DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.02.023
第22卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 2
156 2000年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)02-0156-04

重组睫状神经营养因子对大鼠反应性胶质化的影响

林江凯[1],蔡文琴[1],范 明[2] ([1]第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038;[2]军事医学科学院基础所,北京 100850)

提 要 目的:探讨睫状神经营养因子(CNTF)对反应性胶质化的影响。方法:应用大鼠脑顶叶刺伤模型,将动物分为3组。对照组:刺伤后即原位注射生理盐水10 μl;小剂量组:刺伤后即原位注射0.1 g/L CNTF 1 μg;大剂量组:刺伤后即原位注射1 g/L CNTF 10 μg,分别于伤后1、2、7周灌注活杀大鼠,胶质纤维酸性蛋白(GFAP)免疫组织化学染色。结果:对照组1周时伤道及附近GFAP染色增强,星形胶质细胞数目和突起数及突起长度增加,胞体增大,胞浆丰富;2周时,上述变化仍明显,开始形成胶质瘢痕;7周时有较明显的胶质瘢痕形成;给予CNTF各时间点上述变化均较对照组明显,大剂量组胶质变化较小剂量组更显著。结论:CNTF具有促进胶质化形成的作用。

关键词 睫状神经营养因子;胶质化;脑损伤;胶质纤维酸性蛋白
中图法分类号 R394.2;R745.02 文献标识码 A

Effects of recombinant ciliary neurotrophic factor on reactive gliosis in rats

LIN Jiang-kai, CAI Wen-qin, FAN Ming (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To investigate the effects of recombinant ciliary neurotrophic factor (CNTF) on gliosis. Methods: After the model of brain stab wound in parietal lobe was established in rats, the animals were randomized into the control group, 1 μg group and 10 μg group. The rats in the control group were injected with 10 μl normal saline and those in 1ug and 10 μg groups were injected with CNTF at 1 μg/10 μl and 10 μg/10 μl respectively. Then the rats were sacrificed in 1, 2 and 7 weeks following the injury for immunohistochemistry of GFAP. Results: The hypertrophy and hyperplasia of GFAP(+) glial cells in and around the wound were more significant and lasted longer in 1 μg and 10 μg groups than in the control. The formation of glial scar began at the 2nd week. Furthermore, gliosis was more remarkable in 10 μg group than in 1 μg group. Conclusion: CNTF can enhance the formation of gliosis.

Key words CNTF; gliosis; brain injury; GFAP

胶质化表现为胶质细胞的增生和肥大。如果刺激持续存在或刺激有足够强度,一定时期以后,胶质化组织演变成致密的胶质瘢痕,从而阻碍神经元的神经元的再生[1]。睫状神经营养因子(Ciliary neurotrophic factor, CNTF)是从E8鸡眼分离出的一种特异蛋白,因能维持培养的睫状节神经细胞的存活而命名,有广泛的生理作用[2]。一些研究表明CNTF可促进脊髓和周围神经损伤后轴索生长。CNTF为25×10³u的多肽,存在于中枢神经系统的星形胶质细胞和周围神经系统的雪旺氏细胞,在神经系统的分布不均,在嗅球、视神经和脑干较丰富,与白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor, LIF)属同一家族,共享两个信号转导β成份gp130和LIFR-β受体,其特异性受体即配体结合α-成份为跨膜亚单位CNTFR-α[3]。有关CNTF与胶质化关系的研究的相关报道较少。

1 材料和方法

1.1 动物模型与分组

健康Wistar大鼠27只,体重140~160 g,雌雄不拘,随机分为对照组、小剂量组和大剂量组,每组9只。腹腔注射3%戊巴比妥钠30 mg/kg麻醉,固定于江湾立体定位仪上。左顶头皮切口,直径2 mm牙科钻钻孔,坐标为前囟后4 mm,矢状线旁2.5 mm,穿刺针垂直刺入4 mm,留针30 s后拔除,立即伤道内注入生理盐水或CNTF(军事医学科学院范明提供)。其中对照组注入生理盐水10 μl,小剂量组注入0.1 g/L CNTF 1 μg,大剂量组注入1 g/L CNTF 10 μg。注射时间为5 min,缓慢拔针。拔针后严密缝合头皮。上述操作均严格无菌。

1.2 免疫组织化学检测

按蔡文琴方法[4]进行。SP-9002试剂盒购自中山公司。分别

作者简介:林江凯(1964.4),男,湖北省浠水县人,博士,主治医师,讲师,主要从事神经胶质与神经再生方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68752229

收稿日期:1999-09-29;修回日期:1999-12-22

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

于伤后 1、2、7 周灌注（先 0.9%生理盐水 250 ml，后 Zamboni's 液 200 ml）活杀大鼠，取脑，后固定 6 h 修块。2 d 内冰冻切片，厚 30 μm，0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次，3%H_2O_2 15 min，0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次，置 1%牛血清白蛋白与 Triton 37℃孵育 30 min，1∶100 anti-GFAP（重庆医科大学）37℃孵育 3 h，0.01 mol/L PBS 漂洗 10 min×3 次，1∶100 二抗 37℃孵育 2 h，0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次，1∶100 三抗 37℃孵育 1 h，0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次。0.05%DAB/0.05 mol/L Tris-HCl/0.05% H_2O_2 显色，60℃烘烤 5 h，100%乙醇 10 min×2 次，二甲苯透明，DPX 封片。

1.3　图像分析

920G TIGER 图像分析仪分析单位面积胶质纤维酸性蛋白（Glial fibrillary acidic protein，GFAP）阳性细胞积分光密度（Integral optic density，*IOD*）。

1.4　统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，利用 Excel 行两样本均数的 t 检验，$P<0.05$ 和 $P<0.01$ 代表相差显著和相差非常显著。

2　结果

对照组 1 周时伤道及附近染色增强，星形胶质细胞数目和突起数及突起长度增加，胞体增大，胞浆丰富；2 周时，上述变化仍明显，胶质突起开始交织成网状，逐渐形成胶质瘢痕；7 周时有较明显的胶质瘢痕。给予 CNTF 后，各时间点上述变化均较对照组明显，大剂量组胶质变化较小剂量组更显著，且伤侧胶质化持续存在，时间延长，并影响到对侧大脑半球，见表 1、图 1～4。

表 1　各组 GFAP 积分光密度比较

Tab 1　Comparison of *IOD* among groups

	1st week	2nd week
Control	68.3±22.2	109.9±8.1
Small dosage	146.7±17.2*	181.0±33.3**
Large dosage	338.7±55.9*★	368.0±90.6**★

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control；
★：$P<0.05$ *vs* small dosage

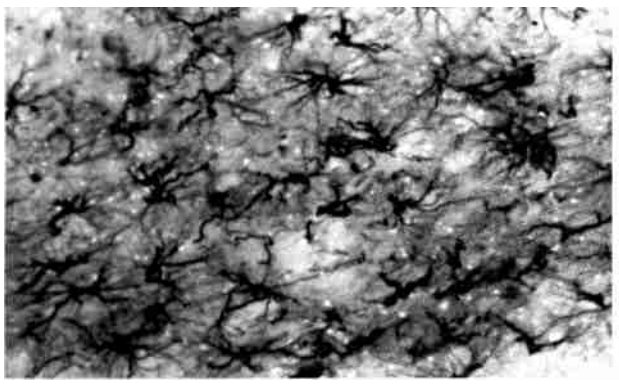


图 1　大剂量组第 1 周时伤侧皮质 GFAP 表现（S-P×400）

Fig 1　GFAP staining around injured cortex of large dosage group at 1st week　(S-P×400)

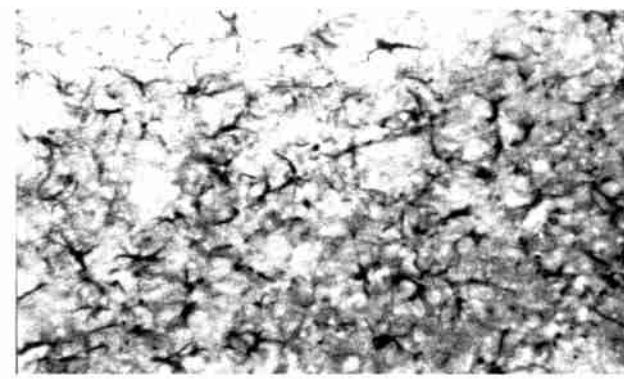


图 2　小剂量组第 1 周时伤侧皮质 GFAP 表现（S-P×200）

Fig 2　GFAP staining around injured cortex of small dosage group at 1st week　(S-P×200)

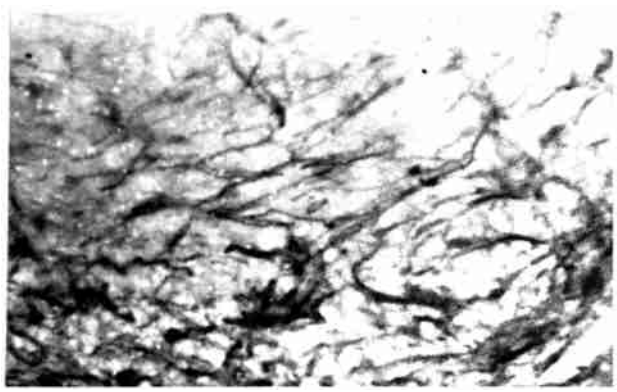


图 3　大剂量组第 2 周时伤侧皮质 GFAP 表现（S-P×400）

Fig 3　GFAP staining in injured cortex of large dosage group at 2nd week　(S-P×400)

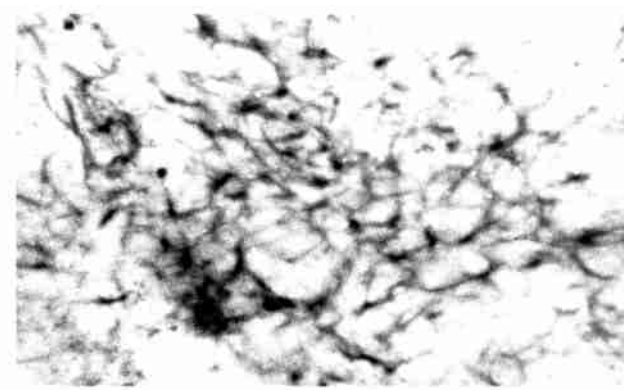


图 4　对照组第 2 周时伤侧皮质 GFAP 表现（S-P×200）

Fig 4　GFAP staining in injured corex of control group at 2nd week　(S-P×200)

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

3 讨论

本实验模型为破坏性损伤，刺激强烈，实验结果显示较广泛的胶质化和胶质瘢痕形成。在此模型基础上局部给予重组 CNTF，发现胶质化明显增强，即 GFAP 免疫组化染色时，伤道附近星形胶质细胞数目增加，细胞胞体增大，突起变粗大且延长，免疫染色加深。这与以前报道的结论一致[5]。CNTF 为神经营养因子，具有神经营养作用。但在胶质化过程中，我们的实验表明它也具有促进胶质化的作用，表现为典型的星形胶质细胞肥大和增生，后期形成胶质瘢痕。

CNTF 促进胶质细胞肥大。胶质化本身是神经系统对于外来刺激的防御性反应，在没有任何伤害时，即单纯的神经元活动增强足以引起星形胶质细胞肿胀。脑损伤时胶质细胞肿大是其早期的突出表现，增大的细胞常持续数天到数周。一些细胞因子可能参与了这一过程。由于胶质细胞表现为内向的钾通道，细胞外钾浓度增加引起钾内流入星形胶质细胞导致细胞内渗透性升高和细胞肿胀。损伤后神经元不能维持其膜电位，导致钾积聚在细胞外。另外损伤的神经元大量释放兴奋性氨基酸谷氨酸，星形胶质细胞摄取谷氨酸，谷氨酸激活胶质代谢营养性的谷氨酸受体从而增加钾、钠、氯流入星形胶质细胞，星形胶质细胞肿胀。离子共转运子（Cotransporter）和交换子（Exchanger）的激活，也可导致胶质肿胀。随肿胀时间的延长，星形细胞为适应损害而增加其功能，表现为细胞肥大[6]。

CNTF 促进胶质细胞增生。体外实验已发现 CNTF 能增强无营养因子支持的非成熟及成熟少突胶质细胞的生存，还增强 O—2A 祖细胞 GFAP 表达。CNTF 作为前炎性因子激活静息星形胶质细胞变为反应性星形胶质细胞，从而引起星形胶质细胞的增生性反应[3]。CNTF 不是由健康细胞所分泌，CNTF mRNA 在正常大鼠中枢神经系统水平很低，对正常的发育、生存并非必需。一旦损伤发生，可能存在于健康细胞内的 CNTF 序列作为损伤信号释放，刺激邻近的胶质细胞，保护神经元[7]。

CNTF 促进胶质化的可能途径。本实验给予外源性的 CNTF，其作用途径可能为外源性的 CNTF 与 CNTF 特异性受体 CNTFR—α 结合，激活核内多种信号转导通路，引起基因的表达[6]。CNTF 引起胶质化可能通过两条途径，一是间接途径，即通过刺激小胶质细胞和星形胶质细胞释放可溶性因子作用于临近的细胞群，这些因子如 IL-1、TNF-α、IL-6、TGF-β 等引起胶质化；二是直接途径，即结合未成熟胶质细胞表面受体直接调节 GFAP 的合成[8]。

局部给予 CNTF 影响对侧大脑半球。本实验还发现伤灶局部给予 CNTF 后星形胶质细胞肥大的时间延长，而且在对侧大脑半球区域如新皮质、海马、基底节的星形胶质细胞肥大，GFAP 染色加深。其原因可能是：①注射入伤道的重组 CNTF 自蛛网膜下腔或脑室系统影响到对侧半球；②脑水肿和胶质细胞的分布的差别；③Kahn[8] 认为，星形胶质细胞通过缝隙连接的细胞间通讯。GFAP 阳性细胞形成的紧密网络可能涉及到通过缝隙连接（Gap junction）的离子和代谢联接，通过这种方式一侧半球的反应性星形胶质细胞与远离损伤脑区的未成熟星形胶质细胞通讯；④还有一可能的解释是神经元而不是胶质通讯网络发送了越过大脑半球的信号。

Levison[7] 利用免疫组化发现 GFAP、vimentin、GST（谷胱肝肽 -S- 转移酶）Y_p、S-100 等蛋白和 OX-42 在 48 h 升高。且增生的细胞增加了 2 倍，作者根据以上胶质细胞基因表达和细胞增生结果认为 CNTF 从多方面诱导胶质化。OX-42 是小胶质细胞的标志分子，其数量增加可能是 CNTF 对小胶质细胞的趋化作用。中间丝 GFAP 和波形蛋白作为主要的细胞骨架蛋白显著上调，导致胶质瘢痕的形成[7]。在 CNTF 的表达环节或作用途径上的适当介入，是否有望减轻脑损伤后的胶质化反应和胶质瘢痕形成尚需进一步的研究。

参考文献

[1] Ridet J L, S K Malhotra, A Privat, *et al*. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function[J]. TINS, 1997, 20(12): 570—577.

[2] Hibi M, Nakajima K, Hirano-T. IL-6 cytokine family and signal transduction: A model of the cytokine system[J]. J Mol Med, 1996, 74(1): 1—12.

[3] Frostick S P, Frcs D M, Yin Q I. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration[J]. Microsurgery, 1998, 18(7): 397—405.

[4] 蔡文琴，王伯弥云. 实用免疫组织化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994，119—130.

[5] Winter C G, Saotome Y, Levison S W, *et al*. A role for ciliary neurotrophic factor as an inducer of reactive gliosis, the glial

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

response to central nervous system injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(13): 5 865—5 869.

[6] Hudgins S N, Levison S W. Ciliary neurotrophic factor stimulates astroglial hypertrophy *in vivo* and *vitro*[J]. Exp Neurol, 1998, 150: 171—182.

[7] Levison S W, Ducceschi M H, Young G M, *et al*. Acute exposure to CNTF *in vivo* induces multiple components of reactive gliosis[J]. Exp Neurol, 1996, 141(2): 256—268.

[8] Kahn M A, Ellison J A, Speight G J, *et al*. CNTF regulation of astrogliosis and the activation of microglia in the developing rat central nervous system[J]. Brain Res, 1995, 685(1-2): 55—56.

（编辑 王 红）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2000)02-0159-02

ROXIMATE 圆形吻合器在食管胃吻合中的临床应用

Clinical application of PROXIMATE circular stapler in esophagogastrostomy

熊 刚，王海东，王明荣，曾会昌 （第三军医大学附属西南医院胸心外科，重庆 400038）

在食管癌、贲门癌手术治疗中，恢复消化道连续性为一重要步骤，近年来，多以胃代食管在胸内或颈部行食管近端-胃吻合术，其吻合方式分为手工吻合和机械吻合。吻合口瘘、吻合口狭窄、胃食管返流是最常见的并发症，其中吻合口瘘是极为严重，甚至致命的。我们于 1996 年 12 月至 1999 年 7 月，采用美国强生公司生产的 PROXIMATE 圆形吻合器行胃食管吻合术共 71 例，现报道如下。

1 资料和方法

1.1 病例资料

71 例病人中男性 57 例，女性 14 例，年龄 34~77 岁，平均 56.6 岁，其中 50~70 岁 54 例，占 76.1%。食管癌 54 例(76.1%)(胸上段癌 4 例，胸中段癌 35 例，胸下段癌 15 例)，贲门癌 17 例(23.9%)，本组病人术前均未行放化疗。

全部病人临床病理 TNM 分期（AJCC1988）为：Ⅰ期 4 例(5.6%)，Ⅱa 期 18 例（25.4%），Ⅱb 期 9 例（12.7%），Ⅲ期 40 例(56.3%)。术中行食管胃左颈部吻合 3 例，右胸顶吻合 3 例，左胸顶及主动脉弓上吻合 19 例，主动脉弓后吻合 13 例，主动脉弓下吻合 33 例。

1.2 吻合方法

本组病人均采用强生公司 PROXIMATE 25 mm 圆形吻合器，主动脉弓下吻合者使用直形（SDH-25），其余使用弯形（CDH-25）。术中采用左胸后外侧切口、右胸前外侧＋上腹正中切口或左颈＋右胸前外侧＋上腹正中切口，常规充分切除肿瘤，食管近残端用专用荷包钳(EH40)及荷包线(EH7625)作全层荷包缝合，置入吻合器钉砧头后收紧打结。于胃前壁(距吻合口 3 cm 以上)作临时切口置入吻合器，穿出胃壁与砧头对合，顺时针旋转器尾调节钮，同时向上送胃，使吻合口无张力，确认食管、胃吻合端间无其它组织后，收紧吻合器，当指示窗内红线达到绿色区域后击发，可听到“咔嗒”声并出现落空感，表示吻合成功。退出吻合器，经胃腔检查吻合口，可疑处作加强缝合，同时检查切除的两组织环是否完整无缺。常规封闭胃切口，将胃底与胸膜固定数针。

2 结果

术后全组随访 1~31 月，平均（18±0.6）月，行 X 线钡餐摄片及纤维胃镜等检查，出现吻合口并发症 4 例，其中胃食管返流 2 例(2.8%)(临床表现为呕吐、返酸)，使用胃动力药及制酸剂治疗后，症状改善；吻合口狭窄 1 例(1.4%)，经胃镜扩张后好转；进食疼痛 1 例(1.4%)，胃镜证实为吻合器钽钉暴露在食管腔内，钳除钽钉后症状消失。无吻合口瘘发生。全组病人平均住院时间 21.3 d，平均手术时间 3 h 50 min。

3 讨论

在食管癌、贲门癌切除、食管胃吻合术中，最严重的并发症是吻合口瘘，尤其是胸内吻合口瘘，一旦发生将直接危及病人生命，据近年来报道，死亡率约 50%[1]或 70%[2]。统计资料显示吻合口瘘发生的主要原因是吻合技术欠佳，手工吻合吻合口瘘发生率约 3%~5%。自国内广泛采用国产 GF-1 型吻合器后，吻合口瘘的发生率明显下降，约 0.9%[2]。但同时吻合口狭窄的发生率则有所上升，其主要原因是国产吻合器吻合唇缘较宽，钽钉数目相对较少，导致吻合口粘膜对合不良，愈合过程中肉芽组织畸形生长，造成吻合口环状狭窄，病人术后再次出现进食梗阻[3]。而采用 PROXIMATE 圆形吻合器时，用荷包钳作食管近残端荷包缝合，荷包线穿透全层，食管断端粘膜距钽钉较远[4]，吻合口处食管胃是一次全层吻合，血供良好，同时减少

（下转 162 页）

作者简介：熊 刚(1969-2)，男，重庆市人，住院医师，发表论文 2 篇。电话：(023)68753705

收稿日期：1999-10-10；修回日期：1999-12-31

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