

大鼠脊髓胶质瘢痕形成的规律**

黄 凯,盛伟斌

Formation of glial scar in the rat spinal cord after injury

Huang Kai, Sheng Wei-bin

Abstract

BACKGROUND: After spinal cord injury, the treatment cannot completely solve the problem with the body because glial scar forms and cystic degeneration occurs in the spinal cord tissue. Therefore, it is of great significance to know the regularity of glial scar development.

OBJECTIVE: To analyze the spatial distribution, characteristics of axon and time characteristics of glial scar in the rat spinal cord after experimental spinal cord injury.

METHODS: SD rats were divided into control group, 1-day group, 3-day group, 5-day group, 1-week group, 2-week group, 4-week group, 6-week group, 8-week group, 10-week group and 12-week group. Allen's weight-drop method was performed to prepare spinal cord injury models in rats expect the control group.

RESULTS AND CONCLUSION: At 4 weeks after spinal cord injury, glial scar and smooth cavity wall began to form. No astrocytes positive for glial fibrillary acidic protein and axons positive for neurofilament protein existed inside the cavity. The glial scar begun to stabilize at 4 weeks after spinal cord injury, and mechanical barriers between the cavity and axon came into being. Thickness of the glial scar no more increased at 10 weeks after spinal cord injury.

Huang K, Sheng WB. Formation of glial scar in the rat spinal cord after injury. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(20): 3671-3674. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景:脊髓损伤后治疗不理想的原因是脊髓组织的囊变和胶质瘢痕的形成,因此,明确胶质瘢痕的发生发展规律具有重要 意义。

目的:观察大鼠脊髓损伤后脊髓胶质瘢痕形成的空间分布、时间规律,以及轴突变化特征。

方法:采用改良 Allen 重物坠落法建立 SD 大鼠脊髓损伤模型,分别于损伤后 1 d, 3 d, 5 d, 1 周, 2 周, 4 周, 6 周, 8 周, 10 周, 12 周取材。以正常饲养的大鼠作对照。

结果与结论:大鼠脊髓损伤后 4 周开始出现致密瘢痕增生,之后瘢痕厚度平稳下降,至损伤后 10 周形成光滑的囊腔壁,囊腔内无胶质纤维酸性蛋白阳性星形胶质细胞,损伤区囊腔周围的胶质瘢痕内可见密集肥大的星形胶质细胞,未见神经丝蛋白阳性轴突位于囊腔内。提示脊髓损伤后 4 周胶质瘢痕厚度达到高峰,囊腔与残存轴突之间开始形成机械屏障,损伤后 10 周瘢痕厚度趋于稳定。

关键词: 胶质瘢痕;脊髓损伤; 胶质纤维酸性蛋白; 星形胶质细胞; 神经丝蛋白

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.20.014

缩略语: AS: astrocytes, 星形胶质细胞; GFAP: glial fibrillary acidic protein, 胶质纤维酸性蛋白; NF-200: neurofilament-200, 神经丝蛋白

黄凯,盛伟斌. 大鼠脊髓胶质瘢痕形成的规律[J].中国组织工程研究,2012,16(20):3671-3674. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

脊髓损伤后在损害的相应节段出现各种运动、感觉和括约肌功能障碍,是继心脑血管病、肿瘤之后严重威胁人类健康的重大疾病,长期以来脊髓损伤一直为众多学者所关注。随着对脊髓损伤的认识,发现神经及轴突再生是促进脊髓损伤修复的重要手段。阻碍轴突有效生长、再生的因素很多,主要有脊髓损伤后星形胶质细胞(astrocytes, AS)增殖、小胶质细胞激活和胶质瘢痕的形成等^[1]。目前对脊髓损伤后胶质瘢痕和轴突间关系的认识仍未完全明确,也尚无有效方法处理胶质瘢痕。有研究证实,急性脊

髓损伤可得到一定程度的修复^[2],而病理上或功 能上趋于稳定或变化较小的陈旧性脊髓损伤难 以修复^[3]。实验通过建立大鼠脊髓损伤模型,采 用免疫组化及免疫荧光染色观察脊髓损伤后脊 髓胶质瘢痕形成的时间规律、空间分布,以及 其与神经轴突的关系。

1 材料和方法

设计:随机对照动物实验。

时间和地点:于2011-04/09在新疆医科大学第一附属医院医学研究中心完成。

材料:清洁级成年雄性SD大鼠110只,体 质量200~220g,由新疆医科大学实验动物中心 Department of Spinal Surgery, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Huang Kai★, Studying for master's degree, Physician, Department of Spinal Surgery, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China 34556746@qq.com

Corresponding author: Sheng Wei-bin, Doctor, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor Department of Spinal Surgery, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China wbsheng_xjmu@ hotmail.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81060106*

Received: 2012-02-10 Accepted: 2012-04-19 新疆医科大学第 一附属医院脊柱 外科,新疆维吾尔 自治区乌鲁木齐 市 830054

通讯作者:盛伟, 斌伟士,教授, 主导师,于医师, "医年子 学第小时, 唐医师, "要子 学第一个科, 新疆 基本的 教 30054 wbsheng_xjmu@ hotmail.com

中图分类号:R318 文献标识码:A 文章编号:1673-8225 (2012)20-03671-04

收稿日期: 2012-02-10 修回日期: 2012-04-19 (20120210004/ WLM · W) 提供,许可证号: SYXK(Xin)2003-001。全部 大鼠均正常饮水摄食。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
兔抗大鼠胶质纤维酸性蛋白	美国 Sigma 公司
(glial fibrillary acidic	
protein,GFAP)抗体、小鼠	
抗大鼠神经丝蛋白	
(neurofilament-200,	
NF-200)抗体、FITC 标记羊	
抗兔 lgG,TRITC 标记兔抗	
小鼠 IgG	
苏木精-伊红染色试剂盒	北京中杉生物有限公司
荧光显微镜	德国 Leica 公司

方法:

实验分组:将110只大鼠随机分为对照组、 损伤后1d,3d,5d,1周,2周,4周,6周, 8周,10周,12周组,每组10只。其中对照组 为正常脊髓组织,仅切除相应椎板后缝合伤口, 不用于制作脊髓损伤模型。其余组分别与脊髓 损伤后相应时间点取材。

大鼠脊髓损伤模型的制备:大鼠腹腔注射麻醉后,俯卧位固定于鼠板上,常规消毒背部,行 背部正中切口,剥离椎旁肌肉以暴露T_{9~10}段脊 髓,咬除T₈椎板,见图1。采用改良Allen重物坠 落法制作大鼠脊髓损伤模型^[4],用30 g重物由 5 cm高度坠落打击开放的SD大鼠脊髓,打击后 出现打击处淤血,术中保持硬脊膜完整性,SD 大鼠出现弓背现象则提示建模成功。



脊髓组织标本制备:分别于术后相应时间点 取各组大鼠,麻醉处死后,40 g/L多聚甲醛经左 心室灌注固定,置300 g/L蔗糖中4 ℃过夜,恒 冷箱中行连续纵行矢状切片,片厚20 μm,冷贴 片,每个脊髓标本裱为10套,玻片上脊髓切片 的间隔为200 μm。

苏木精-伊红染色观察并测量胶质瘢痕的厚度: 脊髓切片室温下放置1h,二甲苯处理,乙醇梯 度脱水,进行常规的苏木精-伊红染色,中性树 胶封固,在显微镜下观察并测量瘢痕的厚度。

免疫组化及免疫荧光染色观察脊髓GFAP和 NF-200的表达:脊髓切片室温下放置1 h,加入 PBS漂洗3次,加入一抗4 ℃(1:100)过夜, PBS漂洗3次,荧光二抗4 ℃孵育8 h,PBS漂 洗4次后水溶性封片剂进行封固。荧光显微镜下 观察。

主要观察指标:损伤脊髓组织瘢痕形成情况及GFAP和NF-200的表达。

统计学分析:所有计量数据用**x±s**表示,用 SPSS 12.0统计软件进行*t*检验分析,*P*<0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验共纳入**110**只大 鼠均进入结果分析。

2.2 脊髓组织的病理学改变 苏木精-伊红染 色显示脊髓损伤5d,可见脊髓损伤部位充血, 硬膜下为深蓝色,硬膜与周围组织分界不是很 清楚,存在轻度粘连,见图2a。脊髓损伤后10 周可见脊髓损伤处有致密瘢痕增生,并与背侧 硬膜发生紧密粘连,形成光滑的囊腔壁,见图 2b。



2.3 脊髓胶质瘢痕厚度 胶质瘢痕界限标志 为胞体明显增大、突起增多,瘢痕组织内无轴 突长入。边界之间长度为胶质瘢痕组织厚度, 对囊腔壁胶质瘢痕的厚度进行测量,结果显示,除了损伤后12周组外,其余每一组大鼠的脊髓胶质瘢痕厚度与前一组比较差异均有非常显著性意义(*P* < 0.01),损伤后1 d至术后4周厚度均增加,损伤后4~10周厚度呈平稳下降趋势,术后10~12周达到稳定,见表1。

Table 1 Thickness of gial scar after spinal cord injury in rat ($\bar{x}\pm s, n=10$,				
Group	Thickness of glial scar	ť*	P*	
Control	0.000±0.000	-	-	
1 d	20.440±1.751	-26.103	0.000	
3 d	30.214±1.524	-13.988	0.000	
5 d	38.526±2.320	-4.989	0.008	
1 wk	49.544±1.366	-8.047	0.001	
2 wk	73.150±1.228	-22.514	0.000	
4 wk	119.942±2.004	-46.038	0.000	
6 wk	109.846±1.514	7.277	0.002	
8 wk	104.634±1.309	8.841	0.001	
10 wk	104.324±1.284	15.500	0.000	
12 wk	104.318±1.284	2.445	0.070	

2.4 损伤脊髓组织 GFAP 和 NF-200 的表达 免疫组 化染色显示,脊髓损伤后 5 d 可见大量 GFAP 阳性细 胞,胞体增大、突起增多延长,见图 3a。脊髓损伤后 10 周,AS 主要集中于损伤部的边缘,损伤区囊腔周 围的胶质瘢痕内可见密集的 AS,较少分布于远离损伤 处的区域,见图 3b。



免疫荧光染色显示,正常轴突在 AS 中排列整齐, 术后细胞活化,突起增多,胞体开始肥大,相互交错 从而影响轴突的延伸,最后形成的致密的胶质瘢痕围 绕着囊腔,轴突被彻底阻挡,无法进入囊腔内。囊腔 壁为 GFAP 阳性(绿色)的 AS,囊腔内无 GFAP 阳性细 胞,见图 4。未见 NF-200 阳性轴突(红色)位于囊腔内, 空洞周围残留脊髓内可观察到残存轴突,空洞附近少 见轴突,不见残存轴突穿过空洞壁,轴突与囊腔有一 定距离。



3 讨论

脊髓损伤的再生修复是近几年研究的热点^[5],脊髓 损伤后,AS出现明显的功能活跃及角质化,表现为增生、 肥大、突起增多,并分泌多种诱导因子^[6-8],是形成瘢痕 组织的主要影响因素。目前脊髓损伤模型较多,但尚无 统一的分型^[9-10]。实验采用改良的Allen's重物坠落法建 立大鼠脊髓损伤模型,该模型的特点是可重复性,可调 控性好,并且保持了硬脊膜的完整^[11-12]。观察脊髓胶质 瘢痕的病理变化发现,大鼠脊髓损伤后24,72h,损伤 处出血、神经细胞水肿、坏死物质液化形成囊腔,囊腔 属于胶质瘢痕的一部分,随着损伤的进展而趋于稳定。 损伤后5d开始出现细胞坏死、细胞核固缩。损伤后1周, 髓腔形成空洞且产生大量的胶质瘢痕。损伤后2周,以 损伤处为中心,灰质大部分崩解,残存部分白质中开始 形成囊腔,与周围分界不清,出血基本吸收。损伤后4 周见损伤处硬膜下脊髓内有致密的脊髓瘢痕增生,在损

伤部形成位于脊髓中心的纵行囊腔,直接损伤区的残留 白质最少、囊腔直径最大,囊腔壁薄,腔内可见大量泡 沫细胞。损伤后10周,损伤区的囊腔稳定,大小基本趋 向于无变化。

相关研究显示,脊髓胶质瘢痕的形成是脊髓损伤后 神经再生障碍的重要原因^[13],增生的瘢痕组织在液化区 和正常组织之间形成障碍,阻止轴突的生长^[14]。而瘢痕 阻碍轴突再生的屏障作用主要有两方面:由AS形成的机 械性屏障和由硫酸软骨素蛋白聚糖组成的化学性屏障。 在损伤刺激下,大量AS快速激活分裂,交织成网状, AS活化的早期分泌有害因子,形成化学性胶质屏障而阻 碍轴突再生、延长、融合,因此AS在胶质瘢痕组织的形 成中有重要作用^[15]。胶质瘢痕将空洞与周围脊髓组织隔 离,胶质瘢痕中的AS表现为胞体增大、突起增多变 粗^[16]。GFAP是AS的主要骨架蛋白之一,能在AS中大 量且特异性的表达^[17-18]。利用GFAP作为AS特异性标志 物,可探讨脊髓损伤大鼠损伤后AS的表达及分布情 况^[19]。实验结果显示,AS被激活后趋于稳定是在伤后 10周,此时囊腔内无GFAP阳性细胞,未见NF-200阳性 轴突位于囊腔内,明显存在阻碍轴突再生的机械性屏 障。

相关研究表明,脊髓损伤后进入陈旧期,囊腔的最 长直径会趋于稳定^[20]。实验对损伤后胶质瘢痕厚度进行 测量,在损伤后4周内厚度呈不断增加的趋势,术后4~10 周,瘢痕厚度呈下降趋势,并于术后10周达到稳定,术 后10~12周观察瘢痕厚度已经稳定无变化。损伤后10周 空洞稳定,胶质瘢痕中AS细胞不再变化,交织成网状而 形成致密的胶质瘢痕。提示对脊髓瘢痕的干预措施要在 其瘢痕组织形态稳定,囊腔不再变化之后实施,以排除 对瘢痕变化存在影响的自身干扰因素,更好地评估干预 措施的效果。若时间的定位不明确,可能导致后期干预 实验对瘢痕的疗效评估出现误差,影响干预实验的准确 性,客观性。

对实验性大鼠脊髓损伤后脊髓胶质瘢痕形成规律 进行研究,有助于了解胶质瘢痕形态、空间特征、瘢痕 形成的时间规律,为准确定位、正确评估干预疗效提供 信息,尽量避免瘢痕自身的发生发展对实验的干扰因 素。

4 参考文献

- Fan P, He XJ. Meizhong Guoji Chuangshang Zazhi. 2007;6(2): [1] 54-57. 樊沛,贺西京.嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤应用进展[J].美中国际创伤
- 杂志,2007,6(2):54-57. Li XG, Yang ZY, Zhang AF, et al. Repair of thoracic spinal cord [2] injury by chitosan tube implantation in adult rats. Biomaterials. 2009:30:1121-1132.
- Houle JD, Tessler A. Repair of chronic spinal cord injury. Exp [3] Neurol. 2003;182(2):247-260

- Xu ST, Guo SF. Beijing: Renmin Weisheng Chubanshe. 2002. 胥少汀,郭世绂.脊髓损伤基础与临床[M].2版.北京:人民卫生出版 [4] 社,2002.
- [5] Arishima Y, Setoguchi T, Yamaura I, et al. Preventive effect of erythropoietin on spinal cord cell apoptosis following acute traumatic injury in rats. Spine (Phila Pa 1976). 2006;31(21): 2432-2438.
- Alexanian AR, Svendsen CN, Crowe MJ, et al. Transplantation of [6] human glial-restricted neural precursors into injured spinal cord promotes functional and sensory recovery without causing allodynia. Cytotherapy. 2011;13(1):61-68. Li KX, Wang WS, Shi CH. Shiyong Yixue Zazhi. 2011;27(22):
- [7] 4034-4036. 李宽新,王维山,史晨辉.大鼠急性脊髓损伤后神经胶质酸性蛋白的表达意义[J].实用医学杂志,2011,27(22):4034-4036.
- Miyashita T, Koda M, Kitajo K, et al. Wnt-Ryk signaling mediates [8] axon growth inhibition and limits functional recovery after spinal
- experimental spinal conductors and a limit to the analysis of the spinal recovery and spinal cord injury. Neurotrauma. 2009;26(7):955-964. Baydin A, Cokluk C, Aydin K. A new minimally invasive experimental spinal cord injury model in rabbits. Minim Invasive Neurosurg. 2007;50(3):170-172. Fukuda S, Nakamura T, Kishigami Y, et al. New canine spinal cord [9]
- [10] injury model free from laminectomy. Brain Res Brain Res Protoc. 2005;14(3):171-180.
- Colak A, Antar V, Karaoğlan A, et al. Q-VD-OPh, a pancaspase [11] inhibitor, reduces trauma-induced apoptosis and improves the recovery of hind-limb function in rats after spinal cord injury. Neurocirugia (Astur). 2009;20(6):533-540.
- Zhang J, Zhang A, Sun Y, et al. Treatment with immunosuppressants FTY720 and tacrolimus promotes functional [12] recovery after spinal cord injury in rats. Tohoku J Exp Med. 2009; 219(4):295-302
- Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. Nat Rev Neurosci. 2004;5(2):146-156. [13]
- [14] Vos P E, Jacobs B, Andriessen TM, et al. GFAP and S100B are biomarkers of traumatic brain injury: an observational cohort study. Neurology. 2010;75(20):1786-1793.
- [15] Wu L, Li JJ, Chen L, et al. Zhongguo Kangfu Lilun yu Shijian.
- 2010;16(3):201-204. 武亮,李建军,陈亮,等.抑制脊髓损伤后星形胶质细胞增殖和胶质瘢 痕形成的研究进展[J].中国康复理论与实践,2010,16(3):201-204. Hu R, Zhou JJ, Wu GC, et al. Zhonghua Shenjing Waike Zazhi. [16] 2008;24(4):304-306.
- 2006,24(4):304-305. 朝荣,周建军,吴国材,等,大鼠脊髓损伤后轴突病理变化与胶质瘢痕 的关系[J].中华神经外科杂志,2008,24(4):304-306. Horner PJ, Gage FH. Regenerating the damaged central nervous system. Nature. 2000;407(6807):963-970. Yang MK, Sheng WB. Zhongguo Jizhu Jisui Zazhi. 2011;21(11):
- [17]
- [18] 947-951.
- 杨明坤,盛伟斌.星形胶质细胞在脊髓损伤修复中的作用[J].中国脊柱 脊髓杂志,2011,21(11):947-951.
- Li KX, Li F. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;15(20):3657-3661. 李宽新,李锋.脊髓损伤模型大鼠神经胶质细胞增殖与胶质纤维酸性 [19] 蛋白的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2010,15(20): 3657-3661
- Hill CE, Beattie MS, Bresnahan JC. Degeneration and sprouting [20] of identified descending supraspinal axons after contusive spinal cord injury in the rat. Exp Neurol. 2001;171:153-169.

来自本文课题的更多信息---

基金声明: 国家自然科学基金项目(81060106)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计及实施, 实验评估为 第二作者,资料收集和成文为第一作者,第二作者审校,第 一作者对文章负责。

利益冲突:课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济 组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求:实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标 准(审批号: A-20101020012)。

本文创新性:对脊髓损伤后胶质瘢痕自然转归的过程做 出了完整的观测,明确了脊髓损伤后胶质瘢痕厚度稳定的具 体时相。