

[文章编号] 1671-587X(2010)02-0225-04

## 新生大鼠视神经损伤后视觉系统中 GAP-43 的表达

霍妍, 袁容娣, 叶剑, 尹小磊, 邹欢

(重庆市第三军医大学大坪医院野战外科研究所眼科, 重庆 400042)

**[摘要]** 目的: 研究新生大鼠视神经横断伤后视觉系统中神经生长相关蛋白质(GAP-43)的表达变化及意义。方法: 新生健康SD大鼠(24 h) 72只, 随机分为正常对照组和视神经横断组。采用免疫组织化学方法检测正常发育及视神经损伤后发育过程中1、3、7、14、28和56 d的SD大鼠视觉系统中GAP-43的表达。结果: 正常对照组SD大鼠出生后整个发育阶段视觉系统中均可检测到GAP-43阳性细胞的表达, 且随着神经元发育成熟表达逐渐下降( $P < 0.05$ ); 视神经横断组GAP-43在损伤后发育过程中可检测到阳性表达, 且较正常对照组增高, 1 d变化不明显, 3 d开始增高, 7~14 d达峰值, 之后逐渐下降至正常水平, 直至56 d基本恢复正常水平( $P < 0.05$ )。结论: GAP-43在新生鼠视觉系统中随生长发育而改变, 在神经横断后GAP-43表达增强, 表明GAP-43在视觉系统发育和再生过程中起重要作用。

**[关键词]** 神经生长相关蛋白; 视觉系统; 大鼠, Sprague-dawley

**[中图分类号]** R774; R-332 **[文献标志码]** A

## Expression of growth associated protein-43 after optic nerve transection injury in visual system of neonatal rats

HUO Yan, YUAN Rong-di, YE Jian, YIN Xiao-lei, ZOU Huan

(Department of Ophthalmology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract: Objective** To study the expression of growth associated protein 43 (GAP-43) after optic nerve transection injury in visual system of neonatal rats and its significance. **Methods** The healthy neonatal SD rats (24 h) were randomly divided into normal control group and optic nerve transection injury group. Immunohistochemical staining technique was used to detect the expressions of GAP-43 in normal and optic nerve transection injury visual system of neonatal rats at 1, 3, 7, 14, 28, 56 d after birth. **Results** The positive expression of GAP-43 in normal control group was found in visual system of neonatal rats at developing stage and with the neurons mature the expression of GAP-43 was decreased ( $P < 0.05$ ). The positive expression of GAP-43 in optic nerve transection injury group was found and was higher than that in normal control group. There was no significant change at 1 d, the expression of GAP-43 in optic nerve transection injury group was increased at 3 d and reached peak at 7-14 d, then it was gradually decreased to normal level until 56 d. **Conclusion** The expression of GAP-43 in visual system of neonatal rats changes with the development. The expression of GAP-43 is increased after optic nerve transection injury. This result suggests that GAP-43 may play an important role in the developing and regeneration of visual system.

**Key words:** growth associated protein; visual system; rats, Sprague-dawley

神经生长相关蛋白 43 (growth associated protein 43, GAP-43) 是一种神经细胞膜上的特异

[收稿日期] 2009-12-30

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题 (30572009)

[作者简介] 霍妍 (1984-), 女, 吉林省四平市人, 医师, 在读医学硕士, 主要从事视神经损伤与修复的研究。

[通信作者] 叶剑 (Tel: 023-68757820, E-mail: yejian1979@163.com)

性磷蛋白,在神经发育和再生过程中呈高表达,能调节神经元对轴突引导信号的反应,在引导轴突生长和调节轴突形成新的联系上起关键作用<sup>[1-2]</sup>,是神经元发育和可塑性的分子标志物<sup>[3]</sup>。神经元的发育和再生过程中,GAP-43伴随着轴突的生长在神经组织内大量合成,其表达产物主要位于轴突生长锥质膜面,该蛋白通过加速生长锥基部胞质膜的扩展而促进轴突生长。神经损伤刺激GAP-43的合成增加,经快速轴浆流运送到受损的神经纤维,为伤侧近端的神经纤维轴芽生长提供了必需的物质<sup>[4]</sup>,国际上将GAP-43列为研究神经生长发育和损伤修复等神经可塑性的首选分子探针。有关GAP-43的深入研究将进一步阐明神经发育和再生过程中轴突延伸及导向性的分子基础,但到目前为止,GAP-43在神经再生中的确切作用仍未完全清楚。本研究旨在观察新生鼠视神经横断伤后视觉系统中GAP-43的表达,为神经再生的研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

1.1 实验动物 出生24 h内的SD大鼠,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,雌雄不限,分为正常对照组和视神经横断伤组,正常发育与视神经横断伤后1、3、7、14、28和56 d 6个时相点,每个时相点6只SD大鼠。动物模型建立:手术横断右侧视神经。乙醚麻醉,消毒、铺巾,剪开上眼睑及上方结膜、眼外肌,暴露视神经,在球后2 mm处横断视神经,缝合伤口,结膜囊涂金霉素眼膏,术后青霉素眼药水点眼。对照组除不横断视神经外,其余步骤相同。

1.2 主要试剂及仪器 兔抗大鼠GAP-43多克隆抗体(Abcam, ab16053),SP免疫组织化学试剂盒、DAB显色试剂盒(北京中杉生物技术公司)。自动脱水机、石蜡切片机(Leica公司),光学显微镜(Olympus公司)。

1.3 实验动物灌注固定及取材 取正常组和视神经横断组1、3、7、14、28和56 d 6个时相点SD大鼠分别行乙醚麻醉,打开胸腔,剪开心包膜,左心室插管,剪开右心房,生理盐水加少许肝素灌注至流出液基本清亮后,4%多聚甲醛灌注。灌注后取双侧眼球及全脑置于体积分数4%多聚甲醛4℃外固定24 h。

1.4 免疫组织化学染色检测 将固定好的标本常

规脱水、浸蜡、包埋,将眼球蜡块平行于视轴方向制成约4  $\mu\text{m}$ 石蜡切片,将全脑依据文献[5]定位于视皮质制成约4  $\mu\text{m}$ 石蜡切片,均贴片于0.05%多聚赖氨酸处理的载玻片上。常规二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水;3%过氧化氢37℃孵育10 min;置于0.01 mol·L<sup>-1</sup>枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中煮沸(95℃,15~20 min),冷却至室温;正常羊血清工作液封闭,37℃、10 min,倾去;滴加兔抗大鼠GAP43多克隆抗体4℃孵育过夜,用PBS缓冲液代替一抗作阴性对照;滴加辣根过氧化物酶活性标记的工作液,37℃孵育30 min;DAB显色3~5 min,自来水充分冲洗后,苏木素复染,脱水、透明,中性树胶封片后光学显微镜下观察。

1.5 图像分析 使用光学显微镜对切片进行观察,进行图像采集,Image proplus 4.5专业图像分析软件进行图像分析。每张切片随机选取5个高倍镜视野,测定在单位视野中免疫组织化学反应阳性颗粒的平均光密度。

1.6 统计学分析 采用SPSS 13.0软件进行统计学分析处理。平均光密度值以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间样本均数比较采用 $t$ 检验。

## 2 结 果

2.1 GAP-43免疫组织化学染色结果 GAP-43阳性颗粒在正常对照组(图1,见封二)及视神经横断组(图2,见封二)新生SD大鼠发育中的视网膜神经节细胞层最明显,视网膜神经节细胞核周可见阳性反应呈棕黄色(黑色箭头所指),GAP-43在正常对照组(图3,见插页一)及视神经横断组(图4,见插页一)新生SD大鼠发育中脑视皮质区域可见神经元胞浆及突起内出现较强的阳性反应,阳性物质呈棕黄色(黑色箭头所指),而胞核为阴性。

2.2 GAP-43免疫组织化学平均光密度值比较 正常对照组GAP-43随着新生SD大鼠生长发育,其在视网膜及脑视皮质区表达逐渐下降。视神经横断后GAP-43在新生SD大鼠的视网膜表达较正常对照组逐渐增高,7~28 d明显增高,14 d达峰值(表1),与对照组比较差异有显著性( $P<0.05$ ),视神经横断组GAP-43在脑视皮质的表达与视网膜相似,7~14 d达峰值,与对照组比较差异有显著性( $P<0.05$ )。见表2。

表 1 2 组 SD 大鼠视网膜中 GAP-43 的表达

Tab. 1 The expressions of GAP-43 in retinal of SD rats in two groups (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	Mean density of GAP-43 in retinal						
	(t/d)	1	3	7	14	28	56
Control		0.350±0.010	0.337±0.015	0.300±0.010	0.257±0.015	0.217±0.006	0.187±0.006
Injury		0.360±0.010	0.370±0.010	0.393±0.015*	0.420±0.010*	0.300±0.010*	0.207±0.006

\* P&lt;0.05 compared with control group.

表 2 2 组 SD 大鼠视皮质中 GAP-43 的表达

Tab. 2 The expressions of GAP-43 in visual cortex of SD rats in two groups (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	Mean density of GAP-43 in visual cortex						
	(t/d)	1	3	7	14	28	56
Control		0.380±0.017	0.363±0.015	0.327±0.015	0.290±0.010	0.243±0.025	0.200±0.020
Injury		0.390±0.020	0.380±0.026	0.413±0.015*	0.423±0.010*	0.287±0.015*	0.217±0.015*

\* P&lt;0.05 compared with control group.

### 3 讨论

在哺乳动物中枢神经系统早期发育过程中存在大量的轴突生长及突触形成, 哺乳动物在出生时其视觉系统并未发育成熟, 在出生后一段时期内的发育过程中, 视觉系统能够根据环境的刺激调节和改变初生时的神经联系和突触结构, 这一改变发生的最敏感时期称为视觉发育可塑性关键期<sup>[6]</sup>。当哺乳动物接近成年时, 视觉系统的可塑性就基本终止。GAP-43 可促进神经细胞生长、轴突再生和突触重构。GAP-43 是神经组织特异性磷酸蛋白, 分布于神经元、再生的雪旺细胞和神经胶质细胞, 被认为是神经元轴突生长发育和可塑性的分子标记物<sup>[7-9]</sup>, 在正常成熟的神经元中, 可能是由于靶器官产生的某种抑制信号通过逆行轴浆转运至胞体, 从而抑制 GAP-43 的表达, Weise 等<sup>[10]</sup>研究发现: GAP-43 在胚胎期神经系统中广泛分布, 一旦神经系统发育成熟, 其表达水平会迅速下降, 甚至消失, 这与本次研究一致。本研究结果显示: 新生鼠视觉系统早期发育过程中, 可塑性的关键时期存在大量 GAP-43 蛋白的表达, 随着神经元的发育成熟及突触联系的建立, GAP-43 的表达量明显下降。神经再生是一个极其复杂的过程, 生长锥是轴突生长和延伸的引导, Go 蛋白是生长锥膜的主要成分, GAP-43 可能是靠改变生长锥中 Go 蛋白的活性影响轴突的生长, 神经再生密切相关的细胞内生长锥蛋白质的 GAP-43 刺激起传导信息的 GTP- $\gamma$ -s 与 Go 结合, 去除抑制信号允许轴突继续生长<sup>[11-13]</sup>。在新生鼠视神经横断后, 突触重建过程中, GAP-43 表达较正常对照组增高, 1 d 变化不明显, 3 d 开始增高,

7~14 d 达峰值, 之后逐渐下降至正常水平, 直至 56 d 基本恢复正常水平。GAP-43 表达变化可能是由于在神经损伤后, 损伤局部吸收而逆行转运至胞体的某种正反馈信号或本身由胞体产生的某种正反馈信号刺激其表达 GAP-43<sup>[11]</sup>。

综上所述, GAP-43 参与了神经元突触重组和神经环路的构建, 促进视网膜内及视皮质神经轴突的修复和再生, 为视神经功能的恢复奠定了基础。

#### [参考文献]

- [1] Nadeau S, Hein P, Fernandes KJ, et al. A transcriptional role for C/EBP beta in the neuronal response to axonal injury [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 29 (4): 525-535.
- [2] Becker T, Lieberoth BC, Becker CG, et al. Differences in the regenerative response of neuronal cell populations and indications for plasticity in intraspinal neurons after spinal cord transection in adult zebrafish [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 30 (2): 265-278.
- [3] Li Y, Chen J, Zhang CL, et al. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells [J]. *Glia*, 2005, 49 (3): 407-417.
- [4] Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity [J]. *Trends Neurosci*, 1997, 20 (2): 84-91.
- [5] Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* [M]. New York: Academic Press, 2007: 35-45.
- [6] LeVay S, Wiesel TN, Hubel DH. The development of ocular dominance columns in normal and visually deprived monkeys [J]. *J Comp Neurol*, 1980, 191 (1): 1-51.
- [7] Wang XY, Zhang JT. Effects of ginsenoside Rg1 on synaptic plasticity of freely moving rats and its mechanism of action [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22 (7): 657-662.

- [8] Hassiotis M, Ashwell KW, Marotte LR, et al. GAP-43 Immunoreactivity in the brain of the developing and adult wallaby (*Macropus eugenii*) [J]. *Anat Embryol (Berl)*, 2002, 206 (1/2): 97-118.
- [9] Gómez M, Hernández ML, Pazos MR, et al. Colocalization of CBI receptors with L1 and GAP-43 in forebrain white matter regions during fetal rat brain development: evidence for a role of these receptors in axonal growth and guidance [J]. *Neuroscience*, 2008, 153 (3): 687-699.
- [10] Weise J, Isenman S, Klocker N. Adenovirus-mediated expression of ciliary neurotrophic factor rescues axotomized rat retinal ganglion cell [J]. *Neuroscience*, 2000, 79 (30): 212-223.
- [11] Chen B, Wang JF, Sun X, et al. Regulation of GAP-43 expression by chronic desipramine treatment in rat cultured hippocampal cells [J]. *Biol Psychiatry*, 2003, 53 (6): 530-537.
- [12] 臧卫东, 张雁儒, 李 鸣, 等. 大鼠闭合性脑损伤后星形胶质细胞的形态及 GAP-43、ET-1 mRNA 表达的变化 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2006, 41 (2): 321-323.
- [13] 薛 辉, 陈 东, 张秀英, 等. 化学去细胞肌肉促进大鼠骨髓半横断后的轴突再生 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2009, 30 (2): 154-158.

## 肺癌患者化疗期间心理干预治疗的效果评价

浙江省宁波市海曙区南门医院(浙江宁波 315010) 陆宝文

近年来本科对肺癌化疗期间患者进行心理干预治疗,最大限度地降低患者的负性情绪,取得了良好的临床效果,现将有关资料报道如下。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 2005年3月—2008年3月本科收治肺癌患者80例,男性46例,女性34例,年龄42~64岁,平均年龄(57.8±8.7)岁。所有患者均经活检病理确诊。既往无精神疾病史。根据患者是否愿意接受系统心理干预分成2组,干预组40例,为自愿接受干预者;对照组40例,为不愿接受干预者;2组年龄、性别、病程具有可比性( $P>0.05$ )。

1.2 治疗方法 2组患者均给予EP方案化疗。21d为1个疗程。2个疗程后观察临床疗效和评定生活质量。干预组在化疗基础上行心理干预治疗。具体干预方法:①认知干预。恶性肿瘤患者大都认为自己得了绝症,无法医治,化疗解决不了问题且副作用大,从而产生悲观、失助、自怜、抑郁、绝望心理。针对不同患者的个人特点,运用心理咨询技能向患者表达同情、理解和无条件的接纳,给患者以情感支持,鼓励患者倾诉内心感受。明确告诉癌症并不是绝症,请来老癌症病友讲述患病后经历及康复后生活,使患者慢慢转变以往片面的认知,增强战胜疾病的信心。同时详细向患者解释化疗与其他治疗的区别,帮助患者正确认识化疗,从而主动配合化疗。②情绪干预。化疗虽然能够很好地控制病情,但由于化疗引起的不良反应较严重,且化疗费用较高,让患者陷于双重压力之中难以自拔。通过分析患者产生负性情绪的原因,有针对性地进行个别心理治疗与辅导,使患者学会自我调节和控制情绪。及时解决患者的疑虑和困惑,给患者搭建交流的平台,使患者在集体治疗中互相交流、互相支持。同时寻求患者家属的支持和配合,共同为患者创造一个良好宽松的心理环境。

1.3 疗效判断标准 根据WHO疗效评价标准。完全缓解:可见的病灶完全消失,维持4周以上;部分缓解:病变的最大直径及最大横径的乘积缩小50%以上,其他病灶无增大,无新病灶出现,维持4周以上;稳定:病灶两径乘积缩小不足50%或增大不超过25%,无新病灶出现,维持4周以上;进展:病灶两径乘积增大25%以上或出现新的病灶。总有效率为安全缓解加部分缓解。生活质量评定标准采用中国医学科学院肿瘤医院编制的中国癌症化疗患者生活质量量表(QLQ-CCC)。生活质量调查时间:化疗前调查,即患者入院后化疗前调查;化疗后调查:第2个化疗给药结束后7d左右调查。

1.4 统计学分析 使用SPSS 13.0统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 $t$ 检验;总有效率以百分率表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验。

### 2 结果

干预组完全缓解9例,部分缓解26例,稳定4例,进展1例,干预组完全缓解率和部分缓解率分别为22.5%和65.0%,总有效率为87.5%;对照组完全缓解6例,进展27例,稳定3例,进展2例,分别为15.0%和67.5%,总有效率为82.5%。干预组的总有效率高于对照组,但差异无显著性( $P>0.05$ )。2组生活质量评分比较:2组化疗前评分差异无显著性;干预组化疗后生理功能障碍评分16.9±2.1、心理功能障碍评分6.8±1.4、社会功能障碍评分6.0±0.2,总评分29.7±1.5;对照组化疗后生理功能障碍评分18.2±2.9,心理功能障碍评分12.5±1.5,社会功能障碍评分8.2±0.4,总评分38.9±1.6。化疗后干预组评分明显低于对照组( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

本研究根据患者心理变化特点,在常规化疗基础上,采用综合心理治疗方法,通过认知教育、放松训练治疗等,减轻了患者的焦虑、抑郁情绪及化疗所致胃肠反应。本研究结果表明:干预组与对照组比较负性情绪明显改善,化疗引起的躯体症状明显减轻,这可能与心理行为干预改变了患者的错误认知、增强了患者战胜疾病的信心及分散了患者的注意力有关。干预组患者在化疗后生活质量均得到改善,表明对化疗患者进行心理行为干预可加速患者化疗后功能状态的恢复及症状的缓解。本文作者认为:心理行为干预对肺癌患者的治疗和康复有积极意义。