

脊神经后根切断大鼠脊髓后角神经元和星形胶质细胞变化及白细胞介素 1 β 和胶质纤维酸性蛋白的表达

陈国栋¹, 郑美妍¹, 张鹏¹, 王振超², 金利新³

https://doi.org/10.12307/2022.948

投稿日期: 2021-11-27

采用日期: 2022-01-22

修回日期: 2022-04-14

在线日期: 2022-04-28

中图分类号:

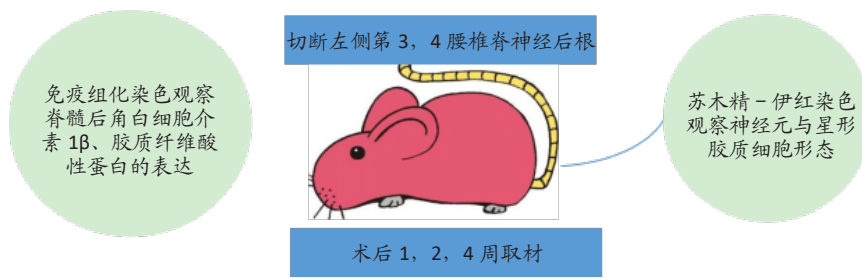
R459.9; R394.2; R686.5

文章编号:

2095-4344(2023)05-00726-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 脊神经后根切断对大鼠脊髓后角神经元、星形胶质细胞及白细胞介素 1 β 和胶质纤维酸性蛋白表达的影响



文题释义:

胶质纤维酸性蛋白: 是星形胶质细胞的标志性蛋白, 是一个中间丝蛋白家族, 其表达量反映了星形胶质细胞的增殖水平, 中枢神经系统疾病或损伤后, 星形胶质细胞反应性高表达胶质纤维酸性蛋白。

白细胞介素 1 β : 其可以在多种细胞中合成和分泌, 在脊髓中主要由星形胶质细胞和神经元分泌, 但其主要是在受外界抗原刺激后才能合成和分泌。创伤刺激神经胶质细胞可诱导白细胞介素 1 等细胞因子的大量表达; 神经根受到机械性和(或)生物化学性影响后, 脊髓神经元和星形胶质细胞反应性表达细胞因子白细胞介素 1 β 增加。

摘要

背景: 脊髓损伤后星形胶质细胞过度角质化对脊髓的修复再生既有积极作用又有消极作用, 如何调控星形胶质细胞角质化到一个合适的程度, 以使其充分发挥正作用是脊髓损伤的一个研究重点。

目的: 观察脊神经后根切断对大鼠脊髓后角神经元、星形胶质细胞及白细胞介素 1 β 和胶质纤维酸性蛋白表达的影响。

方法: 取 33 只成年 Wistar 大鼠, 采用随机抽签法分为对照组($n=3$)与实验组($n=30$)。分离暴露实验组大鼠左右侧第 3、4 腰椎神经后根, 切断左侧第 3、4 腰椎神经后根(实验组手术侧), 右侧不做处理(实验组对照侧); 对照组大鼠不做任何处理。术后 1、2、4 周麻醉后处死大鼠, 取第 3、4 腰椎脊髓组织, 苏木精-伊红染色观察脊髓后角神经元和星形胶质细胞形态学变化, 免疫组化染色观察脊髓后角白细胞介素 1 β 和胶质纤维酸性蛋白的表达。

结果与结论: ①苏木精-伊红染色: 脊神经后根切断后 1、2 周, 实验组手术侧感觉神经元的细胞核和胞浆均发生变化, 术后 4 周神经元出现细胞凋亡; 星形胶质细胞活化, 细胞增多、胞体增大、突起增多, 其数量于术后 2 周达峰值; 实验组手术侧术后 2、4 周的感觉神经纤维数量少于实验组对照侧、对照组($P < 0.05$), 术后 1、2、4 周的星形胶质细胞数量多于实验组对照侧、对照组($P < 0.05$); ②免疫组化染色: 脊神经后根切断后, 实验组手术侧白细胞介素 1 β 和胶质纤维酸性蛋白阳性表达增强, 于术后 2 周达峰值, 实验组手术侧术后 1、2、4 周的胶质纤维酸性蛋白与白细胞介素 1 β 阳性细胞平均吸光度值均高于实验组对照侧、对照组($P < 0.05$); ③结果表明, 脊神经后根切断可引起脊髓后角感觉神经元数量减少、星形胶质细胞反应性增殖, 增强白细胞介素 1 β 和胶质纤维酸性蛋白表达。

关键词: 脊神经后根切断; 胶质纤维酸性蛋白; 白细胞介素 1 β ; 星形胶质细胞; 脊髓后角感觉神经元

Changes in sensory neurons and astrocytes and the expression of interleukin 1beta and glial fibrillary acidic protein in the rat spinal cord after selective dorsal rhizotomy

Chen Guodong¹, Zheng Meiyang¹, Zhang Peng¹, Wang Zhenchao², Jin Lixin³

¹Chengwu Hospital, Heze 274000, Shandong Province, China; ²PLA Navy Submarine Academy, Qingdao 266000, Shandong Province, China; ³Department of Anatomy, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China

Chen Guodong, Master, Attending physician, Chengwu Hospital, Heze 274000, Shandong Province, China

Corresponding author: Jin Lixin, Associate professor, Department of Anatomy, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Excessive keratinization of astrocytes after spinal cord injury forms a mechanical barrier to repair the spinal cord and also plays an active role in spinal cord repair and regeneration. The regulation of keratinization to a suitable extent, to make it fully exert positive effects and decrease negative effects, is

¹ 成武县人民医院, 山东省菏泽市 274000; ² 海军潜艇学院, 山东省青岛市 266000; ³ 青岛大学医学部解剖教研室, 山东省青岛市 266000

第一作者: 陈国栋, 男, 1983 年生, 山东省菏泽市人, 汉族, 2015 年青岛大学医学院毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事骨关节与运动损伤研究。

通讯作者: 金利新, 副教授, 青岛大学医学部解剖教研室, 山东省青岛市 266000

https://orcid.org/0000-0002-1260-2397 (陈国栋)

基金资助: 山东省医药卫生科技发展计划项目 (202104070403), 项目负责人: 陈国栋; 青岛大学医学院国家级实验教学示范中心创新实验项目 (201511065055), 项目负责人: 金利新

引用本文: 陈国栋, 郑美妍, 张鹏, 王振超, 金利新. 脊神经后根切断大鼠脊髓后角神经元和星形胶质细胞变化及白细胞介素 1 β 和胶质纤维酸性蛋白的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(5):726-731.



really a challenge to the research of spinal cord injury.

OBJECTIVE: To observe the alteration of sensory neurons and astrocytes in the rat spinal dorsal horn, as well as the expression of interleukin-1 β and glial fibrillary acidic protein in the abovementioned cells after a selective dorsal rhizotomy.

METHODS: Thirty-three adult healthy Wistar rats were randomly divided into control group ($n=3$) and experimental group ($n=30$). On the operation side of the experimental group, the dorsal roots of the left lumbar 3 and 4 spinal nerves were exposed, separated, and cut off, while on the control side of the experimental group, the dorsal roots of the right lumbar 3 and 4 spinal nerves were only exposed and separated. The control group did not undergo any treatment. The rats were sacrificed under anesthesia at 1, 2, and 4 weeks after operation, and the segmental tissues of lumbar segments 3 and 4 were taken to make paraffin sections. The morphological changes of neurons and astrocytes in the rat spinal dorsal horn were observed by hematoxylin-eosin staining. The expression of interleukin-1 β and glial fibrillary acidic protein in the spinal cord dorsal horn was observed by immunohistochemical staining.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Hematoxylin-eosin staining: 1 and 2 weeks after selective dorsal rhizotomy, there were changes in the nuclei and cytoplasm of sensory neurons on the surgical side of the experimental group and at 4 weeks after operation, apoptosis in neurons appeared. Astrocytes were activated and the number of the cells increased accompanied by enlarged cell body and increased processes and reached a peak at 2 weeks after operation. The number of sensory nerve fibers on the surgical side of the experimental group was less than that on the control side of the experimental group and in the control group at 2 and 4 weeks after operation ($P < 0.05$), while the number of astrocytes was higher than that on the control side of the experimental group and in the control group at 1, 2, and 4 weeks after operation ($P < 0.05$). (2) Immunohistochemical staining: The positive expressions of interleukin-1 β and glial fibrillary acidic protein on the surgical side of the experimental group were enhanced and peaked at 2 weeks after selective dorsal rhizotomy. The average absorbance values of glial fibrillary acidic protein and interleukin-1 β positive cells on the surgical side of the experimental group were higher than those on the control side of the experimental group and in the control group ($P < 0.05$). (3) To conclude, selective dorsal rhizotomy can lead to a decrease in the number of sensory neurons in the dorsal horn of the spinal cord, reactive proliferation of astrocytes, and increased expression of interleukin-1 β and glial fibrillary acidic protein.

Key words: selective dorsal rhizotomy; glial fibrillary acidic protein; interleukin-1 β ; astrocyte; sensory neurons in the spinal dorsal horn

Funding: Shandong Provincial Medical and Health Science and Technology Development Plan, No. 202104070403 (to CGD); the Innovative Experimental Project of National Experimental Teaching Demonstration Center of Qingdao University School of Medicine, No. 201511065055 (to JLX)

How to cite this article: CHEN GD, ZHENG MY, ZHANG P, WANG ZC, JIN LX. Changes in sensory neurons and astrocytes and the expression of interleukin 1beta and glial fibrillary acidic protein in the rat spinal cord after selective dorsal rhizotomy. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(5):726-731.

0 引言 Introduction

脊髓损伤给患者的生活质量带来极大影响,同时也给社会带来沉重的经济负担^[1-2],近年来,脊髓损伤和周围神经损伤的再生修复已成为国内外的研究热点和难点。脊髓损伤后,脊髓中星形胶质细胞增殖并分泌神经生长因子3、脑源性神经营养因子等神经营养因子促进神经的再生修复,但星形胶质细胞过度增殖角质化可形成瘢痕屏障及导致炎症,这些均阻碍了神经轴突的修复再生^[3]。脊髓胶质瘢痕主要由反应性星形胶质细胞、成纤维样细胞、周细胞、少突细胞前体细胞、髓系来源炎症细胞和免疫细胞组成^[4]。临床中脊髓病变、神经根损伤或截瘫患者的神经功能修复效果较差,给患者的功能恢复和生活质量带来很大影响。

星形胶质细胞广泛存在于神经系统中,是重要的胶质细胞。神经系统损伤后,星形胶质细胞会表达多种特异性标记物^[5],胶质纤维酸性蛋白是星形胶质细胞的标志性蛋白^[6],其表达量反映了星形胶质细胞的增殖水平。胶质纤维酸性蛋白是一个中间丝蛋白家族,包括波形蛋白、巢蛋白和其他组成细胞结构功能性蛋白^[7]。对转基因大鼠的研究显示,胶质纤维酸性蛋白在正常形态和功能的星形胶质细胞内低表达,而在反应性星形胶质细胞增生和胶质瘢痕形成过程中高表达^[8]。胶质纤维酸性蛋白主要表达在星形胶质细胞的突起中,并会分泌到血液、脑脊液等体液中,可用来评价神经损伤程度及其预后^[9-10];也有研究显示胶质纤维酸性蛋白可在中枢神经系统外很多组织内的多种类型细胞中表达,如周围神经节中的卫星细胞等^[11]。中枢神经系统患病或损伤后,星形胶质细胞反应性高表达胶质纤维酸性蛋白,在星形胶质细胞的突起和细胞体内可以通过免疫组化方法标记出来^[12]。胶质纤维酸性蛋白已被认为是评价中枢神经系统疾病或损伤变化情况的一项指标^[13]。白细胞介素1 β 是炎症反应的关键引发病,对细胞活化和细胞因子的产生都具有重要贡献^[14]。脊髓损伤后星形胶质细胞和神经元分泌的炎性因子(白细胞介素1 β 、

肿瘤坏死因子 α 等)大量积聚并侵入到脊髓损伤部位,从而导致继发性炎症反应,加重脊髓损伤^[15],控制并减轻脊髓损伤后发生的炎症反应能够减轻脊髓损伤。但是,目前临床上尚未形成治疗脊髓损伤的标准方案,亟需研究更安全、可靠和有效的治疗方法^[16]。

既往研究多集中在脊髓损伤或周围神经损伤后神经元或星形胶质细胞的变化及因子表达情况,对单纯感觉传入损伤或单纯运动传出损伤的研究较少,而且临床也较多见脊髓空洞症、糖尿病周围神经病变、神经后根损伤等单纯感觉传入损伤的病例。所以,观察脊神经后根切断后大鼠脊髓后角的变化特点及病理机制,对于探讨认识感觉缺失引起的脊髓变化及运动功能改变具有重要意义。此次实验采用大鼠第3、4腰神经后根切断手术来建立一个单纯的感觉传入损伤动物模型,拟研究单纯感觉传入损伤后星形胶质细胞和神经元的变化,以及白细胞介素1 β 、胶质纤维酸性蛋白的表达情况,观察单纯感觉传入损伤后星形胶质细胞与神经元的变化情况及其机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验,组间比较进行t检验。

1.2 时间及地点 实验于2014年10月至2015年4月在青岛大学医学院脑血管研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 成年健康Wistar大鼠33只,雌雄不拘,体质量(225.6 \pm 26.8)g,由青岛市药检所动物中心提供,许可证号:SCXK(鲁)2014-0001。饲养环境:普通饲料饲养,自由进食,恒温恒湿,SPF级,温度20-25 $^{\circ}$ C,相对湿度40%-70%。实验经青岛大学医学院动物实验伦理委员会批准,整个实验阶段对大鼠处理完全遵从人道主义原则。

1.3.2 实验试剂和仪器 兔抗人胶质纤维酸性蛋白多克隆抗体、白细胞介素1 β 多克隆抗体、山羊抗兔IgG(北京博奥森

生物科技有限公司); 伊红及苏木精染液(天津福德士科技有限公司); 光学显微镜(日本尼康公司); 石蜡切片机(德国 LEICA); 低温冰箱(-20 °C)(中国海尔有限公司); 生物组织自动包埋机、自动脱水机(中国孝感阔海医疗科技有限公司); 生物组织摊烤片机(中国孝感亚光医用电子技术有限公司); 电热恒温培养箱(中国上海三发科学仪器有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组及制作模型 采用随机抽签法将 33 只 Wistar 大鼠分为对照组(3 只)和实验组(30 只)。对照组不做任何处理。无菌条件下,分离暴露实验组大鼠左右侧第 3, 4 腰神经后根,切断左侧第 3, 4 腰神经后根并将其两断端翻转 180°,保留脊神经前根的完整性(手术侧);右侧第 3, 4 腰神经后根不做任何处理(对照侧)。给予抗生素预防术区感染。术后分笼喂养,室温 20-25 °C。每日观察大鼠切口及手术侧下肢感觉和运动情况。用下肢钳夹实验和针刺实验检查下肢感觉情况,应用国际通用的改良 Tarlov 评分标准对实验大鼠下肢运动功能进行评分^[17],见表 1。所有大鼠钳夹及针刺实验均(-),无疼痛反应,脊神经后根完全切断,实验组有 3 只大鼠术后 1 周改良 Tarlov 评分未达到 4 级,考虑脊神经前根损伤所致,不用于实验,术后 1, 2, 4 周每个时间点 9 只大鼠。

表 1 | 改良 Tarlov 评分标准
Table 1 | Improved Tarlov scoring standard

分级	表现
0 级	后肢无活动,不能负重
1 级	后肢可见活动但不能负重
2 级	后肢活动频繁有力,不能负重
3 级	后肢可支持体质量,能走一二步
4 级	可行走,仅有轻微障碍
5 级	行走正常

1.4.2 实验取材 对照组于制作实验组动物模型时即获取第 3, 4 腰神经后根对应脊髓节段。术后 1, 2, 4 周,实验组分别取改良 Tarlov 评分≥4 级大鼠的第 3, 4 腰对应脊髓节段。3%戊巴比妥钠(1 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠后,仰卧固定在手术台上,切开胸腔暴露心脏,用粗针头经心尖穿入主动脉后并固定,剪开右心耳放血,快速注入温生理盐水 200 mL,然后用 200 mL 固定液持续滴注 1 h 后取材^[18]。暴露并完整取下整根脊髓,浸泡于含 40 g/L 多聚甲醛的 PBS 固定液中,常规固定 24 h。脊髓组织行水平全层切片,片厚 4.0-5.0 μm。

1.5 主要观察指标

苏木精-伊红染色:光镜下对比观察各组脊髓左右侧感觉神经元及星形胶质细胞变化情况。

免疫组化染色:免疫组化染色观察脊髓后角白细胞介素 1β 和胶质纤维酸性蛋白的表达。取脊髓组织切片,温箱 60 °C 预热 30 min,载玻片预先用多聚赖氨酸处理。经二甲苯及体积分数 100%, 95%, 80%, 70% 浓度乙醇脱蜡至水,各 10 min,用蒸馏水冲去残留的乙醇成分。体积分数 3% H₂O₂ 去离子水孵育 5-10 min,以消除内源性过氧化物酶活性。

PBS 冲洗, 3 min×3 次。滴加 10% 的封闭用正常山羊血清工作室孵育 10-15 min,倾去,勿洗。分别滴加兔抗人胶质纤维酸性蛋白多克隆抗体(稀释比为 1 : 100)和白细胞介素 1β 多克隆抗体(稀释比为 1 : 100),37 °C 孵育 2 h。PBS 冲洗, 3 min×3 次。滴加生物素标记的山羊抗兔 IgG, 37 °C 孵育 10-15 min。PBS 冲洗, 3 min×3 次。滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液, 37 °C 孵育 10-15 min。PBS 冲洗, 3 min×3 次。DAB 显色 15-30 min,显微镜下掌握染色程度。自来水充分冲洗,苏木精复染 2 min,盐酸乙醇分化,自来水冲洗 10 min。经体积分数 70%, 80%, 95% 乙醇梯度各 5 min 脱水后,转入无水乙醇脱水。二甲苯 I、二甲苯 II 各透明 10 min,中性树脂胶封固,光镜下对比观察各时间点脊髓切片中胶质纤维酸性蛋白及白细胞介素 1β 表达情况,利用 Image 图像分析系统软件分析免疫组化平均吸光度值。

图像分析:苏木精-伊红染色下,星形胶质细胞是体积最大的一种胶质细胞,核大、浅染,呈卵圆形或圆形,而感觉神经元体积较星形胶质细胞小,核小、深染,呈椭圆形或三角形。每个标本分别随机选取 4 个切片于 400 倍光镜下观察,取其平均数,计数出脊髓后角星形胶质细胞、感觉神经元细胞个数。白细胞介素 1β、胶质纤维酸性蛋白免疫组化染色平均吸光度值反映其表达强度。

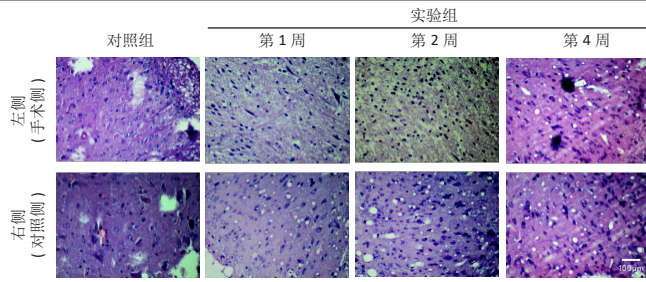
1.6 统计学分析 脊髓后角感觉神经元、星形胶质细胞的细胞数量以及免疫组化胶质纤维酸性蛋白、白细胞介素 1β 阳性细胞平均吸光度值均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。统计学方法已经青岛大学统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 共纳入 33 只 Wistar 大鼠,其中对照组 3 只、实验组 30 只,实验组术后 1 周改良 Tarlov 评分未达到 4 级 3 只,予以剔除,最后共进入结果分析大鼠 30 只。

2.2 各组脊髓组织苏木精-伊红染色结果 脊神经后根切断后,实验组手术侧术后 1, 2 周对应节段脊髓后角中感觉神经元的细胞核和胞浆均发生变化,细胞核由细胞中心移向细胞边缘,染色质深染,术后 4 周神经元中出现新月小体开始发生细胞凋亡;星形胶质细胞的核比其他胶质细胞的核大,呈圆形或卵圆形,染色浅,核仁不明显,星形胶质细胞活化,细胞增多、胞体增大、突起增多,见图 1。

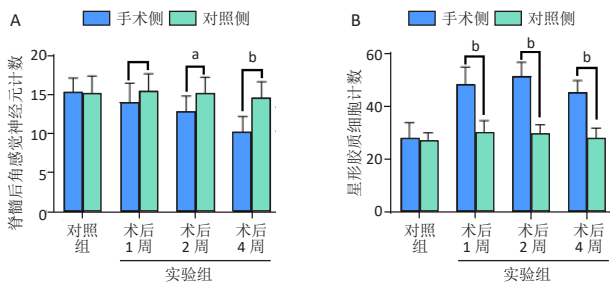
随着术后时间的推移,实验组手术侧脊髓后角感觉神经元计数逐渐减少($P < 0.05$);术后 1 周,实验组手术侧脊髓后角感觉神经元计数与实验组对照侧比较差异无显著性意义($P > 0.05$);术后 2, 4 周,实验组手术侧脊髓后角感觉神经元计数少于实验组对照侧($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),见图 2A。切断脊神经后根后,实验组手术侧星形胶质细胞数量增多,术后 2 周的星形胶质细胞数量多于术后 1, 4 周($P < 0.05$);实验组手术侧术后 1, 2, 4 周的星形胶质细胞数量均多于实验组对照侧与对照组($P < 0.001$),见图 2B。



图注：实验组手术侧术后1, 2周脊髓后角中感觉神经元的细胞核和胞浆均发生变化，细胞核由细胞中心移向细胞边缘，染色质深染，术后4周神经元中出现新月小体开始发生细胞凋亡；星形胶质细胞呈圆形或卵圆形，染色浅，核仁不明显，星形胶质细胞活化，细胞增多、胞体增大、突起增多。标尺=100 μm

图1 | 各组大鼠双侧脊髓后角苏木精-伊红染色

Figure 1 | Hematoxylin-eosin staining of the dorsal horn of the rat spinal cord in each group

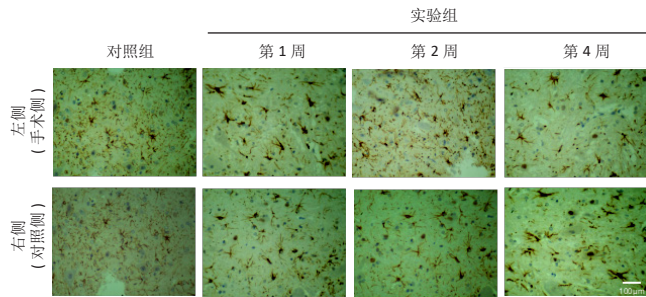


图注：A为感觉神经元计数，B为星形胶质细胞计数。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.001$

图2 | 各组大鼠双侧脊髓后角感觉神经元及星形胶质细胞计数

Figure 2 | Counts of sensory neurons and astrocytes in the dorsal horn of the rat spinal cord in each group

2.3 各组大鼠脊髓组织胶质纤维酸性蛋白免疫组化染色结果见图3。



图注：术后1, 2, 4周，实验组手术侧胶质纤维酸性蛋白表达增强，表达面积明显增大，其中以术后2周时表达面积最大。标尺=100 μm

图3 | 各组大鼠双侧脊髓后角胶质纤维酸性蛋白阳性细胞 (免疫组化染色)

Figure 3 | Glial fibrillary acidic protein positive cells in the dorsal horn of the rat spinal cord in each group (immunohistochemical staining)

免疫组化下胶质纤维酸性蛋白表达增强表现为棕色或红棕色染色加深，表达面积明显增大。切断脊神经后根后，实验组手术侧胶质纤维酸性蛋白阳性细胞平均吸光度值增大，术后2周的胶质纤维酸性蛋白阳性细胞平均吸光度值大于术后1, 4周 ($P < 0.05$)；实验组手术侧术后1, 2, 4周的胶质纤维酸性蛋白阳性细胞平均吸光度值均大于实验组对照侧、对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)，见图4。

2.4 各组大鼠脊髓组织白细胞介素1β免疫组化染色结果见图5。

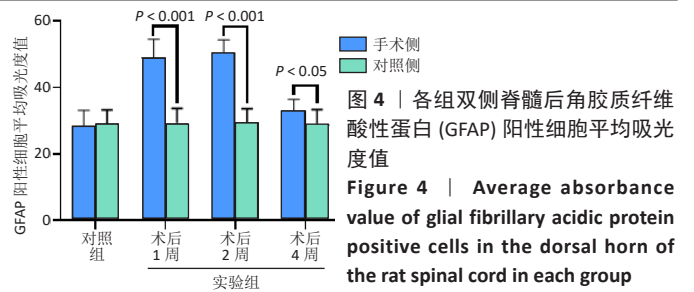
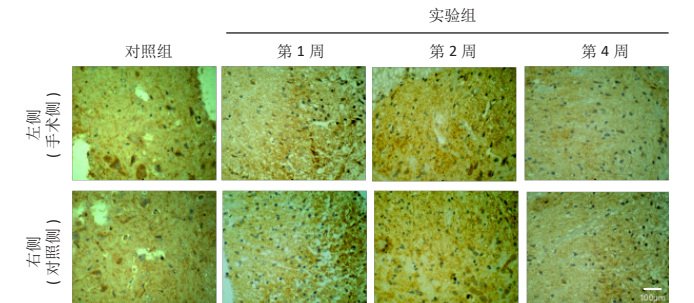


图4 | 各组双侧脊髓后角胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 阳性细胞平均吸光度值

Figure 4 | Average absorbance value of glial fibrillary acidic protein positive cells in the dorsal horn of the rat spinal cord in each group



图注：术后1, 2, 4周，实验组手术侧白细胞介素1β表达增强，其中以术后2周时表达最强烈。标尺=100 μm

图5 | 各组双侧脊髓后角白细胞介素1β阳性细胞 (免疫组化染色)

Figure 5 | Interleukin-1β positive cells in the dorsal horn of the rat spinal cord in each group (immunohistochemical staining)

大鼠脊神经后根切断后1, 2周，实验组手术侧免疫组化白细胞介素1β表达强烈，可见阳性颗粒，白细胞介素1β阳性颗粒大多分布在手术侧脊髓后角神经胶质细胞和后角浅层神经元上。切断脊神经后根后，实验组手术侧白细胞介素1β阳性细胞平均吸光度值增大，术后2周的白细胞介素1β阳性细胞平均吸光度值大于术后1, 4周 ($P < 0.05$)；实验组手术侧术后1, 2, 4周的白细胞介素1β阳性细胞平均吸光度值均大于实验组对照侧、对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)，见图6。

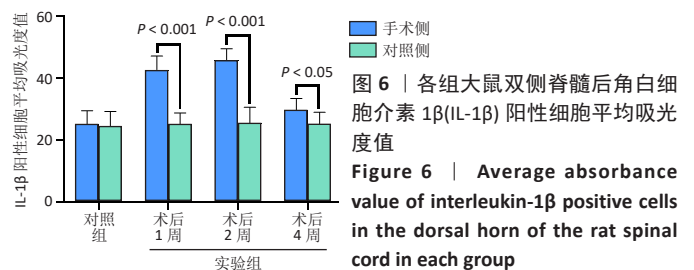


图6 | 各组大鼠双侧脊髓后角白细胞介素1β (IL-1β) 阳性细胞平均吸光度值

Figure 6 | Average absorbance value of interleukin-1β positive cells in the dorsal horn of the rat spinal cord in each group

3 讨论 Discussion

既往研究显示，脊髓损伤后星形胶质细胞过度角质化形成胶质瘢痕，以及分泌硫酸软骨素等抑制成分，成为轴突再生和髓鞘形成的机械性和化学性阻碍^[3]，其形成一圈致密结构紧紧将病变部位包裹，以限制炎症反应的扩散，起到保护周围未受损神经组织的作用^[19]；同时，活化的星形胶质细胞内有助于产生抗氧化剂抑制炎症^[20]，对脊髓损伤的修复起到积极作用，因此，如何调控星形胶质细胞角质化到一个合适的程度以使其充分发挥正作用，已经成为脊髓损伤的一个研究重点。腰脊神经后根切断后，早期手术部位对应节段脊髓

后角中感觉神经元的细胞核由细胞中心移向细胞边缘, 染色质深染, 后期神经元中出现新月小体, 开始出现细胞凋亡, 文献报道神经损伤后感觉神经元胞体死亡率为15%–45%^[21-22]。中枢神经系统中细胞因子白细胞介素1 β 是被激活的星形胶质细胞和神经元合成分泌的, 与炎症反应有关, 它能够导致内皮细胞、白细胞等表达黏附分子, 使白细胞聚集增加, 介导中性粒细胞浸润, 是引起继发性损伤的一种主要炎症因子^[23]。有研究表明白细胞介素1 β 能够启动凋亡基因的表达, 参与神经细胞凋亡的过程^[24-25]。

此次实验采用大鼠左侧第3, 4腰神经后根切断手术以观察脊神经后根或单纯感觉传入损伤后脊髓后角的变化特点及病理机制, 探讨脊神经后根损伤及感觉缺失引起的脊髓变化及对运动功能的影响。大鼠脊神经后根切断后, 感觉神经元于术后1周之后逐渐降低, 到4周时基本稳定; 早期脊髓后角星形胶质细胞增殖角质化, 胶质纤维酸性蛋白表达增强, 于2周达高峰后逐渐降低, 于4周时表达降低但仍稍高于正常水平; 术后1, 2周脊髓后角白细胞介素1 β 表达增强, 到4周时表达降低但仍稍高于正常水平, 其表达主要集中在脊髓后角中的星形胶质细胞和后角浅层的神经元中。这也就说明脊神经后根损伤启动了星形胶质细胞和神经元合成白细胞介素1 β 等细胞因子介导的凋亡过程, 尤其是在损伤的早期, 局部继发性炎症反应明显增强, 所以是否有方法抑制这一凋亡过程以降低对脊神经的继发性损伤, 对于脊髓和神经根损伤等临床疾病将有重要的意义。大鼠脊神经后根切断后, 神经元和星形胶质细胞分泌的白细胞介素1 β 有多种生物学作用, 可引起脊髓继发性损伤也能够启动凋亡基因的表达, 参与神经细胞凋亡^[26-27], 神经元开始出现细胞凋亡, 感觉神经元数目降低, 到损伤后4周时星形胶质细胞及神经元数目基本不再变化, 分泌因子趋于正常。

白细胞介素1 β 和肿瘤坏死因子 α 共同参与了炎症反应的调控, 改变受损处组织细胞外基质, 故减少炎症因子在神经损伤中的负性作用或许有助于患者的神经修复^[28]。近年来, 国内外实验多集中于研究脊髓损伤或病变后如何抑制神经元凋亡以及白细胞介素1 β 对脊髓的继发性损伤, 虽有一定进展但仍未取得重大突破, 例如: 研究发现吡啶美辛能够改善损伤后的神经功能障碍^[29], 酶联蛋白A1(Ac2-26)能够减少白细胞介素1的生成, 免疫抑制剂FK506能够刺激神经细胞再生^[30], 加速受损神经的恢复, 这些药物均对神经有保护作用。脊髓或周围神经损伤早期, 星形胶质细胞促进损伤修复, 后期形成机械性屏障阻碍其修复, 如何消除胶质瘢痕屏障对脊髓或神经再生修复的机械性和化学性阻碍, 已成为近年来的研究方向^[31]。有研究表明, 骨髓间充质干细胞可以减少瘢痕组织形成、保护轴突, 促进脊髓和周围神经损伤动物的功能恢复^[32-33]; 天麻素能够促进脊髓损伤模型中运动功能的恢复, 促进神经轴突的再生, 进而促进脊髓损伤的修复^[34]。ZHENG等^[35]使用一氧化碳释放分子3递送一氧化碳治疗脊髓损伤大鼠, 发现一氧化碳可减少炎性小体的激活, 改善了组织病

理学结果。WANG等^[36]的研究发现, 基于聚唾液酸的米诺环素负载纳米药物输送系统能够改善脊髓损伤大鼠的运动功能、减少胶质瘢痕的形成, 促进神经元的再生和轴突在胶质瘢痕中延伸, 保护神经元和髓鞘免受损伤。周围神经损伤后脊髓中可以分泌多种神经营养因子和细胞因子, 发挥着各种生物学作用^[37]。胡道松等^[38]的实验发现, 外周神经损伤后大鼠脊髓运动神经元及背根节感觉神经元均出现凋亡, 神经吻合可以降低细胞凋亡数。张光运等^[39]的研究发现, 切断坐骨神经脊髓前角可见星形胶质细胞和小胶质细胞活化, 星形胶质细胞的活化早于小胶质细胞, 后期运动神经元发生凋亡。神经根受到机械性和(或)生物化学性影响后, 脊髓神经元和星形胶质细胞反应性表达细胞因子白细胞介素1 β 增加。陈云丰等^[40]发现大鼠神经后根损伤后, 脊髓后角白细胞介素1 β 阳性颗粒大多分布在同侧脊髓后角神经胶质细胞和后角浅层神经元上。LIU等^[41]发现血管内皮生长因子可以促进大鼠神经细胞在体外增殖。谢乐斯等^[42]发现切断大鼠颈神经后根后, 相应节段脊髓后角I、II层内降钙素基因相关肽阳性纤维随损伤时间的延长逐渐减少, 考虑脊髓后角内的降钙素基因相关肽主要是由背根神经节合成并经中枢突运输而来, 而脊髓前角运动神经元内降钙素基因相关肽的表达增强, 前角运动神经元脑源性神经营养因子和神经营养素3表达上调, 引发相应前角运动神经元形态和功能的可塑性改变^[43-44]。

由于周围神经为混合神经, 包括传入神经和传出神经, 所以其损伤引起的脊髓病变与周围神经损伤的关系及机制无法确切区分。从反射弧组成的角度, 损伤其局部结构可以更准确地观察脊髓病理变化。临床中, 像脊髓空洞症、糖尿病周围神经病变及神经后根损伤等单纯感觉传入损伤的病例, 以及脊髓灰质炎后遗症、肌营养不良及神经前根损伤等典型运动神经功能障碍的病例都不少见, 针对单纯感觉传入或单纯运动传出神经损伤的发病机制, 应用抑制不利因子表达的药物, 或通过积极的功能康复锻炼, 并监测其因子表达, 观察是否对运动障碍肢体产生积极作用, 进而为临床提供理论基础。当然, 要研究传入、传出损伤后脊髓细胞变化的具体机制以及如何调控此过程以促进脊髓神经恢复, 将是一个庞大复杂的实验过程, 包括: 单纯感觉传入神经损伤后脊髓前角运动神经元和中间神经元的变化情况及表达因子变化情况, 以及单纯运动传出神经损伤后脊髓各种神经元及星形胶质细胞的变化情况及表达因子情况等, 从而完整地阐述中枢神经系统损伤或周围神经损伤的病理机制, 进而对临床疾病的诊治提供重要理论基础。

结论: 脊神经后根损伤可以引起脊髓后角感觉神经元数量减少、星形胶质细胞反应性增殖, 胶质纤维酸性蛋白表达增强, 于2周达高峰后逐渐降低, 于4周时表达降低但仍稍高于正常水平; 脊神经后根损伤启动了星形胶质细胞和神经元合成白细胞介素1 β 等细胞因子介导的凋亡过程, 尤其是在损伤的早期, 局部继发性炎症反应明显增强。

作者贡献: 金利新、陈国栋进行实验设计, 实验实施为陈国栋, 实验评估为金利新、陈国栋, 资料收集为陈国栋、郑美妍、张鹏, 陈国栋、郑美妍、张鹏成文, 金利新审核。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

出版规范: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

- JAIN NB, AYERS GD, PETERSON EN, et al. Traumatic spinal cord injury in the United States, 1993-2012. *JAMA*. 2015;313(22):2236-2243.
- ZHOU Y, WANG XB, KAN SL, et al. Traumatic spinal cord injury in Tianjin, China: a single-center report of 354 cases. *Spinal Cord*. 2016;54(9):670-674.
- KARIMI-ABDOLREZAEE S, BILLAKANTI R. Reactive astrogliosis after spinal cord injury-beneficial and detrimental effects. *Mol Neurobiol*. 2012;46(2):251-264.
- BRADBURY EJ, BURNSIDE ER. Moving beyond the glial scar for spinal cord repair. *Nat Commun*. 2019;10(1):3879.
- CHENG X, WANG J, SUN X, et al. Morphological and functional alterations of astrocytes responding to traumatic brain injury. *J Integr Neurosci*. 2019;18(2):203-215.
- HERGENROEDER GW, REDELL JB, MOORE AN, et al. Biomarkers in the clinical diagnosis and management of traumatic brain injury. *Mol Diagn Ther*. 2008;12(6):345-358.
- ANDREIUOLO F, JUNIER MP, HOL EM, et al. GFAPdelta immunostaining improves visualization of normal and pathologic astrocytic heterogeneity. *Neuropathology*. 2009;29(1):31-39.
- BLECHINGBERG J, HOLM IE, NIELSEN KB, et al. Identification and characterization of GFAPkappa, a novel glial fibrillary acidic protein isoform. *Glia*. 2007;55(5):497-507.
- MEHTA T, FAYYAZ M, GILER GE, et al. Current Trends in Biomarkers for Traumatic Brain Injury. *Open Access J Neurol Neurosurg*. 2020;12(4):86-94.
- HALFORD J, SHEN S, ITAMURA K, et al. New astroglial injury-defined biomarkers for neurotrauma assessment. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(10):3278-3299.
- SOFRONIEW MV, VINTERS HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):7-35.
- 张亮, 黄绍明, 潘剑. 大鼠脊髓损伤后脑和脊髓胶质纤维酸性蛋白表达变化研究 [J]. 社区医学杂志, 2011,9(6):17-19.
- 潘剑. 大鼠脊髓半切损伤后脑和脊髓 GFAP 表达的变化 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2010.
- ALLAN SM, TYRRELL PJ, ROTHWELL NJ. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(8):629-640.
- OKADA S, HARA M, KOBAYAKAWA K, et al. Astrocyte reactivity and astrogliosis after spinal cord injury. *Neurosci Res*. 2018;126:39-43.
- HU XC, LU YB, YANG YN, et al. Progress in clinical trials of cell transplantation for the treatment of spinal cord injury: how many questions remain unanswered? *Neural Regen Res*. 2021;16(3):405-413.
- CHENG H, CAO Y, OLSON L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science*. 1996;273(5274):510-513.
- 张冬艳. CNTF 对大鼠坐骨神经切断缝合后脊髓前角 GFAP 表达的影响 [D]. 秦皇岛: 华北煤炭医学院, 2010.
- 曹祖懋, 时素华, 胡煜, 等. 针刺双向良性调控星形胶质细胞治疗脊髓损伤的研究进展 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2021,23(6):2100-2104.
- ISHII T, WARABI E, MANN GE. Circadian control of BDNF-mediated Nrf2 activation in astrocytes protects dopaminergic neurons from ferroptosis. *Free Radic Biol Med*. 2019;133:169-178.
- HART AM, TERENCEHI G, KELLERTH JO, et al. Sensory neuroprotection, mitochondrial preservation, and therapeutic potential of N-acetylcysteine after nerve injury. *Neuroscience*. 2004;125(1):91-101.
- SIU AW, ORTIZ GG, BENITEZ-KING G, et al. Effects of melatonin on the nitric oxide treated retina. *Br J Ophthalmol*. 2004;88(8):1078-1081.
- 陈宣维, 贾连顺, 林建华, 等. 大鼠脊髓损伤后白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 基因表达的变化 [J]. 骨与关节损伤杂志, 2003,18(11):764-766.
- BUSCH SA, HAMILTON JA, HORN KP, et al. Multipotent adult progenitor cells prevent macrophage-mediated axonal dieback and promote regrowth after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2011;31(3):944-953.
- MAO L, WANG HD, PAN H, et al. Sulphoraphane enhances aquaporin-4 expression and decreases spinal cord oedema following spinal cord injury. *Brain Inj*. 2011;25(3):300-306.
- FAN X, MA W, ZHANG Y, et al. P2X7 Receptor (P2X7R) of Microglia Mediates Neuroinflammation by Regulating (NOD)-Like Receptor Protein 3 (NLRP3) Inflammasome-Dependent Inflammation After Spinal Cord Injury. *Med Sci Monit*. 2020;26:e925491.
- LI X, YU Z, ZONG W, et al. Deficiency of the microglial Hv1 proton channel attenuates neuronal pyroptosis and inhibits inflammatory reaction after spinal cord injury. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):263.
- 段煜东, 张子程, 李博, 等. 低强度脉冲超声在脊髓损伤神经修复中的研究进展 [J]. 第二军医大学学报, 2021,42(9):1037-1043.
- GUTH L. A reassessment of LPS/indomethacin/pregnenolone combination therapy after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*. 2012;233(2):686.
- 武俏丽, 李庆国, 黄慧玲, 等. 他克莫司促进神经干细胞移植大鼠脊髓损伤的再生与修复 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010,14(23):4235-4238.
- WU J, ZHU ZY, FAN ZW, et al. Downregulation of EphB2 by RNA interference attenuates glial/fibrotic scar formation and promotes axon growth. *Neural Regen Res*. 2022;17(2):362-369.
- LI LM, HAN M, JIANG XC, et al. Peptide-Tethered Hydrogel Scaffold Promotes Recovery from Spinal Cord Transection via Synergism with Mesenchymal Stem Cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(4):3330-3342.
- NAKAJIMA H, UCHIDA K, GUERRERO AR, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2012;29(8):1614-1625.
- 张衡, 张贤平, 戴厚杰, 等. 天麻素干预脊髓损伤模型兔运动功能及神经生长相关蛋白 43 的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2021,25(29):4626-4631.
- ZHENG G, ZHAN Y, WANG H, et al. Carbon monoxide releasing molecule-3 alleviates neuron death after spinal cord injury via inflammasome regulation. *EBioMedicine*. 2019;40:643-654.
- WANG XJ, PENG CH, ZHANG S, et al. Polysialic-Acid-Based Micelles Promote Neural Regeneration in Spinal Cord Injury Therapy. *Nano Lett*. 2019;19(2):829-838.
- ROSENZWEIG ES, SALEGIO EA, LIANG JJ, et al. Chondroitinase improves anatomical and functional outcomes after primate spinal cord injury. *Nat Neurosci*. 2019;22(8):1269-1275.
- 胡道松, 曹福元, 徐清贵, 等. 外周神经损伤后对大鼠脊髓运动神经元及背根节感觉神经元的影响 [J]. 同济医科大学学报, 1999,28(6):478-481.
- 张光运, 段丽, 饶志仁, 等. 大鼠坐骨神经切断后腰脊髓腹角内胶质细胞和神经元的可塑性变化 [J]. 中国神经科学杂志, 2003,19(6):345-348.
- 陈云丰, 曾炳芳, 张惠箴, 等. 大鼠腰神经根损伤后脊髓神经胶质细胞激活和细胞因子表达 [J]. 上海医学, 2002,25(z1):2-4.
- LIU SM, XIAO ZF, LI X, et al. Vascular endothelial growth factor activates neural stem cells through epidermal growth factor receptor signal after spinal cord injury. *CNS Neurosci Ther*. 2019;25(3):3753-85.
- 谢乐斯, 郑林丰, 曾志成, 等. 大鼠脊神经后根切断后脊髓和背根神经节 CGRP 的表达变化 [J]. 神经解剖学杂志, 2007,23(2):209-213.
- JOHNSON RA, OKRAGLY AJ, HAAK-FRENDSCHO M, et al. Cervical dorsal rhizotomy increases brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 expression in the ventral spinal cord. *J Neurosci*. 2000;20(10):RC77.
- KINKEAD R, ZHAN WZ, PRAKASH YS, et al. Cervical dorsal rhizotomy enhances serotonergic innervation of phrenic motoneurons and serotonin-dependent long-term facilitation of respiratory motor output in rats. *J Neurosci*. 1998;18(20):8436-8443.

(责任编辑: GW, ZN, ZJP)