

· 论 著 ·

大鼠脊髓损伤后炎症细胞趋化因子MCP-1 的表达及其意义

马胜忠², 侯铁胜^{1*}, 张雪松¹, 赵 杰¹, 李 明¹

(1. 第二军医大学长海医院骨科, 上海 200433; 2. 济南军区总医院骨科, 济南 250031)

[摘要] 目的: 探讨炎症细胞趋化因子单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)在脊髓损伤早期的表达变化及其在脊髓继发性损伤炎症免疫反应中的作用机制。方法: 采用改良Nystrom 法制备大鼠胸段脊髓后路压迫损伤模型, 运用RT-PCR 技术检测脊髓损伤后 6 h 的MCP-1 mRNA 的表达水平, 免疫组化方法检测损伤后 3、6、12 h 和 1、3、5、7 d 各个时间段MCP-1 阳性细胞与损伤局部单核/巨噬细胞数目的变化。结果: 脊髓损伤后, MCP-1 mRNA 水平明显升高, MCP-1 阳性细胞高峰时间出现在脊髓损伤后 12 h 至 3 d, 同时, 单核/巨噬细胞高峰时间出现在损伤后 3~ 7 d。结论: MCP-1、单核/巨噬细胞均参与了脊髓损伤后早期的继发反应, 单核/巨噬细胞出现的高峰时间滞后于 MCP-1 阳性细胞。

[关键词] 脊髓损伤; 趋化因子; MCP-1; 单核/巨噬细胞

[中图分类号] R 651.2

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X (2004)07-0766-03

Expression of chemokine MCP-1 in rats with spinal cord injury

MA Sheng-Zhong², HOU Tie-Sheng^{1*}, ZHANG Xue-Song¹, ZHAO Jie¹, LIM ing¹ (1. Department of Orthopaedics, Chang-hai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Orthopaedics, General Hospital, PLA Jinan Military Area Command, Jinan 250031)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the expression level of MCP-1 mRNA after spinal cord injury (SCI) and its role in the secondary immunoreaction at the early stage after SCI. **Methods:** The animal model of Nystrom's posterior compression in spinal cord was adopted in this study. The expression level of MCP-1 mRNA was detected by RT-PCR on 6 h post-injury. The expression and distribution of MCP-1 positive cells and the infiltration of monocytes/macrophages were measured by immunohistochemistry on 3 h, 6 h, 12 h, 1 d, 3 d, 5 d, 7 d post-injury. **Results:** The level of MCP-1 expression significantly increased after SCI and the peak MCP-1 positive cells appeared at the early period after SCI (12 h-3 d post-injury), while the peaks of monocytes/macrophages occurred 3-7 d post-injury. **Conclusion:** Both MCP-1 and monocyte/macrophage take part in the secondary immunoreaction at the early stage after SCI. In the local injury site, the peak of monocytes/macrophages lags behind that of MCP-1 positive cells.

[KEY WORDS] spinal cord injury; chemokine; MCP-1; monocyte/macrophage

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(7): 766-768]

[1] 脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)常常导致损伤平面以下不同程度截瘫。近年来对脊髓损伤的研究主要集中在损伤后期脊髓组织再生方面,如神经干细胞移植或嗅鞘细胞移植等,但收效甚微。进而人们认识到受损神经元的存活是其再生的先决条件。在去除原发致伤因素的同时,应用多种手段,如:减轻炎症免疫反应、阻断神经毒性损伤、减少凋亡发生等,尽可能使继发性损伤的程度降低到最小^[1]。

目前,对单核/巨噬细胞等炎症细胞参与脊髓损伤的炎症免疫反应的研究较为深入,而对炎症细胞趋化因子在脊髓损伤中的作用研究甚少。

本研究旨在从免疫学角度探讨炎症细胞趋化因子单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)在脊髓损伤早期的表达变化及其在炎症免疫反应中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 脊髓压迫伤动物模型制备 雄性 SD 大鼠 32 只, 体质量 250~ 300 g(第二军医大学实验动物中心提供)。随机分为 8 组, 每组 4 只, 其中 1 组设为正常对照, 其余动物经 2% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉后俯卧位固定在立体定向仪上。取后正中切口, 切开皮肤、皮下组织, 分离两侧骶棘肌, 暴露出 T₇₋₁₀ 椎板并咬除, 充分暴露 T_{8/9} 脊髓, 注意保持硬脊膜完整。固定两端棘突, 采用改良 Nystrom 法^[2] 后路压迫大鼠胸段脊髓。压迫装置采用一根长 8 cm 的立柱, 其顶端为一直径 4 cm 圆板, 底部有一 2.2 mm ×

[作者简介] 马胜忠(1966-), 男(汉族), 博士, 副主任医师
E-mail: MSZfirst@yahoo.com.cn

*Corresponding author. E-mail: Tshou@sh163.net

5 mm 弧形(凹面向下)光滑金属垫片。立柱穿于长4 cm 的光滑塑料管中,使其能上、下滑动。圆板、立柱及垫片的总质量为100 g。将塑料管固定于立体定向仪的立臂上,在圆板上加25 g 砝码,调整立臂位置,使金属垫片刚好压迫于T_{8/9}脊髓背侧。压迫总重量为35.0 g,压迫时间为5 min,造成大鼠胸髓中度损伤。术后逐层缝合伤口,置于加热灯泡箱中保暖。动物麻醉清醒后温室隔离喂养,每1~2 d 挤压或穿刺排尿1次。各组分别于损伤后3、6、12 h 和1、3、5、7 d 取材。

1.2 标本制作、切片和染色 动物以2%戊巴比妥钠进行腹腔麻醉,4%多聚甲醛500 ml 经心灌注固定,完整取出伤区脊髓,置于4%多聚甲醛(室温)固定12 h。制作石蜡切片,片厚15 μm,行MCP-1、巨噬细胞免疫组化染色(ABC法)。胰酶消化,PBS 漂洗。加入适当稀释的一抗(MCP-1 单抗稀释为1:800,巨噬细胞单抗稀释为1:500),4℃,冰箱孵育过夜。加生物素化二抗和ABC复合物孵育。DAB 显色(巨噬细胞单抗购自Antigenix公司,MCP-1 单抗及ABC试剂盒购自Sigma公司)。

1.3 RT-PCR 脊髓损伤后6 h 通过RT-PCR 技术来检测MCP-1 mRNA 的表达水平。提取脊髓损伤区域的细胞总RNA,AMV 酶逆转录,加MCP-1 引物扩增cDNA,引物序列:引物A,5'-CCT GTT GTT CAC AGT TGC TGC C-3';引物B,5'-TCT ACA GAA GTG CTT GAG GTG GTT G-3'。

1.4 图像分析及统计学处理 在CA-P-530 图像采取卡(中国自动化技术研究所生产)、BMAT286 和Olympus BX60 组成的图像处理系统上进行显微图像分析。MCP-1 阳性细胞、巨噬细胞在Leica quantitation570 图像分析系统上自动计数。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t 检验进行差异性分析。

2 结果

2.1 MCP-1 mRNA 表达 损伤后的脊髓组织和正常对照的脊髓组织经PCR 扩增后均得到一约440 bp 长的扩增产物,与预期大小一致。DNA 电泳

在正常脊髓组织内只检测到低水平MCP-1 mRNA 表达,而损伤后的脊髓表达水平明显增加(β actin 作为内参照),表明MCP-1 基因参与了脊髓损伤(图1)。

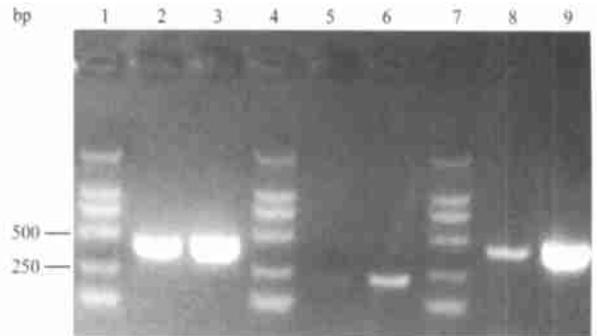


图1 大鼠SCI后MCP-1 mRNA 的表达水平

Fig 1 MCP-1 mRNA expression after SCI in rats

1, 4, 7: PCR marker; 2, 5, 8: Control group; 3, 6, 9: Injured spinal cord; 2, 3: β actin; 5, 6: MIP-1 β 8, 9: MCP-1

2.2 免疫组化染色结果 胞质呈棕黄色的细胞为MCP-1 阳性细胞。正常脊髓阳性细胞较为稀少,在灰白质内分布均匀,染色较浅。MCP-1 阳性细胞高峰期出现在损伤后12 h 至3 d,在损伤区域可见灰质及白质内阳性细胞增多,胞体增大,并见较多破裂细胞,染色变深,主要以弥漫的形式分布在靠近血管区域及血管壁上,胞质深染。胞质内容酶体膜呈棕黄色的细胞为巨噬细胞。正常脊髓巨噬细胞极为少见,染色较浅。高峰期出现在损伤后3~7 d,损伤区域可见灰质及白质内巨噬细胞增多,胞体较大,染色较正常脊髓组变深,在靠近血管区域及血管壁上分布较为稠密。脊髓损伤后3、6、12 h 和1、3、5、7 d 伤段脊髓损伤局部MCP-1 阳性细胞及巨噬细胞的数目见表1。结果显示,脊髓损伤后3 h,在损伤区域MCP-1 阳性细胞和巨噬细胞计数就比正常脊髓对照组明显增多($P < 0.05$),随后两种细胞均进一步急剧增多,巨噬细胞的高峰时段出现在损伤后3~7 d,滞后于MCP-1 阳性细胞出现的高峰期(在损伤后12 h 至3 d)。

表1 脊髓损伤后不同时间损伤局部MCP-1 阳性细胞及巨噬细胞计数

Tab 1 Number of MCP-1 positive cells and macrophages after SCI

(n = 4, $\bar{x} \pm s$)

| Positive cell | Control | Time after spinal cord injury | | | | | | |
|---------------|-------------|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | 3 h | 6 h | 12 h | 1 d | 3 d | 5 d | 7 d |
| MCP-1 | 156.0 ± 6.1 | 184.7 ± 14.3* | 215.2 ± 18.3** | 387.3 ± 21.1** | 382.4 ± 25.5** | 398.4 ± 22.2** | 343.2 ± 24.2** | 352.3 ± 32.5** |
| Macrophage | 29.9 ± 4.6 | 38.4 ± 5.2* | 49.6 ± 7.4** | 71.4 ± 9.2** | 296.5 ± 45.4** | 423.5 ± 42.4** | 456.8 ± 36.5** | 385.2 ± 37.4** |

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

3 讨论

近年来国内外学者在脊髓损伤炎症免疫反应机制方面的研究中对包括单核/巨噬细胞的浸润及脊髓损伤局部小胶质细胞、星形胶质细胞的激活进行了较为深入地探讨,发现趋化性细胞因子参与了外周炎症免疫细胞的募集,并调控炎症细胞进入脊髓损伤区域^[3]。Weiss等^[4]发现,属于趋化因子C-C亚家族的MCP-1引起的单核/巨噬细胞穿越内皮细胞和星形细胞共培养物依赖于细胞间黏附分子1(ICAM-1),并部分依赖于内皮细胞-白细胞黏附分子1(ELAM-1或E-选择素)。MCP-1可引起单核/巨噬细胞胞质内游离钙水平升高、呼吸爆发、表达黏附分子(如 β 整合素)、释放溶酶体酶及超氧阴离子等,还能促使单核/巨噬细胞生成组织因子和促炎细胞因子^[5]。故最近有文献报道^[6]趋化因子可能参与脊髓损伤局部的继发性炎症反应。我们的实验也证实,MCP-1 mRNA在脊髓损伤后表达明显增高,MCP-1阳性细胞在脊髓损伤后3h就能检测到,以后持续增多,损伤后12h至3d为高峰期,在损伤后7d仍有阳性表达,而巨噬细胞在脊髓损伤局部亦明显增多,其高峰时段在损伤后3~7d,明显滞后于MCP-1阳性细胞出现的高峰期,进一步提示脊髓损伤后MCP-1与单核/巨噬细胞之间存在级联反应。

单核/巨噬细胞作为趋化因子MCP-1最主要的效应细胞在脊髓损伤中的作用在SCI免疫反应机制中具有举足轻重的地位。许多研究表明,脊髓损伤后单核/巨噬细胞聚集在损伤部位,以各种机制引起组织损伤,包括:微血管闭塞、氧自由基产生、细胞毒性酶释放、血管舒缩性改变等^[7]。为了减少脊髓损伤后单核/巨噬细胞的侵入、减轻炎症免疫反应的程度,许多学者针对细胞趋化因子或炎症免疫细胞进行干预,取得了一定的效果。Ghirnikar等^[8]注入趋化因子受体拮抗剂 α MP-2能抑制损伤局部炎症免疫细胞的侵入、提高内源性凋亡抑制基因Bcl-2的表达水平从而减少了中枢神经元的死亡。Popovich等^[9]在脊髓损伤后炎症反应最严重时去除周围血中

的单核/巨噬细胞,观察到实验动物患肢功能恢复改善明显,镜下观察见损伤区有髓纤维数目较多、空洞明显减少、轴突再生良好。上述报道提示在脊髓损伤早期阻抑趋化因子与其效应细胞参与的炎症免疫级联反应是减少脊髓继发性损伤的有效途径之一。

综上所述,在脊髓继发性损伤过程中,炎症细胞趋化因子MCP-1在分子、蛋白水平上均有高表达,其可能通过“招募”单核/巨噬细胞进入脊髓损伤区域参与炎症反应,进一步加剧了脊髓原发损伤后的继发性损害。

[参考文献]

- [1] 廖维宏,张光铂 进一步加强脊髓损伤修复研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2003, 13(9): 517-519
- [2] Nystrom B, Berglund JE, Bergquist E. Methodological analysis of an experimental spinal cord compression model in the rat [J]. *Acta Neurol Scand*, 1988, 78(6): 460-466
- [3] Lee YL, Shih K, Bao P, et al. Cytokine chemokine expression in contused rat spinal cord [J]. *Neurochem Int*, 2000, 36(4-5): 417-425
- [4] Weiss JM, Downie SA, Lyman WD, et al. A astrocyte-derived monocyte chemoattractant protein-1 directs the transmigration of leukocytes across a model of the human blood-brain barrier [J]. *Immunology*, 1998, 161(12): 6896-6903
- [5] Ghirnikar RS, Lee YL, Eng LF, et al. Inflammation in traumatic brain injury: role of cytokine and chemokines [J]. *Neurochem Res*, 1998, 23(3): 329-340
- [6] Ma M, Wei T, Boring L, et al. Monocyte recruitment and myelin removal are delayed following spinal cord injury in mice with CCR2 chemokine receptor deletion [J]. *J Neurosci Res*, 2002, 68(6): 691-702
- [7] DeGraba TJ. The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy [J]. *Neurology*, 1998, 51(Suppl 3): 62-68
- [8] Ghirnikar RS, Lee YL, Eng LF. Chemokine antagonist infusion attenuates cellular infiltration after spinal cord contusion injury in rat [J]. *J Neurosci Res*, 2000, 59(1): 63-73
- [9] Popovich PG, Guan Z, Wei P, et al. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury [J]. *Exp Neurol*, 1999, 158(2): 351-365

[收稿日期] 2003-12-12

[修回日期] 2004-03-05

[本文编辑] 孙岩

第二军医大学军队卫生政策与管理研究中心成立

近日,第二军医大学军队卫生政策与管理研究中心正式揭牌成立。该中心的成立,是我校高度重视军事医学整体建设的重要举措,也是卫生勤务学系学术发展的大事,是卫生事业管理专业发展的一个里程碑。中心将本着为军队提供更好的卫生服务为宗旨,坚持有所为、有所不为的原则,突出研究重点,充分发挥研究中心在军队卫生经济管理、卫生资源优化配置研究等方面的优势,力争在今后的的工作中取得突破性进展。