文章编号:1000-5404(2006)14-1493-02

论著

碱性成纤维细胞生长因子对牵张性脊髓损伤后ChAT表达的影响

刘 雷,唐康来,杨 柳,李起鸿 (第三军医大学西南医院关节外科,重庆 400038)

提 要:目的 观察碱性成纤维细胞生长因子(bovine basic fibroblast growth factor, bFGF)对牵张性脊髓损伤后神经元内ChAT表达的影响。**方法** 建立大鼠牵张性脊髓损伤动物模型,治疗组分别于术后即刻、1、2、3、4、8、12、24 h经细导管注入bFGF溶液20 μl(含bFGF 20 μg),对照组在相同时间注入等量生理盐水,然后于术后4、7、14 d处死取材。分别于术前及术后4、7、14 d行胆碱乙酰转移酶(ChAT)的免疫组化检测。**结果** 牵张性脊髓损伤后ChAT阳性细胞数持续下降,经bFGF处理的大鼠ChAT阳性细胞数增多,治疗组与对照组比较差异有显著性($P<0.05$)。**结论** bFGF能促进脊髓神经元合成ChAT,从而促进动物运动功能的恢复。

关键词:牵张;脊髓损伤;胆碱乙酰转移酶;碱性成纤维细胞生长因子
中图法分类号:R338.1;R651.2;R977 **文献标识码**:A

Effect of basic fibroblast growth factor on ChAT expression in tractive spinal cord injury in rats

LIU Lei, TANG Kang-lai, YANG Liu, LI Qi-hong (Center of Joint Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of basic fibroblast growth factor on ChAT expression in neurons after tractive spinal cord injury in rats. **Methods** The animal model of tractive spinal cord injury in 36 SD rats was established. The bFGF-treated rats ($n=18$) received 20 μl bFGF solution containing 20 μg bFGF into subarachnoid cavity immediately, or at 1, 2, 3, 4, 8, 12 and 24 h after animal model establishment, while the saline-treated rats ($n=18$) received the equal volume of normal saline at the same time. Another 6 normal SD rats underwent no treatment as normal controls. All rats were killed on postoperative day 4, 7, 14. The choline acetyltransferase (ChAT) were detected by immunohistochemistry preoperatively and on day 4, 7, 14 after spinal cord injury. **Results** The number of neurons positive of ChAT decreased gradually after tractive spinal cord injury. After bFGF treatment, positive neurons of ChAT increased in number, with significant difference between the bFGF-treated group and saline-treated group ($P<0.05$). **Conclusion** bFGF can enhance the synthesis of motor nerve transmitter, acetylcholine, and facilitate the motor function recovery of animal models.

Key words: traction; spinal cord injury; choline acetyltransferase; basic fibroblast growth factor

牵张性脊髓损伤是脊柱矫形手术的常见并发症之一。损伤后如何修复一直是人们研究的重要课题,研究表明,碱性成纤维细胞生长因子(bovine basic fibroblast growth factor, bFGF)能促进神经元的再生和延长存活时间[1]。但对中枢胆碱能神经元的影响如何报道较少。本实验通过观察bFGF对大鼠牵张性脊髓损伤后脊髓前角运动神经元中胆碱乙酰转移酶(ChAT)表达的影响,探讨bFGF对受损脊髓神经元保护作用的机制,为临床应用bFGF治疗脊髓损伤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组及动物模型制备

成年SD大鼠42只,雌雄不限,体质量200~270 g(由第三军医大学实验动物中心提供)。分成正常组(A组)6只;bFGF治疗组(B组)18只;生理盐水对照组(C组)18只。根据我们对大鼠牵张性脊髓损伤动物模型的观察与评价[2]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蛛网膜下腔向脊髓操作方向插入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、0.5、1、2、3、4、8、12、24 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。

1.2 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),ChAT小鼠抗大鼠单克隆抗体(Chemicon公司,

作者简介:刘 雷(1966-),男,辽宁省大连市人,博士,副主任医师,主要从事脊柱脊髓伤方面的研究,发表论文15篇。电话:13012324402
收稿日期:2005-05-18;修回日期:2006-10-11

美国),S-P 试剂盒(北京中山生物技术公司)。

1.3 取材及切片制备

脊髓损伤组大鼠分别于术后 4、7、14 d 处死取材。用 5% 水合氯醛以 6 ml/kg 腹腔注射麻醉大鼠后,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,常规石蜡包理,连续切片,片厚 5 μm,备用。

1.4 ChAT 免疫组化染色(S-P 法)

参考相关实验技术作免疫组化染色,DAB 显色,苏木精复染,脱水、透明封片。PBS 代替一抗作空白对照,实验中设立严格的正常血清对照做阴性对照,观察与计数方法:以细胞质出现棕黄色染色为阳性。

1.5 图像分析

每张切片采用 Spot 图像分析处理系统,任取 5 个视野,高倍镜下计数每个视野内染色的阳性细胞数。

1.6 统计学处理

数据以 $x \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 及软件,治疗组、对照组分别与正常组间的比较采用单因素方差分析及 q 检验,治疗组与对照组间的比较采用 t 检验。

2 结果

正常对照组大鼠脊髓前角运动神经元均表达阳性,细胞质呈棕色,细胞核不着色,分布较均匀。牵张性脊髓损伤后,ChAT 染色的阳性细胞数持续下降,bFGF 治疗后,ChAT 染色的阳性细胞数明显增加,两者比较差异有显著性意义($P<0.05$, $P<0.01$)(表 1,图 1、2)。

表 1 脊髓牵张损伤后各组 CBS 评分及 ChAT 免疫组化阳性细胞数($x \pm s$)

组别	ChAT			
	0 d	4 d	7 d	14 d
正常组	46.31 ± 12.56	-	-	-
bFGF 治疗组	-	38.53 ± 10.15[ac]	37.64 ± 8.94[bc]	37.42 ± 9.81[bc]
对照组	-	34.35 ± 6.87[c]	31.64 ± 4.71[c]	31.18 ± 3.48[c]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与对照组比较; c: $P<0.01$,与正常组比较

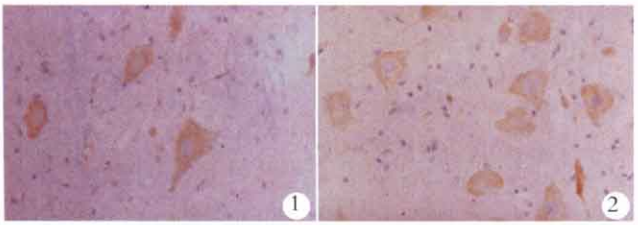


图 1 脊髓对照组 ChAT 免疫组化染色结果 (S-P ×400)

图 2 牵张性脊髓损伤后 bFGF 治疗组 ChAT 免疫组化染色结果 (S-P ×400)

3 讨论

乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)是许多外周突出传递的化学递质。ChAT 催化 Ach 合成的酶的活性变化能直接影响神经元内 Ach 的合成,从而影响正常的神经功能。由于目前尚未建立起一种满意的测定 Ach 方法,因此通常采用检测 ChAT 活性来间接显示 Ach 的水平就可以了解脊髓神经元活性的功能状态和损伤的轻重。为探索神经元损伤发生死亡的机制提供依据。同时,也为研究脊髓损伤后如何保护神经元,减轻受损程度和减少死亡的数量提供依据。故本实验选择 ChAT 免疫组化作为观察指标,研究牵张性脊髓损伤后 bFGF 对 ChAT 表达的影响,以证实 bFGF 对神经元的保护作用。

脊髓损伤后,多发生严重的继发损害,损伤局部进行性缺血、缺氧、能量代谢障碍等导致兴奋性氨基酸、自由基大量生成、细胞内超钙、细胞因子和炎性损伤的产生。而 bFGF 可以防止或抑制细胞内 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[3]。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 在体内外能促进多种中枢及外周神经元的存活及突起生长,体内也能促进损伤神经元的修复与再生[4]。Lee 等[5]研究表明,bFGF 比其他神经营养因子的神经保护作用更大,成年鼠脊髓损伤后,持续髓内灌注 bFGF ,脊髓的完全及不完全损伤区明显减少。

研究证实,脊髓损伤大鼠 ChAT 阳性神经元减少[6]。本研究表明,大鼠牵张脊髓损伤后神经递质 ChAT 合成明显下降,经 bFGF 治疗后 ChAT 阳性细胞数明显恢复,同时大鼠的神经行为功能明显改善。由此可以推论,bFGF 可促进运动神经递质 Ach 合成,从而减轻神经元损伤的程度,起到保护脊髓神经元的作用。

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] 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.

[3] 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.

[4] PECHAN P A, CHOWDHURY K, SEIFERT W. Free radicals induce gene expression of NGF and bFGF in rat astrocyte culture[J]. Neuroreport, 1992, 3(3): 469 - 472.

[5] 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.

[6] YATO Y, FUJIMURA Y, NAKAMURA M, *et al*. Decreased choline acetyltransferase activity in the murine spinal cord motoneurons under chronic mechanical compression[J]. Spinal Cord, 1997, 35(11): 729 - 734.

(编辑 陈聪连)