

半定量分析方法用于评估脊髓损伤后细胞凋亡程度的可行性研究

陈亚平¹ 杨延砚¹ 王文婷¹ 谷莉¹ 周谋望^{1,2}

摘要 目的:探讨免疫组化半定量分析方法用于评估大鼠脊髓损伤后细胞凋亡程度的可行性,为进一步实验研究提供基础依据。方法:成年SD大鼠6只,采用改良Allen法致T9-T10脊髓损伤,伤后1周处死,取脊髓损伤节段及其上、下节段以及膀胱,另处死2只同批健康SD大鼠2只,取T9-10脊髓节段以及膀胱作正常对照。HE染色观察脊髓和膀胱壁的病理学变化,Nissal染色观察神经元数目的变化,并通过免疫组织化学技术标记caspase-3蛋白阳性细胞,用半定量分析方法评估脊髓损伤后脊髓内和膀胱内膜中细胞凋亡的程度。结果:HE染色发现脊髓损伤后脊髓内空洞形成、炎性细胞浸润等病理学变化,膀胱壁中可见到肌束断裂、肌细胞肥大增生、胶原增生、炎性细胞浸润等病理学改变;Nissal染色显示脊髓损伤后损伤节段及其上、下节段均出现神经元数量的减少;免疫组化结果表明3组均有不同程度的caspase-3表达,损伤组脊髓和膀胱内膜caspase-3表达较正常组显著增加($P<0.01$),损伤上段及下段caspase-3表达较损伤节段为少($P<0.01$),但均高于正常对照组($P<0.01$)。损伤上段和下段caspase-3表达差异无显著性意义($P>0.05$)。结论:免疫组化半定量分析方法可以用于评估脊髓损伤大鼠脊髓及膀胱内细胞凋亡的程度。

关键词 脊髓损伤;免疫组化;半定量方法;细胞凋亡;3-半胱天冬酶;大鼠

中图分类号:R651.2 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-02-0107-03

Feasibility study on the method of semiquantitative analysis for the evaluation of apoptosis after spinal cord injury/ CHEN Yaping, YANG Yanyan, WANG Wenting, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(2):107-109

Abstract Objective: To observe the feasibility of semiquantitative analysis for the evaluation of apoptosis after spinal cord injury. **Method:** Six mature adult SD rats were crashed at T9-T10 (modified Allen's method) which caused spinal cord injuries. The injure segments, upper and lower segments of the spinal cord and bladder were taken for analysis, which contrasted with T9-10 spinal cord and bladder of the control rats. HE dyeing was used to observe the pathological changes of spinal cord and wall of bladder, and Nissal dyeing for the amount change of neurons. Caspase-3 positive cells were marked with immunohistochemistry method, and the results were evaluated with semiquantitative analysis. **Result:** Porosis and inflammatory cell infiltration in the spinal cord, rupture of muscle bundles, hypertrophia and over growth of muscle cells and collagens, and inflammatory cell infiltration in the bladder wall could be seen under HE dyeing. Nissal dyeing showed the decrease of neurons at the injured segment, upper and lower segments of the spinal cord. Result of immunohistochemistry showed there were caspase-3 positive expression in all the segments. The injured spinal cord and bladder expressed significantly more caspase-3 positive results ($P<0.01$), upper and lower segments were lower than the injured segments ($P<0.01$), but higher than the control team ($P<0.01$). There were no differences between upper and lower segments ($P=0.869$). **Conclusion:** Immunohistochemistry semiquantitative analysis can be used for the evaluation of the extent of apoptosis after spinal cord injury.

Author's address Rehabilitation Center of 3rd Hospital, Peking University, Beijing, 100083

Key words spinal cord injury; immunohistochemistry; semiquantitative analysis; apoptosis; caspase-3; rat

随着我国工业化、城市化进程的加快,交通事故、工业伤害、突发性外部事件越来越多,直接导致脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)发病率的逐年增加,而与脊髓损伤相关的基础及临床研究也已积极跟进。目前科研人员对脊髓损伤程度和某些治疗的神经再生作用的研究大多数局限于免疫组化技术和Western blot技术,其中前者只能大致标记阳性细胞

的分布,并不能进行定量分析,而后者操作起来难度较大,实验周期长,花费大。Kawasaki等^[1]采用半定量积分法判定大肠腺癌组织中生存素的表达,这不啻

1 北京大学第三医院康复医学科,北京,100083

2 通讯作者

作者简介:陈亚平,女,副教授,硕士

收稿日期:2008-08-04

为介于定量与非定量研究之间的一条蹊径。本实验利用这种半定量积分分析方法,对脊髓损伤大鼠脊髓及膀胱壁内 caspase-3 的表达进行分析,初步探讨该方法用于评估大鼠脊髓损伤后细胞凋亡程度的可行性,为进一步精确分析提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及动物模型的建立

清洁级 6 周龄 SD 大鼠 (由北京大学医学部实验动物中心提供) 8 只,体重 200—250g,雌雄各半,随机取 2 只作为正常对照组,其余 6 只作为脊髓损伤组。所有动物腹腔注射复合麻醉剂 3ml/kg 后,无菌操作下俯卧位取背部正中切口,逐层切开皮肤、皮下及肌肉,暴露第 10 胸椎棘突和椎板,小心咬除棘突及全椎板,充分暴露脊髓,不损伤硬脊膜。采用改良的 Allen 法(WD 法,即重物坠落法)^[2],用 10g 砝码从 25cm 高处沿玻璃管坠落,直击脊髓背侧,致 T9—10 节段脊髓急性不完全性损伤,表现为不完全性截瘫(BBB \leq 11 分)。用庆大霉素冲洗伤口,逐层缝合伤口,无菌敷料覆盖。正常对照组不作处理。

1.2 动物饲养

23.0—23.5℃室温饲养,自由饮食。截瘫动物进行人工辅助排尿,2 次/d。

1.3 取材及标本制作

手术后 7d 处死所有动物,腹腔注射复合麻醉剂(3ml/kg),仰卧位固定于操作台上,打开胸腔自左心室插入静脉套管,快速灌注生理盐水,用剪刀将右心耳剪开一个小口,让血液流出直到流出的液体清亮为止,此过程约需要 0.9%生理盐水 300ml;之后换用 4%多聚甲醛(4℃),看到动物抽搐时减慢液体流速,此过程约需多聚甲醛 200ml,耗时约 40min。取下动物,自背部剪开皮肤,打开椎管,暴露脊髓,取损伤段、损伤上段及损伤下段脊髓各约 5mm 长做脊髓标本,取膀胱颈部做膀胱标本,取出后用 4%多聚甲醛(4℃)后固定过夜。次日将标本放入含 30%蔗糖的 0.1M PBS(4℃)中。待标本沉底后,行连续冰冻切片,横切,片厚 20 μ m,切片直接贴在预先处理好的载玻片上,做烘干处理。

1.4 组织学检查及免疫组化染色

切片分别做 HE 染色、Nissal 染色及 caspase-3 免疫组化反应。免疫组化步骤大致如下:①切片放入含 0.3%Triton-X100 的 0.1M PBS 中,室温下放置 30min;②3% H_2O_2 ,室温下 15min,阻断内源性过氧化物酶;③兔抗 caspase-3 一抗(1:400,北京博奥森生物技术有限公司),4℃过夜;④二抗检测试剂盒(北

京中杉金桥生物技术有限公司),室温下 30min;⑤ DAB 显色反应 2min,冲洗;⑥脱水、透明、中性树脂封片。以 PBS 代替一抗做阴性对照。

1.5 结果判断

观察每张切片 16 个具有代表性的高倍视野,在细胞浆和/或细胞核有棕色颗粒沉着为阳性细胞染色,用半定量方法,依照各自染色程度及染色细胞数进行综合量化分析评分。先按染色强度打分:不着色为 0 分、着淡色为 1 分、着色适中为 2 分、着色深为 3 分;再按着色细胞占计数细胞百分率打分:<5%为 0 分、5%—20%为 1 分、21%—60%为 2 分、>60%为 3 分;每张切片染色程度得分与阳性细胞百分率得分相乘为最后得分:0—1 分为表达阴性(-)、2—3 分为弱阳性(+),4—6 分为中强度阳性(++),>6 分为强阳性(+++),其中表达强度(+、++、+++)均为阳性表达。所有结果均输入计算机 Excel 文档待处理。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 10.0 软件包进行数据统计分析。所有服从正态分布的以均数 \pm 标准差的形式进行统计描述,不服从正态分布的采用 P50(P25, P75)进行统计描述,采用独立样本的 *t* 检验和方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 对照组和 SCI 组大鼠脊髓及膀胱大体观察

取背部正中切口,逐层打开肌肉脊椎板,暴露脊髓全程,对照组脊髓色亮白,完整,连续性较好;SCI 组大鼠脊髓全程连续性遭到破坏,损伤节段明显变细,色灰暗,可见陈旧性出血灶。大鼠仰卧位,取下腹正中切口,切开腹部皮肤肌肉后可直接观察膀胱状态;对照组其膀胱呈倒置的梨形,膀胱壁弹性良好,无残余尿;SCI 组多可见膀胱内残余尿存在,导出尿液后,可见膀胱壁松弛,弹性较差,膀胱较正常对照组增大。

2.2 脊髓及膀胱壁病理学检查结果

对照组膀胱低倍镜下可见逼尿肌横断及纵行切断的肌束排列整齐;高倍镜下平滑肌细胞排列整齐,细胞间结构紧密,偶见炎性细胞浸润。SCI 组膀胱低倍镜下管腔增大,粘膜未见明显异常,粘膜下层充血水肿,肌层肌束排列紊乱,肌束断裂,肌束之间间隙明显增宽,常见炎性病灶;高倍镜下可见肌细胞肥大、增生,束间小血管充血,胶原纤维增生,大量炎性细胞浸润,可见神经束(见图 1,见前置彩色插页)。SCI 组大鼠脊髓破坏表现严重,出血范围扩大,损

伤中心液化坏死,灰质中仅存少量神经元,主要位于前角,空洞形成,周围有炎性细胞浸润,大量胶质细胞增生,白质区仍有部分正常结构(图2,见前置彩色插页)。

2.3 正常脊髓和损伤脊髓的 Nissal 染色结果

损伤节段脊髓的神经元数目减少。

2.4 caspase-3 在 SCI 大鼠脊髓及膀胱内的表达

脊髓内 caspase-3 免疫阳性细胞胞浆及其突起根部呈棕黄色。在正常对照组, caspase-3 偶见表达, 主要位于脊髓灰质。损伤组大鼠脊髓内 caspase-3 免疫阳性细胞主要位于损伤局部, 损伤组织与残存组织的交界处, 还可见于脊髓灰质的前角、中间带、后角及白质内(图3)。与正常对照组相比, 损伤组大鼠脊髓内 caspase-3 表达明显增加, 二者的差异有显著性($P < 0.01$)见表1。另外, 与损伤节段相比, 损伤上段和损伤下段 caspase-3 表达均明显减少, 但明显高于正常对照组, 其差别均具有显著性意义($P < 0.01$)。损伤上段和损伤下段表达的 caspase-3 无显著性差异($P > 0.05$)。在膀胱内, caspase-3 阳性细胞主要分布于膀胱内膜和肌层, 同样是胞浆染成棕黄色(图3, 见前置彩色插页)。

表1 对照组和脊髓损伤组大鼠脊髓和膀胱内膜中 caspase-3 的表达得分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	损伤上段脊髓	损伤节段脊髓	损伤下段脊髓	膀胱内膜
对照组		1.29±1.24		1.22±0.91
脊髓损伤组	4.92±2.02 ^{①②}	7.49±1.76 ^①	5.06±1.82 ^{①②}	5.82±2.21 ^①

①与对照组比较, 损伤组各段脊髓及膀胱内表达 caspase-3 均增加 $P < 0.01$; ②与损伤节段相比, 损伤上段及损伤下段表达 caspase-3 均减少 $P < 0.01$ 。

3 讨论

细胞凋亡是继发性脊髓损伤重要的病理变化之一^[3-6]。既往研究已经证实, 作为关键酶之一, 脊髓损伤后 caspase3 的活化对细胞凋亡是必然的, 在脊髓的继发性损伤过程中发挥着重要作用^[6-7]。可以说, caspase-3 蛋白表达的多少从侧面反映了脊髓损伤后局部组织破坏的严重程度, 也可用来评价某些治疗手段的效果。

免疫组化技术根据抗原抗体特异性结合的原理, 在显微镜下通过观察标记物而获知该蛋白质的分布部位, 是近年来科研和临床工作中最常用的一种检测手段。但是, 由于在制作切片的过程中有可能封闭一部分抗原, 这样会对实验结果造成影响, 再加上缺乏定量分析方法, 使这一技术在实际运用过程中受到了很大的制约。有部分学者用高倍镜视野下数阳性细胞数目的方法实现定量或半定量研究, 也有部分学者采用图像处理系统来对免疫组化阳性颗

粒测定灰度值, 以此达到定量的目的。上述两种方法各有优缺点: 数阳性细胞数目的方法得到的实验数据较准确, 但是对科研人员识别细胞的能力要求较高, 尤其是显色以后出现的所谓“边缘效应”, 即组织边缘部位着色比其它部位深, 这就给实验操作者带来很大的困扰, 况且脊髓损伤以后一个高倍镜视野里出现 100 多个阳性细胞, 不易观察; 测定阳性颗粒灰度的方法同样存在其弊端, 例如它容易受切片上杂质和复染细胞核的干扰, 造成结果出现误差, 所以上述两种方法逐渐被淘汰。

Western blot 蛋白印渍技术也是科研中常见的用于蛋白质定量分析的方法。这种方法虽然可以准确反映出组织中蛋白含量的高低, 但它实施过程复杂, 费时费力, 受诸多客观因素影响, 这就给实验操作者带来很大的困扰。

近年来, 半定量积分分析方法为大多数学者采用。郁丽等^[8]通过研究证实采用半定量方法得出的结论与其它相关结果一致; 屈文东等^[9]半定量观察统计结果与图像分析定量的统计结果一致。本研究采用半定量分析方法得出结论, 脊髓损伤组大鼠的脊髓内 caspase-3 的表达高于正常对照组, 这与 Nissal 染色结果相对应。可见损伤后脊髓内神经元数目的减少与细胞凋亡有关, caspase-3 参与了脊髓损伤后神经元的凋亡, 这与先前的研究结果一致^[10]。同时, 本研究发现, 损伤上段及损伤下段 caspase-3 的表达也较正常对照组明显增加且阳性细胞主要分布在白质, 可见损伤相邻节段同样发生了 caspase-3 介导的细胞凋亡, 符合 Crowe 等^[3]和 Li 等^[5]的结论。白质有大量的胶质细胞凋亡, 推测是由于压迫损伤引起凋亡信号转导, 轴突脱髓鞘而发生。

脊髓损伤后膀胱的变化值得关注, 由于尿道括约肌和膀胱逼尿肌功能的失调, 导致尿潴留的发生, 这是脊髓损伤后尿路并发症的最主要的原因。膀胱病变的程度可以间接反映脊髓损伤的程度。本研究发现, 逼尿肌的高反应性直接导致肌束断裂、排列紊乱, 间质增生, 炎性细胞浸润的部位恰好是有 caspase-3 阳性细胞的位置, 通过半定量分析不难发现, 损伤组大鼠膀胱得分明显高于正常对照组($P < 0.01$), 这说明失神经膀胱的发生及发展过程中同样存在细胞凋亡, 细胞凋亡引起炎症反应的发生。凋亡过程同样由 caspase-3 所介导。可是在 HE 染色中未见膀胱粘膜的变化, 原因可能是膀胱切片较厚, 在镜下细胞重叠, 不易识别微小的炎性病灶, 也可能是切片的位置不同所造成的误差。