

不同剂量 U0126 抑制低频磁刺激引起星形胶质细胞迁移的实验研究*

李哲¹ 方征宇² 黄晓琳^{2,3}

摘要

目的:研究不同剂量 U0126 对低频磁刺激促进星形胶质细胞迁移作用的影响,以选择合适的阻滞剂量。

方法:24 只 SD 大鼠按 U0126 剂量被随机分为对照组(0mg/kg U0126, n=6)、低剂量组(0.1mg/kg U0126, n=6)、中剂量组(0.2mg/kg U0126, n=6)、高剂量组(0.4mg/kg U0126, n=6),四组的刺激参数都为频率 1Hz,强度 1.52T,刺激量为 30 脉冲;均采用溴已锭注射入脊髓左侧背索复制局灶性的脊髓损伤模型。刺激后第 14 天,大鼠被处死,采用图像分析系统观察 GFAP、MAP-2 和 ERK1/2 的表达及脊髓损伤空洞体积的变化。

结果:随着 U0126 剂量的增加,在第 14 天时空洞的体积逐渐增大,GFAP、ERK1/2 的阳性表达逐渐减弱,与对照组相比具有显著性差异($P<0.05$),U0126 中剂量组和高剂量组作用则无明显差异($P>0.05$);病灶区域 MAP-2 均呈阴性表达。

结论:不同剂量的 U0126 可翻转磁刺激引起的星形胶质细胞的迁移,0.2mg/kg 是较合适的剂量。

关键词 低频;磁刺激;星形胶质细胞;迁移

中图分类号:R454.1, R49 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-03-0195-05

The effects of U0126 of different doses on the ability of low frequency magnetic stimulation promoting astrocyte migration/LI Zhe, FANG Zhengyu, HUANG Xiaolin//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(3): 195—199

Abstract

Objective:To investigate the effects of U0126 of different doses on the ability of low frequency magnetic stimulation promoting astrocyte migration and to select suitable dose of U0126.

Method:Twenty-four adult healthy SD rats were selected to receive injection of 0.5ml of 1% ethidium bromide (EB) in PBS into the dorsal spinal cord funiculus on the left side at T10-11 level to make located spinal cord injury models and randomly divided into four groups. The four groups were exposed to magnetic stimulation(1Hz, 1.52T, 30pulses) at the following dose respectively: 0mg/kg U0126(control group), 0.1mg/kg U0126(low-dose group), 0.2mg/kg U0126 (middle-dose group), 0.4mg/kg U0126 (high-dose group). On the day 14 after stimulation, the rats were sacrificed and the expressions of glial fibrillary acidic protein(GFAP), microtubule associated protein-2 (MAP-2), extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) and the volume of holes were detected with immunohistochemistry. Quantitative analysis of the expressions of GFAP, MAP-2 and ERK1/2 were performed with the image analysis system.

Result:With the increase of U0126 dose, the volume of hole increased on day 14 ($P<0.05$). In the lesion area, the expressions of GFAP and ERK1/2 could be found, while MAP-2 could not. Significant differences were revealed in the expressions of GFAP, ERK1/2 among the four groups, it was significantly lower in U0126 groups than that in control group($P<0.05$). while the middle-dose group had similar effect with the high-dose group($P>0.05$).

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30801220)

1 华中科技大学附属同济医院,武汉,430030; 2 华中科技大学附属同济医院康复医学科; 3 通讯作者

作者简介:李哲,男,博士,副主任医师; 收稿日期:2009-12-21

Conclusion: U0126 of different doses all could resupinate astrocyte migrations which were caused by low frequency magnetic stimulation, and 0.2mg/kg was the suitable dose.

Author's address Department of Rehabilitation, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030

Key words low frequency; magnetic stimulation; astrocyte; migration

星形胶质细胞在中枢神经系统损伤和疾病中扮演着非常重要的角色,例如胶质瘢痕的形成,以及胶质界膜和血脑屏障断裂的修复。反应性白质星形胶质细胞对轴突的生长、损伤后胶质瘢痕的形成、脱髓鞘后少突胶质细胞介导的髓鞘再生都起着关键的作用^[1-2]。脊髓损伤后,反应性胶质化形成的胶质瘢痕构成了神经再生的机械屏障,阻碍了轴突的再生和损伤处的神经移植^[3-4]。而胶质瘢痕形成的重要原因即在于星形胶质细胞的迁移。如果能够调节星形胶质细胞的迁移,进而干预胶质瘢痕的形成,将有可能改善神经再生的环境,促进神经元的再生。

磁刺激可产生传导性的感生电流,从而对刺激位点抑制或易化^[5-6],可能会影响胶质瘢痕的形成,但作用很不明确^[7]。这可能因为很多因素如刺激强度、频率、间隔时间、刺激的总量等都有可能影响磁刺激的作用。我们前期分别研究了 0T, 0.76T, 1.52T, 1.9T 磁刺激对星形胶质细胞迁移的影响,发现随着刺激强度增加,星形胶质细胞迁移的能力也逐渐增强。并且,病灶区域随着胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的表达增强,细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK1/2)的表达亦同步增强。说明星形胶质细胞的迁移与 ERK1/2 通路的调节有关;而大鼠对 1.52T 的磁刺激强度具有更好的耐受性。为了进一步明确不同强度磁刺激促进星形胶质细胞迁移的作用与 ERK1/2 通路调节的关系,我们拟采用不同剂量的 ERK 的阻滞剂 U0126 预处理 1.52T, 1Hz 磁刺激组大鼠,一方面观察阻滞星形胶质细胞的迁移能力的变化,另一方面探索 U0126 最佳的阻滞剂量,以进一步明确磁刺激促进星形胶质细胞迁移的作用和 ERK 通路的关系。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立与分组

24 只 SD 大鼠,雄性,体重为 220—300g,由华中

科技大学同济医学院动物实验中心提供。实验以 1.52 T 磁场强度和 1Hz 的频率进行刺激,24 只大鼠随机分为对照组 (0mg/kg U0126, n=6)、低剂量组 (0.1mg/kg U0126, n=6)、中剂量组 (0.2mg/kg U0126, n=6) 和高剂量组 (0.4mg/kg U0126, n=6)。四组均造模:在脊柱背侧 T10—11 水平进行部分椎板切除,用一个外直径 20 μ m 的玻璃微量吸管把 1% 溴己锭磷酸盐溶液 0.5 μ l 注射进左侧背索^[8]。

1.2 治疗干预

磁刺激器为丹麦 Dantec 公司生产,圆形刺激线圈直径为 9cm,脉冲磁场峰值强度为 1.9T。于脊髓损伤后 24h 开始给予磁刺激,将线圈水平置于大鼠脊柱背侧线圈边缘对准 T10 节段、距背部皮肤 1cm 的位置,每天 1 次,每次 30 个脉冲,连续 14d。各组于磁刺激前分别用不同剂量的 U0126 腹腔注射。

1.3 取材及切片

各组分别于术后第 14 天取材。用 100g/L (10%) 水合氯醛腹腔注射 (350mg/kg) 麻醉后,打开胸腔自左心室插入静脉套管至升主动脉,快速灌注冰生理盐水行心脏灌注,切开右心房,待流出的液体清亮后,换用 4% 多聚甲醛缓冲液约 100ml 心脏灌注固定 30min,而后自背部打开椎管,暴露脊髓,取损伤段脊髓约 3mm 长做脊髓标本,标本取出后用 4% 多聚甲醛缓冲液固定过夜。然后进行脱水,石蜡包埋,行横切面 5 μ m 厚度连续切片备用。

1.4 检测指标

免疫组织化学检测:采用链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (streptavidin-biotin-complex, SABC) 法进行免疫组化染色,按 SABC 免疫组化试剂盒说明书中的步骤进行,兔抗 GFAP 抗体稀释度为 1:200,小鼠抗 MAP-2、兔抗大鼠磷酸化 ERK1/2 抗体稀释度为 1:100,二抗采用即用型 SABC 试剂盒内的二抗原液,经 13'3-二胺基联苯胺 (DAB) 显色 (武汉博士德生物工程有限公司),苏木精复染,脱水,中性树脂封固。细胞中含有棕黄色颗粒者为阳性细胞。

病灶体积计算:根据体视学原理,将一个不规则物体平行切割,当分割间距达到足够小,每一单元可近似为柱体,单元体积为截面积乘以分割间距,则该不规则物体的体积为各单元体积之和,即所有截面积之和乘以截面间距。根据此原理计算出每一个病灶的体积量^[9]。

1.5 结果判定与统计学分析

采用计算机图像分析系统测量各组脊髓损伤处GFAP、微管相关蛋白(microtubule associated protein-2, MAP-2)、ERK1/2的表达。方法:物镜放大40倍视野下,随机选择视野中阳性反应细胞并测定其密度值,每次取5个视野,以其平均值作为测定值,应用SPSS12.0统计软件进行单因素方差分析,用LSD法进行各组间的两两比较,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 病灶体积比较

每份样本均获得含病灶组织的等距连续切片40—50张,低倍(100倍)下可见对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,各组病灶的体积分别为 $9863160.3 \pm 2935.3 \mu\text{m}^3$ 、 $31436742.0 \pm 1978.7 \mu\text{m}^3$ 、 $55274400.0 \pm 1986.2 \mu\text{m}^3$ 和 $60434597.0 \pm 2131.0 \mu\text{m}^3$,逐渐增大(图1),低剂量组、中剂量组、高剂量组各组与对照组比较,差异有显著性意义($P < 0.05$),但C组和D组无明显差异 $P > 0.05$ 。

2.2 ERK1/2、GFAP、MAP-2 比较

400倍镜下见(病灶区域):随着U0126剂量的增加,GFAP和ERK1/2的细胞数目和阳性信号密度值均逐渐减少,各组与对照组比较差异有显著性, $P < 0.05$;但C组和D组无明显差异($P > 0.05$)。说明0.2mg/kg和0.4mg/kg的U0126可完全阻滞ERK通路,在ERK通路被完全阻滞后,GFAP表达并没有完全消失。MAP-2各组均未有阳性表达,各组间无明显差异($P > 0.05$)(图2—4,表1)。

表1 各组GFAP、ERK1/2和MAP-2的阳性信号密度值比较 ($\bar{x} \pm s$, 个/400倍视野, Au/单位面积)

组别	胶质纤维酸性蛋白		微管相关蛋白2		细胞外信号调节激酶1/2	
	细胞数	阳性信号密度	细胞数	阳性信号密度	细胞数	阳性信号密度
对照组	49.9±8.1	46.1±4.9	0	0	20.3±3.1	17.3±1.7
低剂量组	23.2±6.7 ^①	27.3±4.2 ^①	0	0	11.5±4.9 ^①	8.1±1.3 ^①
中剂量组	14.6±7.3 ^{①②}	16.3±3.6 ^{①②}	0	0	0 ^{①②}	0 ^{①②}
高剂量组	12.3±6.2 ^{①③}	15.5±3.3 ^{①③}	0	0	0 ^{①③}	0 ^{①③}

注:与对照组比较:① $P < 0.05$;与前一组比较:② $P < 0.05$;③ $P > 0.05$

图1 各组相同层面的横截面积 (HE, ×100)



3 讨论

ERK是丝裂原激活蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号传导通路家族重要成员之一,主要介导增殖反应,包括细胞的分裂、生长、分化等^[10]。U0126是ERK通路特异性的阻滞剂。本实验即采用不同剂量的U0126阻滞ERK通路,来探讨在磁刺激对星形胶质细胞迁移作用的研究中其合适的阻滞剂量。

本研究选择了溴己锭复制局灶性的脊髓损伤模型,造模后导致损伤区域少突胶质细胞、髓磷脂和星形胶质细胞的快速缺失^[11-13],因为溴己锭为剧毒物质,其导致损伤局部细胞的彻底缺失,因此,在磁刺激后,病灶内新增加的细胞即为新迁移进入的细胞。我们根据前期的研究选择磁刺激强度和频率分别为1.52T、1Hz,在本实验中,之所以采用1.52T、1Hz这一参数组合,是因为在前期研究中我们在

图 2 组化 GFAP

(×400)

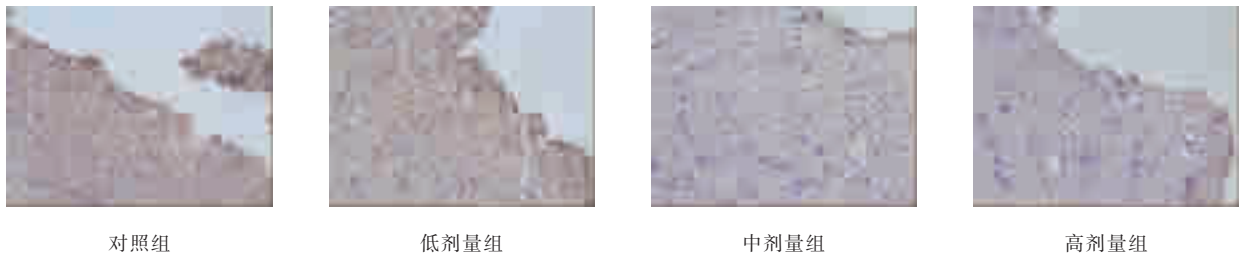


图 3 组化 ERK1/2

(×400)

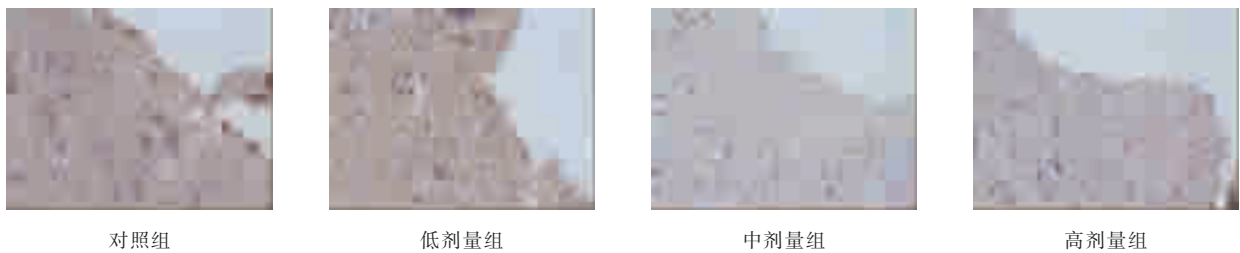
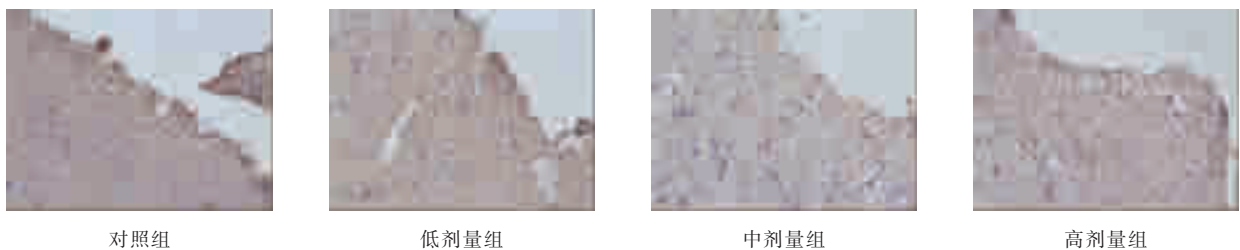


图 4 组化 MAP-2

(×400)



1Hz 的频率下观察了不同强度的磁刺激对星形胶质细胞迁移的影响,发现 1.52T 既可以明显促进星形胶质细胞的迁移,实验大鼠又有较好的耐受性。各种中枢神经系统损伤都可引起星形胶质细胞反应,即反应性胶质化^[14]。

在成体中枢神经系统中,胶质瘢痕的形成是由于星形胶质细胞迁移进入损伤区域而不是增殖^[15-16]。而 GFAP 是一种分子质量为 55ku 的微丝蛋白,星形细胞的标志蛋白,主要用于标记损伤后胶质反应。溴已锭造成脊髓的化学性损伤,病灶区域 GFAP 呈阳性表达,说明磁刺激促进星形胶质细胞迁移进入溴已锭造成的脊髓空洞中。

在病灶区域,我们没有看到 MAP-2 的阳性表达,而微管相关蛋白是微管的结构蛋白之一。研究表明,MAP-2 可参与神经元发育、结构稳定、突起形成和突触可塑性调节,对神经元轴突和树突的发生、延长和稳定具有重要作用^[17-18]。MAP-2 主要在中枢神

经系统的神经元高表达,可以作为神经元迁移或再生的标志蛋白,病灶区域 GFAP 阳性表达而 MAP-2 呈阴性表达,进一步证实迁移进入脊髓空洞的是星形胶质细胞而不是神经元。而 GFAP 和 ERK 相同的变化趋势表明了磁刺激影响星形胶质细胞迁移的内在作用机制与 ERK 通路有关。

采用 U0126 阻滞剂后,溴已锭造成的病灶体积反而增大,随着阻滞剂量的加大,病灶体积相应增大,GFAP 阳性细胞的数量相应减少,说明 U0126 可以阻滞磁刺激造成的星形胶质细胞的迁移,且呈剂量依赖性,更进一步证实磁刺激促进星形胶质细胞迁移的作用机制和 ERK 通路密切。0.2mg/kg 和 0.4mg/kg U0126 都可完全阻滞 ERK 的阳性表达,阻滞效果类似。但 MEK-ERK 通路被完全阻断后,磁刺激促进星形胶质细胞迁移作用并没有完全消失,推测可能有其他机制参与对星形胶质细胞迁移的作用。

总之,U0126 可以阻滞磁刺激引起的大鼠在体

星形胶质细胞的迁移,呈剂量依赖性。0.2mg/kg U0126 在此研究中是较合适的剂量。提示我们在下一步的试验中,可用 0.2mg/kg U0126 阻滞 ERK 通路来探讨磁刺激对星形胶质细胞迁移的作用及和 ERK 通路的关系,从而干预胶质瘢痕的形成,调节神经再生的微环境。

参考文献

[1] Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar[J]. Nat Rev Neurosci, 2004, 5:146—156.
 [2] Talbot JF, Loy DN, Liu Y, et al. Endogenous Nkx2.2 (+)/Olig2 (+) oligodendrocyte precursor cells fail to remyelinate the demyelinated adult rat spinal cord in the absence of astrocytes[J]. Exp Neurol, 2005, 192:11—24.
 [3] Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis [J]. Glia, 2005, 50: 427—434.
 [4] Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar[J]. Neurosci. 2004, 5:146—156.
 [5] 韩肖华, 黄晓琳, 王熠钊, 等. 电针结合经颅磁刺激对脑缺血大鼠学习记忆功能的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2009, 24(6):294—297.
 [6] 黄国付, 黄晓琳, 郭铁成, 等. 电针结合经颅磁刺激对局灶性脑缺血大鼠 p-CREB 表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2009, 24(4): 289—293.
 [7] 孙永安, 赵合庆, 张志琳, 等. 长程经颅磁刺激对脑梗死大鼠皮质脑源性神经营养因子表达及神经功能恢复的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27: 712—716.
 [8] Fang Z, Duthoit N, Wicher G, et al. Intracellular calcium-binding protein S100A4 influences injury-induced migration of

white matter astrocytes[J]. Acta Neuropathol, 2006, 111:214.
 [9] 李幼忱, 李志成, 刘杰, 等. 大鼠皮肤创伤愈合瘢痕的三维重建和体积定量[J]. 中国体视学与图像分析, 2007, 12:2.
 [10] Talmor D, Applebaum A, Rudich A, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases in human heart during cardiopulmonary bypass[J]. Circ Res, 2000, 86: 1004—1007.
 [11] Blakemore WF. Ethidium bromide induced demyelination in the spinal cord of the cat [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 1982, 8:365—375.
 [12] Faber-Elman A, Solomon A, Abraham JA, et al. Involvement of wound-associated factors in rat brain astrocyte migratory response to axonal injury: in vitro simulation [J]. J Clin Invest, 1996:162—171.
 [13] Fushimi S, Shirabe T. The reaction of glial progenitor cells in remyelination following ethidium bromide-induced demyelination in the mouse spinal cord [J]. Neuropathology, 2002:233—242.
 [14] Malhotra S, Shnitka T, Elabrink J. Reactive astrocytes: A review [J]. Cytobios, 1990, 61:133—160.
 [15] Lim JH, Gibbons HM, O'Carroll SJ, et al. Extracellular signal-regulated kinase involvement in human astrocyte migration[J]. Brain Research, 2007, 1164:1—13.
 [16] Auguste KI, Jin S, Uchida K, et al. Greatly impaired migration of implanted aquaporin-4-deficient astroglial cells in mouse brain toward a site of injury [J]. FASEB J, 2007, 21: 108—116.
 [17] Ma D, Chow S, Obrocka M, et al. Induction of microtubule associated protein 1B expression in Schwann cells during nerve regeneration[J]. Brain Res, 1999, 823:141—153.
 [18] Blomgren K, McRae A, Elmered A, et al. The calpain proteolytic system in neonatal hypoxic-ischemia[J]. Ann N Y Acad Sci, 1997, 825:104—119.

2010年康复医学新技术与新进展国际研讨班招生通知

由首都医科大学宣武医院、中国医师协会康复医师分会、北京康复医学会举办的“2010年康复医学新技术与新进展国际研讨班”于2010年5月在北京举行,届时将邀请美国约翰·霍普金斯大学康复系 Zorowitz 教授、德国科隆体育大学康复医院 PT 长 Eibo Schwitters 教授等国内外知名康复专家介绍最新的康复治疗技术和新进展,具有很高的临床应用价值。

授课主要内容: 1、卒中康复治疗的新进展; 2、脑损伤植物状态促醒研究的新进展; 3、经颅磁刺激(TMS)在康复医学中的应用; 4、功能性电刺激(FES)在康复医学中的应用; 5、心肺康复研究的新进展; 6、骨科康复治疗的临床原则实例: 下腰背疼痛的康复、前交叉韧带重建术后的康复、肩痛的康复; 7、平衡功能障碍的康复治疗方法; 8、康复治疗技术的新动态; 9、失语症心理语言评价; 10、临床各种康复治疗新技术实习。

培训对象: 康复科医师、治疗师、神经科医师、骨科医师以及相关临床、科研及治疗人员; **报到时间:** 2010年5月20日; **报到地点:** 大府宾馆(北京市宣武区长椿街45号); **培训地点:** 首都医科大学宣武医院(大府宾馆斜对面); **培训时间:** 2010年5月21—23日; **收费标准:** 培训费1000元(包括学费和资料费),住宿费、膳食费、差旅费及往返车船机票自理。培训结束后,将授予国家级继续教育 I 类学分及培训合格证书。

届时符合条件人员可以现场办理中国医师协会康复医师分会会员证(会员费100元)。

请于2010年4月20日前报名。地址:北京市宣武区长椿街45号宣武医院康复医学科; 邮编:100053; 电话:010-83198326, 手机:13641026802; 传真:010-83156838; 联系人:张艳明; 电子信箱:kfysfh@yahoo.cn。