

大鼠脊髓损伤后星形胶质细胞特异性表达 Gc 的研究

胡大勇 何立华 胡兵 周逸峰

(中国科技大学生命科学院 视觉研究室, 合肥 230026)

摘要 用免疫组织化学方法观察了脊髓的星形胶质细胞在损伤后出现的抗原性改变并对其改变的意义进行了探讨。实验选用 Wistar 大鼠 20 只。实验组 10 只, 对脊髓 T₁₀ 节段进行完全横断; 对照组 10 只, 只进行 T₁₀ 椎板切除术, 不损伤脊髓。在术后第 1、3、5、7、14 d 分别对 20 只大鼠灌注固定, 并取出 3 cm 长手术段脊髓。用 anti-Galactocerebroside (anti-Gc) 和 anti-glia fibrillary acidic protein (anti-GFAP) 抗体对脊髓进行标记。结果表明: 脊髓损伤后第 7 d, 增生肥大的星形胶质细胞可以同时被 anti-GFAP 和 anti-Gc 标记 (荧光双标)。此抗原表型改变至术后 14 d 依然显现。被双标的星形胶质细胞在形态上与成熟的正常胶质细胞基本相同, 而少突胶质细胞只为 anti-Gc 单独标记。对照组脊髓星形胶质细胞和少突胶质细胞只为 anti-GFAP、anti-Gc 分别标记。本实验结果提示: 大鼠脊髓受损后, 星形胶质细胞出现 GFAP 和 Gc 二种抗原表型。此结果首次表明成熟哺乳动物脊髓损伤后星形胶质细胞也可出现类似少突胶质细胞特异性抗原抗体改变。这可能是星形胶质细胞对脊髓创伤的一种特异性反应。这种变化可为探索脊髓损伤区域微环境的变化对脊髓损伤修复的影响提供新的线索。

关键词 anti-GFAP anti-Gc 星形胶质细胞 损伤 脊髓 大鼠

ASTROCYTE IN CNS OF RAT CAN EXPRESS Gc AFTER SPINAL CORD INJURY

Hu Dayong, He Lihua, Hu Bing, Zhou Yifeng

(College of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract By using immunohistochemistry method, we observed the change of the antigen in astrocytes after transection of rat spinal cord and evaluated the significance of such a change. Spinal cord samples from rats of 1, 3, 5, 7 or 14 days after the rat T₁₀ spinal cord was transected and samples from control animals (normal rats) were used for immunohistochemistry reaction with anti-Gc and anti-GFAP antibodies respectively/together. The astrocytes demonstrated both Gc-like immunoreactivity (Gc-LI) and GFAP-like immunoreactivity (GFAP-LI) 7 days after the injury, which lasted till 14 days after the injury. While oligodendrocytes demonstrated only Gc-LI. Samples from normal rats demonstrated GFAP-LI or Gc-LI for astrocytes or oligodendrocytes respectively. After spinal cord injury, the astrocytes demonstrated both GFAP-LI and Gc-LI. The present study suggests that the astrocytes within the spinal cord of adult mammalian animals can express some antigen that is specific for oligodendrocytes after spinal cord injury. This change may be possibly a specific reaction to spinal cord injury. Thus, our result can offer some clue for elucidating the role of local microenvironment in the restoration of spinal cord from injury.

Key words anti-GFAP, anti-Gc, astrocyte, injury, spinal cord, rat

Davies 等^[1]使用微玻管对脊髓白质造成微小的损害, 发现损伤周围的再生神经轴突不能通过此微小的损伤区域, 一些轴突在遇到损伤区域后作 U 形反转再回到未损伤区继续生长。他们观察到的这种现象说明脊髓损伤区域的局部微环境改变可能是导致轴突不能再生的重要原因之一。

神经胶质细胞是构成中枢神经系统微环境的主要成分。脊髓损伤后损伤区及其周围神经胶质细胞到底发生了什么样的变化? 是损伤以后星形胶质细胞分裂产生一些特殊类型的星形胶质细胞阻止了轴突的再生? 还是损伤刺激使原来星形胶质细胞发生变异变为另外类型的星形胶质? 因此, 研究脊髓损伤

区域星形胶质细胞发生的变化,以及这种变化在神经修复中有何作用?则成为重要的课题。

星形胶质细胞在正常发育期大鼠大脑皮层可以出现混合抗原表型($Gc^+/GFA P^+$),这是非成熟星形胶质细胞在发育过程中的特殊表现。在星形胶质细胞离体培养时也可出现这种现象。有人在实验中通过改变细胞培养条件,将无血清条件下培养分化成熟的少突胶质细胞 Gc^+ 转入有血清培养,可以出现 $Gc^+/GFA P^-$ 或 $Gc^-/GFA P^+$ 两种抗原表型;当将有血清培养的 II 型星形胶质细胞 ($GFA P^+$) 转入无血清培养时,也可以出现 $Gc^+/GFA P^-$ 或 $Gc^+/GFA P^+$ 两种表型^[2]。此现象说明当周围环境发生一定变化时,神经胶质细胞可随着条件的变化出现细胞生物学特征的变化,细胞可以从一种抗原表型转变为另一种表型。在动物体内,脊髓损伤也能使中枢神经系统的环境发生变化,脊髓中的胶质细胞是否也会因为这种条件的变化而出现细胞抗原性的改变?为证实此设想,本文作者等进行了以下试验。

材料和方法

1. 动物选择和手术方法

取成年 Wistar 大鼠 20 只,雌雄不拘,平均体重 150 g。随机选 10 只大鼠为实验组,7% 水合氯醛经腹腔注射麻醉 (6 ml/kg),无菌操作下从背部显露 T_{10} 椎骨棘突,切除相应椎板,完全切断 T_{10} 节段硬膜和脊髓,皮肤缝合后创可贴保护。另 10 只为对照组,只作 T_{10} 椎板切除,不损伤脊髓。术后于第 1、3、5、7、14 d 分别取实验组及对照组大鼠各 2 只,深度麻醉下用 4% 多聚甲醛经心脏灌流固定;切取以 T_{10} 为中心的长约 3 cm 的手术段脊髓,用 4% 多聚甲醛后固定,4℃ 冰箱内过夜,常规脱水、透明,石蜡包埋切片备用。

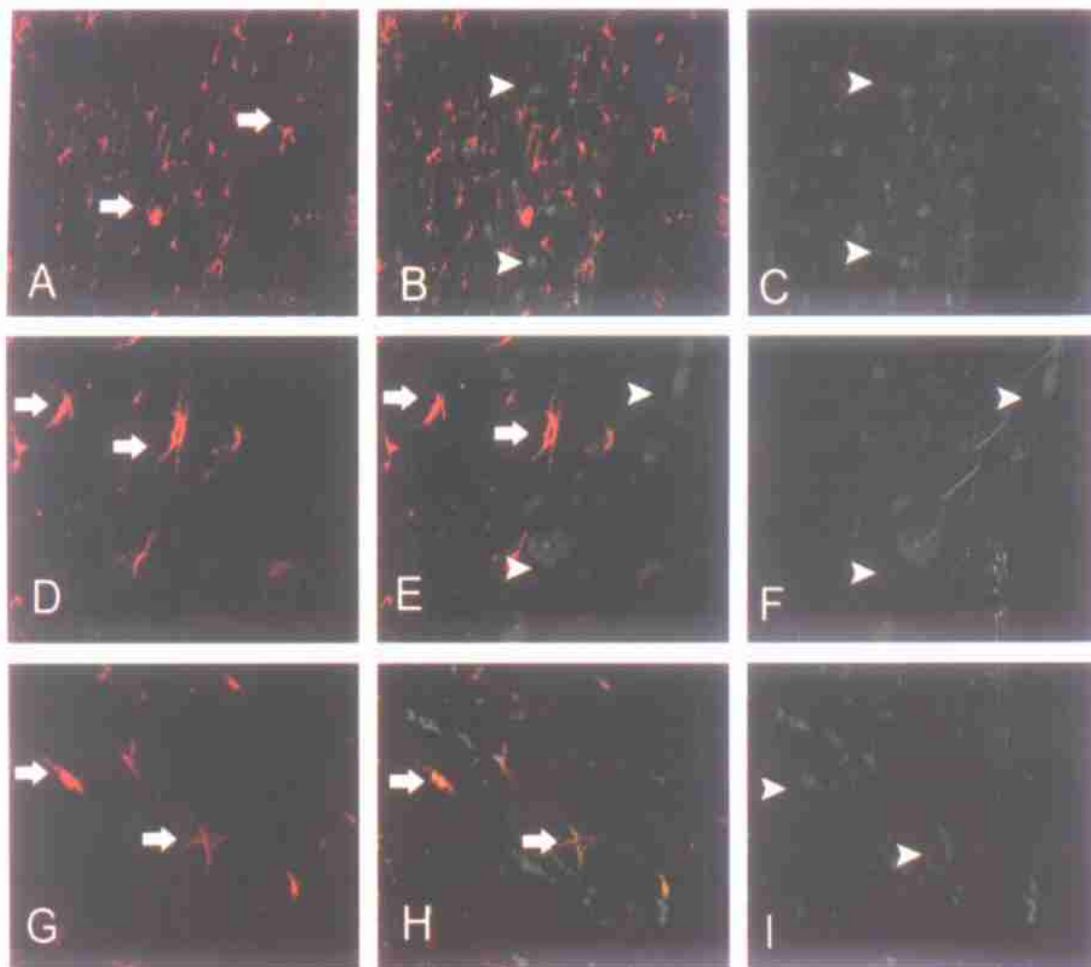
2. 免疫组织化学方法

免疫组化反应在室温下进行。实验操作过程简述如下。从每只大鼠脊髓切片标本中挑选出 5 张切片进行脱腊,100%~30% 梯度酒精还水,0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次每次 3 min;分别取相应血清封闭后,用 anti-GFA P-Cy3-Conjugate (1:4000, Sigma C9205) 自带荧光抗体对星形胶质细胞进行标记;用 anti-Gc (anti-Galactocerebro sides, 1:400, Sigma

G9152) 对少突胶质细胞进行标记;二抗 anti-rabbit IgG (1:250, Vector Laboratories, BA 1000),再加 Avidin-FITC (1:2000, Vector Laboratories) 反应 30 min。阴性对照用 0.01 mol/L 的 PBS 代替一抗,其余步骤相同。Olympus BX-60 显微镜观察,用 SPOT Jr 显微成像系统摄取图象;形态学分析用 MetaView 4.5.0;用 Photoshop 6.0 软件进行图象叠加合成。

结 果

实验组术后第 1 d,脊髓损伤区标本中星形胶质细胞和少突胶质细胞胞体较小,分别被 anti-GFA P 抗体和 anti-Gc 抗体标记,显色很弱。术后第 3 d,星形胶质细胞的胞体明显增大,显色增强。术后第 5 d 的改变基本相同。术后第 7 d,荧光着色更为明显,双标显示在典型的星形胶质细胞 (Fig. G, 箭头示 $GFA P^+$, Red) 的胞体中出现了很明显的 Gc^+ (Fig. I, 箭头所指, Green) 反应,胞体和细胞突起均被清晰显现。将同一视野呈红色的 $GFA P^+$ 图象和呈绿色的 Gc^+ 图象叠加后,视野中被双标的星形胶质细胞重叠,形态完全一致,细胞着色红绿相叠变为黄色 (Fig. H, 箭头所指, Yellow)。其中灰质中的星形胶质细胞出现被双标的现象更为显著,一直到术后第 14 d,这种表达持续存在,表达稳定。随着远离损伤区域, $GFA P^+$ 的星形胶质细胞被 Gc 标记显色越弱,最后这种 $GFA P^+$ 和 Gc^+ 在星形胶质细胞中共表达现象在远离损伤区的脊髓中消失。少突胶质细胞自术后第 1 d 起即呈现 Gc 阳性,且细胞形态典型。未发现 GFA P 阳性反应。对照组各个时间段的脊髓标本中星形胶质细胞 (Fig. D, 箭头所指, Red) 和少突胶质细胞 (Fig. F, 箭头所指, Green) 都只能分别被 anti-GFA P 抗体或 anti-Gc 抗体标记为阳性。经过图象合成处理的同一视野的细胞没有出现重合现象 (Fig. E, 箭头所指)。另外,本实验在正常大鼠胸段脊髓同样也做了 anti-GFA P 和 anti-Gc 标记,星形胶质细胞 (Fig. A, 箭头所指, $GFA P^+$ Red) 和少突胶质细胞 (Fig. C, 箭头所指, Gc^+ Green) 只能分别被 anti-GFA P 和 anti-Gc 标记,图象叠加后同样未出现标记细胞重合现象 (Fig. B, 箭头所指)。结果和对照组相同。



Figs A-C Normal spinal cord of rat. A, shows astrocytes have been labeled by anti-GFAP antibody (Red). C, shows oligodendrocytes have been labeled by anti-Gc antibody (Green). B, shows that A and C have merged into B, two sorts of cells don't superposition. Microscope: $\times 200$

Figs D-F Control group spinal cord. D, shows astrocytes have been labeled by anti-GFAP (Red). F, shows oligodendrocytes have been labeled by anti-Gc (Green). E, shows that D and F have merged into E, two sorts of cells don't superposition. $\times 400$

Figs G-I Spinal cord injury group of seven days after operation. G, shows some astrocytes have been labeled by anti-GFAP antibody (Red) and I, shows these cells have also been labeled by anti-Gc antibody (Green). H, shows that G and I have merged into H, two colors of cells are superposition, the red color and the green color have become yellow. $\times 400$

讨 论

哺乳动物中枢神经系统星形胶质细胞和它的前体细胞胞体中富含 8~9 nm 的中间丝 (intermediate filament), 能特异性地被 anti-GFAP 抗体标记。anti-GFAP 是一种可靠的星形胶质细胞标记抗体。现在已经广泛用来研究中枢神经系统在异常状况下星形胶质细胞的特征性反应^[3]。

Gc 是一种由少突胶质细胞特异性合成的, 构成神经纤维髓鞘的主要糖脂。在细胞培养条件下和哺乳动物中枢神经系统发育期间, 少突胶质细胞自其前体细胞分化成为成少突胶质细胞时即可特异性表

达 Gc, 可特异性地被 anti-Gc 抗体标记。anti-Gc 抗体和 anti-rip 抗体一样, 经常用来作为培养和定位少突胶质细胞的标记工具^[4]。

一般认为, 中枢神经系统星形胶质细胞和少突胶质细胞起源于同一种前体细胞^[5]。前体细胞分别通过不同的分子调节机制发育成形态、功能完全不同的两类大胶质细胞。星形胶质细胞在发育期主要是诱导神经细胞的迁移; 发育成熟以后的星形胶质细胞主要的功能是维持神经组织形态, 同时在提供神经营养因子、参与细胞间的通讯等方面也发挥重要作用^[6]。星形胶质细胞可被特异性的抗体 anti-GFAP 标记。少突胶质细胞的功能与星形胶质细胞

完全不同,它主要构成神经轴索的包膜-髓鞘,是维持神经轴突绝缘和形成神经冲动的跳跃传导的重要结构。少突胶质细胞可以特异性地被 anti-Gc 抗体标记。星形胶质细胞和少突胶质细胞是构成中枢神经系统微环境的主要细胞。现在研究认为,脊髓损伤以后脊髓微环境的改变是造成神经轴突不能成功再生的原因。这种中枢神经系统微环境的改变主要发生在星形胶质细胞和少突胶质细胞上。它包括两个方面的内容,一是由胶质细胞提供特殊的轴突再生促进因子或诱导因子,它们可以促进或诱导轴突再生;另一方面,胶质细胞,主要是星形胶质细胞同时也可产生阻碍轴突再生的抑制因子或形成局部疤痕,它们阻碍了轴突的再生^[7]。因此,了解脊髓损伤以后星形胶质细胞和少突胶质细胞对创伤的反应与此类细胞在正常发育期细胞分子生物学之间的差异是理解这种微环境改变的关键。

在本实验结果中,对照组各个时间段的大鼠脊髓星形胶质细胞和少突胶质细胞只分别被 anti-GFA P 抗体和 anti-Gc 抗体标记,未发现混合表型的星形胶质细胞。在实验组,胸段脊髓横断损伤以后,第 1~3 d 星形胶质细胞和少突胶质细胞也只能分别被各自的特异性抗体 anti-GFA P 和 anti-Gc 标记;但到第 7 d 以后,出现了许多外形肥大的典型 GFA P⁺ 的星形胶质细胞同时也表达 Gc 的特殊现象,直至术后第 14 d,这种现象一直存在。这表明损伤区域的星形胶质细胞的确发生了不寻常的变化,这种特殊类型的星形胶质细胞的出现伴随着脊髓损伤存在,而且这种改变不是一种快速反应,有可能会涉及到细胞分裂以及糖脂合成等复杂过程。同时被 anti-GFA P 和 anti-Gc 标记的星形胶质细胞都出现在脊髓灰质中,脊髓白质中未观察到这种现象。而且这种现象又随着远离脊髓损伤区的距离的增加而弱化,最后消失,说明这种现象与脊髓损伤程度和脊髓损伤所波及的范围可能有一定的相关性。与此变化的同时 Gc⁺ 少突胶质细胞并未被 anti-GFA P 标记,说明脊髓损伤刺激并未引起少突胶质细胞出现 GFA P 表达。

在哺乳动物发育过程中,未成熟的星形胶质细胞可以表达 GFA P 和 Gc 两种抗原。星形胶质细胞成熟以后即不再表达 Gc。星形胶质细胞体外培养改变培养条件也可以出现类似现象。但在成年动物体内,脊髓损伤后星形胶质细胞是否也出现此现象,则迄今未见报道。本实验结果首次提供证据表明,成年哺乳动物脊髓损伤后,脊髓中成熟的星形胶质细胞可以出现类似发育期未成熟星形胶质细胞所表现的抗原特性。并且这种抗原性的改变与损伤有直接的关系。但现在并不清楚发生这样现象的原因及其所代表的意义为何?本文作者等拟在后续的试验中继续关注这个有趣的现象并对其机理作进一步的深入探讨。

(2002- 07- 09)

参 考 文 献

- [1] Davies SJ, Field PM, Raisman G. Regeneration of cut adult axons fails even in the presence of continuous aligned glial pathways. *Exp Neurol*, 1996, 142: 203~ 216
- [2] 蔡文琴, 李海标, 主编 发育神经生物学 第1版 北京: 科学出版社, 1999: 145
- [3] Bignami A, Eng LF, Dahl D, *et al* Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res*, 1972, 43: 429~ 435
- [4] Raff MC, Mirsky R, Fields KL, *et al* Galactocerebroside is a specific cell-surface antigenic marker for oligodendrocytes in culture. *Nature*, 1978, 274: 813~ 816
- [5] Levison SW, Chuang C, Abramson BJ, *et al* The migrational patterns and developmental fates of glial precursors in the rat subventricular zone are temporally regulated. *Development*, 1993, 119: 611~ 622
- [6] Gimenez y Ribotta M, Menet V, Privat A. The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS. *Prog Brain Res*, 2001, 132: 587~ 610
- [7] Fawcett JW. Astrocytic and neuronal factors affecting axon regeneration in the damaged central nervous system. *Cell Tissue Res*, 1997, 290: 371~ 377