

烧伤后慢性应激对大鼠海马微管相关蛋白-2 和胶质纤维酸性蛋白表达的影响

何 梅¹ 章 霞² 陈鹏慧³ 杨宗城¹

摘要 目的: 探讨烧伤后慢性应激大鼠海马神经元微管相关蛋白-2 (MAP-2) 和神经胶质细胞胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 表达的变化。**方法:** 采用 30% 深 II 度烫伤、孤养及慢性中度不定期应激联合建立烧伤后并发抑郁模型, 采用旷场实验观察烧伤后并发抑郁大鼠行为反应, 电镜和免疫组化观察不同区域海马 MAP-2 和 GFAP 的表达及神经元和神经胶质细胞超微结构的变化。**结果:** 烧伤后并发抑郁大鼠活动潜伏期明显延长, 行为反应明显降低 ($P < 0.01$)。烧伤后并发抑郁、烧伤、抑郁及正常组之间 MAP-2 和 GFAP 在 CA1 区变化不明显; 烧伤后并发抑郁大鼠在 CA3 区 MAP-2 和 GFAP 阳性细胞计数和累积光密度 ($89.58 \pm 15.18, 69162.63 \pm 7905.36; 57.33 \pm 6.50, 37918.42 \pm 2060.98$) 明显低于正常组 ($108.80 \pm 18.45, 84607.07 \pm 13602.34; 90.50 \pm 5.98, 55616.67 \pm 3776.54; P < 0.05$); 在齿状回烧伤并发抑郁大鼠 MAP-2 和 GFAP 阳性细胞计数和累积光密度 ($261.00 \pm 35.37, 32199.93 \pm 1344.15; 73.42 \pm 7.32, 68465.21 \pm 15571.64$) 与正常组相比 ($293.00 \pm 24.47, 40299.77 \pm 1155.97; 113.10 \pm 6.72, 108416.10 \pm 5128.89$) 也明显降低 ($P < 0.05$)。电镜可见烧伤并发抑郁组神经元和神经胶质细胞胞浆肿胀, 有的线粒体髓鞘样改变, 线粒体肿胀、空泡化, 内质网扩张等改变。**结论:** 海马神经元和神经胶质细胞结构改变可能是烧伤后抑郁发生的重要病理生理基础。

关键词 烧伤; 慢性应激; 微管相关蛋白-2; 胶质纤维酸性蛋白

中图分类号: R743.3, R493 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2009)-09-0779-04

The influence of chronic stress after burn on the expressions of MAP-2 and GFAP in hippocampus of rats/
HE Mei, QIN Xia, CHEN Penghui, et al. // Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(9): 779—782

Abstract Objective: To study the expressions of microtubule associated protein-2 (MAP-2) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in hippocampus of rats with depression after burn. **Method:** The depression after burn model of rats was established by 30% deep partial thickness burn combined with chronic unpredicted mild stress and separation feed. The behavior reaction of depression after burn on rats were investigated. The expressions of MAP-2 and GFAP and ultrastructures of neurons and astrocytes in hippocampus were analyzed. **Result:** Compared with controls, there were significant influences of depression after burn on the open-field behavior of rats: the latency prolonged and the behavior reaction reduced ($P < 0.01$). The number and accumulate photodensity of MAP-2 and GFAP in CA3 area of depression after burn rats decreased significantly ($89.58 \pm 15.18, 69162.63 \pm 7905.36; 57.33 \pm 6.50, 37918.42 \pm 2060.98$) than that in control group ($108.80 \pm 18.45, 84607.07 \pm 13602.34; 90.50 \pm 5.98, 55616.67 \pm 3776.54$), $P < 0.05$. The number and accumulate photodensity of MAP-2 and GFAP in dentate gyrus (DG) of depression after burn rats also decreased significantly ($261.00 \pm 35.37, 32199.93 \pm 1344.15; 73.42 \pm 7.32, 68465.21 \pm 15571.64$) than that in control group ($293.00 \pm 24.47, 40299.77 \pm 1155.97; 113.10 \pm 6.72, 108416.10 \pm 5128.89$), $P < 0.05$. The observation under electron microscope showed swelling and vacuolization of mitochondrion, myelin sheath irregular changes of neurons and astrocytes in hippocampus of rats with depression after burn. **Conclusion:** The changes of ultrastructure of neurons and astrocytes in hippocampus may be the important pathophysiological basis of depression after burn in rats.

Author's address Burn Department of Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038

Key words burn; chronic stress; microtubule associated protein-2; glial fibrillary acidic protein

海马是介导应激反应的主要脑区, 也是应激激素作用的主要靶器官^[1], 海马内有大量对皮质醇敏感的糖皮质激素受体, 海马在正常情况下参与对 HPA (hypothalamo-pituitary-adrenal) 轴的反馈调节, 对应激进行调节。有研究认为, 慢性和长期的应激刺激会导致海马体积萎缩和细胞死亡^[2]。烧伤及其伴发的一系列生理、心理和社会的刺激作为一种长期的应激

源, 极易引发抑郁情绪障碍, 成为烧伤患者并发心境障碍的重要因素^[3]。本文就大鼠海马微管相关蛋白 2

1 第三军医大学西南医院烧伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆, 400038

2 第三军医大学西南医院整形科

3 第三军医大学神经生物教研室

作者简介: 何梅, 女, 主管护师, 博士

收稿日期: 2008-11-12

(microtubule associated protein 2, MAP2) 和胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 在烧伤后抑郁的病理生理作用进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

成年 Wistar 大鼠, 体质量 180—220g, 由第三军医大学第三附属医院动物中心提供, 清洁级, SCXK (军)2002008。选取旷场实验得分在 30—120 分的大鼠, 随机分成单纯烧伤组 (10 只); 参照《实验烧伤外科学》^[4] 制作 30% 深 II 度烫伤模型; 单纯抑郁组 (12 只); 以慢性不可预见性的中度刺激^[5], 配合孤养, 7 种应激因子按随机方法在 21d 内应用: 昼夜颠倒 24h, 禁食 24h, 夹尾 1min, 电击足底 (电压 36V, 10s/次, 间隔 1min 刺激 1 次, 共 30 次), 束缚应激 24h, 摇晃 (频率 1 次/s, 共 15min), 冰水游泳 (水温 4℃, 5min); 烧伤并发抑郁组 (12 只): 先制作 30% 深 II 度烫伤模型, 再采用慢性不可预见性的中度刺激; 正常对照组 (12 只): 每笼 4 只, 常规喂养。

1.2 方法

1.2.1 旷场实验: 采用 open-field 法 (旷场实验) 测定其行为, 观察时将单个大鼠放进旷场实验箱中央, 记录大鼠在 3min 内的行为表现, 包括在中央格停留时间、水平穿越格数、竖立次数、修饰次数和粪便粒数。行为评定在安静的房间内, 由 3 位观察者同时进行观察, 取 3 人统计的平均值作为实验大鼠原始的行为学数据。

1.2.2 免疫组化及电镜方法: 灌注取材: 每只大鼠用 2% 戊巴比妥钠 (60mg/kg) 行腹腔麻醉, 经左心室—

主动脉插管, 用 300ml 生理盐水快速灌注冲洗, 继之灌入 4% 多聚甲醛 500ml, 持续灌注 1h, 小心开颅取脑并修块, 置于 4% 多聚甲醛溶液中后固定 48h, 30% 蔗糖脱水 48h, 冰冻切片, 片厚 30 μ m, 对照大鼠脑立体定位图谱, 每只选取海马部位切片 5 张, 按照 SP 试剂盒上实验方法进行免疫组化, DAB 显色。

电镜取材: 灌流大鼠方法同前, 迅速剥离脑组织, 将靶点海马组织切成 1mm 小块, 置于 2.5% 戊二醛内室温固定 2h, 组织块经固定、漂洗、脱水、浸透、包埋和固化、超薄切片及染色, 制成电镜标本, 观察神经细胞、胶质细胞的超微结构。

1.2.3 图像分析: 应用 Motic 公司生产的内置数码显微镜, 参考大鼠大脑断层图谱定位大鼠海马 CA1、CA3 区和齿状回, 采用北航医学图像分析管理分析系统 (4.0) 进行形态计量学分析阳性细胞数、平均光密度、累积光密度值。每只大鼠计量 5 张切片, 每张切片双侧海马平均值代表这张切片的值。5 张切片的平均值为该只动物的值。

1.3 统计学分析

所有数据采用 SPSS13.0 统计学软件包进行单因素方差分析, 双侧检验 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 旷场行为比较

见表 1。烧伤后抑郁对大鼠旷场行为产生重要的影响, 潜伏期时间明显延长, 水平运动和直立运动明显减少, 修饰次数和大便无明显差异, 单纯烧伤大鼠只有水平运动明显减少。

2.2 各组大鼠海马各区神经元 MAP2 表达比较

组别	潜伏期(s)	水平格数(格)	直立次数(次)	修饰次数(次)	大便粒数(粒)
烧伤组(n=10)					
前测	3.51 $\pm$ 1.24	49.11 $\pm$ 14.76	14.90 $\pm$ 3.98	2.60 $\pm$ 1.26	2.10 $\pm$ 0.99
后测	4.70 $\pm$ 1.70	27.44 $\pm$ 6.67 ^①	11.10 $\pm$ 4.91	1.70 $\pm$ 0.67	2.60 $\pm$ 1.35
抑郁组(n=12)					
前测	4.25 $\pm$ 1.71	53.14 $\pm$ 14.51	12.13 $\pm$ 4.26	2.38 $\pm$ 1.06	1.88 $\pm$ 1.13
后测	9.50 $\pm$ 5.24 ^①	9.71 $\pm$ 10.59 ^①	6.38 $\pm$ 1.92 ^①	1.25 $\pm$ 1.04	3.50 $\pm$ 2.00
烧伤并发抑郁组(n=12)					
前测	4.03 $\pm$ 0.98	52.57 $\pm$ 18.19	14.00 $\pm$ 3.63	1.50 $\pm$ 0.76	2.00 $\pm$ 0.76
后测	9.00 $\pm$ 3.63 ^①	18.29 $\pm$ 12.22 ^①	4.88 $\pm$ 3.64 ^①	1.38 $\pm$ 0.52	3.13 $\pm$ 1.81
正常对照组(n=12)					
前测	3.65 $\pm$ 1.56	57.11 $\pm$ 16.31	14.80 $\pm$ 4.78	2.40 $\pm$ 1.17	2.00 $\pm$ 0.67
后测	3.80 $\pm$ 1.40	45.33 $\pm$ 16.58	11.20 $\pm$ 6.18	1.90 $\pm$ 0.28	1.60 $\pm$ 0.97

①与正常对照组比较 $P<0.01$

见表 2。烧伤后并发抑郁大鼠海马 MAP2 细胞计数和光密度分析显示在 CA1 区表达无明显差异; 在 CA3 区表达明显降低 ($F=4.48, P=0.01; F=4.13, P=0.01; F=5.17, P=0.00$); 细胞计数和累积光密度在齿状回表达明显低于单纯烧伤组和正常组 ($F=4.56, F=$

4.73, $P=0.01$)。

2.3 各组大鼠海马各区神经胶质细胞 GFAP 表达比较

见表 3。海马星形胶质细胞计数, 平均和累积光密度分析显示烧伤后并发抑郁大鼠在 CA1 区 GFAP

表达无明显变化; 在 CA3 区表达有显著降低 ($F=7.23, F=7.39, F=9.73, P=0.00$); 在齿状回表达有显著降低 ($F=7.10, F=11.40, F=15.39, P=0.00$)。

2.4 海马神经元和神经胶质细胞的电镜结果

正常大鼠海马神经元和神经胶质细胞排列规则, 结构清楚。而抑郁组和烧伤并发抑郁组大鼠神经

元和神经胶质细胞胞浆肿胀, 有的线粒体髓鞘样改变, 线粒体肿胀、空泡化, 内质网扩张, 细胞核内异染色质增多, 烧伤组大鼠海马神经元和神经胶质细胞神经元改变不明显, 胶质细胞除了有的水肿外, 其余改变不明显。见图 1。

表 2 4 组大鼠海马各区 MAP2 表达

($\bar{x} \pm s$)

组别/分区	样本数(只)	细胞计数	平均光密度	累计光密度
正常对照组	10			
CA1		24.30±4.64	0.17±0.01	45132.39±3613.89
CA3		108.80±18.45	0.20±0.04	84607.07±13602.34
齿状回		293.00±24.47	0.17±0.01	40299.77±1155.97
烧伤组	12			
CA1		27.08±2.35	0.17±0.01	46721.39±4742.96
CA3		98.00±7.35	0.18±0.01	72155.74±6429.33
齿状回		295.08±15.02	0.17±0.01	39943.73±1122.17
抑郁组	12			
CA1		25.17±3.88	0.17±0.01	46724.12±3929.12
CA3		91.00±11.87 ^①	0.18±0.01	70931.58±11322.10 ^①
齿状回		276.25±22.67	0.16±0.01	33980.27±3021.16
烧伤并发抑郁组	12			
CA1		27.00±2.98	0.16±0.01	44898.49±3897.05
CA3		89.58±15.18 ^①	0.18±0.01*	69162.63±7905.36 ^②
齿状回		261.00±35.37 ^①	0.16±0.01	32199.93±1344.15 ^①

与正常对照组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$ 。

表 3 4 组大鼠海马各区 GFAP 表达

($\bar{x} \pm s$)

组别/分区	样本数(只)	细胞计数	平均光密度	累计光密度
正常对照组	10			
CA1		87.00±19.66	0.18±0.03	18655.00±1046.38
CA3		90.50±5.98	0.16±0.01	55616.67±3776.54
齿状回		113.10±6.72	0.21±0.03	108416.10±5128.89
烧伤组	12			
CA1		96.00±19.84	0.18±0.03	16877.59±504.92
CA3		87.33±6.05	0.17±0.03	50671.99±2840.73
齿状回		108.50±7.97	0.20±0.04	111157.60±23772.56
抑郁组	12			
CA1		83.17±21.14	0.18±0.03	19832.68±843.38
CA3		62.17±6.44 ^①	0.14±0.03	40509.17±1828.33 ^②
齿状回		81.42±6.94 ^①	0.17±0.01 ^②	88887.55±10640.19*
烧伤并发抑郁组	12			
CA1		90.83±22.48	0.19±0.03	17984.71±989.37
CA3		57.33±6.50 ^②	0.14±0.03 ^①	37918.42±2060.98 ^②
齿状回		73.42±7.32 ^②	0.16±0.01 ^②	68465.21±15571.64 ^②

与正常对照组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$ 。

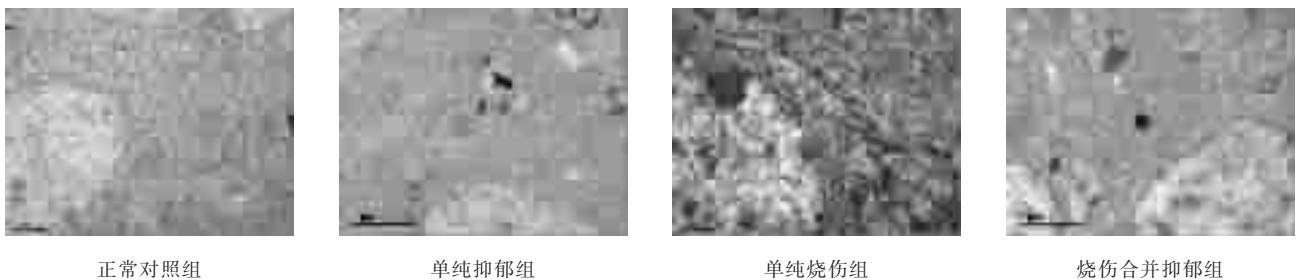


图 1 4 组大鼠海马神经元和神经胶质细胞的电镜所见

($\times 8900$)

3 讨论

动物抑郁模型的制作方法较多, 通常有药物诱发模型、获得性无助模型、慢性应激模型、孤养模型、双侧嗅束切除模型等, 根据对临床上抑郁患者的观

察来看, 长期孤立于社会及慢性的心理社会应激因素是其发病的重要诱发原因, 因此本实验采用 30% 深 II 度烧伤合并慢性不可预见中度刺激配合孤养的动物模型, 可较好地模拟烧伤后慢性心理应激过

程^[5], 实验分组前先用旷场实验对大鼠进行筛选, 剔除活动度极强和活动度极弱的大鼠, 消除大鼠本身行为异质性。旷场行为结果显示烧伤后并发抑郁大鼠对新环境的判断和探索能力下降, 活动度减弱, 兴奋性降低。

在中枢神经系统中, 海马是与认知行为功能密切相关的重要脑区, 富含糖皮质激素受体, 在应激时, 海马极易选择性地受到高浓度糖皮质激素的攻击^[6-7]。本研究通过电镜对大鼠海马神经元和神经胶质细胞的形态学进行观察, 发现烧伤并发抑郁组和抑郁组大鼠神经元和神经胶质细胞少部分可见胞体轻度肿胀, 线粒体肿胀、空泡化, 内质网扩张, 细胞核内异染色质增多, 烧伤组大鼠海马神经胶质细胞除了有一部分轻度水肿外, 其余无明显改变。

关于海马结构和功能改变的机制研究认为, MAP2 是一种重要的细胞骨架结构蛋白, 能够调节微管的聚合、生长及稳定性, 主要参与神经生长发育及神经损伤后细胞骨架的建立和重建过程, 在海马 MAP2 主要存在神经元细胞树突, 对神经元发育、突触形成和突触可塑性调节, 维持海马神经元形态以及神经元树突生长中发挥重要作用, 可作为神经元形态损害的早期标志物^[8]。在本研究中海马神经元 MAP2 表达减少, 主要是在 CA3 区及齿状回表达减少, 平均光密度和累积光密度降低, 在 CA1 区无显著差异(见表 2)。可能 CA3 区和齿状回对应激更为敏感^[9], 锥体细胞含 GC 受体(糖皮质激素受体)较丰富, 因此受到慢性应激的影响较为明显, 在严重应激时也可累及 CA1 区^[10], 出现锥体细胞萎缩, 树突总长度减少等表现。

GFAP 是中枢神经系统中星形细胞独有的细胞骨架蛋白, 是星形细胞中主要的中间丝蛋白, 被认为是星形细胞的特征性标志, 因此, GFAP 可作为研究中枢神经系统损伤后胶质反应的一种指标。本研究采用 GFAP 作为标记, 发现烧伤后抑郁大鼠星形胶质细胞在 CA3 区和齿状回明显减少(见表 3)。星形胶质细胞在中枢神经系统中主要是支持和营养神经元, 维持神经元周围微环境稳定, 被认为是维持神经元正常功能活动的辅助细胞, 星形胶质细胞还通过多种神经生长因子和神经营养因子, 对神经元起到神经营养作用, 从而影响神经元细胞的生长和死亡^[11-13]。近年来, 越来越多的研究认为星形胶质细胞在神经元的信号传递, 突触传递和可塑性方面也具有重要调节作用, Greg 认为星形胶质细胞可能通过调节谷氨酸及单胺类物质含量等方式在精神障碍

类疾病如焦虑、抑郁发病中发挥重要作用^[14-15]。星形胶质细胞不仅影响对神经元细胞的营养和支持, 还可能通过改变神经元突触可塑性, 导致烧伤后并发抑郁大鼠认知行为能力的改变。

烧伤后慢性应激会导致大鼠海马神经元和胶质细胞结构和表达变化, 但这种改变是通过何种途径引起烧伤后慢性应激大鼠认知行为改变还需进一步实验研究。

参考文献

- [1] McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity [J]. *Annu Rev Neurosci*, 1999, 22: 105—122.
- [2] Duman RS, Malberg J, Thome J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment [J]. *Biological Psychiatry*, 1999, 46: 1181—1191.
- [3] 何梅, 刘旭盛, 刘永芳. 烧伤患者心理状态调查与对策 [J]. *中华烧伤杂志*, 2001, 17: 311.
- [4] 黎鳌主编. 实验烧伤外科学 [M]. 重庆出版社, 1997. 34—42.
- [5] Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural—neurobiological concordance in the effects of CMS [J]. *Neuropsychobiology*, 2005, 52(19): 90—110.
- [6] 何梅, 覃霞, 陈军, 等. 烧伤后并发抑郁患者下丘脑—垂体—肾上腺轴功能变化的研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22 (12): 1120—1121.
- [7] Sapolsky RM. Why stress is bad for your brain [J]. *Science*, 1996, 273(5276): 749—50.
- [8] Dehmelt L, Smart FM, Ozer RS, et al. The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(29): 9479—9490.
- [9] Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ, et al. A molecular and cellular theory of depression [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 1997, 54: 597—606.
- [10] 王治静, 刘小红, 汪东, 等. GM1 对惊厥持续状态幼鼠学习记忆功能及海马 CA1 区神经元的远期影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(10): 919—920.
- [11] Grag Miller. The dark side of glia [J]. *Science*, 2005, 308(6): 778—781.
- [12] 徐静, 万燕杰, 曾因明. 手术创伤对大鼠空间学习记忆能力及海马 GFAP 和 S100 蛋白表达的影响 [J]. *中国行为医学科学*, 2006, 15(4): 302—304.
- [13] 李萍, 王宗文, 严进. 睫状神经营养因子对 NMDA 引起海马神经元损伤的作用 [J]. *中国康复医学杂志*, 2005, 20(10): 728—730.
- [14] Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, et al. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus [J]. *J Neurosci*, 1995, 15(3): 1768—1777.
- [15] 徐斌, 陈俊抛, 林煜, 等. 去松果体对大鼠学习记忆及海马结构星形胶质细胞的影响 [J]. *中国行为医学科学*, 2000, 9(3): 188—192.