短篇论著

文章编号:1000-5404(2013)03-0270-03

褪黑素对脊髓损伤大鼠GAP-43表达的影响

徐玉生,金伟林,李星辰,马玉斐,曾冠楠,王培松 (450000 郑州,郑州大学第一附属医院骨科)

[摘要] **目的** 研究褪黑素对大鼠脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)后生长相关蛋白(growth associated protein 43,GAP-43)表达的影响,从新的角度探讨褪黑素修复脊髓损伤的机制。**方法** 72只SD大鼠按照完全随机分组法分为3组:褪黑素治疗组、脊髓损伤组、空白对照组,每组24只。褪黑素治疗组、脊髓损伤组以改良Allen's法建立T_{11}~T_{12}水平脊髓损伤模型,褪黑素治疗组于术后即刻腹腔注射褪黑素(按100 mg/kg剂量注射),脊髓损伤组腹腔注射等体积5%无水乙醇(褪黑素溶剂),空白对照组不做任何处理。术后1、3、7 d对各组大鼠进行BBB评分,检测血清中GAP-43的含量,并应用免疫组织化学染色法观察脊髓中GAP-43的表达。**结果** 术后1、3、7 d大鼠血清中GAP-43含量各组间比较有差异统计学意义($P<0.05$),其中褪黑素治疗组最高,脊髓损伤组次之,空白对照组最低。免疫组织化学染色结果表明:褪黑素治疗组脊髓切片中GAP-43染色阳性细胞数最多,脊髓损伤组次之,对照组最低,各组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 褪黑素治疗后可改变脊髓损伤区局部的微环境,并提高血清和脊髓中GAP-43的含量,促进损伤脊髓的恢复。

[关键词] 褪黑素;脊髓损伤;生长相关蛋白

[中图法分类号] R651.21; R969; R977.1 [文献标志码] A

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)可导致患者损伤节段以下感觉和运动功能的丧失,给家庭及社会带来沉重负担,其治疗一直是医学研究的热点。生长相关蛋白(growth associated protein 43,GAP-43)是一种与神经细胞发育及再生相关的酸性膜磷脂蛋白,可引导轴突生长并调节新突触形成而促进损伤神经的修复,是公认的神经元再生和可塑性的分子标志物[1]。褪黑素是由松果体产生的一种胺类激素,研究表明其可通过清除自由基、抑制脂质过氧化反应、减轻细胞损伤和凋亡、减轻中性粒细胞介导的毒性损害[2-3]等机制修复脊髓损伤,但其是否可通过提高GAP-43的含量以修复脊髓损伤目前尚少见报道。本研究旨在通过检测血清中GAP-43的含量和脊髓中GAP-43的表达,进一步明确褪黑素治疗脊髓损伤的机制,为临床用药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

成年雌性SD大鼠72只,体质量(250±30)g,购自河南省实验动物中心,许可证号:SCXK(豫)2010-0002。实验过程中对动物处置符合动物伦理学要求。褪黑素购自美国Sigma公司,大鼠GAP-43酶联免疫分析(ELISA)试剂盒购自美国RD公司,兔抗鼠GAP-43抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,DAB试剂盒、S-P 9002免疫组化试剂盒均购自北京中杉生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的建立和分组 按300 mg/kg腹腔注射10%水合氯醛麻醉大鼠,麻醉后固定。取后正中切口,暴露脊髓硬膜,改良Allen's WD法制备大鼠T_{11}~T_{12}节段脊髓急性损伤模型[4]。造模成功标准:撞击硬膜后大鼠双下肢呈回缩性扑动、鼠尾痉挛性摆动、硬膜表面充血水肿。术毕生理盐水冲洗术野,再次消毒后常规缝合。72只SD大鼠按照完全随机分组法分为褪黑素治疗组、脊髓损伤组、空白对照组,每组24只。褪黑素治疗组造模成功后10 min腹腔注射褪黑素(100 mg/kg),脊髓损伤组给予等体积5%无水乙醇(褪黑素溶剂),空白对照组不做处理。大鼠术后均给予青霉素10万U肌注,每日人工辅助排尿3次。

1.2.2 大鼠运动功能观察 采用神经功能评定法(BBB评分)标准。BBB评分可全面反映大鼠的运动功能状况,是目前评价中枢神经系统损伤及修复的最佳方法之一[5]。BBB评分将大鼠后肢运动分为22个等级:后肢无运动功能定为0分,运动功能完全正常定为21分,二者之间根据功能分别定为1~20分。术后1、3、7 d由2名经过专业培训的非实验人员独立观察10 min,并记录评分。

1.2.3 取材 各组大鼠麻醉成功后,分别于术后1、3、7 d断头取血(每个时间点8只),并以损伤处为中心取出长约2 cm的脊髓。血液在室温下静置30 min,以离心半径8 cm,3 000 r/min,离心15 min后,收集血清,-80 ℃条件下保存备用。脊髓标本

[基金项目] 郑州大学研究生科学研究项目(11Y03314)

[通信作者] 徐玉生,E-mail:jinlin924@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121129.1157.004.html(2012-11-29)

取出后即刻用4%多聚甲醛进行固定,24 h后石蜡包埋,切片。

1.2.4 血清中GAP-43含量检测 ELISA法检测血清中GAP-43含量,每例样本取10 μL血清,按试剂盒说明操作,用酶标仪在450 nm波长下测定光密度值[D(450)],根据标准曲线计算样品中GAP-43的浓度。

1.2.5 HE及免疫组化染色 每只大鼠取同序数切片3张,应用链霉亲和素-生物素-酶复合物(SABC)染色试剂盒进行免疫组化染色,操作步骤参照试剂盒说明书进行,中性树脂封片。PBS代替一抗作为阴性对照,细胞质和(或)突起染成黄褐色为GAP-43阳性细胞。每张片随机计数5个高倍镜视野(×400)阳性细胞个数,然后取算术平均数代表GAP-43的表达水平。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 17.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 实验动物数量分析及BBB评分

6只大鼠在实验过程中死亡,随即补充,最终进入结果分析的大鼠仍为72只。褪黑素治疗组、脊髓损伤组术后出现明显的后肢运动功能障碍,包括两后肢肌张力低、肌力0级、尿潴留等,空白对照组无运动功能障碍。术后褪黑素治疗组、脊髓损伤组BBB评分较空白对照组明显降低($P<0.05$);术后第1、3天,褪黑素治疗组、脊髓损伤组比较,BBB评分差异无统计学意义($P>0.05$),2组大鼠后肢运动功能无明显恢复;术后第7天,褪黑素治疗组、脊髓损伤组间差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。提示应用褪黑素无法改善脊髓损伤后大鼠早期的运动功能,但随着时间延长运动功能有所改善。

表1 3组 T_{11}~T_{12}节段脊髓急性损伤模型大鼠术后不同时间BBB评分($n=24, \bar{x} \pm s$)

组别	术后1 d	术后3 d	术后7 d
褪黑素治疗组	0.91±0.72[a]	1.23±0.68[a]	3.56±0.86[ab]
脊髓损伤组	0.87±0.65[a]	1.12±0.71[a]	2.11±0.63[a]
空白对照组	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00

a: $P<0.05$,与空白对照组比较;b: $P<0.05$,与脊髓损伤组比较

2.2 大鼠血清中GAP-43水平检测

血清中GAP-43水平从高到低依次为褪黑素治疗组、脊髓损伤组、空白对照组,各时间点各组间差异有统计学意义($P<0.05$)。褪黑素治疗组3个时间点之间的比较差异有统计学意义($P<0.05$),且随时间延长,GAP-43的含量逐渐增多,在褪黑素治疗后第7天GAP-43含量最高;脊髓损伤组各时间点GAP-43含量呈现同褪黑素治疗组相似的表达规律。见表2。说明脊髓损伤后大鼠血清内GAP-43水平随时间延长呈增高趋势,褪黑素治疗组GAP-43含量增高更明显。

表2 3组 T_{11}~T_{12}节段脊髓急性损伤模型大鼠术后不同时间血清GAP-43检测结果(ng/mL,$n=24, \bar{x} \pm s$)

组别	术后1 d	术后3 d	术后7 d
褪黑素治疗组	10.06±0.29[abcd]	13.60±0.41[abc]	14.51±0.56[ab]
脊髓损伤组	7.47±0.25[a]	8.33±0.53[a]	9.78±0.40[a]
空白对照组	6.50±0.24	6.31±0.27	6.43±0.23

a: $P<0.05$,与空白对照组比较;b: $P<0.05$,与脊髓损伤组比较;c: $P<0.05$,与术后7 d比较;d: $P<0.05$,与术后3 d比较

2.3 免疫组化观察脊髓标本GAP-43的表达

图1可见GAP-43表达于脊髓神经元细胞质及突起中,在脊髓前角及其周围更为明显。相同时间点GAP-43表达阳性的细胞数量从多到少依次为褪黑素治疗组、脊髓损伤组、空白对照组,各组间差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

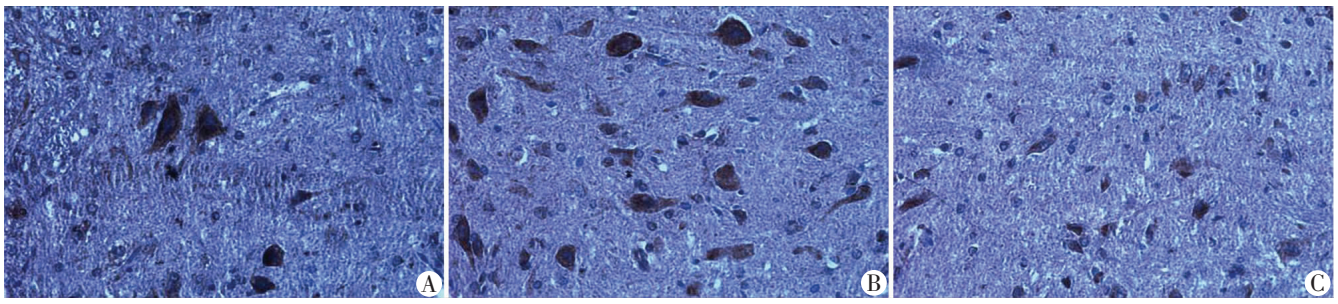
表3 3组 T_{11}~T_{12}节段脊髓急性损伤模型大鼠术后不同时间脊髓GAP-43阳性细胞数($n=24, \bar{x} \pm s$)

组别	术后1 d	术后3 d	术后7 d
褪黑素治疗组	23.33±2.34[ab]	33.22±2.86[ab]	39.44±1.87[ab]
脊髓损伤组	9.33±2.17[a]	13.88±2.03[a]	22.77±2.63[a]
空白对照组	4.00±1.22	3.86±1.13	3.97±1.32

a: $P<0.05$,与空白对照组比较;b: $P<0.05$,与脊髓损伤组比较

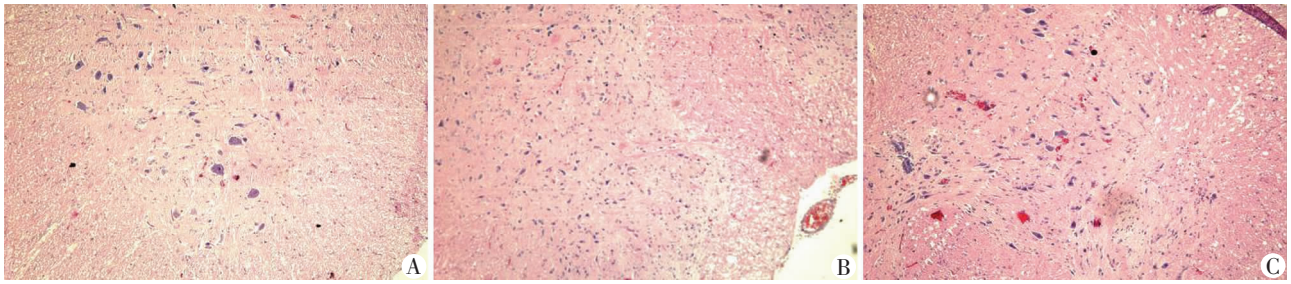
2.4 HE染色观察脊髓标本

褪黑素治疗组、脊髓损伤组均可见脊髓组织内结构紊乱、细胞水肿、片状出血等病理变化,褪黑素治疗组病理变化较脊髓损伤组轻。空白对照组脊髓结构清晰,无出血、细胞水肿等变化。HE染色结果表明,褪黑素可减轻脊髓损伤后的病理变化。见图2。



A:空白对照组;B:褪黑素治疗组;C:脊髓损伤组

图1 术后7 d 3组 T_{11}~T_{12}节段脊髓急性损伤模型大鼠脊髓标本免疫组化染色观察 (S-P ×400)



A:空白对照组;B:褪黑素治疗组;C:脊髓损伤组

图2 术后7 d 3组 T_{11}~T_{12}节段脊髓急性损伤模型大鼠脊髓标本病理学观察 (HE ×100)

3 讨论

褪黑素可通过抑制脊髓损伤早期炎症反应保护脊髓,但褪黑素能否提高脊髓损伤后GAP-43的表达少见研究。本研究表明,褪黑素可增加脊髓损伤大鼠血清GAP-43的含量及脊髓内GAP-43的表达。

GAP-43是20世纪80年代初发现的一种快速转运胞膜磷酸蛋白,其与神经发育、轴突再生、突触重建密切相关,被认为是神经元发育和再生的重要内在决定因子之一[6]。GAP-43广泛存在于神经组织中,尤其在生长锥表达丰富。在生长锥中,GAP-43可促进F-肌动蛋白的聚集,增强生长锥的活力,启动神经轴突的再生、分化及突触重建[7-8]。周围神经损伤后,GAP-43的含量明显增多,其不仅可促进轴突的再生和功能的恢复,同时可能提高再生神经的传导速度[9-10]。GAP-43还可通过增加脊髓损伤后NF200的表达以修复损伤脊髓[11],即使在缺乏外源性营养因子的情况下其仍能使神经长出新突起,并增强神经的可塑性及突触重构[12]。有研究表明,敲除大鼠的GAP-43基因后,大鼠的运动、感觉和反射功能发生障碍,说明它可影响神经系统的发育及神经上、下通路的整合功能[13]。

研究证实褪黑素可通过其抗氧化性能修复脊髓损伤,还可引导大鼠神经干细胞分化为多巴胺能神经元并降低星形胶质细胞的生成[14],提示其可通过引导神经干细胞的分化修复脊髓损伤。本研究从另一角度研究褪黑素修复脊髓损伤的机制,证实褪黑素治疗组大鼠血清及脊髓中GAP-43的含量高于脊髓损伤组及空白对照组,差异有统计学意义。本研究证明,褪黑素可增加血清及脊髓中GAP-43的表达。本研究的不足之处在于没有从基因、蛋白水平定量地研究GAP-43的表达情况。褪黑素增加脊髓损伤后GAP-43表达的具体机制也仍需进一步研究。下一步拟将集中研究褪黑素是通过何种途径、何种机制增加脊髓损伤后GAP-43的表达。

参考文献:

[1] Carulli D, Buffo A, Strata P. Reparative mechanisms in the cerebellar cortex[J]. Prog Neurobiol, 2004, 72(6): 373-398.

[2] Wilhelmsen M, Amirian I, Reiter R J, *et al*. Analgesic effects of melatonin: a review of current evidence from experimental and clinical studies[J]. J Pineal Res, 2011, 51(3): 270-277.

[3] Baydas G, Tuzcu M. Protective effects of melatonin against ethanol-induced reactive gliosis in hippocampus and cortex of young and aged rats [J]. Exp Neurol, 2005, 194(1): 175-181.

[4] 黄霖,唐勇,杨睿,等. 通用型脊髓打击器的研制与脊髓损伤动物模型的建立[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2008, 18(9): 688-693, 插2.

[5] 李晓捷,郭岚敏. 神经行为学检测和改良BBB运动功能评定在脑瘫大鼠运动功能评定中的应用[J]. 中国康复医学杂志, 2008,23(12):1067-1070.

[6] Raivich G, Makwana M. The making of successful axonal regeneration: genes, molecules and signal transduction pathways[J]. Brain Res Rev, 2007, 53(2): 287-311.

[7] Aigner L, Arber S, Kapfhammer J P, *et al*. Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice[J]. Cell, 1995, 83(2): 269-278.

[8] 王锡波,刘广义,董争鸣. 大鼠脑缺血/再灌注损伤后神经再生与Nogo-A蛋白、GAP-43基因表达的关系[J]. 中国康复, 2010,25(4):246-249.

[9] 王维,苑秀华,王中莉,等. 坐骨神经损伤模型大鼠神经传导速度及损伤运动神经元内生长相关蛋白43表达与磁刺激干预[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011,15(46):8617-8620.

[10] Chen L J, Ren Y H, Liu L, *et al*. Upregulated expression of GAP-43 mRNA and protein in anterior horn motoneurons of the spinal cord after brachial plexus injury[J]. Arch Med Res, 2010, 41(7): 513-518.

[11] 段艳萍,王金德,黄佑庆,等. GAP-43治疗大鼠脊髓横断后神经中丝NF200表达的变化[J]. 神经解剖学杂志, 2008,24(4): 406-410.

[12] Novotna I, Slovinska L, Vanicky I, *et al*. IT delivery of ChABC modulates NG2 and promotes GAP-43 axonal regrowth after spinal cord injury[J]. Cell Mol Neurobiol, 2011, 31(8): 1129-1139.

[13] Metz G A, Schwab M E. Behavioral characterization in a comprehensive mouse test battery reveals motor and sensory impairments in growth-associated protein-43 null mutant mice[J]. Neuroscience, 2004, 129(3): 563-574.

[14] Kong X, Li X, Cai Z, *et al*. Melatonin regulates the viability and differentiation of rat midbrain neural stem cells[J]. Cell Mol Neurobiol, 2008, 28(4): 569-579.

(**收稿**:2012-09-20;**修回**:2012-10-30)

(编辑 龙 亮)