

. 实验研究 .

脊髓慢性压迫性损伤后细胞凋亡和 BDNF 表达的观察

李晓东 徐 军

【摘要】目的 探讨大鼠脊髓在遭受到持续进行性压迫损伤后神经细胞凋亡以及脑源性神经营养因子(BDNF)及其TrkB受体的变化。方法 将75只SD大鼠分为模型组、对照组和正常组,各25只;根据造模后取材时间,各组再分为1、7、14、21、28 d 5亚组,每亚组5只。胸₁₁₋₁₂椎板和硬脊膜之间置入缓膨材料(3 mm×5 mm,厚0.8 mm)制作大鼠慢性压迫性脊髓损伤模型,BBB评分评估行为学变化,TUNEL染色检测细胞凋亡,免疫组化染色检测BDNF及其TrkB受体表达变化。结果 造模后7、14、21、28 d,模型组大鼠BBB评分均明显低于对照组和正常组($P<0.05$),而对照组和正常组均无统计学差异($P>0.05$)。模型组大鼠可观察到从脊髓受压开始,神经细胞开始出现凋亡,中央管及前角区域的神经细胞凋亡明显,邻近灰质的白质部分神经胶质细胞凋亡明显;而对照组和正常大鼠未见明显凋亡细胞。模型组大鼠脊髓内BDNF及其TrkB受体呈强阳性,尤其是神经元部位,BDNF及其受体TrkB表达明显,且主要表达在运动类神经元中,随压迫进行,表达逐渐增强,至相对稳定;对照组和正常组大鼠脊髓内BDNF及其TrkB受体表达较少。结论 大鼠脊髓在受到慢性压迫性损伤时,神经细胞凋亡明显,BDNF、TrkB受体表达明显增强。

【关键词】慢性脊髓压迫性损伤;脑源性神经营养因子;TrkB受体;细胞凋亡;大鼠

【文章编号】1009-153X(2016)03-0167-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 651.2; R 363.2⁺1

Observation of cell apoptosis and BDNF expression in spinal cord injured by chronic compression

LI Xiao-dong¹, XU Jun². 1. Department of Neurosurgery, Haici Medical Group, Qingdao 266000, China; 2. Department of Neurosurgery, Cardio-cerebrovascular Disease Hospital, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

【Abstract】Objective To explore the pathogenetic mechanism of injury to spinal cord caused by chronic compression. Methods Seventy-five SD rats were divided into three groups of 25 animal each, i.e. normal group, experimental group, in which the model of spinal cord injury was caused by the chronic compression and control group which was similar to the experimental group in surgical treatment except the chronic compression of the spinal cord. The spinal cord function was determined by Basso, Beattie and Bresnahan locomotor rating scale (BBB Scale) postoperatively 1, 7, 14, 21 and 28 days after the pressure issues in all the groups, in which cells apoptosis and the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor, tropomyosin receptor kinase B (Trk B) in the injured spinal cord were determined respectively by TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) and immunohistochemical staining 28 days after the pressure issues. Results BBB scores were significantly lower in the experimental group than those in the other two groups 1, 7, 14, 21 and 28 days after the pressure issues ($P<0.05$). TUNEL staining showed that there were apoptosis of many cells in the injured spinal cord tissues in the experimental group and no cells apoptosis was found in the other two groups. The immunohistochemical staining showed that the expressions of BDNF and its receptor TrkB were stronger in the spinal cord tissues in the experimental group than those in the other two groups. Conclusion Apoptosis and the expression of BDNF, TrkB in the spinal cord injured by chronic compression, which can cause significant injury to the spinal cord function, are significantly enhanced.

【Key words】Injury; Spinal cord; Chronic compression; Apoptosis; Brain derived neurotrophic factor; Expression

慢性压迫性脊髓损伤是最常见的脊髓损伤,脊髓外肿瘤、外伤后血肿机化、椎间盘突出等均可造成不同程度的慢性压迫性脊髓损伤。研究发现,脊髓在遭受长期压迫后会出现神经细胞凋亡,可能与压迫后营养供应障碍有关。脊髓遭受长期压迫后,为

帮助神经细胞修复,会促使机体分泌神经营养因子,提高神经元的自身修复能力。我们采用SD大鼠制作脊髓压迫模型,探讨神经细胞凋亡、脑源性神经营养因子(brain derived neurophic factor, BDNF)及其TrkB受体在病变过程中的变化情况。

1 资料与方法

1.1 实验动物及分组 取75只SD大鼠(月龄3~4月,体重300~400 g,宁夏医科大学动物实验中心提供),利用计算机产生随机数进行随机分组,分为模型组、对照组、正常组,每组25只;根据造模后取材时间,

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.03.012
基金项目:宁夏回族自治区自然科学基金(NZ11200)
作者单位:266000 山东青岛,海慈医疗集团神经外科(李晓东);
750004 银川,宁夏医科大学总医院心脑血管病医院神经外科(徐军)
通讯作者:徐 军,E-mail:13895078572@163.com

各组再分为 1、7、14、21、28 d 5 亚组,每亚组 5 只。

1.2 方法

1.2.1 缓慢膨胀材料选择 选用遇水可以膨胀的材料制作压迫模型,所选膨胀材料应该具有缓慢膨胀的特点。选用的是赋子型遇水膨胀止水材料,该材料的膨胀时间长久,且膨胀时间持续长,膨胀后体积为原体积的 3 倍左右。缓慢膨胀材料可以充斥空腔内的所有空隙,同时产生巨大的接触压力。

1.2.2 动物模型制作 2% 苯巴比妥钠麻醉大鼠后,切开皮肤,剥离脊柱旁肌肉。选择胸₁₁₋₁₂棘突,切除椎板相关韧带后,显微镜下将一块缓膨材料(3 mm×5 mm,厚 0.8 mm)通过椎间隙嵌入胸₁₁₋₁₂椎板和硬脊膜之间。首次置入膨胀材料不造成椎管占位效应,缝合皮肤。观察大鼠后肢活动情况,若有弹动则说明损伤脊髓;若没有弹动动作,但捏大鼠尾根部会出现弹动动作,则说明手术过程无误。如有神经损伤症状,考虑为术中损伤所致,不计入统计,依数补齐实验动物。

1.2.3 行为学评分 造模前后不同时间点对大鼠的运动功能进行 BBB 评分评估^[1,2],主要观察大鼠后肢运动、尾巴运动以及姿态变化、反射功能,对各项功能进行评分,多次评分取平均值。

1.2.4 取材 大鼠麻醉后,以 40 g/L 多聚甲醛灌注固定,然后打开椎管取出膨胀条,继而取出以伤段为中心的长约 20 mm 脊髓组织,以相同固定液固定过夜,石蜡包埋、切片。

1.2.5 TUNEL 染色检测细胞凋亡 TUNEL 试剂盒为罗氏原位细胞凋亡检测盒。脊髓组织的石蜡切片需要进行脱蜡处理,使用枯草蛋白酶类的高活性蛋白酶溶液消化切片 1 h,然后使用磷酸盐缓冲液冲洗,使用 TUNEL 反应液 50 μl 进行染色,将染色后的切片置于 37 ℃ 恒温箱中自然放干。之后加入 POD 50 μl,每次换液前均用 PBS 冲洗 3×5 min。DAB 显色,脱水、封片,显微镜下观察。

1.2.6 BDNF 及 TrkB 受体免疫组化染色 对脊髓组织

石蜡切片行脱蜡处理,抗原修复后于温度为 37 ℃、浓度为 3% 的过氧化氢溶液孵育 5~10 min,消除内源性过氧化物酶活性。室温下,羊血清中孵育 10~15 min,滴加 1:500 羊抗兔 BDNF 或 TrkB IgG 多抗,4 ℃ 孵育过夜。滴加山羊抗兔 IgG 室温孵育 10~15 min,后加入辣根酶标记链霉卵白素,DAB 显色。自来水充分冲洗后,使用苏木素染色液进行复染,显微镜下观察结果。

1.2.6 统计学分析 使用 SPSS 18.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述,采用重复测量资料方差分析和 *t* 检验,*P*<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学评分比较 造模后 7、14、21、28 d,模型组大鼠 BBB 评分均明显低于对照组和正常组(*P*<0.05),而对照组和正常组均无统计学差异(*P*>0.05),见表 1。

2.2 细胞凋亡比较 模型组大鼠可观察到从脊髓受压开始,神经细胞开始出现凋亡,中央管及前角区域的神经细胞凋亡明显,邻近灰质的白质部分神经胶质细胞凋亡明显。而对照组和正常大鼠未见明显凋亡细胞。造模后 14 d TUNEL 染色见图 1。

2.3 BDNF、TrkB 免疫组化结果 模型组大鼠脊髓内 BDNF 及其 TrkB 受体呈强阳性,尤其是神经元部位,BDNF 及其受体 TrkB 表达明显,且主要表达在运动类神经元中,随压迫进行,表达逐渐增强,至相对稳定。对照组和正常组大鼠脊髓内 BDNF 及其 TrkB 受体表达较少。造模后 14、21 d BDNF、TrkB 免疫组化见图 2。

3 讨论

目前研究表明,神经细胞凋亡为脊髓缺血后继发性损伤的病理机制之一。受压部位的脊髓由于血液供应困难,神经组织得不到足够的营养,容易出现缺血缺氧性坏死,压迫进行性加重导致脊髓损伤呈

表 1 各组动物 BBB 评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

分组	造模后评分时间(d)				
	1	7	14	21	28
模型组	19.9±0.2	12.7±1.6 ^{*#}	8.4±2.5 ^{*#△}	7.3±2.5 ^{*#△}	7.0±1.8 ^{*#△}
对照组	20.2±0.5	21.0±0.0	21.0±0.0	21.0±0.0	21.0±0.0
正常组	21.0±0.0	21.0±0.0	21.0±0.0	21.0±0.0	21.0±0.0

注:与对照组和正常组相应值比,**P*<0.05;与造模后 1 d 相应值比,#*P*<0.05;与造模后 7 d 相应值比,△*P*<0.05

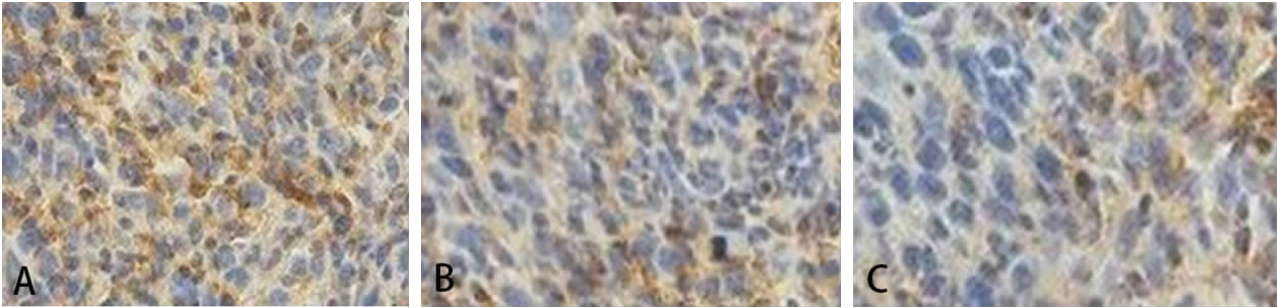


图1 造模后14 d TUNEL 染色(×400)

A. 模型组,细胞凋亡明显增多;B. 对照组,少量细胞凋亡;C. 正常组,细胞凋亡极少

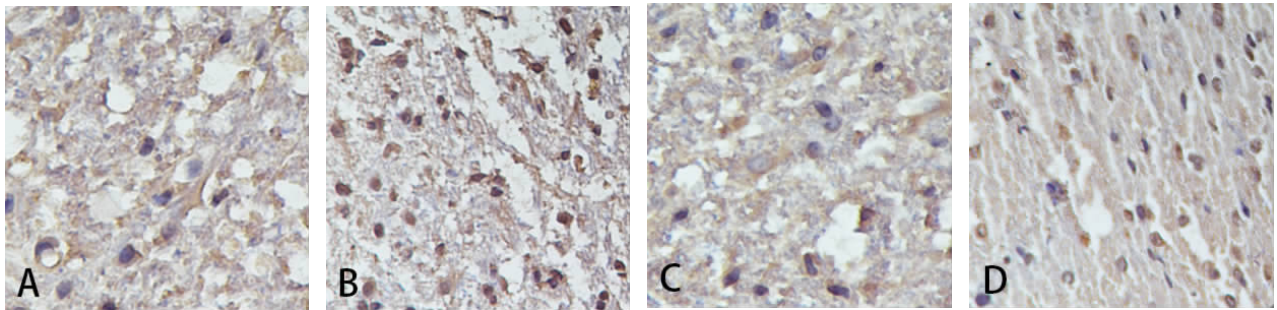


图2 模型组造模后BDNF和TrkB免疫组化染色(×400)

A、B. BDNF免疫组化染色;C、D. TrkB免疫组化染色;A、C. 术后14 d;B、D. 术后21 d

慢性持续性加重表现,另外脊髓受压后也会出现直接性的压迫损伤,这两个因素使得脊髓损伤程度不断加重,其中又以继发性的神经细胞营养缺失和修复不足出现的神经细胞损伤为主要表现。本研究明显组大鼠可以观察到从脊髓受压开始,神经细胞开始出现凋亡,中央管及前角区域的神经细胞凋亡明显,邻近灰质的白质部分神经胶质细胞凋亡明显。

BDNF可促进神经元生存、分化、突触的调控、少突胶质细胞再生、促进髓鞘形成、诱导调节轴突和树突的生长等^[3-5]。BDNF发挥作用离不开其受体TrkB的帮助。BDNF与TrkB受体结合后可诱导一系列反应,可达到保护和修复神经细胞的目的^[6]。本研究发现模型组大鼠造模后1周BDNF及其受体TrkB表达明显增加。BDNF及其受体TrkB表达的增加证明当神经元受损后,BDNF及其受体发挥着一定的作用。这也为采用外源性神经营养因子治疗压迫受损的脊髓神经提供了依据^[7]。

近几年来,慢性脊髓损伤相关病理机制的研究日渐增多。有学者指出脊髓损伤后长期功能障碍和神经细胞难以再生与细胞凋亡有着重要关系^[8-10]。同时有研究报道称,当脊髓受到损伤发生病变后可产生一系列的生理及病理变化,而BDNF可以影响其组织病理学上和行为学上的相关病变,促进其恢复^[10]。Mantilla等^[11]通过动物实验发现在脊髓损伤

后,通过膈运动神经元BDNF/TrkB信号通路激发神经元重塑作用,进而促进神经功能恢复。本实验以此为切入点,通过脊髓慢性压迫模型观察脊髓在受到慢性压迫性损伤时的相关病理机制及BDNF、TrkB的变化,为进一步探究BDNF及TrkB对脊髓的营养修复作用奠定了基础。

【参考文献】

[1] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, *et al.* MASCIS evaluation of open field locomotor scores—effects of experience and teamwork on reliability: Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study [J]. *Neurotrauma*, 1996, 13: 343–359.

[2] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, *et al.* Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight dro device versus transaction [J]. *Exp Neurol*, 1996, 139(2): 244–256.

[3] Holly LT, Blaskiewicz D, Wu A, *et al.* Dietary therapy to promote neuroprotection in chronic spinal cord injury [J]. *J Neurosurg Spine*, 2012, 17(2): 134–140.

[4] Weishaupt N, Blesch A, Fouad K. BDNF: the career of a multifaceted neurotrophin in spinal cord injury [J]. *Exp Neurol*, 2012, 238(2): 254–264.

[5] Parsi S, Soltani BM, Hosseini E, *et al.* Experimental verifi-

- cation of a predicted intronic microRNA in human NGFR gene with a potential pro-apoptotic function [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35561.
- [6] Marini AM, Jiang X, Wu X, *et al.* Role of brain-derived neuro-trophic factor and NF-kappa B in neuronal plasticity and survival: from genes to phenotype [J]. Restor Neurol Neurosci, 2004, 22(2): 121-130.
- [7] Zhang Q, Liao WH, Wu YM, *et al.* The effect of neurotrophins to spinal cord injury in rats [J]. Chin J Traumatol Surg, 2000, 2(1): 45-48.
- [8] Byrnes KR, Stoica BA, Fricke S, *et al.* Cell cycle activation contributes to postmitotic cell death and secondary damage after spinal cord injury [J]. Brain, 2007, 130(11): 2977-2992.
- [9] Cittel DM, Nesic O, Johnson K, *et al.* Detrimental effects of antiapoptotic treatments in spinal cord injury [J]. Exp Neurol, 2008, 210(2): 295-307.
- [10] Ferrini F, De Koninck Y. Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling [J]. Neural Plast, 2013, 20(3): 429-431.
- [11] Mantilla CB, Gransee HM, Zhan WZ, *et al.* Motoneuron BDNF/TrkB signaling enhances functional recovery after cervical spinal cord injury [J]. Exp Neurol, 2013, 247: 101-109.

(2015-09-20 收稿, 2015-11-10 修回)

