DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.024
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
1186 2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)10-1186-02

家兔脊髓横断自体免疫变化的实验研究

杨恒文,朱建华, 珍明,伍亚民 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第三研究室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨脊髓横断(SCT)后自体免疫反应的变化及其意义。方法 采用生物素-亲和素(ABC)染色法、间接酶联免疫吸附法(ELISA)及微量血清(CH50)溶血法分别检测脊髓下胸段($T_{10\sim12}$)完全横断后血清中抗脊髓抗体、损伤局部免疫复合物、血清中髓鞘碱性蛋白抗体及总补体活性。结果 SCT后第5天,血清中出现抗脊髓抗体,第7天横断局部出现免疫复合物,此时血清及脑脊液中开始产生髓鞘碱性蛋白抗体(MBP Ab),其D_λ值伤后明显升高($P<0.01$)。上述变化持续至伤后20 d。血清补体于伤后第3天开始升高,7 d达高峰,9~14 d显著下降。病理检查发现伤后3 d开始有白细胞及淋巴细胞浸润。结论 SCT后动物运动功能毫无恢复,而其自体免疫发生了明显改变,这可能是影响中枢神经系统损伤(CNS)后神经再生和功能恢复的因素之一。

关键词:脊髓横断;髓鞘碱性蛋白;自体免疫反应
中图法分类号:R322.81;R392.1;R651.2 文献标识码:A

Experimental studies of changes of autoimmunity in rabbit after transection of spinal cord

YANG Heng-wen, ZHU Jian-hua, DING Zhen-ming, WU Ya-min (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the changes of autoimmunity and its significance after spinal cord transection (SCT). Methods The activities for antibodies of spinal cord antigens in serum, immuncomplexes in injured location, myelin basic protein antibody in serum and the total serum complement were measured with HRP-avdin-biotin-IgG technique, indirect enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) and the microserum hemolytic method respectively after the lower thoracic spinal cord (T_{10-12}) were transected. Results The antibodies for spinal cord antigens in serum was detectable at the 5th day after transection. At the 7th day, the immuncomplexes and the myelin basic protein antibody (MBP Ab) were detectable at the location of transcection and in serum respectively. In cerebral spinal fluid, the D_λ value raised remarkably after injury ($P<0.01$). The above changes lasted for 20 days. The complements increased from the 3rd day and reached its peak at the 7th day, then decreased conspicuously at the 9~14th day after transection. Pathological examination showed hemorrhage and infiltration of leukocytes and lymphocytes in grey matter as early as the 3rd day after transection. Conclusion The changes of autoimmunity function might be one of the factors that hold back nerve regeneration and functional recovery after the injury of central nerve system.

Key words: spinal cord transection; myelin basic protein; autoimmunity function

本实验以脊髓横断(Spinal cord transection, SCT)家兔做模型采用间接酶联免疫吸附法(ELISA)及生物素抗体染色法(ABC),对比观察SCT前后不同时间特异性自体免疫反应变化、血清总补体活性检测和损伤组织病理学观察,旨在探讨脊髓损伤后自体免疫反应及其意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

家兔(大耳白兔)20只,体重2~2.5 kg,雌雄不拘,对照组均以伤前自身对照。观察时间分为3、5、7、14、21 d 5个时相点,每组动物4只。

1.2 致伤模型及标本采集

SCT:用1%戊巴比妥钠麻醉,在无菌操作下暴露$T_{10\sim12}$脊髓,用眼科剪完全横断,后缝合伤口。每只家兔于伤前及活杀前采集脑脊液1.5 ml与外周血2 ml各1次,所得血清及脑脊液于-20 ℃保存备用。

作者简介:杨恒文(1944-),女,回族,辽宁省本溪市人,高级实验师,主要从事脊髓及神经系统损伤方面的研究,发表论文23篇。电话:(023)68757433

收稿日期:2000-06-23;修回日期:2000-12-29

1.3 髓鞘碱性蛋白(Myelin basic protein, MBP)的提取

髓鞘碱性蛋白抗体(MBP Ab)由医科院免疫室提供;酶标亲和素-生物素试剂盒、酶标羊抗兔IgG抗体(HRPSAR-IgG)均由军科院提供;溶血素由第三军医大学微生物学教研室提供。MBP的提取:取冷藏于-70 ℃的牛脊髓匀浆300 ml,再分别经等体积氯仿-甲醇(体积比2∶1)混合液、10倍体积丙酮、2倍体积蒸馏水反复抽洗过滤、脱脂。滤渣用蒸馏水洗脱,酸化(1 mol/L HCl, pH 3.0) 45 min后12 500 r/min离心1 h,取上清液2 ml做氨基酸分析,其余上清液经纤维素23(CM-23)纯化后Sephadex G150凝胶柱进一步层析,用自动收液器分管收集洗脱液比色,电泳分析法检测原子量。琼脂对流免疫电泳法测定免疫活性。MBP纯品储存于-20 ℃备用。

1.4 脊髓特异抗体及局部免疫复合物测定

采用ABC染色法。

1.5 血清、脑脊液中MBP Ab的检测

采用ELISA方法。

1.6 血清补体活性检测

采用改良的微量血清溶血法(CH50)。

1.7 组织学检查

10%福尔马林固定脊髓,石蜡包埋切片,HE染色,光镜观察。

1.8 统计学处理

采用单因素方差分析和F检验。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2　结果

2.1　MBP 的测定结果

本实验结果显示, SCT 后 7 d, 血清中出现 MBP Ab, 且滴度逐渐升高, 持续至伤后 20 d。伤后 7、14、20 d 与伤前比较差异显著($P<0.01$), 见表 1。SCT 后脑脊液 MBP Ab 的变化规律与血清中 MBP Ab 的变化相似。

2.2　抗脊髓抗体

SCT 组: 伤前、伤后 3 d, 血清所染切片均为阴性; 伤后 5～20 d 血清所染切片均为阳性。光镜下部分髓鞘被染成棕褐色且逐渐加深, 其他结构未见着色。阳性、阴性对照组相应呈现阳性及阴性染色。

2.3　免疫复合物

SCT 后 3～5 d, 脊髓横断处组织切片染色为阴性。伤后 7、14、20 d 均可见脊髓切片中某些结构被染成棕褐色, 复染证实主要为髓鞘。伤前空白对照及心、肝、肾组织切片均呈阴性染色。

2.4　血清补体活性变化

SCT 组: 伤前为(86 ± 8.0) U/ml, 伤后第 3、4、7 天均较伤前显著升高($P<0.01$), 且呈上升趋势。伤后第 9、13、14 天较伤前显著降低($P<0.01$), 17 d 开始恢复至正常水平, 见表 2。

表 1　SCT 组血清 MBP Ab 的 D_λ 值

Tab 1　D_λ value of serum MBP Ab after SCT

	Before injury	Date after injury (d)				
		3	5	7	14	20
n	20	20	16	12	8	4
MBP Ab(D_λ)	0.083 ± 0.01	0.080 ± 0.02	0.080 ± 0.013	0.159 ± 0.040 **	0.178 ± 0.026 **	0.174 ± 0.016 **

**: $P<0.01$ *vs* before injury

表 2　SCT 组不同时间血清补体活性检测结果

Tab 2　Serum complement activity of different time

	Before injury	Date after injury (d)								
		1	3	5	7	9	13	14	17	20
n	20	20	20	16	12	8	8	8	4	4
Serum complement activity (U/ml)	86.0 ± 8.0	94.0 ± 6.3	149 ± 9.1 *	152 ± 8.6 *	177 ± 15.2 *	51 ± 11.2 **	56 ± 11.9 **	52 ± 14.0 **	88 ± 9.1	84 ± 4.3

*: $P<0.01$, **: $P<0.01$ *vs* before injury

2.5　病理组织学变化

SCT 组在伤后 1 d 大体观察脊髓横断面积血、表面肿胀、淤血, 伤后 5 d 横断处有 2 mm 的缺损呈干酪样坏死, 邻近节段肿胀、瘀血。伤后 14、20 d 可见瘢痕填塞。光镜可见早期灰质出血明显、白质少量散在出血, 3 d 可见白细胞及淋巴细胞浸润, 后期可见胶质细胞增生活跃。

3　讨论

近年来神经免疫学是发展最快的领域, 很多人研究并揭示神经免疫调节传递信息的关系[1,2]。由于细胞因子涉及神经免疫系统并起到桥梁作用, 对人体有积极有益的效应。本实验采用脊髓横断模型, 观察脊髓自体免疫反应变化。实验采用 ABC 染色法测定脊髓的特异抗体和脊髓断端有免疫复合物沉积[3]。用 ELISA 法在血清和脑脊液中测定 MBP Ab[4,5], 伤后 7 d 在血清中出现 MBP Ab 滴度逐渐升高, 持续到伤后 20 d。文献[4, 6, 7]用口服 MBP 诱导免疫耐受, 治疗多发性硬化症取得了一定效果, 可能是由于其免疫耐受作用而避免了损伤后由 MBP 所引起的过度免疫反应, 其具体的作用机制还有待研究。病理发现损伤脊髓局部有淋巴细胞白细胞浸润、血管扩张、红细胞渗出、组织水肿和髓鞘脱落, 与中枢神经系统的自身免疫性脱髓鞘疾病相似。文献[8, 9]用 CNS 组织匀浆免疫动物后, 在血清中测得两种神经特异抗体, 其中之一对培养的 CNS 组织髓鞘及胞体有毒害作用。因此可以初步认为 CNS 损伤后不能再生与自体免疫病理反应及其反应产物有关。

参考文献:

[1] Aarli J A. The immune system and the nervous system[J]. J Neurol, 1983, 229(3): 137－154.

[2] Straub R H, Westermann J, Scholmerich J, *et al*. Dialogue between the CNS and the immune system in lymphoid organs[J]. Immunol Today, 1998, 19(9): 409－413.

[3] 蔡文琴, 王伯彣 主编. 实用免疫细胞化学与和核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1995. 119－121.

[4] 刘学彬, 冯　璞, 谢蜀生, 等. 髓鞘碱性蛋白的提取鉴定及诱导口服耐受[J]. 北京医科大学学报, 1998, 30(4): 320－322.

[5] 徐　丽. ELISA 法和杀菌力试验测定健康人血清 A 群 NM 抗体的比较[J]. 疾病监测, 1998, 10(2): 365－368.

[6] Weiner H L, Friedman A, Miller A, *et al*. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens[J]. Annu Rev Immunol, 1994, 12(3): 809－837.

[7] Caspi R R. IL-12 in autoimmunity[J]. Clin Immunol Immunopathol, 1998, 88(1): 4－13.

[8] Hsu S M, Raine L, Fanger H J. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody(PAP) procedures[J]. Histochem Cytochem, 1981, 29(4): 577－580.

[9] Palladini G, Grossi M, Maleci A, *et al*. Immunocomplexes in rat and rabbit spinal cord after injury[J]. Exp Neurol, 1987, 95(3): 639－651.

（编辑　薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net