

·基础研究·

大鼠脊髓损伤模型的改良及伤后再生基因-2蛋白的表达变化

刘 杨¹ 苗宇船¹ 郭继龙¹

摘要

目的:制备改良的大鼠脊髓损伤(SCI)动物模型,并探讨再生基因(Reg)-2蛋白在SCI后的表达规律。

方法:采用36只SD大鼠。参考Allen法,使用自制打击装置致大鼠T13段脊髓中度损伤。以行为联合评分法(CBS)评定模型的可靠性。免疫印迹法和免疫组织化学(SABC)法对正常对照组、伤后第1天、第2天、第3天、第5天和第7天的大鼠脊髓组织中的Reg-2蛋白进行检测。

结果:SCI后大鼠一般情况符合临床损伤特点,且稳定性强;各损伤组大鼠神经功能联合评分均呈明显下降趋势,与正常对照组比较差异具有显著性意义($P < 0.05$);在正常对照组大鼠脊髓神经元内有微量的Reg-2蛋白表达(阳性细胞数为 17.3 ± 2.6 ,Reg-2相对表达量为 0.038 ± 0.007)。SCI后1天,大鼠脊髓内Reg-2表达的免疫阳性细胞随着损伤时间的推移逐渐增多,至伤后第7天仍呈高水平表达(阳性细胞数为 90.0 ± 3.6 ,相对表达量为 0.694 ± 0.018),各组间比较差异具有显著性意义($P < 0.05$)。伤后3天内,Reg-2免疫阳性细胞以后角神经元为主,而伤后7天以前角神经元和胶质细胞为主。

结论:本实验装置制作的大鼠SCI模型稳定、可靠;SCI后Reg-2蛋白表达开始升高,对受损神经起保护和修复作用。

关键词 脊髓损伤;再生基因-2蛋白;免疫印迹;免疫组化

中图分类号:R681.5 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2012)-12-1102-04

Modification of the rats model of spinal cord injury and expression of regenerating gene-2 protein after spinal cord injury in rats/ LIU Yang, MIAO Yuchuan, GUO Jilong//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(12): 1102—1105

Abstract

Objective: To design and produce a kind of modified rat model of spinal cord injury(SCI), and explore the expression pattern and effects of regenerating gene (Reg) -2 protein after SCI in rats.

Method: Thirty-six SD rats were subjected to moderate SCI by modified Allen's crush method with a self-designed experimental device at T13 level of spinal cord. Combined behavioral score(CBS) was used to assess the reliability of model. Western-blot and immunohistochemical techniques (SABC) were used to detect the expression of Reg-2 in rats of different groups (normal control, 1, 2, 3, 5 and 7d post-injury).

Result: After operation the general health status of rat model was accorded with the clinical characteristics of SCI in human, and was with high-stability. The CBS in model groups declined with the time of injury, and compared with the normal control the difference was statistically significant ($P < 0.05$). In normal control group, the number of Reg-2-positive cells and relative expression of Reg-2 in spinal cord were 17.3 ± 2.6 and 0.038 ± 0.007 . At 1d post-injury the level of Reg-2 elevated and reached a high level at 7d post-injury (the number of Reg-2-positive cells and relative expression of Reg-2 were 90.0 ± 3.6 and 0.694 ± 0.018), the difference compared with model groups were statistically significant ($P < 0.05$). In the early phase of injury (in 3d post-injury), neurons

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.12.004

¹ 山西中医学院病理学教研室,太原,030024

作者简介:刘杨,男,博士,讲师; 收稿日期:2012-02-08

in dorsal horn of spinal cord were accounted for the most part of Reg-2-positive cells. But the main Reg-2-positive cells were neurons of spinal anterior horn and gliocytes in the later phase of injury.

Conclusion: The modified rat model prepared with our self-designed experimental device was with high-stability and higher reliability, and the experimental results suggested that SCI could stimulate the Reg-2 expression, which might contribute to maintenance of nerve cell survival and repair of damaged neural tissues after SCI.

Author's address Pathological staff room of Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan, 030024

Key word spinal cord injury; regenerating gene-2 protein; Western-blot; immunohistochemistry

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后可以触发一系列继发性病理生理级联反应,从而进一步加重脊髓组织损伤的程度^[1-2]。哺乳动物的脊髓再生能力极其微弱,这与脊髓神经元自身缺乏足够的再生能力和损伤局部微环境中各种生长抑制因子的影响有关^[3]。再生基因(regenerating gene, Reg)是一种胰腺炎时自胰液中提纯的炎症蛋白,其功能相当于急性反应蛋白、抗凋亡因子和神经细胞生长因子^[4]。Reg蛋白家族的功能最早是在糖尿病的研究中被发现的^[5],近年来Reg蛋白在神经系统损伤中的作用逐渐被人们所注意^[6]。本实验旨在对大鼠SCI模型进行改良后,对Reg-2蛋白的表达变化规律进行观察,以推测在脊髓神经再生过程中Reg-2蛋白所发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型制作及分组

清洁级Wistar大鼠36只(山西医科大学实验动物中心提供,合格证号scxk(晋)2009-0001),体重180—200g,雌雄不拘,随机分为6组(正常对照组,损伤后第1天、第2天、第3天、第5天和第7天组)。对文献^[7]的中实验装置进行改良:将实验台加装固定大鼠四肢装置,同时将“重物+撞针”打击改为冲击杆直接打击。大鼠术后腹腔注射青霉素(100U/d)以抗感染,室温控制在20—25℃,每日按摩膀胱2次至大鼠出现自主排尿为止。术后不同时间点处死动物,无菌条件下取损伤节段脊髓组织,液氮保存或石蜡包埋。

1.2 动物模型评价

采用行为联合评分法(combined behavioral score, CBS)来评定模型的可靠性^[8]。分别计算每只大鼠左右后肢的CBS值(每肢计算3次),统计后取其均值,并对各实验组组间CBS分数的差异进行统

计学分析。

1.3 免疫组织化学SABC法

Reg-2兔抗大鼠单克隆抗体、SABC试剂盒及DAB显色试剂盒由博士德公司提供。一抗(1:300)4℃过夜,其余步骤按试剂盒要求操作。以胞质内出现棕黄色颗粒为阳性,每张切片随机选5个高倍视野,采用IPP 5.0图像分析系统进行图像分析,测定阳性细胞数。

1.4 免疫印迹法

常规方法进行总蛋白的提取和定量。12%分离胶和5%浓缩胶恒压电泳,全湿式电转法将蛋白质转移到硝酸纤维素膜(NC膜)上,5%脱脂奶粉溶液室温封闭4h,置于Reg-2兔抗大鼠单克隆抗体溶液中(1:1000稀释)4℃孵育过夜,TBST溶液洗3min×5次;再于辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG溶液(1:1000稀释)中孵育4℃育1h,TBST溶液洗3min×5次。以上步骤均在摇床上进行。DAB显色,蒸馏水漂洗中止显色反应。采用IPP 5.0图像分析系统检测目的条带和 β -actin的积分光密度值,并计算二者的比值,作为Reg-2相对表达量。

1.5 统计学分析

免疫组织化学SABC法和免疫印迹方法检测结果所得数据以均数 \pm 标准差形式表示,采用SPSS 11.5软件对所得数据进行方差分析和SNK检验。

2 结果

2.1 大鼠脊髓损伤模型的评价

2.1.1 术后一般情况观察:各损伤组大鼠的术后基本情况基本一致,打击后大鼠均表现为身体痉挛性颤动,尾巴痉挛性摆动,双下肢及躯体回缩样扑动。麻醉苏醒后大鼠双下肢呈弛缓性瘫痪,可出现尿潴留或尿失禁。解剖可见伤后大鼠硬脊膜内充血或水肿。伤后第7天时,脊髓损伤节段变细。

2.1.2 CBS评分结果:各损伤组大鼠CBS评分均呈明显下降趋势,其中伤后第1天组评分最高,后随着损伤时间的逐渐延长,评分逐渐减低,分别为 82.7 ± 8.2 、 79.4 ± 7.9 、 74.2 ± 5.1 、 63.2 ± 8.0 和 55.0 ± 6.4 ,与对照组比较 2.9 ± 0.5 ,差异具有显著性意义($P < 0.05$)。

2.2 免疫组织化学染色结果

对照组大鼠脊髓中有少量Reg-2免疫阳性细胞。SCI后第1天,Reg-2免疫阳性细胞随着损伤时间的推移逐渐增多,至伤后第7天,仍呈高水平表达。各实验组间比较,差异具有显著性意义($P < 0.05$)。其中,伤后3天内,Reg-2表达阳性细胞以后角神经元为主,而伤后第7天以前角神经元和胶质细胞为主。见表1,图1。

2.3 免疫印迹结果

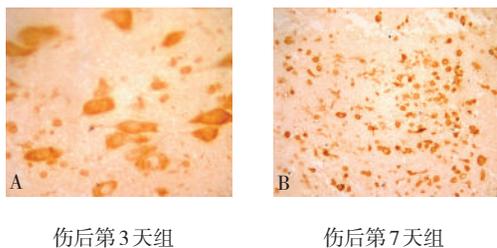
免疫印迹结果显示,Reg-2蛋白在正常脊髓中有表达,但水平较低。SCI后第1天,Reg-2蛋白的表达水平开始升高,至伤后第7天,仍呈高水平表达。各实验组间比较,差异具有显著性意义($P < 0.05$)。见表1,图2。

表1 各实验组Reg-2免疫阳性细胞计数和Reg-2相对表达量的检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Reg-2免疫阳性细胞数	Reg-2的相对表达量
正常对照组	17.3 ± 2.6	0.038 ± 0.007
伤后第1天组	24.0 ± 7.4^{①}	0.143 ± 0.011^{①}
伤后第2天组	35.6 ± 3.6^{①②}	0.312 ± 0.009^{①②}
伤后第3天组	49.0 ± 5.3^{①②}	0.449 ± 0.021^{①②}
伤后第5天组	82.8 ± 7.0^{①②}	0.501 ± 0.015^{①②}
伤后第7天组	90.0 ± 3.6^{①②}	0.694 ± 0.018^{①②}

与对照组比较:① $P < 0.05$;与上一时间点比较:② $P < 0.05$

图1 各实验组Reg-2蛋白的免疫组织化学检测结果

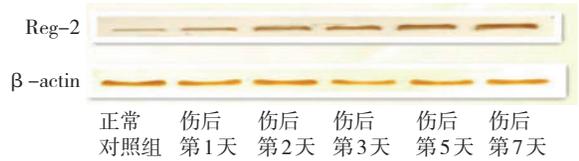


3 讨论

3.1 脊髓损伤动物模型的改良

脊髓损伤模型对于阐明脊髓损伤的病理生理机

图2 各实验组Reg-2蛋白免疫印迹检测结果



制和评价损伤后干预手段的效果非常关键^[9]。为了建立临床相似性高且稳定的脊髓损伤模型,本次实验对动物模型装置进行了如下改良:①控制因动物自身活动对实验的影响:本实验装置可将实验动物的头部、四肢以及尾部固定,减少了致伤过程中实验动物过度活动造成的影响;②保证使脊髓受力均匀:本装置将打击装置改为冲击杆直接打击,并且打击部位放置与暴露脊髓形态相似的塑料垫片,以保证打击部位受力均匀;③避免其他部位受损:加了一个中空的玻璃垂直冲击通道,可使冲击杆沿预先设定的方向下落;打击后及时取走冲击杆,避免因反弹而造成二次打击;④确保模型的一致性:通过调整冲击杆的高度和重量,既可以造成不同程度的脊髓损伤,又可以达到标准化的目的。根据手术一般情况观察和CBS评分结果,本次实验所致动物模型稳定、可靠,实验的可重复性强,基本上能够满足大多数外伤性脊髓损伤的研究,并且可以有效控制脊髓损伤部位,准确控制脊髓损伤的程度,从而制备出相对统一的标准化脊髓损伤动物模型,有助于科学地开展脊髓损伤的科研工作。

3.2 Reg-2蛋白与SCI的关系

Reg-2蛋白是一种应激蛋白,在正常的成年大鼠中枢和外周神经系统低水平表达,但有研究报道,神经系统损伤后,Reg-2蛋白可以促进施万细胞分裂,并分泌多种神经营养、趋化因子,同时再生的感觉神经元和运动神经元的轴突中都有大量的Reg-2蛋白蓄积,使轴突得以迅速而准确地生长,故认为Reg-2是促进损伤神经生长的关键介质^[10-11]。目前关于Reg蛋白在神经系统中的研究,主要是在体外模型中观察Reg蛋白对神经细胞的保护作用^[12],而少有通过在体损伤模型来观察Reg蛋白表达水平变化和探讨其功能意义。本次实验采用改良的大鼠SCI模型,对伤后脊髓神经元内Reg-2蛋白的表达进行了观察,结果显示SCI后第1天,大鼠脊髓内

Reg-2表达水平开始升高,SCI后第7天Reg-2的表达仍处于较高水平。其中伤后3天内,Reg-2表达阳性细胞以后角神经元为主,而伤后第7天以前角神经元和胶质细胞为主。这与SCI后脊髓组织对外刺激的反应时相一致^[13]。SCI后第1天内是脊髓组织对外刺激的急性反应期,此时转录因子、氧化应激、炎症刺激快速上调,伤后12—24h损伤区的神经元凋亡达到高峰,主要分布在灰质后角I、III区,前角VII—IX区,其中少数为前角运动神经元,大多数为后角感觉神经元和胶质细胞,而通过机械损伤刺激产生的Reg-2也主要集中在感觉神经元中;随后,相邻节段的神经元也会发生坏死和凋亡,一般会在伤后第2天—第3天才到高峰期,并持续1w左右,主要分布在灰质前角和白质中,以胶质细胞为主,还有少量的运动神经元,因此Reg-2的表达会出现在前角神经元和胶质细胞中。随着损伤时间的延长,脊髓组织的内源性修复/再生机能开始发挥作用,一般会在SCI后的第3天。此时作为起修复保护作用的介质,Reg-2的表达水平会显著升高,起到激活中枢神经系统再发育,通过运动神经和感觉神经的靶向作用调节,促进神经再生。此外,Reg-2与既往研究所发现的脑源性神经营养因子、胰岛素样生长因子等蛋白因子的表达时相具有重合性^[8,14—15],提示这些生长因子在脊髓修复过程中可能发挥协同作用,具体机制有待于进一步研究。

综上,本次实验结果显示Reg-2在SCI后感觉和运动神经元中表达升高,可以发挥保护神经元、促进轴突再生的作用,提示如果在适宜的时间窗内,人为地提高和促进其表达,则可能减少损伤神经元的死亡,但这一假设还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Sinescu C, Popa F, Grigorean VT, et al. Molecular basis of vascular events following spinal cord injury[J]. *J Med Life*, 2010, 3(3):254—261.
- [2] Shibuya S, Yamamoto T, Itano T. Glial and axonal regeneration following spinal cord injury[J]. *Cell Adh Migr*, 2009, 3(1): 99—106.
- [3] Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal[J]. *NeuroRx*, 2004, 1(1):80—100.
- [4] Wang Y, Jacovetti C, Li B, et al. Coordinated age-dependent and pancreatic-specific expression of mouse Reg 2, Reg 3 α and Reg 3 β genes[J]. *Growth Factors*, 2011, 29(2—3):72—81.
- [5] Astorri E, Guglielmi C, Bombardieri M, et al. Circulating Reg 1 α proteins and autoantibodies to Reg 1 α proteins as biomarkers of β -cell regeneration and damage in type 1 diabetes[J]. *Horm Metab Res*, 2010, 42(13):955—960.
- [6] Averill S, Davis DR, Shortland PJ, et al. Dynamic pattern of reg-2 expression in rat sensory neurons after peripheral nerve injury[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(17):7493—7501.
- [7] 吴江,高建新,刘克敬,等.实验性大鼠脊髓损伤后运动能力及病理学变化的研究[J].*山东大学学报(医学版)*,2006,44(3):231—234.
- [8] 刘杨,刘季,王亚方,等.大鼠脊髓挫伤后BDNF表达的实验性研究[J].*中国法医学杂志*,2007,22(1):15—18.
- [9] 双卫兵,刘强.自制脊髓损伤动物模型实验台的结构与使用[J].*实用医技杂志*,2010,17(8):703—705.
- [10] Nishimune H, Vasseur S, WieSe S, et al. Reg-2 is a motoneuron neurotrophic factor and a signaling intermediate in the CNTF survival pathway[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(12): 906—914.
- [11] Namikawa K, Fukushima M, Murakami K, et al. Expression of Reg/PAP family members during motor nerve regeneration in rat[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 332(1):126—134.
- [12] Fang M, Huang JY, Ling SC, et al. Effects of Reg-2 on survival of spinal cord neurons *in vitro*[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2010, 293(3):464—476.
- [13] 岳海源,汪玉良,孙振,等.脊髓损伤修复研究进展[J].*国际骨科学杂志*,2010,31(2):113—115.
- [14] 刘杨,韩艳玲,刘季,等.大鼠脊髓损伤后HIF- α 基因的表达[J].*中国法医学杂志*,2008,23(1):4—8.
- [15] 刘杨,韩艳玲,王英元,等.大鼠脊髓损伤后IGF-1和Bcl-2表达变化的免疫组织化学研究[J].*中西医结合心脑血管病杂志*, 2007,4(2):134—136.