DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.05.030
第22卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 5
2000年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2000

文章编号:1000-5404(2000)05-0477-04

论著

睫状神经营养因子对大鼠脊髓损伤后GFAP表达的影响

张 强,廖维宏,伍亚民,陈恒胜,李应玉 (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 研究大鼠脊髓损伤后睫状神经营养因子(CNTF)是否能够影响胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达和脊髓损伤后大鼠功能的恢复情况。方法 将动物分为脊髓损伤+CNTF注射组(A组)、脊髓损伤+灭活的CNTF注射组(B组)。手术后1、3、7、14、28 d,应用原位杂交和免疫细胞化学方法观察GFAP的表达,采用计算机图像分析技术,进行定量分析;并用行为学和电生理检查观察大鼠功能恢复情况。结果 大鼠脊髓损伤后GFAP的表达A组明显高于B组,A组损伤脊髓高表达GFAP持续到术后28 d,B组仅持续到术后14 d。增加的GFAP阳性细胞数目与神经功能的改善有一定的平行关系。结论 CNTF能诱导大鼠损伤脊髓高表达GFAP,有助于促进大鼠功能恢复。

关键词:脊髓损伤;睫状神经营养因子;胶质纤维酸性蛋白;原位杂交;免疫细胞化学
中图法分类号:R651.2 文献标识码:A

Effects of ciliary neurotrophic factor on the expression of glia fibrillary acidic protein in spinal cord injry in rats

ZHANG Qiang, LIAO Wei-hong, WU Ya-min, CHEN Hen-sheng, LI Ying-yu (Research Institite of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the effects of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on the expression of glia fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA and on the functional recovery after spinal cord injur in rats. Methods All the experimental rats were inflicted with spinal cord injury induced by Allen's weight-dropping method. They were divided into group A in which the rats were treated with CNTF injection and group B in which the animals received heat-inactivated CNTF injection. On the 1st, 3rd, 7th, 14th and 28th day after the infliction of cord injury, the expression of GFAP mRNA was observed with *in situ* hybridization and immunocytochemistry. Quantitative analysis of the positive cells in the cord lesion and the adjacent area was performed with a computer image analysis system. The functional recovery of the spinal cord injury was examined with behavioral scores and electrophysiological technique. Results After cord injury, the expression of GFAP was significantly higher in group A than in group B. High expression of GFAP persisted to the 28th day after injury in group A and only to the 14th day in group B. The increase of the number of GFAP-positive cells was correlated to the functional recovery of the spinal cord. Conclusion In spinal cord injury, CNTF can induce high expression of GFAP mRNA in cord cells and promote functional recovery of the cord.

Key words: spinal cord injury; ciliary neurotrophic factor; glia fibrillary acidic protein; *in situ* hybridization; immunocytochemistry

睫状神经营养因子(Ciliary neurotrophic factor, CNTF)与神经系统发育、功能维持和损伤修复具有密切的关系。动物实验表明,外源性重组人CNTF注射到腹腔后能促进周围神经再生。临床应用CNTF治疗脑和脊髓运动神经元变性所致侧索硬化症病人,肌萎缩程度明显减低[1~3]。本实验拟用原位杂交,免疫细胞化学技术和行为学检查,观察大鼠脊髓损伤后应用

作者简介:张 强(1963-),男,山东省济宁市人,博士研究生,主治医师,主要从事脊柱脊髓伤方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68757433

收稿日期:1999-09-14;修回日期:1999-12-27

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

CNTF 对大鼠脊髓胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein, GFAP)免疫反应和 GFAP mRNA 蛋白表达及功能恢复影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组

Wistar 大鼠 60 只, 体重 180~250 g, 雌雄不拘, 每个时相点每组 6 只动物。随机将动物分为脊髓损伤+CNTF 注射组(A 组)、脊髓损伤+灭活的 CNTF 注射组(B 组)。手术后 1、3、7、14、28 d, 应用原位杂交和免疫细胞化学方法观察 GFAP 的表达和免疫反应, 采用行为学和电生理检查观察大鼠功能恢复情况。

1.2 手术方法

戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔内注射麻醉, 腰背部脱毛, 无菌条件下暴露脊髓腰膨大。应用改良的 Allen 打击法致伤脊髓(25 cm·g), A 组大鼠在蛛网膜下腔注射 100 ng CNTF, 然后每天在腹腔内注射 100 ng CNTF; B 组注射等量灭活的 CNTF 生理盐水。

1.3 诱发电位检查

应用第三军医大学野战外科研究所研制的多功能神经诱发电位仪检查。动物麻醉后, 选择右侧坐骨神经和对侧大脑皮层运动区分别进行电刺激, 记录感觉诱发电位(Sensory evoked potential, SEP)和运动诱发电位(Motor evoked potential, MEP)波形曲线, 计算波峰和潜峰时。刺激频率 4 Hz, 波宽 0.2 ms。强度 40~60 mV, 信号经前置放大器放大 10 万倍, 计算机叠加 300 次。

1.4 行为学检查

损伤后 1、3、7、14、28 d 对动物称重和进行行为学检查, 斜板试验测量抓握能力和维持姿势的能力动物在斜板上维持 5 s 不滑下的角度。改良的 Tarlov 评分, 0: 没有自主性运动; 1: 仅限于髋膝关节的非反射性运动; 2: 肢体髋膝踝 3 个主要关节的运动; 3: 能主动支持体重和不协调步态, 或偶尔出现协调步态; 4: 前肢和后肢协调的步态, 行走时有趾间关节的运动; 5: 正常步态。

1.5 图像分析

GFAP mRNA 染色以细胞浆呈明显的紫蓝色为阳性染色, GFAP 免疫细胞化学染色以细胞浆呈明显的黄棕色为阳性染色。随机计数 10 张切片, 切片经计算机图像分析系统处理, 测定上述 GFAP 的标记细胞数, 分别测出平均每张切片每平方毫米阳性细胞数, 并经 t 检验。

2 结果

2.1 原位杂交和免疫细胞化学

A 组与 B 组在损伤后 1 d 结果相似, 均可见各节段切片灰质和白质中有大量不规则地分布的 GFAP mRNA 阳性细胞呈紫蓝色。损伤后 3 d 即可见星形胶质细胞增大, 各节段中, 各组以损伤相邻区 GFAP mRNA 阳性细胞数量较多, 尾侧多于头侧, A 组明显多于 B 组。A 组各时间点阳性细胞分布呈一定时相和空间分布特点: GFAP mRNA 面积细胞密度(mm^2)高峰在损伤后 7 d 持续到 28 d, 损伤后 28 d 在灰质和白质的星形胶质细胞形态 B 组已接近正常, 而 A 组表达仍然较高。免疫细胞化学 GFAP 免疫反应也出现了类似的变化趋势。各节段阳性细胞主要分布情况见图 1~4, GFAP mRNA 和 GFAP 阳性细胞数比较见表 1、2。

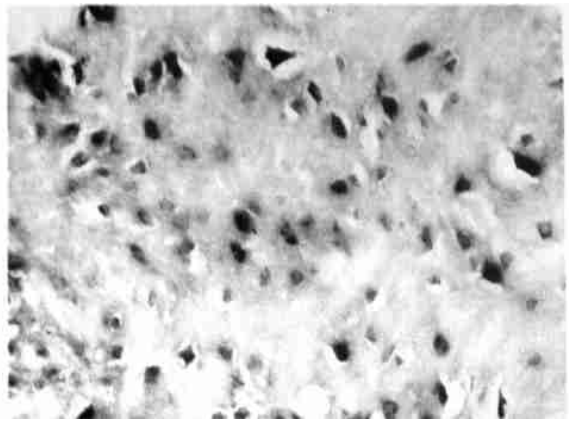


图 1 **A 组大鼠脊髓损伤后 7 d 原位杂交 GFAP mRNA 的表达** (ISH× 200)

Fig 1 Photomicrographs of spinal cord material 7 days after surgery and CNTF treatment showing GFAP mRNA positive astrocytes group A (ISH× 200)

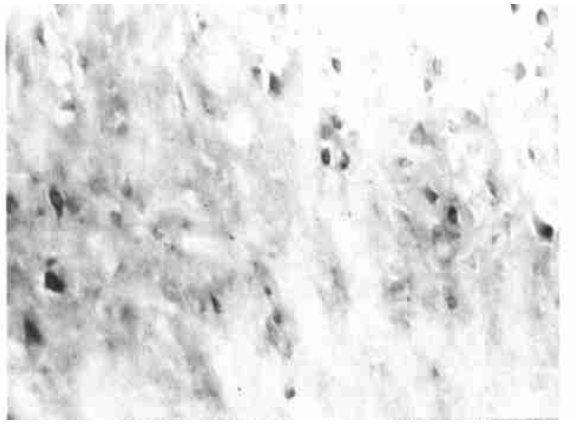


图 2 **B 组大鼠脊髓损伤后 7 d 原位杂交 GFAP mRNA 的表达** (ISH× 200)

Fig 2 Photomicrographs of spinal cord material 7 days after surgery showing GFAP mRNA-positive astrocytes group B (ISH× 200)

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

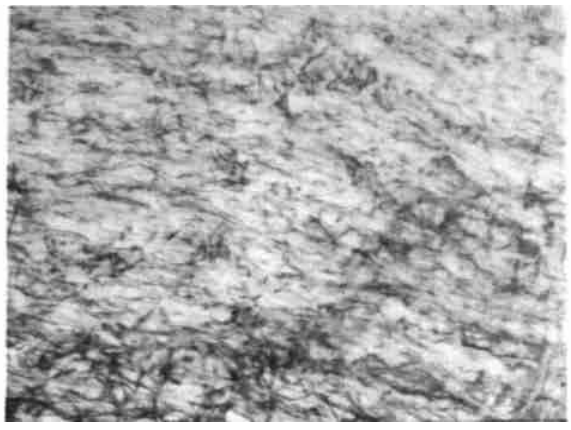


图 3　A 组大鼠脊髓损伤后 7 d GFAP 免疫细胞化学染色　(S-P× 200)

Fig 3　Photomicrographs of spinal cord material 7 days after surgery and CNTF treatment showing GFAP-positive astrocytes group A　(S-P× 200)

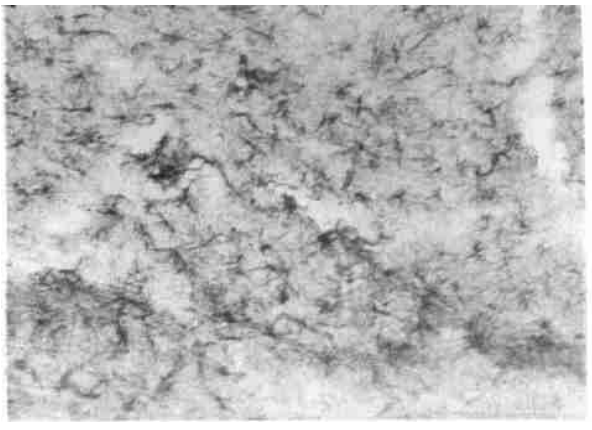


图 4　B 组大鼠脊髓损伤后 7 d GFAP 免疫细胞化学染色表达　(S-P× 200)

Fig 4　Photomicrographs of spinal cord material 7 days after surgery showing GFAP mRNA-positive astrocytes group B　(S-P× 200)

表 1　大鼠损伤脊髓 GFAP mRNA 阳性细胞数(/mm², n= 6)

Tab 1　GFAP mRNA positive astrocytes after spinal cord injury in adult rats (/mm², n= 6)

Group	Post injury (d)				
	1	3	7	14	28
A	124.54±12.21	218.84±15.63 *	320.69±19.56 **	426.86±26.05 **	241.50±13.68 *
B	108.56±9.65	156.46±11.83	225.50±13.47	268.80±15.54	157.26±12.08

*: P< 0.05,　**: P< 0.01 *vs* group B

表 2　大鼠损伤脊髓 GFAP 阳性细胞数(/mm², n= 6)

Tab 2　GFAP positive astrocytes after spinal cord injury in adult rats (/mm², n= 6)

Group	Post injury (d)				
	1	3	7	14	28
A	154.50±13.50	280.64±16.64 *	354.67±20.86 **	469.65±28.65 *	278.09±14.86 *
B	139.86±10.65	176.86±12.80	246.65±13.87	284.85±16.74	171.46±12.85

*: P< 0.05,　**: P< 0.01 *vs* group B

2.2　大鼠行为学检查

手术后 1 d A 组和 B 组大鼠都表现为双后肢瘫痪, 行为学观察无明显差别。14 d 时 A 组大鼠功能明显好于 B 组, 28 d 时 A 组大鼠已能行走, B 组大鼠则行走困难。28 d 时 A 组和 B 组 Tarlov 评分和斜板试验结果分别为: 3.86±1.05 和 2.86±0.78, (63.50±6.64)°和(50.21±5.06)°。

2.3　电生理检查

A 组运动诱发电位潜峰时损伤早期与 B 组差异不显著, 手术后 14、28 d A 组潜峰时明显缩短, 两组比较差异显著。感觉诱发电位波峰潜峰时变异性较大, 两组比较差异不显著。28 d 时 A 组和 B 组 MEP 和 SEP 分别为: (1.96±0.26)ms 和(4.50±0.65)ms, (2.45±0.34)ms 和(3.81±1.62)ms。

3　讨论

CNTF 是 25× 10^3 多肽, CNTF 在中枢神经系统中分布不均匀, 在嗅管内最丰富。CNTF 是脊髓损伤后促进存活因子[1], 能解救睫状、运动、感觉等细胞死亡的神经元, 也能促进 O-2A 祖细胞和少突胶质细胞的存活, 阻止由肿瘤坏死因子造成的细胞中毒性死亡。这些结果都表明 CNTF 有广谱神经营养作用。CNTF 可以介导胶质增生, 研究表明转基因鼠脊髓可以过度表达 GFAP 免疫反应 GFAP mRNA, 注射 CNTF 到新脑皮质 24 h 内可增加 GFAP 免疫反应并伴有星形胶质细胞

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

增生[2,3]。在中枢神经系统 CNTF 出现在星形胶质细胞中,在培养的星形胶质细胞具有功能性 CNTF 受体,胶质细胞能够直接对 CNTF 产生反应[4]。

GFAP 主要用于标记损伤后胶质反应,在正常情况下GFAP 受星形胶质细胞的动力调节[5]。损伤后增生的GFAP 阳性星形胶质细胞能促进星形胶质细胞有丝分裂,使原始祖细胞分化到成熟的星形胶质细胞。各种中枢神经系统损伤都可引起星形胶质细胞反应[6]。星形胶质细胞反应的标志是细胞数增加,细胞体肥大,星形胶质细胞分枝增多。星形胶质细胞在脊髓损伤后神经元存活和突触形成中起重要的作用。因为星形胶质细胞可以通过细胞裂解释放各种神经营养因子,有益于损伤脊髓的修复,实验证明星形胶质细胞胞质裂解后能释放神经生长因子,成纤维细胞生长因子,白细胞介素-1,白细胞介素-3,白细胞介素-6,肿瘤坏死因子等[7]。损伤后星形胶质细胞也增加它们细胞器的数量,可能是因为产生神经生长因子的需要。然而星形胶质细胞在大鼠脊髓损伤的修复作用具有二重性既可以抑制也可以促进损伤修复[8,9]。在成年大鼠脊髓损伤后星形胶质细胞增生肥大在囊肿和正常脊髓组织之间形成障碍,增生的瘢痕组织阻止轴突的生长[10]。

我们的实验结果表明:损伤后 7 d 灭活CNTF 组和CNTF 组 MEP 两组比较无明显变化,损伤后 14、28 d 脊髓损伤的神经修复重建部分功能恢复,CNTF 组 MEP 潜峰时与灭活 CNTF 组比较明显缩短。因此我们推测CNTF 主要保护脊髓运动神经元,促进脊髓运动功能的恢复。SEP 变异较大可能与 Allen 打击方法所致脊髓感觉传导束损伤轻重不一致有关,另外,CNTF 可能对脊髓感觉神经功能恢复的作用不大。应用 CNTF 后 7 d,大鼠损伤的脊髓 GFAP 免疫反应和 GFAP mRNA 蛋白表达明显升高,持续在高水平达 28 d。而灭活 CNTF 组GFAP mRNA 伤后 14 d 即明显下降,损伤后 28 d 已基本恢复到损伤后 1 d 的水平。Tarlov 评分和斜板试验也出现了相同的变化趋势,因此,我们的发现表明脊髓损伤后应用 CNTF 治疗能使损伤脊髓 GFAP 免疫反应和GFAP mRNA 蛋白高表达,并能促进大鼠功能的恢复。CNTF 可使GFAP 上调,然而这种骨架蛋白在促进胶质增生的同时也导致了胶质瘢痕的形成,因此如何更好地应用 CNTF 减少胶质瘢痕的形成还有待进一步研究。

(致谢:感谢北京军事医学科学院范明教授提供重组人CNTF 生物制剂。)

参考文献:

[1] 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.

[2] 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): 55—67.

[3] Sendtner M G, Kreutzberg G W, Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy [J]. Nature, 1990, 345(3): 440—441.

[4] Rudge J S, Li Y, Pasnikowski E M, *et al*. Regulation of ciliary neurotrophic factor in cultured rat hippocampal astrocytes[J]. Eur J Neurosci, 1994, 6(1): 2 118—2 229.

[5] Day J R, Laping N J, Lampert-Etchells M, *et al*. Gonadal steroids regulate the expression of glial fibrillary acidic protein in the adult male rat hippocampus[J]. Neuroscience, 1993, 55(2): 435—443.

[6] Malhotra S, Shnitka T, Elabrink J. Reactive astrocytes: A review [J]. Cytobios, 1990, 61(1): 133—160.

[7] Baldwin S T, Broderick R, Blades D A. Alterations in temporal/spatial distribution of GFAP-and vimentin-positive astrocytes after spinal cord contusion with the New York University spinal cord injury device[J]. J Neurotrauma, 1998, 15(12): 1 015—1 026.

[8] Tatagiba M, Brosamle C, Schwab M. Regeneration of injured axons in the adult mammalian central nervous system[J]. Neurosurgery, 1997, 40(4): 541—547.

[9] Fagan A, Gage F. Cholinergic sprouting in the hippocampus: A proposed role for IL-1[J]. Exp Neurol, 1990, 110(1): 105—120.

[10] Hinkle D, Baldwin S, Scheff S, *et al*. GFAP and S100β gene expression in the cortex and hippocampus in response to mild cortical contusion[J]. J Neurotrauma, 1997, 14(5): 729—738.

(编辑 潘式文)

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