DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000852

微管相关蛋白-1B 在弥漫性轴索损伤中的表达变化与意义

张　鹏[1],赵敏珠[1],朱士胜[2],刘　梦[1],高　军[1],李红卫[3],李剑波[1]

(1. 重庆医科大学基础医学院法医学教研室,重庆　400016;2. 重庆医药高等专科学校医学技术院,重庆　401331;
3. 重庆市公安局刑警总队技术处,重庆　400021)

【摘　要】目的:观察微管相关蛋白-1B(microtubule-associate protein 1B,MAP1B)在 SD 大鼠弥漫性轴索损伤(diffuse axonal injury,DAI)后脑组织中表达的变化,探索其表达变化的意义。**方法**:采用改良的 Marmarou 法建立 SD 大鼠 DAI 模型,分为空白对照组(10 只,不予任何处理),假打击组(10 只,给予致伤组相同的打击前准备,但不予以打击),致伤 6 h 组(10 只),致伤 1 d 组(10 只)和致伤 3 d 组(10 只),分别于打击 6 h、1 d、3 d 后,处死动物,提取脑组织,结合 Western blot 和免疫组化方法,观察 SD 大鼠脑组织中 MAP1B 表达的变化。**结果**:Western blot 结果显示致伤 6 h 组(0.50 ± 0.07)、致伤 1 d 组(0.56 ± 0.07)和致伤 3 d 组(0.50 ± 0.06)中 MAP1B 表达水平较空白对照组(0.30 ± 0.06;P=0.001,P=0.000,P=0.001)、假打击组(0.30 ± 0.04;P=0.001,P=0.000,P=0.001)明显升高。免疫组化结果显示致伤 6 h 组(4.70 ± 0.79)、致伤 1 d 组(4.78 ± 0.86)和致伤 3 d 组(4.70 ± 0.89)中 MAP1B 表达水平较空白对照组(4.06 ± 1.15;P=0.023,P=0.007,P=0.023)、假打击组(3.90 ± 1.46;P=0.002,P=0.000,P=0.002)明显升高。**结论**:SD 大鼠 DAI 后脑组织中 MAP1B 表达水平上调,提示其参与了 DAI 后轴索损伤的病理改变过程,并可能在稳定、修复及再生受损轴索的机制中起着重要作用。

【关键词】弥漫性轴索损伤;微管相关蛋白-1B;轴索修复;SD 大鼠

【中图分类号】R651.1+5　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2015-03-16

Expression and significance of microtubule-associate protein 1B in rats with diffuse axonal injuries

Zhang Peng[1], Zhao Minzhu[1], Zhu Shisheng[2], Liu Meng[1], Gao Jun[1], Li Hongwei[3], Li Jianbo[1]

(1. Teaching and Research Section of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University; 2. Faculty of Medical Technology, Chongqing Medical and Pharmaceutical College; 3. Technical Department of Interpol Corps of the Chongqing Police Bureau)

[Abstract]*Objective*: To examine the expression of the microtubule-associate protein 1B(MAP1B) in rats with diffuse axonal injury (DAI) as well as to elucidate the mechanisms of MAP1B in the procession of axonal repairment. ***Methods***: DAI was induced in adult male SD rats using an injury model adapted from Marmarou. The rats were divided into five groups: injured 6 h group(n=10), injured 1 d group(n=10), injured 3 d group(n=10), sham group(n=10) and sham-injured group(n=10). The animals were sacrificed at 6 h, on 1 d and 3 d post injury. Western blot and immunohistochemistry were performed to observe the expression of MAP1B in rats with DAI. ***Results***: Western blot and immunohistochemistry analyses showed MAP1B expression was up-regulated in the brain tissues of injured 6 h group, injured 1 d group, injured 3 d group than in sham group and sham-injured group. ***Conclusion***: Expression of MAP1B is increased in the brain tissues of injury group, indicating that MAP1B may be involved in the pathophysiological mechanisms of DAI and may play an important role in the repair of the axon after head trauma.

[Key word]diffuse axonal injury; microtubule-associate protein 1B; repairment; SD rats

作者介绍:张　鹏,Email:972421821@qq.com,
研究方向:法医病理学。

通信作者:李剑波,Email:ljb2032008@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81273344);上海市法医学重点实验室开放课题资助项目(编号:KF1105)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160114.2221.004.html
(2016-01-14)

弥漫性轴索损伤(diffuse axonal injury,DAI)是头部受到外力作用后发生成角或旋转加/减速运动所造成的弥漫分布于脑白质、以轴索损伤为主要改变的一种原发性脑实质的损伤,其发病机制尚不明确。DAI 的特征性病理改变是轴索广泛的损害,胼胝体局灶性出血和上脑干背外侧象限局灶性出血,即 DAI 的三联征[1]。目前认为,DAI 可能是导致颅脑外伤后患者高植物生存率、高死亡率的主要原因之一,临床迄今尚无有效治疗 DAI 的药物和措施。

微管相关蛋白-1B(microtubule-associate protein 1B,MAP1B)是微管相关蛋白的一员,主要表达于神经元细胞,具有稳定微管结构的功能,它被认为在轴索形成及生长中发挥重要作用[2]。长期以来,大多数学者认为 MAP1B 在生长的神经元中高表达,而在成熟的神经系统中低表达,但最近有研究发现,MAP1B 在成熟 SD 大鼠脑组织缺血后表达升高,这可能与其稳定及修复受损轴突的功能相关。前期研究显示,DAI 后脑组织由于脑血管流速的下降也处于缺血缺氧状态[3],因此,本课题对 SD 大鼠 DAI 后脑组织 MAP1B 表达水平进行检测,探讨了 MAP1B 在 DAI 中的表达变化与意义,为进一步研究轴索损伤的病理生理机制提供帮助。

1 材料与方法

1.1 实验材料

清洁级健康成年雄性 SD 大鼠 70 只,体质量(350±50) g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 DAI 模型的建立 采用改良的 Marmarou[4]法建立 SD 大鼠 DAI 模型,按照随机抽样法抽取 50 只 SD 大鼠,用水合氯醛溶液(10%,0.35 ml/100 g)腹腔注射麻醉,麻醉成功后,头顶部常规脱毛、消毒,沿中线切开头皮,暴露颅骨,将直径 10 mm、厚 3 mm 的打击垫片用牙科磷酸锌水门汀固定于颅顶的冠状缝与人字缝之间的中央部,将大鼠俯卧位固定于致伤装置的海绵床上,使其头顶部的打击垫片中央正对致伤装置不锈钢管的下端开口,且与重锤(不锈钢质,450 g)底面平行,通过致伤装置的悬线将重锤提升至 1.5 m 高度后放松悬线,使重锤自由下落至固定于大鼠头顶部的垫片上,然后迅速撤离海绵床,防止重锤再次打击。随后将 SD 大鼠移至操作台,取出垫片,消毒、缝合手术切口。11 只 SD 大鼠打击后即刻死亡,死亡率为 22%;其余 SD 大鼠打击后出现昏迷,昏迷时间为(4.80±1.48) min。

1.2.2 实验分组 存活的 39 只大鼠按照随机抽样法抽取 30 只,分为致伤 6 h 组、致伤 1 d 组和致伤 3 d 组,每组 10 只;假打击组 10 只大鼠给予上述打击致伤组同样的手术和打击前准备,但不给予打击;空白对照组 10 只大鼠不做任何处理。

1.2.3 标本的收集 分别于打击后 6 h、1 d、3 d 断头处死各组大鼠,取出脑组织,并沿矢状轴将脑组织一分为二,一半置于无菌无酶冻存管后迅速放入液氮罐中暂时保存,以备 Western blot 检测;另一半置于 10%中性福尔马林溶液中固定 1 周后,石蜡包埋,制成 5.0 μm 厚的切片进行嗜银染色及免疫组织化学检测。

1.2.4 Western blot 检测各组 MAP1B 的表达 将冻存的脑组织置于预冷的 1×PBS 液中洗去血液和其他组织,称重后放入置于冰上的碾钵中,按组织重量:裂解液按照 1:10 的比例,加入后进行匀浆,收集裂解液,放置 30 min,12 000 g 离心 30 min,吸取上清,Bradford 法测定蛋白浓度。取 30 μg 蛋白,加 5×SDS loading buffer 后 100 ℃变性 10 min,8%聚丙烯酰胺凝胶电泳,半干式电转移至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h。滴加一抗(1:1 000),4 ℃过夜。TBST 洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:5 000),室温孵育 1 h。TBST 洗膜后,加入 ECL 试剂,暗室中曝光于 X 线胶片上,显影、定影。采用美国 Image Lab 凝胶成像分析软件进行图像扫描和分析,β-actin 作为内参对蛋白质条带进行校正。

1.2.5 免疫组织化学法检测各组 MAP1B 的表达 检测试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供,具体操作步骤如下:切片、脱蜡、水化,枸橼酸盐溶液微波热修复 10 min,3% H_2O_2 室温 10 min 灭活内源性酶,滴加山羊血清室温封闭 20 min,甩去多余液体。滴加一抗(1:100),4 ℃过夜,复温 1 h,滴加山羊抗兔 IgG,室温 20 min,滴加 SABC 液,室温 20 min,DAB 显色、复染、分化、返蓝后中性树脂封片。阳性对照由试剂公司提供;PBS 代替一抗作为阴性对照。以细胞质中出现明显的棕黄色颗粒作为免疫组化阳性。

每组 10 张切片,每张切片随机选取 5 个高倍视野(400 倍)。结果的定量分析:显示阳性反应细胞的百分率及阳性反应的强度作为免疫组化定量的指标。显示阳性反应细胞的百分率分为 5 个等级:<10%,10%~30%,30%~50%,50%~70%和>70%,分别对应于不同的评分:0、1、2、3、4;细胞阳性反应强度分为 4 个等级:无、轻度、中度和重度,分别对应于不同的评分:0、1、2、3。2 个评分相加得到 1 个处于 0~7 之间的数值,用于免疫组化结果的定量分析。

1.3 统计学处理

所得数据均采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计学处理。计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间差异采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Tukey 法,检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 嗜银染色验证 DAI 模型建立成功

嗜银染色结果显示:致伤 6 h 组、致伤 1 d 组和致伤 3 d 组轴索肿胀、扭曲、断裂,可见轴索收缩球(axomal retraction ball,ABR)形成(箭头所示);空白对照组与假打击组轴索走行自然、光滑,粗细基本均匀,排列紧密(图 1)。

2.2　Western blot 检测空白对照组、假打击组、致伤 6 h 组、致伤 1 d 组及致伤 3 d 组 MAP1B 的表达

Western blot 结果显示致伤 6 h 组、致伤 1 d 组及致伤 3 d 组 MAP1B 的表达量（目的蛋白条带与内参的灰度值之比为 0.50 ± 0.07，0.56 ± 0.07，0.50 ± 0.06）较空白对照组（0.30 ± 0.06）、假打击组（0.30 ± 0.04）增加（图 2）。经统计学分析，空白对照组与致伤 6 h 组、致伤 1 d 组、致伤 3 d 组比较有统计学差异（F=18.525；P=0.001，P=0.000，P=0.001），假打击组与致伤 6 h 组、致伤 1 d 组、致伤 3 d 组比较有统计学差异（F=18.525；P=0.001，P=0.000，P=0.001）。

2.3　免疫组织化学法检测空白对照组、假打击组、致伤 6 h 组、致伤 1 d 组及致伤 3 d 组 MAP1B 的表达

与空白对照组（图 3A）相比，致伤 6 h 组、致伤 1 d 组及致伤 3 d 组 MAP1B 明显高表达（图 3C~E，F=7.643；P=0.023，P=0.007，P=0.023）；与假打击组（图 3B）相比，致伤 6 h 组、致伤 1 d 组及致伤 3 d 组 MAP1B 明显高表达（图 3C~E，F=7.643；P=0.002，P=0.000，P=0.002）。箭头所示 MAP1B 在致伤 6 h 组、致伤 1 d 组及致伤 3 d 组神经元细胞质及轴突中高表达。免疫组织化学法检测结果与 Western blot 结果一致。

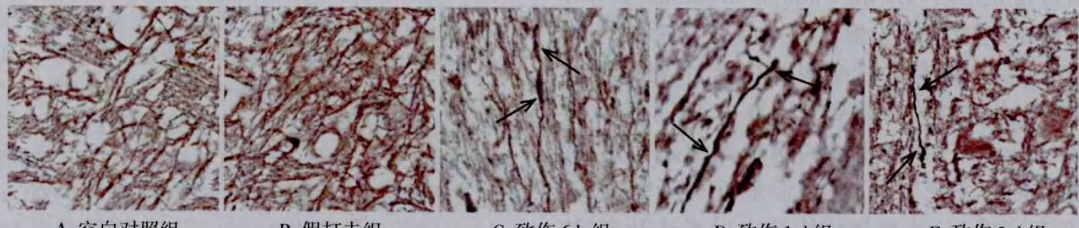
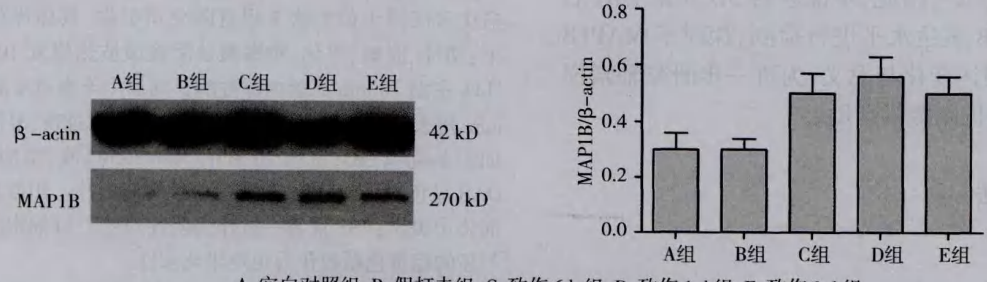


图 1　致伤 6 h 组、致伤 1 d 组和致伤 3 d 组可见轴索肿胀、断裂、ARB 形成（400 ×）

Fig.1　Axonal swelling, fracture, ARB formation observed in injured 6 h group, injured 1 d group and injured 3 d group (400 ×)



A. 空白对照组；B. 假打击组；C. 致伤 6 h 组；D. 致伤 1 d 组；E. 致伤 3 d 组

图 2　MAP1B 在空白对照组、假打击组、致伤 6 h 组、致伤 1 d 组及致伤 3 d 组 SD 大鼠脑组织中的表达水平（$\bar{x} \pm s$，n=10）

Fig.2　Expression of MAP1B in brain tissues of sham group, sham-injured group, injured 6 h group, injured 1 d group and injured 3 d group ($\bar{x} \pm s$, n=10)

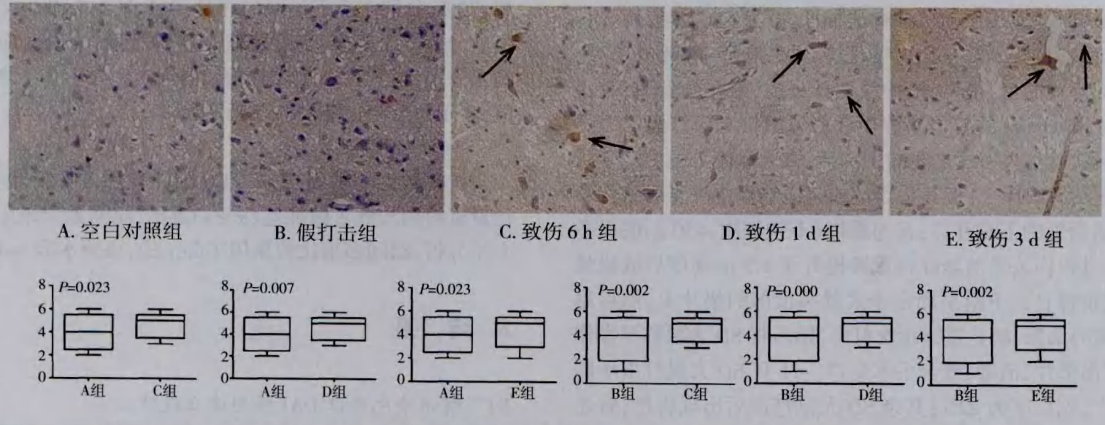


图 3　免疫组化法检测 MAP1B 在空白对照组、假打击组、致伤 6 h 组、致伤 1 d 组及致伤 3 d 组 SD 大鼠脑组织中的表达（400 ×）；采用箱图反应各组 MAP1B 表达结果

Fig.3　Expression of MAP1B in brain tissues of sham group, sham-injured group, injured 6 h group, injured 1 d group and injured 3 d group by immunohistochemistry (400 ×); Box-plot was performed to observe the expression of MAP1B

3 讨 论

DAI是脑深部组织因加速或减速运动形成的剪应力作用导致的一种严重的颅脑损伤，其主要病理改变为广泛的轴索损伤。过去认为，轴索在外力打击的瞬间即刻发生断裂，断端处收缩形成收缩球。但近期研究发现，颅脑外伤时最大剪应力作用部位与轴索损伤部位并不一致，即剪应力作用于轴索后并未导致轴索断裂及收缩球形成；同时发现大部分受损的轴索并不会即刻断裂，而是经历一系列复杂的连锁病理反应，包括由于脑外伤后脑血流降低、脑组织缺血缺氧等，导致轴索的运输障碍、肿胀，继而在肿胀处断裂，形成收缩球，即继发性轴索断裂或迟发型轴索断裂[5]。这些研究显示，DAI 后脑组织可能存在轴索修复的机制来稳定、修复部分受损的轴索，使其在外力打击后保持组织结构的完整。

MAP1B 是微管相关蛋白家族的重要组成部分，它表达于神经元，并与微管相结合，起到稳定微管结构的作用。Meixner 等[6]将大鼠 MAP1B 基因敲除，发现大鼠脑组织中含有丰富穿过大脑中线轴突的胼胝体消失，从基因水平上证明敲除 MAP1B 破坏了轴突正常生长机制；另有研究报道[7]，*MAP1B* 可以通过与神经细胞胞质中 EB1(end-binding 1)和 EB3 (end-binding 3)(2 种微管正端跟踪蛋白)相互作用，控制微管的动力学改变，从而稳定损伤轴索中微管结构、促进轴索的延伸，达到修复或再生的作用。MAP1B 在轴索生长及修复过程中发挥如此关键作用，那么，其在 DAI 后脑组织中表达变化如何，国内外尚无研究。

本研究首次发现 MAP1B 在 SD 大鼠 DAI 后6 h、1 d、3 d 脑组织中表达升高，且各致伤组表达水平无显著差异，不仅印证了 MAP1B 可在成年大鼠脑缺血损伤后表达升高的观点，而且提示其在 DAI 后受损轴索的稳定、修复甚至再生中可能发挥重要作用。本试验结果也显示 MAP1B 在致伤 6 h 组、致伤 1 d 组与致伤 3 d 组中表达水平无显著差异，提示其在脑组织中表达水平在伤后 3 d 内没有明显变化；其表达水平与致伤程度是否相关，有待进一步的研究。

综上所述，本研究发现具有稳定、修复及再生受损轴索功能的 MAP1B 在 DAI 后脑组织中表达水平升高，且在 6 h、1 d 和 3 d 变化不显著，MAP1B 在 DAI 后脑组织中的这种表达变化及其规律，不仅为进一步探索 DAI 后轴索损伤的发病机制提供了新的研究方向，也为早期及轻型 DAI 的诊断提供科学的理论依据；同时，对于临床 DAI 治疗靶点的确定以及预后的判断提供了重要参考。

本研究结果来自动物试验的基础研究，MAP1B 在人 DAI 的表达变化规律如何，本课题组将在下一阶段对其进行深入研究。

参 考 文 献

[1] Yang T,He G,Zhang X,et al.Preliminary study on diffuse axonal injury by Fourier transform infrared spectroscopy histopathology imaging [J].J Forensic Sci,2014,59(1):231-235.

[2] Villarroel-Campos D,Gonzalez-Billault C.The MAP1B case:an old MAP that is new again[J].Dev Neurobiol,2014,74(10):953-971.

[3] Li J,Li XY,Feng DF,et al.Biomarkers associated with diffuse traumatic axonal injury:exploring pathogenesis,early diagnosis,and prognosis[J].J Trauma,2010,69(6):1610-1618.

[4] Marmarou A,Foda MA,van dan Brink W,et al.A new model of diffuse brain injury in rats:Part 1 pathophysiology and biomechanics [J].J Neunosurg,1994,80(2):291-300.

[5] 冯 华，朱 刚，林江凯.颅脑创伤基础与临床[M].北京：人民军医出版社，2011:255-269.

[6] Meixner A,Haverkamp S,Wassle H,et al.MAP1B is required for axon guidance and is involved in the development of the central and peripheral nervous system[J].J Cell Biol,2000,151(6):1169-1178.

[7] Tortosa E,Galjart N,Avila J,et al.MAP1B regulates microtubule dynamics by sequestering EB1/3 in the cytosol of developing neuronal cells[J].EMBO J,2013,32(9):1293-1306.

（责任编辑：冉明会）