

# 脊髓减压病对大鼠 TNF- $\alpha$ 、NGF 及 TrkA 表达的影响

## Variation of TNF- $\alpha$ , NGF and TrkA expression in rat spinal cord decompression sickness

章建程, 赵敏, 殷明\*, 陈锐勇, 方以群, 王文波

(海军医学研究所舰艇卫生研究室, 上海 200433)

[关键词] 脊髓; 减压病; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 神经生长因子; TrkA

[中图分类号] R 845.21 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2006)05-0567-02

潜水医学中, 发生在中枢神经系统的减压病以脊髓减压病较为多见。在失事潜艇的艇员脱险时, 往往由于没有立即救治的条件, 使脊髓减压病成为减员的重要原因之一<sup>[1]</sup>。本实验通过对脊髓减压病大鼠 NGF、TrkA 和 TNF- $\alpha$  蛋白表达的观察, 分析减压病致脊髓损伤的自身保护因素与加重损伤的因素, 及其时间分布的特点, 认识脊髓减压病的发病规律, 为治疗脊髓减压病提供理论依据。

### 1 材料和方法

1.1 动物分组及试剂 健康雄性 SD 大鼠, 体质量 200~250 g, 由第二军医大学实验动物中心提供。采用随机数字法分组: 正常对照组 4 只、安全减压组 4 只、脊髓减压病组 20 只。NGF、TrkA、TNF- $\alpha$  多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, EnVision 试剂为 DAKO 公司产品, DAB 为 Sigma 公司产品。

1.2 动物模型制作 将脊髓减压病组大鼠进行高压气暴露, 经 30 s 空气加压至 1 MPa, 停留 5.5 min, 50 s 减至常压出舱。安全减压组大鼠采用动物安全减压方案减至常压。

1.3 取材切片 脊髓减压病组大鼠在出舱 0、6、24、48 和 72 h 各取 4 只, 灌注取材。以 0.3% 戊巴比妥钠 (0.01 ml/kg) 麻醉, 4% 多聚甲醛 PBS 缓冲液左心室灌注固定, 取脊髓胸腰段, 常规石蜡包埋切片, 片厚 3  $\mu$ m。

1.4 H-E 染色 切片常规用二甲苯脱蜡, 各级乙醇漂洗, 苏木精染色, 盐酸乙醇分化、脱水, 中性树胶封片。

1.5 免疫组织化学染色 EnVision 法染色, 抗体稀释比例: NGF 为 1:50, TrkA 为 1:60, TNF- $\alpha$  为 1:80。

1.6 图像分析 采用 ImageJ 图像分析系统进行灰度分析。

### 2 结果

2.1 病理变化 对照组和安全减压组脊髓组织结构完整, 神经细胞形态正常 (图 1A)。脊髓减压病 0 h 组脊髓灰质和白质均有较多小气泡分布, 各时间点脊髓减压病组损伤表现为组织结构模糊不清, 疏松肿胀, 出血, 部分细胞核碎裂、核溶解, 可见明显的充血和血管周围渗出 (图 1B)。

2.2 NGF、TrkA 和 TNF- $\alpha$  蛋白表达的变化 见表 1。对照组和安全减压组均未出现阳性染色。脊髓减压病组快速减压后 6 h 有少量 NGF、TrkA 表达, 24 h 组表达明显增强, 48 h 和 72 h 组 NGF 表达仍比较明显 (图 2A), 但 TrkA 表达开始减弱 (图 2C)。TNF- $\alpha$  表达的时间分布特点和变化趋势与

TrkA 相似, 在减压后 48 h 表达明显增强并达到高峰 (图 2B), 然后开始减弱, 但仍高于 6 h 组的表达水平。阳性染色主要分布在脊髓灰质神经元、白质神经纤维和神经胶质细胞。

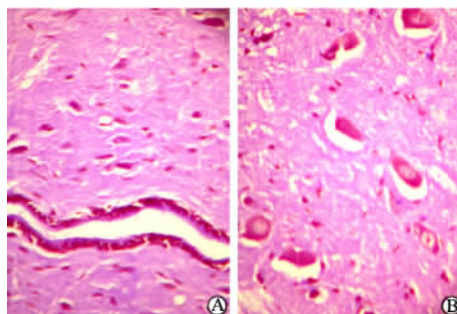


图 1 安全减压组 (A) 和脊髓减压病 0 h 组 (B) H-E 染色 ( $\times 200$ )

表 1 免疫组织化学图像分析结果 (灰度值)

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

出舱时间 (t/h)	NGF	TrkA	TNF- $\alpha$
0	187.9 $\pm$ 13.2	182.6 $\pm$ 14.3	191.3 $\pm$ 11.4
6	180.3 $\pm$ 12.4	172.8 $\pm$ 11.7	180.9 $\pm$ 10.7
24	148.5 $\pm$ 13.2	147.5 $\pm$ 17.1	159.8 $\pm$ 20.1
48	149.7 $\pm$ 17.6	156.9 $\pm$ 20.8	150.9 $\pm$ 17.2
72	152.3 $\pm$ 10.3	170.4 $\pm$ 13.6	167.5 $\pm$ 13.1

### 3 讨论

脊髓减压病是一种累及中枢神经系统的重型减压病, 快速减压造成的脊髓损伤是具有自身复杂性的急性损伤, 与一般的机械损伤不同, 其临床治疗难度很大, 致残率较高。脊髓减压病的直接病因是气泡, 这些气泡的产生主要是过饱和的惰性气体在快速减压的过程中来不及经血液循环和呼吸系统安全排出体外, 而在原地释放形成的, 影像学观察到的结果证实了这些气泡的存在, 这和惰性气体在体内不同组织

[基金项目] 总后卫生部面上项目 (98m050). Supported by the general program of Health Ministry of the General Logistic Department of PLA (98m050).

[作者简介] 章建程, 硕士, 副研究员。

\* Corresponding author. E-mail: paper-007@yahoo.com.cn

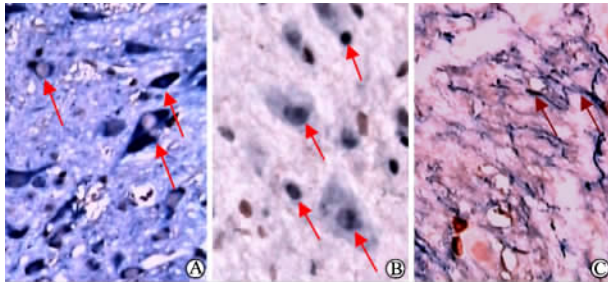


图2 脊髓灰质 NGF(A)、TNF-α(B)和脊髓白质 TrkA(C)染色

A,C: 24 h, ×200; B: 48 h, ×400; 箭头所示为阳性染色的脊髓灰质神经元、神经胶质细胞和白质神经纤维

中的溶解规律和中枢神经系统的各部分组织结构特点有关。由于气泡的多发性及游走性,损伤往往不局限于某一部位,可能既有平面的病变,又有纵向的损害,具有涉及不同节段的广泛性和多病灶性的特点。中枢神经系统是一个致密组织,只要有一些气泡即可引起明显的应力变形,其中脊髓组织对空气栓塞特别敏感,易于受到损伤。

神经生长因子是最早发现的神经营养因子,研究证实它是一种对神经细胞的生长、发育、分化再生及功能发挥起重要作用的蛋白质,是促进神经系统损伤修复的重要因素之一<sup>[2]</sup>。在应激条件下,NGF 不仅能促进神经纤维的定向生长,神经元的有丝分裂、分化、修复,还可以促进神经膜细胞及神经胶质细胞生长,从而减少继发性损害,促进受损神经元再生。研究表明,中枢神经系统损伤后,原已封闭的神经生长因子受体重新暴露,说明损伤神经元的神经再生需要 NGF 的营养和支持<sup>[3]</sup>。本实验中脊髓减压病组快速减压后 6 h 开始有少量 NGF 蛋白表达,24 h 组表达明显增强,直到 72 h 表达仍比较明显,提示脊髓减压病发生后大鼠存在自身的保护和修复机制,而且保护作用并非一过性,而是持续发挥作用,以维持损伤后神经元的生存和轴突再生,有利于神经功能的恢复。内源性 NGF 表达增多的功能意义有利于保护损伤的神经元,可能与 NGF 稳定细胞内 Ca<sup>2+</sup> 水平,降低氧化损害,参与蛋白磷酸化和基因表达调控有关<sup>[4]</sup>。

NGF 有两种类型的细胞表面受体,一类是高亲和力受体酪氨酸激酶 TrkA,介导正向信号如促进生长和存活;另一类是低亲和力受体 P75NTR,介导正向和反向信号,可以诱导神经细胞发生凋亡。NGF 的神经保护作用必须有其相应的受体 TrkA 的高表达才能得以充分体现,因此 TrkA 也与中枢神经细胞的再生和分化密切相关<sup>[5]</sup>。TrkA 受体表达增加与损伤急性期即早基因 c-fos、c-jun 及细胞因子 IL-1、TNF-α 等过度表达有关,属于机体自身对损伤与抗损伤的调节。研究发现,转染 TrkA 后可以抑制 NGF 低亲和力受体 P75 诱导的神经元凋亡,同时伴随着丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 的活化、神经酰胺的产生及 c-jun 氨基末端激酶 (JNK) 的活化被抑制,TrkA 不仅可以启动促进细胞存活的信号,同时也可以抑制 P75 诱导的神经细胞凋亡信号<sup>[6]</sup>。本实验中脊髓减压病组快速减压后 6 h 即有 TrkA 及其相应的配基 NGF 表达,在 24 h 组表达明显增加达到高峰,脊髓

减压病发生后 NGF 和 TrkA 均是自身保护和修复机制的重要因素,以维持损伤后神经元的生存和轴突再生。

肿瘤坏死因子(TNF)超家族是一类多功能的细胞因子,具有诱导细胞凋亡、抗病毒、免疫调节等多种生物学活性,其中一些成员可以通过和细胞膜上相应受体结合,启动细胞内的凋亡机制,诱导细胞凋亡<sup>[7]</sup>。本实验中脊髓减压病组快速减压后 6 h 即开始有少量 TNF-α 蛋白表达,24 h 表达明显增加,48 h 达到高峰,提示脊髓减压病发生后存在继发性损伤的因素,导致脊髓发生更加严重的损伤。离体实验研究提示,TNF 对神经元具有毒性作用,它可以触发谷氨酸介导的对培养的人胚胎脑细胞的神经毒性,刺激自由基形成,并参与了脱髓鞘损害。Lee 等<sup>[8]</sup>的研究发现,脊髓损伤后,TNF 在损伤部位合成增加,免疫活性增强,导致内皮细胞、神经元和胶质细胞凋亡,同时激活诱导型一氧化氮合成酶,引起损伤脊髓变性。

由此可见,减压导致脊髓损伤后,一方面出现加重脊髓损伤的损害因素,同时脊髓自身也有自我保护和修复机制,受损的神经元或者变性坏死或者存活再生,取决于损伤因素与保护因素之间的平衡。加强保护因素同时抑制损伤因素造成继发损伤是治疗脊髓减压病的重要途径。

[参考文献]

[1] Francis TJ, Griffin JL, Homer LD, et al. Bubble-induced dysfunction in acute spinal cord decompression sickness[J]. J Appl Physiol, 1990, 68: 1368-1375.  
 [2] Brown A, Ricci M, Weaver LC. NGF message and protein distribution in the injured rat spinal cord[J]. Exp Neurol, 2004, 188: 115-127.  
 [3] Widenfalk J, Lundströmer K, Jubran M, et al. Neurotrophic factors and receptors in the immature and adult spinal cord after mechanical injury or kainic acid[J]. J Neurosci, 2001, 21: 3457-3475.  
 [4] Sayer FT, Oudega M, Hagg T. Neurotrophins reduce degeneration of injured ascending sensory and corticospinal motor axons in adult rat spinal cord[J]. Exp Neurol, 2002, 175: 282-296.  
 [5] Fischer SJ, Podratz JL, Windebank AJ. Nerve growth factor rescue of cisplatin neurotoxicity is mediated through the high affinity receptor: studies in PC12 cells and p75 null mouse dorsal root ganglia[J]. Neurosci Lett, 2001, 308: 1-4.  
 [6] Evangelopoulos ME, Weis J, Kruttgen A. Neurotrophin effects on neuroblastoma cells: correlation with trk and p75NTR expression and influence of Trk receptor bodies[J]. J Neuro-oncol, 2004, 66: 101-110.  
 [7] Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 66: 1403-1408.  
 [8] Lee YB, Yune TY, Baik SY, et al. Role of tumor necrosis factor-α in neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2000, 166: 190-195.

[收稿日期] 2005-09-17

[修回日期] 2006-04-24

[本文编辑] 尹 茶