

# 大鼠脊髓损伤后神经丝蛋白及胶质纤维酸性蛋白表达的变化及意义

胡俊勇, 李佛保, 廖威明, 徐栋梁, 刘世敬

(中山大学附属第一医院骨科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】研究脊髓损伤后神经元中神经丝蛋白(NF<sub>200</sub>)及星形胶质细胞胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达的变化及其关系,探讨不同细胞在再生修复中的作用。【方法】SD大鼠30只,分为正常、伤后1 d,3 d,7 d,14 d,21 d组,每组5只,用免疫组化染色及图象分析方法观察神经元NF<sub>200</sub>及星形胶质细胞GFAP的表达,并对二者进行相关性分析。【结果】脊髓损伤后NF<sub>200</sub>及GFAP的表达均呈进行性增高,二者有显著的相关性;GFAP表达的增高早于NF<sub>200</sub>的增高,而前角神经元NF<sub>200</sub>的表达早于后角神经元。【结论】脊髓损伤后,星形胶质细胞可能是刺激神经元功能活跃,促进神经纤维再生的一个重要因素,不同类型神经元对损伤的反应存在着差异。

**关键词:**脊髓损伤;神经微丝蛋白质类;神经胶质原纤维酸性蛋白质

**中图分类号:**R651.2

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-257X(2003)02-0129-03

## The Changes of NF<sub>200</sub> and GFAP Expression and Their Significance After Spinal Cord Injury in Rats

HU Jun-yong, LI Fo-bao, LIAO Wei-ming, XU Dong-liang, LIU Shi-jin

(Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:**【Objective】To study the changes of NF<sub>200</sub> in neurons and GFAP in astrocytes and their interrelations after spinal cord injury (SCI). 【Methods】Thirty SD rats were divided randomly into six groups, the group of control, 1, 3, 7, 14 and 21 day after SCI. There were five rats in each group. Immunohistochemical technique and image analysis were used to examine the expressions of NF<sub>200</sub> in neurons and GFAP in astrocytes, and their correlation was also analysed. 【Results】Both NF<sub>200</sub> and the GFAP were increased significantly after SCI. The increase of GFAP was earlier than that of NF<sub>200</sub>, and the neurons in anterior horn expressed NF<sub>200</sub> earlier than that in posterior horn. There was a significant positive relationship between the levels of NF<sub>200</sub> and GFAP. 【Conclusion】The astrocytes probably play an important role in stimulating and promoting the never regeneration, and the reactions of different type neurons to the injury were not the same.

**Key words:** spinal cord injuries; neurofilament proteins; glial fibrillary acidic protein

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(2): 129-131]

在脊髓损伤后的修复反应中,神经元及神经胶质细胞均有明显的形态和功能改变,以适应神经纤维再生修复的需要,但有关其变化规律的研究较少。我们于2002年6月至10月间用免疫组化的方法观察了神经元及星形胶质细胞在损伤后的变化,以探讨其在脊髓损伤修复中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

小鼠抗大鼠NF<sub>200</sub>抗体、小鼠抗大鼠GFAP抗体、生物素化山羊抗小鼠IgG、SABC试剂盒、DAB

收稿日期:2002-12-08

基金项目:广东省医药卫生青年科学研究基金资助项目(B1997154)

作者简介:胡俊勇(1969-),男,四川江油人,博士生;李佛保,教授,博士生导师。

试剂盒均购自武汉博士德公司。

## 1.2 实验动物及处置

健康 SD 大鼠 30 只, 体质量 220 ~ 250 g, 雌雄不限 (中山大学实验动物中心提供), 随机分为正常、伤后 1, 3, 7, 14, 21 d 6 组, 每组 5 只。损伤组以 100 g/L 的水合氯醛 300 mg/kg 腹腔麻醉后, 显露 T12 节段脊髓后外侧, 以自制的钳夹器行前后方向挤压脊髓, 挤压程度 100%, 时间 30 s, 使成完全损伤。伤后普通鼠笼喂养, 人工排尿每日 2 次。

## 1.3 取材

分别于伤前、伤后 1, 3, 7, 14, 21 d 取相应组大鼠以体积分数 10% 中性福尔马林心脏灌注后取出损伤段及距损伤边缘 0.5 cm 外邻近脊髓组织, 继续以体积分数 10% 中性福尔马林固定 24 h, 石蜡包埋, 切片 (损伤段作纵形切片, 损伤邻近段作横行切片), 片厚 5  $\mu\text{m}$ 。

## 1.4 组织学及免疫组织化学检查

损伤处脊髓行常规 HE 染色, 损伤邻近处行免疫组化染色。神经丝蛋白 (NF<sub>200</sub>) 及胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 染色均采用链霉亲和素 - 生物素 (SABC) 法, 参考试剂盒说明操作 (微波修复抗原, 一抗稀释度均为 1:100, 37  $^{\circ}\text{C}$  1 h), DAB 显色, 苏木精轻度复染, 脱水, 封片, 对照以 0.02 mol/L PBS (pH = 7.2) 代替一抗。光镜下观察, 细胞内有棕黄色颗粒者为阳性。并计数每张切片的 NF<sub>200</sub> 阳性神经元数。

## 1.5 图象分析

采用德国 KONTRON IBAS 2.5 全自动图象分析系统, 放大 200 倍下, 以切片的背景调整灰度, 选择灰质前、中、后各两个视野计算其内 GFAP 的平均阳性面积。

## 1.6 统计学方法

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间行 *t* 检验, 相关性采用直线相关分析。

# 2 结 果

## 2.1 伤处组织学检查

伤后 1 d, 见灰质结构破坏, 可见大量出血, 白质也表现坏死, 伤后 3 d, 伤处结构完全坏死, 断裂, 出血及炎症细胞浸润, 其中心远近 2 mm 内灰白质均有坏死, 细胞肿胀, 结构不清, 7 d 时无明显变化, 以后伤处形成囊腔及胶质瘢痕 (图 1)。

## 2.2 免疫组化检查

各时点 NF<sub>200</sub> 阳性神经元数量及 GFAP 的阳性面积见表 1, 二者在伤后均持续增高, 相互之间呈明显的正相关, 但二者的变化也有不同之处, 在时间上 GFAP 的增高早于 NF<sub>200</sub> 的增高, 在分布上 GFAP 在整个灰质的变化相似, 而 NF<sub>200</sub> 在伤后早期只出现在前角运动神经元, 后角神经元的阳性出现较晚, 伤后 1 周仅有个别细胞阳性, 以后逐渐增多, 3 周时最为明显。在形态上, 神经元胞体及胞核均增大, 星形胶质细胞则数量增多, 体积增大 (图 2 ~ 4)。

表 1 伤后 NF<sub>200</sub> 阳性神经元数量及 GFAP 阳性面积的变化

Table 1 Changes of NF<sub>200</sub> - positive neurons and GFAP area in the spinal cord after injury

Groups	<i>n</i>	NF <sub>200</sub> positive neurons	<i>S</i> / $\mu\text{m}^2$	<i>r</i>
Control	5	4.0 $\pm$ 1.4	976.4 $\pm$ 66.3	
1 d	5	5.6 $\pm$ 1.9	1 658.6 $\pm$ 206.2 <sup>1)</sup>	
3 d	5	15.4 $\pm$ 3.0 <sup>1)</sup>	2 321.2 $\pm$ 214.3 <sup>1)</sup>	0.86 <sup>1)</sup>
7 d	5	34.2 $\pm$ 4.9 <sup>1)</sup>	3 079.3 $\pm$ 268.7 <sup>1)</sup>	
14 d	5	57.4 $\pm$ 7.8 <sup>1)</sup>	3 927.5 $\pm$ 413.3 <sup>1)</sup>	
21 d	5	61.2 $\pm$ 8.4	4 819.7 $\pm$ 462.4 <sup>2)</sup>	

Compared with control group, 1) *P* < 0.01, 2) *P* < 0.05

# 3 讨 论

成年哺乳动物脊髓损伤后的神经再生是指轴突的再生, 轴突无合成蛋白的能力, 所需功能和结构蛋白均由神经元胞体合成经轴浆转运供给, 故神经元的功能状态可以反映神经纤维再生的情

况。神经丝蛋白 (NF) 是构成神经元胞体和神经轴突细胞骨架的主要成分, 在维护神经元的功能和轴浆转运等一系列与脊髓损伤修复相关的病理生理变化中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。NF 依相对分子质量的不同可分为 NF68, NF140 和 NF200 3 种。其中 NF200 在正常情况下只存在于轴索中, 而胞体不含或很少含

有,故正常时 NF<sub>200</sub> 染色,胞体为阴性。当脊髓损伤后,损伤区内的神经细胞受创伤及继发因素的直接影响出现变性坏死、结构破坏及细胞崩解,失去对创伤的反应能力。而损伤区外的邻近神经元在创伤刺激及多种诱导因子的作用下,开始大量合成及积存 NF<sub>200</sub>,以适应神经再生的需要。NF<sub>200</sub> 积存于胞体内而使胞体着色<sup>[3,4]</sup>。有研究表明脊髓不完全损伤后 NF<sub>200</sub> 阳性神经元的数量及神经元胞体着色的程度与后肢的功能恢复情况有密切的关系<sup>[5]</sup>,说明 NF<sub>200</sub> 染色不仅能显示伤后神经元的形态,也能反映其功能状态。本实验选择损伤邻近段脊髓作为观察对象能较好地反映神经细胞在创伤后的修复反应。本实验中观察到脊髓损伤后 NF<sub>200</sub> 阳性神经元的出现在时间上和分布上都有一定规律。在时间上存在一个潜伏期,伤后 3 d 才明显变化,以后逐渐增强,在分布上,伤后早期主要为前角运动神经元着色,以后才出现侧角及后角神经元着色,至伤后 3 周时,后角神经元着色明显增强。不同部位神经元着色在时间上的这种差别反映了不同类型的神经元对创伤的反应是存在差别的,这可能与其功能及信号传导方向的不同有关。其内在机制还有待深入研究。

胶质纤维酸性蛋白(GFAP)是构成神经胶质细胞的主要细胞骨架蛋白,其表达的高低可以反映胶质细胞的功能状态<sup>[6]</sup>。在正常情况下,星形胶质细胞是中枢神经系统的主要胶质细胞,对神经细胞起保护、支持及参与代谢的作用。脊髓损伤后,星形胶质细胞出现明显的功能活跃及胶质化,表现为增生、肥大、突起增多,并能分泌 BFGF、基膜素等多种神经诱导因子促进神经再生<sup>[7,8]</sup>。本文中观察到伤后 1 d,GFAP 染色即明显增强,在时间上早于 NF<sub>200</sub> 阳性神经元的出现,在整个观察期,二者的增高程度有显著的相关性。提示了星形胶质细胞在脊髓损伤后可能是刺激神经元功能活跃、促进神经纤维再生的重要因素。但已有文献<sup>[9]</sup>指出星形胶质细胞功能的持续活跃在损伤后期则表现为胶质细胞过度增生,形成胶质瘢痕而对神经纤维生长及神经再通起着机械性和化学性的阻碍作用。本实验中观察到伤后 3 周时,GFAP 的表达仍在增高,而该时点 NF 阳性神经元的数量虽然增多,但单个神经元的染色强度却开始下降,可能也与此有关。

脊髓损伤后, NF 和 GFAP 表达的变化反映了

神经细胞的功能情况,对研究不同神经细胞在损伤修复中的作用也有重要的参考价值,对其深入研究将有利于加深对脊髓内在修复机制的认识,为促进脊髓功能的恢复提供帮助。

(本文图 1~4 见插页 3. Fig. 1~4 shown in back coloured page 3)

#### 参考文献:

- [1] Zhang Z X, Casey D M, Julien J P, *et al.* Normal dendritic arborization in spinal motoneurons requires neurofilament subunit L [J]. *J Comp Neurol*, 2002, 450 (2): 144.
- [2] Uchida K, Baba H, Maezawa Y, *et al.* Progressive changes in neurofilament proteins and growth-associated protein-43 immunoreactivities at the site of cervical spina cord compression in spinal hyperostotic mice[J]. *Spine*, 2002, 27(5): 480.
- [3] Yabe J T, Wang F S, Chylinski T, *et al.* Selective accumulation of the high molecular weight neurofilament subunit within the distal region of growing axonal neurites [J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2001, 50(1): 1.
- [4] Brook G A, Plate D, Franzen R, *et al.* Spontaneous longitudinally orientated axonal regeneration is associated with the Schwann cell framework within the lesion site following spinal cord compression injury of the rat [J]. *J Neurosci Res*, 1998, 53(1): 51.
- [5] 胥少汀,郭世绂. 脊髓损伤基础与临床[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,2002. 205.
- [6] Bigini P, Bastone A, Mennini T. Glutamate transporters in the spinal cord of the wobbler mouse[J]. *Neuroreport*. 2001, 12(9):1815.
- [7] Cheng H, Wu J P, Tzeng S F. Neuroprotection of glial cell line-derived neurotrophic factor in damaged spinal cords following contusive injury[J]. *J Neurosci Res*, 2002, 69(3): 397.
- [8] Kawai H, Arata N, Nakayasu H. Three-dimensional distribution of astrocytes in zebrafish spinal cord[J]. *Glia*, 2001, 36(3): 406.
- [9] Baldwin S A, Broderick R, Blades D A, *et al.* Alterations in temporal/spatial distribution of GFAP and vimentin-positive astrocyte after spinal cord contusion with the New York University spinal cord injury device[J]. *J Neurotrauma*, 1998, 15(12): 1015.

(编辑 张敏瑞)

大鼠脊髓损伤后神经丝蛋白及胶质纤维酸性蛋白表达的变化及意义 (正文见第 129 页)

### The Changes of NF<sub>200</sub> and GFAP Expression and Their Significance After Spinal Cord Injury in Rats (Text in page 129)

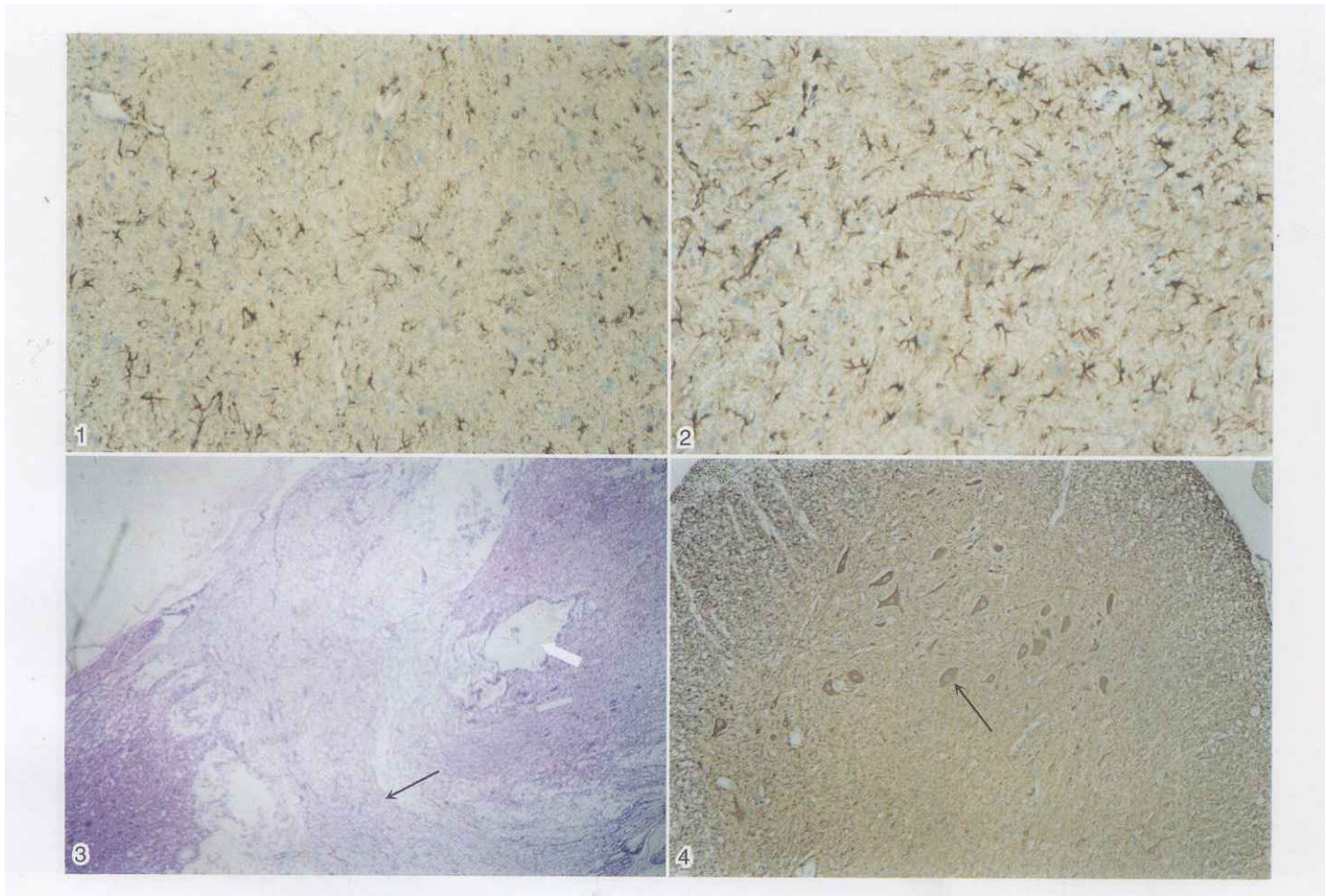


图 1 伤后 21 天, 伤处断端间胶质瘢痕(↑)及囊腔(∩)形成。 HE × 40

图 2 伤后 7 天, 前角神经元 NF200 阳性表达。 × 200

图 3 伤后 7 天, 免疫组化 GFAP 染色, 示星形胶质细胞开始增生。 × 200

图 4 伤后 21 天, 免疫组化 GFAP 染色, 示星形胶质细胞显著增生, 肥大。 × 200

Fig. 1 21 days after injury, glial scar and vesicle formation in the injured area. HE × 40

Fig. 2 7 days after injury, NF200 expression in neuroes of the anterior horn. × 200

Fig. 3 7 days after injury, astrocytes in the grey matter, immunohistochemical stain of GFAP. × 200

Fig. 4 21 days after injury, astrocytes in the grey matter show obvious increase and enlargement, immunohistochemical stain of GFAP. × 200