

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00694

视神经慢性受压后视神经胶质细胞的病理变化

吕立权, 楼美清, 董 艳, 蔡如珏, 胡国汉, 骆 纯, 侯立军, 卢亦成*

第二军医大学长征医院神经外科, 上海市神经外科研究所, 上海 200003

[摘要] **目的:**观察视神经慢性受压后视神经胶质细胞的病理改变,探讨胶质细胞与神经元的相互作用,为慢性视神经损伤的修复研究提供基础。**方法:**30只成年家猫随机等分为正常对照组、假手术组、压迫1周组、压迫2周组、压迫4周组和压迫8周组($n=5$)。后4组利用球囊植入法建立慢性视神经损伤模型。各组动物灌注固定,取视神经组织,行透射电镜观察和免疫组织化学染色,观察胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、髓磷脂碱性蛋白(MBP)、碳酸酐酶Ⅱ(CAⅡ)和ED-1的表达变化。**结果:**电镜下正常视神经髓鞘结构完整,各髓板清晰、排列紧密;受压2周后见轻微脱髓鞘;4周后出现板层分离、髓鞘泡状解离,并可见变性的胶质细胞;8周后髓鞘崩解更为明显,大部分髓鞘明显变薄,并可见凋亡小体形成。免疫组化染色在受压2周后无明显改变;4周后视神经MBP染色出现排列紊乱,有缺失现象;8周后染色缺失更为明显。受压4周后视神经压迫区出现CAⅡ染色紊乱,有缺失现象;8周后更为明显。非压迫区在受压8周后CAⅡ染色仍基本正常。受压4周后视神经直接受压区GFAP染色强度下降,损伤区近侧端染色强度增加;至8周时更为明显。正常视神经内可见散在的ED-1染色阳性细胞;受压4周后损伤区周围ED-1染色阳性细胞明显增多;8周后更为明显。**结论:**视神经慢性受压后损伤区出现胶质细胞变性和坏死,损伤区周围出现星形胶质细胞增殖和小胶质细胞激活,提示胶质细胞改变参与了慢性视神经损伤的病理过程。

[关键词] 慢性视神经损伤;少突胶质细胞;星形胶质细胞;小胶质细胞;病理学

[中图分类号] R 774.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)06-0694-05

Pathological changes of glial cells following chronic optic nerve compression

LÜ Li-quan, LOU Mei-qing, DONG Yan, CAI Ru-jue, HU Guo-han, LUO Chun, HOU Li-jun, LU Yi-cheng*

Department of Neurosurgery, Shanghai Institute of Neurosurgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[ABSTRACT] **Objective:** To examine the pathological changes of glial cells after chronic optic nerve compression, so as to discuss the interaction between the glial cells and neurons. **Methods:** Thirty adult cats were randomly divided into 6 groups ($n=5$), namely, control group, sham operation group, 1-week compression group, 2-week compression group, 4-week compression group, and 8-week compression group. The chronic optic nerve injury model was produced by an inflatable balloon implanted under the optic chiasm in the latter 4 groups. All the animals were sacrificed and perfused; the optic nerves were removed and the cellular responses of the nerves were observed by electronic microscopy; and the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), myelin basic protein (MBP), carbonic anhydrase Ⅱ (CA Ⅱ) and ED-1 was examined at various time points by immunohistochemical staining. **Results:** Under the electron microscopy, the normal optic nerves had integrated myelin structure, clearly and closely arranged neural plate. The optic nerve presented slight demyelination 2 weeks after compression; myelin laminae dissociating and glial cell degenerating occurred 4 weeks after compression; and the demyelination became more obvious and the most myelin became thinner 8 weeks after compression. No obvious immunohistochemical changes were found in the optic nerves during the first two weeks of compression. The MBP staining was disturbed and lost at 4 weeks after compression, which became more obvious 8 weeks after compression. The CA Ⅱ staining in the compressed region was irregular and lost at 4 weeks, which was more obvious at 8 weeks; the staining in non-compressed region was normal. The intensity of GFAP staining was reduced in the compressed region and increased at proximal portion of the nerve at 4 weeks, which became more significant at 8 weeks. The ED-1 positive cells were found in the normal nerve with low density. The positive cells increased around the compressed region at 4 weeks and became more significant at 8 weeks. **Conclusion:** Glial cell degeneration and death

[收稿日期] 2008-11-22 **[接受日期]** 2009-03-19

[基金项目] 国家自然科学基金(30271333), 国家自然科学基金青年科学基金项目(30600635). Supported by National Natural Science Foundation of China(30271333) and National Natural Science Foundation of China for the Youth (30600635).

[作者简介] 吕立权, 博士, 讲师、主治医师. E-mail: lvliquan@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81885671, E-mail: lycheng@sh163.com

occur in the compressive region after chronic compression of optic nerve. The proximal portion of the compressed nerve has astrocyte proliferation and microglia activation, indicating that functional change of glial cells may contribute to chronic optic nerve injury.

[KEY WORDS] chronic optic nerve injuries; oligodendrocyte; astrocyte; microglia; pathology

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(6): 694-698]

累及视路的占位病变对视神经造成的慢性压迫损伤是神经外科和眼科常见疾病, 主要包括垂体腺瘤、颅咽管瘤、鞍结节脑膜瘤、蝶骨嵴内侧脑膜瘤等, 常导致患者视力严重下降。这类患者很大部分即使在全切除肿瘤之后, 造成的视力障碍也难以恢复, 有的甚至继续恶化^[1]。目前临床上对这类患者缺乏积极有效的干预措施, 原因之一是对慢性视神经损伤的病理过程和分子机制缺乏深入的了解。我们前期已成功建立猫慢性视神经损伤模型, 并对其病理学及相关差异表达基因进行了初步研究^[2-4], 发现慢性视神经损伤有不同于急性损伤的特点, 值得进一步研究。

神经胶质细胞在中枢神经系统(CNS)损伤和修复中的作用日益受到重视, 它们既是CNS内源性损伤因子的主要来源, 又是CNS损伤后神经功能修复的积极参与者^[5]。但目前对视神经损伤后神经胶质细胞的变化所知甚少。因此, 本研究利用透射电镜和免疫组织化学染色方法动态观察视神经慢性受压后神经胶质细胞的变化, 旨在为阐明慢性视神经损伤的病理机制和促进损伤后的功能修复研究提供基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 胶质纤维酸性蛋白(GFAP)小鼠源性单克隆抗体购自 NeoMarkers 公司, 髓磷脂碱性蛋白(MBP)小鼠源性单克隆抗体购自 Serotec 公司, 碳酸酐酶 II (CA II)小鼠源性多克隆抗体购自 Rockland 公司, ED-1 小鼠源性单克隆抗体购自 Chemicon 公司, EnVision 试剂购自 DAKO 公司。

1.2 实验动物及分组 成年健康家猫 30 只, 雌雄不限, 体质量 2.5~3.5 kg, 由第二军医大学实验动物中心提供。双眼屈光间质清, 瞳孔等大等圆, 对光反应好, 眼底无异常。随机分为 6 组($n=5$), 正常组: 不进行任何手术处理; 假手术组: 进行开颅手术, 放入球囊而不充盈; 压迫 1 周组: 注入造影剂时间为第 1 天, 总量 0.1 ml; 压迫 2 周组: 注入造影剂时间及剂量为第 1 天 0.1 ml、第 11 天 0.1 ml, 总量

0.2 ml; 压迫 4 周组: 注入造影剂时间及剂量为第 1 天 0.1 ml、第 11 天 0.1 ml, 第 21 天 0.05 ml, 总量 0.25 ml; 压迫 8 周组: 注入造影剂时间及剂量为第 1 天 0.1 ml、第 11 天 0.1 ml, 第 21 天 0.05 ml, 第 36 天 0.05 ml, 第 51 天 0.05 ml, 总量 0.35 ml。

1.3 慢性视神经损伤模型的建立 参照文献^[2]方法建立慢性视神经损伤模型: 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉动物, 仿人翼点入路开颅。在手术显微镜下星形切开硬脑膜至骨缘, 排除脑脊液, 慢慢抬起颞叶脑组织, 沿蝶骨棘深入直至见到白色视神经和视交叉。在视神经外侧间隙植入不可脱球囊, 后接长约 20 cm 导管, 穿皮下隧道引至颈背部, 注入造影剂 0.1 ml, 检查球囊位于视神经视交叉及其下的颅底骨性结构之间, 导管末端加热封闭, 检查无泄漏后将导管埋于颈背部皮下。术后注意观察生命体征和神经系统功能缺损情况。每组动物在预定的时间追加造影剂的量, 术后行头颅 CT 扫描。

1.4 标本取材 3%戊巴比妥钠深度麻醉, 开胸经左心室插管至主动脉, 血管钳夹闭胸主动脉, 上腔静脉开口排除灌注液, 依次灌注生理盐水 500 ml, 4%多聚甲醛和 0.1%戊二醛混合液 250 ml, 立即取出视神经, 制成石蜡切片和电镜标本。

1.5 透射电镜观察 视神经及时置入 2.5%戊二醛溶液固定 2 h, 再置入 1%四氧化锇液固定 2 h。Epon812 常规包埋, 超薄切片, 醋酸铀及硝酸铅染色后行透射电镜(Hitachi H-800)观察、拍照。

1.6 免疫组化染色 用 EnVision 法分别检测视神经 GFAP、MBP、CA II、ED-1 的表达: 切片常规脱蜡水化, 0.3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶; 加一抗, 37℃恒温箱内孵育 2 h, 再加 EnVision 试剂 37℃孵育 30 min; DAB 显色, 苏木精衬染, 常规中性树脂封片, 显微镜下观察, 阳性细胞呈棕黄色。

2 结果

2.1 视神经胶质细胞超微结构变化 正常视神经髓鞘结构完整, 各髓板清晰、排列紧密, 轴索间可见胶质细胞, 主要为少突胶质细胞和星形胶质细胞, 后者周围可见胶原纤维和基底膜。视神经受压 2 周后

可见轻微脱髓鞘;受压4周后出现板层分离、髓鞘泡状解离,胶质细胞内细胞器减少,胞膜溶解;8周后髓

鞘崩解更为明显,大部分髓鞘明显变薄,胶质细胞变性坏死更为明显,并可见到凋亡小体(图1)。

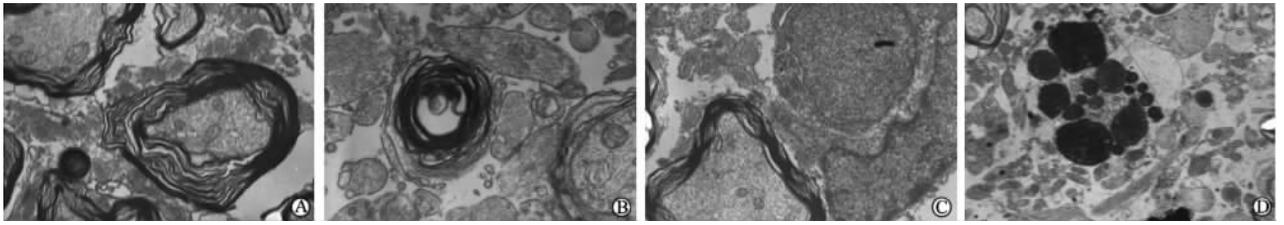


图1 视神经慢性损伤后胶质细胞的超微结构

Fig 1 Ultra-structure of glial cells after chronic optic nerve compression

A: Demyelination, 4 weeks after compression; B: Thin myelin, 8 weeks after compression; C: Glial cell degeneration, 4 weeks after compression; D: Apoptotic body, 8 weeks after compression. Original magnification: $\times 10\ 000$ (A, B, C); $\times 7\ 000$ (D)

2.2 视神经受压后各指标表达的变化 正常视神经 MBP 染色呈均匀棕黄色,沿神经轴索排列整齐;

受压4周后开始出现棕黄染色排列紊乱,有缺失现象;受压8周后染色缺失更为明显(图2)。

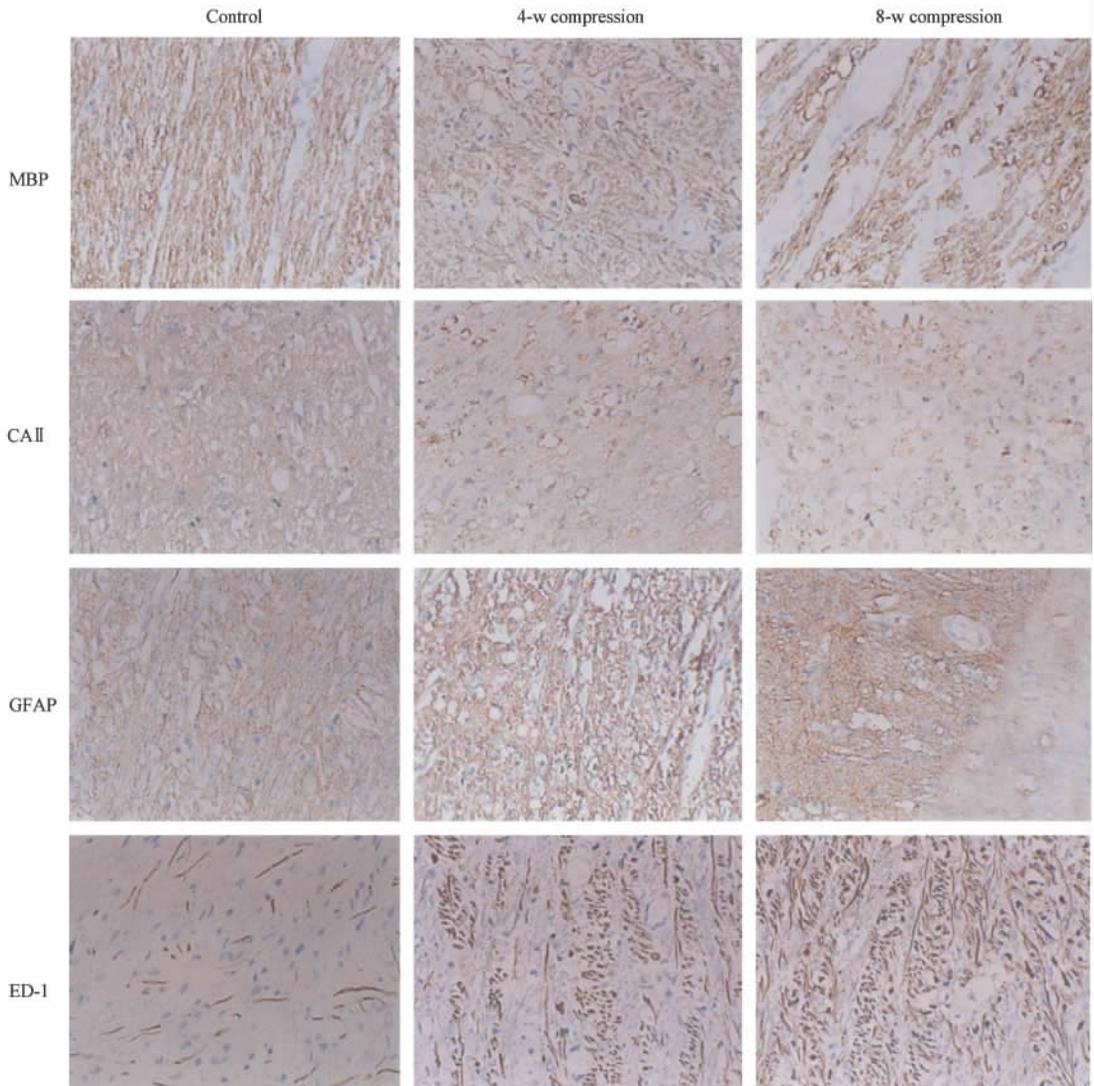


图2 视神经慢性损伤后 MBP、CA II、GFAP、ED-1 表达的变化

Fig 2 Immunohistochemical changes of MBP, CA II, GFAP, and ED-1 after chronic optic nerve compression

Original magnification: $\times 400$

正常视神经 CA II 染色呈均匀棕黄色, 分布于少突胶质细胞胞质内; 受压 4 周后压迫区开出现染色紊乱, 有缺失现象, 受压 8 周后更为明显(图 2)。非压迫区在术后 8 周染色仍基本正常。

视神经受压 2 周后 GFAP 染色没有明显改变; 受压 4 周后直接压迫区染色强度下降, 损伤区近侧端染色强度增加, 至第 8 周时上述变化更为明显(图 2)。正常视神经内可见散在的 ED-1 染色阳性细胞; 受压后 4 周受压区周围 ED-1 染色阳性细胞开始明显增多, 至受压后 8 周更为明显(图 2)。

3 讨论

神经胶质细胞在 CNS 损伤后的病理生理和修复重建过程中起着关键作用。小胶质细胞在损伤早期即被激活, 分泌多种炎性介质和毒性物质, 被认为是加重继发损伤的主要效应细胞。少突胶质细胞在早期发生脱髓鞘和死亡, 不仅导致神经冲动传导障碍, 而且产生的髓鞘碎片能够抑制轴索再生。同时星形胶质细胞反应性增殖、形成胶质瘢痕, 在局限损伤反应的同时阻碍了神经功能的修复。调控这些细胞的反应以利于神经功能的修复已经成为 CNS 损伤治疗的一个新的策略。本研究采用透射电镜和免疫组织化学方法对慢性视神经损伤过程中胶质细胞的变化进行了动态研究, 发现在视神经慢性受压过程中胶质细胞的病理变化与急性视神经损伤既有相似之处, 又有其自身的特点。

3.1 少突胶质细胞的变化及意义 视神经中少突胶质细胞主要功能是形成中枢神经的髓鞘, 还可分泌多种神经营养因子, 促进神经元和胶质细胞的存活。视神经慢性压迫损伤后发生脱髓鞘改变, 其直接的后果是视觉冲动传导障碍, 导致视力下降^[6]。另外, 产生的髓鞘碎片会激活小胶质细胞和募集巨噬细胞, 激活炎症反应。降解的髓鞘碎片含有大量轴索抑制因子, 是视神经损伤后轴索再生障碍的重要因素之一, 而克服这些抑制分子的抑制作用可以促进 CNS 损伤后轴索再生和功能恢复, 可为人类视神经损伤后修复提供新的治疗途径。

少突胶质细胞对于多种损伤因子如氧化物、毒性物质、放射损伤和机械损伤非常敏感^[7]。本研究也发现在视神经受压区少突胶质细胞胞体标志物 CA II 染色降低, 提示视神经慢性受压将导致少突胶质细胞死亡。少突胶质细胞除形成髓鞘之外, 还分

泌多种神经营养因子, 促进神经元和胶质细胞的存活和功能发挥^[8]。因此少突胶质细胞死亡有可能触发和加重轴索变性。

3.2 星形胶质细胞的变化及意义 星形胶质细胞具有非常重要和复杂的功能, 参与神经损伤和修复过程。本研究结果显示在受压区 GFAP 染色降低, 提示视神经受压后星形细胞死亡, 在电镜下也观察到有胶质细胞的凋亡和坏死, 这意味着轴索和其他神经细胞将逐渐丢失来自星形细胞的营养支持作用。而且, 星形细胞死亡过程中, 不仅对周围微环境的调控能力将逐渐丧失, 且自身也可能释放一些毒性物质, 如兴奋性氨基酸、过氧化物等, 加重轴索的损伤。星形细胞的缺失还可能与神经再生障碍有关, 因为成熟的星形细胞可合成和释放多种神经营养因子, 而且正常表型的星形细胞能够促进神经的生长^[9]。因此视神经受压区星形胶质细胞缺失将导致轴突生长缺乏良好的基质。

尽管星形细胞在受压区减少, 但是 GFAP 染色在受压视神经的近段是增强的, 提示星形细胞发生了增殖或肥大, 成为反应性星形细胞。反应性星形细胞拥有大量紧密交织的突起, 并通过缝隙连接或紧密连接以及细胞外基质串连起来, 导致细胞外空间非常狭小, 构成了阻碍轴索生长的物理屏障。不仅如此, 它还分泌许多轴索抑制分子, 其中最为重要的是硫酸软骨素蛋白多糖(chondroitin sulfate proteoglycans, CSPGs)^[10]。视神经损伤后许多 CSPGs 表达上调^[11], 抑制 CSPGs 的作用可以促进视神经再生^[12]。在视神经慢性损伤后抑制胶质瘢痕形成, 削弱 CSPGs 的作用可能有助于神经功能的修复。

3.3 小胶质细胞的变化及意义 CNS 损伤后, 小胶质细胞是 CNS 内最早活化的细胞, 能够迅速迁移至损伤区域, 增殖并具有吞噬能力, 消化和清除死亡细胞和碎片组织, 促进组织修复。视神经损伤后小胶质细胞/巨噬细胞也是最早活化的细胞。在大鼠视神经挫伤后 24 h 内即可以看到圆形的 ED-1 (+)/溶菌酶 (+) 细胞, 1 周后数量达到最高峰, 大部分在 3 周后消失, 它们能够有效地清除组织碎片^[13]。激活的小胶质细胞可能有利于神经再生: 一方面小胶质细胞激活后具有吞噬功能, 能够清除髓鞘碎片等轴索生长抑制物, 同时激活的小胶质细胞能够分泌多种神经营养因子, 也能促进神经再生。用激活的巨噬细胞移植到损伤视神经能够促进神经

再生^[14]。但是活化的小胶质细胞也被认为是神经元继发变性的原因之一。因为激活的小胶质细胞可产生和释放对神经细胞有害的化学物质,这些物质包括蛋白酶、超氧化阴离子羟基、过氧化氢、花生四烯酸、一氧化氮、兴奋性氨基酸、喹啉酸和细胞因子等。

在本实验中 ED-1 在损伤 4 周后表达上调,提示其在慢性视神经损伤早期即被激活。小胶质细胞作为重要的炎性细胞可能参与了损伤病理过程。由于小胶质细胞的功能表现为两面性,因此如果完全抑制小胶质细胞激活可能并不有利于损伤神经组织的修复^[15]。如何调控小胶质细胞的激活程度,使其有利于损伤修复而不危害到正常神经细胞是一项值得深入研究的课题。

综上所述,视神经慢性受压后损伤区出现胶质细胞死亡,损伤区周围出现星形胶质细胞增殖和小胶质细胞激活,提示胶质细胞改变参与视神经慢性损伤病理过程。合理调控胶质细胞的反应可能有利于视神经损伤的修复。

[参考文献]

- [1] Suri A, Narang K S, Sharma B S, Mahapatra A K. Visual outcome after surgery in patients with suprasellar tumors and preoperative blindness[J]. *J Neurosurg*, 2008, 108: 19-25.
- [2] 吕立权, 朱爱红, 楼美清, 蔡如珏, 董 艳, 卢亦成. 猫慢性视神经损伤模型的建立及病理学的动态变化[J]. *中华医学杂志*, 2006, 86: 2177-2181.
- [3] 吕立权, 楼美清, 董 艳, 蔡如珏, 胡国汉, 骆 纯, 等. 猫视神经慢性损伤相关差异表达基因消减 cDNA 文库的构建[J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29: 550-554.
Lü L Q, Lou M Q, Dong Y, Cai R J, Hu G H, Luo C, et al. Construction of subtracted cDNA library for differentially expressed genes associated with chronic optic nerve injury[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2008, 29: 550-554.
- [4] 吕立权, 楼美清, 董 艳, 蔡如珏, 胡国汉, 骆 纯, 等. 视神经慢性损伤相关差异表达 cDNA 文库的鉴定与分析[J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29: 934-939.
Lü L Q, Lou M Q, Dong Y, Cai R J, Hu G H, Luo C, et al. Identification and analysis of subtracted cDNA library of differentially expressed genes associated with chronic optic nerve injury[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2008, 29: 934-939.
- [5] Barres B A. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease[J]. *Neuron*, 2008, 60: 430-440.
- [6] Clifford-Jones R E, Landon D N, McDonald W I. Remyelination during optic nerve compression[J]. *Trans Ophthalmol Soc UK*, 1980, 100(Pt 2): 274-275.
- [7] Kim D H, Vaccaro A R, Henderson F C, Benzel E C. Molecular biology of cervical myelopathy and spinal cord injury: role of oligodendrocyte apoptosis[J]. *Spine J*, 2003, 3: 510-519.
- [8] Du Y, Dreyfus C F. Oligodendrocytes as providers of growth factors[J]. *J Neurosci Res*, 2002, 68: 647-654.
- [9] Davies S J, Fitch M T, Memberg S P, Hall A K, Raisman G, Silver J. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system[J]. *Nature*, 1997, 390: 680-683.
- [10] Silver J, Miller J H. Regeneration beyond the glial scar[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5: 146-156.
- [11] Sellés-Navarro I, Ellezam B, Fajardo R, Latour M, McKerracher L. Retinal ganglion cell and nonneuronal cell responses to a microcrush lesion of adult rat optic nerve[J]. *Exp Neurol*, 2001, 167: 282-289.
- [12] Koprivica V, Cho K S, Park J B, Yiu G, Atwal J, Gore B, et al. EGFR activation mediates inhibition of axon regeneration by myelin and chondroitin sulfate proteoglycans[J]. *Science*, 2005, 310: 106-110.
- [13] Frank M, Wolburg H. Cellular reactions at the lesion site after crushing of the rat optic nerve[J]. *Glia*, 1996, 16: 227-240.
- [14] Lazarov-Spiegler O, Solomon A S, Schwartz M. Peripheral nerve-stimulated macrophages simulate a peripheral nerve-like regenerative response in rat transected optic nerve[J]. *Glia*, 1998, 24: 329-337.
- [15] Streit W J, Walter S A, Pennell N A. Reactive microgliosis[J]. *Prog Neurobiol*, 1999, 57: 563-581.

[本文编辑] 贾泽军