

大鼠完全性脊髓损伤后降钙素基因相关肽与运动终板的关系

张庆民 关骅 洪毅

[摘要] 目的 观察大鼠完全性脊髓损伤后降钙素基因相关肽(CGRP)和乙酰胆碱酯酶(AChE)在骨骼肌运动终板中的变化特点及运动终板的变化。方法 采用 Wistar 大鼠制作 T₁₀ 脊髓横断模型,分别于损伤后 1、2、4、8 周取胫前肌肌腹标本,以免疫组化法检测 AChE 和 CGRP 在运动终板中的变化。结果 脊髓横断 1 周后 CGRP 在运动终板中的数量、分布即明显减少,着色变浅,而 AChE 在运动终板中的变化发生在损伤后 4 周时;运动终板中 CGRP 和 AChE 始终未完全消失。结论 上运动神经元损伤后骨骼肌运动终板存在退变现象;AChE 和 CGRP 与运动终板的退变相关;检测 CGRP 能更早地显示运动终板的改变。

[关键词] 脊髓损伤;运动终板;降钙素基因相关肽;大鼠

Relationship of the change of calcitonin gene related peptide and degeneration of the motor endplate after spinal cord injury in the rat ZHANG Qing-min, GUAN Hua, HONG Yi. Department of Spine and Spinal Cord Surgery, Faculty of Rehabilitation of the Capital University of Medical Science, Beijing 100068, China

[Abstract] Objective To observe changes of calcitonin gene related peptide (CGRP) and acetylcholinesterase (AChE) in motor endplate (MEP) after complete spinal cord injury (SCI) in the rat. Methods SCI model of Wistar rats were established by transecting T₁₀ spinal cord completely. The venters of the tibial anterior muscle were taken at 1, 2, 4 and 8 weeks postoperatively to carry out the experiment. The changes of CGRP and AChE in the MEP were investigated with immunohistochemical test. Results After complete SCI, the quantity and distribution of CGRP decreased in MEP of 1-week sample, and the changes of AChE were observed until 4-week sample, and although the staining was light and sparse, CGRP and AChE existed in MEP during 2 months postoperatively. Conclusion There is degeneration of MEP in skeletal muscle after upper motor neuron injury; CGRP and AChE are related to the degeneration of MEP; CGRP test can show the changes of MEP earlier.

[Key words] spinal cord injury (SCI); motor endplate (MEP); calcitonin gene related peptide (CGRP); acetylcholinesterase (AChE); rat

中图分类号:R683.2 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2005)02-0089-02

[本文著录格式] 张庆民,关骅,洪毅.大鼠完全性脊髓损伤后降钙素基因相关肽与运动终板的关系[J].中国康复理论与实践,2005,11(2):89-90.

运动终板结构与功能的存在是各种脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)治疗方法(外科减压、药物治疗、细胞移植、神经再生、神经电刺激、康复治疗等)达到有效目标的基础,对 SCI 的预后和治疗效果具有直接影响。本研究采用免疫组化方法研究 SCI 后乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)和降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)在骨骼肌运动终板中的变化,探讨其与运动终板退变之间的联系。

1 材料与方法

1.1 动物模型制作 选取成年雄性 Wistar 大鼠 50 只(购于中国军事医学科学院),体重(250±50)g,按“随机数字表法”随机分成假手术组和模型组。1%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔内麻醉大鼠,显微镜下暴露 T₉~T₁₀ 脊髓背面及两侧,在 T₁₀ 脊髓节段水平切断脊髓。

作者单位:1. 100068 北京市,首都医科大学康复医学院;2. 100068 北京市,北京博爱医院脊柱脊髓外科。作者简介:张庆民(1966-),男,陕西渭南市人,博士研究生,副主任医师,主要研究方向:脊柱脊髓损伤的外科治疗。

术后 1、2、4 和 8 周采用 BBB 法(Basso, Beattie, Bresnahan locomotor rating scale)^[1]评定后肢运动功能。造模后,大鼠后肢运动功能无明显恢复,BBB 评分无明显增加,证明模型可靠。

1.2 骨骼肌运动终板 AChE 和 CGRP 免疫组化检测 模型组大鼠分别于造模后 1、2、4 和 8 周用 4%多聚甲醛心脏灌注固定,取大鼠胫前肌肌腹部标本 2 份,分别采用 ABC 法行 AChE 及 CGRP 免疫组化染色检测。胫前肌标本用 4%多聚甲醛浸泡后固定 2~4 d,转入 30%蔗糖 1~2 d;常规石蜡包埋切片,二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,PBS 冲洗,微波修复;3% H₂O₂ 室温孵育 5~10 min,消除内源性过氧化物酶的活性;依次与兔抗人 CGRP 血清、生物素标记羊抗兔血清、卵白素-生物素-辣根过氧化物酶复合物孵育,DAB 暗处显色 5 min,苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

2 结果

2.1 运动终板中 AChE 分布的变化 假手术组胫前肌中可见运动终板较为清晰(见封 3 图 2.1)。AChE

免疫组化法染色显示,脊髓横断后 1、2 周时运动终板的数量、分布及着色无明显变化(见封 3 图 2.2),但肌纤维有一定程度萎缩;4 周时运动终板数量、分布减少,开始部分染色模糊、浅淡;至 8 周时,运动终板数量、分布减少更加明显,且染色模糊、浅淡,不易辨认,但并未消失,部分标本肌肉萎缩明显,可见肌肉变性,胶原纤维增生(见封 3 图 2.3)。

2.2 运动终板中 CGRP 分布的变化 假手术组胫前肌中运动终板显示清晰(见封 3 图 2.4)。脊髓横断 1 周后 CGRP 在运动终板中的数量、分布即明显减少,着色变浅,但至 8 周时仍可见 CGRP 阳性标记物,运动终板并未完全消失(见封 3 图 2.5),部分标本肌肉萎缩明显,可见胶原纤维增生。

3 讨论

在正常生理状态下,运动神经元通过运动终板与骨骼肌纤维建立联系,支配骨骼肌完成各种生理功能。AChE 主要来源于运动神经元胞体,通过轴突快速运输到达神经终末;AChE 活性的强弱反映运动神经元的功能状态^[2],终板区 AChE 含量的多少亦能反映终板退变及再生情况^[3]。CGRP 与乙酰胆碱共存于运动终板^[4],与肌电活动共同调节肌肉纤维接头区及接头外乙酰胆碱受体的生物合成和基因表达^[5]。

人们普遍认为,CGRP 通过调高肌细胞 cAMP 水平触发乙酰胆碱受体的磷酸化及其后的受体集中,从而调节神经肌肉的递质传递^[6]。王树森等切断大鼠坐骨神经建立周围神经损伤模型,以免疫组化方法检测 CGRP 在运动终板中分布的变化,发现损伤 1 周后运动终板中 CGRP 立即完全消失,推测在运动终板退变机制中 CGRP 的缺乏很可能是一个重要的因素,因此认为 CGRP 与运动终板的退变相关^[7]。

Marlier 等观察到,大鼠脊髓横断后,前角运动神经元中 CGRP 随时间推移(48 h 至 5 个月)而减少^[8]。脊髓 CGRP mRNA 从损伤后 1 d、靶肌肉神经肌肉接头 CGRP 从损伤后 4 d 开始下降,第 7 天降至极低水平,提示 CGRP 亦可能参与上运动神经元损伤后靶肌肉神经肌肉接头乙酰胆碱受体的调控,比乙酰胆碱受体的改变更早^[9]。

本实验结果显示,脊髓横断 1 周后,CGRP 在运动终板中的数量、分布即明显减少,着色变浅,而 AChE 在运动终板中的变化发生在损伤后 4 周时,即 CGRP

出现变化的时间早于 AChE,但两者均始终未完全消失,且整个变化趋势是一致的。本实验结果提示,上运动神经元损伤后骨骼肌运动终板存在退变,而且 CGRP 免疫组化检测较 AChE 更为敏感。由此推测,在运动终板退变机制中,CGRP 缺乏很可能是一个重要因素,CGRP 的变化可以反应运动终板的变化及功能情况,为临床了解 SCI 患者骨骼肌运动终板情况,加强 SCI 后远端肌肉保护及功能康复提供了一个较为有效的方法和理论基础。

致谢:本实验得到空军总医院病理科答冀平主任的指导和帮助,在此致谢。

[参考文献]

- [1] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection[J]. *Exp Neurol*, 1996, 139: 244—256.
- [2] 殷琦, 陆裕朴, 胡蕴玉, 等. 肌肉失神经后运动终板早期退变实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 1995, 9: 35—37.
- [3] 许小珊, 沈菊英. 运动终板及其神经末梢的染色方法[J]. *中国人民解放军军事医学科学院院刊*, 1980, 9: 105—107.
- [4] Csillik B, Taiti L, Kovacs T. Distribution of calcitonin gene-related peptide in vertebrate neuromuscular junction: Relationship to the acetylcholine receptor[J]. *J Histochem Cytochem*, 1993, 41: 1547—1555.
- [5] Fontaine B, Klarsfeld A, Changeux J. Calcitonin gene-related peptide and muscle activity regulate acetylcholine receptor α -subunit mRNA levels by distinct intracellular pathways[J]. *J Cell Biol*, 1987, 105: 1337—1342.
- [6] Changeux J. Molecular biology of the acetylcholine receptor: Functional architecture and development regulation[J]. *Eur J Neurosci*, 1991, 4: 1—10.
- [7] 王树森, 黄耀添, 褚晓朝, 等. 大鼠坐骨神经损伤后降钙素基因相关肽与运动终板的关系[J]. *中国显微外科杂志*, 1997, 120(4): 270—272.
- [8] Marlier L, Rajaofea N, Peretti Renacci R, et al. Calcitonin gene-related peptide staining intensity is reduced in rat lumbar motoneurons after spinal cord transection: a quantitative immunocytochemical study[J]. *Exp Brain Res*, 1990, 82: 40—47.
- [9] 应舜伟, 吴新民, 王庚. 上运动神经元损伤后脊髓降钙素基因相关肽和骨骼肌乙酰胆碱受体的改变[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2002, 34(3): 281—285.

(收稿日期: 2005-01-28)



图 1.1 缺血再灌注前HE染色
($\times 100$)



图 1.2 缺血再灌注后 48 h HE 染色
($\times 100$)



图 1.3 A 组 (硫酸镁处理组) 缺血
再灌注后 48 h HE 染色 ($\times 100$)



图 2.1 假手术组大鼠胫前肌细胞
膜表面运动终板部位AChE免疫反应阳
性标记物清晰, 分布多 ($\times 100$)



图 2.2 脊髓损伤组大鼠胫前肌运
动终板部位AChE免疫反应阳性标记
物数量、分布及着色2周时无明显变
化 ($\times 300$)



图 2.3 脊髓损伤组大鼠胫前肌运
动终板部位 AChE 免疫反应阳性标
记物数量、分布8周时减少明显, 但
未完全消失 ($\times 300$)



图 2.4 假手术组大鼠胫前肌细胞
膜表面运动终板部位 CGRP 免疫反
应阳性标记物染色清晰, 分布较多
($\times 100$)



图 2.5 脊髓损伤组大鼠胫前肌运
动终板部位CGRP免疫反应阳性标记
物数量、分布8周时减少明显, 但未
完全消失 ($\times 100$)