

·基础研究·

运动训练对出血性脑损伤 GAP-43 基因及蛋白表达的影响*

李红玲¹ 葛艳萍¹ 刘春辉¹ 岳 崑¹ 曹慧芳¹

摘要 目的:观察运动训练对脑出血大鼠生长相关蛋白(GAP-43)基因及其蛋白表达的影响。方法:实验动物用健康雄性SD大鼠160只。先将96只大鼠随机分为3组,实验组(出血后运动,n=32)、对照组(出血后不运动,n=32)、假手术组(无出血不运动,n=32)。各组又分为术后第7天,第14天,第21天,第28天共4个时相点,每个时相点4只用于免疫组化检测,4只用于RT-PCR检测。实验组大鼠于术后第72小时开始跑笼训练,其余大鼠在标准笼内自由活动。再将另外64只随机分为脑出血后第6小时,第12小时,第24小时,第48小时,第72小时,第7天,假手术组和正常组,每组4只分别用于免疫组化和RT-PCR检测。结果:①免疫组化结果:GAP-43阳性细胞表达为细胞胞浆着棕黄色,阳性细胞主要分布于血肿周围和大脑皮质的神经元,实验组于脑出血后第12小时开始上调,持续到第7天,与正常组和假手术组相比差异有显著性($P<0.05$)。实验组于运动后第14天出现上调,第28天达高峰,与对照组相比差异有显著性($P<0.05$),实验组和对照组与假手术组相比差异有显著性($P<0.01$)。②RT-PCR结果:脑出血后第12小时GAP-43 mRNA表达一度升高,与对照组比差异有显著性($P<0.05$),之后维持较高水平,直到第14—28天。实验组表达于第14—28天与假手术组相比差异有显著性($P<0.05$),与对照组比($P>0.05$)。结论:GAP-43参与了脑出血后神经可塑性的发生,运动训练可促进GAP-43基因及蛋白表达,从而改善神经功能。

关键词 运动训练;脑出血;大鼠;生长相关蛋白-43

中图分类号:R493,R743.34 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-10-0884-04

The effects of exercises on expression of GAP-43 and GAP-43mRNA after ICH in rats/LI Hongling, GE Yanping, LIU Chunhui, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(10): 884—887

Abstract Objective: To investigate the effects of exercises on expression of GAP-43(growth associated protein-43) and GAP-43mRNA of neuronal cells after intracerebral hemorrhage(ICH) in rats. **Method:** Ninety-six male SD rats (body weight, 270—300g) were divided into three groups, trial group(ICH and exercises group, n=32), control group (ICH group, n=32) and sham operated group (no ICH without exercises, n=32). The rats brains were removed at the 7th d, 14th d, 21st d, 28th d after operation. The other 64 rats were divided into 8 groups (the 6th h, 12th h, 24th h, 48th h, 72th h, 7th d after ICH, sham operated and normal). The activations of GAP-43 and GAP-43mRNA were measured by immunohistochemistry and RT-PCR. The rats in trial group began cage-running exercises at the 72nd h after operation. The others lived in standard cages. **Result:** ①The result of immunohistochemistry: GAP-43-positive cells distributed around the hematoma and neuron of cortex. The number of GAP-43-positive cells was very little in sham-operation group. In trial group up-regulation of GAP-43 displayed at the 12th h after ICH, until the 7th d after ICH, and there was significant difference compared with sham operated group and normal group ($P<0.05$). There was up-regulation of expression of GAP-43 in trial group at the 14th d—28th d after operation, and there was significant difference in trial group and control group compared with sham operated group ($P<0.01$), but in trial group the expression of GAP-43 was on a higher level than that in control group ($P<0.05$). ②The result of RT-PCR: There was up-regulation of GAP-43mRNA at the 12th h after ICH in trial group, compared with control group ($P<0.05$). In trial group and control group there was higher expression at the 14th—28th d than that in sham-operated group($P<0.05$), but in trial group there was no significant difference compared with control group ($P>0.05$). **Conclusion:** The results suggested that GAP-43 participated in neuronal plasticity after ICH, and exercises training could clearly up-regulate the expression of GAP-43 and GAP-43-mRNA and improve neurological function.

Author's address Department of rehabilitation, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050000

Key words exercise; intracerebral hemorrhage; rats; growth associated protein-43

脑的可塑性和功能重组是神经康复包括脑卒中康复的主要机制。但这些研究主要是针对缺血性卒中中进行,国外仅有少数作者报告运动训练有益于脑

* 基金项目:河北省卫生厅科研基金项目(07042)

1 河北医科大学第二医院康复科,石家庄,050000

作者简介:李红玲,女,主任医师,博士,硕士研究生导师

收稿日期:2008-04-08

出血(intracerebral hemorrhage, ICH) 动物^[1-2], 但对其作用机制未进行深入研究。国内至今尚未见这方面的报道。本研究旨在观察运动训练对脑出血大鼠生长相关蛋白-43 (growth associated protein-43, GAP-43) 基因及其蛋白表达的影响, 从而探讨运动训练与出血性脑损伤后大脑可塑性的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器: 电泳仪 (DYY-12)、电泳槽 (DYCZ-40B) 和水浴式电转膜系统 (北京六一仪器厂); 超低温冰箱 (日本 SANYO 公司); 5417R 低温高速离心机、5415D 台式高速离心机 (德国 Eppendorf 公司) 和 Mastercycler384DNA 扩增仪 (德国 Eppendorf 公司); 756 型紫外分光光度计 (国产上海); GeneAmp 9600 型 PCR 仪 (美国 PE 公司); UVP 凝胶扫描系统 (美国 UVP 公司); 微量移液器 (德国 Gilson)。

1.1.2 主要试剂: 封闭用正常山羊血清、生物素标记羊抗兔 IgG、辣根酶标记链霉卵白素 (S-A/HRP)、DAB 显色剂和 APES (北京中山生物技术有限公司); 异丙醇 (北京益利精细化学品有限公司); 甘油 (丙三醇, 北京华美公司); EDTA (美国 Promega 公司); GAP-43 (北京中山生物技术有限公司); 丽春红 S、十二烷基硫酸钠和 β -巯基乙醇 (美国 Amresco 公司); 三羟甲基氨基甲烷 (Tris, 上海化学试剂有限公司); Red TaqDNA 聚合酶 (北京赛百盛公司); RT-PCR 引物 (上海生物工程公司合成); 反转录酶 (AMV-RT)、核糖核酸酶抑制剂 (RNasin)、dNTP、Taq DNA 聚合酶、随机引物 (Random primers) 和琼脂糖 (美国 Promega 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物与分组: 实验动物用健康雄性 SD 大鼠 160 只, 体重 270—300g, 由河北医科大学基础医学院实验动物中心提供, 清洁级, 以标准饲料和纯净水喂养, 饲养环境为我院动物室多层层流架, 恒温 (20—25℃)。其中 96 只随机分为 3 组, 实验组 (出血后运动 $n=32$)、对照组 (出血后不运动, $n=32$)、假手术组 (无出血不运动, $n=32$ 只)。试验组和对照组又分为术后第 7 天, 第 14 天, 第 21 天, 第 28 天共 4 个时相点, 每个时相点 4 只用于免疫组化检测, 4 只用于 RT-PCR 检测。试验组于术后第 72 小时开始跑笼训练 (具体方法见参考文献 3), 其余大鼠在标准笼内自由活动。另外 64 只随机分为出血后第 6 小时, 第 12 小时, 第 24 小时, 第 48 小时, 第 72 小时, 第 7 天, 假手术和正常组, 每时相点 4 只用于免疫组

化检测, 4 只用于 RT-PCR 检测。

1.2.2 动物模型建立: 参照李红玲等的方法^[3], 采用胶原酶 0.5U (胶原酶稀释浓度为 0.2U/ μ l 生理盐水) 诱导大鼠右侧尾状核脑出血模型, 假手术组操作方法同脑出血模型组, 但不注射胶原酶, 只注射同等剂量的生理盐水。

1.2.3 免疫组化标本采集: 于相应时间点将大鼠用速眠新注射液 (0.2ml/mg) 麻醉后, 迅速开胸, 经心脏至主动脉插管, 先用生理盐水约 100ml 冲洗血液, 然后以多聚甲醛约 400ml 先快后慢进行灌流固定 1.5—2h。迅速解剖切取出大脑, 去除额极 4mm 前部脑组织, 经脑表面穿刺点冠状切开标本, 取穿刺点后约 4mm 的脑组织, 放入 4% 多聚甲醛液固定, 经脱水、透明、石蜡包埋, 免疫组化备用。

1.2.4 GAP-43 检测: GAP-43 蛋白检测采用免疫组化 SP 法。具体步骤按试剂盒说明书进行, GAP-43 多克隆抗体, 工作浓度 1:50。Caspase-3 蛋白以细胞浆呈棕黄色着色为阳性细胞。随机选择 5 个视野, 然后算出每高倍 (400 \times) 镜下阳性细胞数。

1.2.5 RT-PCR 取材: 操作者严格操作, 戴口罩、帽子、手套, 由专人负责断头处死大鼠, 专人使用 200℃ 干烤的器械于手术台上留取右侧血肿周围大脑组织 100mg \times 2, 迅速将组织置于 4℃ DEPC 水中洗去血液后, 放入消毒冻存的 EP 管内, 投入液氮壶中, 然后放入 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2.6 RT-PCR 测定 GAP-43 mRNA 表达水平: 用 Trizol RNA 提取试剂提取细胞总 RNA, 紫外线分光光度计测定总 RNA 的浓度和纯度, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 的质量。cDNA 第一链合成后 37℃ 反转录 60min, 95℃ 5min 灭活反转录酶。反转录后 cDNA 作为 PCR 模板, 扩增。GAP-43 上游引物 5'-cga cag gat gag ggt aaa gaa ga-3', 下游引物: 5'-gtg agc agg aca gga gag gaa-3, R-GAP-43 基因扩增条件为: 94℃ 5min, 然后 94℃ 45s, 52℃ 45s 72℃ 45s 三步法 (35 个循环), 72℃ 延伸 5min。扩增目的片段长度分别为 149bp。同时扩增鼠 β -actin 用作内参照, 保证每次实验的相对可比性, 扩增的目的片段长度为 374bp。然后取 RT-PCR 产物 4 μ l, 加上样缓冲液 1 μ l, 在 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 EB) 上电泳, 80V, 45min, 用 UVP 凝胶图像成像系统拍摄打印实验结果, 用凝胶图像分析系统 (Gel-Pro Analyzer Version 3.0) 分析结果。

1.3 统计学分析

应用 State 8.0 软件进行分析。数据以均数 \pm 标准差表示, 各组均数的比较行单因素方差分析, 进行两两比较。

2 结果

2.1 GAP-43 免疫组化结果

阳性细胞表达为细胞胞浆着棕黄色,着色部位主要见于血肿周围和大脑皮质的神经元。正常大鼠脑组织表达很低,脑出血后第12小时开始上调,持续到第7天,与正常组(6.4±3.03)和假手术组(7.32±2.57)相比有显著性($P<0.05$),见表1。实验组和对照组于第14天时GAP-43蛋白表达开始上调,第28天达高峰,但试验组表达更显著,两组间差异有显著意义($P<0.05$),两组与假手术组相比差异有显著意义($P<0.01$),见图1(见前置彩色插页),表2。

表1 脑出血不同时间点与假手术及正常大鼠脑组织GAP-43阳性细胞和mRNA的表达 ($\bar{x}\pm s$)

	动物数	第6小时	第12小时	第24小时	第48小时	第72小时	第7天
GAP-43 阳性细胞	24	9.6±2.12	14.1±4.01 ^{①②}	12.8±2.73 ^{①②}	13.4±3.62 ^{①②}	13.96±3.17 ^{①②}	11.8±4.33 ^{①②}
GAP-43 mRNA	24	0.96±0.09	1.16±0.16 ^{①②}	0.88±0.15	0.81±0.13	0.70±0.16	0.94±0.27

与对照组比^① $P<0.05$;与正常组比^② $P<0.05$

表2 三组不同时间血肿周围组织GAP-43阳性细胞表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	第7天	第14天	第21天	第28天
实验组	16	16.32±2.5	19.75±2.99 ^{①③}	23.25±5.68 ^{①④}	31.12±3.30 ^{①④}
对照组	16	11.7±3.21	9.35±4.69	15.25±6.08 ^④	19.7±2.82 ^④
假手术组	16	7.5±2.08	7.0±4.76	6.75±3.5 ^②	7.6±4.03 ^②

与对照组比^① $P<0.05$;^② $P<0.01$;与假手术组比^③ $P<0.05$;^④ $P<0.01$

2.2 GAP-43 mRNA 结果

在149bp处和375bp处分别为GAP-43和 β -actin的扩增带。取GAP-43与 β -actin的比值为基因表达量。结果显示脑出血后第6小时开始GAP-43 mRNA表达上调,第12小时达到一高水平,与对照组(0.79±0.43)比有显著意义($P<0.05$),之后(第24小时—第7天)处于较高表达,但与对照组比无显著性差异($P>0.05$)。实验组和对照组GAP-43 mRNA表达于第14—28天较假手术组相比有显著意义($P<0.05$),但实验组与对照组比虽有增高趋势,但差异无显著性($P>0.05$),见图2,3,表1,3。

表3 三组不同时间血肿周围组织GAP-43 mRNA的表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	第7天	第14天	第21天	第28天
实验组	16	0.86±0.17	0.90±0.21 ^①	1.01±0.45 ^①	1.04±0.29 ^①
对照组	16	0.71±0.14	0.69±0.05 ^①	0.74±0.03 ^①	0.77±0.07 ^①
假手术组	16	0.47±0.15	0.46±0.08	0.48±0.09	0.50±0.12

^①与假手术组比 $P<0.05$

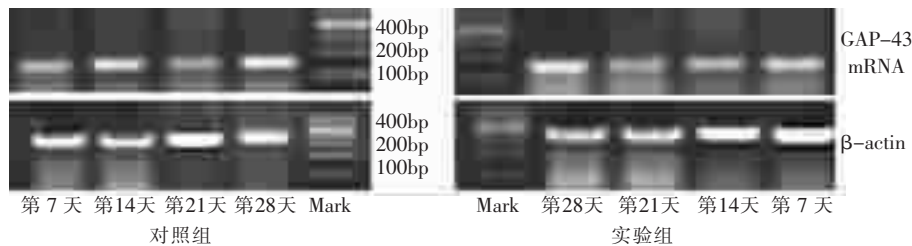


图2 实验组、对照组不同时间点GAP-43 mRNA表达

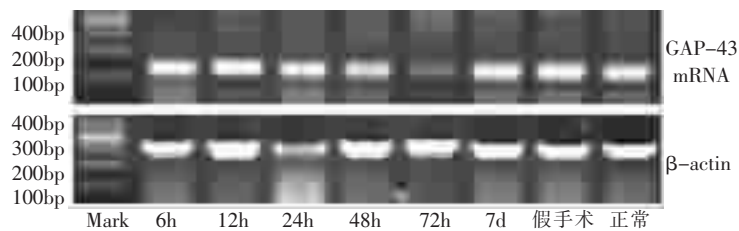


图3 出血后不同时间点、假手术组及正常大鼠GAP-43 mRNA表达

3 讨论

GAP-43(又称作 neuromodulin),是一种轴突膜蛋白,一种神经特异性蛋白质,参与神经细胞外生长及突触发育形成和神经细胞再生,在神经元发育和再生过程中呈现高水平表达,被作为突触生长的标志物。GAP-43能调解轴突延伸作用,改变细胞形态。GAP-43作为突触前膜的结构成分,为神经出芽反应代表性的结构蛋白,检测GAP-43可以较好的反应神经系统对损伤反应的可塑性^[4]。

有研究采用大鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,2h后给予再

灌注,之后在第6小时,第12小时,第2天,第7天,第14天,第21天,第28天应用免疫组化方法检测GAP-43和MAP-2,并通过双染进行这些蛋白的细胞定位。结果在梗死中心区域大多数受损神经元的GAP-43和MAP-2活性降低,但在缺血再灌注早期(6h内)梗死灶中心完整或有改变的神经元GAP-43和MAP-2活性增高,在缺血半暗带区GAP-43和MAP-2活性增高将持续更长时间。结果说明在短暂缺血后,半暗带区结构性蛋白GAP-43(轴突)和MAP-2(树突)选择性升高预示着缺血神经元的代偿和修复机制^[5]。

关于 GAP-43 在缺血性脑损伤中阳性表达的部位比较统一,主要分布于脑梗死灶的周围区^[6-8],如脑顶叶皮质区、纹状体区及海马区等。但 GAP-43 开始表达的时间及持续时间不尽相同,如有研究显示,缺血再灌注 2h 脑顶叶皮质区及纹状体区均有 GAP-43 阳性神经元表达增加^[6-7],再灌注 7d 达高峰,14d 达最低值^[7]。缺血再灌注 2h-14d 纹状体区 GAP-43 阳性高于海马区及皮质区^[8];脑缺血再灌注 6 小时后 GAP-43 表达逐渐增高,第 7d 达高峰,以后逐渐降低,21d 仍有表达^[9]。

本研究结果显示:脑出血后 GAP-43 阳性表达主要见于血肿周围和大脑皮质。GAP-43 蛋白于术后第 12 小时开始上升,持续到第 28 天,与正常组和假手术组相比有显著性。GAP-43mRNA 于脑出血后第 12 小时有一过性升高,虽然在第 24 小时—第 7 天无显著性改变(可能与实验样本量小有关),但仍提示脑出血后血肿周围组织和皮质的 GAP-43 会自发增高,存在神经自我修复的现象,支持上述结果。

关于运动与 GAP-43 的关系研究很少,但有研究显示^[10],应用 MCAO 大鼠模型进行分组对照研究,结果显示,丰富环境、探索学习和社交组大鼠的 GFAP、GAP-43 明显高于对照组。李玲等^[11]采用光化学法制成 MCAO 大鼠模型,将其随意分为功能训练组和制动组,康复组大鼠每天置于滚筒式网状训练器内转动训练,在平衡木,转棒上做行走训练,30min/d,5 次/周,结果显示,脑梗死后功能训练(21—28d)可促进大鼠行为恢复及脊髓前角 GAP-43 表达的增加。王炳高等^[12]的研究同样认为,早期康复运动促进大鼠大脑缺血后功能恢复的分子机理可能与缺血半影区 GAP-43 的表达提高有关。其他干预措施,如电针、药物(batroxobin)也可以增强 GAP-43 表达,改进梗死区病理变化^[6,13]。

但出血性脑损伤在这方面的实验研究目前尚未见报道。有临床研究将 100 例脑出血患者随机分为康复组和对照组各 50 例,康复组患者在急性期生命体征稳定后采用康复治疗,4 周后结果显示,早期康复治疗脑出血能明显改善患者的神经功能缺损程度,提高临床疗效,降低致残率^[14]。还有研究将 76 例脑出血患者分为早期康复组 40 例(生命体征稳定、神经病学体征不再进展后 48h—7d 开始功能训练)和晚期康复组 36 例(在发病后 3—4 周开始功能训练),疗前两组患者的 FMA(Fugl-Meyer 运动功能评定)、MBI 和临床神经功能缺损程度评分无显著性差异,治疗 1 个月后各项评分均较治疗前有明显改善,但早期康复组的改善程度更大^[15]。薄宇清等^[16]的研

究有同样认为,早期康复能明显改善脑出血患者的运动功能和 ADL。本作者^[3]在以前的研究中证实,早期(术后 24h)转笼运动训练可以改善脑出血大鼠的神经功能损伤,支持上述研究结果。本研究通过转笼运动对脑出血大鼠进行干预,发现实验组在出血灶周围和皮质均有 GAP-43 的表达上调,尤以运动后第 21 天—第 28 天明显,提示运动可以通过上调 GAP-43,从而改善其功能状态。进一步揭示了运动训练改善脑出血患者功能状态的机制。

GAP-43 参与出血性脑损伤后的神经修复,而运动训练可使之强化,进而改善其神经功能恢复。

参考文献

- [1] Debow SB, Davies ML, Clarke HL, et al. Constraint-induced movement therapy and rehabilitation exercise lessen deficits and volume of brain injury after stratal hemorrhage stroke in rats[J]. Stroke, 2003, 34:1021—1026.
- [2] Lee HH, Shin MS, Kim YS, et al. Early treadmill exercise decreases hemorrhage-induced neuronal cell death and increases cell proliferation in the dentate gyrus of streptozotocin-induced hyperglycemic rats [J]. J Diabetes Complications, 2005, 19 (6): 339—346.
- [3] 李红玲,刘春辉,葛艳萍,等. 运动训练对脑出血大鼠神经功能恢复的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28(10): 649—652.
- [4] 郭宗军,丰岩清,郭云良,等. 神经生长因子对脑缺血在灌注后生长相关蛋白和突触素表达的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22(4):201—204.
- [5] Li Y, Jiang N, Powers C, et al. Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats [J]. Stroke, 1998 Sep, 29(9): 1972—1980.
- [6] Wu W, Guan X, Zhang X, et al. GAP-43 expression and pathological changes of temporal infarction in rats and effects of batroxobin[J]. J Tradit Chin Med, 2002, 22(1):42—46.
- [7] Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats[J]. Stroke, 1995, 26(11):2135—2144.
- [8] Du XM, Zhang D, Liu GY. Expressions of survivin and growth associated protein-43 to inhibit the apoptosis of neurons after cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu, 2007, 11 (25):4927—4930.
- [9] 丰岩清,郭云良,石秉霞. 脑缺血再灌注后生长相关蛋白和突触素表达及其意义[J]. 青岛大学医学院学报, 2000, 36(4):247—249.
- [10] 李阔,高俊淑,李娜,等. 不同环境对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质 GFAP、GAP-43 的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(7):581—583.
- [11] 李玲,饶志仁. 康复训练对脑梗塞偏瘫大鼠的行为学和脊髓 GAP-43 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2001, 16(3):132—136.
- [12] 王炳高,王守彪,郭云良,等. 早期康复训练对脑缺血后行为恢复的影响及其分子机理 [J]. 中国康复医学杂志, 2004, 19(3): 196—199.
- [13] Yi W, Xu NG, Wang GB. Experimental study on effects of electro-acupuncture in improving synaptic plasticity in focal cerebral ischemia rats [J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 2006, 26(8):710—714.
- [14] 王淑芳,林树芬,康西忠,等. 早期康复治疗对脑出血病人神经功能的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2006, 4(7):634—635.
- [15] 彭化生,袁春兰. 康复介入时间对脑出血患者功能恢复的影响 [J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(2):150—151.
- [16] 薄宇清,刘惠萍,马连萍. 康复治疗脑血管病的疗效观察[J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(8):623—623.