论著

文章编号:1000-5404(2006)17-1768-04

二甲胺四环素对大鼠脊髓损伤后 caspase-3、p53 表达的影响

陈 钢[1],梁 群[2],陈安民[1],郭凤劲[1],徐卫国[1] ([1]华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科,武汉 430030;[2]深圳市第二人民医院创伤外科,深圳 518039)

提 要:目的 探讨大鼠脊髓损伤后应用二甲胺四环素(minocycline)对 caspase-3、p53 表达及细胞凋亡的影响。**方法** 成年大鼠随机分为脊髓损伤后应用二甲胺四环素的治疗组(A 组)和应用生理盐水对照组(B 组),损伤后不同时间点(4 h、8 h、1 d、3 d、7 d、14 d、21 d)取材,用 HE 染色观察损伤脊髓组织病理变化,免疫组化染色检测 caspase-3、p53 表达阳性细胞,原位末端标记法(TUNEL 法)标记凋亡细胞,及荧光酶联测定法测定 caspase-3 的活性。**结果** HE 染色镜检发现脊髓组织病理学改变 A 组明显轻于 B 组。A、B 两组均发现凋亡细胞及 caspase-3、p53 表达,神经细胞凋亡指数及 caspase-3、p53 表达均为 B 组 > A 组($P < 0.05$)。**结论** 二甲胺四环素能抑制大鼠脊髓损伤后 caspase-3、p53 表达及细胞凋亡。

关键词:脊髓损伤;细胞凋亡;caspase-3;p53;二甲胺四环素

中图法分类号:R361.2;R651.2;R978.14 **文献标识码**:A

Effect of minocycline on caspase-3, p53 and apoptosis after spinal cord injury in rats

CHEN Gang[1], LIANG Qun[2], CHEN An-min[1], GUO Feng-jin[1], XU Wei-guo[1] ([1]Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, [2]Department of Traumatic Surgery, The Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518039, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of minocycline on the expression of caspase-3, p53 and apoptosis after spinal cord injury (SCI) in rats. **Methods** One hour after spinal cord injury, adult male SD rats were divided randomly to receive 50 mg/kg minocycline intraperitoneally and 24 hour again, followed by 5-day 25 mg/kg minocycline (group A), or normal saline (group B), with 56 rats in each group. After operation, the rats were sacrificed at 4 h, 8 h, 1 d, 3 d, 7 d, 14 d and 21d ($n=4$ at each time point), and the injuried spinal tissue specimens were stained with hematoxylin and eosin (HE), immunohistochemistry and terminal deoxynucl-eotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method, and caspase-3 activity was examined. **Results** The histopathologic changes in spinal cord tissues in group B was worse than that in group A. The expression of caspase-3, p53 and apoptotic cells was observed in two groups, and the apoptotic index and the expression of caspase-3, p53 in group B were higher than that in group A ($P<0.05$). **Conclusion** Minocycline could inhibit the expression of caspase-3, p53 and apoptosis after SCI in rats.

Key words: spinal cord injury; apoptosis; caspase-3; p53; minocycline

1996 年 Li 等[1]最先提出脊髓损伤后存在胶质细胞凋亡,并持续 3 周以上。近年的研究证实脊髓损伤(SCI)后,大量的神经细胞以凋亡方式死亡,细胞凋亡被认为是脊髓损伤继发改变的重要组成[2]。如何有效抑制这部分神经细胞的凋亡成为 SCI 治疗的一个重要方面。二甲胺四环素属第二代半合成的四环素类药物,不仅有强大的抗菌作用,并且有明显的抗炎效果。近年来有研究表明其通过抑制小胶质细胞的活性对脑组织缺血有明显的神经保护功能[3]。我们应用大鼠脊髓损伤模型,早期注射二甲胺四环素(minocycline),通过观察细胞凋亡的情况以及其对半胱-天冬氨酸蛋白酶 3(caspase-3)、p53 表达的影响,来探讨二甲胺四环素对神经的保护作用及其可能机制。

作者简介:陈 钢(1973-),男,江西省南昌市人,博士,医师,主要从事脊柱外科方面的研究,现在江西省人民医院骨科。电话:13016489661,E-mail: nccg73@sohu.com

收稿日期:2005-05-19;修回日期:2005-09-15

1　材料与方法

1.1　动物及试剂

成年雄性 SD 大鼠 112 只，体质量 300～350 g，由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。主要试剂为兔抗鼠 caspase-3 p20 亚单位一抗、兔抗鼠 p53 多克隆、SABC 试剂盒、TUENL 试剂盒、activity assay 检测试剂盒（均购自武汉博士德公司）和二甲胺四环素（minocycline，Sigma 公司）。

1.2　脊髓损伤模型

将 112 只大鼠编号随机分为二甲胺四环素治疗组（A 组）、生理盐水对照组（B 组）2 组（每组 56 只），均进行操作如下：10% 水合氯醛 0.4 ml/100 g 腹腔注射麻醉，然后将大鼠俯卧固定于手术台上，无菌条件下进行背中段正中切口，显露 T9～T10 棘突椎板，暴露脊髓硬膜，将 35 g 重物通过 2.2 mm×5 mm 弧形光滑金属垫片压迫于该段脊髓后正中部，时间为 4 min，造成大鼠脊髓中度损伤。A 组大鼠伤后 1 h 予腹腔内注射二甲胺四环素（50 mg/kg），24 h 后再次给予 50 mg/kg 剂量注射，然后再予 5 d 的 25 mg/kg 的剂量治疗。B 组予生理盐水注射，给药方法同 A 组。

1.3　取材、切片

于术后 4、8 h 和 1、3、7、14、21 d 各个时相点将对照组和治疗组各取大鼠 4 只，麻醉下剖胸，心脏插管，先灌注生理盐水约 200 ml 冲洗（至流出液澄清），再用 4% 多聚甲醛约 200 ml 灌流固定，解剖椎管取出损伤段脊髓，再置于 4% 多聚甲醛液内进行后固定。将损伤段及损伤上下段各约 0.5 cm 常规石蜡包埋，5 μm 连续切片。所有部位切片均进行 HE 染色，观察病理改变。另外在 7 个时相点将对照组及治疗组大鼠各 4 只致死后取 T9～T10 脊髓节段，机械破碎，加入 1 ml D-Hanks 液，振荡器混匀，过 35 μm 尼龙网，用 D-Hanks 液调整细胞量至 2×10^6 个/L。

1.4　免疫组化法检测 caspase-3 和 p53 蛋白的表达

参照 SABC 试剂盒说明进行操作，用免疫组化染色检测 caspase-3、p53 阳性细胞，caspase-3 阳性细胞细胞质棕黄色染色，p53 阳性细胞细胞核着色为主，计数高倍视野内染色阳性细胞，计算阳性率。

1.5　荧光酶联测定法测定的 caspase-3 活性

将制备的细胞悬液采用 Roche 公司 activity assay 检测试剂盒，荧光酶标仪检测，激发波长为 430 nm，发射波长为 535 nm。

1.6　TUNEL 法标记

按原位凋亡检测试剂盒（TUNEL 法，武汉博士德）使用说明对脊髓组织切片进行染色，阳性细胞核呈棕黄色颗粒状。在高倍光镜下，计算凋亡指数（apoptotic index，AI），即每张片选取 5 个阳性细胞数最多的高倍视野，计算出平均阳性细胞百分数。

1.7　统计学处理

应用 SPSS 12.0 软件包进行统计，各组数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，caspase-3、p53 阳性细胞率及神经细胞凋亡指数在 A、B 两组间比较采用独立样本 t 检验及相关分析。

2　结果

2.1　组织学观察

光镜下见 A 组大鼠脊髓组织出血、坏死程度较轻，形成囊腔少，神经细胞肿胀不明显。B 组大鼠脊髓组织有较多片状出血及出血坏死后形成的囊腔，神经细胞肿胀较明显。

2.2　免疫组化检测

B 组大鼠脊髓损伤后 8 h caspase-3 表达呈增加趋势，损伤 1 d 后明显表达，7 d 达高峰，14 d 仍较明显，21 d 降低；A 组大鼠应用二甲胺四环素治疗，脊髓 caspase-3 表达较 B 组低，高峰发生在损伤后 3d，以后逐渐降低。A、B 两组间比较有显著性差异（$P<0.01$）。p53 表达的时间分布特点与 caspase-3 相似，7 d 达高峰，阳性细胞以白质中胶质细胞为主。caspase-3 表达与 p53 表达存在正相关（$r=0.953$，$P<0.01$）。见表 1、2。

2.3　caspase-3 活性检测

对照组伤后 8 h 组荧光值高于伤后 4 h 组，此后继续升高，14 d 后逐渐下降，治疗组 caspase-3 活性显著低于对照组（$P<0.05$），差异有显著性意义，见表 3。

2.4　TUNEL 法标记

B 组大鼠脊髓损伤后 4 h 及 8 h 在灰质及白质中见少量散在的标记阳性细胞，损伤 1 d 后凋亡指数渐增，7 d 达高峰，高峰时主要发生在白质中胶质细胞，以后呈下降趋势；A 组大鼠脊髓神经细胞凋亡指数较 B 组低，高峰发生在损伤后 3 d，以后逐渐降低。A、B 两组间比较差异性显著（$P<0.05$），见表 4。

表 1　大鼠脊髓损伤后不同时间点的 caspase-3 表达阳性细胞率（%，$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

组别	损伤后时间						
	4 h	8 h	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
A	9.65±3.82[a]	16.39±3.42[a]	22.32±4.13[a]	35.34±5.54[a]	30.24±6.67[a]	23.46±3.32[a]	11.37±2.48[a]
B	15.27±2.43	26.65±4.35	42.72±3.24	63.15±4.47	73.25±6.16	58.42±1.39	23.53±5.32

a：$P<0.01$，与 B 组比较

表 2　大鼠脊髓损伤后不同时间点的 p53 表达阳性细胞率（%，$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

组别	损伤后时间						
	4 h	8 h	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
A	9.14±7.37[a]	13.27±2.53[a]	28.63±8.37[a]	38.38±8.21[a]	31.25±2.17[a]	22.97±8.92[a]	8.82±6.32[a]
B	17.53±4.43	23.86±8.42	50.27±4.62	61.73±7.26	78.31±5.15	64.98±5.86	31.85±3.96

a：$P<0.01$，与 B 组比较

表3 大鼠脊髓损伤后不同时间点的 caspase-3 活性荧光值($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	损伤后时间						
	4 h	8 h	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
A	409 ± 28.87[b]	517 ± 25.14[a]	602 ± 54.37[a]	721 ± 67.21[a]	753 ± 36.17[a]	528 ± 39.92[a]	362 ± 52.41[b]
B	752 ± 23.25	1023 ± 47.61	1352 ± 98.16	2659 ± 127.26	2651 ± 189.53	1432 ± 117.43	701 ± 87.29

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$, 与 B 组比较

表4 大鼠脊髓损伤后不同时间点的凋亡细胞指数(%, $\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	损伤后时间						
	4 h	8 h	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
A	9.65 ± 3.82	18.39 ± 2.48	10.38 ± 4.27[b]	17.26 ± 2.14[a]	15.24 ± 4.67[b]	10.46 ± 1.25[a]	11.27 ± 4.38
B	11.23 ± 2.34	21.24 ± 3.35	19.26 ± 6.15	37.47 ± 1.37	40.25 ± 2.25	19.27 ± 2.19	15.26 ± 2.36

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$, 与 B 组比较

3 讨论

以往认为脊髓损伤继发性细胞死亡是由坏死引起,近年来许多实验研究证实,在神经系统损伤过程中,除坏死外,大量神经细胞以凋亡方式死亡。前者发生在脊髓损伤后急性期,以细胞肿胀破裂为主要形式;后者以核染色质固缩,DNA 断裂,电泳呈梯带分布为特征,是迟发性脊髓损伤后神经细胞死亡的重要方式[2]。神经系统损伤后神经细胞凋亡区域的总蛋白表达水平受到抑制,但却有多种蛋白和核转录因子特异性及延迟性表达。p53 是细胞凋亡通路上的关键分子之一。p53 可分为野生型和突变型,目前认为只有野生型 p53 才具诱导细胞凋亡的作用。p53 表达增加,直接引起细胞凋亡,也可以通过调节其他凋亡相关基因表达间接导致细胞凋亡。其机制可能为:① p53 是一种核内的磷酸蛋白,DNA 损伤阻止或打破了 p53 和 mdm2 蛋白的相互作用,p53 转录水平将升高,激活其下游的 WAF/GiP1 基因表达 p21,p21 能抑制细胞周期素依赖性激酶(cyclindependent kinase, CDK)的活性,使细胞停滞在 $G_1 \sim S$ 期之间,如果 DNA 损伤未能及时修复,细胞发生凋亡;② p53 基因降低内源性 bcl-2 的表达和抑制其功能;③ p53 可作为 bax 基因转录直接激动剂,提高细胞内 Bax 蛋白表达,使 Bcl-2/B ax 蛋白比例改变而促使细胞凋亡;④ p53 增强 Fas、FasL 基因表达,从而激活 Fas 途径。Devireddy 等[4]研究发现病毒感染细胞后 p53 数量和活性增高,并且刺激激活 p21 和 Bax,同时激活 caspase,诱导细胞凋亡。Querido 等[5]研究发现腺病毒感染产生的 E1A 蛋白增加 p53 表达,导致 p53 积累,同时将 p53 的半衰期由正常细胞的 20 min 延长至 2 h,致细胞快速凋亡。Katiyar 等[6]在研究西利马林的抗肿瘤机制时发现表达野生型 p53 的细胞凋亡数明显多于 p53 缺失的细胞。以上提示 p53 介导了脊髓损伤后的细胞凋亡。

半胱-天冬氨酸蛋白酶(caspase),也称 ICE 样蛋白酶,被认为是细胞凋亡过程中最重要的蛋白酶,它直接水解激活与 DNA 断裂等凋亡特征性改变密切相关的蛋白,又称为死亡蛋白酶[7]。迄今已发现 14 个家族成员,分为两类:一类参与 caspase 家族其他成员的激活,包括 caspase-1、2、4、5、8、9 和 10;另一类介导细胞凋亡下游的执行阶段,包括 caspase-3、6、7、14。其中 caspase-3 是凋亡过程中最重要的蛋白酶,是多种凋亡途径的共同下游效应部分,是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路。在正常情况下,caspase-3 蛋白是以活性很低的酶原形式合成,通过蛋白酶水解去除氨基酸的一段序列而被激活。有研究证实,在缺血和外伤性脊髓损伤动物模型中,caspase-3 活性增强[8]。单纯的 caspase-3 蛋白的增高并不能直接说明是具有活性的 caspase-3 增多,因而我们采用荧光酶联测定法测定细胞凋亡的发生时期 caspase-3 的活性变化。实验证实在脊髓损伤后不久神经细胞就开始以凋亡方式死亡并且持续较长一段时间,caspase-3 活性变化、caspase-3 蛋白表达及细胞凋亡在时间上一致。提示 caspase-3 参与了脊髓损伤细胞凋亡的调节,可见 caspase-3 表达增加可能在脊髓继发损伤的发生发展中起重要作用。本实验结果显示损伤后神经细胞凋亡指数及 caspase-3、p53 蛋白表达增多,均于脊髓损伤后 1 周达高峰。与脊髓损伤阳性凋亡细胞一致,提示 caspase-3、p53 参与了脊髓损伤细胞凋亡的调节,可见 caspase-3、p53 表达增加可能在脊髓继发损伤的发生发展中起重要作用。提示抑制 caspase-3 及 p53 可能是防治脊髓继发损伤的有效方法。本实验采用免疫组化染色法及 TUNEL 标记法观察了大鼠脊髓损后应用二甲胺四环素对 caspase-3 及 p53 表达及荧光酶联测定法测定 caspase-3 活性和细胞凋亡的影响,结果显示二甲胺四环素治疗组大鼠脊髓神经细胞凋亡指数及 caspase-3 表达均较生理盐水组低,高峰发生在损伤后 3 d,以后

逐渐降低，表明二甲胺四环素抑制了脊髓损伤后 caspase-3 及 p53 表达，减少细胞损伤和凋亡，对神经细胞起保护作用。

二甲胺四环素属第二代半合成的四环素类药物，不仅有强大的抗菌作用，并且有明显的抗炎效果。Chen 等[9]研究发现在转基因 Huntington 舞蹈病大鼠模型中，能抑制 caspase-1 和 caspase-3 的表达并延迟死亡率。Zhu 等[10]研究表明二甲胺四环素能减少线粒体细胞色素 C 的释放从而抑制细胞凋亡。最近的研究证实应用二甲胺四环素治疗能延迟胶质细胞的死亡，减少轴突的衰亡而促进脊髓损伤后功能的恢复[11]。本实验 HE 染色显示二甲胺四环素治疗组大鼠脊髓组织出血、坏死程度较轻，形成囊腔少，神经细胞肿胀不明显，而生理盐水组大鼠脊髓组织有较多片状出血及出血坏死后形成的囊腔，神经细胞肿胀较明显。还观察了大鼠脊髓损后应用二甲胺四环素对 caspase-3、p53 表达及细胞凋亡的影响，结果显示二甲胺四环素治疗组大鼠脊髓神经细胞凋亡指数、caspase-3、p53 表达及 caspase3 活性均较生理盐水组低，高峰发生在损伤后 3d ，以后逐渐降低，表明二甲胺四环素抑制了脊髓损伤后 caspase-3、p53 蛋白表达，减少细胞损伤和凋亡，对神经细胞起保护作用。综上所述，作者认为二甲胺四环素除了能通过降低谷氨酸盐兴奋性毒性，抑制小胶质细胞的活性，减少线粒体细胞色素 C 的释放等防治继发 SCI 外，还抑制了脊髓损伤后 caspase-3、p53 表达表达，减少细胞损伤和凋亡，对神经细胞起保护作用。

参考文献：

[1] LI G L, BRODIN G, FAROOQUE M, *et al*. Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1996, 55(3): 281 - 289.

[2] CROWE M J, BRESNAHAN J C, SHUMAN S L, *et al*. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys [J]. Nat Med, 1997, 3(1): 73 - 76.

[3] TIKKA T, FIEBICH B L, GOLDSTEINS G, *et al*. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia [J]. J Neurosci, 2001, 21(8): 2580 - 2588.

[4] DEVIREDDY L R, JONES C J. Activation of caspases and p53 by bovine herpesvirus 1? infection results in programmed cell death and efficient virus release[J]. J Virol, 1999, 73(5): 3778 - 3788.

[5] QUERIDO E, MARCELLUS R C, LAI A, *et al*. Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells [J]. J Virol, 1997, 71(5): 3788 - 3798.

[6] KATIYAR S K, ROY A M, BALIGA M S. Silymarin induces apoptosis primarily through a p53-dependent pathway involving Bcl-2/Bax, cytochrome c release, and caspase activation[J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(2): 207 - 216.

[7] STENNICKE H R, SALVESEN G S. Properties of the caspases [J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1387(1 - 2): 17 - 31.

[8] SPRINGER J E, AZBILL R D, KNAPP P E. Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury [J]. Nat Med, 1999, 5(8): 943 - 946.

[9] CHEN M, ONA V O, LI M, *et al*. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease [J] . Nat Med, 2000, 6(7): 797 - 801.

[10] ZHU S, STAVROVSKAYA I G, DROZDA M, *et al*. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice [J] . Nature, 2002, 417(6884): 74 - 78.

[11] STIRLING D P, KHODARAHMI K, LIU J, *et al*. Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury [J]. J Neurosci, 2004, 24(9): 2182 - 2190.

（编辑　陈聪连）

参考文献类型及标识

根据 GB 3469 规定，以单字母方式标识以下各种参考文献类型：

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献，其文献类型标识建议采用单字母“A”；对于其他未说明的文献类型，建议采用单字母“Z”。

对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献，建议以下列双字母作为标识：

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部