

基础研究

AMPA 谷氨酸受体亚基-2 在大鼠脊髓损伤急性期对少突胶质前体细胞凋亡的影响

王学辉¹, 李超¹, 项明源¹, 张同星², 张辉³, 周强³, 张涛³

(1 天津医科大学一中心临床学院 300070 天津市; 2 天津医科大学研究生院 天津医院 300211 天津市;

3 天津市第一中心医院骨科 300192 天津市)

【摘要】目的:探讨 AMPA 谷氨酸受体亚基-2 (AMPA-GluR2) 在大鼠脊髓损伤急性期对少突胶质前体细胞 (oligodendrocyte precursor cells, OPCs) 凋亡的影响。**方法:**60 只 SD 雌性大鼠随机分为假手术组 (Sham 组, $n=15$), 脊髓损伤组 (SCI 组, $n=15$), AMPA 受体拮抗剂 NBQX 组 ($n=15$) 和 Ca^{2+} 通透性 AMPA 受体拮抗剂 JSTx 组 ($n=15$)。SCI 组、NBQX 组和 JSTx 组应用 Allen's 打击法建立大鼠脊髓 (T9) 损伤模型。采用 BBB 评分评估各组大鼠脊髓损伤后运动功能恢复情况。HE 染色观察脊髓损伤后病理学改变。免疫组化和免疫蛋白印迹 (Western blot) 法检测 AMPA-GluR2 在各组大鼠脊髓组织中的表达情况。免疫荧光标记 OPCs 并应用 TUNEL 法检测其在各组中的凋亡情况。**结果:**SCI 组 BBB 评分较假手术组降低 ($P<0.05$), 脊髓损伤后 3d NBQX 组 (3.60 ± 0.65) 和 JSTx 组 (3.80 ± 0.76) BBB 评分较 SCI 组 (1.50 ± 0.35) 高 ($P<0.05$), NBQX 组和 JSTx 组之间无差异 ($P>0.05$)。HE 染色结果显示 SCI 组和两个拮抗剂组的脊髓组织均存在损伤, 脊髓组织腹侧和腹外侧白质病理学损伤评分显示 NBQX 组 (1.60 ± 0.42) 与 JSTx 组 (1.50 ± 0.35) 评分较 SCI 组 (2.30 ± 0.20) 低 ($P<0.05$)。AMPA-GluR2 免疫组化结果显示, 脊髓损伤后 3d SCI 组阳性细胞数 (6.15 ± 0.52) 较假手术组 (13.25 ± 0.21) 明显减少 ($P<0.05$), NBQX 组 (2.10 ± 0.42) 和 JSTx 组 (4.45 ± 0.54) 阳性细胞数较 SCI 组少 ($P<0.05$), NBQX 组阳性细胞数最少, 与 JSTx 组比较有显著性差异 ($P<0.05$)。Western blot 结果显示, 脊髓损伤后 3d SCI 组和两个拮抗剂组 AMPA-GluR2 表达水平均较假手术组 (0.94 ± 0.07) 降低 ($P<0.05$), NBQX 组 (0.37 ± 0.07) 及 JSTx 组 (0.54 ± 0.12) 较 SCI 组 (0.69 ± 0.03) 低 ($P<0.05$), 且 NBQX 组 AMPA-GluR2 表达水平最低 ($P<0.05$)。免疫荧光显示, 脊髓损伤后 3d 各组大鼠脊髓组织均存在免疫荧光标记的 OPCs; TUNEL 法检测 OPCs 凋亡指数表明, NBQX 组 (0.21 ± 0.02) 和 JSTx 组 (0.17 ± 0.01) 较 SCI 组 (0.42 ± 0.02) 均降低 ($P<0.05$), 且 JSTx 组较 NBQX 组降低 ($P<0.05$)。**结论:**大鼠脊髓损伤急性期 OPCs 凋亡与脊髓组织中 AMPA-GluR2 表达下降有关。

【关键词】脊髓损伤; AMPA 受体; 谷氨酸受体亚基 2; NBQX; JSTx; 少突胶质前体细胞; 凋亡

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2018.10.09

中图分类号: R683.2, Q786 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2018)-10-0925-08

Effect of AMPA-GluR2 on apoptosis of oligodendrocyte precursor cells in acute stage of spinal cord injury in rats/WANG Xuehui, LI Chao, XIANG Mingyuan, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2018, 28(10): 925-932

【Abstract】Objectives: To investigate the effect of AMPA-glutamate receptor subunit-2 (AMPA-GluR2) on the apoptosis of oligodendrocyte precursor cells (OPCs) in the acute phase of spinal cord injury in rats. **Methods:** 60 female SD rats were randomly divided into sham operation group (Sham group, $n=15$), spinal cord injury group (SCI group, $n=15$), AMPA receptor antagonist NBQX group ($n=15$) and Ca^{2+} permeability AMPA receptor antagonist JSTx group ($n=15$). Allen's method was used in SCI group, NBQX group and JSTx group to establish a rat spinal cord (T9) injury model using. BBB score was used to evaluate the recovery of motor function after spinal cord injury in rats. The pathological changes after spinal cord injury were observed by HE staining. The expression of AMPA-GluR2 in spinal cord tissue of each group was detected by immunohistochem-

基金项目: 天津市卫计委科技基金 (2015KZ036)

第一作者简介: 男 (1992-), 硕士研究生, 研究方向: 脊柱外科

电话: (022)23626353 E-mail: NMGwang602@163.com

通讯作者: 周强 E-mail: osdoctorzq@126.com; 张涛 E-mail: Zht70@sina.com

istry and Western blot. The OPCs was labeled with immunofluorescence and its apoptosis in each group was detected by TUNEL method. **Results:** The BBB score of SCI group was lower than that of Sham group ($P < 0.05$), the BBB scores of NBQX group (3.60 ± 0.65) and JSTx group (3.80 ± 0.76) were higher than that of SCI group (1.50 ± 0.35) on the 3rd day after spinal cord injury ($P < 0.05$) and there was no difference between NBQX group and JSTx group ($P > 0.05$). The results of HE staining showed that there were spinal cord injuries in SCI group and two antagonist groups, the ventral and ventrolateral white matter pathological damage scores of spinal cord tissue showed that the scores of NBQX group (1.60 ± 0.42) and JSTx group (1.50 ± 0.35) were lower than that of SCI group (2.30 ± 0.20) ($P < 0.05$). The results of AMPA-GluR2 immunohistochemistry showed that the number of positive cells in SCI group (6.15 ± 0.52) was significantly lower than that in Sham group (13.25 ± 0.21) 3 days after spinal cord injury ($P < 0.05$), the number of positive cells in NBQX group (2.10 ± 0.42) and JSTx group (4.45 ± 0.54) was lower than that in SCI group ($P < 0.05$) and the number of positive cells in NBQX group was the least, the number of positive cells in JSTx group was higher than that in the NBQX group ($P < 0.05$). Western blot results showed that the expression of AMPA-GluR2 in SCI group and two antagonist groups was lower than that in Sham group (0.94 ± 0.07) 3 days after spinal cord injury ($P < 0.05$), the expression level of AMPA-GluR2 in NBQX group (0.37 ± 0.07) was lower than that in JSTx group (0.54 ± 0.12) ($P < 0.05$), and the expression level of AMPA-GluR2 was the lowest in the NBQX group. Immunofluorescence showed that positive-labeled OPCs were presented in the spinal cord of rats in each group 3 days after spinal cord injury, the apoptosis index of OPCs in NBQX group and JSTx group was lower than that in SCI group (0.42 ± 0.02) by TUNEL method ($P < 0.05$), and the apoptotic index of JSTx group (0.17 ± 0.01) was lower than that of NBQX group (0.21 ± 0.02) ($P < 0.05$). **Conclusions:** The apoptosis of OPCs in the acute stage of spinal cord injury in rats is related to the decrease of AMPA-GluR2 expression in spinal cord.

[Key words] Spinal cord injury; AMPA receptor; Glutamate receptor subunit 2; NBQX; JSTx; Oligodendrocyte precursor cells; Apoptosis

[Author's address] First Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin, 300070, China

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是临床常见的致伤残原因之一。SCI后局部微环境中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等炎症因子通过活化星形胶质细胞,破坏谷氨酸平衡,诱发少突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cells, OPCs)产生兴奋性细胞毒性, Ca^{2+} 内流导致增殖的OPCs出现凋亡^[1,2],因此抑制谷氨酸的毒性作用对抑制SCI后OPCs凋亡起着重要作用。促进SCI后增殖的OPCs存活并向少突胶质细胞(oligodendrocytes, OLs)分化,使残留神经轴突髓鞘再生,能够最大限度地发挥残留神经纤维的作用,改善神经功能恢复^[3]。研究表明OPCs表达AMPA(氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸)受体,并对其敏感,AMPA受体介导的谷氨酸毒性在OLs凋亡过程中起关键作用^[4]。AMPA受体是一种谷氨酸受体(Glutamate receptors, GluR),它是由GluR1-R4四种亚基中的一种或多种围绕一个亲水性的中心孔构成的五聚体^[5],其中含有GluR2的AMPA受体对 Ca^{2+} 不通透(即 Ca^{2+} 不通

透性AMPA受体, CIP-AMPA), 而不含GluR2的AMPA受体则具有 Ca^{2+} 通透的特性^[6,7](即 Ca^{2+} 通透性AMPA受体, CP-AMPA)。Grossman等研究表明,AMPA-GluR1-R4亚基之间的半衰期为24h^[8],当脊髓发生损伤时,GluR1和GluR3一定程度上会取代GluR2,导致GluR2相对减少^[9,10],CP-AMPA表达增高。研究表明,AMPA受体拮抗剂NBQX[6-硝基-7-氨磺酰基-(f)-喹啉-2,3-二酮]可以有效减少谷氨酸导致的OLs凋亡^[6]。CP-AMPA在OPCs增殖、分化及凋亡中发挥重要作用^[11],CP-AMPA拮抗剂JSTx(Joro Spider toxin, 蜘蛛毒素)可以有效抑制氧葡萄糖剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)诱导的OPCs凋亡^[12]。然而AMPA-GluR2是否对SCI后急性期OPCs凋亡有影响,目前尚无定论。本研究通过大鼠SCI后给予NBQX和JSTx两种拮抗剂进行干预实验,观察AMPA-GluR2表达量变化与大鼠SCI急性期OPCs凋亡的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

山羊血清(Gibco 公司,美国);一抗:多克隆兔抗 AMPA - GluR II & III (Chemicon, AB1506), 单克隆鼠抗 A2B5 (Abcam, ab53521, OPCs 特异性标志物);二抗:酶标山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物(中杉金桥, PV-6000), 羊抗小鼠 IgG-FITC(异硫氰酸荧光素, Solarbio, SF131); DAPI 核染料(Sigma 公司, 美国); NBQX (Sigma, N183), JSTx (Sigma, N193); 原位细胞凋亡检测(TUNEL)试剂盒(Roche 公司, 德国); Nanodrop 分光光度计(Thermo 公司, 美国), 正置荧光显微镜(Olympus 公司, 日本), 冰冻切片机(Leica, 德国)。

1.2 动物分组与模型制作

SPF级健康雌性 SD 大鼠 60 只(购于北京军事医学研究所), 体重 200~250g。60 只大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、脊髓损伤组(SCI 组)、AMPA 受体拮抗剂 NBQX 组及 Ca^{2+} 通透性 AMPA 受体拮抗剂 JSTx 组, 每组 15 只。术前禁食 12h, 自由饮水。10%水合氯醛(4ml/kg)腹腔麻醉。假手术组仅行 T9 节段椎板切除术, 剩余三组均采用 Allen's 打击法^[13,14]建立大鼠脊髓(T9)损伤模型, 即在暴露的脊髓硬脊膜上以 10g×3cm 的能量撞击脊髓, 并立即移开。模型制作成功的标志为:大鼠尾巴痉挛性摆动, 双下肢及躯体回缩样扑动, 双下肢呈迟缓性瘫痪。用生理盐水溶解拮抗剂, NBQX^[15,16] (20mg/kg), JSTx^[12] (1mg/kg) 损伤后立即经腹腔注射^[17], 8h 后等剂量再次注射, 连续给药 3d。SCI 组和假手术组术后立即、术后 8h 分别经腹腔注射等量生理盐水, 连续注射 3d。

1.3 神经功能学评分

为了评估术后运动功能恢复状况, 从每组实验动物中随机抽取 5 只大鼠在 SCI 后 1d、3d、7d 进行 BBB 运动评分^[18]。评分范围为 0~21 分, 其中 0 分代表后肢无运动, 21 分代表后肢正常运动。评估时将大鼠置于宽阔场地自由活动 5min, 观察其自发性后肢运动。评分记录由不参与动物分组与拮抗剂干预但熟悉评分标准的 2 位观察者同时独立进行, 二者评分结果取平均值为每只大鼠的最终得分。

1.4 脊髓样本取材

各组实验动物 SCI 后 1d、3d、7d 用 10%水合氯醛过量麻醉后, 快速开胸暴露心脏, 经左心室插管至升主动脉, 并剪开右心耳, 灌入生理盐水

250ml, 待流出液清亮后, 换用 4%多聚甲醛 250ml 继续灌注, 大鼠尾巴变硬后迅速取出 T8~T10 段脊髓(约 1.2cm), 以损伤位点为中心向头、尾侧各取约 0.6cm:一段脊髓固定于 4% 多聚甲醛中, 石蜡包埋后行 HE 染色及免疫组化;另一段脊髓标本置于 30%蔗糖 buffer 4℃保存过夜, OCT 包埋后迅速冻存于 -80℃冰箱备用免疫荧光检测。同样方法取出 T8~T10 段脊髓迅速冻存于 -80℃冰箱备用 Western blot 检测。

1.5 HE 染色

石蜡包埋标本以 4μm 连续横断面切片, 待切出完整脊髓组织后, 每组样本连续切片 3 张行 HE 染色, 显微镜下观察各组大鼠脊髓组织病理学改变。用 Image J 软件测量脊髓白质空泡化面积, 根据脊髓损伤后脊髓腹侧和腹外侧白质空泡化程度进行病理学损伤分级^[4]: 0 分, 正常(没有看到空泡); 1 分, 轻度损伤(受影响区域 < 10%); 2 分, 中度损伤(10%至 50%受影响区域); 3 分, 严重损伤(受影响区域 > 50%)。每组 HE 染色切片左右侧组织病理损伤得分的平均值为每只大鼠的最终结果, 结果以均数±标准差表示。

1.6 免疫组化染色

石蜡切片常规脱蜡复水, 3% H_2O_2 封闭 10min, 修复抗原, 5%山羊血清封闭非特异性结合位点 1h, 一抗(多克隆兔抗 AMPA-GluR II & III, 1:200) 4℃过夜, 二抗室温下孵育 1h, 滴加二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)溶液显色, 苏木素复染, 脱水透明封片后光镜观察结果并拍照。免疫组化阳性细胞的细胞膜及细胞质呈棕黄色。结果判读:每张切片取 4 个不重叠的高倍视野, 计数每个视野阳性细胞数, 结果以均数±标准差表示。

1.7 Western blot

大鼠脊髓组织研磨后加入 RIPA 裂解液, 待充分裂解后, 于 4℃下 12000r/min 离心 15min, 取上清液。用 BCA 法测定蛋白浓度, 变性后进行 SDS-PAGE 电泳, 转至 PVDF 膜, 用 5%脱脂奶粉室温封闭 60min, 加一抗(兔抗 AMPA-GluR2 与 β -actin, 1:1000), 4℃孵育过夜。TBST 洗涤后 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:2500)室温孵育 1h, 混合等体积的化学发光液与 PVDF 膜反应, 于 G:BOX 中曝光。用 Image J 软件分析 AMPA-GluR2 与 β -actin 条带灰度值, 后者作为内参照;之后得到目的条带灰度值和相应的内参照条带灰度值的比

值,即为该目的蛋白表达量的半定量结果。

1.8 免疫荧光

冰冻切片固定后,5%山羊血清封闭 1h,一抗(鼠抗 A2B5,1:1000)4℃过夜,二抗(羊抗小鼠 IgG-FITC,1:500)室温孵育 1h,滴加 TUNEL 反应混合液,湿盒内避光 37℃孵育 1h,滴加 DAPI 溶液,荧光封片剂封片,于正置荧光显微镜下观察并摄取图片。结果判读:将 A2B5 阳性/DAPI 定义为 OPCs 细胞数,将 A2B5 阳性/TUNEL 阳性定义为 OPCs 凋亡细胞数,凋亡指数(Apoptosis index)=OPCs 凋亡细胞数/OPCs 细胞数。每张切片取 4 个不重叠的高倍视野,计数每个视野阳性细胞数,结果以均数±标准差表示。

1.9 统计学分析

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ (均数±标准差)表示,采用 22.0 版 SPSS 软件,进行 *t* 检验及单因素方差分析(One-way ANOVA)事后 Tukey 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物后肢神经功能评分

使用 BBB 评分在 SCI 后 1d、3d、7d 评估大鼠运动功能恢复的情况(表 1)。假手术组在术后 7d 恢复正常行走功能, BBB 评分为 21.00 分。SCI 组术后即刻观察无后肢自发性运动,表明成功建立脊髓损伤模型,SCI 组大鼠术后 7d 内 BBB 评分逐渐增高,且始终低于假手术组($P < 0.05$)。SCI 后 3d 两个拮抗剂组的 BBB 评分均较 SCI 组升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而 NBQX 拮抗剂组较 JSTx 拮抗剂组 BBB 评分差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 组织病理学结果

HE 染色结果(图 1)显示,假手术组脊髓灰白质分界清晰,结构致密,腹角灰质神经细胞呈多角形,核仁明显,腹侧及腹外侧白质神经纤维排列有序;SCI 组脊髓灰质可见出血灶,腹角灰质神经元肿胀、固缩,溶解甚至消失,腹侧及腹外侧白质结构疏松化及空泡化明显;NBQX 拮抗剂组与 JSTx 拮抗剂组腹侧及腹外侧白质疏松化及空泡化程度均较 SCI 组减轻,组织病理学损伤评分较 SCI 组均低,差异均有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。

2.3 免疫组化结果

各组脊髓组织免疫组化结果(图 2)显示,假

表 1 各组实验动物不同时间点 BBB 评分结果($n=5, \bar{x} \pm s$)

Table 1 BBB scores of different time points of experimental animals in each group

时间 (天) Time (Day)	假手术组 Sham operation group	SCI 组 SCI group	NBQX 拮 抗剂组 NBQX antagonist group	JSTx 拮抗 剂组 JSTx antagonist group
1	20.50±0.35	0.40±0.42	0.80±0.45	0.90±0.22
3	20.90±0.20	1.50±0.35 ^①	3.60±0.65 ^②	3.80±0.76 ^②
7	21.00±0.00	6.50±0.61 ^①	8.90±0.82 ^②	9.50±0.79 ^②

注:①与假手术组比较, $P < 0.05$; ②与 SCI 组比较, $P < 0.05$

Note: ①Compared with Sham operation group, $P < 0.05$; ②Compared with SCI group, $P < 0.05$

手术组阳性细胞表现为神经胶质细胞膜及胞浆呈现棕黄色淡染,主要位于脊髓腹侧及腹内外侧白质;SCI 后 3d SCI 组白质空泡化明显,阳性细胞数较假手术组明显减少($P < 0.05$),说明机械性损伤后脊髓组织 GluR2 表达减少, Ca^{2+} 内流增多导致脊髓白质脱髓鞘及空泡化;NBQX 组阳性细胞数和 JSTx 组阳性细胞数均较 SCI 组少 ($P < 0.05$,表 2),且 NBQX 组阳性细胞数最少。JSTx 组阳性细胞数较 NBQX 组多,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 Western blot 结果

Western blot 结果(图 3)显示,SCI 后 3d SCI 组脊髓组织中 AMPA-GluR2 表达水平较假手术组降低 ($P < 0.05$);NBQX 组和 JSTx 组的 AMPA-GluR2 表达水平较 SCI 组均降低($P < 0.05$);由于 AMPAR 拮抗剂 NBQX 与谷氨酸竞争性结合 AMPA-GluR1-R4,因此 NBQX 组 AMPA-GluR2 表达水平最低(表 2),且 JSTx 组 AMPA-GluR2 表达水平高于 NBQX 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.5 免疫荧光结果

免疫荧光结果(图 4)显示,各组脊髓组织中均可见特异性抗体 A2B5 标记的 OPCs,结合 TUNEL 法显示,假手术组 OPCs 凋亡指数较少,SCI 组 OPCs 凋亡指数较假手术组升高($P < 0.05$),NBQX 组和 JSTx 组 OPCs 凋亡指数均较 SCI 组减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),且 JSTx 组 OPCs 凋亡指数低于 NBQX 组($P < 0.05$,表 2),结果显示经 AMPAR 拮抗剂 NBQX 和 CP-AMPA 拮抗剂 JSTx 干预可以有效减少 SCI 后脊髓组织中 OPCs 的凋亡。

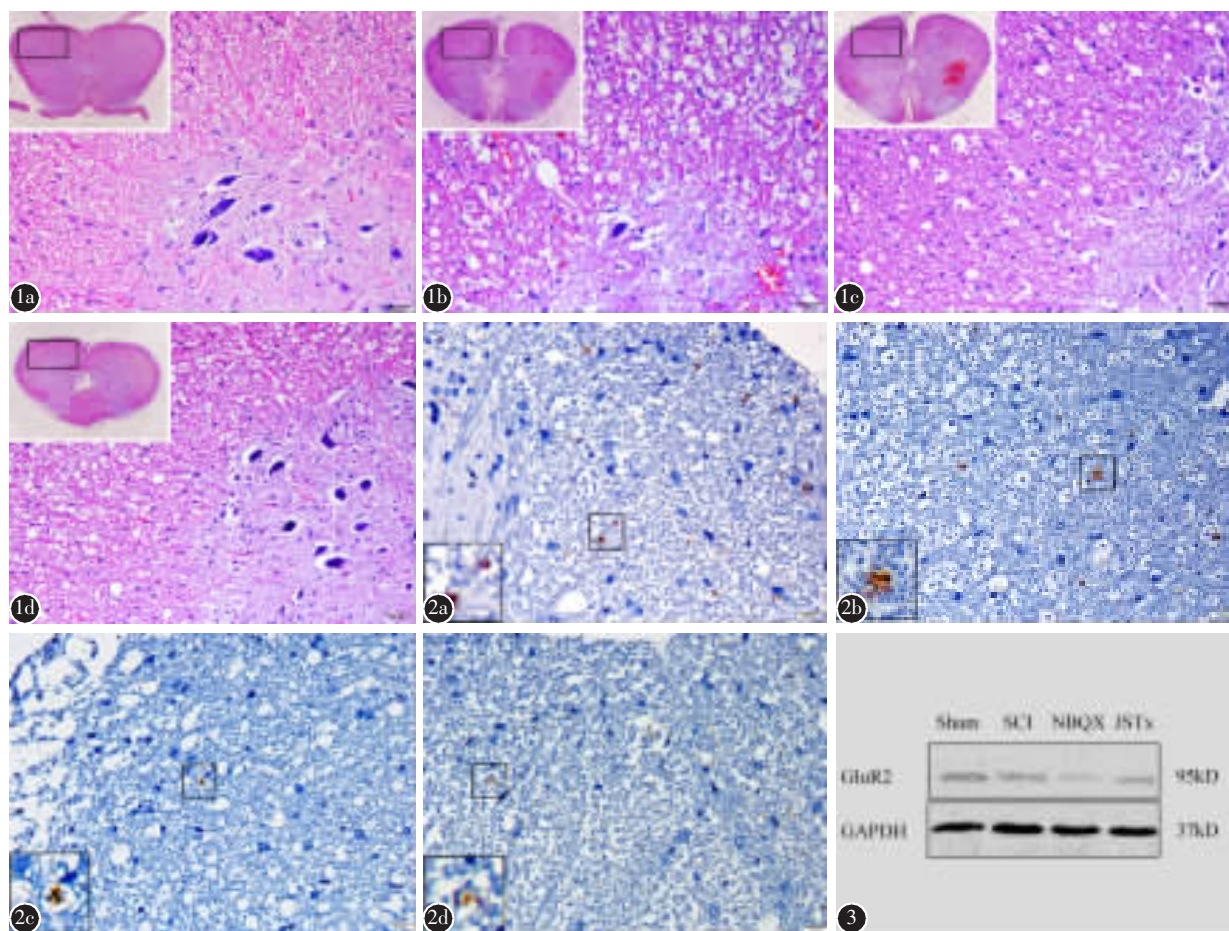


图 1 SCI 后 3d 各组大鼠脊髓组织病理学变化(HE $\times 100$, 标尺: $50\mu\text{m}$) **a** 假手术组, 脊髓灰白质的分界清楚, 细胞形态正常 **b** SCI 组, 脊髓灰质可见出血灶, 腹侧及腹外侧白质结构疏松化及空泡化明显 **c、d** NBQX 组(**c**)和 JSTx 组(**d**), 腹侧及腹外侧白质结构疏松化及空泡化较 SCI 组减轻 **图 2** SCI 后 3d 各组脊髓组织 AMPA-GluR2 的免疫组化结果($\times 200$, 标尺: $20\mu\text{m}$) **a** 假手术组, 脊髓腹侧及腹内外侧白质神经胶质细胞膜及细胞质呈现棕黄色淡染 **b** SCI 组脊髓白质空泡化明显, 阳性细胞数较假手术组减少 **c** NBQX 组阳性细胞数最少 **d** JSTx 组阳性细胞数较 NBQX 拮抗剂组增多 **图 3** Western blot 检测 SCI 后 3d 各组脊髓组织中 AMPA-GluR2 的表达水平: 假手术组(Sham 组)脊髓组织中 AMPA-GluR2 表达水平正常, SCI 组较假手术组减低, NBQX 组和 JSTx 组较 SCI 组均降低, 且 NBQX 组最低

Figure 1 Pathological changes of spinal cord tissue of rats in each group 3 days after SCI(HE $\times 100$, bar: $50\mu\text{m}$) **a** Sham operation group, the gray matter and white matter of the spinal cord was clear defined, and the cell morphology was normal **b** SCI group, hemorrhagic foci were found in the gray matter of the spinal cord, and the ventral and ventrolateral white matter structure was loose and vacuolated **c, d** NBQX group (**c**) and JSTx group (**d**), ventral and ventrolateral white matter structure loosening and vacuolization were less than SCI group **Figure 2** Immunohistochemical results of AMPA-GluR2 in spinal cord tissue of each group 3 days after SCI ($\times 200$, bar: $20\mu\text{m}$) **a** Sham operation group, the glial cell membrane and cytoplasm of the ventral and ventrolateral white matter of the spinal cord showed brownish-yellow staining **b** SCI group, the white matter vacuolization was obvious, and the number of positive cells was lower than that in Sham operation group **c** NBQX group, the number of positive cells was the least **d** JSTx group, the number of positive cells increased compared with NBQX group **Figure 3** Western blot analysis of AMPA-GluR2 expression in spinal cord tissue of each group 3 days after SCI: Sham operation group, the expression level of AMPA-GluR2 in spinal cord tissue was normal; SCI group, the expression level of AMPA-GluR2 was lower than that in Sham operation group; NBQX group and JSTx group, the expression level of AMPA-GluR2 was lower than that in SCI group, and the expression level of AMPA-GluR2 was the lowest in NBQX group

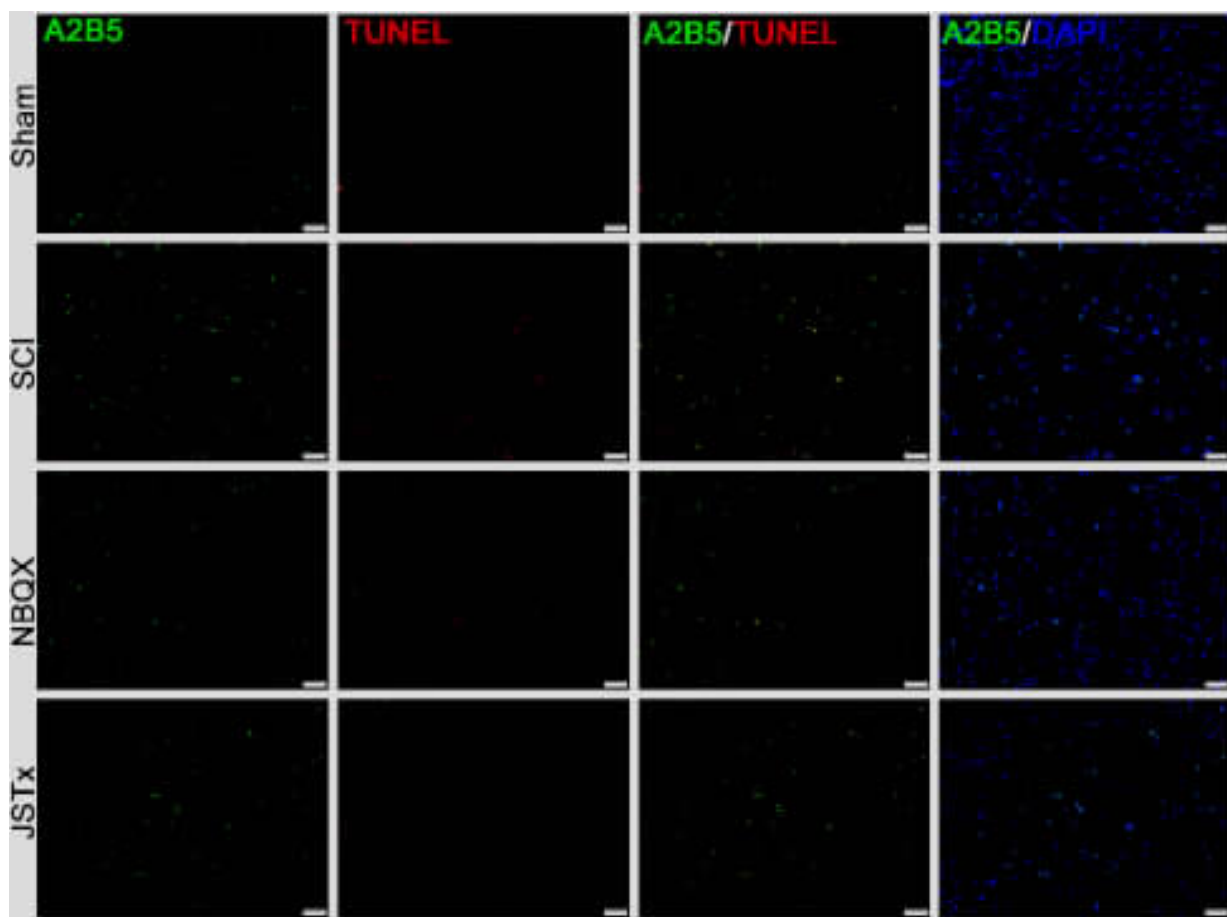


图 4 SCI 后 3d 各组脊髓组织中 OPCs 凋亡的免疫荧光结果(绿色荧光:A2B5 抗体特异性标记的 OPCs;红色荧光:TUNEL 法检测凋亡细胞;蓝色荧光:DAPI 法显示细胞核,×100, 标尺:50μm) Sham 组,OPCs 凋亡较少;SCI 组,OPCs 凋亡较 Sham 组明显增多;NBQX 组和 JSTx 组 OPCs 凋亡较 SCI 组减少,并且 JSTx 组 OPCs 凋亡较 NBQX 组减少

Figure 4 Immunofluorescence results of OPCs apoptosis in spinal cord tissue of each group 3 days after SCI(green fluorescence: OPCs-specific labeled antibody A2B5; red fluorescence: apoptotic cells detected by TUNEL method; blue fluorescence: DAPI method showed nucleus, ×100, bar: 50μm) Sham group, the apoptosis of OPCs was less; SCI group, the apoptosis of OPCs was significantly higher than that in Sham group; The apoptosis of OPCs in NBQX group and JSTx group was lower than that in SCI group. The apoptosis of OPCs in JSTx group was lower than that in NBQX group

表 2 SCI 后 3d 各组大鼠脊髓组织实验结果

($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Experimental results of spinal cord tissue of rats in each group 3 days after SCI

	假手术组 Sham operation group	SCI组 SCI group	NBQX组 NBQX group	JSTx组 JSTx group
病理损伤评分 Pathological damage score	0.20±0.27	2.30±0.20 ^①	1.60±0.42 ^②	1.50±0.35 ^②
免疫蛋白印迹 Western blot	0.94±0.07	0.69±0.03 ^①	0.37±0.07 ^②	0.54±0.12 ^{②③}
免疫组化 immunohistochemical	13.25±0.21	6.15±0.52 ^①	2.10±0.42 ^②	4.45±0.54 ^{②③}
OPCs凋亡指数 Apoptosis index of OPCs	0.13±0.01	0.42±0.02 ^①	0.21±0.02 ^②	0.17±0.01 ^{②③}

注:①与假手术组比较 $P<0.05$;②与 SCI 组比较 $P<0.05$;③与 NBQX 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with Sham operation group, $P<0.05$; ②Compared with SCI group, $P<0.05$; ③Compared with NBQX group, $P<0.05$

3 讨论

随着交通工具广泛应用,城镇化建设不断深入和老龄化社会的到来,SCI 临床发病率逐年升高。SCI 后炎症级联反应和各种组织因子对脊髓造成不可逆的继发性损伤,严重影响患者日常生活及运动功能,给患者、家庭及社会带来沉重的负担。中枢神经系统中未分化的 OPCs 约占中枢神经细胞总数的 5%~8%^[19],其在正常生理状态下能够增殖并分化为成髓鞘 OLs,使神经电脉冲的跳跃传导得以顺利进行;但在 SCI 急性期,迅速增殖的 OPCs 并未完全分化为成髓鞘 OLs,且随着病情进展而逐渐减少及凋亡^[20]。目前,SCI 急性期 OPCs 的凋亡机制并未完全清楚,且缺乏对 OPCs 凋亡干预的有效手段,严重制约了 SCI 治疗的进展。因此,探索 SCI 急性期 OPCs 凋亡的机制对减少 OPCs 凋亡,促进 SCI 后神经功能修复,以及开发新型 SCI 治疗策略具有重要的临床意义。

既往研究表明,SCI 后第 1 天 OLs 大量凋亡,巨噬细胞及活化的小胶质细胞在 SCI 急性期(SCI 后 3d 内)吞噬坏死的髓鞘及凋亡的细胞使白质呈空泡化结构^[21],与此同时 OPCs 增殖在 SCI 后第 3 天出现高峰^[22]。由于星型胶质细胞活化,神经胶质细胞运输谷氨酸能力下降,破坏谷氨酸动态平衡;过量的谷氨酸激活 OPCs 上的离子型谷氨酸受体,诱发谷氨酸兴奋性毒性, Ca^{2+} 内流过增使得 SCI 后增殖的 OPCs 凋亡,无法分化为成髓鞘 OLs,导致轴突髓鞘修复失败。Villanueva 等研究表明,大鼠 SCI 后伤残的原因主要取决于轴突脱髓鞘和脊髓白质腹侧和腹外侧区域病变的严重程度^[4,23]。本研究在大鼠脊髓损伤模型的基础上,选用在 SCI 过程中对 Ca^{2+} 内流起关键作用的 AMPA-GluR2 作为观察指标,通过观察 AMPA-GluR1-R4 拮抗剂 NBQX 和 AMPA-GluR1/R3/R4 拮抗剂 JSTx 对 SCI 后 AMPA-GluR2 表达的影响,论证 AMPA-GluR2 的表达变化与大鼠 SCI 急性期 OPCs 凋亡的关系。

实验结果显示,造模后 3d SCI 组脊髓组织的腹侧及腹外侧白质空泡化程度较假手术组明显加重,组织病理损伤评分较假手术组升高($P<0.05$),且 BBB 评分较假手术组显著降低($P<0.05$),说明大鼠 SCI 后轴突脱髓鞘和脊髓白质腹侧和腹外侧空泡化严重影响大鼠后肢运动功能;SCI 组 AMPA-GluR2 表达水平在免疫组化和 Western

blot 较假手术组均降低表明,SCI 后谷氨酸浓度增高,激活 OPCs 上的 AMPA 受体,CP-AMPA 表达增高,GluR1 和 GluR3 一定程度上取代 GluR2,使得 GluR2 表达相对减少, Ca^{2+} 通透性增加,进而导致 SCI 组 A2B5 免疫荧光标记的 OPCs 凋亡指数高于假手术组($P<0.05$)。

为进一步验证 AMPA-GluR2 对脊髓损伤后 OPCs 凋亡的影响作用,本实验应用 AMPAR 拮抗剂 NBQX 和 CP-AMPA 拮抗剂 JSTx 进行干预实验。结果显示在应用 NBQX 拮抗剂后 3d,脊髓组织腹侧及腹外侧白质空泡化程度较 SCI 组减轻,组织病理损伤评分较 SCI 组降低($P<0.05$),BBB 评分较 SCI 组升高;由于 AMPAR 拮抗剂 NBQX 与谷氨酸竞争性结合 GluR1-R4,所以 NBQX 拮抗剂组 AMPA-GluR2 表达水平在免疫组化和 Western blot 中均最低,且均较 SCI 组降低($P<0.05$);GluR1-R4 被 NBQX 竞争性结合后,谷氨酸兴奋性毒性作用减弱, Ca^{2+} 内流减少,因此 NBQX 拮抗剂组 A2B5 免疫荧光标记 OPCs 的凋亡指数低于 SCI 组($P<0.05$)。研究结果同时表明在应用 JSTx 拮抗剂后 3d,由于 CP-AMPA 拮抗剂 JSTx 竞争性结合 GluR1/R3/R4,使得 GluR1 和 GluR3 无法取代 GluR2,因此 JSTx 拮抗剂组的 AMPA-GluR2 表达水平在免疫组化和 Western blot 中均较 NBQX 组升高($P<0.05$);GluR1/R3/R4 被 JSTx 竞争性结合后,含有 GluR2 的 CP-AMPA 阻止 Ca^{2+} 内流,因此 JSTx 拮抗剂组 A2B5 免疫荧光标记 OPCs 的凋亡指数低于 NBQX 组($P<0.05$)。与此同时,JSTx 拮抗剂组大鼠脊髓组织的腹侧及腹外侧白质空泡化程度较 SCI 组减轻,组织病理损伤评分较 SCI 组降低($P<0.05$),BBB 评分较 SCI 组升高,而较 NBQX 拮抗剂组差异无统计学意义($P>0.05$)。综上所述,AMPA 拮抗剂 NBQX 可以有效与谷氨酸竞争性结合 OPCs 上的 AMPA-GluR1-R4,而 CP-AMPA 拮抗剂 JSTx 仅拮抗 GluR1/R3/R4,在 SCI 后阻止 GluR1 和 GluR3 对 GluR2 的取代,从而减少 Ca^{2+} 内流,降低 OPCs 凋亡,使 SCI 后运动功能恢复得到改善。

本研究通过 BBB 评分,脊髓腹侧及腹外侧白质病理学变化及组织病理学损伤评分,AMPA-GluR2 在免疫组化和 Western blot 中的表达水平,A2B5 免疫荧光标记 OPCs 结合 TUNEL 法观察 OPCs 凋亡指数,表明 SCI 后 OPCs 凋亡与

AMPA-GluR2 表达水平降低有关。通过干预措施稳定 AMPA-GluR2 的表达量,从而减少谷氨酸兴奋性毒性引起的 Ca^{2+} 内流,改善 OPCs 生存的微环境,减少 OPCs 凋亡进而发挥积极的神经修复作用。在 SCI 急性期,该机制将为细胞移植时机选择或药物干预手段治疗 SCI 提供一个新的参考。但 AMPA 拮抗剂 NBQX 及 CP-AMPA 拮抗剂 JSTx 影响 AMPA-GluR2 表达水平的信号通路机制及其他作用机制有待深入研究。

4 参考文献

- Liu Y, Chen Y, Du WT, et al. GluR3B Ab's induced oligodendrocyte precursor cells excitotoxicity via mitochondrial dysfunction[J]. Brain Res Bull, 2017, 130: 60–66.
- Huang S, Tang C, Sun S, et al. Protective effect of electroacupuncture on neural myelin sheaths is mediated via promotion of oligodendrocyte proliferation and inhibition of oligodendrocyte death after compressed spinal cord injury [J]. Mol Neurobiol, 2015, 52(3): 1870–1881.
- Kawabata S, Takano M, Numasawa-Kuroiwa Y, et al. Grafted human iPS cell-derived oligodendrocyte precursor cells contribute to robust remyelination of demyelinated axons after spinal cord injury[J]. Stem Cell Reports, 2016, 6(1): 1–8.
- Kanellopoulos GK, Xu XM, Hsu CY, et al. White matter injury in spinal cord ischemia: protection by AMPA/kainate glutamate receptor antagonism[J]. Stroke, 2000, 31(8): 1945–1952.
- Bowie D. Redefining the classification of AMPA-selective ionotropic glutamate receptors[J]. J Physiol, 2012, 590(1): 49–61.
- Wang Y, Liu L, Chen H, et al. Influence of the epileptiform discharge microenvironment on the differentiation of oligodendrocyte precursor cells[J]. Brain Res, 2018, 1679: 53–63.
- Kew JN, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology [J]. Psychopharmacology (Berl), 2005, 179(1): 4–29.
- Grossman SD, Rosenberg LJ, Wrathall JR. Relationship of altered glutamate receptor subunit mRNA expression to acute cell loss after spinal cord contusion[J]. Exp Neurol, 2001, 168(2): 283–289.
- Steiner P, Sarria JC, Glauser L, et al. Modulation of receptor cycling by neuron-enriched endosomal protein of 21 kD[J]. J Cell Biol, 2002, 157(7): 1197–1209.
- Grossman SD, Wolfe BB, Yasuda RP, et al. Changes in NMDA receptor subunit expression in response to contusive spinal cord injury[J]. J Neurochem, 2000, 75(1): 174–184.
- Zonouzi M, Renzi M, Farrant M, et al. Bidirectional plasticity of calcium-permeable AMPA receptors in oligodendrocyte lineage cells[J]. Nat Neurosci, 2011, 14(11): 1430–1438.
- Deng W, Rosenberg PA, Volpe JJ, et al. Calcium-permeable AMPA/kainate receptors mediate toxicity and preconditioning by oxygen-glucose deprivation in oligodendrocyte precursors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(11): 6801–6806.
- Duan HQ, Wu QL, Yao X, et al. Nafamostat mesilate attenuates inflammation and apoptosis and promotes locomotor recovery after spinal cord injury [J]. CNS Neurosci Ther, 2018, 24(5): 429–438.
- 林泉, 王振宇, 李建东, 等. 大鼠脊髓损伤节段线粒体自噬蛋白及凋亡因子的表达[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2017, 27(5): 435–440.
- Lippman-Bell JJ, Rakhade SN, Klein PM, et al. AMPA receptor antagonist NBQX attenuates later-life epileptic seizures and autistic-like social deficits following neonatal seizures[J]. Epilepsia, 2013, 54(11): 1922–1932.
- Johnstone JT, Morton PD, Jayakumar AR, et al. Inhibition of NADPH oxidase activation in oligodendrocytes reduces cytotoxicity following trauma[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80975.
- Shen Y, Liu XB, Pleasure DE, et al. Axon-glia synapses are highly vulnerable to white matter injury in the developing brain[J]. J Neurosci Res, 2012, 90(1): 105–121.
- Kim DS, Jung SJ, Lee JS, et al. Rapid generation of OPC-like cells from human pluripotent stem cells for treating spinal cord injury[J]. Exp Mol Med, 2017, 49(7): e361.
- Li N, Leung GK. Oligodendrocyte precursor cells in spinal cord injury: a review and update[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 235195.
- Imai T, Katoh H, Suyama K, et al. Amiloride promotes oligodendrocyte survival and remyelination after spinal cord injury in rats[J]. J Clin Med, 2018, 7(3). pii: E46. doi: 10.3390/jcm7030046.
- Kakulas BA. Neuropathology: the foundation for new treatments in spinal cord injury[J]. Spinal Cord, 2004, 42(10): 549–563.
- Lytle JM, Chittajallu R, Wrathall JR, et al. NG2 cell response in the CNP-EGFP mouse after contusive spinal cord injury[J]. Glia, 2009, 57(3): 270–285.
- Villanueva L, Bernard JF, Le Bars D. Distribution of spinal cord projections from the medullary subnucleus reticularis dorsalis and the adjacent cuneate nucleus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat[J]. J Comp Neurol, 1995, 352(1): 11–32.

(收稿日期:2018-08-03 修回日期:2018-09-07)

(英文编审 郑国权/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)