

·基础研究·

大鼠慢性压迫性脊髓损伤后胶质纤维酸性蛋白的表达及意义

冯旭¹ 陈安民² 孙正义³ 黄建明¹ 刘莉¹

摘要 目的:探讨大鼠慢性压迫性脊髓损伤后胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达变化,并研究 GFAP 与压迫程度的关系,以及对脊髓功能恢复的影响。**方法:**通过制作 Wistar 大鼠 CCSCI 模型,分成 A 组(假手术对照组)、B 组(椎管侵占率 25%压迫组)和 C 组(椎管侵占率 50%压迫组),结合大鼠的生物行为评分,应用免疫组织化学 SABC 法,分别于术后 1、2、3、5、8、12 周检测各组脊髓组织中 GFAP 蛋白表达的灰度值差异。**结果:**GFAP 表达在 3 周时达高峰,同时间点 A 组表达最低,C 组最高。BBB 评分显示术后 3 周内压迫组脊髓功能恢复较快。**结论:**GFAP 在 CCSCI 中的表达水平与压迫程度有关,适度的 GFAP 表达增高和胶质化反应有助于大鼠脊髓功能的恢复。

关键词 慢性压迫性脊髓损伤;模型;胶质纤维酸性蛋白;压迫程度;脊髓功能恢复

中图分类号:R651.2,R49 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-1242(2007)-11-1016-02

胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)作为星形胶质细胞(astrocyte,AS)的特异性标志物,参与中枢神经系统损伤后胶质化反应^[1]。检测 GFAP 在慢性压迫性脊髓损伤(chronic compressive spinal cord injury, CCSCI)中的表达变化将有利于阐明 AS 的作用和胶质化反应对脊髓功能的影响,从而进一步了解脊髓在慢性受压过程中的内源性保护机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组

将雄性 Wistar 大鼠 90 只,体重 250—350g,随机分成 A 组(假手术对照组)、B 组(椎管侵占率 25%压迫组)和 C 组(椎管侵占率 50%压迫组),每组各 30 只,分别于术后 1、2、3、5、8、12 周取材,每组各时间点 5 只。

1.2 慢性压迫性脊髓损伤模型制备

室温(22℃—26℃)下 10g/L 戊巴比妥钠(40ml/kg)腹腔麻醉后,将 Wistar 大鼠俯卧固定于手术架上,严格无菌条件下操作,以 T13 为中心取后正中切口,咬除 T13 棘突,将直径 3mm,螺距 0.5mm 的塑料螺钉经 T13 椎板旋入使脊髓受压,椎管侵占率(突入椎管内螺钉长度与同节段椎管直径之比)约为 10%。然后根据分组情况,B 组和 C 组逐级加压,1 周内椎管侵占率分别达 25%和 50%。术后 2 只因感染死亡,予以补充。

1.3 神经功能观察

分别于术后 1、2、3、5、8、12 周运用脊髓运动功能评定标准(Basso-Beattie-Bresnahan, BBB 评分法)^[2],对大鼠进行行为及肢体运动功能检测,观察术前、术后各时间点大鼠后肢活动、肌力等功能,通过测定反映各组大鼠脊髓功能恢复状态。

1.4 取材及固定

于 20g/L 的戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔注射深度麻醉下,生理盐水和 40g/L 多聚甲醛心脏灌注固定,快速切取伤段脊髓 1cm,固定于 4%多聚甲醛溶液中,1 周后取出脱水,石蜡包埋。

1.5 组织病理学观察

进行 HE 染色,光镜下观察 CCSCI 受压脊髓段白质、灰质的病理变化。

1.6 免疫组织化学检测

采用 SABC 法(SABC 试剂盒购自武汉博士德公司)。^①石蜡切片脱蜡水化。^②加入体积分数 3% H_2O_2 水洗 5—10min。^③浸入 0.01mol/L 枸橼酸盐(pH 6.0)中加热(95—100℃)后冷却。^④滴入抗原修复液,室温下 10min。^⑤加体积分数 10%正常山羊血清,37℃ 30min。加入一抗鼠抗人 GFAP(工作浓度 1:50)单克隆抗体,置入湿盒内 4℃冰箱过夜。^⑥加入二抗生物素化羊抗鼠 IgG,37℃ 30min。^⑦加入 SABC 复合物,37℃ 30min。^⑧二氨基联苯胺显色。苏木素复染,盐酸乙醇分化。中性树胶封片。上述步骤间用 0.01mol/L PBS 液浸洗 5min×3 次。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.7 结果判定与统计学分析

GFAP 染色以细胞浆呈棕黄色为阳性,采用 HPIAS-1000 图像分析系统,进行图像半定量分析,方法:物镜放大 20 倍视野下,随机选择视野中阳性反应细胞并测定其灰度值,灰度值与细胞反应强度成反比。采用 SPSS10.0 统计软件进行 F 检验,并做多组间的两两比较(q 检验)。

2 结果

2.1 受试动物生物行为学变化

B 组动物压迫伤后即出现轻度瘫痪,C 组压迫伤后出现中度瘫痪,术后 3 周内恢复较快,5 周后脊髓功能大部分恢复。BBB 评分:C 组与 A 组各时间点差异都有显著性;B 组与 A 组 3 周内差异存在显著性;C 组和 B 组在术后 1、2 周时差异有显著性($P<0.05$),见表 1。

2.2 组织病理学变化特征

B 组初期脊髓组织出现轻度水肿,术后 3 周神经元、轴突改变较轻微,胶质细胞增生肥大。C 组压迫初期脊髓灰质水肿,点状出血,神经元胞浆染色淡,白质表现为轴突排列较紊乱;脊髓受压后 8 周,脊髓周径变小,神经元萎缩,白质轴突周围间隙增大,空泡化改变,部分神经元代偿性增大,胶质细胞

1 上海市南汇区中心医院骨科,201300

2 华中科技大学同济医学院同济医院矫形外科

3 兰州大学生命科学院骨科研究所

作者简介:冯旭,男,博士,主治医师

收稿日期:2007-03-22

增生明显,有少许炎性细胞浸润。见图1(见后置彩色插页2)。

2.3 免疫组织化学检测 GFAP 结果

B组 GFAP 平均灰度值在 SCI 后 1 周即有表达,2 周时增多,3 周时达高峰,以后逐渐下降。B、C 两组 GFAP 表达较 A

组明显增高(表现为灰度值降低),C 组 GFAP 平均灰度值表达水平较 B 组高,见图 2—3(见后置彩色插页 2)。B 组与 C 组 GFAP 表达在 2,3 周差异有显著性意义 ($P<0.05$),8 周后两组 GFAP 表达趋于接近,见表 1。

表 1 慢性压迫性脊髓损伤后大鼠 BBB 评分及脊髓组织 GFAP 的表达

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

组别	鼠数(只)	术后时间(周)					
		1	2	3	5	8	12
BBB 评分							
A 组	30	19.7±1.2	20.1±0.9	20.6±1.0	21.0±0.0	21.0±0.0	21.0±0.0
B 组	30	12.8±1.6 ^①	15.6±1.3 ^①	18.5±0.8 ^①	19.3±0.9	19.6±1.1	20.1±1.8
C 组	30	9.6±1.1 ^{①②}	13.4±1.0 ^{①②}	16.9±1.2 ^①	17.3±1.3 ^①	17.6±0.9 ^①	17.9±1.1 ^①
GFAP 表达 (平均灰度值)							
A 组	30	148.63±8.90	145.54±11.33	146.47±13.05	148.56±10.52	150.33±9.97	151.72±11.86
B 组	30	119.91±11.47 ^①	113.70±9.68 ^①	106.53±10.46 ^①	114.71±9.23 ^①	121.64±13.19 ^①	128.05±10.89
C 组	30	105.85±10.59 ^①	92.38±10.21 ^{①②}	87.55±9.62 ^{①②}	101.66±10.39 ^①	116.72±12.68 ^①	119.33±11.73 ^①

①与 A 组比 $P<0.05$; ②与 B 组比 $P<0.05$

3 讨论

临床上由于脊柱病变所致慢性压迫性脊髓损伤在压迫因素去除后常有较好的预后,提示脊髓具有内源性保护机制。通过动物模型模拟慢性压迫性脊髓损伤,了解脊髓损伤相关因子的变化,对进一步研究内源性机制,促进脊髓康复具有积极的意义。

理想的动物模型是 CCSCI 研究的前提。CCSCI 模型主要用于模拟椎管内退行性变、肿瘤等占位性病变造成的脊髓损伤,CCSCI 的发生关键在于压迫程度轻、压迫时间长和致伤速度慢,因此,掌握好压迫程度、速率和时间就容易复制理想的 CCSCI 模型。

本模型以塑料螺钉为压迫装置施行脊髓背侧压迫,类似于 Johannes^[3]制作的螺钉-平板机械压迫模型,操作简单,易于观察和控制压迫程度、时间和压迫速率,有良好的重复性。由于椎管容积相对固定,脊髓后方的压迫可间接引起脊髓前角运动神经元的受压,因此尽可能地模拟慢性脊髓损伤生物机制,特别适于啮齿类动物慢性脊髓损伤的模型制作。

中枢神经系统损伤后可引起 AS 胶质化反应,表现为细胞数目和分枝增多、胞体增大,GFAP 的快速合成,释放 NGF、bFGF、IL 等细胞因子,损伤早期 AS 还可吞噬损伤的髓鞘碎片及退变的神经轴突,对神经细胞起保护、支持及参与神经系统代谢性活动的作用,有利于神经细胞损伤的修复^[4-5]。GFAP 为 AS 特异性标志蛋白,分子量 51KD,主要构成 AS 的细胞骨架和维持细胞形状,其含量与分布对于星形胶质细胞的结构稳定和突起形成有重要意义。有研究表明,GFAP 在正常情况下 GFAP 可促进分泌多种神经诱导因子,如基膜素等,促进神经纤维生长。GFAP 主要用于标记损伤后胶质反应,但是 AS 增生过度形成胶质瘢痕则阻止轴突的生长而不利于损伤修复^[6-7]。

从本实验 GFAP 表达结果得知,同一时间内 B、C 两组 GFAP 表达较 A 组明显增高(灰度值变小),在脊髓压迫伤 1—5 周时表现更显著,2、3 周时 C 组 GFAP 表达比 B 组增高。这说明压迫因素可刺激 AS 内 GFAP 的表达,并随压迫程度的增加相应增高。GFAP 是中枢神经系统损伤后胶质反应的主要标记物,了解 GFAP 的表达可反映出胶质化反应的轻重。因此,可初步断定,由于 CCSCI 压迫程度和致伤速度较急

性脊髓损伤相对轻微和缓慢,AS 形成的胶质化反应也随之减弱,这将防止胶质瘢痕的过度形成,反而有利于脊髓功能的恢复,这可能是临床上 CCSCI 病例预后较好的病理机制之一。

结合大鼠生物行为学评分,可以看出 C 组各时间点 BBB 评分低于 B 组, C 组大鼠脊髓功能恢复较慢。这似乎说明,随着压迫程度的加重,GFAP 表达增高反而不利于脊髓功能恢复。众所周知,脊髓损伤存在复杂的病理机制,慢性脊髓损伤后常出现脱髓鞘现象和 Schwann 细胞反应^[8],其功能恢复与原发损伤和继发性损伤等诸多因素有关,C 组神经功能恢复慢可能主要与原发损伤较重有关。本结果提示,各组 GFAP 表达水平在压迫伤后 3 周达高峰,同时 BBB 评分显示伤后 3 周内大鼠脊髓功能恢复幅度最大,说明 GFAP 在一定程度内表达增强有助于脊髓功能恢复。同时,由于 GFAP 表达与 AS 增生有密切关系,而 AS 过度增生不利于损伤修复,但如何调控 GFAP 在适度水平表达及其具体机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Pekny M, Pekna M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration[J]. J Pathol, 2004, 2004(4):428—437.
- [2] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field-testing in rats [J]. J Neurotrauma, 1995, 13: 343—359.
- [3] Schramm J, Hashizume K, Fukushima T, et al. Experimental spinal cord injury produced by slow, graded compression [J]. J Neurosurg, 1979, 50:48—57.
- [4] Cassina P, Pehar M, Vargas MR, et al. Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis[J]. J Neurochem, 2005, 93(1):438—465.
- [5] Baldwin ST, Broderick R, Blades DA. Alterations in temporal/spatial distribution of GFAP and vimentin positive astrocytes after spinal cord contusion with the New York University spinal cord injury device[J]. J Neurotrauma, 1998, 15:1015—1026.
- [6] Zhang S, Kluge B, Huang F, et al. Photochemical scar ablation in chronically contused spinal cord of rat [J]. Neurotrauma, 2007, 24(2): 411—420.
- [7] Eng LF, Ghimikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP thirty-one years (1969—2000) [J]. Neurochem Res, 2000, 25(9—10): 1439—1451.
- [8] Guest JD, Hiester ED, Bunge RP. Demyelination and Schwann cell responses adjacent to injury epicenter cavities following chronic human spinal cord injury [J]. Exp Neurol, 2005, 192(2): 384—393.