

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.07.014

辛伐他汀对创伤性脑损伤大鼠胶质原纤维酸性蛋白表达的影响

靳春杰¹, 周 伟², 江荣才³, 张士俊¹

(1. 天津市北辰医院神经外科, 天津 300400; 2. 天津中医药大学第二附属医院眼科, 天津 300150;

3. 天津市神经病学研究所, 天津 300052)

【摘 要】目的: 利用大鼠创伤性脑损伤(Traumatic brain injury, TBI)模型, 探讨胶质原纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein, GFAP)在脑组织的表达变化规律及辛伐他汀(Simvastatin, SIM)对其的影响。方法: 5 周龄 SD 大鼠 54 只, 随机分 3 组: 假致伤组、对照组、治疗组, 每组 18 只。对照组、治疗组参照 Feeney 氏法制造 TBI 模型。造模前晚及术后每晚治疗组给予 SIM 10 mg/kg 灌胃; 对照组给予等量淀粉灌胃; 于伤后 3、12、24 h 和 3、7、14 d 处死取脑。采用免疫组化技术, 检测大鼠伤侧海马 CA3 区 GFAP 表达变化情况。结果: 对照组伤后 3 h 即见 GFAP 阳性表达增强, 3、7 d, GFAP 阳性细胞增加达到高峰($P < 0.01$)。治疗组伤后治疗 7 d 时 GFAP 的阳性表达较对照组明显下降($P < 0.05$), 而治疗 ≤ 3 d 和治疗 14 d 时, 与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: SIM 可抑制 GFAP 在 TBI 后的过度表达。

【关键词】创伤性脑损伤; 胶质原纤维酸性蛋白; 辛伐他汀

【中国图书分类法分类号】R651.1+5

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-12

Effects of Simvastatin on glial fibrillary acidic protein expression in rats with traumatic brain injury

JIN Chunjie¹, ZHOU Wei², JIANG Rongcai³, ZHANG Shijun¹

(1. Departments of Neurosurgery, Beichen Hospital; 2. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine; 3. Institute of Neurology in Tianjin)

【Abstract】Objective: To study the changing rules of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expressions in the rat brain after traumatic brain injury (TBI) and to observe the effect of Simvastatin (SIM) on them based on the TBI rat model. Methods: Totally 54 Sprague-Dwalye (SD) rats aged 5 weeks were employed and divided into sham TBI group, control group and treatment group ($n=18$). TBI model was established in control group and treatment group by Feeney's method. The rats in treatment group were fed SIM 10 mg/kg in the evening pre-injury and in every evening post-injury while those in control group were fed the same dose of starch each time. Then the rats were sacrificed and the rat brains were collected at different time points (3, 12, 24 h and 3, 7, 14 d post the injury). The changes of GFAP expressions in cornu ammonis (CA) area were detected with immunohistochemistry. Results: The GFAP positive cell percentage was higher in control group than in sham TBI group at 3 h after the injury. The GFAP positive cell percentage reached the peak at 3 d and 7 d after the injury ($P < 0.01$). The positive expression of GFAP was significantly lowered in treatment group than in control group at 7 d after the treatment ($P < 0.05$). There was no difference at 1, 2, 3 d and 14 d after the treatment between control group and treatment group ($P > 0.05$). Conclusion: SIM treatment could decrease the over-expression of GFAP in rats after TBI.

【Key words】traumatic brain injury; glial fibrillary acidic protein; Simvastatin

创伤性脑损伤 (Traumatic brain injury, TBI) 是神经外科常见、多发性疾病, 是造成外伤患者致残和死亡的重要原因^[1]。TBI 后药物性神经保护治疗是近年关注的焦点, 他汀类药物的非调脂作用近年来倍受人们关注^[2,3]。本实验建立大鼠 TBI 模型, 应用

辛伐他汀 (Simvastatin, SIM) 干预治疗, 观察 SIM 对 TBI 后脑组织胶质原纤维酸性蛋白 (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) 表达的影响, 以探讨 SIM 对 TBI 治疗和脑保护的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康 5 周龄清洁级 SD 大鼠 54 只, 体质量

作者介绍: 靳春杰 (1970-), 男, 副主任医师, 硕士,

研究方向: 颅脑损伤与脑血管病的临床诊治与基础研究。

基金项目: 天津市北辰区科委科技发展计划资助项目 (编号: BCWS2011-10)。

190~230 g,雌雄兼用(辽宁医学院实验动物中心提供)。单个代谢笼、标准饲料喂养,自由进食和饮水,室温 18℃~22℃。随机数字表法分为 3 组:假致伤组、对照组、治疗组,每组 18 只,各个时间点的实验动物数 3 只。动物使用遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 SIM 片(国药准字 H20010454,哈药集团三精制药股份有限公司);GFAP 单克隆抗体(美国 CST 公司,产品编号 #3670);PV-6002 两步法免疫组化检测试剂(北京中杉金桥生物工程公司);Leica RW2235 石蜡切片机(德国徕卡显微系统股份有限公司);CIAS-1000 细胞图像分析系统(中国大恒集团有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备和药物干预 对照组与治疗组参照 Feeney 自由落体撞击法制造 TBI 模型。将实验大鼠用 10% 水合氯醛 0.4 ml/100 g 腹腔注射麻醉后,固定在立体定向仪上。沿头顶正中左侧 3 mm 纵行切开头皮,分离骨膜,以骨钻在冠状缝后 1 mm、正中缝左侧作一直径为 5 mm 的圆形骨窗,保持硬脑膜完整。50 g 重锤自 20 cm 高处自由落下,使撞杆头正撞击于左顶骨窗上,造成脑损伤;然后止血、生理盐水冲洗伤口、滴庆大霉素,骨蜡封闭骨窗,间断缝合头皮。假致伤组只作骨窗,保证硬脑膜完整,不用砵码撞击。实验动物出现下列情况之一者将予以剔除,不纳入实验:(1)伤后 2 h 内因各种因素死亡者;(2)伤后呼吸抑制时间超过 5 min;(3)开颅导致硬脑膜开放者;(4)致伤后失血过多者。

建模结束后,根据动物神经行为学评分标准(Neurological severity score, NSS),在大鼠 TBI 后各个时间点对其行为学改变进行评价(评分标准见表 1)。治疗组造模前晚及术后每晚给予 SIM 10 mg/kg 生理盐水溶解为 1 ml 混悬液灌胃;对照组于造模前晚及术后每晚给予等量淀粉生理盐水溶解为 1 ml 混悬液灌胃。

1.2.2 指标的检测 各组分别于伤后 3、12、24 h 和 3、7、14 d 用 4% 的多聚甲醛灌注取脑。投入 4% 的多聚甲醛溶液固定,经过梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋,制成 5 μ m 切片。采用 PV-6002 两步法免疫组化检测试剂按试剂盒说明进行实验,检测各组每个时间点伤侧脑组织海马 CA3 区 GFAP 的表达,并应用 CIAS-1000 细胞图像分析系统测定 CA3 区 GFAP 的像素值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析,实验测试指标的数据资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组样本均数采用 Levene 法检验方差齐。采用完全随机单因素实验设计,各时间点 3 个组间神经行为学评分及脑组织 CA3 区 GFAP 表达量的差异比较采用单因素方差分析,组间的多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑外伤后神经行为学评分结果

假致伤组:NSS 评分各个时间点均为满分。

表 1 大鼠神经行为学评分标准

项目	内容	得分
平衡能力	1. 平衡稳定,四爪均在横梁(宽 2.5 cm)上	5
	2. 抓横梁的边缘或有抖动	4
	3. 一个或更多的爪从横梁上掉下来	3
	4. 努力平衡但最终掉下来	2
	5. 瘫或吊在横梁上,但最终掉下来	1
	6. 没有任何平衡企图	0
能够保持 5 s 的斜面最大角度	50°	4
	45°	3
	40°	2
	35°	1
翻身	30°	0
	1. 能自主翻身	1
支头	2. 不能自主翻身	0
	1. 能支起头部重量	1
行走	2. 不能支起头部重量	0
	1. 能走直线且稳定	4
	2. 能走直线但走路不稳	3
	3. 不能走直线	2
	4. 腹部贴近地面爬行	1
用无齿镊以中等力夹其尾	5. 不能移动	0
	1. 逃走	2
	2. 能逃走但不超过 10 cm	1
用无齿镊以中等力夹其肢	3. 无反应	0
	1. 迅速收回	2
中一肢体	2. 收回但反应慢	1
总分	3. 无反应	0
		19

对照组:TBI 后各时间点 NSS 评分明显低于假致伤组($P < 0.05$),但评分随时间呈增加趋势。

治疗组:TBI 后 3、12、24 h、3 d、14 d NSS 评分明显低于假致伤组($P < 0.05$),高于对照组;3、7 d 时评分明显高于对照组,有统计学意义,且 7、14 d 时评分已经接近假致伤组(见表 2)。

表 2 大鼠神经行为学评分结果

伤后时间	分组			F 值	P 值
	假致伤组	治疗组	对照组		
3 h	19.0 $\pm$ 0.0	10.5 $\pm$ 1.2*	10.2 $\pm$ 1.5*	7.958	0.008
12 h	19.0 $\pm$ 0.0	12.1 $\pm$ 1.3*	11.4 $\pm$ 1.6*	6.374	0.012
24 h	19.0 $\pm$ 0.0	13.6 $\pm$ 1.4*	12.4 $\pm$ 1.4*	5.819	0.027
3 d	19.0 $\pm$ 0.0	16.7 $\pm$ 1.1**	13.5 $\pm$ 1.3*	5.072	0.034
7 d	19.0 $\pm$ 0.0	17.8 $\pm$ 1.0*	14.9 $\pm$ 1.5*	4.912	0.039
14 d	19.0 $\pm$ 0.0	18.7 $\pm$ 1.1	16.5 $\pm$ 1.2*	3.854	0.043

注:*,治疗组和对照组与假致伤组相同时间点两两比较, $P < 0.05$;

★,治疗组与对照组相同时间点比较, $P < 0.05$

2.2 海马 CA3 区 GFAP 免疫组织化学染色

假致伤组:海马 CA3 区 GFAP 阳性表达未见明显异常,

均可见少量 GFAP 阳性细胞排列规则,染色淡,胞体小,突起细短(图 1),各时间点两两相比差异无统计学意义($P>0.05$)。海马结构正常,星形胶质细胞(Astrocyte,AST)胞体较小,周围放射状突起细短,棕黄色的 GFAP 颗粒分布于星型细胞胞浆及突起中。

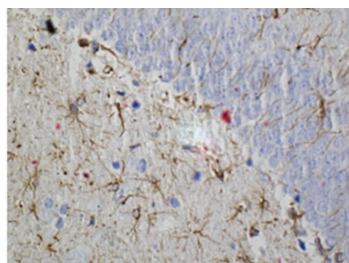
对照组:伤后 3 h 可见 GFAP 阳性细胞染色加深,伤后 12 h,GFAP 阳性细胞较假致伤组增多;24 h,GFAP 阳性细胞增多更明显,胞体肥大,突起增粗,细胞排列紊乱,与假致伤组相比差异有统计学意义($P<0.05$);3 d,GFAP 阳性细胞明显增加;7 d 达到高峰,与假致伤组相比差异有统计学意义($P<0.01$);14 d,GFAP 阳性细胞开始有所减少,但仍高于假致伤组($P<0.05$)(图 2)。

治疗组:伤后各时间点与假致伤组相比,GFAP 阳性细胞染色亦有所加深,GFAP 阳性细胞增多,胞体肥大,突起增粗,且伤后 24 h、3 d、7 d 与假致伤组相同时间点比较差异有统计学意义($P<0.05$);但与未治疗组相比,程度减轻,特别是随着 SIM 治疗时间的延长,治疗 7 d 时,可见治疗组 GFAP 的阳性表达明显低于未治疗组,差异有统计学意义($P<0.05$),而治疗 ≤ 3 d 和治疗 14 d 时,与未治疗组相比差异无统计学意义($P>0.05$)(图 3)(统计结果见表 3)。

3 讨 论

本实验观察发现,大鼠的 NSS 评分显示,SIM 治疗可明显加快 TBI 大鼠运动功能的恢复。术后 3 d 时,SIM 治疗与非治疗组相比,差异有统计学意义。免疫组化结果显示,SIM 治疗后可降低胶质细胞过度反应,7 d 时可见治疗组 GFAP 的阳性表达明显低于未治疗组,而在其它时间点,治疗组与未治疗组相比,差异无统计学意义。该结果提示,在 TBI 后的继发性脑损伤中 SIM 在 GFAP 的高表达时间点抑制其表达,而在 TBI 的早期和后期并无明显的抑制作用。

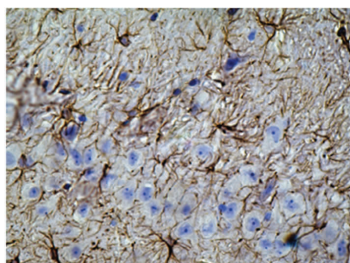
脑组织受各种刺激后,海马是反应较敏感的区域,常作为脑损伤研究的重点部位^[4]。TBI 会引起 GFAP 表达迅速显著增多^[5,6]。GFAP 是 AST 特有的一种细胞骨架蛋白,被用来标志脑组织损伤致 AST 活化。GFAP 表达量的多少可作为研究脑损伤后胶质细胞反应的标志^[7],其表达水平可提示 AST 活化及增殖程度^[8,9]。一定成熟度的 AST 可以分泌神经



海马结构正常,AST 胞体较小,周围放射状突起细短,棕黄色的 GFAP 颗粒分布于星型细胞胞浆及突起中

图 1 假致伤组 7 d
(免疫组化染色,400×)

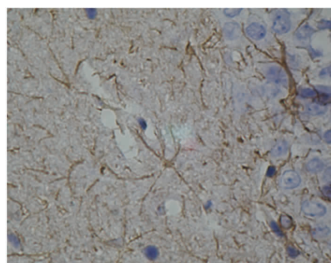
Fig.1 Sham TBI group at 7 d post-injury(Immunohistochemical staining,400×)



GFAP 阳性细胞增加达到高峰,胞体增大,突起变粗变长,呈蜘蛛样

图 2 对照组术后 7 d
(免疫组化染色,400×)

Fig.2 Control group at 7 d post-injury (Immunohistochemical staining,400×)



GFAP 阳性细胞增生减轻,胞体稍增大,突起轻度变粗变长

图 3 治疗组术后 7 d
(免疫组化染色,400×)

Fig.3 Treatment group at 7 d post-injury(Immunohistochemical staining,400×)

表 3 3 组大鼠不同时间点伤侧海马 CA3 区 GFAP 阳性表达(像素值)

Tab.3 Positive expression of GFAP in CA3 region at the injured side of rats' brain among three groups at different time points (pixel value)

伤后时间	分组			F 值	P 值
	假致伤组	治疗组	对照组		
3 h	60 732.40 ± 6 392.32	65 931.70 ± 5 968.12	66 129.50 ± 6 037.47	2.887	0.077
12 h	63 987.20 ± 5 272.25	80 413.60 ± 7 914.23	81 455.70 ± 6 983.53	3.079	0.054
24 h	61 398.60 ± 6 120.35	86 879.60 ± 8 014.71*	88 741.70 ± 6 094.37*	5.954	0.038
3 d	64 329.30 ± 5 728.41	94 462.80 ± 8 515.36*	99 403.60 ± 7 892.54*	7.257	0.021
7 d	60 032.80 ± 5 683.24	102 952.80 ± 9 827.28*▲	139 674.80 ± 9 273.75*	12.331	0.007
14 d	59 873.60 ± 4 762.39	89 792.30 ± 7 469.39*	104 432.70 ± 8 779.63*	8.754	0.014

注:*,治疗组和对照组与假致伤组相同时间点两两比较, $P<0.05$;★,治疗组和对照组与假致伤组相同时间点两两比较, $P<0.01$;▲,治疗组与对照组相同时间点比较, $P<0.05$

营养因子,促进神经细胞生长、发育、分化并对轴突生长有导向作用,而大量增生活化的 AST 却因可以形成胶质瘢痕为组织恢复带来负面效应^[10,11],有研究发现,在缺血引起的脑损伤后 6 h~7 d GFAP mRNA 一直处于高表达水平^[12]。大量 GFAP 的堆积不仅是造成反应性 AST 胞体肥大、突起增粗、延长的主要原因,而且是 AST 参与胶质瘢痕形成的重要物质基础^[8,13,14]。因此有理由认为,在 TBI 急性期适当的 GFAP 高表达是有益的,但损伤晚期 GFAP 高表达则可促进胶质瘢痕的形成,阻碍神经轴突再生。SIM 是羟甲戊二酰辅酶 A (Hydroxy-methyl-glutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 的还原酶抑制剂,临床多用于高胆固醇血症的治疗。Wu 等^[15]的研究显示:SIM 抑制窝蛋白-1 在 AST 细胞膜的脂质转运体中的表达和无糖无氧环境下 AST 脂质转运体上表皮生长因子受体的磷酸化,从而降低了 AST 活性,促进了 TBI 后的神经细胞的复苏;Wu 等观察 TBI 后 4 d SIM (1 mg/kg) 明显抑制了 GFAP 的高表达,但本研究发现在第 7 天明显抑制 GFAP 的高表达;与 Wu 等不同之处是我们造模前进行了 SIM 预处理且服药剂量为 10 mg/kg,是否与这些因素相关有待进一步设计单纯预处理组及单纯治疗组及不同剂量组别进行对比观察。最近研究^[16]发现 SIM 通过调节血管内皮生长因子受体 2 (Vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2) 促进 TBI 大鼠创伤灶周围和海马部位的新生血管生成,体外实验也有同样发现 SIM 促进新生血管生成。Béziaud 等^[17]研究发现 SIM 可以防止 TBI 大鼠血管内皮紧密连接的损害,抑制中性粒细胞在脑实质的浸润保护血脑屏障。SIM 极有可能通过以上多种因素影响 GFAP 表达,表明 SIM 很有可能成为一种理想的 TBI 治疗药物应用于临床。

参 考 文 献

- [1] 张 赛,只达石.努力改进我国颅脑创伤急救体系及监测技术[J].中华神经外科杂志,2005,21(4):195-196.
- [2] 张健莉,赵丽波,刘晓娟.阿托伐他汀钙对脑梗死患者 MMP-9 和白介素-18 的影响[J].中国医药导报,2011,8(7):27-28.
- [3] 张 梅,田 英,刘翠平,等.急性缺血性脑卒中患者 CRP、TNF- α 的变化及辛伐他汀抗炎作用研究[J].现代中西医结合杂志,2011,20(13):1564-1576.
- [4] Zhang M, Tian Y, Liu C P, et al. Study on the changes of C reactive protein and TNF- α in patients with acute ischemic stroke and anti-inflammation of Simvastatin[J]. Hebei Journal of Integrated Chinese Traditional and Western Medicine, 2011, 20(13):1564-1576.
- [5] Kotapka M J, Generalli T A, Grahata D I, et al. Selective vulnerability of hippocampal neurons in acceleration-induced experimental head injury[J]. Neurotrauma, 1991, 8(4):247-258.
- [6] 刘 超,卢大华,李昌琪,等.急性酒精中毒合并中度创伤性脑损伤大鼠海马 GFAP 的表达[J].现代生物医学进展,2008,8(7):1248-1249.
- [7] Liu C, Lu D H, Li C Q, et al. The expression of GFAP in hippocampus of rats after moderate traumatic brain injury following acute alcoholism[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(7):1248-1249.
- [8] Norenberg M D. Astrocyte responses to CNS injury[J]. Exp Neurol, 1994, 53(3):213-220.
- [9] Dvorak F, Haerer I, Sitzer M, et al. Characterisation of the diagnostic window of serum fibrillary acidic protein for the differentiation of intracerebral haemorrhage and ischaemic stroke[J]. Cerebrovasc Dis, 2009, 27(1):37-41.
- [10] Carbonell W S, Mandell J W. Transient neuronal but persistent astroglial activation of ERK/MAP kinase after focal brain injury in mice[J]. Neurotrauma, 2003, 20(4):327-336.
- [11] 周亦武,张益鹤,邓伟年,等.人大脑及脑干挫伤后星形胶质细胞及其胶质纤维酸性蛋白的变化[J].华中科技大学学报(医学版),2005,34(3):277-280.
- [12] Zhou Y W, Zhang Y H, Deng W N, et al. Changes of Astrocytes and GFAP after human cerebral and brain stem contusion[J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology (Health Sciences), 2005, 34(3):277-280.
- [13] Loos M, Dihne M, Block F. Tumor necrosis factor- α expression in areas of remote degeneration following middle cerebral artery occlusion of the rat[J]. Neuroscience, 2003, 122(2):373-380.
- [14] Block F, Dihne M. Inflammation in areas of remote changes following focal brain lesion[J]. Prog Neurobiol, 2005, 75(5):342-365.
- [15] Calmssee C, Stumm R K, Schafer M K, et al. Clenbuterol induces growth factor mRNA, activates astrocytes, and protects rat brain tissue against ischemic damage[J]. Eur Pharmacology, 1999, 379(1):33-45.
- [16] Herx L M, Yong V W. Interleukin-1 β is required for the early evolution of reactive astroglia following CNS lesion[J]. Neuropathol and Exp Neurol, 2001, 60(10):961-971.
- [17] Zhang L, Zhao W, Li B, et al. TNF- α -induced overexpression of GFAP is associated with MAPKs[J]. Neuroreport, 2000, 11(2):409-412.
- [18] Wu H, Mahmood A, Lu D, et al. Attenuation of astroglia and modulation of endothelial growth factor receptor in lipid rafts by simvastatin after traumatic brain injury[J]. Neurosurgery, 2010, 113(3):591-597.
- [19] Wu H, Jiang H, Lu D, et al. Induction of angiogenesis and modulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by simvastatin after traumatic brain injury[J]. Neurosurgery, 2011, 68(5):1363-1371.
- [20] Béziaud T, Ru C X, El Shafey N, et al. Simvastatin in traumatic brain injury: effect on brain edema mechanisms[J]. Crit Care Med, 2011, 39(10):2300-2307.

(责任编辑:冉明会)