

大鼠颅脑损伤后突触素表达变化研究*

王焱超¹, 张 瑜², 蓝 婷³, 艾潇琳¹, 梁锐超¹, 贺 民¹, 李 杨¹, 方 芳^{1△}

1. 四川大学华西医院 神经外科(成都 610041); 2. 成都大学附属医院 神经外科(成都 610081);

3. 四川省第二人民医院 病理科(成都 610000)

【摘要】 目的 探讨大鼠颅脑损伤后突触素变化规律并探索其与组织学、影像学的动态变化关系。**方法** 健康3月龄雄性SD大鼠24只,依据突触素检测时间,分为损伤后2周、4周、8周组和对照组共4组,每组6只。其中3个损伤组通过建立大鼠自由落体脑损伤模型,在损伤后24 h、2周、4周和8周时通过CT检查观察其颅脑损伤后脑组织的影像学变化,对照组不作损伤处理。同时检测大鼠颅脑损伤后脑组织形态学及影像学变化,并分别于2周、4周、8周使用免疫荧光法及蛋白免疫印迹实验观察受伤后大鼠脑组织突触素表达变化。**结果** 大鼠颅脑损伤后,神经功能评分提示实验组大鼠出现明显神经功能障碍,HE染色提示实验组大鼠受伤24 h出现脑细胞水肿、坏死。另外尚可见局部的充血,受伤后2周后出现脑溶解性液化及坏死,而受伤4周及8周后除可见明显组织缺损外,无明显组织学变化。CT检查提示实验组大鼠术后24 h呈现全脑明显的低密度影,此后脑组织低密度灶的区域及程度开始减轻,至受伤后2周低密度影已经明显减退,受伤后4周及8周时脑损伤已经不明显,仅可见骨窗缺损。免疫荧光染色及western blot均提示突触素表达于2周下降,第8周略有上升。**结论** 成功建立了Feeney大鼠自由落体脑损伤模型。大鼠颅脑损伤后,突触素在受损急性期呈现下降,持续至脑损伤后第8周开始恢复。突触素的表达随时间变化的规律与影像学、组织病理学变化有关。

【关键词】 颅脑损伤 动物模型 影像学 组织病理学

The Alterations in Expression of the Synaptophysin in Rat Brain Trauma Injury Model—an Experimental Study

WANG Yan-chao¹, ZHANG Yu², LAN Ting³, AI Xiao-lin¹, LIANG Rui-chao¹, HE Min¹, LI Yang¹, FANG Fang^{1△}. 1. Department of Neurosurgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Chengdu University, Chengdu 610081, China; 3. Department of Pathology, the Second People's Hospital of Sichuan, Chengdu 610000, China

△ Corresponding author, E-mail: merrisn@hotmail.com

【Abstract】 Objective To study the rat brain trauma injury model and investigate the rules of transformation of expression of synaptophysin and its relationship between histology and radiology alternation after brain trauma injury. **Methods** 24 SD male rats aged three months were randomly divided into 4 groups, including a control group of 6 rats. The experimental group rats were received operation to build free falling brain trauma injury model. The rat were analyzed at 2, 4, 8 weeks after injury. The experimental group rat were killed after CT scan and functional evaluation, histological changes were measured through HE staining. Synaptophysin were observed by using immunofluorescence method and Western blot. **Results** After brain injury the functional evaluation of rat showed dysneuria. Edema and necrosis in neurons and local congestion at 24 h after injury, necrosis and solubility liquefaction at 2 weeks after injury, and histological defects at 4 weeks and 8 weeks after injury, were observed in HE staining in experimental group. The significant cerebral low density shadows at 24 h after injury, lightened in 2 weeks after injury, and disappeared at 4 weeks and 8 weeks after injury, left only the bone defects in CT images. Expression of synaptophysin in brain tissue was decreased from 2 weeks after injury and it was mild increased at 8 weeks after injury evaluated by immunofluorescence method and Western blot. **Conclusion** The functional evaluation, histological and CT scan result indicate that we have built the rat brain trauma injury model successfully. The damage of synapse was correlated with histological and radiological result. The expression of synaptophysin was decreased form acute stage and gradually increased until 8 weeks after injury. This study can be applied as control in research of nerve regeneration after brain trauma injury.

【Key words】 Brain trauma injury Animal model Radiology Histopathology

颅脑损伤(trumatic brain injury, TBI)是神经外科的常见病、多发病。脑外伤的特点是起病急,进展快,复杂多变,死亡率及致残率均较高^[1]。虽然近

* 国家自然科学基金(No. 81100925, No. 81472361)资助

△ 通信作者, E-mail: merrisn@hotmail.com

年来随着临床治疗技术的提高,其死亡率及致残率均有一定下降,但其治疗效果及康复情况仍不理想。因此加强其基础及临床研究是神经外科研究的重大课题。在临床实践中,评价颅脑损伤最为常用的指标除了格拉斯哥评分外,主要使用CT对于脑水肿及脑挫裂伤程度进行评价。目前在科学研究中最主要使用的颅脑损伤模型是大鼠自由落体脑损伤模型,其被广泛的运用在脑外伤的科学研究中^[2]。突触素被认为是突触的标志,突触在神经结构和功能中具有重要作用。同时也是评价神经再生的重要指标^[3-5]。目前在大鼠颅脑损伤模型研究中,关于颅脑损伤后的突触素随时间变化及其与影像、组织病理学的相关性评价较为缺乏。鉴于评价突触再生在神经再生研究中的重大意义,本研究采用Feeney大鼠自由落体脑损伤模型^[2,6],观察大鼠颅脑损伤后不同时间段突触素表达变化,同时结合临床实际,对突触素与颅脑损伤模型的影像学及病理学的相关性进行研究。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立

1.1.1 颅脑损伤装置 撞击装置由支架、砝码、套管和脚板四部分组成,套管长20 cm,其中每隔1 cm钻一个小孔以减少空气阻力,砝码重30 g,脚板为直径5 mm、高1 mm的圆柱体。

1.1.2 实验动物及分组 健康3月龄雄性SD大鼠24只,体质量300~350 g,笼内饲养,由四川省医学科学院实验动物中心提供。随机分为损伤2周、损伤4周、损伤8周组和对照组,每组6只。自由进食SPF大鼠饲料及蒸馏水。按照实验设计于不同时间段处死。

1.1.3 模型制作 3个损伤组大鼠术前均禁水禁食8 h,预防术中窒息。行乙醚预麻醉后,予1 mL/100 g水合氯醛腹腔内注射,麻醉后以俯卧固定于木板上,皮筋固定四肢,左侧颅顶部备皮,碘伏消毒后铺无菌巾,选取颅顶正中切口,切开长约4 cm的皮肤及骨膜,向两侧分离露出约1 cm²左右大小的颅骨范围,选取冠状缝前中线偏左侧钻孔,持针器扩大骨窗直径至约5 mm大小,期间需注意保护矢状窦,并避免撕脱硬脑膜,置入脚板。实验组使用30 g砝码于20 cm处自由落体进行撞击(能量为600 g·cm)。撞击之后保留骨窗,连续缝合头皮。对照组只切开皮肤并暴露切口范围,不行打击处理。损伤后死亡大鼠相应损伤组立即进行补充。

1.2 受伤后功能评价

损伤组大鼠分别于打击后24 h、2周、4周、8周进行功能评价。功能评价采用Bederson评分^[7]:将大鼠尾部提起至1 m高度观察双侧上肢,如双上肢均指向地面,认为无瘫痪记0分,如手术对侧持续挛缩,记1分。将记1分大鼠置于充分摩擦力的地面,保证其爪子能够紧紧抓住地面,轻轻提起尾巴,从各方向给予侧方力量直至前肢滑行一段距离,若患侧表现出抵抗侧方力量下降,记2分。让记2分大鼠自由运动,如大鼠出现圆圈状运动,记3分。

1.3 CT检查

损伤组大鼠分别于打击后24 h、2周、4周、8周行CT平扫检查(德国西门子公司,四川大学华西医院)。扫描时大鼠腹腔内预注射1 mL/100 g水合氯醛保持镇静。

1.4 取材及HE染色处理

CT检查及进行功能评价后,分别取损伤组大鼠3只(每组1只)于损伤后24 h处死,同时取对照组1只处死,以判定损伤效果。补足各组例数至6只,3个损伤组各6只大鼠分别于相应时间(2周、4周、8周)行CT检查后处死,并于上述时点分别处死对照组(每时点2只)作为对照。所有大鼠处死前均用乙醚预麻醉,水合氯醛(1 mL/100 g)腹腔内注射。用体积分数为10%的多聚甲醛心内灌注后,断颈后取完整脑组织。于损伤处做冠状切面取材,再用体积分数为10%的多聚甲醛固定。固定72 h后,行石蜡包埋,4 μ m连续切片,HE染色后镜下观察。

1.5 免疫荧光染色观察突触素的变化

各组大鼠处死后,采用PBS灌注脑组织,取出脑组织,取填入材料部分于OCT胶于-80℃速冻,切成5 μ m切片后,体积分数为4%的多聚甲醛固定1 h。PBS洗片两次。3% Triton X-100打孔15 min(Sigma, 美国),PBS清洗一次后,室温下抗原封闭液封闭1 h。PBS清洗两次后加入突触素一抗(SY38, ab8049, Abcam公司,美国,1:20),4℃过夜。PBS清洗两次后加入二抗(A0568, 碧云天,中国,1:500),室温孵育1 h后,PBS清洗两次,加入DAPI(0.5 g/mL)染色15 min。抗荧光淬灭剂封片,次日于激光共聚焦显微镜下观察两种抗体荧光分布密度及强度(莱卡公司,TCS SP8,四川大学)。

1.6 蛋白免疫印迹(Western blot)

剩余大鼠脑组织于液氮中研磨成粉末。RIPA裂解液(碧云天,中国)消化组织20 min。4℃下

12 000 r/min离心 5 min。常规测定脑组织中的蛋白浓度,加 SDS-PAGE 上样缓冲液,100 ℃下煮沸 10 min。120 g/L SDS-PAGE 凝胶上以 120 V 电压电泳 1 h。电泳后样品转至 PVDF 膜上,TBS 缓冲液清洗,室温下 5%脱脂牛奶封闭 2 h,加入一抗(SY38, ab8049, Abcam 公司,美国,1:20)在 4 ℃下孵育过夜。TBST 清洗 3 次后,加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗,在室温下避光孵育 1.5 h。显色后使用凝胶分析仪器分析。

2 结果

2.1 大鼠打击后神经功能障碍情况

术后损伤 2 周组大鼠于术后 24 h 内死亡 1 只,损伤 8 周组大鼠于术后 48 h 内死亡 1 只,共计 2

只,剩余所有大鼠均可爬行,该 2 只死鼠不纳入检测结果。在进行补充后,打击后 24 h 神经功能评分结果提示剩余大鼠神经功能评分 1 分者 7 只(38.9%),2 分者 8 只(44.4%),3 分者 3 只(16.7%)。对照组苏醒后无任何神经系统症状。损伤 2 周组神经功能评分为 (1.6 ± 0.55) 分,损伤 4 周组神经功能评分为 (1.2 ± 0.45) 分,损伤 8 周组神经功能评分为 (1.2 ± 0.45) 分。

2.2 CT 变化

损伤组大鼠脑组织低密度影于术后 24 h 明显可见,呈现全脑明显的低密度影,此后脑组织低密度灶的区域及程度开始减轻。至受伤后 2 周低密度影已经明显减退,受伤后 4 周及 8 周时脑损伤已经不明显,仅可见骨窗缺损(图 1)。

2.3 HE 染色组织学变化

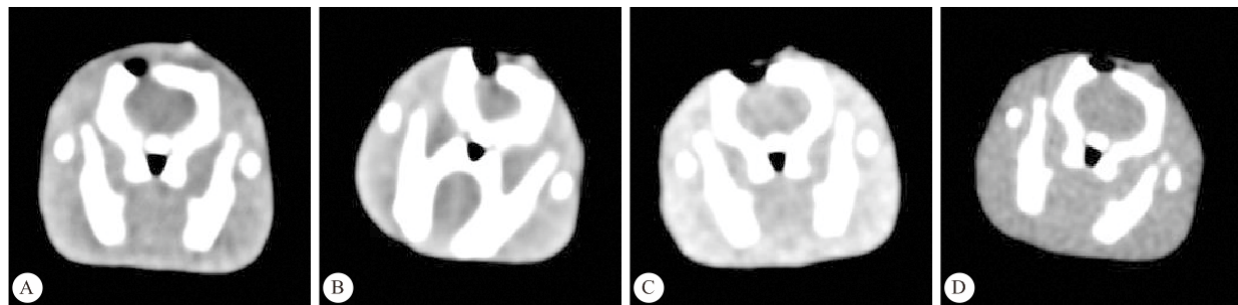


图 1 损伤组大鼠术后 24 h(A)、2 周(B)、4 周(C)和 8 周(D) CT 平扫检查结果

Fig 1 CT scan images of rats at 24 h (A), 2 weeks (B), 4 weeks (C) and 8 weeks (D) after injury

见图 2。对照组在预设时间点处死后,大鼠脑组织可见完整神经元,其呈椭圆形或圆形,可见明显神经树突及轴突。神经元细胞核核膜完整,核仁清晰,呈蓝紫色,神经纤维呈现致密状,染色均匀。实验组脑组织神经元于 24 h 出现细胞肿胀,胞质呈淡染,提示脑细胞水肿,神经元核膜不清,部分细胞核仁移位,另一部分细胞核仁消失,提示细胞的坏死。另外尚可见局部的充血。大鼠受伤 2 周后较多神经元细胞周围出现空隙,同时也可见深染的神经元,整体表现提示出现脑溶解性液化及坏死。而大鼠受伤 4 周及 8 周后除可见明显组织缺损外,无明显组织学变化。

2.4 突触素变化

免疫荧光染色结果(图 3)与 Western blot 结果(图 4)均提示,与损伤 2 周时相比,大鼠脑组织突触素的表达在损伤 4 周时变化不大,损伤 8 周时大鼠脑组织突触素的表达较之前均有上升。但 3 个损伤组与对照组比较突触素的表达均降低。

3 讨论

原发及继发性脑损伤都会带来神经细胞损伤并进而产生突触的损伤,而目前突触的再生仍然是神经科学的难题之一,而在脑外伤后轴突及突触在自然环境下随时间变化规律也较少被研究。本研究分析了大鼠在颅脑损伤后不同时间段的影像学、组织学及突触素表达变化。发现大鼠脑组织外伤后均出现不同程度的神经功能障碍,提示大鼠颅脑损伤模型建立成功。本研究发现外伤后 CT 影像提示骨窗缺损及大鼠脑组织低密度影像,这一现象提示脑水肿及脑挫裂伤的产生。大鼠脑组织水肿自损伤后 24 h 明显产生,随着时间的推移脑组织低密度灶区域及程度开始减轻。至 2 周水肿已经明显减退,4 周、8 周只可见骨窗缺损。在相应的时间点的组织病理学变化提示脑组织于颅脑损伤后 24 h 出现水肿、坏死及充血,于受伤后 2 周出现脑神经元溶解性液化及坏死,在受伤 4 周及 8 周时则以组织坏死及

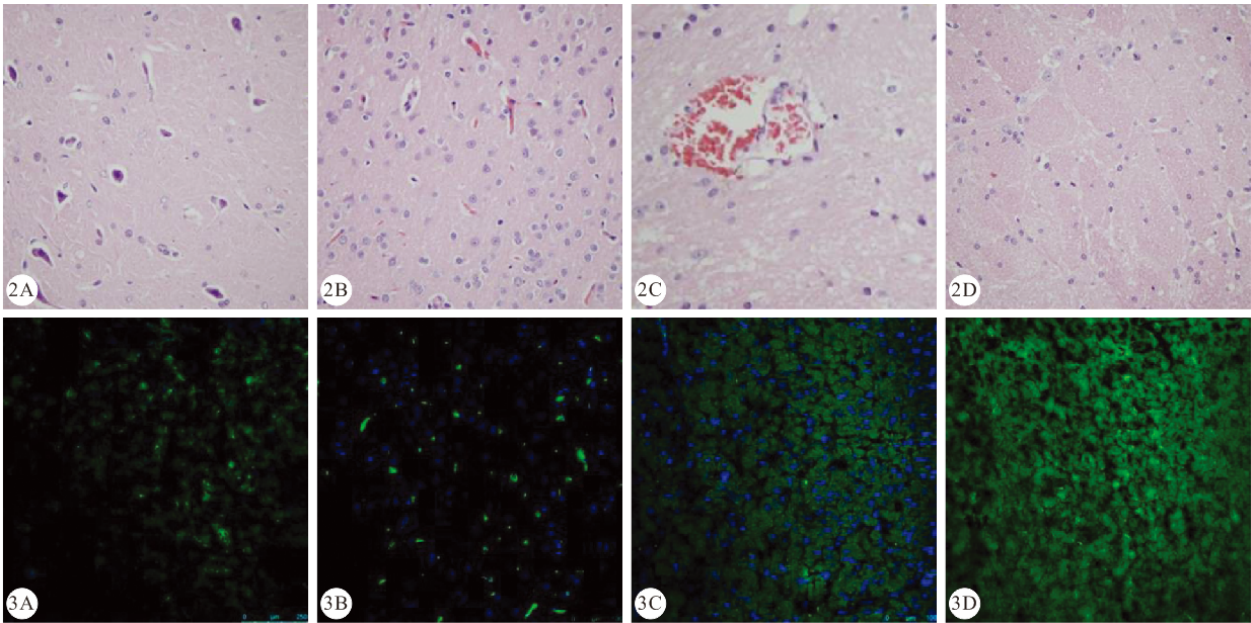


图 2 颅脑损伤后 24 h(×400)和 2 周(×200)时的大脑组织 HE 染色结果
光染色 ×200

图 3 颅脑损伤后大鼠脑组织中的突触素表达变化。免疫荧
光染色 ×200

Fig 2 HE staining images of rat brain tissues at 24 h (×400) and 2 weeks (×200) after injury

Fig 3 The alterations of expression of the
synaptophysin in rat brain injury model. Immunofluorescence ×200

2A: Pyknotic nuclei of neurons at 24 h after injury; 2B: Edema of neurons and other nerve cells at 24 h after injury; 2C: Congestion of brain tissue 24 h after injury; 2D: The brain tissues showed colliquative necrosis at 2 weeks after injury; 3A: 2 weeks after injury; 3B: 4 weeks after injury; 3C: 8 weeks after injury; 3D: Control

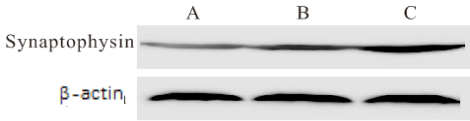


图 4 颅脑损伤后大鼠脑组织中突触素的 Western blot 检查结果

Fig 4 The alterations of expression of the synaptophysin in rat brain
injury model (Western blot)

A: 2 weeks after injury; B: 4 weeks after injury; C: 8 weeks after injury

缺损为主要表现。实验中组织病理学及 CT 结果提示,脑水肿及脑挫裂伤,神经元坏死的自然变化在组织学及 CT 影像上所呈现的规律具有一致性,并且组织学表现可以通过 CT 反映出来。这与目前文献所报道的脑损伤规律有一致性^[6]。证实了大鼠组织病理学变化与 CT 影像学变化的一致性,同时表明我们成功建立大鼠脑损伤模型。

突触素作为突触的重要标志,突触素在调节突触功能方面具有重要作用,其在突触的锚定、释放、回收中具有重要功能,并直接影响着神经功能的执行^[4-5]。其在脑损伤中的变化规律,代表着脑组织再生、突触重建及神经功能重建的变化规律。但目前文献少有对于其在大鼠脑损伤模型中表达量变化

的报道。本研究结果提示较之损伤 2 周时,突触素在损伤 4 周时变化不大,而损伤第 8 周突触素的表达较之第 2 周及第 4 周均有上升。通过对比突触素和病理学、影像学的变化,我们发现,突触素的变化,与脑损伤的严重程度及恢复变化趋势存在一致性,这提示脑存在一定的自我修复功能,但是其自我修复的程度有限,难以恢复受伤前的结构。

本大鼠颅脑损伤研究与临床工作中常见的颅脑损伤患者的病理及病理生理变化均有一定的相似性。通过观测实验大鼠行为变化、CT 表现、组织病理学表现,证实我们成功建立 Feeney 大鼠自由落体脑损伤模型。同时我们尚发现突触素的变化随时间变化的规律与影像学、组织病理学变化有关。本研究结果可以为研究药物促进神经轴突的再生效果提供实验模型及对照数据,可用于神经再生的研究。

参 考 文 献

[1] 李 冰,李宗敏,郭建欣,等. 6496 例颅脑损伤的流行病学特征. 中华神经外科杂志,2005,21(4):197-199.

[2] FEENEY DM, BOYESON MG, LINN RT *et al.* Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. Brain Res,1981,211(1):67-77.

- [3] HOU XE, DAHLSTRÖM A. Synaptic vesicle proteins and neuronal plasticity in adrenergic neurons. *Neurochem Res*, 2000,25(9/10):1275-1300.
- [4] SONG SH, AUGUSTINE GJ. Synapsin Isoforms and Synaptic Vesicle Trafficking. *Mol Cells*, 2015, 38(11): 936-940.
- [5] CHEN J, YU S, FU Y, *et al.* Synaptic proteins and receptors defects in autism spectrum disorders. *Front Cell Neurosci*, 2014(8):276[2015-11-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4161164/>. doi: 10. 3389/fncel. 2014. 00276.
- [6] 张荣军, 游 潮, 蔡博文, 等. Feeney 法建立大鼠闭合性脑损伤模型及评估. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19(12): 1015-1018.
- [7] BEDERSON JB, PITTS LH, TSUJI M, *et al.* Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.

(2015 - 12 - 09 收稿, 2016 - 03 - 11 修回)

编辑 汤 洁

(上接第 851 页)

- [2] MARCHESAN JT, MORELLI T, MOSS K, *et al.* Association of Synergistetes and Cyclodipeptides with Periodontitis. *J Dent Res*, 2015, 94(10): 1425-1431.
- [3] CHAPPLE IL, GENCO R; working group 2 of the joint EFP/AAP workshop. Diabetes and periodontal diseases; consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*, 2013, 84(4 Suppl): S106-S112.
- [4] ZHOU J, JIANG N, WANG S, *et al.* Exploration of human salivary microbiomes-insights into the novel characteristics of microbial community structure in caries and caries-free subjects. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147039[2015-11-03]. dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0147039.
- [5] GURSOY UK, KÖNÖNEN E, PUSSINEN PJ, *et al.* Use of host- and bacteria-derived salivary markers in detection of periodontitis; a cumulative approach. *Dis Markers*, 2011, 30(6): 299-305.
- [6] ABUSLEME L, DUPUY AK, DUTZAN N, *et al.* The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J*, 2013, 7(5): 1016-1025.
- [7] PARK OJ, YI H, JEON JH, *et al.* Pyrosequencing Analysis of Subgingival Microbiota in Distinct Periodontal Conditions. *J Dent Res*, 2015, 94(7): 921-927.
- [8] GRIFFEN AL, BEALL CJ, CAMPBELL JH, *et al.* Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J*, 2012, 6(6): 1176-1185.
- [9] JAKUBOVICS NS. Intermicrobial Interactions as a Driver for Community Composition and Stratification of Oral Biofilms. *J Mol Biol*, 2015, 427(23): 3662-3675.
- [10] KISTLER JO, BOOTH V, BRADSHAW DJ, *et al.* Bacterial community development in experimental gingivitis. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71227[2015-11-03]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0071227>.
- [11] HUANG S, YANG F, ZENG X, *et al.* Preliminary characterization of the oral microbiota of Chinese adults with and without gingivitis. *BMC Oral Health*, 2011(11): 33[2015-11-03]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22152152>. doi: 10.1186/1472-6831-11-33.
- [12] ZORINA OA, PETRUKHINA NB, BASOVA AA, *et al.* Identification of key markers of normal and pathogenic microbiota determining health of periodontium by NGS-sequencing 16S-rDNA libraries of periodontal swabs. *Stomatologiia (Mosk)*, 2014, 93(6): 25-31.
- [13] NAKANO K, MIYAMOTO E, NEMOTO H, *et al.* Clinical and microbiological evaluations of mandibular lateral incisor with radicular-gingival groove. *Pediatric Dental Journal*, 2007, 17(1): 93-99.
- [14] KIANOUSH N, ADLER CJ, NGUYEN KA, *et al.* Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92940[2015-11-03]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0092940>.
- [15] PAES BATISTA DA SILVA A, BARROS SP, MOSS K, *et al.* Microbial profiling in experimentally induced biofilm overgrowth among patients with various periodontal states. *J Periodontol*, 2016, 87(1): 27-35.

(2016 - 03 - 17 收稿, 2016 - 08 - 25 修回)

编辑 沈 进