

经皮电刺激对大鼠脊髓损伤后神经胶质酸性蛋白和神经生长因子表达的影响*

胡成功¹ 李俊岑² 党彦丽² 曾 茜² 刘 超² 张 晓^{2,3}

摘要

目的: 探讨经皮电刺激(TES)对大鼠脊髓损伤(SCI)后神经胶质酸性蛋白(GFAP)和神经生长因子(NGF)表达的影响。

方法: 选用成年雄性SD大鼠72只,随机分为3组:正常组(A组)、TES组(B组)和模型组(C组)。A组8只,B、C组各32只。用Allen法,复制T9脊髓不完全损伤动物模型。B组损伤后给予损伤部位上2cm位置的皮肤及右下肢小腿位置的皮肤TES治疗7d。BBB评分后,运用免疫组织化学染色和蛋白质印迹来检测GFAP、NGF的表达变化。

结果: BBB评分显示,B组与C组相比,评分增加幅度大($P<0.05$),SCI各组BBB评分均明显小于A组($P<0.05$)。免疫组化和Western印迹检测结果显示在实验观察的7d中,B组与C组相比,GFAP的表达减少,在第5天达到最低值($P<0.05$);NGF的表达一直在增加($P<0.05$)。

结论: 在SCI后1—7d内,TES能抑制GFAP的表达,促进内源性NGF的合成,可能创造有利于神经再生的微环境,减少胶质瘢痕的形成。

关键词 脊髓损伤;经皮电刺激;神经胶质酸性蛋白;神经生长因子

中图分类号: R651.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2011)-11-1009-05

The impact of transcutaneous electrical stimulation on the expressions of glial fibrillary acidic protein and nerve growth factor in rats after spinal cord injury/HU Chengong, LI Juncen, DANG Yanli, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(11): 1009—1013

Abstract

Objective: To study the impact of transcutaneous electrical stimulation(TES) on the expressions of glial fibrillary acidic protein(GFAP) and nerve growth factor (NGF) after spinal cord injury(SCI) in rats.

Method: Seventy-two adult male SD rats were randomly divided into 3 groups: normal group(A group, n=8), TES group(B group, n=32) and model group(C group, n=32). The incomplete SCI on T9 model was made by Allen's method. TES group was given electroacupuncture on the acupoint at 2cm above the injury part skin and right shank for 7 days. Immunohistochemistry and Western blotting techniques were used to detect the expressions of GFAP and NGF after BBB evaluation.

Result: The BBB score in TES group increased to 21.00 ($P<0.05$) compared with model group, The BBB scores in each SCI group were significantly less than that in normal group ($P<0.05$). The result of immunohistochemistry and Western blotting within 7 days of the experiment showed in TES group compared with model group, the expression of GFAP reduced and the lowest value appeared at the 5th day ($P<0.05$); NGF expression kept increasing continuously($P<0.05$).

Conclusion: Within 7 days after SCI, TES can inhibit the expression of GFAP and stimulate the synthesis of en-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.11.005

*基金项目:四川省科技厅课题(06J13-023)成都医学院创新实验项目(CX2010021)

1 成都医学院,成都,610083; 2 成都医学院实验技术教研室; 3 通讯作者

作者简介:胡成功,男,本科生在读; 收稿日期:2011-07-06

ogenous NGF. So it may create a favorable microenvironment for nerve regeneration and reduce the formation of glial scar.

Author's address Chengdu Medical College, Rongdu Road 601, Chengdu, Sichuan Province, 610083

Key word spinal cord injury; transcutaneous electrical stimulation; glial fibrillary acidic protein; nerve growth factor

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是严重危害人类健康的脊柱脊髓疾患,常致严重伤残,引起各种并发症,严重影响患者的身心健康和生存质量,甚至危及生命。脊髓损伤后神经的修复是一个世界性难题,而修复是一个漫长的过程,往往是神经还在修复中,主要由星形胶质细胞增生的胶质瘢痕已形成,所以脊髓损伤修复中主要的问题是如何减少瘢痕的形成,促使神经轴突恢复传导。目前减少胶质瘢痕形成有很多方法,如药物治疗、移植、基因干预及电针等,近年发现经皮电刺激(transcutaneous electrical stimulation, TES)有促进周围神经功能恢复的作用。但关于经皮电刺激对脊髓损伤后中枢神经功能恢复方面的研究较少。神经胶质酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)是星形胶质细胞的标志物,神经生长因子(nerve growth factor, NGF)又是由星形胶质细胞分泌的,它们对神经元的存活、生长发育、分化、再生和功能维持起重要作用。为此,本实验以GFAP、NGF为观察指标,制备脊髓损伤模型,运用组织病理学、免疫组化和Western blotting等方法来探讨经皮电刺激对大鼠脊髓损伤后不同时段损伤区及附近GFAP、NGF表达的影响,进而探究经皮电刺激对SCI后早期中枢神经功能恢复的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年SD大鼠72只,雌雄不限,体重 180 ± 20 g,由四川大学实验动物中心提供,分笼饲养,动物饲养环境温度 $20-25^{\circ}\text{C}$ 。随机分为3组:即为A组(正常组, $n=8$)、B组(TES组, $n=32$)和C组(模型组, $n=32$)。B组和C组于造模后第1、3、5、7天分成4小组,每小组8只,所有大鼠均在同一条件下饲养。

1.2 仪器

SZD-II型电子针疗仪(苏州)。

1.3 动物模型制备

B组和C组均用1.5%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉

(用量 45mg/kg 体重),背部剃毛,常规消毒。以T9为中心,纵行切开皮肤及皮下组织,剥离椎旁肌肉并暴露棘突与椎板,咬除T9椎板,模仿Allen法^[1]用自行加工设计的打击装置制备动物模型,即10g冲击棒自25mm高处自由坠落致伤脊髓。缝合伤口,术后协助大鼠排尿,每日早晚各1次,每日注射1ml青霉素和2ml生理盐水,抗菌和补充体液,持续至大鼠取材为止。在此期间注意观察皮肤有无压疮或感染、下肢有无溃烂。而正常对照组大鼠仅切除相应椎板后即缝合伤口。术后小心护理,独笼饲养,每日挤压排尿2次至其排尿反射恢复为止。

1.4 经皮电刺激干预

术后24h起对B组大鼠进行经皮电刺激30min,每天1次,刺激时间为12:00。参数设置:疏密波脉冲电流,电流强度以背部肌肉轻微抖动为宜,刺激频率10Hz,正极接损伤部位上2cm位置的皮肤,负极接右下肢小腿位置的皮肤。A组不干预,但同样固定于和电刺激组相同的固定装置上,时间点与B组相同。

1.5 大鼠后肢运动功能观察

按照Basso DM等^[2]报道的运动功能评分(Basso, Beattie & Bresnahan locomotor rating scale, BBB)方法进行单盲评判。

1.6 取材及切片处理

B组和C组于术后第1、3、5、7天的15:00进行脊髓取材,每个时间点每组各8只鼠(其中6只用于免疫组化检测,2只用于蛋白质印迹检测)。免疫组化取材方法:用过量的麻药戊巴比妥钠进行过度麻醉大鼠,自左心室插管后剪开右心耳,灌注加入肝素钠与普鲁卡因的冰生理盐水直到有澄清液从右心耳流出,再灌注4%多聚甲醛1h。打开椎弓管暴露T7、T9、T11段脊髓段进行取材放入4%多聚甲醛固定。取材结束后,经脱水,运用组织芯片包埋,切片($5\mu\text{m}$),摊片,烤片,备用。蛋白质印迹取材方法:深度麻醉后迅速活体取材,长短一致,加入蛋白裂解

液,冰水浴上充分碾磨 5min, 10000g 离心 30min, 取上清液于冰箱备用。A组第7天取材。

1.7 免疫组织化学染色和蛋白质印迹

非生物素二步法进行 GFAP 和 NGF 免疫组化染色,将各组切片置于二甲苯中脱蜡,梯度酒精水化,行高压热抗原修复,用 3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶,正常山羊血清封闭非特异性抗原。分别滴加 GFAP 抗体(效价 1:500)或 NGF 抗体(效价 1:20), 4℃ 冰箱过夜。次日用兔抗鼠二抗 37℃ 恒温孵育 60min,在切片上加入 DAB- H_2O_2 显色液,室温下反应,显色充分,及时用 0.01mol/L PBS 漂洗;苏木素复染,梯度酒精逐级脱水,二甲苯透明,树胶封片,显微镜观察并拍照。

取上清液用紫外光吸收法测定蛋白质在 280nm 处的吸光度和初步蛋白浓度。电泳分离,洗玻璃板并组装,将其垂直放置,制备 5ml 8% 分离胶溶液,取 3.4 ml 加入玻璃板中,覆盖一层超纯水,分离胶聚合完全后(约 30min),倾出覆盖层,尽可能排除凝胶上液体。制备 2ml 5% 积层胶溶液,加入玻璃板至灌满后迅速插入梳子,待积层胶聚合完全后,置于 4℃ 冰箱中过夜。取出凝胶板,使之减冻至室温。在样品中按 1:4 体积比加入 5XSDS 上样缓冲液配制样品,在 100℃ 加热 5min 以使蛋白质变性。取出梳子,组装电泳槽。用去离子水洗涤加样槽,把凝胶固定于电泳装置上,上下槽各加入 Tris-甘氨酸电极缓冲液。按预定顺序加样 10 μ l,将电泳装置与电源相接,电泳直至溴酚蓝接近玻璃板底部,然后关闭电源。然后取出胶块转膜,将胶和滤纸 5 片浸于转移缓冲液中平衡 10min,按从负极到正极的顺序依次为滤纸、胶、滤纸制成膜装置。将转移槽置于冰浴中,放入装好的膜装置,加电转缓冲液,插上电极,1.5h(电流约为 300mA)。用漂洗液 TBST 2 次 5min,用 TBST 配置 5% 羊血清,封闭 1h。用 5% 羊血清按说明书的稀释比稀释一抗。一抗孵育 37℃ 1h 或 4℃ 冰箱中过夜,同法按说明书的稀释比稀释二抗。二抗孵育 37℃ 1h 底物孵育及显色。按蛋白质印迹化学发光试剂说明书进行底物显色,在暗室中,加入显色液 A 和 B,显色 5min,进行凝胶成像。

1.8 主要观察指标

大鼠脊髓损伤后进行 BBB 功能评分数据统计,

观察 GFAP、NGF 阳性产物在脊髓的分布,分别计数各组术后第 1、3、5、7 天的脊髓内、中、外三个 1028 μ m² 面积内 GFAP、NGF 的阳性细胞数,测量阳性产物的平均积分光密度值。

1.9 统计学分析

用 OLYMPUS 数码照相机采集图像进行观察分析。各组阳性细胞数和平均积分光密度值数据以均数 \pm 标准差表示,用 SPSS13.0 软件包,采用方差分析 LSD 法进行组间比较。

2 结果

损伤前,三组大鼠 BBB 评分均为 21.00 分,SCI 后,B 组 BBB 评分均高于 C 组($P < 0.05$),C 组、B 组 BBB 评分均明显小于 A 组($P < 0.05$),SCI 后第 5 天开始 B 组与 C 组存在显著差异($P < 0.05$)。BBB 评分统计,GFAP、NGF 的阳性细胞数及平均积分光密度值参见表 1。

显微镜观察到脊髓内 GFAP 免疫阳性反应物的分布:在 A 组,B 组及 C 组的灰质和白质内均可见到含有 GFAP 棕黄色阳性表达产物的细胞,呈星形。GFAP 的阳性表达物主要分布于脊髓中央管附近,坏死组织的空洞周围,白质的边缘及白质内神经元的轴突上(图 1—8)。NGF 免疫阳性反应物的分布概况:NGF 的阳性表达物主要分布于腹侧灰质神经元胞体及胞核。蛋白印迹检测结果显示,在实验观察的 7d 中,B 组与 C 组相比,GFAP 的条带颜色明显减少,在第 5 天差值达到最大($P < 0.05$);NGF 的表达一直在增加($P < 0.05$)(图 9—10),与免疫组化结果相符。

3 讨论

NGF 是最早被发现的一种神经营养因子,是对神经元的存活、生长发育、分化、再生和功能维持起重要作用的物质^[4],主要来自胶质细胞分泌和外周神经元所支配的靶组织和平滑肌细胞的合成^[5]。大量实验结果表明,SCI 后的恢复与 NGF 存在一定关系。本实验通过观察 TES 对大鼠 T9 节段脊髓横断损伤后 NGF 表达的变化,我们观察到 SCI 后 7 天内 B 组与 C 组相比 NGF 阳性细胞表达一直在增加,与文献报道一致^[6-7],主要存在于前角的运动神经元胞浆内,胞浆着色较深,细胞核着色较浅。Friedma 等^[8]利

表1 各组GFAP和NGF平均积分光密度值、阳性细胞数、BBB评分值

(n=6, $\bar{x} \pm s$)

	A组	B组				C组			
		第1天	第3天	第5天	第7天	第1天	第3天	第5天	第7天
平均积分光密度值 (GFAP)	1.1 ± 0.23	1.64 ± 0.44	3.70 ± 1.54	5.74 ± 0.15 ^①	4.58 ± 0.52 ^①	2.84 ± 0.36	3.7 ± 2.61 ^②	14.02 ± 1.5 ^②	6.67 ± 7.58 ^②
平均积分光密度值 (NGF)	0.78 ± 0.31	1.60 ± 0.67	2.88 ± 0.75	4.73 ± 0.81 ^①	6.90 ± 0.32 ^①	1.35 ± 0.13	1.90 ± 0.24 ^②	2.73 ± 1.24 ^②	4.78 ± 1.28 ^②
阳性神经元数 (NGF)	1.40 ± 0.55	3.80 ± 0.48	7.20 ± 0.37	10.4 ± 1.32 ^①	15.80 ± 1.30 ^①	2.20 ± 0.84	4.40 ± 1.14 ^②	7.60 ± 1.32 ^②	10.80 ± 1.92 ^②
BBB评分	21.00 ± 0.00	0.09 ± 0.38	0.67 ± 1.49	3.71 ± 4.52 ^①	6.75 ± 5.50 ^①	0.01 ± 0.21	0.33 ± 0.73 ^②	1.14 ± 1.35 ^②	2.33 ± 2.29 ^②

①B组与A组、C组相同时间点比较P<0.05;②:C组与A组相同时间点比较P<0.05

图1 B组第5天脊髓中央管区存在大量GFAP阳性细胞,其细胞突起呈强阳性 (免疫组化染色, ×400)

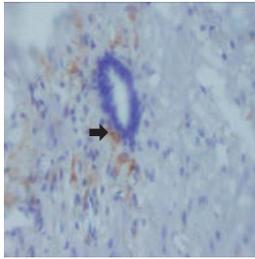


图2 C组第5天脊髓中央管区见大量GFAP阳性细胞,细胞突起呈强阳性,并向损伤区延伸 (免疫组化染色, ×400)

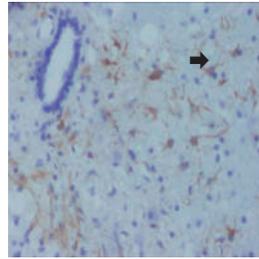


图3 B组第7天脊髓损伤区周围存在GFAP阳性细胞 (免疫组化染色, ×400)

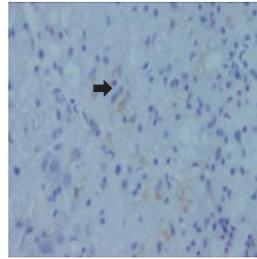


图4 C组第7天损伤周围可见GFAP免疫阳性反应物,表达于胞质中 (免疫组化染色, ×400)

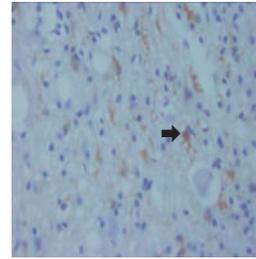


图5 C组第5天腹侧灰质神经元胞体及胞核NGF免疫反应呈强阳性 (免疫组化染色, ×400)

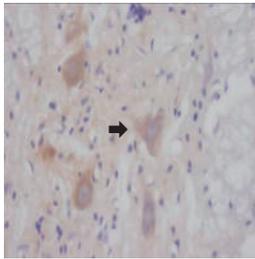


图6 B组第5天腹侧灰质神经元胞体及胞核NGF免疫反应呈强阳性 (免疫组化染色, ×400)

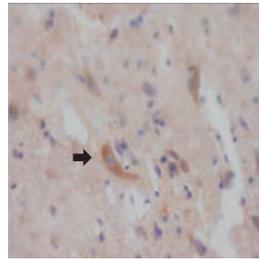


图7 C组第7天腹侧灰质神经元胞体及胞核NGF免疫反应呈强阳性 (免疫组化染色, ×400)

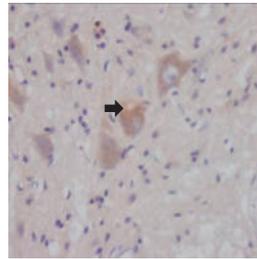


图8 B组第7天腹侧灰质神经元胞体及胞核NGF免疫反应呈强阳性 (免疫组化染色, ×400)

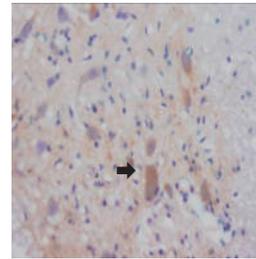
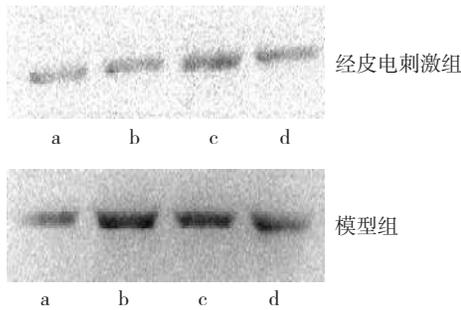
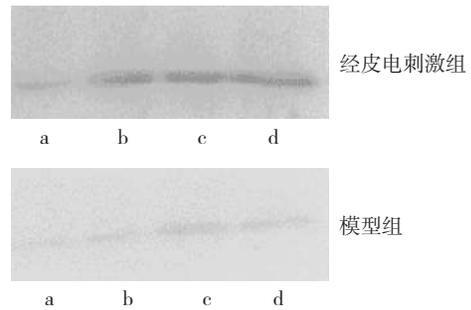


图9 Western-blot法检测B组和C组中GFAP的表达



a-d分别表示SCI后第1、3、5、7天

图10 Western-blot法检测B组和C组中NGF的表达



a-d分别表示SCI后第1、3、5、7天

用脑源性神经营养因子和神经营养因子-3抗体,观察了大鼠脊髓横切后神经营养因子的免疫反应分布,证实神经营养因子的免疫反应都定位于灰质,尤其是前角的运动神经元及白质的一些胶质细胞,提示脊髓中NGF水平的变化可能与脊髓自身修复能力有关。

星形胶质细胞可诱导神经元突起定向生长,成年动物则对神经元起支持、营养、隔离和保护作用。外伤所致的SCI常导致严重的神经功能缺损,SCI后,星形胶质细胞过度增生是阻碍损伤轴突再生的一个重要原因^[9-11],反应性星形胶质细胞增生所形成的致密胶质瘢痕可产生物理屏障作用,阻碍再生轴突的生长,反应性星形胶质细胞还可分泌大量生长抑制因子,对损伤轴突的再生起着明显的抑制作用^[12-13]。本实验观察到损伤后其区域内星形胶细胞的标志物GFAP阳性细胞数明显增加,并在第5天达高峰,SCI后局部星形胶质细胞快速增生,损伤中心坏死面积较大。在给予电针刺刺激治疗后,发现其损伤程度和GFAP的表达都有明显减少,于春雷等^[14]在脊髓损伤后受损组织胶质纤维酸性蛋白表达上调的信号传导机制研究中发现损伤后第1天GFAP开始上升,持续到第7天开始回落,第7天是表达最高峰。张秦宏等^[15]在电针对大鼠急性脊髓损伤后GFAP表达影响的实验研究中发现,脊髓损伤后经电针治疗后的第3天到第7天,大鼠电针治疗组星形胶质细胞数明显低于C组,与本实验相符。

星形胶质细胞可合成和分泌多种神经营养因子,包括NGF、bFGF、BDNF和GDNF等^[16]有学者认为NGF主要是由未成熟星形胶质细胞分泌,而研究发现通过加长星形胶质细胞的未成熟期^[17],抑制成熟星形胶质细胞的过度形成,使幼稚期的星形胶质细胞分泌更多的神经营养因子。至于本实验中TES能使星形胶质细胞减少而神经营养因子增加的现象,可能是由于TES促使肌肉等靶组织中NGF产生过多从而逆向上来的也多^[18],还有一种可能是TES使神经功能改善而是NGF的利用减少了。

本实验在SCI后1—7d内, TES能抑制GFAP的表达,从而可能创造有利于神经再生的微环境,减少胶质瘢痕的形成。因此,证明可能是治疗脊髓损伤的有效手段。提示SCI后5d内可能为修复损伤的一

个时间窗口,越早治疗效果越好。TES抑制GFAP表达的机制尚未被完全认识,可能是由于损伤信号通过星形胶质细胞突起间的网络联系而相互影响。TES促进NGF表达的机制尚未被完全认识,我们推测可能是TES促进细胞内外某种信号通路的产生,而使NGF的表达增加,这种细胞信号能调节多种来源的NGF。

参考文献

- [1] Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. A preliminary report[J]. JAMA, 1991, 57: 878—880.
- [2] Fitch MT, Doller C, Combs CK, et al. Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma[J]. J Neurosci, 1999, 19(19):8182—8198.
- [3] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1—21.
- [4] 张海明,张映.神经生长因子对神经元作用的研究进展动物医学进展[J]. 动物医学进展, 2006, 27(9): 39—41.
- [5] Creedon D, Tuttle JB. Nerve growth factor synthesis in vascular smooth muscle[J]. Hypertension, 1991, 18(6): 730—741.
- [6] 张志坚,姜平,刘锦波,等.神经生长因子及其高亲和力受体在脊髓损伤大鼠大脑运动皮质及皮质脊髓束的表达[J]. 解剖学报, 2004, 35(6): 589—594.
- [7] 陈保围,黄渭清.脑源性生长因子与神经损伤的修复及再生[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(15): 805—809.
- [8] Friedman B, Kleinfeld D, Ip NY, et al. BDNF and NT-4/5 exert neurotrophic influences on injured adult spinal motor neurons [J]. J Neurosci, 1995, 15(2): 1044—1056.
- [9] Tang X, Davies JE, Davies SJ. Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue[J]. J Neurosci Res, 2003, 71(3): 427—444.
- [10] Tian DS, Xie MJ, Yu ZY, et al. Cell cycle inhibition attenuates microglia induced inflammatory response and alleviates neuronal cell death after spinal cord injury in rats[J]. Brain, 2007, 130(1): 177—185.
- [11] Huang X, Kim JM, Kong TH, et al. GM-CSF inhibits glial scar formation and shows long-term protective effect after spinal cord injury[J]. J Neurol, 2009, 277(1-2): 87—97.
- [12] Silver J, Miller JH. Regeneration Beyond the Glial Scar[J].

(下转第1019页)