

# 大鼠大脑中动脉供血区梗死后小脑皮质 GFAP mRNA 动态表达\*

## Dynamic Expression of GFAP mRNA of Cerebellar Cortex after the Infarction of Middle Cerebral Artery Supply Area in Rats

李 洁<sup>1</sup>, 车玉琴<sup>1</sup>, 康志伟<sup>1</sup>, 林 巧<sup>1</sup>

LI Jie<sup>1</sup>, CHE Yu-qin<sup>1\*</sup>, KANG Zhi-wei<sup>1</sup>, LIN Qiao<sup>1</sup>

(1. 中国医科大学附属第四医院神经内科, 辽宁沈阳 110032)

(1. The Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Department of Neurology, Shenyang, Liaoning, 110032, China)

**摘要:**采用 Longa 大鼠大脑中动脉内栓线阻断法制备动物模型,用实时定量 PCR 法检测大鼠大脑中动脉闭塞后小脑皮质胶质纤维酸性蛋白 mRNA 的表达。结果显示,持续性大鼠大脑中动脉闭塞后,胶质纤维酸性蛋白 mRNA 在大鼠的小脑皮质有动态表达,第 1 天、第 3 天和第 5 天比对照组明显增高 ( $P < 0.05$ ),第 7 天、第 10 天和第 14 天比对照组明显下降 ( $P < 0.05$ )。大鼠大脑中动脉闭塞后小脑皮质出现胶质纤维酸性蛋白动态表达,远离梗死灶的相关部位脑组织继发损害机制可能与神经抑制因子有关。

**关键词:**脑梗死 小脑 GFAP mRNA(胶质纤维酸性蛋白 mRNA)

中图分类号:R742.8 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2010)03-0255-04

**Abstract:** The changes of glial fibrillary acid protein (GFAP) mRNA in cerebellar cortex were observed after rat middle cerebral artery occlusion. The animal model was prepared with Longa's Bolt line blocking method (MCAO) in middle cerebral artery of rats, and the expression of GFAP mRNA was examined with real-time quantitative PCR method. The results show, GFAP mRNA has dynamic expression in the cerebellar cortex after persistent middle cerebral artery occlusion, The expression in the operated group significantly increases on the 1st, 3rd and 5th day, but decreases on the 7th, 10th and 14th day in comparison with that of the sham-operated group ( $P < 0.05$ ). After rat middle cerebral artery occlusion, there are dynamic changes of GFAP in cerebellar cortex, which occurs far away from the site of infarction and secondary damage to brain tissue may be related to the neural inhibitory factor.

**Key words:** cerebral infarction, cerebellum, GFAP mRNA (glial fibrillary acid protein mRNA)

脑卒中是威胁中老年人健康的常见病和多发病,随着人口老龄化,其发病率明显上升,并严重威胁中老年人的健康和生存质量。先前有关缺血性卒中的研究主要集中在梗死灶局部,对远隔梗死灶的相关研究未给予足够重视。现已有文献报道,脑梗死造成的神经功能缺损不仅与梗死灶局部损伤后神经细胞坏死和凋亡有关,而且也与远隔梗死灶的相关部位的继发性神经细胞坏死和凋亡损害有关<sup>[1~4]</sup>。黑质和丘脑不

属于大脑中动脉(MCA)供血区,并且大脑中动脉闭塞(MCAO)后患侧黑质和丘脑损害发生较晚,提示黑质和丘脑损害非缺血所致。Block 等<sup>[5]</sup>研究发现,局灶性脑缺血后丘脑、黑质网状部、海马和脊髓等部位观察到继发性改变,这些区域出现以小胶质细胞和星形胶质细胞激活为特征的改变。另外,局灶性脑桥梗死可导致梗死灶同侧或双侧小脑中脚继发性损害<sup>[6]</sup>,局灶性皮质下梗死可引起胼胝体继发性损害<sup>[7]</sup>,提示与梗死灶有神经纤维联系的远隔部位都有发生继发性损害的可能。细胞的坏死和凋亡发生的速度和严重程度受许多因素影响。Papadopoulos 等<sup>[8]</sup>研究发现,脑缺血后的各种抑制因素的存在是导致神经纤维再生

收稿日期:2009-08-03

修回日期:2010-05-11

作者简介:李 洁(1985-),女,硕士研究生,主要从事神经病学研究。

\* 辽宁省教育厅科学技术研究项目(项目编号:20060998)资助。

广西科学 2010年8月 第17卷第3期

受限的重要原因,这些抑制性的因素包括胶质疤痕、神经生长抑制因子以及神经营养因子障碍。目前,有关于远隔梗死灶的脑组织发生继发损害的确切机制尚未完全阐明,可能与神经营养障碍、神经生长抑制因子、局部脑血流减少、神经递质调节失衡以及蛋白质合成抑制等因素有关。其中,神经营养障碍以及神经生长抑制因子作用增强被认为是重要的因素之一。因此,采取各种有效手段减轻脑梗死后远隔部位继发性损害,可能对梗死后神经功能恢复有重要意义。本研究对照观察大鼠大脑中动脉闭塞后大鼠小脑皮质胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acid protein,GFAP)的动态变化,研究远离梗死灶的相关部位脑组织继发损害机制与神经抑制因子的关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 实验动物及分组

SPF级Wistar雄性大鼠,体质量250~300g,由中国医科大学实验动物中心提供。大鼠饲养于恒温净化通风动物房,自由进食和饮水,室温保持(25±2)℃。将大鼠随机分为假手术组(30只)和实验组(30只)。两组大鼠又按实验第1天、第3天、第5天、第7天、第10天、第14天各分为6个组,每组5只。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

试剂:无RNA酶的水(Invitrogen life technologies);无RNA酶的糖原(Invitrogen life technologies);RNA酶抑制剂(Epicentre);MMLV反转录酶(Epicentre);10×RT缓冲液(250mM Tris-HCl,pH值8.3,200mM KCl,40mM MgCl<sub>2</sub>,5mM DTT,Epicentre);2.5mM dNTP混合液(dATP,dGTP,dCTP和dTTP各2.5mM,HyTest Ltd)Oligo(dT)18(上海生工生物工程有限公司出品);10×PCR缓冲液(Promega);Taq聚合酶(Promega);100bp DNA Ladder(天根生化科技(北京)有限公司出品);10000×Sybergreen(Invitrogen)

仪器:TaKaRa PCR Thermal Cycler(宝生物工程(北京)有限公司出品);H6-1微型电泳槽(上海精益有机玻璃制品仪器厂出品);Rotor-Gene 3000 Realtime PCR仪(Corbett Research)引物设计软件:Primer 5.0 Rotor-gene 6.0(Corbett Research);Gene Amp PCR System 9700(Applied Biosystems)

### 1.2 实验方 法

#### 1.2.1 动物模型的制作

参照Longa<sup>[9]</sup>的大鼠大脑中动脉内栓线阻断法

(MCAO)适当改良后进行。模型制备方法:把大鼠用10%水合氯醛(300mg/kg)腹腔注射麻醉后,将大鼠仰卧位固定在实验台上,取颈正中切口,切开皮肤,钝性分离各层组织,分离右侧颈总动脉(CCA),向上分离右颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA),在近右侧颈总动脉分叉处约5~8mm处结扎右颈外动脉,于右侧颈总动脉近心端夹一动脉夹,在右颈外动脉近分叉处留置一打好结的丝线,在右颈外动脉结扎处与分叉处之间做一直径约0.2mm的“V”型切口,将尼龙线自切口处轻轻插入,轻轻收紧线结,松开动脉夹,将尼龙线顺右颈外动脉经颈内动脉送入颅内,插入深度约(18.5±0.5)mm微遇阻力时停止,使尼龙线头端位于大脑中动脉起始处,阻断大脑中动脉的血流。收紧丝线,海绵胶止血,缝合切口,单笼饲养。假手术组只进行麻醉和血管分离术,不结扎血管及导入线栓。

#### 1.2.2 神经功能评分

参照Longa<sup>[9]</sup>的评分标准进行5分制神经功能评分。0分为无神经功能缺损症状(肢体活动正常),1分为轻度局灶性神经功能症状缺失(不能完全伸展左侧前肢),2分为中度局灶性功能缺失(行走时向偏瘫侧及右侧旋转),3分为重度神经功能缺失(自主运动时向右侧倾倒),4分为极重度损伤(不能自发行走,意识水平降低)。将评分在1~3分的动物纳入下一步实验,其余动物予以排除。

#### 1.2.3 实时定量PCR检测

总RNA纯化提取:全部大鼠按不同时间点处死,并将右侧小脑半球放入去RNA酶的试管中,液氮速冻,-80℃保存。取100mg小脑皮层组织标本剪碎、研磨后置于离心管中,加入1ml TRIZOL,按试剂说明书中操作步骤进行RNA提取。GFAP引物:sense5'-GGGAGTCGGCGAGTTACCA-3', antisense5'-CACCGTCTTTACCACGATGTTTC-3'; GAPDH引物:sense5'-GGAAAGCTGTGGCGTGAT-3', antisense5'-AAGGTGGAAGAATGGGAGTT-3'。使用分光光度仪检测抽提总RNA的质量和浓度,要求A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>的比值在2.0左右,并记录RNA含量。cDNA的合成:每1份标本取总RNA 2μg,Oligo(dT) 1μl,加无RNA酶的H<sub>2</sub>O至总体积10μl,混合液在70℃水浴3min,降到37℃放置10min;加5×反应缓冲液4μl,RNasin核酸酶抑制剂1μl,10mmol/L dNTP 1μl,MMLV反转录酶1μl,混合后37℃恒温1min;加10μl的RT反应液到10μl退火混合物中,37℃水浴60min,加热到95℃维持5min。BDNFmRNA实时定量PCR:cDNA1μl,10×反应缓

冲液 2.5 $\mu$ l, 2.5mmol/LdNTP2.5 $\mu$ l, Taq 聚合酶 1units, 25mmol/LMgCl<sub>2</sub>1.2 $\mu$ l, 5 $\mu$ mol/L 上、下游引物混合物 2 $\mu$ l, 10 $\times$ BDNF 14 $\mu$ l, 加 DEPC 处理的双蒸水至 25 $\mu$ l。将溶液混合, 设置 PCR 反应为 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 40 个 PCR 循环(94 $^{\circ}$ C, 20s; 59 $^{\circ}$ C, 20s; 72 $^{\circ}$ C, 30s); 建立 PCR 产物的熔解曲线, 扩增反应结束后继续从 72 $^{\circ}$ C 缓慢加热到 99 $^{\circ}$ C(每 5s 升高 1 $^{\circ}$ C)(内参 GAPDH 基因反应条件相同)。将不同浓度的定量模板的对数和相应的 Ct 值作图, 制成标准曲线。根据绘制的梯度稀释 DNA 标准曲线, GFAP 基因与 GAPDH 基因的浓度结果直接由机器生成。GFAP 基因浓度除以 GAPDH 基因的浓度, 即为此样品 GFAP 基因的校正后的相对含量。所有大鼠均以上述实验方法得出结果。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS11.0 统计软件。数值以均数 $\pm$ 标准差( $x \pm s$ )表示, 组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 PCR 产物的特异性

图 1 和图 2 结果显示, 定量 PCR 产物的熔解曲线只有 1 个峰, 而且熔解温度均一, 峰形锐利, 在曲线的其他位置未见到波形, 说明扩增产物为特异性产物, 无引物二聚体及非特异性产物产生。

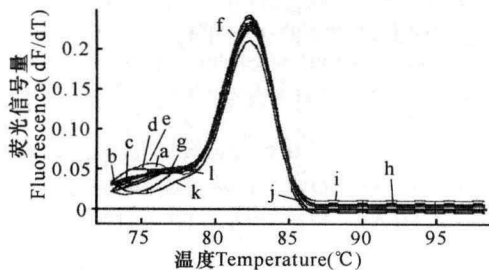


图 1 GFAP mRNA 反应曲线

Fig.1 GFAP mRNA melting curve

a, b, c, d, e 分别是假手术组 1d, 3d, 5d, 7d, 10d; g, h, i, j, k 分别是实验组 1d, 3d, 5d, 7d, 14d。

a, b, c, d, e are the control group of 1d, 3d, 5d, 7d, 10d, respectively; g, h, i, j, k are the experiment group of 1d, 3d, 5d, 7d, 14d, respectively.

### 2.2 GFAP mRNA 表达水平

从表 1 结果可以得出, 实验组大鼠的 GFAP mRNA 表达在大脑中动脉闭塞后第 1 天、3 天和 5 天比假手术组大鼠的明显增高 ( $P < 0.05$ ), 第 7 天、第 10 天和第 14 天比假手术组大鼠的明显下降 ( $P < 0.05$ ), 说明大鼠大脑中动脉闭塞后, GFAPmRNA 在小脑皮质有动态表达。

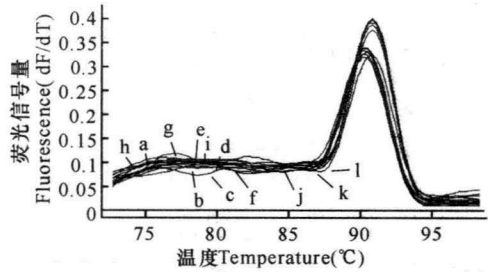


图 2 GAPDH mRNA 反应曲线

Fig.2 GAPDH mRNA melting curve

a, b, c, d, e 分别是假手术组 1d, 3d, 5d, 7d, 10d; g, h, i, j, k 分别是实验组 1d, 3d, 5d, 7d, 14d。

a, b, c, d, e are the control group of 1d, 3d, 5d, 7d, 10d, respectively; g, h, i, j, k are the experiment group of 1d, 3d, 5d, 7d, 14d, respectively.

## 3 讨论

在中枢神经系统, 不仅存在着能促进神经元生长、存活和影响神经可塑性的神经营养因子, 还存在许多抑制神经细胞生存、生长和修复的抑制因子, 如存在于细胞外基质的生长抑制因子(GIF)和硫酸软骨素蛋白多糖, 少突胶质细胞产生的轴突生长抑制蛋白, 如 Nogo-A、髓鞘相关糖蛋白和少突胶质细胞/髓鞘糖蛋白<sup>[10,11]</sup>, 星形胶质细胞产生的胶质纤维酸性蛋白(GFAP)等。未成熟的星形胶质细胞对轴突生长有导向作用, 但是随着成熟程度增加, 其分泌的促轴突生长的营养因子逐渐减少, 而分泌的 GFAP 含量逐渐增加; 在病理情况下, 大量成熟的星形胶质细胞在损伤脑组织周围分泌大量的 GFAP, 成为直接阻碍神经再生的屏障。实验研究发现, 大脑中动脉闭塞后 1 周同侧纹状体和丘脑腹后外侧核抑制性蛋白 GFAP 表达逐渐增加, 星形胶质细胞明显增生、肥大, 提示脑梗死后远离梗死灶脑组织发生继发性损害与神经组织周围存在神经生长抑制因子有关<sup>[12]</sup>。Lin 等<sup>[13]</sup>研究发现, 脑梗塞后神经元减少的同时伴有反应性星形胶质细胞增殖, 且在脑梗塞后 1 周, 星形胶质细胞增殖增多, 4 周后更明显。GFAP 是星形胶质细胞的标志蛋白, 在星形胶质细胞中有丰富的、唯一的表达, 可以作为中枢神经系统损伤后星形胶质细胞反应增生的标志。有实验表明, GFAP 的表达与星形胶质细胞的活性成正比<sup>[14]</sup>, 而且, GFAP 阳性胶质细胞数目的增加与 mRNA 水平的增加是相一致的<sup>[15]</sup>。

本研究结果显示, 持续性大脑中动脉闭塞后 GFAPmRNA 在其远隔部位的小脑皮质有动态表达, 第 1 天、第 3 天和第 5 天较假手术组明显增高, 第 7 天、第 10 天和第 14 天较假手术组明显下降, 其动态表达在时间上与文献报道有一些出入, 分析与远隔部

表 1 GFAP mRNA 表达水平

Table 1 Expression level of GFAP mRNA

分组 Group	n	GFAP mRNA 表达水平 Expression level of GFAP mRNA ( $x \pm s$ )					
		1d	3d	5d	7d	10d	14d
假手术组 Control group	30	5.16±0.04	5.68±0.03	5.63±0.04	5.67±0.02	5.28±0.03	5.65±0.04
实验组 Experiment group	30	6.18±0.04*	6.82±0.03*	9.63±0.14*	1.20±0.02*	1.20±0.15*	1.30±0.12

\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。\*:  $P < 0.05$ , VS control group.

位的不同组织对其脑缺血反应性不同有关。以往研究表明,神经元损伤不仅可由直接作用于细胞体的伤害引起,轴突的退行性改变也可以引起神经元损伤。当神经纤维断裂后,轴突发生华勒变性-断端远侧轴突自近向远变解解体。小脑血液供应为后循环即椎基底动脉系统而非大脑中动脉,因此大脑中动脉阻断后引起小脑皮质的分子生物学改变并非直接缺血导致,可能与小脑失联络有关,也就是说,皮质桥小脑通路中断的结果。其机制可能与神经传导通路中断有关<sup>[5]</sup>。大脑皮质是皮质桥脑通路的起源地,其投射纤维传导至对侧小脑半球颗粒细胞的兴奋性冲动,因此皮质桥小脑通路的损害可使对侧小脑功能障碍。从大脑皮质与小脑皮质间存在大量的神经纤维联系以调节精确的运动,当一侧大脑中动脉闭塞后神经纤维突触间联系中断,远隔区小脑皮质在早期出现神经轴突再生、突触重建等结构修复,后期逐渐出现神经元数量减少、功能下降和轴突再生减弱,伴随着其变化,星形胶质细胞在数量上也有动态变化,因而就出现 GFAP 表达的变化。

目前,脑梗死后神经可塑性与神经营养因子的相关性研究较多,而与抑制因子的相关性研究较少。本研究通过大鼠大脑中动脉持续性闭塞模型,观察大鼠小脑皮质 GFAP 的动态变化,从而研究远离梗死灶的相关部位脑组织继发损害机制与神经抑制因子的关系。因此,如何干预脑梗死后神经生长抑制因子对梗死灶周围和远隔部位神经组织的影响是今后卒中后神经可塑性研究的方向之一。同时,这也为改善远期神经功能、神经损伤和再生问题提供新的思路。

参考文献:

[1] Buss A, Pech K, Merkler D, et al. Sequential loss of myelin proteins during Wallerian degeneration in the human spinal cord[J]. Brain, 2005, 128(2): 356-364.  
 [2] Moller M, Frandsen J, Andersen G, et al. Dynamic changes in corticospinal tracts after stroke detected by fibretracking[J]. Neurol Neurosurg Psychiatry, 2007, 78(6): 587-592.  
 [3] Wang F, Liang Z, Hou Q, et al. Nogo-A is involved in secondary axonal degeneration of thalamus in hypertensive rats with focal cortical infarction [J].

Neurosci Lett, 2007, 417(3): 255-260.

[4] Zhao F, Kuroiwa T, Miyasaka N, et al. Characteristic changes in T(2)-value, apparent diffusion coefficient, and ultrastructure of substantia nigra evolving exofocal postischemic neuronal death in rats[J]. Brain Res, 2001, 895(1-2): 238-244.  
 [5] Block F, Dihne M, Loos M. Inflammation in areas of remote changes following focal brain lesion [J]. Prog Neurobiol, 2005, 75(5): 342-365.  
 [6] Mejdoubi M, Catalaa I, Cognard C, et al. Bilateral wallerian degeneration of the middle cerebellar peduncles due to unilateral pontine infarction [J]. J Neuroradiol, 2006, 33(4): 263-265.  
 [7] Meguro K, Constans J M, Courtheoux P, et al. Atrophy of the corpus callosum correlates with white matter lesions in patients with cerebral ischaemia [J]. Neuroradiology, 2000, 42(6): 413-419.  
 [8] Papadopoulos C M, Tsai S Y, Alsbie T, et al. Functional recovery and neuroanatomical plasticity following middle cerebral artery occlusion and IN21 antibody treatment in the adult rat[J]. Ann Neurol, 2002, 51(4): 433-441.  
 [9] Zea Longa E, Weinstein P R, Calson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84.  
 [10] Taketomi M, Kinoshita N, Kimura K, et al. Nogo-A expression in mature oligodendrocytes of rat spinal cord in association with specific molecules[J]. Neurosci Lett, 2002, 332(1): 37-40.  
 [11] Buss A, Sellhaus B, Wolmsley A, et al. Expression pattern of NOGO-A protein in the human nervous system[J]. Acta Neuropathol, 2005, 110(2): 113-119.  
 [12] 曾进胜, 李华, 洪华, 等. 实验性大脑皮层梗死后丘脑和纹状体突触重构与抑制性蛋白表达[J]. 中国临床康复, 2002, 6(17): 2534-2535.  
 [13] Lin B, Ginsberg MD, Busto R, et al. Sequential analysis of subacute and chronic neuronal astrocytic and microglial alterations after transient global ischemia in rats. Acta Neuropathol(Berl), 1998, 95(5): 515-523.  
 [14] Petit C K, Morgello S, Felix J C, et al. The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rats brain[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1999, 10(3): 850-859.  
 [15] Hinkle D A, Baldwin S A, Scheff S W, et al. GFAP and S100beta expression in the cortex and hippocampus in response to mild cortical contusion[J]. J Neurotrauma, 1997, 14(10): 729-738.

(责任编辑: 邓大玉)