DAB 显色。用 β-actin 作内参。各反应间用 TBST 充分洗涤。PVDF 膜常温晾干后进行条带图像扫描分析，计算各条带的灰度（OD）值。

1.7 图像分析与统计处理

采用 TD2000 图像分析系统对脑片 Nissle 染色神经元和 GFAP 免疫阳性细胞进行定量计数。在 40 和 20 倍物镜下进行图像分析，每个标本随机抽取 6 张切片，每张切片选择海马各两个视野（每个视野相当于切片上 0.132mm² 和 0.265mm²），然后由计算机自动计数，统计神经元数量和免疫阳性细胞数。统计学分析：Nissle 染色神经元数、免疫组化阳性细胞数和 OD 值数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析及 $q$ 检验，统计检验水准 $\alpha=0.05$。所有数据使用 SPSS10.0 统计软件处理。

## 2 结 果

2.1 大鼠脑电活动监测

缺氧前大鼠 EEG 以 θ 波为主，较多 β 波重叠在 θ 波中，有少量 α 波和 δ 波，缺氧后显示大鼠脑电以 θ、δ 波为主，波幅减低，在此背景上部分大鼠反复出现阵发性尖波、尖慢波、棘波发放（图 1）。在末次缺氧后 2h 内，有 19.76%（14/71）大鼠出现痫性放电，即亚临床发作，对照组（$n$=7）无痫性放电。

2.2 Nissle 染色

对照组大鼠皮层和海马神经元排列整齐规则，胞核大而圆，核仁明显，细胞体突起明显，胞浆染色均匀。缺氧组大鼠皮层和海马神经元排列紊乱、肿胀，稀疏，间隙增宽，胞浆浓缩、深染，核碎裂，细胞体突起明显减少，核仁模糊。缺氧后 14 天，28 天亚临床发作组与非亚临床发作组及对照组（各 4 只）大鼠的海马 CA1 区、CA3 区、颞叶皮质的神经元相比，神经元数目减少显著（$P<0.05$），可见残存神经元胞体萎缩，突起减少或消失，尼氏小体逐渐分解以致消失（图 2，表 1）。

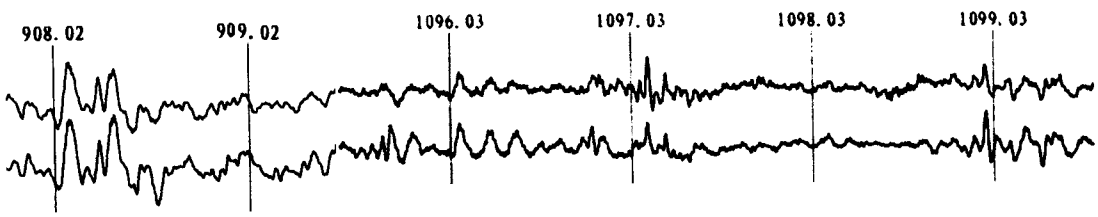
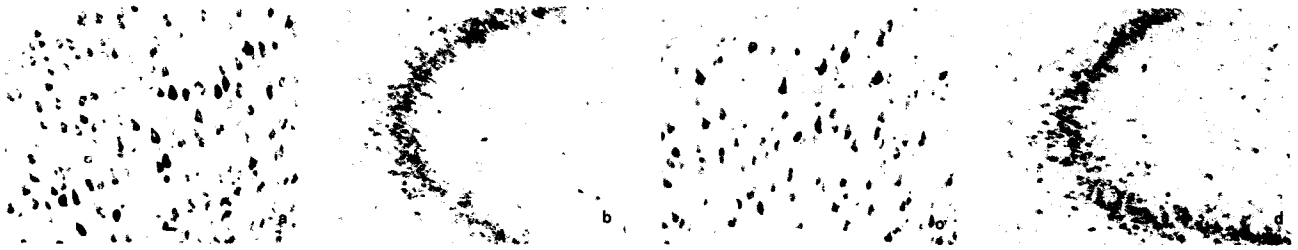



图 1 缺氧后大鼠出现反复尖波、尖慢波、棘波发放

维普资讯 http://www.cqvip.com





a:非亚临床发作组皮层 40×； b: 非亚临床发作组$CA_3$区 20×； c:亚临床发作组皮层 40×； d:亚临床发作组 $CA_3$区 20×；

**图 2 非亚临床发作组和亚临床发作组 14d 皮层、海马组织 Nissle 染色**

**表 1 大鼠缺氧后 14 天、28 天相关脑区 Nissle 染色的神经元的数目($\bar{x} \pm s$)**

| Group | Temporal cortex | | CA1 | | CA3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 14d($n$=4) | 28d($n$=4) | 14d($n$=4) | 28d($n$=4) | 14d($n$=4) | 28d($n$=4) |
| Control | 107.34 ± 9.21 | | 127.44 ± 9.03 | | 144.21 ± 7.44 | |
| Non-subclinical seizures | 97.12 ± 5.71 | 95.39 ± 7.25 | 103.37 ± 5.43[c] | 108.56 ± 4.67[c] | 120.32 ± 7.04[c] | 119.32 ± 4.32[c] |
| Subclinical seizures | 73.19 ± 3.76[ab] | 76.56 ± 6.64[ab] | 80.92 ± 5.43[ab] | 77.29 ± 7.75[ab] | 90.45 ± 8.34[ab] | 86.15 ± 6.66[ab] |

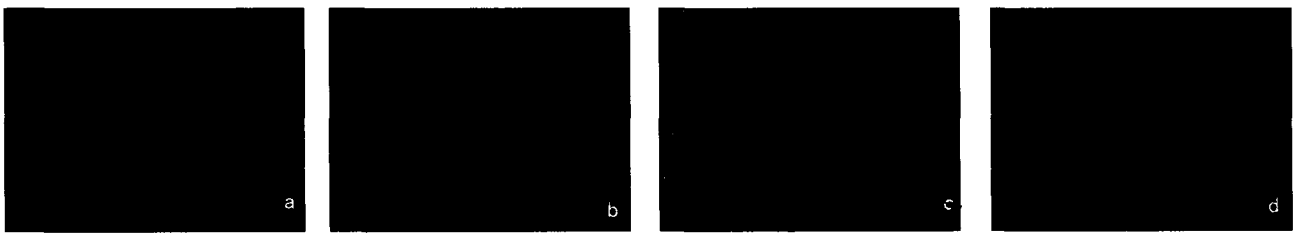
a:$P<0.01$ vs control;b:$P<0.05$ vs non-subclinical seizures;c:$P<0.05$ vs control;

### 2.3 免疫荧光检测海马齿状回、颞叶皮层 GFAP 表达

亚临床发作组 14 天,28 天与相应非亚临床发作组及对照组大鼠(各 4 只)的海马和颞叶皮质比较,GFAP 阳性细胞数明显增多($P<0.01$),其中亚临床发作组 28 天大鼠海马齿状回 GFAP 阳性细胞数较 14 天显著增多($P<0.05$)(图 3,表 2)。

### 2.4 免疫印迹检测海马 GFAP 含量

对照组、亚临床发作组和非亚临床发作组 14 天、28 天(各 3 只)大鼠海马 GFAP 免疫蛋白印迹检测如图 4 所示,对照组、亚临床发作组和非亚临床发作组 14 天、28 天海马 GFAP 含量[分别为(0.5021 ± 0.0201)、(0.9771 ± 0.0302)、(1.2665 ± 0.0388)、(0.7843 ± 0.0331)、(0.7653 ± 0.0231)]。亚临床发作



a:非亚临床发作组 14d GFAP 表达 20×； b:非亚临床发作组 28d GFAP 表达 20×；
c:亚临床发作组 14d GFAP 表达 20×； d:亚临床发作组 28d GFAP 表达 20×；

**图 3 免疫荧光检测海马齿状回 GFAP 表达**

**表 2 大鼠缺氧后 14 天、28 天相关脑区 GFAP 免疫阳性细胞数目($\bar{x} \pm s$)**

| Group | Temporal cortex | | Hippocampal DG | |
|---|---|---|---|---|
| | 14d($n$=4) | 28d($n$=4) | 14d($n$=4) | 28d($n$=4) |
| Control | 103.37 ± 5.43 | | 117.44 ± 9.33 | |
| Non-subclinical seizures | 119.32 ± 6.32 | 116.75 ± 9.93 | 134.29 ± 7.75[c] | 140.21 ± 7.48[c] |
| Subclinical seizures | 143.56 ± 7.25[ab] | 152.75 ± 6.64[ab] | 157.34 ± 9.21[ab] | 186.15 ± 6.66[abd] |

a:$P<0.01$ vs control;b:$P<0.05$ vs non-subclinical seizures;c:$P<0.05$ vs control;d:$P<0.05$ vs 14d subclinical seizures

维普资讯 http://www.cqvip.com



组 GFAP 含量显著高于非亚临床发作组和对照组($P<0.05$)，亚临床发作组 28 天 GFAP 含量明显高于 14 天($P<0.05$)。

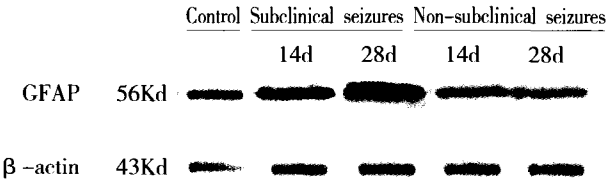



**图 4　三组海马免疫印迹检测 GFAP 含量结果**

## 3　讨　论

大鼠缺氧后，脑电图出现弥漫性慢波增多，Nissle 染色显示大鼠弥漫性缺氧性脑损伤形成，病变累及海马、皮层、皮层下结构等区域，这些部位的神经元排列紊乱、稀疏，肿胀、变性、坏死，证明此方法处理的大鼠存在缺氧性脑损伤。在缺氧处理后发现部分大鼠脑电图呈现弥漫性慢波背景基础上出现棘波、尖波、尖慢波等痫性放电。痫性发作以电生理记录样放电为标准，即亚临床发作或临床前发作，出现现棘波、尖波或高波幅慢波放电。根据大鼠缺氧后脑电图呈现的异常波形，因此可称为缺氧性脑损伤后亚临床发作或临床前发作。目前国内外类似的研究少，本研究亚临床发作率为 19.67%。临床上，各种原因所致的缺氧性脑损害并不少见，其后并发癫痫发作常属难治性癫痫的范畴。但动物实验中很难观察到通过缺氧诱发出典型的痫性发作，但脑电图可记录到痫性放电，因此，对缺氧性脑损伤后早期亚临床发作的研究有助于探讨此类癫痫发病机制。

海马、皮层神经元对缺氧敏感，其中海马 CA1，CA3 和门区的抑制性中间神经元是海马结构内最易受损的部位。研究显示癫痫发作间期放电始自 CA1 区，海马 CA3 区的锥体细胞是发作间期棘波放电的起搏器，海马的三级突触局部回路是癫痫发生的结构基础，痫性发作多伴有海马结构异常。海马 CA1 区、颞叶皮层神经元脱失的病理损害可能扰乱该区域 GABA 能神经元介导的痫性抑制作用[6]。脑缺氧损伤后神经元脱失，残存神经元的代偿性异常兴奋或可复性改变可能是癫痫发作敏感性增强的结构基础[7]。本实验 Nissle 染色结果显示亚临床发作大鼠海马 CA1 区 、CA3 区、颞叶皮质的神经元数目显著减少，残存神经元胞体萎缩，胞浆浓缩，突起减少或消失，非亚临床发作的大鼠海马 CA1 和 CA3 区神经元也有脱失。提示缺氧损伤致神经元脱失，可能使痫性发作敏感性增加，也可能是造成缺氧损伤后痫性发作的重要机制之一。本实验显示亚临床发作大鼠神经元脱失更显著，可能是缺氧损伤与痫性发作共同作用的结果，也可能为缺氧损伤直接所致，从而导致痫性发作。

星形胶质细胞具有营养、支持和保护神经元作用，并积极参与神经元的电生理活动，而 GFAP 是星形胶质细胞激活的有效指标之一。近年对癫痫患者和动物模型的脑组织病理研究证实癫痫的发生和发展过程中均有星形胶质细胞增生和 GFAP 表达的增加，表明星形胶质细胞参与了癫痫发生发展过程，但这些变化在癫痫发病中是原因还是结果仍不十分清楚。Dutuit 等[8]对遗传性失神性癫痫大鼠皮质和丘脑的星形胶质细胞 GFAP 表达研究，发现星形胶质细胞的变化在癫痫形成之前就已经出现的，说明星形胶质细胞的变化参与癫痫的形成过程。星形胶质细胞参与维持 $Na^+$、$K^+$的平衡，摄取和合成 GABA，减少神经元过度兴奋等调制作用。当病理情况下如脑缺血、缺氧时，神经胶质细胞内的碳酸酐酶不能相应增高，导致细胞内酸碱失调；GABA 缺乏，细胞外谷氨酸浓度增加；神经元细胞外 Na，K 浓度平衡失调，使神经细胞兴奋阈值降低，导致神经元易于放电，引起癫痫发作，而此时星形胶质细胞就可能启动代偿机制以调制神经元兴奋性[9]。本实验结果显示缺氧损伤后亚临床发作组与非亚临床发作组大鼠海马 GFAP 表达明显增强，而亚临床发作组有随时间延长逐渐增加的趋势，以海马区为著，提示缺氧后有星形胶质细胞被激活，星形胶质细胞早期激活增生可能是机体的代偿保护机制以调整神经元的内外环境改变，降低其兴奋性，而星形胶质细胞后期持续激活增生及乃至胶质瘢痕的形成可能是缺氧损伤后反复痫性发作的重要机制之一。

## 参　考　文　献

[1] Victor M, Ropper AH. Admas and Victor, s Principles of Neurology 7th[M]. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc. 2001. 1184-1185.

[2] Yang SN, Huang CB, Yang CH, et al. Impaired SynGAP expression and long-term spatial learning and memory in hippocampal CA1 area from rats previously exposed to perinatal hypoxia-induced

（下转第 1319 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com



法[1]。因此,乙肝疫苗的应用是控制和预防乙肝的根本措施。

临床资料显示,来就诊的本市儿童 HBsAg 阳性率为 4.44%, 明显低于我国普通人群乙肝病毒携带率; 大三阳和小三阳的百分比分别为 3.21%和 0.99%,也低于普通人群水平;而抗 -HBs 阳性率为 46.56%,明显高于普通人群。由于本研究的全部对象均来自医院, 而非从一般人群中进行的调查,因此结果不一定能准确反映本市儿童的乙型肝炎病毒的感染情况,但实验数据在一定程度上说明我市儿童的乙肝主动免疫工作开展有一定成效,这将对提高下一代的人口素质发挥积极作用。但由于受检儿童中乙肝两对半全阴性比例高达 47.08%,这部分人在未来生活中的感染和免疫情况直接关系到人群乙肝携带率的高低,建议对 HBsAg 阴性的儿童坚强乙肝疫苗接种。

Pre-S1 是乙肝病毒表面蛋白的一种,它通过增强表面抗原的免疫原性帮助病毒感染细胞,因此在一定程度上可以反映乙肝病毒的感染和增殖情况[7,8]。通常临床认为 HBeAg 是表征病毒增殖活跃和具有强烈传染性的指标[9],文献报道二者联合检测对判断乙肝患者体内病毒增殖情况和传染性更灵敏和有效[10]。但我们检测结果显示 HBeAg 的阳性率更高,Pre-S1 在临床医疗实践中的价值还有待进一步研究,考虑到医疗成本和病人经济负担,是否需要将两对半和 Pre-S1 同时检测还有待商榷。

一般研究认为,HBeAg 不会在 HBsAg 阴性的情况下出现, 但我们检出 1 例 HBeAg/ 抗 -HBc 阳性的患者,这是一种特殊的模式表现还是 HBsAg 漏检引起,有待进一步研究。另外,对于乙肝两对半全阴性而 Pre-S1 为阳性的 5 例患者,为明确乙肝病毒感染情况, 最好行乙肝病毒 DNA 的 PCR 定量检测进一步分析原因[11]。

## 参 考 文 献


[1] 赵 鸿,斯崇文.慢性乙型肝炎治疗的最新进展[J]. 传染病信息,2006;19(4):161-162.

[2] 张曙浩,王 丽,祝木生.深圳特区四组人群 14621 人的乙型肝炎两对半调查报告[J]. 临床和实验医学杂志,2006;5(7):1042-1043.

[3] 苏红丽,封秀红.农村 18 岁以下人群乙肝疫苗接种率及乙肝病毒感染率调查[J]. 医药论坛杂志,2004;25(19):29-30.

[4] 谢新宝,朱启镕.乙型肝炎病毒母婴传播和阻断的研究进展[J]. 传染病信息,2006;19(3):101-102.

[5] 丁 玎,黄送榜,蔡丽莺.江门市卫生学校入校学生 HBsAg 携带情况及疫苗接种效果观察[J]. 苏州大学学报,2003;23(4):419-420.

[6] 陈 栋,朱传新,胡玉琴,等.温州市不同人群乙肝病毒感染情况分析[J]. 中国热带医学,2007;7(1):164-165.

[7] 陈海蔚,徐令清. 乙肝病毒血清标志物、PreS1 抗原检测与肝癌诊断的关系[J]. 实用预防医学,2006;13(3):752-753.

[8] 刘新焕,徐育红,刘 杨,等.乙型肝炎病毒前 S1 蛋白的检测及临床意义[J]. 中华临床医学研究杂志,2006;12(9):1266-1267.

[9] 杨丹红,鄢卫星,吴 炜. HBV 感染者在不同感染期血清 HBV-DNA 含量变化及意义[J]. 临床肝胆杂志,2006;22(6):45-451.

[10] 曾 平,胡 娟,古 宇.PreS1Ag、HBeAg 和 HBV-DNA 的对比检测与分析[J]. 西南国防医药,2006;16(6):604-606.

[11] 刁奇志,王贵学.HBV-DNA 与 preS1 抗原均阳性患者 HBeAg 阴性的原因探讨[J]. 临床检验杂志,2006;24(5):346-347.


(上接第 1259 页)


insults:beneficial effects of A68930[J]. Neurosci Lett,2004;371(1):73-78.

[3] 彭 斌,李舜伟,谭会兵. 缺氧诱导大鼠脑细胞低氧诱导因子一 1α 表达的研究[J].中风与神经疾病杂志,2002;19(1):67-69.

[4] Hartings JA,WilliamsAJ,Tortella FC. Occurrence of nonconvulsive seizures,periodic ep ilep tiform discharges, and intermittent rhythmic delta activity in rat focal ischemia[J]. Exp Neurol,2003;179(2):139-149.

[5] Niederhauser JJ,Esteller R,Echauz J,et al. Detection of seizure precursors from depth-EEG using a sign periodogram transform[J]. IEEE Trans Biomed Eng,2003;50(4):449-458.

[6] Veliskova J,Claudio OI,Galanopoulou AS,et al. Seizures in the developing brain[J]. Epilepsia,2004;45(suppl 8):6-12.

[7] Chen WF,Chang H,Huang LT,et al.Alterations in long-term seizure susepibility and the complex of PSD-95 with NMDA receptor from animals previously exposed to perinatal hypoxia[J]. Epilepsia,2006;47(2):288-296.

[8] Dutuit M,Didier2Baz è s M,Vergnes M,et al. Specific alteration in the expression of glial fibrillary acidic protein, glutamate dehydrogenase,and glutamine synthetase in rats with genetic absence epilepsy[J]. Glia,2000;32(1):15-24.

[9] 张秀丽. 星形细胞在癫发病机制中作用的研究进展[J]. Foreign Medical Science. Section on Neurology& Neuro-surgency,2001;28(1):38-40.