论著

文章编号:1000-5404(2005)13-1348-03

碱性成纤维细胞生长因子对大鼠牵张性脊髓损伤后 *c-fos* 基因表达的影响

刘 雷,唐康来,许建中,李起鸿 (第三军医大学西南医院骨科,重庆 400038)

提 要:目的 观察碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)对牵张性脊髓损伤后 *c-fos* 基因表达的影响。**方法** 用特制的脊柱撑开器放置在大鼠脊髓 T_{12} ~ L_3 椎体横突上纵向牵张,同时皮层体感诱发电位监测,建立大鼠牵张性脊髓损伤模型。用免疫组织化学染色法观察 *c-fos* 基因的表达,并用计算机图像分析系统进行定量分析。**结果** 脊髓损伤后神经元 C-FOS 蛋白 *D* 值较正常组显著增加,表达高峰出现在损伤后 2 h,而 bFGF 治疗组在各时相点均低于对照组($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 碱性成纤维细胞生长因子能显著抑制脊髓损伤后 *c-fos* 基因的表达,这可能是 bFGF 保护神经元并减轻脊髓损伤的机制之一。

关键词: 牵张性;脊髓损伤;*c-fos* 基因;碱性成纤维细胞生长因子
中图法分类号: R341.43; R394.3; R744 **文献标识码:** A

Inhibition effects of basic fibroblast growth factor on *c-fos* gene expression after tractive spinal cord injury in rats

LIU Lei, TANG Kang-lai, XU Jian-zhong, LI Qi-hong (Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of basic fibroblast growth factor on *c-fos* gene expression in spinal cord neurons of rats after tractive spinal cord injury. **Methods** The animal model of SD rats with tractive spinal cord injury was established through tracting T_{13} – L_2 spine longitudinally with a special spinal tractor that was put on parapophysis of T_{12} – L_3 vertebrae after exposing T_{13} – L_2 spinal cord *via* dual laminectomy, meanwhile spinal cord function was monitored by cortical somatosensory evoked potential (CSEP). Forty model rats were randomly divided into 2 groups, the bFGF treatment group ($n=20$) with bFGF injection into the subarachnoid cavity and the control group ($n=20$) with saline injection. Five SD rats without any treatment served as normal control. The *c-fos* gene expression was detected with immunohistochemistry and analyzed quantitatively with image system of computer. **Results** The *c-fos* gene expression in tractive spinal cord injury was higher than that in normal control group, especially increased markedly in damaged neurons. The peak value of *c-fos* gene appeared in 2 h after the injury, but c-fos level in the bFGF treatment group was lower evidently than that in the control group at the different sacrificed time ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Basic fibroblast growth factor can inhibit significantly the *c-fos* gene expression in spinal cord after tractive injury, which may be one of the mechanism that bFGF protect neurons and relieve lesion in spinal cord.

Key words: traction; spinal cord injury; *c-fos* gene; basic fibroblast factor

牵张性脊髓损伤是脊柱矫形手术的常见并发症之一,而脊髓损伤后再生修复的研究一直是神经科学领域的重点课题。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是近年来研究较多的一种新的神经营养因子[1],其神经营养作用包括促进神经细胞再生和存活。研究表明,外源性 bFGF 通过机械泵入髓内或鞘内能减轻组织损伤,增加功能恢复[2]。为进一步证实其作用并探讨作用机制,本实验通过建立牵张性脊髓损伤模型,观察碱性成纤维细胞生长因子对脊髓损伤后 *c-fos* 表达的影响。为脊髓损伤的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年 SD 大鼠 45 只,雌雄不限,体质量 190 ~ 280 g,分成 3 组,①正常组(A 组):5 只大鼠,不损伤脊髓;作为测量 *c-fos* 基

作者简介:刘 雷(1966-),男,辽宁省大连市人,博士,副主任医师,主要从事脊髓损伤及组织工程方面的研究,发表论文 15 篇。电话:(023)68754907

收稿日期:2004-06-08;修回日期:2004-09-10

因的正常对照；②治疗组（*B* 组）：*20* 只大鼠，脊柱撑开致 *CSEP* 波幅下降 70% 脊髓损伤后，经蛛网膜下腔插入细导管注入 bFGF；③对照组（C 组）：20 只大鼠，脊柱撑开致 CSEP 波幅下降 70% 脊髓损伤后，经蛛网膜下腔插入细导管注入等量生理盐水。

1.2　主要设备及试剂

特制的脊柱撑开器（成都仪器厂）；Cantata 体感诱发电位仪（DANTEC，丹麦）；bFGF 冻干粉剂（1 mg/支，珠海亿胜生物制药有限公司）；兔抗人 *c-fos* 多克隆抗体（北京中山生物技术有限公司）。

1.3　动物损伤模型的制备

根据我们对大鼠牵张性脊髓损伤模型的观察与评价[3]进行模型制备，5% 水合氯醛以 6 ml/kg 腹腔内注射麻醉大鼠，大鼠俯卧位固定于手术台后，腰背部脱毛，无菌原则下进行背中下段正中纵切口，在放大镜下以 T_{13} 为中心暴露 T_{12} ~ L_3 棘突椎板后，咬除 T_{13} ~ L_2 棘突椎板，暴露 T_{13} ~ L_2 相应部位脊髓并保持脊髓完整，将特制的脊柱撑开器固定在 T_{12} ~ L_3 椎体横突上，同时行 CSEP 监测，撑开脊柱至 CSEP 波幅下降 70% 持续 10 min 后，取除撑开器，将细导管自 L_3 蛛网膜下腔向脊髓损伤方向插入 3 mm，椎旁软组织缝合固定导管，另一端露出皮外，治疗组分别于术后即刻、5、10、15、25、35、45 min 及 1 h 经细导管注入 20 μl bFGF（含 bFGF 20 μg），对照组注入等量生理盐水。

1.4　取材及切片制备

脊髓损伤组大鼠分别于术后 15 min，1、2、4 h 处死取材。用 5% 水合氯醛以 6 ml/kg 腹腔内注射麻醉大鼠后，自左心室插管后剪开右心耳，快速灌注生理盐水冲洗，待流出的液体清亮后，灌注 4% 多聚甲醛。自背部打开椎管，切取 T_{13} ~ L_2 脊髓节段约 1.5 cm，用 4% 多聚甲醛固定 24 ~ 48 h，常规石蜡包埋，连续切片，片厚 5 μm，备用。

1.5　免疫组织化学染色（S-P 法）

从每只大鼠切片中随机抽取，参考相关实验技术操作作免疫组织化学染色。DAB 显色，二甲苯透明，脱水，中性树脂封固，以神经元胞核染成棕褐色为阳性细胞。

1.6　图像分析

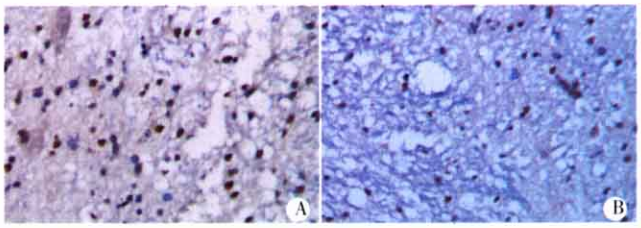
每个动物测 5 张切片，每张切片采用 Spot 图像分析处理系统，分别测出脊髓神经元内 C-FOS 蛋白的积分光密度（*D*）值，代表 C-FOS 蛋白的含量。

1.7　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 10.0 软件进行 *t* 检验。

2　结果

正常组可见脊髓灰质内散在的 C-FOS 蛋白表达弱阳性细胞，*D* 为（1.84 ± 0.91），对照组术后 15 min 脊髓灰质神经元 C-FOS 蛋白的 *D* 值开始增加，术后 2 h C-FOS 蛋白 *D* 值达高峰（图 1A），以后下降，与正常组比较差异有显著性意义（$P < 0.01$）。bFGF 治疗组术后 C-FOS 蛋白的 *D* 值在各个时相点均较对照组降低（图 1B），二者比较差异有显著性意义（$P < 0.05$，$P < 0.01$），见表 1。



A：Control；B：bFGF-treated

图 1　牵张性脊髓损伤后 2 h C-FOS 表达　（S-P × 400）

Fig 1　Expression of C-FOS in 2 h after tractive spinal cord injury　（S-P × 400）

表 1　脊髓损伤后 C-FOS 蛋白的 *D* 值（$n = 5$，$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　*D* value of C-FOS protein after spinal cord injury（$n = 5$，$\bar{x} \pm s$）

Group	Time after injury operation			
	15 min	1 h	2 h	4 h
Control	4.64 ± 0.41	9.47 ± 1.04	13.32 ± 1.51	8.53 ± 0.54
bFGF-treatment	3.17 ± 0.78 *	5.23 ± 0.46 **	10.13 ± 1.26 **	6.14 ± 0.32 **

*：$P < 0.05$，**：$P < 0.01$，*vs* control

3　讨论

原癌基因表达的检测方法是一种从细胞水平对神经元功能活动定位的新方法[4]，*c-fos* 是一种快速，一过性表达的原癌基因，普遍存在于中枢神经细胞，正常情况下表达水平很低，难以检测。当中枢神经细胞受到伤害刺激如缺血时，会出现神经细胞 *c-fos* 癌基因快速表达，FOS 蛋白迅速堆积于胞核，通过它们的表达传递和整合信息，作用于目的基因，改变其转录水平，发挥细胞核内第三信使的作用，参与神经细胞的生长，分化和损伤修复的调节[5]。Yakovlev 等[6]认为中枢神经细胞对伤害性刺激作出应答反应的程序可能为：伤害性刺激→兴奋性氨基酸受体（NMDA）激活→一氧化氮（NO）产生→激活胞内第二信使（cGMP，钙调素，蛋白激酶 C，二酰基甘油，三磷酸基醇和钙离子等 ）→第二信使进入胞核，从而诱导 *c-fos* 基因转录 mRNA→mRNA 在胞浆中翻译合成 FOS 蛋白→FOS 与 JUN 蛋白在核中形成复合物，与目的核基因内调节节位点相结合，从而进一步激活目的核基因，最终对该刺激作出反应。

碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）分布广泛，在胚胎发育、血管形成、创伤修复等方面发挥着重要作用。在神经系统中的作用尤为突出。可防止或抑制细胞内 Ca^{2+} 浓度升高，维持 Ca^{2+} 稳定，保护神经元免受兴奋性氨基酸的毒性作用[7]。bFGF 能减少自由基损害，在中枢神经外伤，缺氧，缺血过程中自由基是早期产物，而局部的 bFGF 表达也增强，可提高超氧化物歧化酶和谷胱甘肽还原酶的活性，对抗自由基，缓解神经损伤。研究表明，bFGF 对体外培养的中枢和外周神经细

胞均有营养和保护作用。表现为促进神经元存活和突起生长,这些神经元中以中枢神经元较多。如在鸡胚体外培养基中加入已知可靠的运动神经元营养因子能保护60%的运动神经元存活,而加入bFGF则在运动神经元全部存活[8]。Lee等[9]的研究表明,bFGF比其它神经营养因子的神经保护作用更大,成年鼠脊髓挫伤后,持续髓内灌注bFGF,脊髓的完全及不完全损伤区明显减少。本实验结果显示,脊髓神经元C-FOS蛋白各时相点的表达明显增多,2 h达高峰,提示C-FOS蛋白与脊髓继发性损害有关。bFGF治疗组显示C-FOS蛋白表达较对照组明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示bFGF对脊髓具有保护作用,它可能改变了L-型钙通道的生物特性,抑制细胞外Ca^{2+}内流,减轻了细胞内钙离子超载,从而减轻和抑制C-FOS蛋白的表达。保护了神经细胞,这可能是bFGF对脊髓损伤具有保护作用的分子机制,但bFGF如何影响*c-fos*的表达,其间的信号传递通路是什么及存在哪些调控因素尚需作进一步研究。

参考文献:

[1] Kerekes N, Landry M, Rydh Rinder M, *et al*. The effect of NGF, BDNF and bFGF on expression of galanin in cultured rat dorsal root ganglia [J]. Brain Res, 1997, 754 (1-2): 131 - 141.

[2] Fawcett J W. Spinal cord repair: from experimental models to human application[J]. Spinal Cord, 1998, 36(12): 811 - 817.

[3] 刘 雷, 裴福兴, 吕 波, 等. 皮层体感诱发电位监测脊髓牵张性损害的实验研究[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26(9): 513 - 516.

[4] Ju G, Zhang X, Jin B Q, *et al*. Activation of corticotropin-releasing factor-containing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus by interleukin-1 in the rat [J]. Neurosci Lett, 1991, 132(2): 151 - 154.

[5] 徐智策, 蒋星红. 快反应基因在神经科学研究中的进展与动态[J]. 生理科学进展, 1997, 28(1): 49 - 51.

[6] Yakovlev A G, Faden A I. Sequential expression of c-fos protooncogene, TNF-alpha, and dynorphin genes in spinal cord following experimental traumatic injury[J]. Mol Chem Neuropathol, 1994, 23(2-3): 179 - 190.

[7] Mattson M P, Murrain M, Guthrie P B, *et al*. Fibroblast growth factor and glutamate: opposing roles in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture[J]. J Neurosci, 1989, 9(11): 3728 - 3740.

[8] Sendtner M, Arakawa Y, Stockli K A, *et al*. Effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on motoneuron survival[J]. J Cell Sci Suppl, 1991, 15 (3): 103 - 109.

[9] Lee T T, Green B A, Dietrich W D, *et al*. Neuroprotective effects of basic fibroblast growth factor following spinal cord contusion injury in the rat[J]. J Neurotrauma, 1999, 16(5): 347 - 356.

(编辑 龙 亮)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2005)13-1350-01

1例巨大假性颈动脉瘤诊治体会

Treatment of a giant cervical carotid artery pseudoaneurysm

吴国庆[1],范亚川[1],聂解初[2],张丰深[1] (解放军第324医院:[1]普通外科,[2]五官科,重庆 400020)

患者男性,45岁。因"右颈部外侧缓慢生长性包块12年,突然增大伴声嘶和呼吸困难半月余"急诊入院。既往体健,无确切外伤史及手术史,无颈部感染和动脉粥样硬化病史。入院查体:头偏向左侧,精神差,呼气困难,不能平卧;包块位于右颈部前外侧,大小约20 cm×20 cm×10 cm,固定、光滑、边界清楚,有明显的血管搏动和血管杂音,气管明显左前外侧移位。彩色超声多普勒检查提示包块为混合性,周边液性暗区,有反向血流信号;颈部MRI增强观察,右侧颈内动脉未见异常,颈外动脉未见显影,包块边界清楚,且有搏动伪影,与颈外动脉关系密切,提示包块可能源于右颈总动脉末端。入院后第5天出现包块明显增大、呼吸困难,点头呼吸,右颈总动脉交叉压迫试验未见明显脑缺血表现。局麻下行气管切开、紧贴瘤体下方结扎右颈总动脉。观察2 d,生命体征平稳,呼吸功能改善,神志清楚,瘤体未进一步明显增大、张力未见增加。气管切开术后第3天,在全麻下行"右颈部假性动脉瘤切除术"(图1A):①按瘤体形状取"I"形切口,纵切约20 cm,上、下各横切约15 cm;②胸锁乳突肌和肩胛舌骨肌萎缩、并被挤向两侧,颈总动脉沿瘤体前下方、锁骨上穿入瘤体,颈内静脉瘪陷、被挤向外侧;③瘤体上端贴近颌下腺,内侧将气管明显推向左外侧、压向左侧斜方肌,下界紧贴锁骨,整个瘤体大小约20 cm×20 cm×15 cm,有包膜,内侧与下方薄;④在原结扎处远端离断右颈总动脉,然后贴瘤体周围剥离,紧贴肿瘤结扎甲状腺上动脉,保护右迷走神经干、完整游离切除肿瘤;⑤瘤体1 470 g,剖开见瘤体内均为淤血块,颈外动脉起始处有一大小约0.5 cm×0.4 cm破口。手术历时4 h、

(下转1360页)

作者简介:吴国庆(1953-),男,安徽省祁门县人,副主任医师,主要从事普通外科临床方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68762178
通讯作者:张丰深,电话:(023)68762178
收稿日期:2005-03-21;修回日期:2005-05-03