

大鼠脊髓损伤后骨形态发生蛋白 2 表达变化的规律及意义

马敏杰, 贺西京, 王国毓, 臧全金, 李锋涛, 刘 宇

(西安交通大学医学院第二附属医院骨二科 710004 西安市)

【摘要】目的:观察大鼠脊髓损伤后损伤脊髓组织中骨形态发生蛋白 2(BMP2)表达变化的时间及空间分布规律,探讨抑制 BMP2 增加的最佳时间及部位。**方法:**成年 SD 大鼠 40 只,随机分为 5 组:假手术组,损伤后 1d 组、3d 组、7d 组、14d 组,每组 8 只。将大鼠麻醉后以 T10 棘突为中心,打开椎板,暴露脊髓,各损伤组使用 NYU impactor 打击器制作大鼠脊髓损伤模型,假手术组不做打击处理。分别于造模前后对各组大鼠进行运动功能 BBB 评分,于预定时间点处死动物,取损伤段(假手术组取相应节段)脊髓组织行 HE 染色和免疫组化染色,观察脊髓组织学改变并进行阳性细胞计数,采用方差分析进行组间比较。**结果:**造模前各组大鼠的 BBB 评分均为 21 分;造模后假手术组大鼠 BBB 评分高于各损伤组,且差异有显著性($P<0.01$),各损伤组之间两两比较评分均无显著性差异($P>0.05$)。HE 染色假手术组大鼠脊髓组织结构清晰,层次规整,条理性强,灰质中可见较多的神经元,白质中可见大量纤维性星形胶质细胞;损伤组大鼠损伤处脊髓组织结构紊乱,层次感消失,可见弥散的血细胞,早期增多较晚期明显,脊髓灰质与白质中都可因大量组织细胞溶解而遗留的组织空洞。各组脊髓灰、白质中均有 BMP2 表达,假手术组灰质中平均阳性细胞数为 1.53 ± 0.38 个/HP,白质中为 0.77 ± 0.14 个/HP;损伤后 1d 组灰质中为 13.70 ± 4.81 个/HP,白质中为 7.23 ± 3.14 个/HP;损伤后 3d 组灰质中为 9.37 ± 3.61 个/HP,白质中为 5.63 ± 2.23 个/HP;损伤后 7d 组灰质中为 6.17 ± 1.81 个/HP,白质中为 4.17 ± 1.24 个/HP;损伤后 14d 组灰质中为 4.36 ± 1.60 个/HP,白质中为 1.87 ± 1.13 个/HP;损伤各组 BMP2 平均阳性细胞数与假手术组相比均均有明显差异($P<0.01$),各组灰质区 BMP2 平均阳性细胞数的增加均较白质区更为显著($P<0.01$)。**结论:**脊髓损伤后损伤脊髓组织中 BMP2 的表达增加,损伤后 1d 最高,主要集中在损伤区灰质区。针对 BMP2 进行特异性抑制最好在损伤后第一天的脊髓灰质区实施。

【关键词】脊髓损伤;骨形态发生蛋白 2;大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.04.15

中图分类号:R683.2,Q507 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2011)-04-0329-05

Dynamic expression of bone morphogenetic protein 2 and its clinical significance after spinal cord injury in rat/MA Minjie, HE Xijing, WANG Guoyu, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2011, 21(4): 329~333

【Abstract】 Objective:To observe the dynamic expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) after spinal cord injury in rat, especially the changes on different time point and in different site, and to investigate the optimal time point and site for inhibiting BMP2 expression. **Method:**A total of 40 Sprague Dawley rats were randomly assigned into 5 groups: 1-day-after-impact group, 3-day-after-impact group, 7-day-after-impact group, 14-day-after-impact group and sham operation group with 8 rats in each group. After making skin incision centered as T10, the whole T10 and T9 and T11 partial laminar were removed to expose the spinal cord. Spinal cord injury models were created by NYU impactor. After that, behavior testing of all rats was assessed by using the Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) locomotor rating scale before and after the perfusion. Each group of rats were perfused with 4% paraformaldehyde in heart on the 1st, 3th, 7th, 14th day-after-impact, and then HE staining was used to observe the difference between the sham operation group and test

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:30973023)

第一作者简介:男(1983-),在读硕士,研究方向:脊柱脊髓损伤

电话:(029)87678005 E-mail:mmj0351@yahoo.com.cn

通讯作者:贺西京 E-mail:xijing_h@tom.com

groups. Meanwhile, immunohistochemistry was used to evaluate the level of BMP2 in the injured region. **Result:** BBB score showed no significant difference among the spinal cord injury groups at the same time point ($P > 0.05$). By HE staining, the tissue structure of sham operation group showed clear and orderly, on the contrary, it was disorderly in rest groups. According to the result of immunohistochemistry, significant difference was detected between the model group and sham operation group ($P < 0.05$). Compared with the sham operation group, the mean number of BMP2 positive cells in 1-day-after-impact group was 13.70 ± 4.81 and 7.23 ± 3.14 for the gray and white matter respectively, 9.37 ± 3.61 and 5.63 ± 2.23 in 3-day-after-impact group, 6.17 ± 1.81 and 4.17 ± 1.24 in 7-day-after-impact group, and 4.36 ± 1.60 and 1.87 ± 1.13 in 14-day-after-impact group. The BMP2-positive cells in gray matter increased more significantly than white matter ($P < 0.01$). **Conclusion:** The number of BMP2-positive cells increase after SCI, and reach peak at 14d, the specific inhibition of BMP2 should be performed in gray matter at 1d after SCI.

[Key words] Spinal cord injury; Bone morphogenetic protein 2; Rat

[Author's address] Second Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710004, China

脊髓损伤的修复是当今医学难题。在诸多影响因素中,胶质瘢痕的形成是阻碍神经再生的重要原因之一^[1]。最近的研究发现,属于转化生长因子 β (TGF- β)超家族蛋白的骨形态发生蛋白(BMP)在神经系统发育中有重要且复杂的作用,特别是BMP家族中的BMP2,可通过广泛表达于神经干细胞(NSCs)胞膜上及胞浆中的BMP受体实现对神经发育后期NSCs分化的多元性调控,从而导致内源性残留的NSCs向星形胶质细胞(Ast)方向分化,进而形成胶质瘢痕,抑制神经再生^[2]。另有研究发现针对BMP2的特异性抑制因子可以拮抗其在神经再生中的负面作用^[3]。在中枢神经修复和再生过程中,针对BMP2进行特异性抑制治疗是促进神经再生的方法之一。本研究旨在观察BMP2在脊髓损伤后的局部表达变化规律,探讨针对BMP2的最佳抑制治疗时间及最佳干扰部位。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂

选取3月龄成年健康SD大鼠40只,雌雄各半,体重200~250g。所选大鼠系国家一级实验动物(西安交通大学医学院实验动物中心)。兔抗大鼠BMP2(美国CHEMICON公司),羊抗兔二抗免疫组化试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司);德国Leica显微镜及Q550CW图像信号采集与分析系统。

1.2 动物分组及脊髓损伤模型的建立

40只大鼠随机分为假手术组(A组),损伤后1d组(B组)、3d组(C组)、7d组(D组)、14d组(E

组),每组8只。B~E组均采用Allen经典打击法建立T10脊髓打击损伤模型^[4],打击能量为10g $\times$ 10cm。术中严格遵守无菌原则,模型制作完毕后单笼单只喂养,每天人工按摩膀胱2次促进排尿,勤换刨花垫料,保持环境干燥。A组仅切开T10全椎板及T9、T11的部分椎板,对脊髓不作打击处理。

1.3 运动功能BBB评分

分别于造模前及造模后进行BBB评分^[5]。评分之前先排空动物膀胱,然后将所有大鼠逐一置于200cm $\times$ 200cm场地上,由2位不知分组情况且熟悉BBB评分标准的观察者分别从相反的方向对每只大鼠仔细观察4min。2位观察者评分的平均值即为该大鼠运动功能BBB评分值。

1.4 标本取材及组织学检查

各组大鼠分别在预定时间点行麻醉后经左心室依次用肝素生理盐水500ml和4%多聚甲醛400ml灌注,取出脊髓,以打击损伤处为中点(假手术取相应节段)取1cm长脊髓,置4 $^{\circ}$ C下4%多聚甲醛中固定6h后移入80%酒精中过夜。经梯度酒精逐级脱水后用石蜡包埋脊髓组织,沿脊髓横切面进行切片,片厚5 μ m。每只大鼠选取10张损伤区组织切片进行染色,其中5张切片行HE染色观察组织结构,另5张切片行BMP2染色:即与兔抗大鼠BMP2抗体于4 $^{\circ}$ C孵育过夜,二抗为通用型SP广谱免疫组化试剂盒,显色底物为DAB,常规脱水,透明封固。

1.5 统计学分析

应用Q550CW图像信号采集与分析系统进行高倍镜下采集与计数,细胞浆及胞膜着棕褐色

为 BMP2 阳性细胞。先在低倍镜下确定脊髓灰质区和白质区,然后在相应区域调整为高倍镜取图。每张切片在高倍视野下分别随机取上、下、左、右及中心共 5 个视野进行阳性细胞计数。以 5 个视野阳性细胞的均数作为该切片的阳性细胞数,以每只大鼠的 5 张切片的阳性细胞数的均数代表该大鼠的阳性细胞数。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析比较组间差异。所有数据采用 SPSS 13.0 软件进行分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 运动功能 BBB 评分结果

40 只大鼠全部进入结果分析,无脱失者。A 组的大鼠运动功能 BBB 评分均为 21 分。B~E 组大鼠造模后相同时间点运动功能 BBB 评分无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.2 HE 染色结果

光镜下 A 组脊髓组织结构清晰,层次规整,条理性强,灰质中可见较多的神经元,大部分胞体呈多极形态,轮廓清晰,结构完整,胞核大多位于细胞中央,核仁清晰可见;白质中可见大量的蜘蛛样细胞,即纤维性星形胶质细胞,有直而细长的突起,且分支较少,胞质内含有较多的胶质纤维原(图 1a)。B~E 组脊髓组织结构严重紊乱,层次不

清,有大量血细胞弥散,尤以 B 组明显,灰质中与白质中都可见大量神经细胞形态不完整,并出现大量碎裂的细胞。随着损伤后时间延长,灰质中与白质中都可见因大量组织细胞溶解而遗留的空洞(图 1b~1e)。

2.3 免疫组化染色结果

各组大鼠脊髓组织中 BMP2 表达情况见图 2 和表 1。A 组大鼠脊髓组织灰、白质中均有 BMP2 细胞散在分布;B~E 组大鼠脊髓灰、白质中 BMP2 阳性细胞数明显增加,且以 B 组增高最为显著,此后逐渐降低,但在观察期内均高于 A 组 ($P < 0.05$);各组脊髓损伤组织灰质区中 BMP2 阳性细胞数均高于相应时间点白质区的阳性细胞数 ($P < 0.05$)。

3 讨论

Nakashima 等^[6]的研究证明,BMP2 在中枢神经损伤后修复的过程中具有抑制神经再生的作用,其机制主要为:局部上调的 BMP2 可通过 BMP 信号传导通路诱导大量内源性 NSCs 向 Ast 分化,而 Ast 的大量增加正是胶质瘢痕形成的主要诱导因素之一。当胶质瘢痕形成以后,一方面对神经再生起着直接的阻碍作用,使再生的轴突无法通过损伤区建立桥接;另一方面,胶质瘢痕还产生一些抑制因子如硫酸软骨素蛋白聚糖(CSPG),

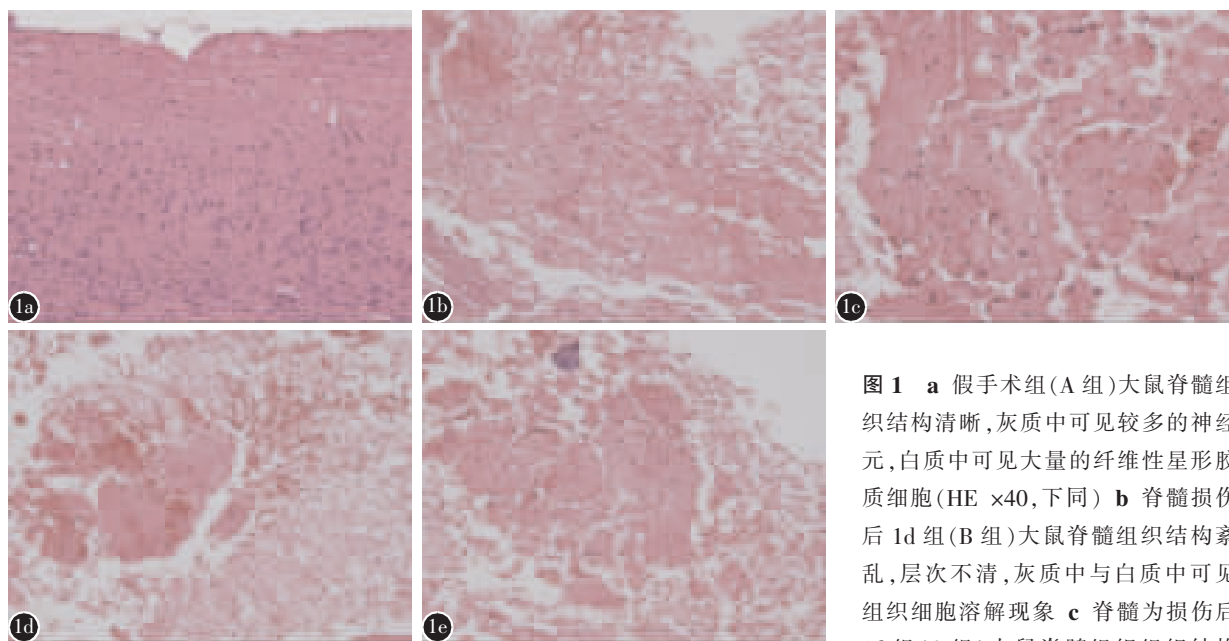


图 1 a 假手术组(A 组)大鼠脊髓组织结构清晰,灰质中可见较多的神经元,白质中可见大量的纤维性星形胶质细胞(HE $\times 40$,下同) b 脊髓损伤后 1d 组(B 组)大鼠脊髓组织结构紊乱,层次不清,灰质中与白质中可见组织细胞溶解现象 c 脊髓为损伤后 3d 组(C 组)大鼠脊髓组织结构

紊乱,层次不清,灰质中与白质中可见大量组织细胞溶解缺损 d 损伤后 7d 组(D 组)大鼠脊髓组织结构严重紊乱,层次不清,灰质中与白质中可见因大量组织细胞溶解而遗留的空洞 e 损伤后 14d 组(E 组)大鼠脊髓组织结构严重紊乱,层次不清,灰质中与白质中可见因大量组织细胞溶解而遗留的空洞

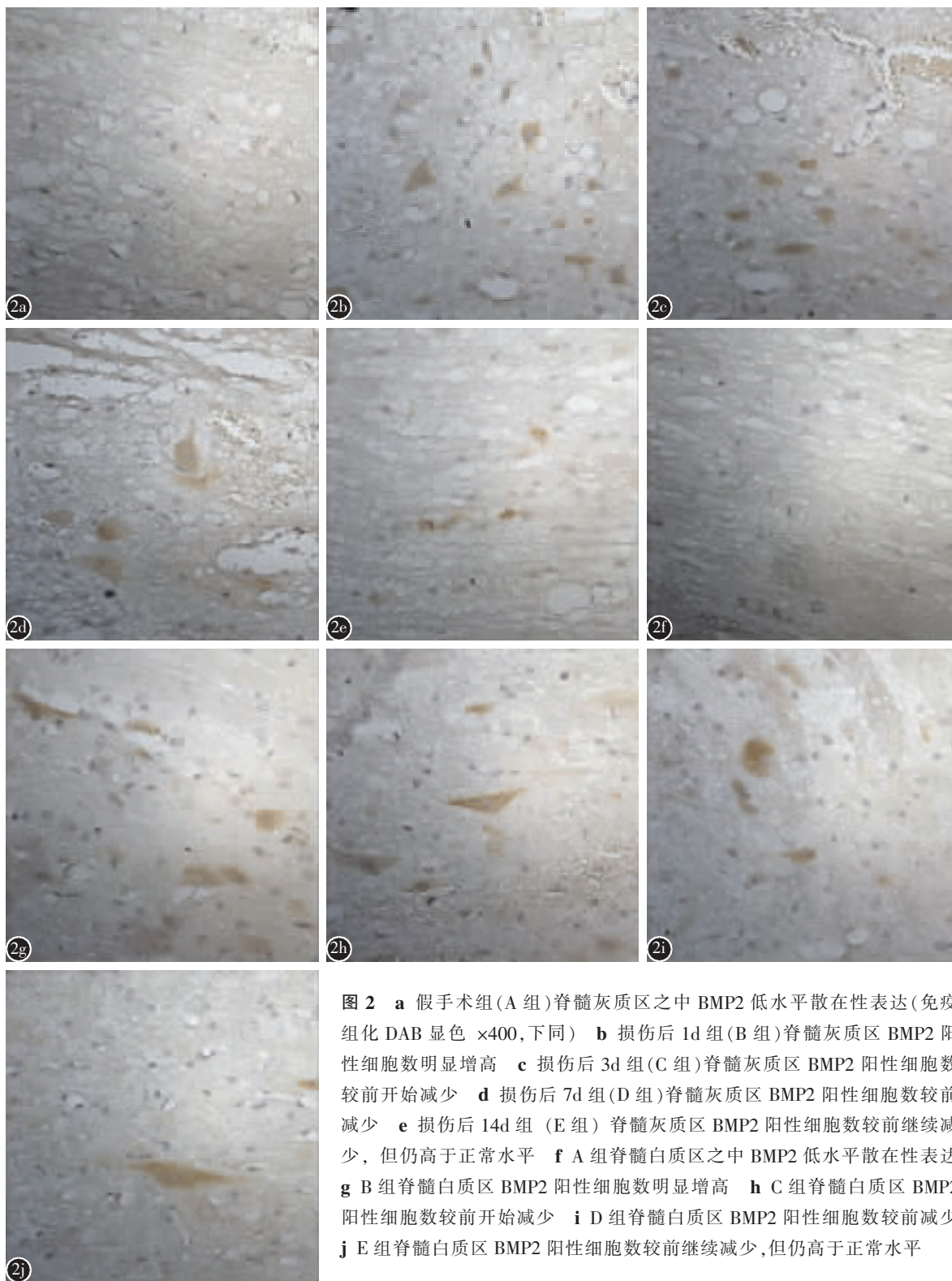


图 2 a 假手术组(A 组)脊髓灰质区之中 BMP2 低水平散在性表达(免疫组化 DAB 显色 $\times 400$,下同) b 损伤后 1d 组(B 组)脊髓灰质区 BMP2 阳性细胞数明显增高 c 损伤后 3d 组(C 组)脊髓灰质区 BMP2 阳性细胞数较前开始减少 d 损伤后 7d 组(D 组)脊髓灰质区 BMP2 阳性细胞数较前减少 e 损伤后 14d 组(E 组)脊髓灰质区 BMP2 阳性细胞数较前继续减少,但仍高于正常水平 f A 组脊髓白质区之中 BMP2 低水平散在性表达 g B 组脊髓白质区 BMP2 阳性细胞数明显增高 h C 组脊髓白质区 BMP2 阳性细胞数较前开始减少 i D 组脊髓白质区 BMP2 阳性细胞数较前减少 j E 组脊髓白质区 BMP2 阳性细胞数较前继续减少,但仍高于正常水平

表 1 假手术组与损伤各组脊髓组织中不同区域 BMP2 阳性细胞数 ($n=8, \bar{x} \pm s$, 个/HP)

	假手术组(A 组)	损伤后 1d 组(B 组)	损伤后 3d 组(C 组)	损伤后 7d 组(D 组)	损伤后 14d 组(E 组)
灰质区	1.53 ± 0.38	13.70 ± 4.81^{①}	9.37 ± 3.61^{①②}	6.17 ± 1.81^{①②}	4.36 ± 1.60^{①②}
白质区	0.77 ± 0.14	7.23 ± 3.14^{①②③}	5.63 ± 2.23^{①②③}	4.17 ± 1.24^{①③②}	1.87 ± 1.13^{①②③}

注:①与假手术组相同区比较 $P < 0.05$;②与相同区前一时间点比较 $P < 0.05$;③与同时时间灰质区比较 $P < 0.05$

抑制轴突的外向性生长^[7]。抑制胶质瘢痕形成是促进神经再生的关键。针对 BMP2 的抑制性治疗可以达到减少胶质瘢痕形成的目的。探究 BMP2 在脊髓损伤后表达变化的空间和时间规律就成为首先需要解决的问题。

Setoguchi 等^[8]的研究证实,正常情况下成年哺乳动物中枢神经系统里的 BMP2 呈散在性低水平表达,但其表达在脊髓损伤后明显上调。本研究中免疫组化染色结果显示,假手术组大鼠脊髓组织内均有 BMP2 低水平散在性表达;脊髓损伤各组脊髓组织中 BMP2 阳性细胞数均明显增高,且以损伤后 1d 组增高最为显著,此后虽然逐渐降低,但在观察期内(14d)仍高于假手术组。进一步证实了 Setoguchi 等的研究结果,而且从形态学上证实了脊髓中 BMP2 表达增加出现峰值的时间是损伤后的第一天。

脊髓损伤会引起机体产生内源性应激活动。有研究发现^[9],当脊髓损伤后,脊髓中央管附近存在的 NSCs 可发生反应性增生,并参与神经修复;而脊髓灰质中处于静止期的 NSCs 也会因损伤而活化并参与神经修复,因此,损伤后局部会出现大量的 NSCs。Xiao 等^[9]的研究证实,在损伤后第一天的脊髓灰质中,BMP2 的上调主要出现于 NSCs 之中。由于本研究条件与其高度相似,我们推测 BMP2 阳性细胞数增加的实质可能是 NSCs 的大量增生和活化。据此我们可以推断脊髓损伤后 NSCs 的应激性活化是 BMP2 表达上调的根本原因。另外,本研究还发现 BMP2 阳性细胞数在脊髓灰质和白质中的变化具有空间分布上的差异,即脊髓损伤后各组灰质区中的 BMP2 阳性细胞数均高于相应时间点白质区的阳性细胞数。可见脊髓损伤后 BMP2 的表达主要集中在损伤区灰质的 NSCs 之中。

有研究发现^[1,2,7],大幅上调的 BMP2 可通过调控 BMP 信号通路诱导内源性 NSCs 分化为 Ast,而 Ast 促进了胶质瘢痕形成,进而抑制神经再生。有研究证实,特异性抑制因子 Noggin 可以竞争性地与 BMP I、II 受体结合从而抑制 BMP 传导通路、阻断 BMP2 诱导内源性 NSCs 分化为 Ast 的作用,进而减少胶质瘢痕的形成^[10]。Noggin 等 BMP2

特异性抑制因子的使用有助于神经的再生。但其应用的最佳时间及部位尚不清楚。本研究发现,在损伤后的第一天、脊髓灰质区中 BMP2 表达增加最为显著,因此,在损伤后第一天的脊髓灰质区中尽早使用 Noggin 等 BMP2 特异性抑制因子可使其神经保护作用得到最大程度的发挥。

4 参考文献

1. Okano H, Kaneko S, Okada S, et al. Regeneration-based therapies for spinal cord injuries[J]. *Neurochem Int*, 2007, 51(2-4): 68-73.
2. Parr AM, Kulbatski I, Tator CH. Transplantation of adult rat spinal cord stem/progenitor cells for spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2007, 24(5): 835-845.
3. Matsuura I, Taniguchi J, Hata K, et al. BMP inhibition enhances axonal growth and functional recovery after spinal cord injury[J]. *J Neurochem*, 2008, 105(4): 1471-1479.
4. Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation: preliminary report[J]. *JAMA*, 1911, 57: 878-880.
5. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection[J]. *Exp Neurol*, 1996, 139(2): 244-256.
6. Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, et al. BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(10): 5868-5873.
7. Fuller ML, DeChant AK, Rothstein B, et al. Bone morphogenetic proteins promote gliosis in demyelinating spinal cord lesions[J]. *Ann Neurol*, 2007, 62(3): 288-299.
8. Setoguchi T, Nakashima K, Takizawa T, et al. Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor[J]. *Exp Neurol*, 2004, 189(1): 33-44.
9. Xiao Q, Du Y, Wu WT, et al. Bone morphogenetic proteins mediate cellular response and, together with Noggin, regulate astrocyte differentiation after spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2010, 221(2): 353-366.
10. Hampton DW, Asher RA, Kondo T, et al. A potential role for bone morphogenetic protein signalling in glial cell fate determination following adult central nervous system injury in vivo[J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 26(11): 3024-3035.

(收稿日期: 2010-09-13 修回日期: 2010-12-09)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)