

·基础研究·

电刺激对大鼠脊髓损伤后神经胶质纤维酸性蛋白与 白细胞介素-1 α 表达的影响

张莹莹^{1a}, 李俊岑^{1a}, 饶莹^{1a}, 杨拯^{1b}, 张晓^{1b}, 郑蕖^{1c}, 许丽丽^{1c}

[摘要] 目的 探讨电刺激对脊髓损伤后神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、白细胞介素-1 α (IL-1 α)表达的影响。方法 健康成年 SD 大鼠 72 只随机分为正常组、损伤组、电刺激组。采用 Allen's 法将后两组复制为脊髓 T₉ 损伤模型。术后对电刺激组大鼠进行电刺激治疗 7 d。3 组均进行 BBB 评分, 免疫组织化学检测 GFAP 与 IL-1 α 的表达情况。结果 损伤组和电刺激组 BBB 评分均小于正常组 ($P < 0.05$), 伤后 5 d、7 d, 电刺激组较损伤组 BBB 评分增加 ($P < 0.05$)。损伤组、电刺激组 GFAP 阳性表达均在伤后 5 d 达到高峰, 伤后 5 d、7 d, 电刺激组 GFAP 表达低于损伤组 ($P < 0.05$); IL-1 α 阳性表达在伤后 7 d 内持续上升, 伤后 5 d、7 d, 电刺激组 IL-1 α 表达低于损伤组 ($P < 0.05$)。结论 电刺激能抑制 GFAP 与 IL-1 α 的表达, 可能有利于减轻炎症反应, 减少胶质瘢痕形成。

[关键词] 脊髓损伤; 电刺激; 神经胶质纤维酸性蛋白; 白细胞介素-1 α

Effects of Electrical Stimulation on the Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein and Interleukin-1 Alpha in Adult Rats with Spinal Cord Injury ZHANG Ying-ying, LI Jun-cen, RAO Ying, et al. Chengdu Medical College, Chengdu 610083, Sichuan, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of electrical stimulation on the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and interleukin-1 alpha (IL-1 α) in adult rats with spinal cord injury. **Methods** 72 adult SD rats were randomly divided into damage group ($n = 24$), electrical stimulation group ($n = 24$) and normal group ($n = 24$). The spinal cord incomplete injury model on T₉ was made with Allen's method in the former 2 groups. The rats in electrical stimulation group accepted electrical stimulation for 7 d. All the rats were evaluated with the Basso, Beattie & Bresnahan locomotor rating scale (BBB scale), and the expression of GFAP and IL-1 α were determined with immunohistochemistry. **Results** The BBB scores in both the damage group and electrical stimulation group were significantly less than that in the normal group ($P < 0.05$), and it was more in the electrical stimulation group than in the damage group 5 and 7 d after injury. The expressions of the GFAP significantly increased after injury to the peak on 5th day, while it was less in the electrical stimulation group than in the damage group 5 and 7 d after injury ($P < 0.05$). The expressions of the IL-1 α increased continually after injury, while it was less in the electrical stimulation group than in the damage group 5 and 7 d after injury ($P < 0.05$). **Conclusion** Electrical stimulation can inhibit the expression of GFAP and IL-1 α , that reduce inflammation and glial scar formation.

Key words: spinal cord injury; electrical stimulation; glial fibrillary acidic protein; interleukin-1 alpha

[中图分类号] R651.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2011)09-0844-04

[本文著录格式] 张莹莹, 李俊岑, 饶莹, 等. 电刺激对大鼠脊髓损伤后神经胶质纤维酸性蛋白与白细胞介素-1 α 表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2011, 17(9): 844—847.

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是严重危害人类健康的脊柱脊髓疾患, 常致严重伤残, 引起各种并发症, 严重影响患者的身心健康和生存质量, 甚至危及生命。脊髓损伤后, 胶质细胞大量增生, 胶质瘢痕形成与炎症反应增强是加重神经损伤和功能障碍的主要原因。电刺激在脊髓功能恢复中具有一定的促进作用, 但电刺激对 SCI 后炎症反应和胶质瘢痕形成的影响报道较少。电刺激是否有助于减轻 SCI 后胶质瘢痕形成和炎症反应呢?

神经胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)参与胶质瘢痕形成过程; 白细胞介素-1 α

(interleukin-1 alpha, IL-1 α)为主要的炎症因子, 其表达的增加是加重炎症反应和诱导神经元及少突胶质细胞凋亡的主要因素之一。为此, 本实验以 GFAP、IL-1 α 为观察指标, 探讨电刺激对大鼠脊髓损伤后不同时段损伤区及附近 GFAP、IL-1 α 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康成年 SD 大鼠 72 只, 雌雄不限, 体重(180 \pm 20) g, 由四川大学实验动物中心提供, 分笼饲养, 动物饲养环境温度 20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 。随机分为损伤组($n = 24$)、电刺激组($n = 24$)和正常组($n = 24$)。损伤组和电刺激组于造模后 1 d、3 d、5 d、7 d 分成 4 小组,

基金项目: 1.四川省科技厅课题(2008SZ0053); 2.成都医学院创新实验项目(CX2010035)。

作者单位: 1.成都医学院, a: 临床医学系; b: 实验技术教研室; c: 基础医学院, 四川成都市 610081。作者简介: 张莹莹(1990-), 女, 四川泸州市人, 2008 级本科生。通讯作者: 张晓。

每组6只。

1.2 动物模型制备 损伤组和电刺激组大鼠均用1.5%戊巴比妥钠45 mg/kg腹腔注射麻醉,背部剃毛,常规消毒。以T₉为中心,纵行切开皮肤及皮下组织,剥离椎旁肌肉并暴露棘突与椎板,咬除T₉椎板,按Allen's法^[1]用自行加工设计的打击装置,将10 g冲击棒自25 mm高处自由坠落致伤脊髓。缝合伤口。正常组大鼠仅切除相应椎板后即缝合伤口。术后大鼠独笼饲养。协助大鼠排尿,每日早晚各1次,至其排尿反射恢复;每日注射青霉素1 ml和生理盐水2 ml,抗菌和补充体液,持续至大鼠取材。在此期间注意观察皮肤有无压疮或感染、下肢有无溃烂。

1.3 电刺激 术后24 h起对电刺激组大鼠进行经皮电刺激30 min,每天1次。参数设置:疏密波脉冲电流,电流强度中档,刺激频率10 Hz,正极接T₇右侧夹脊穴位置的皮肤,负极接右下肢足三里穴位置的皮肤。连续电刺激至各组动物取材。

1.4 取材及切片处理 各组大鼠分别在术后1 d、3 d、5 d、7 d取材。用过量的戊巴比妥钠麻醉大鼠,自左心室插管后剪开右心耳,灌注加入肝素钠与普鲁卡因的冰生理盐水,直到有澄清液从右心耳流出,再灌注4%多聚甲醛1 h。打开椎弓管,切除T₇、T₉、T₁₁段脊髓,固定24 h后置自动脱水包埋机处理。修片,连续切片,片厚5 μm,连续5张进行贴片、烤片,备用。

1.5 免疫组织化学染色 采用非生物素二步法进行GFAP和IL-1α免疫组化染色。将各组切片置于二甲苯中脱腊,梯度酒精水化,高压热抗原修复,用3% H₂O₂封闭内源性过氧化物酶,正常山羊血清封闭非特异性抗原。分别滴加GFAP抗体(1:500)或IL-1α抗体(1:20),4℃冰箱过夜。用兔抗鼠二抗37℃恒温孵育60 min。加入DAB-H₂O₂显色液,室温下反应,显微镜下显色充分,及时用0.01 mol/L PBS漂洗;苏木素复染,梯度酒精逐级脱水,二甲苯透明,树胶封片。显微镜下观察GFAP、IL-1α的表达,阳性结果为棕黄色反应。

1.6 大鼠后肢运动功能观察 按照Basso^[2]等报道的BBB(Basso, Beattie & Bresnahan locomotor rating scale)运动功能评分方法进行评定。

1.7 统计学分析 用OLYMPUS数码照像机采集图像,观察GFAP、IL-1α阳性产物在脊髓的分布。分别计数各组术后1 d、3 d、5 d、7 d脊髓内、中、外3个视野1028 μm²面积内GFAP、IL-1α的阳性细胞数,测

量阳性产物的平均积分光密度值。各组阳性细胞数和平均积分光密度值数据以($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS 13.0软件进行方差分析,显著性水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 BBB评分 损伤前,3组大鼠BBB评分均为21.00分;损伤后,损伤组、电刺激组BBB评分均小于正常组($P < 0.05$);从损伤后第5天开始,电刺激组BBB评分高于损伤组($P < 0.05$)。见表1。

表1 脊髓损伤后不同时间点各组大鼠BBB评分的比较(n=6)

组别	1 d	3 d	5 d	7 d
正常组	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00
损伤组	0.01±0.21 ^a	0.33±0.52 ^a	1.17±0.41 ^a	2.33±0.38 ^a
电刺激组	0.09±0.38 ^a	0.67±0.54 ^a	3.80±0.45 ^{a,b}	6.67±0.31 ^{a,b}

注: a: 与正常组比较, $P < 0.05$; b: 与损伤组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 GFAP 正常组脊髓中央管周围的室管膜区未见GFAP阳性细胞的表达;室管膜区以外的灰质和白质中偶可见染色程度较弱的GFAP阳性细胞;GFAP阳性细胞突起细长并向四周延伸。损伤1 d后,损伤组和电刺激组可观察到脊髓损伤区、损伤邻近区、中央管周围室管膜区、灰质和白质中GFAP阳性细胞的表达(图1);损伤3 d后,在损伤区及周围灰质、白质中GFAP阳性细胞的表达与损伤后1 d相比均增多($P < 0.05$),GFAP阳性细胞肥大,染色变深;损伤3~5 d,GFAP阳性细胞逐渐达到高峰;5 d时损伤组和电刺激组的积分光密度值均达到最高,损伤组高于电刺激组($P < 0.05$)(图1,表2);损伤7 d后,电刺激组和损伤组GFAP阳性细胞较7 d时减少(图1)。与损伤组相比,电刺激组变化幅度较小。见表2、表3。

表2 损伤后不同时间点大鼠GFAP平均积分光密度值(n=6)

组别	1 d	3 d	5 d	7 d
正常组	1.18±0.11	1.15±0.14	1.15±0.10	1.23±0.13
损伤组	2.84±0.36	3.7±2.61 ^a	14.02±1.50 ^a	6.67±7.58 ^a
电刺激组	1.64±0.44	3.70±1.54 ^a	5.74±0.15 ^{a,b}	4.58±0.52 ^{a,b}

注: a: 与正常组比较, $P < 0.05$; b: 与损伤组比较, $P < 0.05$ 。

表3 损伤后不同时间点大鼠GFAP阳性细胞数(n=6)

组别	1 d	3 d	5 d	7 d
正常组	9.10±0.21	9.09±0.19	9.09±0.23	9.08±0.17
损伤组	14.89±0.33	26.30±0.80 ^a	35.32±0.15 ^a	31.43±0.88 ^a
电刺激组	18.31±0.22	42.10±1.61 ^a	57.51±0.50 ^{a,b}	50.48±0.34 ^{a,b}

注: a: 与正常组比较, $P < 0.05$; b: 与损伤组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 IL-1α 正常组脊髓灰质前角附近有极少量IL-1α阳性细胞。损伤组损伤后1 d,脊髓灰质前角可见少量IL-1α阳性细胞,呈IL-1α弱染色的突起(图2);随着时间的推移,IL-1α表达量呈递增趋势(图2),至损伤后

2.4 GFAP 和 IL-1 α 在电刺激组中的相关性 用 SPSS 13.0 统计软件对电刺激组中 GFAP 和 IL-1 α 的阳性细胞数的平均积分光密度值进行 Pearson 相关分析, GFAP 和 IL-1 α 在 1~7 d 的变化相关($r=0.891$, $P<0.05$)。

3 讨论

GFAP 作为星形胶质细胞的主要骨架蛋白之一, 是星形胶质细胞的一种特征性标记物^[3]。GFAP 表达的减少反映星形胶质细胞反应性减弱^[4]。星形胶质细胞一方面能提供特殊的轴突再生促进因子或诱导因子, 促进或诱导轴突再生; 另一方面也可产生阻碍轴突再生的抑制因子或形成局部瘢痕^[5-9]。

电刺激能在局部形成“微电池”效应, 加速局部代谢, 改善局部缺血微环境^[10-11], 促进脊髓损伤后神经组织的再生与修复, 减轻脊髓的继发性损伤^[12]。

本实验结果显示, 在电刺激组和损伤组中, 脊髓损伤后 1~3 d, GFAP 阳性表达无显著性差异, 但星形胶质细胞在大鼠脊髓损伤后 1 d 开始活化, 1~3 d 增殖缓慢, 这可能与脊髓损伤早期主要表现为局部水肿、出血和组织细胞发生水解坏死, 而胶质细胞处于活化初期有关; 损伤后 5 d 两组 GFAP 阳性表达达到高峰, 而损伤后 7 d, GFAP 阳性细胞减少, 在这两个时间点, 电刺激组 GFAP 表达低于损伤组, 提示损伤后 5 d 可能是电刺激影响星形胶质细胞过度增殖的关键时间点。

IL-1 α 是在感染和炎症状态下, 由多种细胞产生的、具有多方面生物学功能的细胞因子, 主要参与介导炎症反应、调节免疫及调节机体代谢^[13-14]。IL-1 α 表达减少提示炎症反应的减弱。有实验表明, 电针督脉可以通过抑制脊髓水肿的程度来减轻脊髓的继发性损伤^[15]; 在缺血性脑损伤大鼠, 电针明显抑制大鼠脑组织炎症反应, 减轻缺血再灌注继发性神经元损伤, 对脑缺血再灌注损伤有显著的保护作用^[16]。本实验结果提示, 电刺激可能抑制受损伤脊髓组织中的 IL-1 α 表达, 减轻脊髓损伤后炎症反应和细胞凋亡。

本实验提示, 脊髓损伤后, GFAP 和 IL-1 α 的表达存在相关性。有文献报道, 星形胶质细胞能合成和分泌神经活性物质^[17]; 而炎症因子的释放可导致组织损伤和细胞凋亡, 进而反射性促进星形胶质细胞增殖和胶质瘢痕形成^[18]。两者之间存在一定的联系。

脊髓继发性损伤是在原发性损伤的基础上触发的一系列多种分子和细胞参与的复杂过程, 对这一过程本质的认识对于控制继发性损伤, 促进脊髓再生修复具有重要意义^[19-20]。本研究提示, 电刺激在短期内能

减少星形胶质细胞增生, 降低炎症因子, 创造了有利于运动功能的恢复及神经再生的微环境。但长期电刺激治疗的疗效情况仍不清楚。

[参考文献]

- [1] Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: A preliminary report [J]. J Am Med Assoc, 1911, 57: 878-880.
- [2] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effect of experience and teamwork on reliability multicenter animal spinal cord injury study [J]. J Neurotrauma, 1996, 13(7): 343-359.
- [3] Eng LF, Yu ACH, Lee YL. Astrocytic response to injury. Progress in brain research [J]. Res Neurol Neurosci, 1992, 94(4): 353-365.
- [4] Carmignoto G. Astrocyte-neurone crosstalk: variants of the same language [J]. Trends Pharmacol Sci, 2000, 21(7): 252-258.
- [5] Bezzi P, Volterra A. A neuron-glia signalling network in the active brain [J]. Curr Opin Neurobiol, 2001, 11(3): 387-394.
- [6] Fitch MT, Doller C, Combs CK, et al. Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma [J]. J Neurosci, 1999, 19(19): 8182-8198.
- [7] Schiffer D, Giordana MT, Migheli A, et al. Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain [J]. Brain Res, 1986, 374(1): 110-118.
- [8] Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP - thirty-one years (1969-2000) [J]. Neurochem Res, 2000, 25(9-10): 1439-1451.
- [9] Kigerl KA, McGaughy VM, Popovich PG. Comparative analysis of lesion development and intraspinal inflammation in four strains of mice following spinal contusion injury [J]. J Comp Neurol, 2006, 494(4): 578-594.
- [10] Kerr C, McDowell B, Cosgrove A, et al. Electrical stimulation in cerebral palsy: a randomized controlled trial [J]. Dev Med Child Neurol, 2006, 48(11): 870-876.
- [11] Fehlings MG, Tator CH. The effect of direct current field polarity on recovery after acute experimental spinal cord injury [J]. Brain Res, 1992, 579(1): 32-42.
- [12] 牛晓梅, 刘智斌, 牛文民, 等. 督脉、夹脊电针治疗急性脊髓损伤实验研究进展分析 [J]. 陕西中医学院学报, 2009, (3): 53-56.
- [13] Pan JZ, Ni L, Sodhi A, et al. Cytokine activity contributes to induction of inflammatory cytokine mRNAs in spinal cord following contusion [J]. J Neurosci Res, 2002, 68(3): 315-322.
- [14] Yamazaki Y, Maeda T, Someya G, et al. Temporal and spatial distribution of Fos protein in the lumbar spinal dorsal horn neurons in the rat with chronic constriction injury to the sciatic nerve [J]. Brain Res, 2001, 914(1-2): 106-114.
- [15] 韩清民, 谢杰, 柴生颢, 等. 电针督脉对实验性脊髓损伤大鼠水通道蛋白 24 的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(7): 736-739.
- [16] 周爽, 黄建华. 电针对脑缺血再灌注损伤大鼠炎症反应的影响 [J]. 江苏中医药, 2005, 26(7): 49-51.
- [17] 王红, 张远强, 丁玉强, 等. 神经激肽 P 受体在小鼠中枢神经系统内的定位分布 [J]. 解剖学报, 2002, 33(1): 21.
- [18] Puder BA, Papka RE. Hypothalamic paraventricular axons projecting to the female rat lumbosacral spinal cord contain oxytocin immunoreactivity [J]. J Neurosci, 2001, 21(1): 53-60.
- [19] Turner RS, Delong MR. Corticostriatal activity in primary motor cortex of the macaque [J]. J Neurosci, 2000, 20(18): 7096-7108.
- [20] Hamid S, Hayek R. Role of electrical stimulation for rehabilitation and regeneration after spinal cord injury: an overview [J]. Eur Spine J, 2008, 17(9): 1256-1269.

(收稿日期: 2011-04-14)