

基础研究

MEK 抑制剂对脊髓损伤后胶质瘢痕形成的影响

林 斌, 沈忠美, 鄢 斌

(解放军第 175 医院骨科 全军创伤骨科中心 363000 福建漳州)

【摘要】目的:观察 MEK(mitogen-activated ERK-regulating kinase, 丝裂原活化的细胞外信号调节激酶之调节激酶)抑制剂对脊髓损伤后胶质瘢痕形成的影响,并探讨胶质瘢痕形成的机制。**方法:**36 只 SD 大鼠随机分为 3 组。I 组为假手术组,只打开椎板,不打击脊髓;II 组及 III 组分别为脊髓损伤组及脊髓损伤后干预组,均造成 T12 脊髓损伤,III 组每天给予腹腔注射 MEK 抑制剂(U0126)共 9d,其余组给予腹腔注射等量的二甲基亚砷(DMSO)。在术后当天、1d、3d、5d、7d、14d、21d、28d 时对每组大鼠行 BBB 评分;术前及术后当天、14d 及 28d 时对大鼠行体感诱发电位检测;术后 14d 及 28d 时分别处死大鼠,灌注固定,取原打击处脊髓标本行 HE 染色、神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)及波形蛋白(Vim)免疫组化染色并光镜下进行观察,计算阳性细胞数。**结果:**I 组各时间点 BBB 评分及其他指标均无明显变化。脊髓损伤后,II 组及 III 组大鼠双后肢运动功能均表现出不同程度的恢复,术后 28d 时 II 组 BBB 评分为 12.00 ± 1.70 分,III 组为 16.5 ± 1.08 分,III 组恢复速度较 II 组更快($P < 0.05$)。脊髓损伤后,大鼠双后肢感觉诱发电位潜伏期明显延长,波幅明显降低;术后观察,III 组潜伏期及波幅恢复较 II 组明显增快($P < 0.05$),III 组在 28d 时可达潜伏期 16.86 ± 0.55 ms、波幅 4.19 ± 0.11 μV。脊髓损伤后,HE 染色可看到胶质细胞明显增多,胶质瘢痕形成,28d 时 III 组较 II 组瘢痕范围小;损伤后星形胶质细胞明显活化增殖,GFAP 及 Vim 的镜下表达数量明显增多。II 组、III 组损伤后 14d 时 GFAP 的表达分别为 143.56 ± 1.09 和 133.56 ± 3.31 ,Vim 的表达分别为 93.82 ± 4.48 和 89.32 ± 6.50 ;28d 时两组的 GFAP 表达分别为 110.68 ± 9.41 和 102.44 ± 6.93 ,Vim 的表达分别为 72.96 ± 4.16 和 66.44 ± 4.46 ,干预后明显下调了 GFAP 及 Vim 的表达($P < 0.05$)。**结论:**MEK 抑制剂能通过抑制星形胶质细胞的增殖,下调 GFAP 及 Vim 的表达,减少胶质瘢痕形成;同时可促进脊髓损伤后大鼠双后肢行为学及神经功能的恢复。

【关键词】脊髓损伤;MEK 抑制剂;胶质瘢痕;神经胶质原纤维酸性蛋白;波形蛋白

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2012.12.10

中图分类号:R683.2,Q556 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2012)-12-1102-06

Effect of MEK inhibitors on glial scar formation after acute spinal cord injury/LIN Bin, SHEN Zhongmei, YAN Yun//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2012, 22(12): 1102-1107

【Abstract】Objectives: To investigate the influence and mechanism of the MEK inhibitors on glial scar formation after acute spinal cord injury in a rat model. **Methods:** Thirty-six adult female Sprague-Dawley rats were divided randomly into sham injury group (group I), SCI group (group II), and U0126 treatment group (group III). SCI lesions in group II and III were made by modified Allen's impact device; while the sham injury group only accepted the pseudo-operation. Locomotor capacity was assessed based on the 21-point Basso, Beattie and Bresnahan score at 1d, 3d, 5d, 7d, 14d, 21d and 28d after injury. Somatosensory evoked potentials were used to assess neurologic recovery. While the lesions were obtained and studied by conventional histology, GFAP and Vim immunohistochemistry(HIC) by using light microscopy at 14d and 28d after injury. The rats were sacrificed at 14 and 28 days after SCI, perfusion fixed. **Results:** There was no obvious changes in BBB score and other index in group I. After SCI, hind limbs motor function in group II and group III showed varied degrees of recovery, after 28 days, the BBB score in group II was 12.00 ± 1.70 , and it was 16.5 ± 1.08 in group III, group III improved more remarkably than group II ($P < 0.05$). Somatosensory evoked potentials prolonged after SCI, while the amplitude decreased significantly; the latency and amplitude in group III increased significantly than group II ($P < 0.05$), the incubation period in group III at 28 days was

基金项目:2009 年度军区医学科技创新课题(编号:09MA067)

第一作者简介:男(1967-),医学硕士,主任医师,研究方向:四肢及脊柱创伤

电话:(0596)2931538 E-mail: linbin813@163.com

16.86±0.55ms, and the amplitude was 4.19±0.11μV. HE staining showed glial cells increased after SCI, glial scar formed obviously at 28 days. Compared with group II, the scar volume in group III was smaller; astrocytes activation and proliferation of GFAP expression significantly increased in group II and group III. At 14 days, the GFAP expression in two groups was 143.56±1.09 and 133.56±3.31 respectively; Vim expression of the two groups was 110.68±9.41 and 102.44±6.93 respectively. At 28 days, the GFAP and Vim of the two groups were 110.68±9.41, 102.44±6.93 and 72.96±4.16, 66.44±4.46 respectively. The expressions of GFAP and Vim significantly decreased after intervention of U0126 ($P<0.05$). **Conclusions:** MEK inhibitors can inhibit star glial cell proliferation as well as the expression of GFAP and Vim, which can decrease glial scar formation, and then improve the hindlimb motor function.

【Key words】 Spinal cord injury; Inhibitors of mitogen-activated ERK-regulating kinase; Glial scar formation; Glial fibrillary acidic protein; Vimentin

【Author's address】 Department of Orthopaedics, the 175 Hospital of PLA, Zhangzhou, Fujian, 363000, China

脊髓损伤后, 由于胶质细胞反应性增生形成的胶质瘢痕成分在损伤早期主要由星形胶质细胞、小胶质细胞、少突胶质细胞和浸润的巨噬细胞组成; 损伤后期星形胶质细胞逐渐替代其他的细胞成分而成为最主要的组成成分^[1]。这些成分细胞一方面构成了阻碍轴突再生的复杂的三维立体结构, 另一方面还分泌一定数量的抑制轴突生长的分子^[2]。国内外学者围绕胶质细胞反应性增生展开了大量的基础研究, 不同干预手段都一定程度上抑制了胶质瘢痕的形成, 我们利用丝裂原活化的细胞外信号调节激酶上调激酶(mitogen-activated ERK-regulating kinase, MEK)抑制剂(即 U0126), 选择性地抑制抑制丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路中的细胞外信号调节激酶(extra cellular signal-regulated kinase, ERK)通路, 从而探讨胶质瘢痕形成的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

选取雌性 SD 大鼠 36 只。体重 250~350g, 购自厦门大学实验动物中心。PBS 及 PB 缓冲液、Tris-HCl 磷酸缓冲液、HE 染色剂、神经胶质原纤维酸性蛋白质试剂盒(GFAP)、多聚赖氨酸(Poly-l-lysine)、波形蛋白(Vimentin, Vim)试剂盒(福州迈新生物科技有限公司)。U0126、二甲基亚砜(DMSO)(碧云天有限公司)。

1.2 实验动物分组及模型制备

1.2.1 实验动物分组 将实验动物随机分为假手术组(I组, $n=12$)、单纯脊髓损伤(SCI)组(II组, $n=12$)及脊髓损伤后 U0126 干预组(III组, $n=12$)。I组只打开椎板, 不打击脊髓。II组和III组用改良

Allen's 法^[3]制作急性脊髓损伤模型。

1.2.2 实验动物造模 以 3% 戊巴比妥钠(30mg/kg 体重)腹腔注射麻醉大鼠后, 俯卧位固定于手术台上, 脱毛, 消毒, 铺巾, 以大鼠背部最高处定位 T12 并正中后路纵形切开, 长约 1.5cm, 向两侧牵开椎旁肌, 显露 T12 棘突及椎板, 咬除 T12 棘突与椎板, 形成后方直径 4.0mm 的骨窗, 充分暴露椎管及硬脊膜, 深达椎管硬脊膜, 用一根重 10.0g 圆形金属冲击棒(金属冲击棒下端直径约 2.5mm, 与脊髓直径几乎吻合), 通过内径为 4.0mm 的中空管, 距脊髓 7cm 高处(致伤能量经预试验最后选用 70.0g·cm 势能的力, 作为造成脊髓损伤的致伤外力), 使金属杆在中空管指定位置, 垂直自由落下, 造成脊髓损伤, 局部脊髓血肿示打击成功, 观察鼠双后肢是否具有应激反射, 并在术后行体感诱发电位检测, 进一步评估脊髓撞击试验的可信性, 撞击失败动物予以剔除。止血缝合伤口, 并立即腹腔注射生理盐水 5ml 以补充体液丢失, 术后 24h 内给予保暖, 避免术后死亡。II组中 1 例、III组中 2 例首次打击失败, 重新补充。

1.2.3 术后给药及术后护理 术毕, 将每只大鼠单独放入一笼观察, 动物饲养房温度维持在 25℃左右, 换气扇 24h 运转, 使室内保持通气, 保持鼠窝干燥、清洁。术后协助大鼠排尿, 每日早晚各一次, 持续 1~2 周, 人工排尿后每天用络合碘对尿道口进行消毒, 至大鼠恢复反射性排尿。并观察皮肤有无压疮或感染、下肢有无溃烂。术后头 3 天, 皮下注射青霉素(1 万 U/d)。伤后 III组给予腹腔注射 U0126(20μg/d, 用 DMSO 溶解)共 9d, 其余组给予腹腔注射等量的 DMSO, 每天 1 次。

1.3 观察指标

1.3.1 BBB 评分 伤后当天、1d、3d、5d、7d、14d、

28d 分别进行 BBB 评分。观察者为非本组实验人员,但对评分标准十分熟悉。

1.3.2 皮层体感诱发电位(SEP) 应用诱发电位仪检测,刺激电极置于胫前肌中部,参考电极置于远侧 1cm 处,刺激强度为 1.5~4mA,波宽 0.2mA,频率 1.9Hz 连续方波刺激叠加 20~40 次。记录电极置于头顶部中线与冠状缝交点处头皮下,参考电极置于其后方 0.5cm 处。地线紧贴于生理盐水浸湿的动物尾部。以大鼠后肢出现轻微抽动为准,分别观察大鼠伤前、伤后当天、伤后 14d 及伤后 28d 时 SEP P1 波潜伏期及 P1-N1 波幅的变化。

1.3.3 组织学观察 每组实验动物在损伤后 14d、28d 时以肉眼见血肿伤区为中心从其头尾两端向致伤处咬开椎板,截取长约 1cm 脊髓组织(包含损伤区及其上下段脊髓)。10%甲醛固定,脱水、石蜡包埋,常规脊髓标本纵行切片(片厚 3μm)后,行 HE 染色、GFAP 及 Vim 免疫组化染色,光镜观察。

1.4 统计学处理

实验结果用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 16.0 软件包处理数据结果,各组 BBB 评分及阳性细胞计数结果两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验,感觉诱发电位结果各组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 表示对比组之间的差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BBB 评分

评分结果见表 1。I 组大鼠各时间点 BBB 评分无明显变化。脊髓损伤后 7d, II 组及 III 组大鼠瘫痪后肢的 BBB 评分比较无统计学差异 ($P>0.05$);7~28d, III 组大鼠后肢运动功能的恢复明显较 II 组快,两组相比差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。II 及 III 组大鼠各时间点 BBB 评分与 I 组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 SEP 检测结果

SEP 潜伏期及波幅检测结果见表 2、3。I 组大鼠各时间点潜伏期及波幅无明显变化。大鼠脊髓损伤后当天 SEP 潜伏期明显延长,波幅明显降低。伤后 14d, III 组的潜伏期明显缩短,波幅明显上升,与 II 组相比,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。伤后 28d, II 组 SEP 潜伏期亦较前缩短,波幅明显上升,且与 14d 时比较差异有统计学意义

表 1 各组不同时间 BBB 评分结果 ($\bar{x}\pm s$, 分)

Table 1 The BBB score results of each group at different times

组别 Group	I 组 Group I	II 组 Group II	III 组 Group III
伤后当天(n=12) The day after injury	21.00±0.00	0.00±0.00 ^①	0.00±0.00 ^①
伤后 1d(n=12) After injury for 1 day	21.00±0.00	1.65±0.67 ^①	1.45±0.89 ^①
伤后 3d(n=12) After injury for 3 days	21.00±0.00	3.50±0.69 ^①	3.45±0.99 ^①
伤后 5d(n=12) After injury for 5 days	21.00±0.00	5.70±0.80 ^①	5.20±1.15 ^①
伤后 7d(n=12) After injury for 7 days	21.00±0.00	7.80±0.76 ^①	8.15±1.04 ^①
伤后 14d(n=12) After injury for 14 days	21.00±0.00	9.65±1.50 ^①	13.7±1.26 ^{①②}
伤后 21d(n=6) After injury for 14 days	21.00±0.00	10.40±1.51 ^①	14.1±1.52 ^{①②}
伤后 28d(n=6) After injury for 28 days	21.00±0.00	12.00±1.70 ^①	16.5±1.08 ^{①②}

注:①与 I 组比较 $P<0.05$;②与 II 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with group I, $P<0.05$; ②Compared with group II, $P<0.05$

表 2 各组不同时间 SEP 潜伏期 ($\bar{x}\pm s$, ms)

Table 2 SEP latency at different times in each group

组别 Group	I 组 Group I	II 组 Group II	III 组 Group III
伤前(n=12) Before injury	13.54±0.39	13.57±0.46	13.57±0.29
伤后当天(n=12) The day after injury	13.62±0.39	23.36±0.36 ^①	23.53±0.42 ^①
伤后 14d(n=12) After injury for 14 days	13.60±0.45	20.41±0.34 ^①	19.72±0.43 ^{①②}
伤后 28d(n=6) After injury for 28 days	13.58±0.45	17.43±0.44 ^①	16.86±0.55 ^{①②}

注:①与 I 组比较 $P<0.05$;②与 II 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with group I, $P<0.05$; ②Compared with group II, $P<0.05$

表 3 各组不同时间 SEP 波幅 ($\bar{x}\pm s$, μV)

Table 3 Amplitude at different times in each group

组别 Group	I 组 Group I	II 组 Group II	III 组 Group III
伤前(n=12) Before injury	5.98±0.22	5.97±0.25	5.96±0.23
伤后当天(n=12) The day after injury	6.02±0.25	1.71±0.28 ^①	1.74±0.32 ^①
伤后 14d(n=12) After injury for 14 days	6.02±0.42	3.38±0.50 ^①	3.84±0.33 ^{①②}
伤后 28d(n=6) After injury for 28 days	5.99±0.30	3.79±0.41 ^①	4.19±0.11 ^{①②}

注:①与 I 组比较 $P<0.05$;②与 II 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with group I, $P<0.05$; ②Compared with group II, $P<0.05$

($P<0.05$);同时, III 组 SEP 潜伏期较 14d 时明显缩短,波幅升高明显,差异有统计学意义($P<0.05$),

与同期Ⅱ组相比亦有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 组织学观察结果

2.3.1 肉眼观察 Ⅱ组及Ⅲ组伤后即可见到脊髓背侧弥漫性充血、水肿;14d 及 28d 皆可见损伤节段硬膜外瘢痕形成,与硬膜粘连明显,且可见脊髓萎缩,直径变细。Ⅰ组 14d 及 28d 相应脊髓节段亦可见少许硬膜外瘢痕形成,与硬膜粘连,考虑与打开椎板时,手术刺激有关,但其脊髓未见明显水肿,后正中血管清晰可见,脊髓结构清楚。

2.3.2 苏木精-伊红染色 脊髓损伤后 14d,Ⅱ组可见脊髓灰质、白质仍可见少许出血灶,脊髓结构破坏严重,灰质神经元溶解,明显脱失,损伤区大面积液化坏死,囊腔形成;白质中可见大量肿胀的轴突及空泡,神经纤维排列紊乱;28d 后脊髓灰质、白质出血灶基本吸收,脊髓结构进一步破坏,灰质神经元溶解、液化,形成大量的空泡性结构,炎症浸润减轻,大量胶质细胞包绕囊腔形成致密的胶质瘢痕(图 1)。而Ⅲ组在术后 14d 时,亦可见脊髓结构破坏,炎症细胞浸润,神经元脱失、崩解,胶质细胞增生肥大,囊腔形成等现象,但程度及范围皆较Ⅱ组轻;28d 后,炎症细胞浸润减轻,瘢痕形成,瘢痕大小较Ⅱ组小(图 2)。Ⅰ组在 14d 及 28d 时,大多动物脊髓结构无明显变化,神经元结构清晰,白质、灰质界限明显,未见空泡现象,研究过程中发现Ⅰ组少数几只大鼠脊髓可见少量出血灶,少量胶质细胞聚集现象,考虑大鼠脊髓椎板切除造成脊柱稳定性降低,引起继发脊髓损伤可能。

2.3.3 GFAP 免疫组织化学染色结果 GFAP 阳性细胞计数结果见表 4。GFAP 免疫组织化学染色可见阳性细胞胞质呈棕褐色,形如蜘蛛,周围有放射状突起。Ⅰ组中 14d 及 28d 时,GFAP 阳性细胞表现为胞体体积小,突起短小,密度稀疏,灰质中神经元结构清晰。相比较而言,Ⅱ组 14d 时可见脊髓损伤处 GFAP 阳性细胞表达数量增强,细胞深染,细胞胞体肥厚,突起延长,于囊腔周边尤为明显,囊腔内少许阳性细胞表达,于损伤附近亦可见星型胶质细胞增生,肥大,但比损伤处增生程度较轻(图 3);28d 时损伤节段 GFAP 阳性细胞表达数量与 14d 时明显减少($P<0.05$),但阳性细胞胞体更大,突起更粗更长,相互缠结交织成网状,形成致密的胶质瘢痕,并包绕囊腔,囊腔内未见阳性细胞表达(图 4)。Ⅲ组 GFAP 阳性细胞表达数量在 14d 及 28d 时与Ⅱ组相比差异均有统计学意义

($P<0.05$),且 GFAP 阳性细胞体积变小,突起变少,染色变淡,胶质瘢痕范围变小(图 5、6)。

2.3.4 Vim 免疫组织化学染色结果 Vim 阳性细胞计数结果见表 5。Ⅰ组在术后观察过程中,无 Vim 阳性细胞表达,可见白质、灰质结构正常,神经元细胞结构完整(图 7)。Ⅱ组及Ⅲ组可见 Vim 阳性细胞,胞质含棕褐色颗粒,形如蜘蛛,突起呈放射状;14d 时 Vim 阳性细胞表达明显增强,体积大小不一,于囊腔周边表达明显。28d 时Ⅱ组及Ⅲ组 Vim 阳性细胞表达数量与 14d 时比较明显减少($P<0.05$)。但Ⅲ组与Ⅱ组相比,14d 及 28d 时 Vim 阳性细胞表达数量均较少($P<0.05$)(图 8、9)。

3 讨论

细胞的生命活动极其复杂,都必须受到严格的调控,其不仅要与外界环境进行信息交流,还要在细胞之间进行信息传递。MEK/ERK 信号通路是将细胞外刺激信号传导至细胞内并调控其他基因表达的重要通路之一,细胞外信号作用于细胞表面受体,依次激活 Ras、Raf-1 及 MEK,并进一步使 ERK 磷酸化而活化,ERK 活化后可进入细胞核,也可在胞浆内调节其他基因的表达^[4-5]。

有学者认为 MEK/ERK 信号通路可能参与炎症反应及细胞因子的生成过程而对脊髓损伤产生不利因素^[6-7],并参与了细胞凋亡过程,通过对此信号通路的阻滞可以抑制炎症反应及细胞凋亡,从而促进脊髓功能的恢复。本研究对大鼠神经功能恢复的评价主要是通过 BBB 评分及皮层诱发电位检测来完成的。大鼠脊髓损伤后,通过二者结果的观察,我们可以认为 MEK 抑制剂可促进脊髓损伤后大鼠运动能力及神经功能的恢复。究其原因,可能与 MEK 抑制剂可抑制炎症反应及抗细胞凋亡有关,但不排除与 MEK 抑制剂抑制了胶质瘢痕的形成有关。Ⅱ组大鼠后肢运动功能及神经功能随着时间的延长也表现不同程度的恢复,因此我们认为大鼠脊髓损伤后神经功能有自发恢复能力。

许多研究表明,ERK 的表达与脊髓损伤后神经修复及疼痛症状有关^[8-9]。Yu 等^[10]证实了脊髓损伤后,磷酸化的 ERK 可在神经元、小胶质细胞及星型胶质细胞中表达,且在星型胶质细胞中持续表达。因此我们认为 MEK/ERK 信号通路还参与了胶质瘢痕形成过程。本研究选用 DMSO 为对照

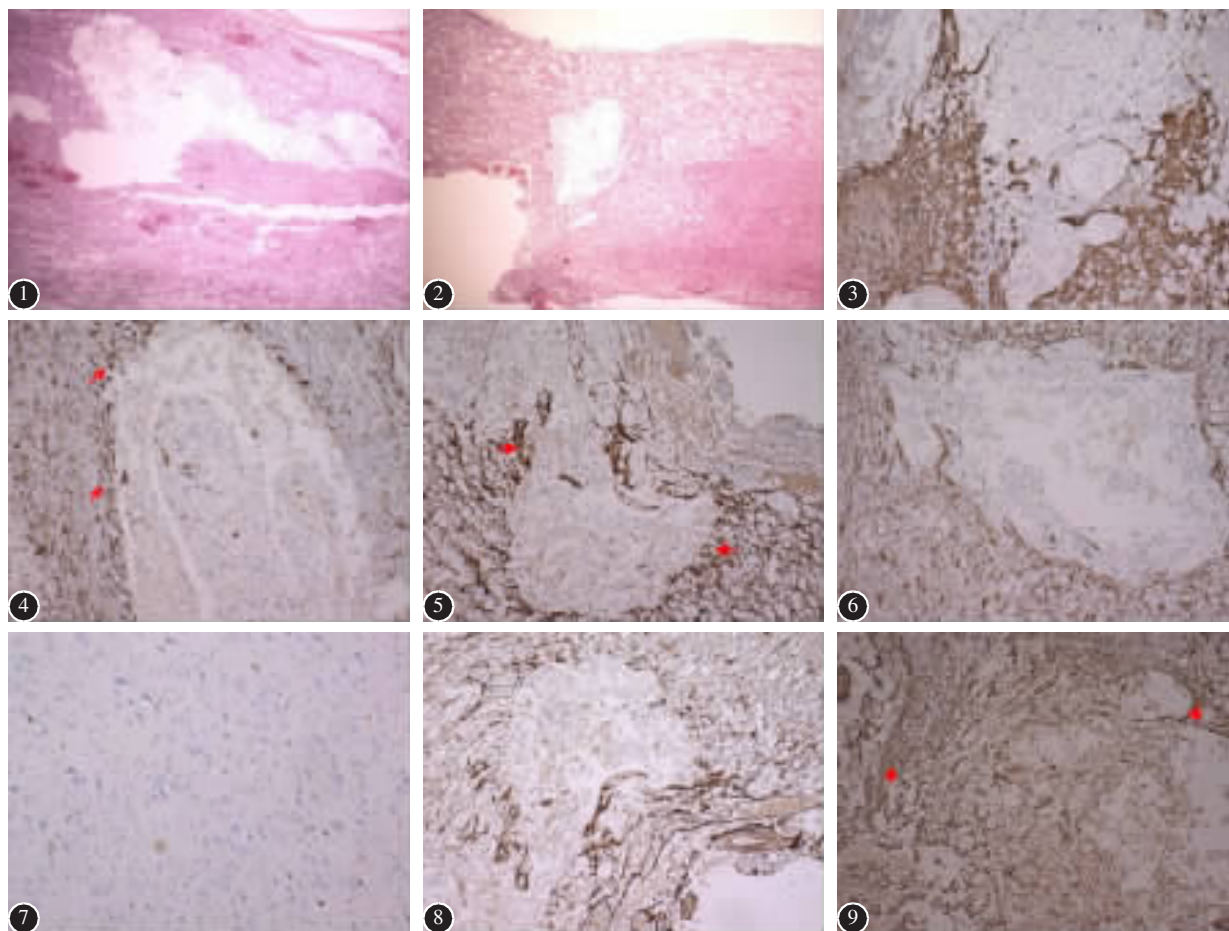


图 1 II 组脊髓损伤后 28d 示灰质神经元溶解、液化,形成大量的空泡性结构,大量胶质细胞包绕囊腔,胶质瘢痕形成(HE $\times 100$) **图 2** III 组脊髓损伤后 28d 示瘢痕形成,瘢痕大小较 II 组小(HE $\times 100$) **图 3** II 组伤后 14d 脊髓损伤处 GFAP 阳性细胞表达数量增强,细胞深染,细胞胞体肥厚,突起延长,囊腔周边尤为明显,囊腔内少许阳性细胞表达,于损伤附近亦可见星型胶质细胞增生、肥大,但比损伤处增生程度较轻(GFAP 染色 $\times 100$,下同) **图 4** II 组伤后 28d 脊髓损伤处损伤节段 GFAP 阳性细胞表达数量与 14d 时比较明显减少,但阳性细胞胞体更大,突起更粗更长,相互缠结交织成网状,形成致密的胶质瘢痕 **图 5、6** III 组 GFAP 阳性细胞表达数量在 14d 及 28d 时与 II 组比较明显减少,且 GFAP 阳性细胞体积变小,突起变少,染色变淡,胶质瘢痕范围变小 **图 7** I 组免疫组化染色示 Vim 阳性细胞表达呈阴性,神经元细胞结构完整 **图 8** II 组伤后 28d 脊髓损伤后,免疫组化染色可见 Vim 阳性细胞,胞质含棕褐色颗粒,形亦蜘蛛,突起呈放射状($\times 100$) **图 9** III 组伤后 28d 时 Vim 阳性细胞表达数量较 II 组明显减少($\times 100$)

Figure 1 After SCI for 28 days, HE in group II showed that neurons dissolved and liquefied, forming a large number of vacuolar structures, the inflammatory infiltration reduced, glial scar formation for a large number of glial cells surround

Figure 2 After SCI for 28 days, HE in group III showed that scar formed, scar size was small compared to group II

Figure 3 After SCI for 14d in group II, the number of expression of GFAP positive cells enhanced. Cells deeply stained, hypertrophy, and neurite extension. A number of positive cells surrounded the cysts cavity. Astrocytes proliferation and hypertrophy can also be found near the injury, but proliferation extent was less than the injury area (GFAP $\times 100$)

Figure 4 After SCI for 28d in group II, Compared with after injury for 14 days, the GFAP positive cells expressed significantly reduced. But positive cell prominence was thicker and longer longer, and mutual entanglement woven into the mesh, formed a dense glial scar (GFAP $\times 100$) **Figure 5, 6** After injury for 14d and 28d, the number of GFAP-positive cells expression in group III significantly reduced. The GFAP positive cells became smaller, less prominence, pale staining. The scope of glial scar was smaller (GFAP $\times 100$)

Figure 7 Vim positive cells in group I was negative, and the structural of neurons was integrity (GFAP $\times 100$) **Figure 8** After SCI for 28d in group II, the Vim immunohistochemical staining showed that positive cytoplasm contained brown particles, the positive cells prominence formed radially as the spider (GFAP $\times 100$)

Figure 9 After SCI for 28d in group III, Vim positive cells decreased significantly compared with group II (GFAP $\times 100$)

表 4 各组不同时间 GFAP 阳性细胞计数结果

($\bar{x} \pm s$, 个, $n=6$)

Table 4 GFAP positive cells at different times in each group

组别 Group	伤后 14d After injury for 14 days	伤后 28d After injury for 28 days
I 组 Group I	27.82±1.29	27.1±1.66
II 组 Group II	143.56±1.09 ^①	110.68±9.41 ^①
III 组 Group III	133.56±3.31 ^{①②}	102.44±6.93 ^{①②}

注:①与 I 组比较 $P<0.05$;②与 II 组比较 $P<0.05$ Note: ①Compared with group I, $P<0.05$; ②Compared with group II, $P<0.05$

表 5 各组不同时间 Vim 阳性细胞计数结果

($\bar{x} \pm s$, 个, $n=6$)

Table 5 Vim positive cells at different times in each group

组别 Group	伤后 14d After injury for 14 days	伤后 28d After injury for 28 days
I 组 Group I	0.00±0.00	0.00±0.00
II 组 Group II	93.82±4.48 ^①	72.96±4.16 ^①
III 组 Group III	89.32±6.50 ^{①②}	66.44±4.46 ^{①②}

注:①与 I 组比较 $P<0.05$;②与 II 组比较 $P<0.05$ Note: ①Compared with group I, $P<0.05$; ②Compared with group II, $P<0.05$

组,其原因在于,U0126 需使用 DMSO 作为溶剂,但早期便有文献报道 DMSO 对急性脊髓损伤早期有治疗作用。本研究观察发现,脊髓损伤后 2 周及 4 周,脊髓结构严重破坏,神经元崩解、坏死,炎症细胞浸润,损伤区大面积液化坏死灶,囊腔形成,大量胶质细胞包绕囊腔形成致密的胶质瘢痕;U0126 干预后亦可见上述病理改变,但程度及范围皆较 II 组轻。目前许多研究把 GFAP、Vim 蛋白的表达作为胶质细胞异常表达及脊髓的再生修复的评价指标之一。本研究免疫组织化学染色结果显示,U0126 干预后,损伤局部亦可见星形胶质细胞反应性增生肥大,但 GFAP 及 Vim 表达的程度较 II 组轻,阳性细胞计数明显较 II 组少,胶质瘢痕形成范围较小,阳性细胞密度更稀疏。由此我们可以认为 U0126 可通过下调 GFAP 及 Vim 的表达,降低星形胶质细胞的增殖。其中 Vim 蛋白在假损伤组中未见表达,说明 Vim 蛋白不存在于正常星形胶质细胞中,而脊髓损伤后随着反应性胶质化

的发生 Vim 才表现出明显上调,因此 Vim 可用于反映脊髓损伤后胶质化的指标。本实验通过对 MEK/ERK 信号通路的阻滞,结果 GFAP 及 Vim 表达显著下调。

本研究结果表明,脊髓损伤后,利用 MEK 抑制剂干预,可一定程度上改善脊髓损伤后大鼠双后肢 BBB 评分,并促进神经功能恢复,同时可下调 GFAP 及 Vim 表达。因此,我们认为 MEK/ERK 信号通路可能参与了胶质瘢痕的形成。

4 参考文献

1. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar [J]. Nat Rev Neurosci, 2004, 5(2): 146–156.
2. Fitch MT, Silver J. Inflammation and the glial scar: factors at the site of injury that influence regeneration in the central nervous system. In: Saunders NR, Dziegielewska KM, eds. Degeneration and Regeneration in the Nervous System [M]. Amsterdam: Harwood, 2000. 77–92.
3. Black P, Markowitz RS, Damjanov I, et al. Model of spinal cord injury: Part 3 Dynamic load technique [J]. Neurosurg, 1998, 22(1): 51–56.
4. Wang ZQ, Wu DC, Huang FP, et al. Inhibition of MEK–ERK1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2004, 996(1): 55–66.
5. Chang L, Karin M. Mammalian Map kinase signaling cascades [J]. Nature, 2001, 410(6824): 37–40.
6. Lu K, Cho CL, Liang CL, et al. Inhibition of the MEK/ERK pathway reduces microglial activation and interleukin-1-beta expression in spinal cord ischemia/reperfusion injury in rats[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2007, 133(4): 934–941.
7. Genonvese T, Esposito E, Mazzon E, et al. Evidence for the role of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in the development of spinal cord injury [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 325(1): 100–114.
8. Han M, Huang RY, Du YM, et al. Early intervention of ERK activation in the spinal cord can block initiation of peripheral nerve injury-induced neuropathic pain in rats[J]. Acta Physiologica Sinica, 2011, 63(2): 106–114.
9. Margarita C, Ning Z, John G, et al. Following nerve injury neuregulin-1 drives microglial proliferation and neuropathic pain via the MEK/ERK pathway[J]. GLIA, 2011, 59(4): 554–568.
10. Yu CG, Yezierski RP, Joshi A, Raza K, et al. Involvement of ERK2 in traumatic spinal cord injury[J]. J of Neurochem, 2010, 113(1): 131–142.

(收稿日期:2012-02-17 修回日期:2012-05-25)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)