

基础研究

硫酸软骨素酶 ABC 对大鼠急性脊髓损伤后
神经中丝和胶质纤维酸性蛋白的影响陈德纯¹,任先军¹,唐 勇²,蒋 涛¹

(1 第三军医大学新桥医院骨科 400037 重庆市;2 重庆市中医骨科医院 400015 重庆市)

【摘要】目的:探讨硫酸软骨素酶 ABC(ChABC)对大鼠急性脊髓损伤后神经中丝 200(NF200)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的影响。**方法:**SD 大鼠 72 只,雌雄不限,随机分为假手术组(A 组)、损伤对照组(B 组)和 ChABC 治疗组(C 组),每组 24 只。A 组仅打开椎板及置管,不损伤脊髓,不给药;C 组和 B 组均采用 Allen's 法制作大鼠 T10 脊髓损伤模型,分别在伤后即刻和随后每天 1 次连续 1 周蛛网膜下腔注射 ChABC(6 μ l/次)和等量生理盐水。术后 1d、1 周、2 周和 4 周每组各处死 6 只大鼠,B 组和 C 组以损伤区为中心、A 组在相应部位切取 1cm 长的脊髓组织,以 HE 染色观察脊髓组织形态变化,应用免疫组化方法检测脊髓组织中 NF200 和 GFAP 的变化。**结果:**HE 染色示 A 组脊髓无胶质细胞增生和胶质瘢痕形成;B、C 组脊髓损伤区有胶质细胞增生和胶质瘢痕,C 组明显少于 B 组。A 组术后 1d、1 周、2 周和 4 周时 NF200 阳性细胞数及灰度值和 GFAP 染色阳性面积无差异,1、2、4 周时 B、C 组脊髓损伤区 NF200 染色阳性细胞数及灰度值和 GFAP 染色阳性面积均较 A 组显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),1d 和 1 周时 C 组 NF200 染色阳性细胞数及灰度值与 B 组比较无显著性差异,2 周和 4 周时 C 组明显高于 B 组($P<0.05$);1d、1 周和 4 周时 C 组 GFAP 染色阳性面积与 B 组无显著性差异,2 周时 C 组显著小于 B 组($P<0.05$)。**结论:**ChABC 能提高大鼠急性脊髓损伤后神经细胞内 NF200 的表达并抑制 GFAP 的表达,进而促进神经细胞的修复,抑制胶质细胞的增生和胶质瘢痕的形成,对脊髓损伤具有保护作用。

【关键词】脊髓损伤;硫酸软骨素酶 ABC;胶质纤维酸性蛋白;神经中丝;大鼠

中图分类号:R322.81,R683.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2007)-05-0380-04

The effect of chondroitinase ABC on glial fibrillary acidic protein and neurofilament 200 after spinal cord injury in rats/CHEN Dechun,REN Xianjun,TANG Yong,et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord,2007,17(5):380~383

【Abstract】Objective:To investigate the effect of Chondroitinase ABC(ChABC) on glial fibrillary acidic protein(GFAP) and neurofilament 200(NF200) after spinal cord injury(SCI) in rats.**Method:**Seventy-two SD rats were randomly divided into sham group(A),normal saline group(B) and ChABC group(C) with each group of twenty-four.The SCI model was established according to the method of Allen's and animals in group B and C were administrated every day with 6 μ l saline,and 6 μ l ChABC respectively for 1 week by using subarachnoid space catheter placed near the injury site.Animals in group A group were treated as control.At 1d,1 week,2 weeks and 4 weeks,the rats were killed,and the spinal cord about 1cm long which included the injured site was harvested.Immunohistochemistry and image analysis were used to detect the change of GFAP in astrocytes and NF200 in the injured spinal cord.The status of the remnant injured spinal cord tissue was detected by HE staining.**Result:**HE stain indicated there was no glial cellular proliferation and glial scar in group A,but there was glial cellular proliferation and glial scar in group B and C,moreover,those in group C is obviously less evident than in group B.There were no significant difference with respect to the number of NF200 positive neurons,OD scale and the area of GFAP positive after injury in 1d,1 week,2 weeks and 4 weeks,which increased more significantly in group B and C than in group A at 1 week,2 weeks and 4 weeks after injury($P<0.05$ or $P<0.01$).There were no significant difference with respect to NF200 positive neurons and OD scale between group C and B at 1d and 1 week after injury,but those were more higher in group C than

第一作者简介:男(1977-)医学硕士,医师,研究方向:脊柱外科

电话:(023)68774081 E-mail:chendechn2001@163.com

通讯作者:任先军

group B at 2 weeks and 4 weeks after injury. There were no significant difference with respect to the area of positive GFAP between group C and B, but that was significantly smaller in group C than in group B ($P < 0.05$). **Conclusion:** The ChABC can enhance the expression of NF200 in neurocyte, inhibit the expression of GFAP, thus promote the recovery of neuron, attenuate the glial cellular proliferation and glial scar formation, protect the injured spinal cord tissue after acute SCI in rats.

【Key words】 Spinal cord injury; Chondroitinase ABC; Glial fibrillary acidic protein; Neurofilament 200; Rat

【Author's address】 Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China

胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和神经中丝(NF)分别为胶质细胞和神经细胞特异性中间丝蛋白,可分别鉴定并判断两类细胞在脊髓损伤后的增生和再生程度。本研究旨在观察硫酸软骨素酶 ABC(ChABC)对大鼠急性脊髓损伤后 NF200 和 GFAP 变化的影响,进而探讨 ChABC 对急性脊髓损伤后神经细胞和胶质细胞的影响。

1 材料和方法

1.1 动物分组和模型制备

SD 大鼠 72 只(第三军医大学大坪医院动物中心提供),雌雄不拘,体重 230~250g,随机分为假手术组(A 组)、损伤对照组(B 组)和 ChABC 治疗组(C 组),每组 24 只。B、C 组用改良 Allen's 法制作 T10 脊髓损伤模型,动物经 1%戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔麻醉后固定于操作台,小心咬除 T9~T11 棘突,并咬除 T10 全椎板,在撞杆和脊髓之间置一 2.2×4mm 的铜片,铜片弧形凹陷,与脊髓表面一致,撞杆垂直自由落下。致伤能量为 5×7g·cm,造成不完全性脊髓损伤。大鼠尾巴痉挛性摆动,双下肢及躯体回缩样扑动,双下肢呈弛缓性瘫痪,表明造模成功。再咬除 T12 右侧半椎板,暴露硬脊膜,作为蛛网膜下腔置管区。损伤后每日人工挤压排尿 3 次,直到恢复自主排尿。A 组仅打开椎板和置管,不损伤脊髓。将手术后不符合要求的 5 只(A 组 1 只, B 组和 C 组各 2 只)剔除,并重新制作补充。

1.2 给药方法

用改良 Yaksh 法^[1],在脊髓损伤后用微量注射器针头在暴露好的 T12 段硬脊膜上穿刺,见到脑脊液流出时将直径 0.3mm 的 PE-10 导管(自制)置入蛛网膜下腔,孔尖距损伤中心 1~2mm。将导管固定于下段棘突及肌肉上。C 组在伤后即刻蛛网膜下注射 6μl 的 ChABC (Sigma, 1u/ml), B 组给予等量生理盐水, A 组仅插管不给药。伤后第

2 天开始每天同量给药 1 次, 1 周后拔除导管。

1.3 取材

在造模后 1d、1 周、2 周和 4 周时每组各取 6 只大鼠麻醉后开胸,左心室插管至主动脉弓,右心耳剪一小切口,生理盐水灌注至清亮液体流出后,换 4%多聚甲醛先快后慢灌注固定约 30min, B 组和 C 组以损伤区为中心、A 组相应部位切取 1cm 长的脊髓组织,置于 4%多聚甲醛后固定。每份标本以损伤区为中心做连续切片 20 张,片厚 6μm,石蜡包埋,随机取 6 张备用。

1.4 病理学检测

每个时间点每只大鼠取 2 张切片 HE (苏木精-伊红)染色,观察各组脊髓组织的形态、胶质细胞和神经细胞的变化以及胶质瘢痕的增生情况。

1.5 NF200 和 GFAP 的检测

每个时间点每只大鼠取 2 张切片以系统卵白素-生物素免疫组化(SABC)法染色,染色步骤按说明书进行,即脱蜡、灭活内源性过氧化物酶、抗原修复,牛血清蛋白(BSA)封闭,加一抗(抗 NF-200/抗-GFAP,博士德)过夜,加二抗和 SABC(博士德),经 13'3-二胺基联苯胺(DAB)和双氧水显色,复染,脱水,封片。组织细胞中含有棕黄色颗粒为阳性细胞。采用德国产 Leica 全自动图象分析系统对切片进行组织图象分析。计算各切片灰质前角、后角、中间带 3 个区域内 3 个随机 400 倍视野下 NF200 阳性细胞平均计数和平均灰度值(OD)以及 GFAP 阳性平均染色面积(μm²),灰度值越高表示染色越强,抗原的相对含量越多。

1.6 统计学分析

利用 SPSS 10.0 统计软件包对不同时间点的 NF200 阳性细胞数及灰度值和 GFAP 阳性细胞面积进行统计学分析。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组数据间差异用单因素方差分析(ANOVA),两组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有显

著性差异, $P<0.01$ 为有非常显著性差异。

2 结果

2.1 病理学检测结果

A 组无胶质细胞增生和胶质瘢痕形成, 神经元及尼氏体无变化。B 组和 C 组在损伤后 1d 脊髓灰质出血均非常明显, 前角运动神经元肿胀, 边界尚清楚, 尼氏体分解, 炎症细胞聚集, 两组间无差异; 在伤后 1 周时两组尼氏体继续分解, 成细沙粒状, 神经元死亡较多, 星形胶质细胞活化增生, 两组差异不明显; 在伤后 2 周时两组星形胶质细胞继续增生, 开始有胶质瘢痕形成, 但 C 组少于 B 组; 伤后 4 周时两组胶质细胞大量增生, 瘢痕组织形成, 但 C 组明显少于 B 组, 可见到不规则的残存神经元, C 组多于 B 组(图 1、2、3, 后插页 IV)。

2.2 NF200 和 GFAP 的检测结果

A 组 NF200 着色浅, 着色神经细胞较少。C 组和 B 组伤后 1d 与 A 组比较无明显差异 ($P>0.05$), 1 周时着色神经细胞数开始增多, 灰度值增强, 与 A 组比较有显著性差异 ($P<0.01$), 但 B 组和 C 组无明显差异; 在 2 周和 4 周时着色神经细胞的数量 C 组明显增多, 灰度值明显增强, 与 A 组比较有统计学差异 ($P<0.05$), 术后 1d、1 周、2 周和 4 周时 B、C 组比较亦有统计学差异 ($P<0.05$) (表 1, 图 4、5、6, 后插页 IV)。B、C 组 GFAP 染色阳性面积均明显大于 A 组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), C 组和 B 组 GFAP 面积在伤后 1d 即开始增大, 2 周时最明显, 4 周时有所减小; 但 C 组小于 B 组, 在伤后 2 周时两组有统计学差异 ($P<0.05$) (表 2, 图 7、8、9, 后插页 IV)。

表 1 不同时间点损伤对照组(B 组)和 ChABC 治疗组(C 组)大鼠脊髓损伤组织和假手术组(A 组)相应部位脊髓组织中 NF200 阳性细胞数及灰度值 $(\bar{x}\pm s, n=6)$

	NF200 阳性细胞数(%)			NF200 阳性细胞灰度值		
	A 组	B 组	C 组	A 组	B 组	C 组
术后 1d	7.67±2.42	6.83±1.60 ^①	7.17±2.14 ^{①②}	153.08±10.78	156.87±12.92 ^①	151.54±10.59 ^{①②}
术后 1 周	6.21±1.94	14.50±1.52 ^③	15.83±2.32 ^{②③}	157.74±10.91	175.38±12.88 ^③	180.55±11.94 ^{②③}
术后 2 周	7.00±2.37	19.67±1.98 ^③	23.20±2.48 ^{③④}	160.86±11.53	194.39±13.89 ^③	216.34±14.58 ^{③④}
术后 4 周	6.50±2.43	23.50±3.08 ^③	28.31±2.32 ^{③④}	156.17±12.35	189.38±10.89 ^③	207.89±12.06 ^{③④}

注: ①与 A 组比较 $P>0.05$; ②与 B 组比较 $P>0.05$; ③与 A 组比较 $P<0.01$; ④与 B 组比较 $P<0.05$

表 2 不同时间点损伤对照组(B 组)和 ChABC 治疗组(C 组)大鼠脊髓损伤组织和假手术组(A 组)相应部位脊髓组织中 GFAP 阳性面积 $(\bar{x}\pm s, n=6)$

	GFAP 阳性面积(μm^2)			
	术后 1d	术后 1 周	术后 2 周	术后 4 周
假手术组(A 组)	710.35±88.48	758.15±97.11	725.58±85.25	706.44±76.72
损伤对照组(B 组)	976.62±110.36 ^①	1715.38±243.14 ^②	4182.53±210.73 ^②	3963.86±141.84 ^②
ChABC 治疗组(C 组)	896.61±116.88 ^{①③}	1587.14±182.89 ^{②③}	3890.60±224.78 ^{②④}	3792.19±264.78 ^{②③}

注: 与 A 组比较① $P<0.05$, ② $P<0.01$; 与 B 组比较③ $P>0.05$, ④ $P<0.05$

3 讨论

3.1 硫酸软骨素蛋白多糖在脊髓损伤后的作用

脊髓损伤(SCI)后神经功能不易恢复。Li 等^[2]认为, SCI 后损伤区微环境中含有大量的抑制因子等抑制了轴突生长, 是再生修复失败的一个重要原因。所以改变损伤脊髓周围微环境可以促进 SCI 后受损区神经元的修复和轴突的生长。硫酸软骨素蛋白多糖(CSPGs)是一种非常重要的轴突再生抑制因子, 主要由活化的星形胶质细胞和少突胶质细胞分泌, 存在于胞外基质。CSPGs 在中枢

神经系统(CNS)发育过程中可调节神经细胞增生、迁徙和分化, 轴突的生长和路径选择以及突触的形成和成熟等, 最终促成 CNS 的解剖和功能分层。但在 SCI 后, CSPGs 表现出强大的抑制作用, 抑制轴突和神经细胞的再生修复^[3]。ChABC 为 CSPGs 的分解酶, 可以阻断 CSPGs 的抑制作用, SCI 后给予 ChABC 可以促进大鼠脊髓损伤后功能恢复^[4]。

3.2 ChABC 对 SCI 后神经细胞内 NF 表达的影响

NF 是构成神经元胞体和神经轴突细胞骨架的主要成份,被称为细胞骨架结构。在维护神经元的功能和轴浆转运等一系列与 SCI 修复相关的病理生理变化中发挥着重要作用。NF 因分子量不同分为三种:68KD、140KD 和 200KD。200KD 仅存在于轴突内,在正常情况下对其染色只显示轴突情况,胞体不着色或着色很浅。当 SCI 后因轴突修复或神经细胞功能改变而在胞体中合成和积存 200KD 的 NF 时,胞体可着色,这反映了神经细胞的一个功能状态^[5]。本实验中大鼠 SCI 后,部分轴突断裂或者脱髓鞘,再生机制启动,神经元因轴突再生的刺激,合成 NF200 增加,未损伤组无变化。损伤对照组和 ChABC 治疗组损伤后 1d 增加不明显,1 周时明显增加,但两组无明显差异;在 2、4 周时继续增加,两组有明显差异($P<0.05$)。这种差异可能是因为再生轴突的生长锥接触到胶质瘢痕分泌的 CSPGs 后,生长停止所致^[6],这样对相应神经元的刺激合成 NF200 的作用也停止,而在 ChABC 治疗组中 ChABC 阻断了 CSPGs 的抑制功能,生长锥继续生长,神经元合成 NF200 增多,轴突再生能力强,因此显色的神经元和轴突数量多,着色的颜色深。

3.3 ChABC 对 SCI 后 GFAP 表达的影响

GFAP 是神经胶质细胞的主要细胞骨架成份,在成熟的神经系统中,主要存在于星形胶质细胞中,标准分子量为 51KD,在急性和慢性 SCI 中,星形胶质细胞肿胀、肥大、突起增多和延长,GFAP 合成表达增强。它的变化反映了星形胶质细胞的状态。胥少汀等^[5]和 Davies 等^[6]认为星形胶质细胞在脊髓损伤后的作用可能具有双重性,即星形细胞的幼稚期的诱导作用与成熟期的阻抑作用。当神经纤维再生时,星形胶质细胞增生的幼稚期,合成活跃,构成网络框架,以支持诱导神经纤维再生。当神经纤维再生不良时,两者之间达不到互相刺激或支持保护时,星形胶质细胞则转化为结构型胶质细胞,成为神经纤维再生路上的机械性或化学性的阻挡因素^[5,7],其对 SCI 后神经再生的负面效应仍占优势地位^[8]。本实验结果显示在

SCI 后 1d GFAP 表达开始增强,胶质细胞开始增生、肥大,在伤后 2 周时 GFAP 的表达最强,但 ChABC 治疗组较损伤对照组明显减少,差异有显著性($P<0.05$),在 4 周时的表达略有下降。HE 染色可见 ChABC 治疗组 4 周时损伤区的瘢痕面积要小于损伤对照组。表明 ChABC 能抑制 SCI 后 GFAP 表达,抑制胶质细胞的增生活化。

本实验结果提示,蛛网膜下腔应用 ChABC 阻断脊髓损伤区微环境中 CSPGs 的作用后,可以促进神经细胞的修复,抑制胶质细胞增生和胶质瘢痕形成,从而促进 SCI 后神经功能的恢复。

4 参考文献

1. Yaksh TL, Kohl RL, Rudy TA. Induction of tolerance and withdrawal in rats receiving morphine in the spinal subarachnoid space[J]. Eur J Pharmacol, 1977, 42(3): 275-284.
2. Li S, Liu BP, Budel S, et al. Blockade of Nogo-66, myelin-associated glycoprotein, and oligodendrocyte myelin glycoprotein by soluble Nogo-66 receptor promotes axonal sprouting and recovery after spinal injury[J]. J Neurosci, 2004, 24(46): 10511-10520.
3. Yick LW, Cheung PT, So K, et al. Axonal regeneration of Clarke's neurons beyond the spinal cord injury scar after treatment with chondroitinase ABC [J]. Exp Neurol, 2003, 182(1): 160-168.
4. Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury[J]. Nature, 2002, 416(6881): 636-640.
5. 胥少汀, 郭世绶. 脊髓损伤基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 192-194, 204-209.
6. Davies SJ, Goucher DR, Doherty D, et al. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord[J]. J Neurosci, 1999, 19(14): 5810-5822.
7. Faulkner JR, Herrmann JE, Woo NJ, et al. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury[J]. J Neurosci, 2004, 24(9): 2143-2155.
8. 赵兵, 丁永利, 宋跃明. 蛛网膜下腔灌注胶质细胞源性神经营养因子对损伤脊髓再生及功能恢复的影响 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2006, 16(6): 435-439.

(收稿日期: 2006-07-26 修回日期: 2007-03-26)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 李伟霞)