

· 基础研究 ·

脊髓损伤后脂质蓄积对损伤灶自发荧光强度的影响

郭磊,程志坚,张舵,常素娥,贺西京
(西安交通大学第二附属医院骨二科,陕西 西安 710004)

【摘要】 目的:研究小鼠脊髓损伤后损伤灶的脂质蓄积与自发荧光强度之间的关系,探索硫酸铜能否消除脊髓损伤灶的自发荧光。方法:选取鼠龄 8~12 周,体重 18~24 g 的野生型小鼠 36 只,随机分为正常对照组(4 只)与脊髓损伤组(32 只)。脊髓损伤组于损伤后 1、2、4、8 周分别随机抽取 8 只处死,以损伤灶为中心取脊髓组织标本行冰冻切片(正常对照组取相同节段的脊髓,标本放入 4%多聚甲醛溶液进行后固定),在荧光显微镜的绿色通道下观察自发荧光,进行油红 O 染色显示损伤灶的脂质蓄积,并分析自发荧光强度与脂质蓄积量的相关性。配制硫酸铜缓冲液处理切片以消除自发荧光,并优化硫酸铜浓度与作用时间。结果:正常脊髓组织切片未发现明显自发荧光或脂质染色,而脊髓损伤后在损伤灶出现自发荧光,并且强度随损伤后时间延长而增强。油红 O 染色显示损伤灶的脂质同样随损伤后时间延长而蓄积,并且增长趋势与自发荧光的增强趋势呈正相关。应用硫酸铜缓冲液后,自发荧光强度显著降低,优化硫酸铜浓度与作用时间后效果更好。结论:脊髓损伤后损伤灶脂质蓄积可能在决定自发荧光的强度上起重要作用,自发荧光强度可以作为评估脂质过氧化损害的简便指标;优化的硫酸铜法能够显著消除脊髓损伤后损伤灶的自发荧光,有利于免疫荧光染色技术在脊髓损伤研究中的应用。

【关键词】 脊髓损伤; 脂质移动; 自发荧光; 硫酸铜

DOI:10.3969/j.issn.1003-0034.2016.08.013

Effect of lipid accumulation after spinal cord injury in autofluorescence intensity of injury site GUO Lei, CHENG Zhijian, ZHANG Duo, CHANG Su-e, and HE Xi-jing. The Second Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi, China

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between lipid accumulation and autofluorescence intensity of injury site after spinal cord injury (SCI), and explore whether CuSO_4 can eliminate autofluorescence in the injury site after SCI. **Methods:** Thirty-six Wild Type mice at age of 8 to 12 weeks (weight 18 to 24 g) were randomly divided into normal control group ($n=4$) and SCI group ($n=32$). Respectively, 8 mice of SCI group were sacrificed randomly at 1 week, 2 weeks, 4 weeks and 8 weeks after injury. Frozen sections of spinal cord tissue with injury site at the center were made to observe autofluorescence under green channel of fluorescence microscope (Specimens of normal control group were taken from the same segment of the spinal cord, and fixed with 4% paraformaldehyde solution). Oil Red O staining was applied to visualize the lipid accumulation in the injury site, and correlation between lipid accumulation and autofluorescence intensity was analyzed. Furthermore, sections were incubated with CuSO_4 buffer to eliminate autofluorescence, and CuSO_4 concentration and incubation time was optimized. **Results:** No obvious autofluorescence or lipid staining was found in normal spinal cord tissue sections. By contrast, autofluorescence appeared in the injury site of spinal cord sections, and the intensity increased with passing time after injury. Oil Red O staining showed that lipid accumulated in the injury site with passing time after injury as well, and the correlation between lipid accumulation and autofluorescence intensity was positive. After incubation with CuSO_4 buffer, the autofluorescence in the injury site was significantly reduced, especially after optimizing CuSO_4 concentration and incubation time. **Conclusion:** Lipid accumulation may play an important role to determine the autofluorescence intensity of injury site after SCI, and the autofluorescence intensity can be used as a simple index for evaluating lipid peroxidation damage. Optimized method of using CuSO_4 can significantly reduce the autofluorescence in the injury site after SCI, which will be beneficial to the application of immunofluorescence staining technique in the study of SCI.

KEYWORDS Spinal cord injuries; Lipid mobilization; Autofluorescence; Copper Sulfate

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2016, 29(8): 738-743 www.zggszz.com

基金项目:国家自然科学基金(编号:81571209)

Fund program: National Nature Science Foundation of China (No. 81571209)

通讯作者:贺西京 E-mail: xijing_h@vip.tom.com

Corresponding author: HE Xi-jing E-mail: xijing_h@vip.tom.com

大量的研究表明脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 能激起损伤灶的炎症反应, 进一步导致神经退化和组织破坏^[1]。炎症反应能够吸引来源于骨髓的巨噬细胞浸润损伤灶, 吞噬神经组织脱髓鞘而形成的大量髓鞘碎片, 并形成包含大量脂质的“泡沫细胞”长期存在于损伤灶, 造成对脊髓组织的继发性损害^[2]。油红 O 染色能够对这些“泡沫细胞”进行染色, 显示髓鞘碎片被吞噬消化及形成的脂质逐渐蓄积的过程, 所以经常用于脱髓鞘疾病的研究^[3]。免疫荧光染色能够为研究疾病的病理进程提供高质量的图片, 故也得到了广泛的应用。然而笔者在研究损伤脊髓组织时, 发现损伤灶在荧光显微镜的绿色荧光通道下常出现较强的自发荧光, 使免疫荧光染色的背景不清楚, 甚至造成假阳性信号的干扰, 阻碍了免疫荧光染色技术在损伤脊髓组织切片中的应用。目前尚未有文献涉及脊髓损伤灶自发荧光的成因和特点, 而在脑组织等其他神经组织中脂褐素 (Lipofuscin) 是造成自发荧光的常见原因^[4-5]。脂褐素不仅内含大量的脂质, 其产生也与脂质的过氧化作用相关^[6]。因此, 本研究初步分析小鼠 SCI 模型中损伤灶脂质蓄积与自发荧光强度之间的关系, 并优化基于 Schnell 介绍的硫酸铜法来消除脊髓损伤灶的自发荧光^[7]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

8~12 周大野生型小鼠 36 只, 体重 18~24 g。硫酸铜、醋酸铵、醋酸、多聚甲醛、丙二醇、蔗糖、油红 O 等化学试剂均购自美国 Sigma 公司。冰冻切片机 (Thermo 公司, 美国), 倒置显微镜 (Olympus 公司, 日本), 荧光显微镜 (Life Tech 公司, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 将 36 只小鼠随机分为正常对照组与 SCI 组, 正常对照组 4 只, SCI 组 32 只。正常对照组不做任何处理, SCI 组进行 SCI 模型的制备。

1.2.2 SCI 模型制备 用 5% 的异氟醚诱导麻醉, 再调至 1.5%~2% 维持麻醉。常规备皮、消毒, 无菌铺巾, 用手术刀沿着背部中线划开 T₆ 至 L₂ 脊柱水平的皮肤, 分离 T₈ 至 T₁₂ 脊椎背侧上的肌肉及韧带, 用微型咬骨钳去掉 T₉ 和 T₁₀ 脊椎的棘突, 小心切除 T₁₀ 的椎板和 T₉ 一半的椎板以充分暴露 T₁₀ 段的脊髓, 夹住 T₈ 和 T₁₁ 的棘突以固定小鼠, 采用美国罗格斯大学 Keck 神经科学合作中心研发的第 3 代脊髓损伤打击器, 调零后, 将 10 g 重的金属杆从 6.25 mm 高度释放, 确保损伤处于脊髓中线以确保脊髓两侧的损伤程度相同, 然后逐层缝合, 制备成 T₁₀ 节段 SCI 小鼠模型^[8]。

1.2.3 术后护理 术后立即给予保暖、补水、镇痛、抗炎处理; 室温分笼饲养, 笼中预先放少量食物并采用长嘴水瓶以方便术后饮食; 每天进行 2 次膀胱按摩排尿以预防尿路感染, 并继续抗炎至术后 1 周; 术后每周监测 1 次体重、肌张力、大小便量。

1.2.4 取材、切片 分别于损伤后 1、2、4、8 周分别随机处死 8 只小鼠, 依次用生理盐水和 4% 多聚甲醛行心脏灌注, 以损伤灶为中心取得脊髓标本, 正常对照组取相同节段的脊髓, 标本放入 4% 多聚甲醛溶液进行后固定, 在切片前 1 d 放入 4 °C 冰箱 30% 蔗糖溶液过夜脱水, OCT 包埋脊髓标本后行冰冻纵切片, 厚度 7 μm。

1.2.5 油红 O 染色 冰冻切片室温放置 30 min 以平衡温度, PBS 浸洗后用 100% 丙二醇浸洗 5 min 以去掉标本中的水分, 滴加油红 O 染料在 60 °C 烤箱中作用 10 min, 去掉油红 O 染料后滴加 85% 丙二醇作用 5 min 并在蒸馏水中浸洗至没有染料渗出, 甘油明胶封片后照相。

1.2.6 自发荧光淬灭 将硫酸铜和醋酸铵溶于蒸馏水中配成 10 mM 硫酸铜 50 mM 醋酸铵溶液, 再用醋酸调整至 pH 5.0, 得到硫酸铜缓冲液作为自发荧光淬灭剂。用 PBS 洗去损伤脊髓切片的包埋剂, 滴加硫酸铜缓冲液处理 10 min, 在荧光显微镜下观察并照相。为增强消除自发荧光的效果, 配制 20 mM 硫酸铜缓冲液并作用切片 20 min, 在荧光显微镜下观察并照相。

1.3 观察项目与方法

1.3.1 术后行为观察 按双盲原则对脊髓损伤后小鼠进行双后肢运动功能评分, 以 Basso 小鼠运动评分标准 (Basso Mouse Scale, BMS) (0~9 分)^[9] 进行, 并观察记录小鼠双后肢肌张力、反射、大小便及一般状态。

1.3.2 油红 O 染色组织切片观察 分别在 4、10、20 倍镜下观察脊髓损伤后不同时期的脊髓油红 O 染色组织切片, 并在 10 倍镜下以损伤灶为中心对染色切片进行拍照, 用 Image Pro Plus 软件对图像进行分析, 并取 2 位实验员按双盲原则计算出的油红 O 染色面积平均值, 对不同时期的油红 O 染色面积进行比较。

1.3.3 自发荧光淬灭前后观察 分别在 4、10、20 倍镜的绿色荧光通道下观察正常脊髓组织与脊髓损伤后不同时期脊髓切片的自发荧光, 及运用硫酸铜后的脊髓切片的自发荧光, 并在 10 倍镜下以损伤灶为中心进行拍照, 用 Image Pro Plus 软件对图像进行分析, 并取 2 位实验员按双盲原则计算出的自发荧光强度平均值, 对不同时期及淬灭前后的自发

荧光强度进行比较。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件包对所有实验数据进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, n 表示试验重复次数,相关性分析采用 Spearman 等级相关分析,组间差异用单因素方差分析(One Way ANOVA)比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后行为观察

在整个观察过程中,正常对照组小鼠的双后肢运动功能 BMS 评分一直为 9 分,其肌张力、反射、大小便均正常,一般状况良好。SCI 组小鼠术中及术后无意外死亡,术前所有小鼠的后肢运动功能 BMS 评分为 9 分,术后即刻双后肢软瘫,肌张力及反射活动消失,BMS 评分为 0 分,并出现尿潴留,需要人工按压促进排尿。从术后第 3 天 BMS 评分开始逐渐升高,双侧评分基本一致,肌张力开始逐渐增强。术后 1 周开始能够自主排便,体重逐渐回到术前水平,BMS 评分逐渐升高,术后 1、2 周的 BMS 评分分别为 1.69 ± 0.33 ($n=32$)、 3.00 ± 0.41 ($n=24$)。从术后 3 周 BMS 评分开始到达平台期,此后评分缓慢增高,术后 4 周 BMS 评分为 3.69 ± 0.56 ($n=16$),观察期结束即术后第 8 周时小鼠 BMS 评分为 4.31 ± 0.52 ($n=8$)。术后各时间点 SCI 组小鼠的双后肢运动功能 BMS 评分与正常对照组的差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 油红 O 染色观察 用油红 O 染色显示脊髓组织的脂质蓄积,正常脊髓组织未见明显的油红 O 着色(图 1)。损伤脊髓组织切片的损伤区域都被油红 O 染色,而且着色面积随着损伤后时间推移有所变化。选取损伤后各时间点着色面积最大的切片做代表,损伤 1 周后损伤区域有大量染成红色的脂质堆积,2 周后损伤区域油红 O 着色面积略减少,4 周后油红 O 着色面积又再次增加并且颜色加深,8 周后的油红 O 着色面积最大(图 2)。经过 Image Pro Plus 软件计算染色面积并用 SPSS 19.0 软件分析,脊髓损伤 1 周后油红 O 染色面积 (0.150 ± 0.013) mm^2 ,2 周后 (0.120 ± 0.008) mm^2 ,4 周后 (0.180 ± 0.009) mm^2 ,8 周后 (0.230 ± 0.012) mm^2 ($n=4$)。

2.3 自发荧光观察

正常脊髓组织切片未发现明显的自发荧光(图 3),脊髓损伤后 1、2、4、8 周的切片在绿色荧光通道都能观察到分布于整个损伤灶内的自发荧光,而损伤灶外的脊髓组织并无明显自发荧光。在脊髓损伤后 1 周时已有较明显的自发荧光,2 周时自发荧光稍减弱,之后随着损伤后时间延长而增强,在损伤后 8 周自发荧光非常明显(图 4)。经过 Image Pro Plus 软件计算平均荧光强度值并用 SPSS 19.0 软件分析,脊髓损伤 1 周后在绿色荧光通道下的自发荧光平均强度为 0.031 ± 0.003 ,2 周后为 0.025 ± 0.002 ,4 周后为 0.049 ± 0.011 ,8 周后为 0.083 ± 0.006 ($n=4$)。

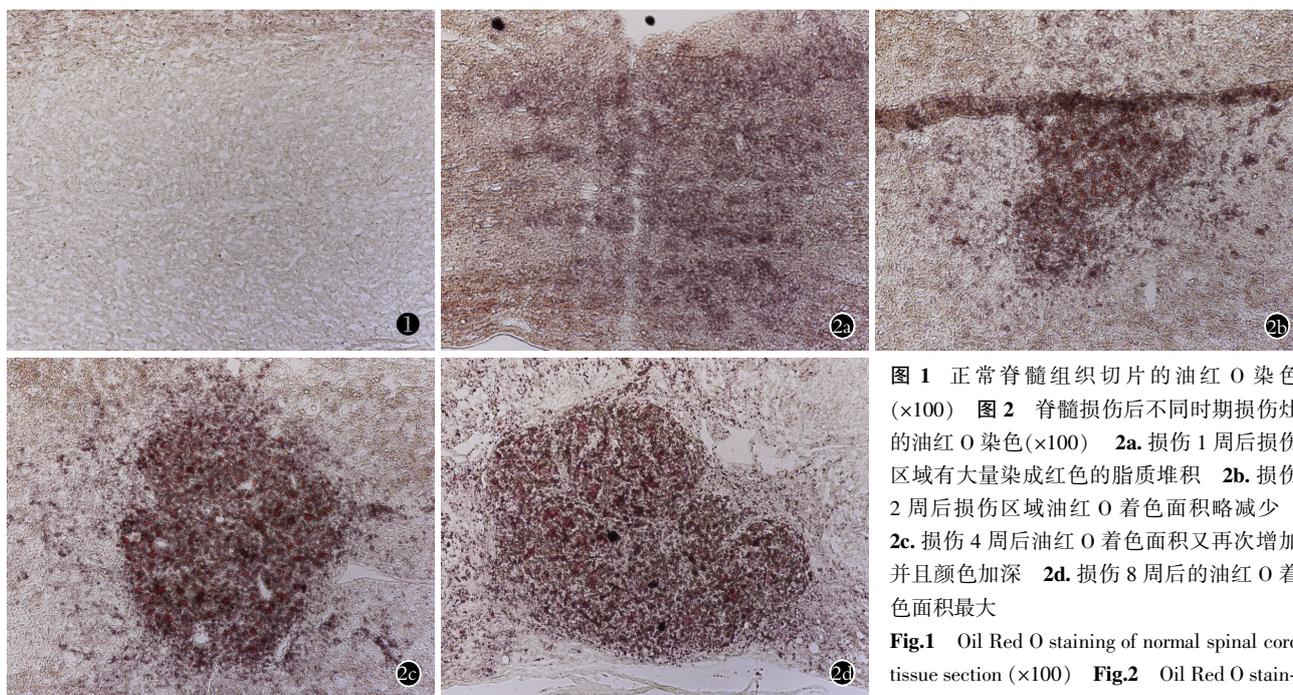


图 1 正常脊髓组织切片的油红 O 染色 ($\times 100$) 图 2 脊髓损伤后不同时期损伤灶的油红 O 染色 ($\times 100$) 2a. 损伤 1 周后损伤区域有大量染成红色的脂质堆积 2b. 损伤 2 周后损伤区域油红 O 着色面积略减少 2c. 损伤 4 周后油红 O 着色面积又再次增加并且颜色加深 2d. 损伤 8 周后的油红 O 着色面积最大

Fig.1 Oil Red O staining of normal spinal cord tissue section ($\times 100$) Fig.2 Oil Red O staining of the injury site at time points after SCI ($\times 100$)

100) 2a. A mess of lipid with stained red color accumulated in the injury site at 1 week after SCI 2b. The area of Oil Red O staining spots slightly decreased at 2 weeks after SCI 2c. With passing time after injury, the area of Oil Red O staining spots increased again with deeper coloring at 4 weeks after SCI 2d. The area was biggest at 8 weeks after SCI

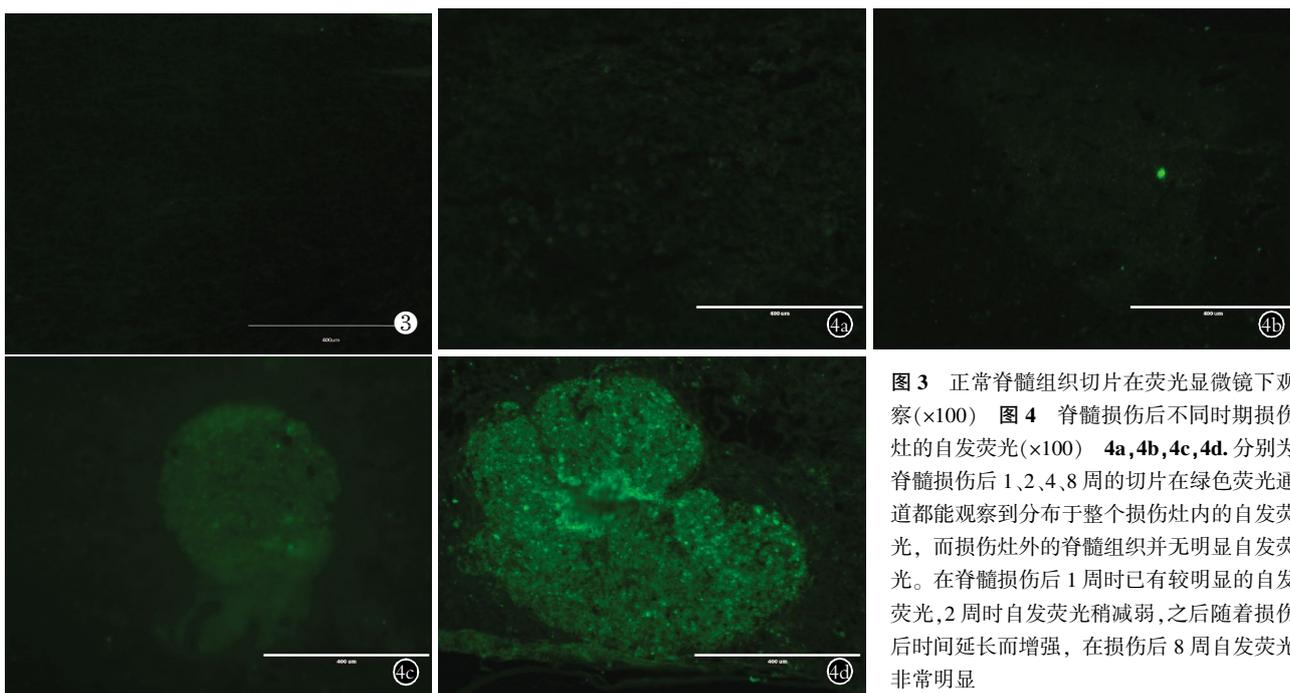


图3 正常脊髓组织切片在荧光显微镜下观察($\times 100$) 图4 脊髓损伤后不同时期损伤灶的自发荧光($\times 100$) 4a,4b,4c,4d. 分别为脊髓损伤后1、2、4、8周的切片在绿色荧光通道都能观察到分布于整个损伤灶内的自发荧光,而损伤灶外的脊髓组织并无明显自发荧光。在脊髓损伤后1周时已有较明显的自发荧光,2周时自发荧光稍减弱,之后随着损伤后时间延长而增强,在损伤后8周自发荧光非常明显

Fig.3 Normal spinal cord sections under fluorescence microscope ($\times 100$) Fig.4 Autofluorescence in the injury site at time points after SCI ($\times 100$) 4a,4b,4c,4d. Autofluorescence was observed inside the injury site at 1,2,4,8 weeks after SCI, by contrast, no obvious autofluorescence was found outside the injury site of spinal cord. There was obvious autofluorescence in the injury site at 1 week after SCI. The intensity of autofluorescence was slightly decreased at 2 weeks after SCI, but increased with passing time after injury from then on, and the autofluorescence was very obvious at 8 weeks after SCI

2.4 脂质蓄积与自发荧光强度的相关性分析

脂质蓄积量与自发荧光强度相关性采用 Spearman 等级相关分析,结果表明脊髓损伤灶的脂质蓄积与自发荧光强度呈正相关($r=0.96, P<0.05$,图5)。

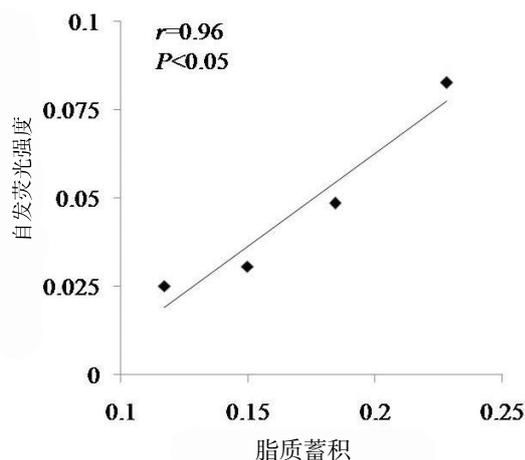


图5 脊髓损伤灶脂质蓄积与自发荧光强度的相关性

Fig.5 Correlation between lipid accumulation and autofluorescence intensity of injury site after SCI

2.5 自发荧光淬灭效果观察

配制 10 mM 硫酸铜 50 mM 醋酸铵溶液(pH5.0)作荧光淬灭剂,与损伤脊髓组织切片作用 10 min

后,自发荧光强度大幅降低(图6)。经过 Image Pro Plus 软件计算平均荧光强度值并用 SPSS 19.0 软件分析,损伤1周后自发荧光平均强度为 0.020 ± 0.001 ,2周后为 0.018 ± 0.001 ,4周后为 0.027 ± 0.003 ,8周后为 0.036 ± 0.004 ($n=4$),与应用淬灭剂前的差异具有统计学意义($P<0.05$,表1)。将淬灭剂中硫酸铜的浓度提高到 20 mM 并与损伤8周后脊髓组织切片孵育 20 min,在荧光显微镜下几乎观察不到自发荧光(图7)。

表1 应用硫酸铜缓冲液前后脊髓损伤灶自发荧光的对比 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of autofluorescence in the injury site before and after CuSO_4 buffer treatment ($\bar{x} \pm s$)

SCI后时间	动物数	荧光淬灭前	荧光淬灭后	P值
1周	4	0.031 ± 0.003	0.020 ± 0.001	0.000
2周	4	0.025 ± 0.002	0.018 ± 0.001	0.001
4周	4	0.049 ± 0.011	0.027 ± 0.003	0.010
8周	4	0.083 ± 0.006	0.036 ± 0.004	0.000

3 讨论

本研究首次揭示了脊髓损伤后损伤灶的脂质蓄积与损伤灶自发荧光的强度密切相关,并验证了优

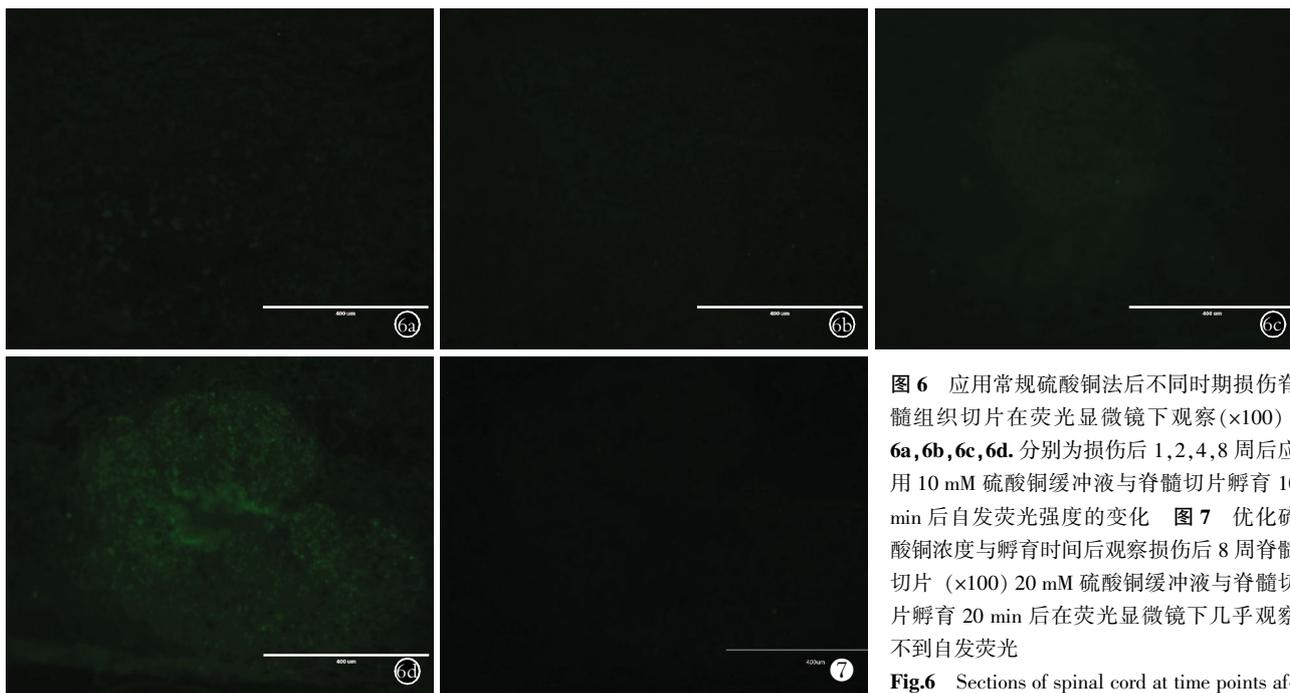


图 6 应用常规硫酸铜法后不同时期损伤脊髓组织切片在荧光显微镜下观察(×100) 6a, 6b, 6c, 6d. 分别为损伤后 1, 2, 4, 8 周后应用 10 mM 硫酸铜缓冲液与脊髓切片孵育 10 min 后自发荧光强度的变化 图 7 优化硫酸铜浓度与孵育时间后观察损伤后 8 周脊髓切片 (×100) 20 mM 硫酸铜缓冲液与脊髓切片孵育 20 min 后在荧光显微镜下几乎观察不到自发荧光

using conventional CuSO_4 method (×100) 6a, 6b, 6c, 6d. Autofluorescence was greatly reduced after sections were incubated with 10 mM CuSO_4 buffer for 10 minutes at 1, 2, 4, 8 weeks after injury Fig.7 Sections of spinal cord at 8 weeks after injury by optimized CuSO_4 concentration and incubation time (×100) Almost no autofluorescence could be observed under fluorescence microscope after sections were incubated with 20 mM CuSO_4 buffer for 20 minutes

Fig.6 Sections of spinal cord at time points after injury under fluorescence microscope after

化的硫酸铜法可以显著消除脊髓损伤灶的自发荧光。研究结果提示脊髓损伤后脂质蓄积可能在决定损伤灶的自发荧光强度上起到重要作用，自发荧光强度可以作为评估脂质过氧化损害的简便指标；而优化的硫酸铜法可以显著消除脊髓损伤灶的自发荧光，有利于免疫荧光染色技术在脊髓损伤研究中的应用。

脊髓损伤后神经组织脱髓鞘形成的髓鞘碎片长期存在，不仅吸引激活的巨噬细胞蓄积在损伤灶中抑制髓鞘再生^[10]，还会被巨噬细胞吞噬消化，形成包含大量脂质的“泡沫细胞”促进继发性损伤的发展^[2]。油红 O 染料仅对细胞内的中性脂染色，而不会对完整的髓鞘或正常的神经组织染色，因此可以反映脊髓损伤后脂质蓄积的变化^[2]。本研究显示损伤灶的脂质蓄积虽总体上是随损伤后时间延长而增多，但损伤 2 周后的脂质蓄积却比 1 周后略少，这可能与吞噬髓鞘碎片并将其转变成中性脂的巨噬细胞的浸润规律有关，即脊髓损伤后巨噬细胞的浸润数量在 1 周后达到高峰，此后迅速下降并 2 周后开始上升，并在 8 周后再次达到高峰^[11-12]。另外，脂质蓄积的变化也从侧面反映了脊髓损伤后神经纤维的髓鞘再生情况不理想^[13]。

在对冰冻切片进行免疫荧光染色时，除了未洗净包埋剂或荧光二抗等常见操作因素，脂褐素或“类

脂褐素”是神经组织切片出现自发荧光的重要原因^[4-5]。脂褐素导致的自发荧光波长非常接近绿色荧光蛋白(GFP)的波长，对绿色荧光通道下的免疫荧光染色结果干扰最大^[6]，故本实验主要在绿色荧光通道下观察脊髓损伤灶的自发荧光变化。脂褐素又被称为“老年素”，在脂质氧化的过程中产生^[14-15]。本实验所用小鼠年龄较小，而且术后 8 周时自发荧光也只局限于损伤灶，说明脂质蓄积在促进损伤灶脂褐素产生并增强自发荧光上起到重要作用。自发荧光的强度检测也说明了这一点，尤其是损伤后第 2 周时脂质蓄积面积相对损伤后第 1 周时减少，而自发荧光的强度也是同样的变化趋势，表明脂质蓄积量与自发荧光强度密切相关。自发荧光已经被用于评估某些疾病细胞内的脂质过氧化^[16]，提示自发荧光也许可以用于作为评估脊髓损伤灶内的脂质过氧化程度的标志，从而了解损伤灶的氧化破坏，为治疗脊髓损伤靶向脂质疗法提供更为简便的指标。

消除脂褐素相关的自发荧光的方法有很多，包括硼氢化钠、苏丹黑 B、高锰酸钾、硫酸铜、氯化铜、过氧化氢等^[5]。选用硫酸铜法来消除脊髓损伤灶的自发荧光，既是基于以往硫酸铜法消除类脂褐素在其他神经组织中造成的自发荧光的成功经验^[4,7]，也是因为硫酸铜具有抗原识别和荧光蛋白表达的相对惰性^[5,7]。笔者用 10 mM 硫酸铜醋酸铵溶液与脊髓切

片孵育 10 min, 损伤灶的自发荧光即显著减少。对于自发荧光较强烈的切片, 如损伤后 8 周脊髓切片, 用 20 mM 硫酸铜醋酸铵溶液与脊髓切片孵育 20 min, 自发荧光几乎被完全消除。说明优化的硫酸铜法能够消除脊髓损伤灶的自发荧光。这为今后在脊髓损伤研究中探索损伤灶的病理变化进行免疫荧光染色, 特别是双重或多重免疫荧光染色创造了良好的条件。

本研究也有不足之处, 如目前只对脊髓损伤程度一致的损伤灶在损伤后不同时间点的脂质蓄积与自发荧光强度的相关性进行了分析, 尚未讨论脊髓损伤的程度与脂质蓄积量或自发荧光强度的相关性; 另外, 在对损伤脊髓组织切片进行免疫荧光染色时如何优化硫酸铜法, 即在尽量消除自发荧光与最小影响目标抗体检测的平衡中达到最好效果, 这些都需要今后更进一步的探索研究。

参考文献

- [1] Ren Y, Young W. Managing inflammation after spinal cord injury through manipulation of macrophage function[J]. *Neural Plast*, 2013, 2013: 945034.
- [2] Wang X, Cao K, Sun X, et al. Macrophages in spinal cord injury: phenotypic and functional change from exposure to myelin debris [J]. *Glia*, 2015, 63(4): 635-651.
- [3] Smith ME. Phagocytosis of myelin in demyelinating disease: a review[J]. *Neurochem Res*, 1999, 24(2): 261-268.
- [4] Spitzer N, Sammons GS, Price EM. Autofluorescent cells in rat brain can be convincing impostors in green fluorescent reporter studies [J]. *J Neurosci Methods*, 2011, 197(1): 48-55.
- [5] Potter KA, Simon JS, Velagapudi B, et al. Reduction of autofluorescence at the microelectrode-cortical tissue interface improves antibody detection[J]. *J Neurosci Methods*, 2012, 203(1): 96-105.
- [6] Billinton N, Knight AW. Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence[J]. *Anal Biochem*, 2001, 291(2): 175-197.
- [7] Schnell SA, Staines WA, Wessendorf MW. Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue[J]. *J Histochem Cytochem*, 1999, 47(6): 719-730.
- [8] Young W. Spinal cord contusion models[J]. *Prog Brain Res*, 2002, 137: 231-55.
- [9] Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, et al. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains[J]. *J Neurotrauma*, 2006, 23(5): 635-659.
- [10] Imai M, Watanabe M, Suyama K, et al. Delayed accumulation of activated macrophages and inhibition of remyelination after spinal cord injury in an adult rodent model[J]. *J Neurosurg Spine*, 2008, 8(1): 58-66.
- [11] Beck KD, Nguyen HX, Galvan MD, et al. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment[J]. *Brain*, 2010, 133(Pt 2): 433-447.
- [12] Nguyen HX1, Beck KD, Anderson AJ. Quantitative assessment of immune cells in the injured spinal cord tissue by flow cytometry: a novel use for a cell purification method[J]. *J Vis Exp*, 2011, (50) pii: 2698.
- [13] 张舵, 寨旭, 贺西京. 油红 O 染色在大鼠脊髓损伤中的应用[J]. *中国骨伤*, 2015, 28(8): 738-742.
Zhang D, Zhai X, He XJ. Application of oil red O staining in spinal cord injury of rats[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2015, 28(8): 738-742. Chinese with abstract in English.
- [14] Markelic M, Velickovic K, Golic I, et al. The origin of lipofuscin in brown adipocytes of hyperinsulinaemic rats: the role of lipid peroxidation and iron[J]. *Histol Histopathol*, 2013, 28(4): 493-503.
- [15] Krohne TU, Stratmann NK, Kopitz J, et al. Effects of lipid peroxidation products on lipofuscinogenesis and autophagy in human retinal pigment epithelial cells[J]. *Exp Eye Res*, 2010, 90(3): 465-471.
- [16] Stoya G, Klemm A, Baumann E, et al. Determination of autofluorescence of red blood cells (RbCs) in uremic patients as a marker of oxidative damage[J]. *Clin Nephrol*, 2002, 58(3): 198-204.

(收稿日期: 2015-12-17 本文编辑: 王宏)