

胚胎脊髓移植后大鼠损伤脊髓 c-Jun 免疫反应的变化及其意义

张强¹ 吴越¹ 廖维宏² 王正国² 伍亚民² 李英玉²

(1. 第 88 医院全军骨科中心, 山东 泰安 271000; 2. 第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所三室, 重庆 400042)

【摘要】 目的 研究大鼠胚胎脊髓移植后能否影响 c-Jun 免疫反应的表达和脊髓损伤后大鼠功能的恢复。方法 将动物分为脊髓半切洞损伤加胚胎脊髓移植组(A 组)和单纯脊髓板切洞损伤加明胶海绵填塞组(B 组)。每个时相点每组 6 只动物, 术后 1, 3, 7, 14 和 28 天, 应用行为学和电生理检查观察大鼠功能恢复情况, 应用免疫细胞化学方法观察 c-Jun 免疫反应的表达, 采用计算机图像分析技术, 进行定量分析。结果 大鼠脊髓损伤后 c-Jun 免疫反应的表达 A 组明显高于 B 组, 胚胎脊髓抑制后可使损伤脊髓高表达 c-Jun 免疫反应持续到术后 7 天。增加的 c-Jun 免疫反应阳性细胞数目与神经功能的改善相平行。结论 胚胎脊髓移植后可使损伤脊髓高表达 c-Jun, 并促进大鼠功能恢复。

【关键词】 移植, 胎组织 脊髓损伤 免疫细胞化学

Variation of c-Jun Immune Reaction of Injured Spinal Cord in Rats after Fetal Spinal Cord Transplantation and Its Significance ZHANG Qiang, WU Yue, LIAO Wei-hong, et al. The 88th Hospital of Military (Shandong Tai'an, 271000)

【Abstract】 Objective To study the statement of immunoreaction of c-Jun and functional recovery of spinal cord injury in rats after fetal spinal cord(FSC) transplantation. **Methods** Experimental rats were divided into two groups: spinal cord hemisection injury combination with transplants of FSC to injured site group (group A), and spinal cord injury that received gelfoam pledgets group(group B). On the 1st, 3th, 7th, 14th and 28th day after operation, 6 animals in each group at each time phase, were observed for their function recovery with the methods of praxiology and electrophysiological examination, the animals were then sacrificed for the observation of the statement of c-Jun reaction by immunochemistry method and computer image analysis system was used for quantitative analysis. **Results** The c-Jun immunoreaction of group A were significantly higher than that of group B. On the 28th day after injury, positive cells of group B could still be recognized and that of group A returned to normal level at 7 days after operation. These increases of GFAP positive cells were paralleled with a significant improvement in neurological function recovery. **Conclusion** FSC transplantation is sufficient to increase the statement of immunoreaction of c-Jun and promote the recovery of neurological function of rats after spinal cord injury.

【Key Words】 Transplantation, fetal tissue Spinal cord injuries Immunocytochemistry

研究表明即早基因(immediate early genes IEGs)在中枢神经损伤后轴索再生中起重要的作用, IEGs 还参与许多损伤相关的细胞机制, 包括轴索切断, 神经转运阻滞, 神经分化和细胞死亡, IEGs 基因的表达如 c-Jun 还与某些类型的神经元轴索切断后的生长反应有关^[1,2]。我们研究的目的是观察胚胎脊髓移植后损伤脊髓 c-Jun 免疫反应的变化以及与脊髓功能恢复的关系。

1 材料与方 法

1.1 动物分组 Wistar 大鼠 60 只, 体重 180~250g, 雌雄不拘, 每个时相点每组 6 只动物。随机将动物分为脊髓半切洞损伤+ FSC 移植组(A 组)、单纯脊髓半切洞损伤组(B 组)。手术后 1 天, 3 天, 7 天, 14 天和 28 天, 应用行为学和电生理

检查观察大鼠功能恢复情况, 应用免疫细胞化学方法观察 c-Jun 免疫反应。

1.2 手术方法 戊巴比妥钠 30mg/kg 腹腔内注射麻醉, 腰背部脱毛, 将大鼠固定在脑立体定位仪上, 无菌条件下暴露脊髓腰膨大。用负压吸引的方法损毁并吸除腰膨大左半侧脊髓造成一约 2mm×2mm×2mm 大小的洞腔, 胚胎脊髓供体为同种异体妊娠 14 天的大鼠, 在麻醉和无菌条件下取出胎鼠。显微镜下仔细切取颈胸段胎鼠脊髓约 2mm, 尽可能将胚胎脊髓表面的软脊膜等结缔组织切除干净, 然后用玻璃针头吸取移植, 注入预制的脊髓洞腔内。B 组脊髓损伤后用同样大小的明胶海绵填充脊髓洞腔, 用 9-0 线缝合硬脊膜, 逐层缝合切口。

1.3 行为学检查 损伤后 1, 3, 7, 14, 28 天对动物称重和进行行为学检查, 斜板试验^[3]测量抓握能力和维持姿势的能力, 动物在斜板上维持 5 秒钟不滑下的角度。改良的 Tarlov 评分^[4]: 0: 没有自主性运动; 1: 仅限于髌膝关节的非反射性运动; 2: 肢体髌膝踝三个主要关节的运动; 3: 能主动支持体重和不协调步态, 或偶尔出现协调步态; 4: 前肢和后肢协调的步态, 行走时有趾间关节的运动; 5: 正常步态。

1.4 诱发电位检查 应用第三军医大学野战外科研究所研制的多功能神经诱发电位仪检查。动物麻醉后, 选择右侧坐骨神经和对侧大脑皮层运动区分别进行电刺激, 记录 SEP 和 MEP 波形曲线, 计算波峰和潜峰时。刺激频率 4HZ, 波宽 0.2ms, 强度 40~60mv, 信号经前置放大器放大 10 万倍, 计算机叠加 300 次。

1.5 图象分析 术后 1, 3, 7, 14 天实验动物经麻醉后, 用生理盐水、4% 多聚甲醛做心脏灌注固定。取脊髓全长, 对 SCI

区以及上、下端 1cm 的脊髓组织切片进行 c Jun 免疫反应检测。c Jun 单克隆抗体 SANTA CRUZ 公司产品, 参照 SP 试剂盒说明书进行操作, 镜下观察阳性细胞的计数。随机计数 9 张切片(损伤段, 损伤上段, 损伤下段各 3 张), 切片经计算机图像分析系统处理, 分别测出平均每张切片每平方毫米阳性细胞数, 并经 t 检验。

2 结果

2.1 免疫细胞化学 A 组与 B 组在损伤后 1 天结果相似, 脊髓损伤区附近均可见各节段切片灰质和白质中有大量不规则地分布的 c Jun 阳性细胞呈棕黄色。损伤后 3 天各节段中即可见 c Jun 阳性细胞增多, A 组明显多于 B 组。A 组各时间点阳性细胞分布呈一定时相和空间分布特点: c Jun 面积细胞密度(cells/mm²) 高峰在损伤后 7 天持续到 28 天, 损伤后 28 天在灰质和白质的星形胶质细胞形态 B 组已接近正常, 而 A 组表达仍然较高。各节段阳性细胞分布情况见图 1, 2, 表 1。

表 1 大鼠脊髓损伤手术后 c Jun 阳性细胞数($\bar{x} \pm s, \text{mm}^2$)

组别	大鼠数	损伤后时间(天)				
		1	3	7	14	28
A 组	6	156.50 ± 13.80	297.65 ± 16.65	392.67 ± 21.53*	397.43 ± 29.60**	318.09 ± 15.69**
B 组	6	109.86 ± 10.65	156.86 ± 12.80	216.65 ± 13.87	84.85 ± 16.47	71.46 ± 12.85

注: A 组与 B 组比较 t 检验* P < 0.05 ** P < 0.01

2.2 大鼠行为学检查 手术后 1 天 A 组和 B 组大鼠都表现为双后肢瘫痪, 行为学观察无明显差别。14 天时 A 组大鼠功

能明显好于 B 组, 28 天时 A 组大鼠已能行走, B 组大鼠则行走困难。Tarlov 评分和斜板试验结果见表 2, 3。

表 2 大鼠脊髓损伤手术后大鼠功能 Tarlov 评分($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数	移植后时间(天)				
		1	3	7	14	28
A 组	6	2.32 ± 0.21**	3.67 ± 0.43**	4.19 ± 0.57*	4.36 ± 0.75*	4.53 ± 2.58**
B 组	6	1.06 ± 2.15	2.28 ± 0.43	2.53 ± 0.57	2.67 ± 0.74	2.86 ± 0.78

注: A 组与 B 组比较 t 检验* P < 0.05 ** P < 0.01

表 3 大鼠脊髓损伤手术后大鼠斜板试验结果($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数	移植后时间(天)				
		1	3	7	14	28
A 组	6	44.82 ± 5.72	57.65 ± 5.86	62.67 ± 6.18*	68.42 ± 7.31*	74.82 ± 7.04*
B 组	6	38.75 ± 4.79	42.64 ± 5.51	45.13 ± 4.76	48.51 ± 5.69	50.21 ± 5.06

注: A 组与 B 组比较 t 检验* P < 0.05 ** P < 0.01

2.3 电生理检查结果 A 组运动诱发电位(MEP)潜峰时损伤早期与 B 组无明显差异, 手术后 14 天 A 组潜峰时明显缩

短, 两组比较有显著差异。感觉诱发电位(SEP)潜峰时, 两组比较无显著差异见表 4。

表 4 胚胎脊髓移植后各组 MEP 和 SEP 潜峰时($\bar{x} \pm s, \text{ms}$)

组别	大鼠数	MEP			SEP		
		7 天	14 天	28 天	7 天	14 天	28 天
A 组	6	2.64 ± 0.45**	2.31 ± 0.34*	1.96 ± 0.26**	3.12 ± 0.62	2.89 ± 0.47*	2.45 ± 0.34
B 组	6	5.45 ± 0.82	4.26 ± 0.62	4.50 ± 0.65	4.90 ± 1.54	4.43 ± 1.65	3.81 ± 1.62

注: A 组与 B 组比较 t 检验* P < 0.05 ** P < 0.01

3 讨论

最近的研究表明 c Jun 家族包括 JunB 和 JunD 等, 是由二聚体组成, 这些二聚体作为转录子在靶基因结合于激动蛋白 1(activator protein 1 AP1) 部位。c Jun 转录子在转录时对神

经结构和突触重建有重要作用的 mRNAs 蛋白密码起关键作用。这些蛋白包括 Tα1 微管蛋白和生长相关蛋白 43(growth associated protein 43 GAP-43), 还有细胞骨架的重要成分神经丝蛋白和 α 微管蛋白。因此, IEGs 基因的表达如 c Jun 与神

经再生反应有关,而不是简单的损伤反应。本实验发现胚胎脊髓移植可以上调 ϵ Jun 免疫反应表达。我们的实验结果表明:胚胎脊髓移植后 7 天,大鼠损伤的脊髓 ϵ Jun 免疫反应明显升高,持续在高水平达 28 天。而单纯损伤组 ϵ Jun 免疫反应伤后 14 天即明显下降,损伤后 28 天已基本恢复到损伤前的水平, Tarlov 评分和斜板试验也出现了相同的变化趋势。 ϵ Jun 的表达和损伤脊髓神经元功能恢复和再生有明显的联系, ϵ Jun 的表达不仅与神经细胞的自杀程序的激活有关,而且可以直接激发和维持损伤神经元的再生反应^[5]。我们的研究也表明,脊髓损伤后应用胚胎脊髓移植能使损伤区周围脊髓 ϵ Jun 免疫反应高表达,并能促进大鼠功能的恢复。

(本文图 1,2 见封 3)

参考文献

[1] Raghupathi R, Grants I, Rosenberg LJ, et al. Increased Jun im-

munoreactivity in an In Vitro model of mammalian spinal neuron physical injury. J Neurotrauma, 1998, 15(7): 555-561.

[2] Defelipe C, Jenkins R, Ó Shea R, et al. The role of immediate early genes in the regeneration of the central nervous system. Adv Neurol, 1993, 59: 263-271.

[3] Fehlings, MG and Tator CH. The relationships among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. Exp Neurol, 1995, 132: 220-228.

[4] Cheng H, Cao Y and Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats. Partial restoration of hind limb function. Science, 1996, 273: 510-513.

[5] Herdegen T, Skene JHP, Bahr M. The ϵ Jun transcription factor. Bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. Trends Neurosci, 1997, 20: 227-231.

(收稿: 2000 06 14 修回: 2000 07 14 编辑: 李为农)

《骨与关节外科杂志·美国卷》2001 年第 83 卷第 1 期目录

Table of Contents for The Journal of Bone and Joint Surgery

Volume 83 A, Number 1, 2001

-Excellence Through Peer Review James D. Heckman, MD. pp. 1-2.

A Prospective Evaluation of the Clinical Utility of the Lower Extremity Injury Severity Scores Michael J. Bosse, M.d; Ellen J. Mackenzie, Phd; James F. Kellam, M.d; pp. 3-14.

Meta Analyses in Orthopaedic Surgery. A Systematic Review of Their Methodologies Mohit Bhandari, M.d; Farrah Morrow, Bsc; Abhaya V. Kulkarni, M.d; pp. 15-24.

Complications of Elbow Arthroscopy Edward W. Kelly, M.d; Bernard F. Morrey, M.d; Shawn W. O' Driscoll, Phd, M.d; pp. 25-34.

The Effect of Upper Limb Motion on Lower Limb Muscle Synchrony. Implications for Anterior Cruciate Ligament Injury E. J. Cowling, Bsc(Hons); J. R. Steele, Phd; pp. 35-41.

Measurement Accuracy in Congenital Scoliosis Fernando A. M. Facanha Filho, M.d; Robert B. Winter, M.d; John E. Loirstein, M.d; pp. 42-5.

Damage to Cobalt Chromium Surfaces During Arthroscopy of Total Knee Replacements Gregory E. Raab, Bs; Christopher M. Jobe, M.d; Paul A. Williams, Ms; pp. 46-52.

Spontaneous Repair of Full Thickness Defects of Articular Cartilage in a Goat Model. A Preliminary Study Douglas W. Jackson, M.d; Peggy A. Laor, Phd; Harold M. Aberman, Dvm;

pp. 53-64.

Initial Review of Electronic Residency Application Service Charts by Orthopaedic Residency Faculty Members. Does Applicant Gender Matter? Susan A. Scherl, M.d; Nicole Lively; Michael A. Simon, M.d; pp. 65-70.

Surgical Repair of Chronic Rotator Cuff Tears. A Prospective Long Term Study Robert H. Cofield, M.d; Javad Parvizi, M.d, Frcs; Pierre J. Hoffmeyer, M.d; pp. 71-7.

Resection, Rotationplasty, and Femoropelvic Arthrodesis in Severe Congenital Femoral Deficiency. A Report of the Surgical Technique and Three Cases Kenneth L. B. Brown, M.d, Msc, Frcs; pp. 78-85.

Primary Repair of Intraoperative Disruption of the Medial Collateral Ligament During Total Knee Arthroplasty Seth S. Leopold, Major, Medical Corps, United States Army; Chris McStay, Bs; Karen Klafeta, Bs; Joshua J. Jacobs, M.d; Richard A. Berger, M.d; Aaron G. Rosenberg, M.d; pp. 86-91.

Effects of Radial Head Excision and Distal Radial Shortening on Load Sharing in Cadaver Forearms Micheal F. Shepard, M.d; Keith L. Markolf, Phd; Arati Mallik Dunbar, M.d; pp. 92-100.

Intra Articular Lipoma of the Knee Joint. A Case Report Keiji Matsumoto, M.d; Hidetoshi Okabe, M.d; Michihito Ishizawa, M.d; pp. 101-5.

基质金属蛋白酶-3 和其组织抑制剂-1 在椎间盘中的表达及意义

(正文见 204 页)

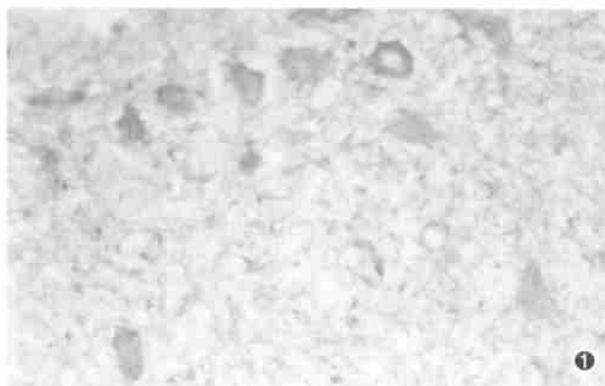


图 1 软骨细胞 MMP3 染色阳性; 细胞核为蓝色; 细胞浆为棕黄色。ABC $\times 400$

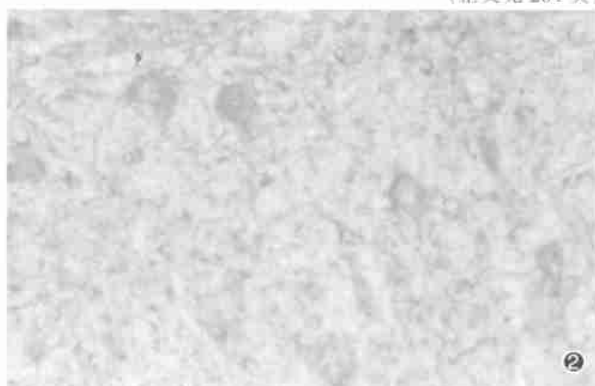


图 2 软骨细胞 TIMP-1 染色阳性; 细胞浆为棕黄色; 细胞核为蓝色。ABC $\times 400$

胚胎脊髓移植后大鼠损伤脊髓 c-Jun 免疫反应的变化及其意义

(正文见 206 页)



图 1 A 组大鼠脊髓损伤后 7 天 c-Jun 免疫反应的表达, $\times 200$



图 2 B 组大鼠脊髓损伤后 7 天 c-Jun 免疫反应的表达, $\times 200$

去睾大鼠骨丢失的组织学机理研究

(正文见 209 页)



图 1 病理组: 广泛的骨吸收表面, 提示: 骨吸收增强, 骨重建单位激活率增高, 骨转换加快 (甲苯胺蓝染色 光镜 $\times 400$)

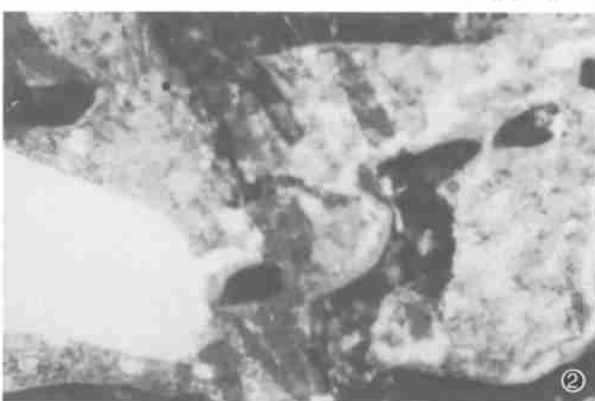


图 2 病理组: 骨小梁稀疏、较薄, 且有较多的中断现象, 说明骨量丢失, 骨转换加快导致骨结构破坏 (甲苯胺蓝染色 光镜 $\times 100$)