·论 著·

巨噬细胞迁移抑制因子在小鼠脊髓损伤后的表达研究

赵 喆[1],姚 远[2],杜长国[3],邓其跃[1] (1. 第三军医大学基础部神经生物学教研室,神经生物学重庆市市级重点实验室,重庆 400038;2. 第三军医大学新桥医院骨科,重庆 400037;3. 解放军 77100 部队后勤部门诊部,重庆 400014)

[摘 要] **目的** 探讨巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)在小鼠脊髓损伤后的修复作用。**方法** 选择 C57BL/6 小鼠制作重物砸伤的脊髓损伤模型,分为手术组和假手术对照组,损伤节段为 $T_9 \sim T_{10}$;用免疫组织化学法显示 MIF 在损伤急性期(术后 72 h)的表达改变。用 RT-PCR 显示 MIF 与 RhoA 的 mRNA 水平改变;用免疫荧光双标显示小胶质细胞表达 MIF 和 RhoA 的情况。**结果** 重物坠落致脊髓损伤后 72 h,MIF 在损伤段脊髓中蛋白表达量增加;同时 MIF 的 mRNA 水平升高,且伴随 RhoA 的 mRNA 水平升高,手术组和假手术组之间的差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 重物坠落致脊髓损伤后的急性期,损伤局部活化的小胶质细胞中 MIF 表达增加;少突胶质和星形胶质样细胞中有 MIF 累积,神经元中 MIF 的水平变化不显著。同时,MIF 的 mRNA 水平也出现上调,与 RhoA 的 mRNA 上调在时空上有一致性,提示 MIF 可能调节损伤局部微环境参与轴突再生抑制。

[关键词] 巨噬细胞迁移抑制因子;脊髓损伤;Ras 同族基因家族成员 A

[中图分类号] R651.2;Q25 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)01-0001-04

Expression and effects of macrophage migration inhibitory factor on spinal cord injury in mice

ZHAO Zhe, YAO Yuan, DU Chang-guo, DENG Qi-yue (Department of Neurobiology, Third Military Medical University, Chongqing Key Laboratory of Neurobiology, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of macrophage migration inhibitory factor (MIF) on spinal cord injury. **Methods** C57BL/6 mice with injury at $T_9 \sim T_{10}$ were taken as spinal cord injury (SCI) model, and they were divided into the operated group and the sham operated group. Immunohistochemistry was used to detect expression changes of MIF during 72 hours after operation. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to test changes of mRNA level. And double staining immunofluorescence techniques was used to show expressions of MIF and RhoA. **Results** Expression of MIF at acute stage (72 hours after injury) increased significantly. Results of RT-PCR showed that mRNA levels of MIF and RhoA both increased. There were statistical differences between the two groups ($P<0.05$). **Conclusion** In acute stage after SCI, MIF increased in the activated microglia. MIF accumulated in oligodendrocyte-like and astrocyte-like cells in injured spinal cord, which might contribute to inhibitory environment for regeneration. Moreover, mRNA level of MIF raised with the increase of RhoA mRNA level, which indicated the potential inhibition of MIF to axonal regeneration in CNS.

Keywords: macrophage migration inhibitory factor; spinal cord injury; Ras homolog gene family member A

中枢神经损伤后难以再生[1],中枢神经系统(central nervous system,CNS)自身特点及损伤后局部微环境是造成脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)后再生困难的主要因素[2]。而周围神经系统(peripheral nervous system,PNS)损伤后可以再生,受损轴突和髓鞘碎片的及时清除为轴突再生提供通道。但是,CNS 损伤后这个清除过程却被延迟,CNS 中有吞噬和免疫功能的小胶质细胞以及损伤后浸润的巨噬细胞没有能够及时清除碎片,使损伤轴突的周围环境不利于再生。因此,在 CNS 损伤的急性期及时创造利于再生的环境对促进 CNS 损伤修复是非常必要的。脊髓损伤急性期,小胶质细胞和巨噬细胞参与的炎性反应是主要的病理表现之一[3]。巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)作为固有免疫的组成部分[4],在压迫性脊髓损伤急性期表达明显上调[5],但其上调的意义目前还不完全清楚。前期研究发现,脊髓半横断损伤后与轴突再生相关的 Ras 同族基因家族成员 A(Ras homolog gene family member A,RhoA)表达上调,可能与轴突再生受阻有关。本研究旨在探讨重物坠落所致脊髓损伤急性期 MIF 参与脊髓损伤及修复过程的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性 C57BL/6 小鼠 30 只,体质量 20 ~ 25 g,由第三军

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201401001

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31201018);重庆市自然科学基金项目(2008BB5110)

[收稿日期] 2013-09-12 [修回日期] 2013-10-10

医大学实验动物中心提供。脊髓砸伤装置一套(固定架、套管、重锤、击打锤)。主要试剂:抗体 anti-MIF 和 anti-OX42 购自 Santa Cruz 公司,FITC 标记山羊抗兔 IgG、TRITC 标记山羊抗兔 IgG、HRP 标记山羊抗兔 IgG,DAB 试剂盒购自北京中杉公司,Simply P 总 RNA 提取试剂盒购自 BioFLux 公司,RT-PCR 试剂盒购自 BioRT 公司。

1.2 小鼠脊髓砸伤模型

将 30 只小鼠随机分为假手术对照组及手术组,腹腔注射 4% 水合氯醛麻醉,皮肤消毒后,纵行切开背部皮肤及皮下组织,钝性分离椎旁肌肉组织,切除 T_{10} 棘突及椎板暴露硬脊膜,固定击打锤使之轻触脊髓表面,击打锤接触脊髓面为半径 1 mm 的圆形,使用砸伤装置将 10 g 重锤固定于 5 cm 高度,自由落下撞击击打锤砸伤 $T_9 \sim T_{10}$ 脊髓组织[6]。砸伤瞬间动物痉挛性摆尾并出现双下肢回缩后瘫痪,视为造模成功。假手术对照组仅切除 $T_9 \sim T_{10}$ 棘突及椎板,不进行砸伤。术后保暖至动物从麻醉中苏醒,正常喂养,每日 1 次腹腔注射青霉素 2 万单位,人工膀胱按压挤尿 3 次。根据 BBB 评分方法[6] 分别于术后 24 h 和 72 h,由与实验无关人员进行小鼠下肢功能评价。

1.3 损伤脊髓免疫组织化学染色

分别于术后 24 h 和 72 h 两个时相点腹腔注射 3.5% 水合氯醛麻醉小鼠,37 ℃生理盐水及预冷 4% 多聚甲醛经心脏灌注。取小鼠脊髓损伤段脊髓组织,经后固定、脱水后常规冰冻切片,厚度 15 μm。切片 PBS 漂洗每次 5 min,共 3 次;5% 正常山羊血清 37 ℃封闭 1 h;加入一抗(anti-MIF,1∶200)37 ℃放置 1 h 后,4 ℃过夜;取出后,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;HRP 标记二抗,37 ℃孵育 1 h,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;用 DAB 显色试剂盒对切片进行显色普通光学显微镜下观察,拍照。

1.4 小胶质细胞分离培养

使用 5 d 以内新生小鼠,75% 乙醇浸泡消毒后迅速断头,于预冷的 D-Hanks 平衡液中仔细剥离脑膜并分离皮层;剪碎并漂洗组织后,0.125% 胰酶 37 ℃中消化 30 min,10% 胎牛血清-DMEM/F12 培养基终止消化,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,10% FBS-DMEM/F12-1% P/S 培养基重悬浮细胞,轻微吹打至细胞悬浮,200 目细胞筛过滤,种植于培养瓶中,12 ~ 24 h 完成首次换液,以后每 3 d 更换一次培养基。培养至第 14 天,取出细胞并于眶式摇床上筛选细胞,200 r/min,2 h 后,收集上清,1 000 r/min离心 10 min,种植于 24 孔板中,密度 $3.5 \times 10^5/cm^2$,37 ℃,5% CO_2 孵箱中备用[8]。

1.5 免疫荧光双标染色

取出细胞爬片,室温下,使用 37 ℃预热的 4% 多聚甲醛液固定细胞 30 min,PBS 漂洗;5% 正常山羊血清封闭,37 ℃,1 h;加入一抗混合液(使用一抗稀释液稀释 OX42、MIF、MBP,浓度 1∶100、1∶200),4 ℃过夜;PBS 漂洗;37 ℃孵育二抗(Rho 标记的羊抗兔二抗),避光;PBS 漂洗,加入 FITC 标记的山羊抗小鼠二抗,37 ℃避光 1 h;弃二抗,DAPI 复染,室温 30 min,PBS 漂洗;抗荧光淬灭封片剂避光封片,拍照。全过程中,PBS 漂洗均为每次 5 min,均为 3 次。

1.6 RT-PCR 检测损伤脊髓 MIF 和 RhoA mRNA 表达

提取损伤组织总 RNA,检测 A260、A280,计算 RNA 浓度及 A260/A280,A260/A280 比值在 1.8 ~ 2.0 范围内的 RNA 纯度合格。PCR 扩增引物:Nogo-A 基因上游:5'-CTGGAGTGGTGTATTTTGGTGC-3',下游:5'-TACTGTTTGGGGCCTTGTCATT-3',产物长度 550 bp;MIF 基因上游:5'-TTTGCAGGGAGGACACAGGAA-3',下游:5'-TGGCAGCGTTCATGTCGTAATA-3',产物长度 551 bp;RhoA 基因上游:5'-TGTCAACTGCAAGAACTCTGGT-3',下游:5'-AAGGAGCACTGTGACTTAGAGC-3',产物长度 608 bp;β-actin 基因上游:5'-ACGTTGACATCCGTAAAGACCT-3',下游:5'-CAGTAACAGTCCGCCTAGAAGC-3',产物长度 286 bp。将 PCR 产物放入 1.5% 琼脂糖凝胶电泳(80 V,60 min),应用凝胶电泳成像仪观察并通过 Quantity One 软件进行数据采集及分析。

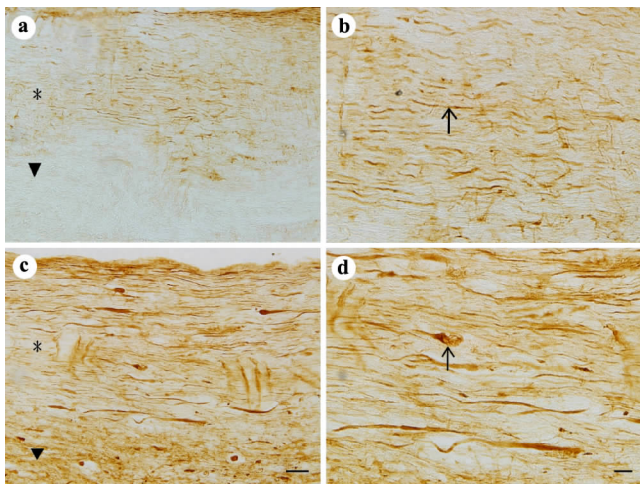
1.7 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,组间比较采用 χ^2 检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

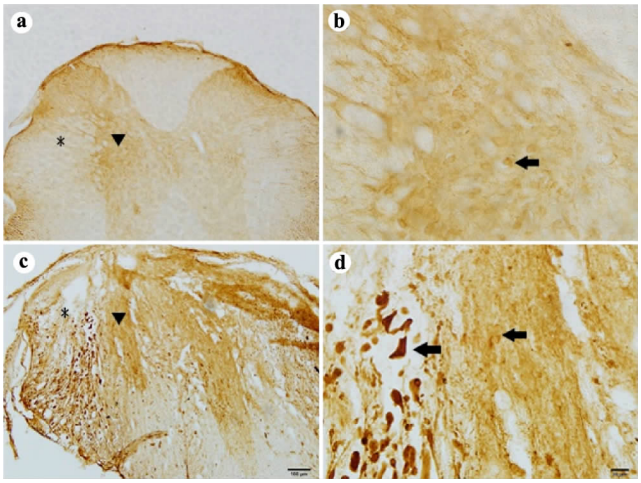
2.1 小鼠脊髓损伤后 MIF 的表达增加

假手术组小鼠脊髓白质中可见 MIF 阳性的轴突均匀分布,白质中也存在胶质细胞样的阳性细胞。灰质中以及神经元表达的 MIF 水平较低。脊髓损伤 72 h 后,白质中可见膨大的轴突末端呈 MIF 强阳性。灰质和白质中可见 MIF 强阳性的阿米巴样细胞,灰质中 MIF 表达增强(图 1)。从脊髓横切片上可见,假手术组动物白质和灰质中均有 MIF 的低水平表达,脊髓损伤 72 h 后,MIF 表达显著上调,尤其在白质中有大量 MIF 阳性的细胞及轴突终末,MIF 阳性细胞从形态上看与活化的小胶质细胞相似,灰质中神经元中 MIF 表达改变不明显(图 2)。



a:假手术组(×200,标尺 = 50 μm);b:a 的局部放大(×400,标尺 = 20 μm);c:SCI 后 72 h 组(×200,标尺 = 50 μm);d:c 的局部放大(×400,标尺 = 20 μm);*:背侧白质区域;▼:灰质区域;↑:轴突

图 1 小鼠脊髓损伤后 MIF 的表达(纵切面)

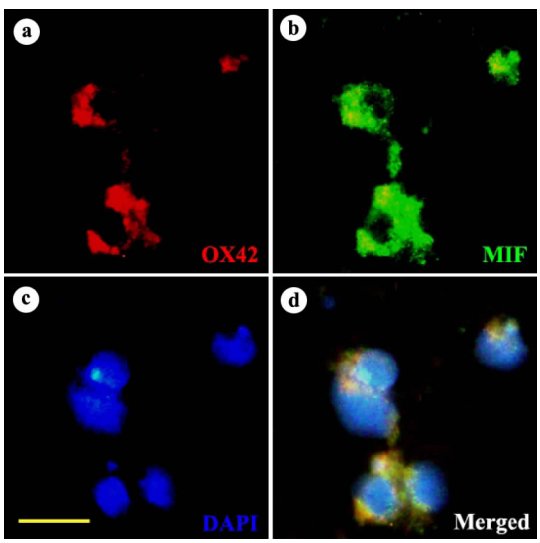


a:假手术组(×100,标尺 = 100 μm);b:a 的局部放大(×400,标尺 = 20 μm);c:SCI 后 72 h 组(×100,标尺 = 100 μm);d:c 的局部放大(×400,标尺 = 20 μm);*:背侧白质区域;▼:灰质区域;↑:轴突

图 2　小鼠脊髓损伤后 MIF 的表达(横切面)

2.2　小胶质细胞中 MIF 和 OX42 的共表达

为了检验脊髓损伤后白质和灰质中存在的 MIF 阳性细胞为何种细胞,本研究进行了 MIF/OX42 的免疫荧光双标实验。OX42 是特异性活化小胶质细胞标记物,荧光双标结果显示(图 3),原代培养的小胶质细胞同时表达 OX42 和 MIF,提示脊髓损伤后白质和灰质中存在的 MIF 强阳性细胞可能为活化的小胶质细胞。

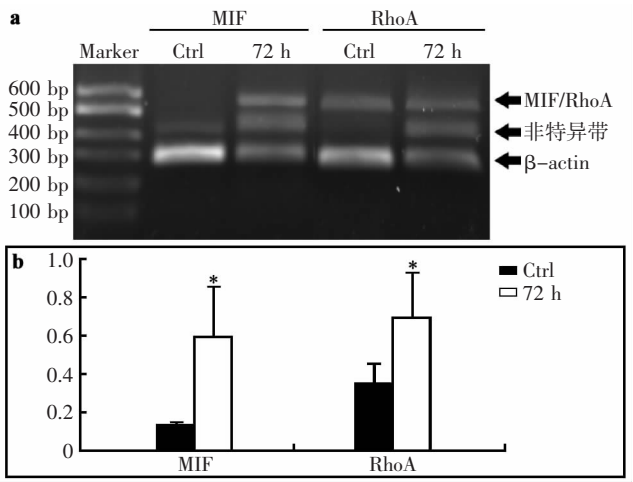


a:显示细胞为 OX42 阳性;b:显示细胞同时为 MIF 阳性;c:DAPI 标记的细胞核;d:a、b、c 的叠加

图 3　小胶质细胞中 MIF 和 OX42 的表达(×400,标尺 = 20 μm)

2.3　假手术组及损伤后 MIF、RhoA 基因转录

MIF 在脊髓砸伤后表达增加,为了探寻其增加的意义,本研究检测了损伤后 MIF 以及与轴突再生相关的 RhoA 的 mRNA 水平,统计学分析所用数据为 3 次实验的总数据。结果显示(图 4),假手术组中 MIF 的 mRNA 水平很低,损伤 72 h 后 MIF 在基因转录水平上升高,2 组之间有显著差异($P < 0.05$)。RhoA 的水平与轴突的再生密切相关,相对于假手术组,损伤后 72 h RhoA 在基因转录水平上也显著升高($P < 0.05$)。分子量为 400 ~500 bp 处,损伤 72 h 后出现了非特异条带,推测是由于砸伤引起的物理冲击和化学炎症损伤影响了 RNA 的转录过程,模板链断裂并最终产生断裂的 DNA 片段。



a:DNA 琼脂糖电泳图;b:对电泳结果分析柱形图(*:与 Ctrl 比较,$P < 0.05$)

图 4　损伤后 72 h MIF 和 RhoA 的 mRNA 水平升高

3　讨论

巨噬细胞迁移抑制因子是机体固有免疫调控当中的一类重要分子,在压迫性脊髓损伤急性期表达上调[5],但对其上调的意义目前尚无定论。研究显示,敲除 MIF 基因有助于压迫性脊髓损伤小鼠后肢功能的恢复,提示 MIF 的存在阻碍了 SCI 后受损神经元的存活[9]。传统理论认为,MIF 是一个促炎因子,主要参与脊髓损伤后的炎症反应,但炎症反应具有双刃剑的效应,MIF 在其中的作用尚不明确。已知损伤后 MIF 在胶质细胞中水平增加,但神经元中 MIF 的水平改变不显著,提示增加的 MIF 可能主要来源于活化的小胶质细胞。原位杂交实验显示中枢神经系统中 MIF 的 mRNA主要位于神经元和小胶质细胞,但 MIF 抗体标记则同时在星形胶质细胞、神经元和少突胶质细胞中呈现阳性[10]。在本研究中,免疫组织化学结果显示损伤后神经元中 MIF 表达上调不显著,而增加的 MIF 主要集中表达在阿米巴样的胶质细胞中,细胞化学染色的结果也证明 OX42 标记的原代小胶质细胞表达 MIF,提示重物砸伤所致脊髓损伤后组织和细胞中增加的 MIF 主要来源于活化的小胶质细胞。

目前已有的研究显示 MIF 除了作为促炎因子以外,还与星形胶质细胞参与的血脑屏障通透性调节功能相关[11],并进而影响脊髓损伤后穿越 CNS 血脑屏障

的巨噬细胞,使其直接或通过分泌某些活性因子在损伤局部发挥作用[12]。在本实验中发现,损伤后星形胶质和少突胶质样的细胞呈现 MIF 阳性,而这两类细胞并非 MIF 在 CNS 内的主要来源,可能的解释是这些胶质细胞是从胞外环境中摄取了 MIF,但它们通过何种机制获取 MIF 还不清楚。本文推测,小胶质细胞产生的 MIF,可能通过与星形胶质细胞和少突胶质细胞膜上的分子作用启动内吞机制摄取 MIF。本研究随后检测了与轴突再生关系密切的 RhoA,其 mRNA 水平明显升高,不利于轴突再生。同时,损伤后 MIF mRNA 水平的增加则进一步提示其与再生抑制存在一定的关系[13]。有研究表明,原代培养的小鼠成纤维细胞中,MIF 可以通过 RhoA 参与调节细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)的表达,进而调节细胞周期[14]。本研究发现损伤后 MIF 与 RhoA 都出现了明显上调,这些结果提示,一方面,进入星形胶质细胞的 MIF 可能通过调控其细胞周期促进其增殖形成胶质瘢痕[5];另一方面,星形胶质细胞表面的 MIF 还可能进一步影响脊髓损伤后巨噬细胞的进入,调控巨噬细胞和小胶质细胞在损伤后局部微环境中对星形胶质细胞和少突胶质细胞的作用,比如清除髓鞘碎片以及阻碍胶质瘢痕的形成等。因此,MIF 将对轴突损伤后再生的微环境产生重要的影响,研究 MIF 除了炎症作用以外的其他效应将有助于理解脊髓再生困难的原因和潜在的机制,为促进脊髓损伤后的修复提供新的策略。

[参考文献]

[1] 李建军,周红俊,洪 毅,等. 2002 年北京市脊髓损伤发病率调查[J]. 中国康复理论实践,2004,10(7):412 - 413.

[2] Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1[J]. Nature, 2000, 403(6768): 434 - 439.

[3] Dohrmann GJ, Wagner FC Jr, Bucy PC. Transitory traumatic paraplegia: electron microscopy of early alterations in myelinated nerve fibers[J]. J Neurosurg, 1972, 36(4): 407 - 415.

[4] Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(10): 791 - 800.

[5] Koda M, Nishio Y, Hashimoto M, et al. Up-regulation of macrophage migration-inhibitory factor expression after compression-induced spinal cord injury in rats [J]. Acta Neuropathol, 2004, 108(1): 31 - 36.

[6] 卢曼鹏,权正学,刘 渤,等. 小鼠脊髓损伤标准化重物打击模型的制备及评价[J]. 中国修复重建外科杂志,2008,22(8):933 - 938.

[7] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1 - 21.

[8] Skaper SD, Argentini C, Barbierato M. Culture of neonatal rodent microglia, astrocytes, and oligodendrocytes from cortex and spinal cord[J]. Methods Mol Biol, 2012, 846: 67 - 77.

[9] Nishio Y, Koda M, Hashimoto M, et al. Deletion of macrophage migration inhibitory factor attenuates neuronal death and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice[J]. Acta Neuropathol, 2009, 117(3): 321 - 328.

[10] Vera PL, Meyer-Siegler KL. Anatomical location of Macrophage Migration Inhibitory factor in urogenital tissues, peripheral ganglia and lumbosacral spinal cord of the rat[J]. BMC Neuroscience, 2003, 4: 17.

[11] Bacher M, Weihe E, Dietzschold B, et al. Borna Disease virus-induced accumulation of macrophage migration inhibitory factor in rat brain astrocytes is associated inhibition of macrophage infiltration[J]. Glia, 2002, 37(4): 291 - 306.

[12] Filbin MT. How inflammation promotes regeneration[J]. Nature Neuroscience, 2006, 9(6): 715 - 717.

[13] Nishio Y, Nishihira J, Ishibashi T, et al. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in peripheral nerve regeneration: anti-MIF antibody induces delay of nerve regeneration and the apoptosis of Schwann cells[J]. Mol Med, 2002, 8(9): 509 - 520.

[14] Swant JD, Rendon BE, Symons M, et al. Rho GTPase-dependent signaling is required for macrophage migration inhibitory factor-mediated expression of cyclin D1 [J]. J Biol Chem, 2005, 280(24): 23066 - 23072.

(编辑:魏 源)

欢迎使用《局解手术学杂志》稿件远程处理系统

为了提高编辑、出版工作效率,缩短论文发表周期,加强作者、读者、编者及审稿专家的联系,《局解手术学杂志》开通了互联网在线投稿、审稿、查询系统,本系统包括作者在线投稿查稿、专家在线审稿、编辑在线办公三部分。作者可通过网站投稿并查询稿件处理情况,审稿专家可实现网上审稿。网址为 http://www.jraos.com.cn。本刊编辑部欢迎广大作者、读者访问本刊网站并使用该系统。如果您在投稿中遇到什么问题,或者对本系统及网站有好的意见和建议,请及时联系我们,谢谢您的大力支持!

电话:(023)68752649,68752251; QQ 群:78472559; E-mail:jjssxzz@163.com

《局解手术学杂志》编辑部