临床研究 文章编号:0253-3626(2009)05-0625-04

星形胶质细胞钙调蛋白在损伤后胶质瘢痕形成中的作用

顾 香[1],张杰敏[2],陈阳美[1]

(1. 重庆医科大学附属第二医院神经内科;2. 浙江衢州衢化医院神经内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨钙调蛋白对星形胶质细胞损伤后增生及胶质瘢痕形成的影响。方法:体外纯化培养星形胶质细胞,机械划痕法构建星形胶质细胞损伤模型,动态观察星形胶质细胞损伤前后钙离子浓度的变化,以及损伤后应用钙调蛋白抑制剂三氟拉嗪(Trifluoperazine dihydrochloride,TFP)处理,星形胶质细胞增生的主要标志物 GFAP 表达的变化。采用激光共聚焦观察细胞内游离钙离子浓度动态变化,免疫组织化学染色方法检测星形胶质细胞胶质纤维酸性蛋白(Glia fibrillary acidic protein,GFAP)表达量的变化。结果:星形胶质细胞损伤后细胞内钙离子浓度迅速上升,2 min 后明显下降至接近基础水平。星形胶质细胞损伤后钙调蛋白抑制剂能够抑制星形胶质细胞 GFAP 蛋白表达量的增加。结论:星形胶质细胞损伤后钙离子浓度明显变化,激活细胞内钙离子信号传导并参与星形胶质细胞损伤后的增生反应,而钙调蛋白抑制剂三氟拉嗪对星形胶质细胞损伤后的增生反应有显著的抑制作用。

【关键词】星形胶质细胞;划痕损伤;增生;胶质瘢痕;钙调蛋白

【中国图书分类法分类号】R338 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-08-08

Effect of calmodulin on the formation of glial scar after the astrocyte injury

GU Xiang, et al

(*Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital , Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of calmodulin on reactive astrocytosis and formation of glial scar after astrocytes are injured. *Methods*: Astrocytes were prepared from newborn rat cerebral cortex and evaluated the purity by immunostaining of glial fibrillary acidic protein (GFAP). The astrocyes injury model was made by means of surgical blade scraping. We observed the concentration of intracellular free calcium before and after injury in dynamic state .Then injured astrocytes were divided into two groups. The intervention group was added with suppressive agent of calmodulin-trifluoperazin dihydrochloride(TFP)after injury; the control group wae added into nothing. At different times after injury, we performed immunocytochemical staining for glial fibrillary acidic protein(GFAP)on each group and immunocytochemical staining photographs were analyzed by image analysis system, obtaining average optical densities. ***Results***: Concentration of the tracellular free calcium increased quickly 2 minutes after astrocytes were injured。 The immunocytochemical staining results indicated the control group and the intervention group had statistical significance. *Conclusion*: After astrocytes were injured the intracellular free calcium concentration obviously incredsed, activated the intracellular Ca^{2+} signal pathway and participatal in the proliferation. TFP can obviously inhibit this proliferation reaction after the astrocytes are injured.

【Key words】Astrocyte; Scraption; Proliferation; Glial scar; Calmodulin

中枢神经系统损伤后的最后恢复大多数会形成胶质瘢痕[1]。胶质瘢痕形成的基础是星形胶质细胞的增生,其最重要的物质基础就是胶质纤维酸性蛋白(Glia fibrillary acidic protein,GFAP)。胶质瘢痕的形成对中枢神经系统损伤后神经结构和功能的重建起到了严重的阻碍作用。因此,抑制胶质瘢痕的形成对中枢神经系统的损伤后修复起到了很好的促进作用。在前期实验中构建了大鼠星形胶质细胞损伤前后差异表达基因的 cDNA 文库。在筛选差异表达的基因中,表达显著上调的基因包括包括热休克蛋白 70 基因,钙调蛋白基因等[2]。因此本实验主要探讨星形胶质细胞损伤后钙调蛋白对细胞增生的影响以及与胶质瘢痕形成之间的关系,为以后

作者介绍:顾 香(1982-),女,硕士,研究方向:神经损伤与修复。

通讯作者:陈阳美,男,教授,E-mail:chenym1997@tom.com。

中枢神经系统损伤的临床治疗在基础研究方面提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 材料和试剂 Sprague-Dawley(SD)大鼠新生鼠(24 h 内),第三军医大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。DMEM/F12 培养基购自 Hyclone,胎牛血清购自杭州四季青,小鼠抗大鼠 GFAP 单克隆一抗购自 newmarker 公司,小鼠抗大鼠钙调蛋白单克隆一抗购自 newmarker 公司,免疫组化试剂盒购自深圳晶美公司,钙调蛋白(Trifluoperazin dihydrochloride,TFP)购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 星形胶质细胞的原代培养方法 参考 McCarthy 建立的经典方法,体外纯化培养星形胶质细胞[3]。从实验动物中心领取 SD 大鼠新生鼠(24 h 内),75%酒精消毒后,用镊子撕裂头皮及头骨,暴露双侧大脑半球,用弯镊从脑底部取出大脑半球,放入预冷的 D-HANKS 中,尽量清洗干净血液,在解剖显微镜下用镊子剥去软脑膜。血管,然后将脑组织用眼科剪剪成 1 mm^3 大小的组织块,吸管轻柔吹打制成细胞悬液,用 200 目筛网(孔径约 40 μm × 50 μm)过滤细胞悬液至 15 ml 离心管中,离心(1 000 r/min,5~8 min),去上清,收集细胞,吹打制成细胞悬液,置于完全培养基中(DMEM/F12 + 10%胎牛血清),并以 1×10^4 的密度接种于 50 ml 的未经多聚赖氨酸处理的培养瓶中,37℃,5% CO_2 培养箱 30~60 min,待成纤维细胞贴壁。翻转培养瓶,吸出培养液,再接种于 50 ml 多聚赖氨酸处理的培养瓶中。2 d 后第一次换液,此后每 3 d 换一次液,培养至 2 周左右可见细胞长满培养瓶,然后以 0.25%的胰蛋白酶消化细胞,离心后收集细胞沉淀,重新制成细胞悬液进行传代,传至 3~4 代后进行星形胶质细胞免疫组化鉴定,纯度达到 95%。

1.2.2 星形胶质细胞体外划痕损伤模型的建立 参考张杰敏等报道的大鼠脊髓星形胶质细胞体外划痕损伤模型[4]。待星形胶质细胞传至 3~4 代细胞生长达 80%~90%融合,免疫组化检测细胞纯度达到 95%后,用无菌手术刀片,在培养皿中呈"#"字形划痕损伤,划痕线之间平行间距为 0.5 cm,控制划伤的力度和速度。然后 D-HANKS 液清洗细胞碎片,加入新鲜完全培养基继续培养,倒置显微镜下观察细胞损伤后生长情况。

1.2.3 激光共聚焦扫描显微镜下动态观察划痕损伤前后星形胶质细胞内的钙离子浓度变化 吸弃培养皿中培养基,D-HANKS 液轻柔清洗培养皿 3 遍,在 35 mm 的培养皿中加入工作浓度为 0.04 μmol/L 的 fluo-3AM (分子量 1 130 kD)液 1~2 ml,37℃避光孵育 30~60 min,吸弃 D-HANKS 液,加入含钙、镁离子的完全培养基,将培养皿用胶布固定于激光共聚焦显微镜下扫描,观察静息状态下细胞内钙离子浓度,然后用刀片在显微镜下轻轻呈 # 字型划伤,动态观察星形胶质细胞内钙离子浓度的变化,持续观察 15 min[5]。

1.2.4 免疫组化检测星形胶质细胞损伤及加入 TFP 后 1、3、5 d 细胞 GFAP 的表达量变化 星形胶质细胞传至 3~4 代后,将最后一次传代的细胞随机分为 3 个组,对照组,损伤组,药物干预组,每个组 5 皿细胞。干预组于损伤后在新鲜培养基中立即加入 25 μmol/L 的 TFP,分别于损伤后 1、3、5 d取出培养皿,95%酒精固定 20 min,3% H_2O_2- 甲醛清除内源性过氧化氢酶,PBS 清洗 3 遍,山羊血清封闭,小鼠抗大鼠 GEAP 一抗 37℃孵育 2~3 h,PBS 清洗后,二抗 37℃孵育 30 min,DAB 显色,显微镜下观察。

1.3 统计学处理

所有实验数据均用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对照组与干预组采用配对 t 检验。采用 SPSS13.0 统计软件进行统计,$P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 星形胶质细胞损伤前后钙离子浓度动态变化

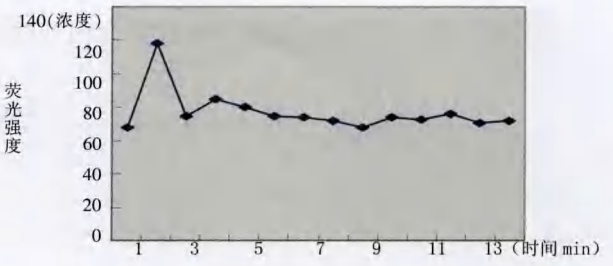


图 1 损伤后钙离子浓度变化

星形胶质细胞静息状态下钙离子荧光强度为 70 左右,损伤后钙离子浓度迅速上升,在约 10 s 内达到高峰,峰值为 120 左右,然后在 20~30 s 内钙离子荧光强度迅速下降,2 min 时间内钙离子浓度持续下降,约 5 min 后基本接近正常水平,5~10 min 之间钙离子浓度变化不大。(损伤区域一邻近区域钙离子荧光强度变化一致,取视野内各细胞钙离子荧光强度各时间点平均值)。

2.2 TFP 对星形胶质细胞损伤后细胞增生的影响

2.2.1 GFAP 免疫组化染色显微镜下观察结果 星形胶质细胞损伤后可见划痕周围出现空白区域,而损伤区域外的星形胶质细胞所受影响不大。损伤后 1 d 未加入 TFP 组与加入 TFP 组的星形胶质细胞 GFAP 染色比较,加入 TFP 组细胞体积明显瘦小,没有增生的痕迹(见图 2-1,2-2)。而损伤后 3 d 可以观察到,损伤后未加入 TFP 组的星形胶质细胞开

始向损伤区域增生、爬行,并且划痕区有细胞突起的延伸,而损伤后加入 TFP 组的星形胶质细胞体积仍然瘦小,数量没有增加,划痕区周围几乎没有细胞及细胞突起的延伸,表明细胞的增生明显的受到抑制,TFP 明显的抑制了星形胶质细胞的增生(见图 2-3,2-4)。损伤后 5 d 可以观察到损伤后无 TFP 组的星形胶质细胞向损伤区域增生,有细胞突起跨过损伤区,并逐渐融合,表明胶质瘢痕开始形成。而加入 TFP 组的细胞形态仍然明显瘦小,细胞数量较损伤后 3 d 有增加,但损伤区周围未见增生的胶质细胞也未见细胞,突起跨过划痕区(见图 2-5,2-6)。

2.2.2 GFAP 免疫组化图片光密度值分析 采用北航医学图象分析管理系统进行体视学图像分析,损伤后 1、3、5 d 未加入 TFP 组细胞与加入 TFP 组细胞 GFAP 免疫组化染色光密度值比较,结果有显著性差异(见表 1)。

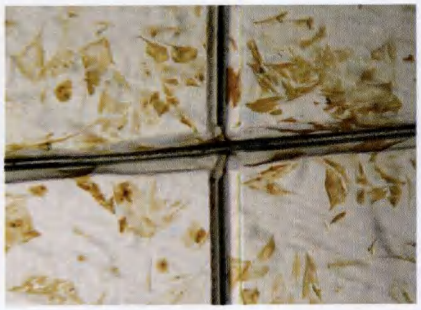


图 2-1 星形胶质细胞损伤后 1 d 免疫组化染色×400(OLYMPUS 显微镜 CX21 放大 400 倍)

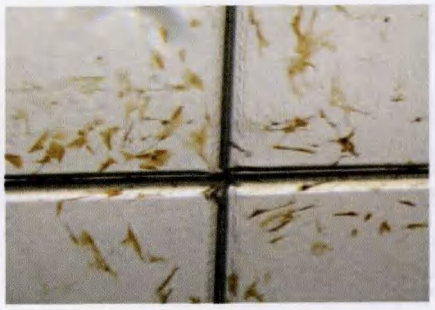


图 2-2 星形胶质细胞损伤后 TFP 干预 1 d 免疫组化染色×400

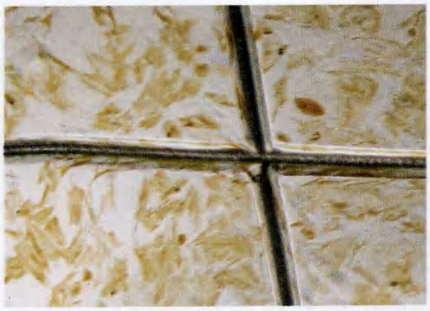


图 2-3 星形胶质细胞损伤后 3 d 免疫组化染色 ×400

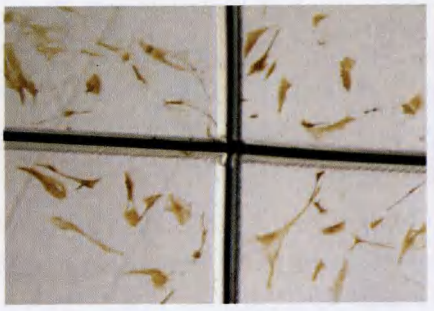


图 2-4 星形胶质细胞损伤后 TFP 干预 3 d 免疫组化染色×400



图 2-5 星形胶质细胞损伤后 5 d 免疫组化染色×400



图 2-6 星形胶质细胞损伤后 TFP 干预 5 d 免疫组化染色×400

表 1 各组细胞 GFAP 免疫组化染色光密度值结果分析($\bar{x}\pm s$)

分组/时间	1 d	3 d	5 d
损伤组	0.14 ± 0.012	0.20 ± 0.03	0.30 ± 0.07
干预组	0.05 ± 0.015*	0.091 ± 0.02*	0.14 ± 0.03*

注:与相同时间组比较 *P<0.05

3 讨 论

星形胶质细胞是中枢神经系统里数量最多的细胞,在中枢神经系统中起着支持、营养、信号传导等多方面的作用[6]。星形胶质细胞在中枢神经系统损伤后被激活,损伤区周围的细胞增生、肥大,不少作者报道早期反应性增生的星形胶质细胞中神经营养因子表达增高[7],这对于神经损伤后的早期的神经保护起到了促进的作用,而损伤后期增生的胶质细胞相互融合,最终形成胶质瘢痕,这将不利于神经损伤后的修复和功能重建。因此,抑制胶质瘢痕的形成对于神经损伤后最终结构和功能的重建非常重要。

钙离子是细胞内重要的第二信使,在星形胶质细胞损伤后钙离子浓度变化所激活的多个信号途径中参与细胞的反应,最终导致细胞的增生及其他的细胞功能变化[8]。在本实验中,星形胶质细胞在受到外界刺激时,钙离子通道快速开放,细胞内钙离子浓度迅速升高,然后钙离子浓度达峰值后快速降低。因此,我们认为,钙离子浓度的变化在细胞受到刺激后起到信号传导的作用。而我们从文献报道中知道,钙离子浓度变化的主要效应蛋白是钙调蛋白,钙离子/钙调蛋白通路被激活,从而激活其下游的多个信号传导途径。因此,我们推断钙调蛋白所介导的信号传导通路在星形胶质细胞的损伤反应中起着非常关键的作用。

在本试验的第二部分,我们在体外纯化培养星形胶质细胞,采用星形胶质细胞划痕损伤模型,在星形胶质细胞损伤后加入 TFP,继续培养至第 5 d。观察星形胶质细胞损伤后 1、3、5 d 损伤组与加入 TFP 干预组之间的星形胶质细胞增生的情况。结果显示加入 TFP 干预组较损伤后未加入 TFP 组星形胶质细胞增生的主要标志物 GFAP 的表达明显减少,表明 TFP 对星形胶质细胞机械性损伤后的细胞增生起到了很好的抑制作用。Yu 等[9]报道利用钙调蛋白抑制剂能够阻滞中心粒从细胞间桥到细胞中心的回归,从而抑制细胞的增生。钙调蛋白抑制剂处理胞质分裂的细胞同样会导致细胞分裂的抑制并会使细胞停留在 G_1 期[10]。因此,本实验结果也显示钙调蛋白对细胞的增生起到了很好的调控作用。

目前,临床中对于中枢神经系统损伤应用各种电压依赖性钙离子通道或非电压依赖性钙离子通道抑制剂治疗,效果并不确切。早在 1994 年,Koren-Schwarter 等就发现 TFP 可以抵抗大鼠脑缺血时各种特征性病理改变,提出钙调蛋白拮抗剂可能是治疗脑缺血性脑血管病的一种有效药。近来有研究表明阻断钙调蛋白的功能对神经元的兴奋性中毒有抑制作用,并且阻断钙调蛋白可能会减弱大脑缺血后的脑损伤[9]。但是,钙离子/钙调蛋白通路下游的信号传导通路仍然很多,其下游通路中哪一个通路起到了主要的作用目前并不清楚。因此,我们推断钙调蛋白抑制剂的进一步研究为中枢神经系统损伤后的治疗提供了新的治疗方向。

参 考 文 献

[1] Cervos Navarro J,Lafuente JV.Traumatic brain injuries:structural changes[J]. Neurological Sciences,1991,103(Suppl):S3-14.

[2] 张杰敏,廖维宏.大鼠脊髓星形胶质细胞损伤后的 cDNA 文库构建及其基因表达变化[J].中华创伤杂志,2005,21(11):852-857.

[3] McCarthy KD,de Vellis J. Preparation of sep arate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue[J]. Cell Biol, 1980,85 (3):890-902.

[4] 张杰敏,廖维宏.大鼠脊髓星形胶质细胞体外划痕损伤模型的建立[J]. 中华创伤杂志,2005,21(2):133-134.

[5] Rzigalinski BA,Weber JT,Willoughby KA,et al. Intracellular free calcium dynamics in stretch-injured astrocytes[J]. Neurochem,1998,70 (6):2377-2385.

[6] Ridet JL,Malhoa SK,Privat A,et al .Reactive astroeytes:cellular and molecular cues to biological function[J]. Trends Neurosci,1997,20(12): 570-577.

[7] Satake K,Matsuyama Y,Kamiya M,et al.Up-regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF)Following traumatic spinal cord injure[J]. Neuroreport,2000,11(17):3877-2882.

[8] Lixia Zhao,Roberta DB.Vasopression-Induced Cytoplasmic and Nuclear Calcium Signaling in Embryonic Cortical Astrocytes:Dynamics of Calcium and Calcium-Dependent Kinase Translocation[J]. Neuroscience, 2003,23(10):4228-4239.

[9] Yu Yue Yue,Dai Gu,Pan FY,et al.Calmodulin regulates the post-anaphase reposition of centrioles during cytokinesis[J]. Cell research, 2005,15(7):548-552.

[10] Zhao Lan,Zhao Qian,Lu Rong,et al. Effects of tyroserleutide on gene expression of of calmodulin and PI3K in hepatocellular carcinoma[J]. Cell Biochem,2008,103(2):471-478.

(责任编辑:关蕴良)