

大鼠脊髓损伤后运动终板内乙酰胆碱酯酶和降钙素基因相关肽的变化

张皓峰¹, 欧喜超², 杨朝阳², 刘玉军², 鲁强², 李晓光²

[摘要] 目的 观察大鼠不同类型脊髓损伤后降钙素基因相关肽(CGRP)与乙酰胆碱酯酶(AChE)在后肢腓肠肌运动终板内的变化,以探讨不同类型脊髓损伤后 CGRP 和 AChE 与运动终板退变的关系。方法 60 只成年 Wistar 大鼠随机分为假手术组(A组)、切割型脊髓损伤组(B组)和撞击型脊髓损伤组(C组),术后 1、2、4、10 周分别用 Karnovsky-Roots 直接法染色检测 AChE、免疫组化法检测 CGRP 的变化。结果 两损伤组大鼠术后运动终板中 CGRP 和 AChE 浓度均下降,但 C 组 10 周时有了明显恢复,而 B 组一直处于较低水平;CGRP 的改变早于 AChE。结论 在大鼠不同类型脊髓损伤后,CGRP 和 AChE 的活性和浓度与运动终板退变的程度不同。

[关键词] 脊髓损伤;运动终板;降钙素基因相关肽;乙酰胆碱酯酶;大鼠

Changes of Calcitonin Gene-related Peptide and Acetylcholine Esterase in Motor End Plates after Spinal Cord Injury in Adult Rats ZHANG Ai-feng, OU Xi-chao, YANG Zhao-yang, et al. Neuroscience Research Institute of Capital Medical University, Key Laboratory of Beijing Neuroregeneration Repair Research, Key Laboratory of Neural Degeneration of Ministry of Education, Beijing 100069, China

Abstract: **Objective** To explore the degeneration of motor end plates (MEP) by observing the expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and acetylcholine esterase (AChE) in the MEP after different types of spinal cord injury. **Methods** 60 adult female Wistar rats were randomly assigned to 3 groups: sham group, completely transection group and contusion group. The content of AChE in the MEP was detected with Karnovsky-Roots staining and the expression of CGRP was then determined with immunohistochemistry. **Results** The content of both AChE and CGRP significantly decreased after either type of spinal cord injury. However, their activity gradually recovered to the normal level in the contusion group, but not in the transection group. Moreover, the changes of CGRP occurred earlier than those of AChE. **Conclusion** The motor end plate degenerates differently after different kinds of spinal cord injury in adult rat, CGRP and AChE are related to the degeneration of MEP.

Key words: spinal cord injury (SCI); motor end plates (MEP); calcitonin gene-related peptide (CGRP); acetylcholine esterase (AChE); rats

[中图分类号] R651.2 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)11-1030-03

[本文著录格式] 张皓峰,欧喜超,杨朝阳,等.大鼠脊髓损伤后运动终板内乙酰胆碱酯酶和降钙素基因相关肽的变化[J].中国康复理论与实践,2008,14(11):1030-1032.

在过去的 20 年,随着各种脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)动物模型的出现,对于脊髓损伤的研究也取得了重大发展。神经系统损伤修复后运动功能的恢复最终要依赖于运动终板结构的保存及其生理功能的恢复;许多研究已经证实,降钙素基因相关肽(CGRP)和乙酰胆碱酯酶(AChE)在维持外周靶肌肉形态、发挥运动终板功能中发挥着重要作用。

1 材料和方法

1.1 材料 雌性 Wistar 大鼠,首都医科大学实验动物中心提供,体重 225~250 g,随机分成假手术组(A组, n=8)、切割型脊髓损伤组(B组, n=26)和撞击型脊髓损伤组(C组, n=26);小鼠来源抗人 CGRP 多克隆抗体:Sigma;生物素化抗鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记链

霉卵白素:中杉试剂公司;碘化乙酰硫代胆碱:Sigma。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 大鼠用 6%水合氯醛 6 ml/kg 腹腔注射麻醉,俯卧位固定于鼠板上,显微镜下暴露 T₈~T₉ 脊髓。

1.2.1.1 切割型脊髓损伤模型 将脊髓硬脊膜打开,使用显微外科剪刀将一段长约 3 mm 脊髓全部切除,然后用吸引器于软膜下吸断未横断的脊髓组织,确认此段无组织残留。术中采用压迫和电凝进行止血,9/0 显微缝合线缝合硬脊膜,分层缝合肌肉、皮肤,碘酒消毒切口。

1.2.1.2 撞击型脊髓损伤模型 采用 NYU(北京军区总医院全军骨科中心实验室进行)脊髓打击器,以 60 g/cm 打击 T₉ 平面脊髓,冲击重物为圆柱形,横断面直径 2.5 mm,质量 10 g,从距离 T₉ 表面 60 mm 高度自由下落造成重度撞击伤模型。

1.2.1.3 假手术组 同法暴露 T₉ 段脊髓而不造成脊髓损伤。

术后给予青霉素 2×10⁵ U/次,2 次/d;按摩膀胱 2~3 次/d,防止泌尿系统及其他并发症的发生。

基金项目:北京市自然科学基金项目(7041002);北京市教育委员会科技发展计划项目(KZ200310025008)。

作者单位:1.首都医科大学附属友谊医院口腔科,北京市 100050; 2.首都医科大学北京神经科学研究所,北京市神经再生修复研究重点实验室,教育部神经变性病学重点实验室,北京市 100069。作者简介:张皓峰(1958-),男,北京市人,副主任医师,主要研究方向:周围神经损伤与修复。通讯作者:李晓光。

1.2.2 HE 染色 损伤组大鼠手术 1 周后,经 4%多聚甲醛溶液灌注固定,取脊髓损伤处组织作常规石蜡包埋,纵行连续切片,片厚 8 μm ,进行常规苏木精-伊红染色。

1.2.3 AChE 染色(Karnovsky-Roots 直接法) 术后 1 周、2 周、4 周、10 周, B、C 组大鼠各取 6 只进行灌注固定,取 L₂~L₄ 脊髓节段进行恒冷箱(-20℃)脊髓横行冰冻切片,片厚 30 μm 。染色方法:切片入 AChE 孵育液[含醋酸缓冲液(pH=6.3) 6.5 ml、碘化硫代乙酰胆碱 5 mg、0.1 mol/L 枸橼酸钠 0.5 ml、30 mmol/L 无水硫酸铜 1.0 ml、双蒸水 1.0 ml、5 mmol/L 高铁氰化钾(GR 及 AR 级)1.0 ml]37℃孵育 1.5~2 h,蒸馏水洗 3 次,脱水,透明,树胶封片。

1.2.4 CGRP 免疫组织化学染色 取材同 AChE 染色, L₂~L₄ 脊髓节段脊髓横行冰冻切片,片厚 30 μm 。染色方法:0.01 mol/L PBS-0.3% Triton-X100 浸洗切片 3 次,每次 5 min;蒸馏水浸洗 3 遍,共 10 min;3% H₂O₂ 室温孵育 15 min 清除内源性过氧化物酶;0.1 mol/L PBS-0.3% Triton-X100 浸洗切片 3 次,共 10 min。5%山羊血清室温孵育 30 min,以封闭非特异性抗原,降低染色背景。直接入兔来源的 CGRP 多克隆抗体(1:2000),4℃过夜。0.1 mol/L PBS 浸洗 3 遍,共 10 min。加入生物素化的山羊抗兔 IgG(1:300),室温孵育 3 h。0.1 mol/L PBS 浸洗 3 遍,共 10 min。加入辣根过氧化物酶标记链霉卵白素(1:300),室温孵育 3 h。DAB 显色,室温 20 min, DW 终止显色;苏木素复染细胞核。脱水,透明,树胶封片。

1.2.5 运动终板的形态组织学观察和形态定量分析 应用 Leica Qwin 图像分析系统测定 AChE 和 CGRP 阳性染色部位的透光度值。

1.3 统计学方法 数值以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 HE 染色 B 组大鼠损伤处组织行 HE 染色,均证实为脊髓完全横断,切片上可见脊髓无明显肿胀,切

口较整齐,脊髓组织在损伤处直径略微变细。C 组大鼠脊髓损伤处腹侧可见软脊膜完整,有约 0.1~0.2 mm 厚正常白质结构残留。

2.2 AChE 染色 A 组大鼠腓肠肌运动终板为棕黑色,细颗粒状亚铁氰化铜沉淀,在纵切面上其形状为椭圆形或卵圆形,大小为 20~40 μm ,边缘清晰锐利,着色均匀,一根肌纤维上只能见到一个运动终板。术后 1 周, B、C 组大鼠前角运动神经元 AChE 着色与正常组无明显差异;术后 4 周, B 组明显变浅, C 组稍有变浅;术后 10 周, B 组大鼠前角运动神经元 AChE 着色仍较浅,但 C 组大鼠与 4 周时相比有了明显的恢复。

Leica Qwin 图像分析显示, B、C 组术后 1 周 AChE 阳性染色部位的透光度与 A 组相比无显著性差异($P>0.05$);术后 4 周与 A 组相比透光度明显增加($P<0.01$), B、C 组间相比也有显著性差异($P<0.05$);术后 10 周, C 组大鼠与 B 组相比有了明显恢复($P<0.01$)(图 1)。

2.3 CGRP 免疫组织化学染色 A 组大鼠腓肠肌中可见运动终板被 CGRP 抗体清晰标记,显示 CGRP 免疫阳性标记与 AChE 组织化学所显示的运动终板分布一致,并且阳性部分(运动终板区域)分布较为均匀,着色清晰,颜色相对较深,结构界限较清晰。B、C 组大鼠术后 1 周 CGRP 免疫染色阳性部分明显变浅,结构不甚清楚且部分运动终板出现染色模糊;术后 4 周, B、C 组大鼠阳性部分仍较浅; B 组术后 10 周, CGRP 免疫染色阳性部分仍较 A 组浅,结构模糊; C 组术后 10 周与 1 周时相比 CGRP 免疫阳性染色部分结构较清晰,且着色变深。

Leica Qwin 图像分析显示, B、C 组大鼠损伤 1 周后运动终板 CGRP 阳性染色部位的透光度值较 A 组大鼠明显增大($P<0.01$), B、C 两组相比无显著性差异($P>0.05$);术后 4 周 C 组透光度值有所降低; B 组术后 10 周与 A 组相比透光度值明显增加($P<0.01$), 而 C 组术后 10 周与 A 组相比无显著性差异,并且 B、C 两组相比有显著性差异($P<0.05$)(图 2)。

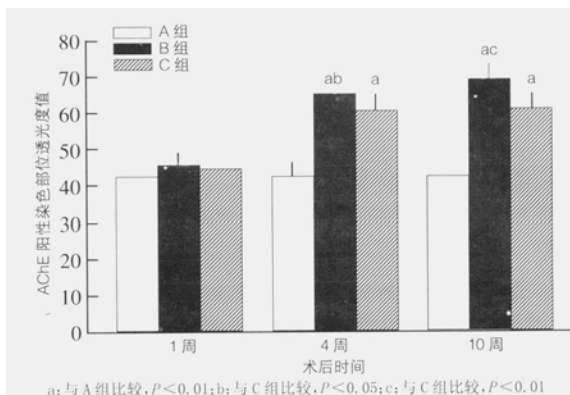


图 1 大鼠脊髓损伤后腓肠肌 AChE 的变化

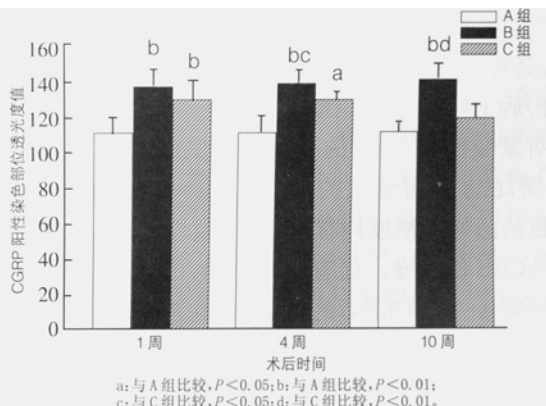


图 2 大鼠脊髓损伤后腓肠肌 CGRP 的变化

3 讨论

本实验采用的切割型脊髓损伤模型^[1]是在显微镜直视状态下,于软脊膜内小心细致地切断,吸除脊髓组织,由于外侧及腹侧软脊膜可以完整保留,透明的软脊膜可帮助判断组织是否残留,并且组织学检验也证实为脊髓完全横断。使用 NYU 脊髓打击器^[2]制作的重度撞击损伤模型,能够在相当程度上模拟人类脊髓受损的受力过程,但脊柱脊髓的偏移常常造成损伤结果的不一致性,损伤后仍会有部分轴突残留于脊髓的周边区域,通过 HE 染色发现 C 组大鼠脊髓腹侧仍有明显厚薄不一的白质纤维残留,证实了其损伤结果的不一致性与不完全性。由于残留纤维的代偿作用,导致两组大鼠脊髓损伤后运动终板退变的程度也不同。

正常生理条件下,运动神经元通过终板与骨骼肌相联系,支配骨骼肌完成各项生理功能。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。各种形式的 AChE 都能在脊髓运动神经元和骨骼肌细胞中找到^[3-4]。AChE 活性的强弱可反映运动神经元的功能状态^[5],终板区 AChE 浓度也能够反映终板退变及再生情况^[6];研究显示,周围神经离断后远端及去神经支配骨骼肌的 AChE 活性明显减低,之后 AChE 阳性反应的出现可认为是神经纤维再生标志之一^[7]。本实验结果显示,在脊髓损伤后 1 周时,运动终板 AChE 水平与正常组相比无明显变化;4 周时两组模型大鼠均出现染色变浅,并且 B 组大鼠更明显;10 周时 C 组大鼠由于残留纤维的代偿作用,运动终板 AChE 染色与正常组相比无显著性差异,但 B 组大鼠 10 周时损伤平面以下运动神经元和骨骼肌运动终板 AChE 的活性仍处于较低水平,可能与损伤的程度较重有关。

CGRP 在神经细胞胞体合成,在感觉和运动神经纤维中经逆行和顺行轴浆运输在神经元和神经末梢之间进行传递^[8-9]。CGRP 能调节中枢神经系统及周围神经系统的突触传递。脊髓横断后,脊髓前角运动神经元失去了上运动神经元对其 CGRP 合成的促进信号^[10],CGRP 合成减少,神经末梢释放的 CGRP 也减少,其对肌细胞的作用随之减弱。本研究显示,在脊髓损伤后 1 周 CGRP 免疫组化染色阳性部位的着色已经明显变浅,CGRP 的变化早于 AChE 的变化;术后 10 周,由于残留纤维的代偿,C 组大鼠 CGRP 在运动终板的活性和浓度均有明显提高,且 CGRP 的改变早于 AChE 的改变。已有研究证实,CGRP 不仅调节乙酰胆碱受体(AChRs)的代谢,而且还直接或者间接参

与终板处 AChE 四聚体和其他形式 AChE 的调节^[11]。CGRP 主要通过顺行轴浆运输,调节 cAMP 信号传导通路激活的肌肉 AChR 的合成与聚集^[12]。因此在检测上运动神经元损伤后骨骼肌运动终板是否退变时,CGRP 免疫组化检测较 AChE 更为敏感。

本研究显示,大鼠不同类型脊髓损伤后,运动终板存在不同程度的退变,脊髓不完全性损伤后,AChE 和 CGRP 的水平由低变高的这一动态变化,反映了运动终板功能从受损到逐渐恢复的变化过程,且随着时间的延长,双下肢的运动功能也逐渐恢复。

[参考文献]

- [1] Marder E, Borgens RB. Functional recovery after spinal hemisection in guinea pigs: the effects of applied electric field[J]. J Comp Neurol, 1990, 96(6): 634 - 640.
- [2] 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(2): 244 - 256.
- [3] Inestrosa NC, Perelman A. Distribution and anchoring of molecular forms of acetylcholinesterase[J]. Trends Pharmacol Sci, 1989, 10(8): 325 - 329.
- [4] Legay C. Why so many forms of acetylcholinesterase? [J]. Microsc Res Tech, 2000, 49(1): 56 - 72.
- [5] 殷琦, 陆欲朴, 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.
- [6] 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.
- [7] Ma JZ, Luo YX, Wu XM, et al. The study on NGF effect on degenerated and reinnervated motor end-plate histochemical and ultrastructural changes[J]. Zhonghua Xianwei Waik Zazhi (Chin J Microsurg), 1998, 21(5): 118 - 120.
- [8] Kashihara Y, Sakaguchi M, Kuno M. Axonal transport and distribution of endogenous calcitonin gene-related peptide in rat peripheral nerve[J]. J Neurosci, 1989, 9(11): 3796 - 3802.
- [9] Fernandez HL, Hodges-Savola CA. Axoplasmic transport of calcitonin gene-related peptide in rat peripheral nerve as a function of age[J]. Neurochem Res, 1994, 19(11): 1369 - 1377.
- [10] Marlier L, Rajaofetra 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(1): 40 - 47.
- [11] Fernandez HL, Ross GS, Nadelhaft I. Neurogenic calcitonin gene-related peptide: a neurotrophic factor in the maintenance of acetylcholinesterase molecular forms in adult skeletal muscles[J]. Brain Res, 1999, 844(1-2): 83 - 97.
- [12] 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.

(收稿日期: 2008-03-10 修回日期: 2008-08-28)