

· 基础研究 ·

不同强度磁刺激对星形胶质细胞迁移的影响及其机制研究

李哲 方征宇 黄晓琳

【摘要】目的 研究不同强度磁刺激对星形胶质细胞迁移作用的量效关系,并探讨其作用机制。**方法** 24只SD大鼠按刺激强度被随机分为A(0 T)、B($1.9 \times 40\%$ T)、C($1.9 \times 80\%$ T)、D($1.9 \times 100\%$ T)4组,4组的刺激频率均为1 Hz,刺激量为30个脉冲,均采用溴已锭(EB)注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,处死大鼠,采用图像分析系统观察胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、微管相关蛋白-2(MAP-2)和细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)的表达及脊髓损伤区空洞体积的变化。**结果** 随着磁刺激强度的增加,在第14天时空洞的体积逐渐缩小,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。在空洞缩小的区域中,可以观察到GFAP、ERK1/2的阳性表达,而无MAP-2的阳性表达。随着磁刺激强度的增加,GFAP、ERK1/2的阳性表达亦显著增强($P < 0.05$)。**结论** 磁刺激可影响星形胶质细胞的迁移,并随着刺激强度的增强,星形胶质细胞迁移的能力亦增强,这可能与ERK1/2的高表达有关。

【关键词】 磁刺激; 星形胶质细胞; 迁移

The effect of magnetic stimulation on astrocyte migration and its mechanism LI Zhe, FANG Zheng-yu, HUANG Xiao-lin. Department of Rehabilitation, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: HUANG Xiao-lin, Email: xiaolinhuang2006@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of magnetic stimulation on astrocyte migration and its mechanism. **Methods** Twenty-four adult, healthy Sprague-Dawley rats were injected with $0.5 \mu\text{l}$ of 1% ethidium bromide (EB) in the left side of the dorsal spinal cord funiculus at the T_{10-11} level to make a local spinal cord injury model. They were then randomly divided into four groups and exposed to 30 pulses of magnetic stimulation at 1 Hz and the following intensities: 0 T (Group A); $1.9 \times 40\%$ T (Group B); $1.9 \times 80\%$ T (Group C); $1.9 \times 100\%$ T (Group D). On the 14th day after stimulation, the rats were sacrificed and the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), microtubule associated protein-2 (MAP-2) and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) were detected, and the volume of holes in the injured area of the spinal cord was measured. Quantitative analysis of the GFAP, MAP-2 and ERK1/2 expression was performed using immunohistochemistry and an image analysis system. **Results** The volume of holes in the injured area of the spinal cord decreased with increasing stimulation intensity. In the reduced area of the holes, the expression of GFAP and ERK 1/2 could be seen, but not MAP-2. Significant differences were revealed in the expression of GFAP and ERK 1/2 among the four groups, but it was always significantly higher in the magnetic stimulation groups than in the controls. **Conclusions** After magnetic stimulation, astrocytes migrate into the injured spinal cord's holes. Astrocyte migration increases with increased magnetic stimulation intensity, which may be associated with high expression of ERK 1/2.

【Key words】 Magnetic stimulation; Astrocytes; Migration

上世纪90年代后,磁刺激技术在中枢神经系统疾病诊治中的应用越来越受到人们的关注^[1],尤其在神经再生方面的研究,正成为近年来研究的热点。磁刺

激通过调节神经损伤后的离子平衡、神经营养因子、c-fos基因、胶质细胞及细胞凋亡等来改善神经再生的微环境。脊髓损伤后损伤区脊髓组织含水量增多,钙离子水平升高,镁离子水平下降,而应用磁刺激可减少脊髓损伤后的离子失衡,从而对继发性脊髓损伤具有保护作用^[2-4]。

神经损伤后,星形胶质细胞迁移形成胶质瘢痕^[5],成为主要的抑制性因素^[6],构成了神经再生的

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.04.003

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30801220)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科

通信作者:黄晓琳,Email:xiaolinhuang2006@163.com

机械屏障^[7,8]。因此,有人评估了磁刺激对星形胶质细胞的生理作用认为,磁刺激可能会影响胶质瘢痕的形成提示,但作用很不明确。这是因为很多因素(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。本研究选择特定的脊髓损伤模型,采用固定的频率和刺激总量,探讨不同的刺激强度对星形胶质细胞迁移的影响。

材料与方法

一、动物模型的建立与分组

SD 大鼠 24 只,雌、雄各半,体重为 220 ~ 300 g,由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供。随机分为 A 组(0 T)、B 组($1.9 \times 40\%$ T)、C 组($1.9 \times 80\%$)、D 组($1.9 \times 100\%$ T),每组 6 只。4 组均造模:在脊柱背侧 T_{10-11} 水平进行部分椎板切除,用一个外径为 20 μm 的玻璃微量吸管把 1% 溴己烷磷酸盐溶液 0.5 μl 注入左侧背索^[10]。

二、治疗方法

磁刺激器为丹麦 Dantec 公司生产,圆形刺激线圈直径为 9 cm,脉冲磁场峰值强度为 1.9 T。D 组用 100% 最大输出(1.9 T),C 组用 80% 最大输出(1.52 T),B 组用 40% 最大输出(0.76 T),于脊髓损伤后 24 h 开始给予磁刺激,将线圈水平置于大鼠脊柱上方,线圈边缘对准 T_{10} 节段、距背部皮肤 1 cm 的位置,刺激频率为 1 Hz,每天 1 次,每次 30 个脉冲,连续 14 d。A 组置相同环境下,未予磁刺激。

三、取材及切片

各组分别于术后第 14 天取材。用 100 g/L (10%) 水合氯醛腹腔注射麻醉(350 mg/kg 体重)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 100 ml 心脏灌注固定 30 min,而后自背部打开椎管,暴露脊髓,取损伤段脊髓约 3 mm 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 μm 厚度连续切片备用。

四、检测指标

苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色:病理组织学检查用 HE 染色。

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时,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^[11]。

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,兔抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体稀释度为 1:200,小鼠抗微管相关蛋白-2(microtubule associated protein-2, MAP-2)、兔抗大鼠磷酸化细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, 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 13'3-二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色(购自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。

五、结果判定

采用计算机图像分析系统测量各组脊髓损伤处 GFAP、MAP2、ERK1/2 的表达。方法:物镜放大 10 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。

六、统计学分析

所有数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 12.0 版统计软件进行单因素方差分析,计算 F 值,若 F 值 $> F_{0.05}$,则 $P < 0.05$,再用 LSD 法进行各组间的两两比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

每份样本均获得含病灶组织的等距连续切片 40 ~ 50 张,低倍(40 倍)下可见,随着刺激强度的增加,A、B、C、D 各组病灶的体积分别为($204\ 001\ 597.0 \pm 3123.0$) μm^3 、($105\ 274\ 400.0 \pm 2987.2$) μm^3 、($51\ 345\ 840.0 \pm 2996.3$) μm^3 、($17\ 425\ 680.0 \pm 3047.5$) μm^3 ,逐渐缩小(图 1),B、C、D 各组与 A 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。100 倍下见:随着刺激强度的增加,GFAP 和 ERK1/2 的细胞数目和阳性信号密度值均逐渐增加,与 A 组(对照组)比较, $P < 0.05$,且 C、D 组分别与前一组比较, $P < 0.05$;而 MAP-2 的细胞数目和阳性信号密度值无明显变化($P > 0.05$),且 C、D 组分别与前一组比较, $P > 0.05$ (表 1)。

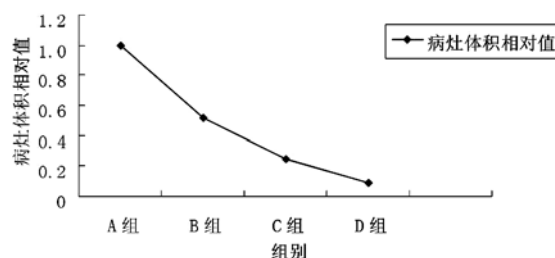


图 1 各组病灶体积比较

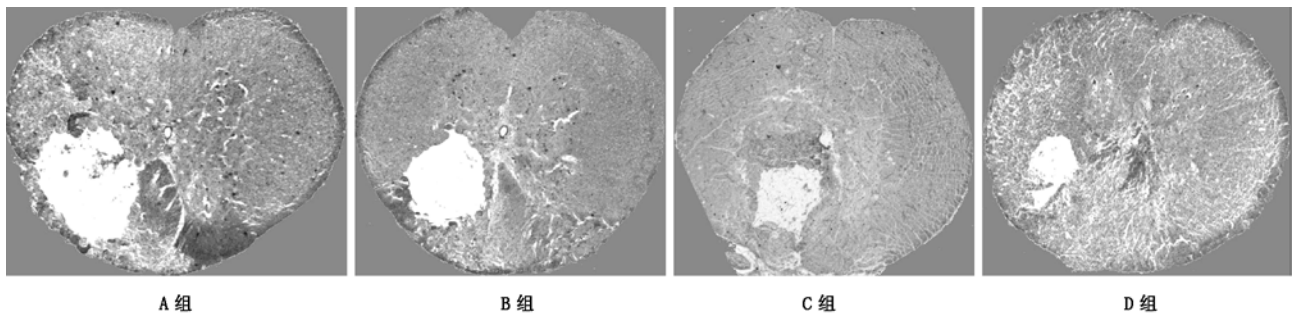


图 2 各组相同层面的横截面积(HE 染色, ×40)

表 1 各组 GFAP、MAP-2、ERK1/2 阳性细胞数目及阳性信号灰度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	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	
		细胞数目 (个/100 倍视野)	阳性信号 灰度值	细胞数目 (个/100 倍视野)	阳性信号 灰度值	细胞数目 (个/100 倍视野)	阳性信号 灰度值
A 组	6	37.9 ± 6.1	76.1 ± 4.9	42.3 ± 7.4	78.6 ± 5.8	28.3 ± 5.2	67.6 ± 4.7
B 组	6	73.3 ± 5.9 ^a	99.3 ± 7.2 ^a	37.5 ± 6.7 ^b	72.6 ± 7.8 ^b	47.3 ± 4.9 ^{ac}	80.1 ± 6.3 ^{ac}
C 组	6	97.6 ± 5.7 ^{ac}	126.6 ± 6.9 ^{ac}	32.3 ± 7.1 ^{bd}	70.4 ± 6.9 ^{bd}	55.7 ± 5.7 ^{ac}	101.3 ± 5.7 ^{ac}
D 组	6	147.2 ± 6.2 ^{ac}	167.5 ± 7.1 ^{ac}	31.2 ± 6.5 ^{bd}	67.2 ± 6.7 ^{bd}	64.3 ± 6.2 ^{ac}	149.5 ± 5.9 ^{ac}

注:与 A 组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P > 0.05$;与前一组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P > 0.05$

讨 论

GFAP 是一种分子质量为 55 k μ 的微丝蛋白,星形胶质细胞的标志蛋白,主要用于标记损伤后胶质反应。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^[12]。星形胶质细胞反应性胶质化有两重性,即幼稚期的诱导作用和成熟期的抑制作用。当神经纤维再生时 AS 处于幼稚期合成活跃,构成网状框架,并支持诱导神经纤维再生^[13];当神经纤维再生不良时 AS 的胶质化幼稚期过渡到成熟期,AS 转为结构性胶质细胞,对神经再生起到机械阻挡作用。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的迁移进入损伤区域而不是增殖^[14-15]。

MAP-2 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。MAP-2 是一种重要的细胞骨架蛋白,主要包括高分子质量的 MAP-1、MAP-2 以及低分子质量的 tau (τ)^[16] 蛋白群。MAP-2 主要在中枢神经系统的神经元高表达,除此之外,MAP-2 在背根神经节、激活的胶质细胞和少突胶质细胞也有少量表达。位于神经系统中的 MAPs 主要有两方面的作用:一是与微管相互作用,促进微管的组装并增加微管的稳定性;二是与轴突运输有关。研究发现,MAP-2 活性下降可造成微管变性堆积,影响细胞骨架的完整;并可使线粒体的轴突转运发生障碍,最终导致神经元死亡。另外,MAP-2 可被 Ca^{2+} 介导的钙激活蛋白酶 calpain 水解^[17],从而引起细胞骨架的破坏。

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^[18]。

本研究选择了溴已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^[19-21],因为溴已锭为剧毒性物质,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。随着刺激强度的增加,局灶性脊髓损伤病灶体积逐渐减少;病灶边缘,GFAP、ERK1/2 呈阳性表达,两者的变化趋势一致;而 MAP-2 呈阴性表达。说明磁刺激促进星形胶质细胞而非神经元的迁移,并随着刺激强度的增强,促进星形胶质细胞迁移的能力也越强,这一作用可能和 ERK1/2 通路的调节有关。

Fang 等^[10] 的研究显示,少突胶质细胞介导的溴已锭诱导的脱髓鞘后的髓鞘再生要求有星形胶质细胞的存在,脱髓鞘区域的快速定殖可能有助于提高髓鞘再生。按照这个思路,通过磁刺激提高白质星形胶质细胞的迁移能力可能有助于快速修复中枢神经损伤后的胶质界膜,尽可能减少脊髓损伤后空洞的形成。但是,星形胶质细胞迁移到什么程度有助于髓鞘再生,什么程度导致胶质瘢痕的形成,阻碍神经再生,有待进一步探讨。

总之,本研究发现,磁刺激可影响星形胶质细胞的迁移,且随着刺激强度的增强,星形胶质细胞迁移的能力亦增强。但是,磁刺激的作用与许多因素有关系,主要包括强度、频率、刺激的总量等,本研究仅探讨不同的刺激强度对星形胶质细胞迁移的影响,关于其频率和刺激的总量的量效关系有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 刘洪广, 周琳, 顾靖, 等. 中枢神经的无创性磁刺激技术及其应用. 生物医学工程学杂志, 2001, 18: 169-172.
- [2] 许涛, 郭风劲, 郭铁成, 等. 磁刺激对大鼠离体神经干细胞生长和分化的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27: 129-132.
- [3] 许涛, 郭风劲, 郭铁成, 等. 磁刺激对损伤大鼠脊髓组织巢蛋白表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27: 720-723.
- [4] Chan P, Eng LF, Lee YL, et al. Effects of pulsed magnetic stimulation on GFAP levels in cultured astrocytes. J Neurosci Res, 1999, 55: 238-244.
- [5] Seiji Okada, Masaya Nakamura, Hiroyuki Katoh, et al. Conditional ablation of Stat3 or Soc3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. Nat Med, 2006, 12: 829-834.
- [6] Glenn Yiu, Zhigang He. Glial inhibition of CNS axon regeneration. Neuroscience, 2006, 7: 617-627.
- [7] Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. Glia, 2005, 50: 427-434.
- [8] Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. Neuroscience, 2004, 5: 146-156.
- [9] 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. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27: 712-716.
- [10] Fang Z, Duthoit N, Wicher G, et al. Intracellular calcium-binding protein S100A4 influences injury-induced migration of white matter astrocytes. Acta Neuropathol, 2006, 111: 214.
- [11] 李幼忱, 李志成, 刘杰, 等. 大鼠皮肤创伤愈合疤痕的三维重建和体积定量. 中国体视学与图像分析, 2007, 12: 2.
- [12] Malhotra SK, Shnitka TK, Elabrink J. Reactive astrocytes: a review. Cyto-bios, 1990, 61: 133-160.
- [13] Hinkle D, Baldwin S, Schef S, et al. GFAP and S100 gene expression in the codex and hippocampus in response to mild comical contusion. J Neurotrauma, 1997, 14: 729-738.
- [14] Lim JH, Gibbons HM, O'Carroll SJ, et al. Extracellular signal-regulated kinase involvement in human astrocyte migration. Brain Res, 2007, 1164: 1-13.
- [15] Kurtis I, Songwan Jin, Kazunori Uchida, et al. Greatly impaired migration of implanted aquaporin-4-deficient astroglial cells in mouse brain toward a site of injury. FASEB J, 2007, 21: 108-116.
- [16] Ma D, Chow S, Obrocka M, et al. Induction of microtubule associated protein 1B expression in Schwann cells during nerve regeneration. Brain Res, 1999, 823: 141-153.
- [17] Blomgren K, McRae A, Elmered A, et al. The calpain proteolytic system in neonatal hypoxic-ischemia. Ann N Y Acad Sci, 1997, 825: 104-119.
- [18] Talmor D, Applebaum A, Rudich A, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases in human heart during cardiopulmonary bypass. Circ Res, 2000, 86: 1004-1007.
- [19] Blakemore WF. Ethidium bromide induced demyelination in the spinal cord of the cat. Neuropathol Appl Neurobiol, 1982, 8: 365-375.
- [20] 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 Clin Invest, 1996: 162-171.
- [21] Fushimi S, Shirabe T. The reaction of glial progenitor cells in remyelination following ethidium bromide-induced demyelination in the mouse spinal cord. Neuropathology, 2002, 22: 233-242.

(修回日期: 2009-11-03)

(本文编辑: 松 明)

· 消息 ·

2010 年康复医学新技术与新进展国际研讨班招生通知

首都医科大学宣武医院、中国医师协会康复医师分会、北京康复医学会将于 2010 年 5 月在北京举办“2010 年康复医学新技术与新进展国际研讨班”, 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前来授课。培训结束时, 将授予国家级继续教育 I 类学分及培训合格证书。

主要授课内容: (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: 腰背痛的康复、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。

报到及培训时间: 2010 年 5 月 20 日报到, 5 月 21 至 23 日培训。

报到地点: 北京市宣武区长椿街 45 号大府宾馆。

收费标准: 培训费 1000 元(包括学费和资料费), 食宿及差旅费自理。

联系电话: 010-83198326, 手机: 13641026802; 传真: 010-83156838; 电子邮箱: kfysfh@yahoo.cn; 联系人: 北京市宣武区长椿街 45 号宣武医院康复医学科 张艳明; 邮编: 100053。

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