文章编号:1000-5404(2010)12-1321-04

论著

汉防己甲素对大鼠急性脊髓损伤后 bcl-2 和 bax 表达的影响

罗春山,田晓滨,汪 雷,李 波,彭 智,周焯家,简月奎,赵伟峰 (550001 贵阳,贵州省人民医院骨科)

[摘要] 目的 观察汉防己甲素(tetrandrine,Tet)对大鼠急性脊髓损伤后 bcl-2 和 bax 表达的影响,探讨其对脊髓损伤的作用机制。**方法** 成年 SD 大鼠 100 只,分为 4 组:假手术组 10 只,损伤对照组、甲基强的松龙(methylprednisolone,MP)治疗组、Tet 治疗组各 30 只。胸 8、9 椎板切除后,损伤对照组,MP、Tet 治疗组用加速压迫型 Allen's 打击法制成脊髓损伤模型,后 2 组动物于制模前,伤后 24、48 h 尾静脉分别注射 MP 90 mg/kg 和 1% Tet 22.5 mg/kg。各组大鼠于术后 8 h,1、3、7、14 d 行运动功能 BBB 评分,取损伤段脊髓行石蜡切片 HE 染色,观察脊髓组织的形态结构变化,免疫组织化学染色检测细胞凋亡因子 bcl-2、bax 表达。**结果** 伤后 7、14 d MP、Tet 治疗组大鼠运动功能评分显著高于损伤对照组($P<0.05$),各时间点 MP、Tet 治疗组评分无统计学意义($P>0.05$);MP、Tet 治疗组脊髓组织损害较损伤对照组轻,术后 8 h 至 14 d 动态观察,3~7 d 损伤表现最为严重,达到损伤高峰期;假手术组中 bax、bcl-2 阳性细胞数较少,MP、Tet 治疗组 bax 阳性细胞数少于损伤对照组($P<0.05$),而 bcl-2 阳性细胞数多于损伤对照组($P<0.05$)。**结论** Tet 可通过增加 bcl-2 表达和降低 bax 表达来抑制急性脊髓损伤后神经细胞的凋亡,有益于脊髓组织的保护,促进运动功能的恢复。

[关键词] 粉防己碱;急性;脊髓损伤;基因, bcl-2; bcl-2 相关 X 蛋白质
[中图法分类号] R285.5; R651.2; R363.25 **[文献标志码]** A

Influence of tetrandrine on Bcl-2 and Bax expressions in rats with spinal cord injury

Luo Chunshan, Tian Xiaobin, Wang Lei, Li Bo, Peng Zhi, Zhou Zuojia, Jian Yuekui, Zhao Weifeng (Department of Orthopaedics, People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang, Guizhou Province, 550001, China)

[Abstract] Objective To observe the influence of tetrandrine (Tet) on the expressions of Bcl-2 and Bax in rats with spinal cord injury. **Methods** A total of 100 SD rats were randomly divided into sham-operation group (group A, $n=10$), spinal cord injury group (group B, $n=30$), methylprednisolone group (MP) group (group C, $n=30$) and Tet group (group D, $n=30$). The modified Allen method was adopted to establish the models of T9 spinal cord injury in groups B, C and D. The animals of group D received 1% 22.5 mg/kg Tet through tail vein in 24 and 48 h after operation, those of group B were injected with normal saline at same volume as in group D, and the rats from group C were given a tail vein injection of 90 mg/kg MP before and 24 and 48 h after injury. BBB score was recorded at 8 h, and 1, 3,7 and 14 d after operation. Six rats from each group were killed immediately after BBB scoring, and the samples were taken from the spinal cord injury sites for HE staining. The expression levels of Bcl-2 and Bax proteins in the obtained samples were studied with immunohistochemical assay. **Results** The BBB score of groups C and D were significantly higher than that of group B at day 7 and 14 ($P<0.05$). There was no significant difference in the score between groups C and D at each time points ($P>0.05$). HE staining showed the spinal cord of groups C and D had fewer necrosis than that of group B ($P<0.05$). The injury was most severe in day 3 to 7. The number of Bcl-2 positive cells in groups C and D were larger than those of group B at each time points ($P<0.05$). However the number of Bax postive cells in groups C and D were less than those of group B at each time points ($P<0.05$). **Conclusion** Tet is able to protect neurons from apoptosis and promote the nerve function recovery by inhibiting the expression of Bax and promoting the expression of Bcl-2.

[Key words] Tetrandrine; acute; spinal cord injuries; genes, bcl-2; bcl-2-associated X protein

Supported by the Foundation of Governor of Guizhou Province(2005-27) and the Science Foundation of Department of Health of Guizhou Province (2003-150).
Corresponding author: Tian Xiaobin, Tel: 86-851-5600978, E-mail: txb6@vip.163.com

[基金项目] 贵州省省长基金(2005-27);贵州省卫生厅基金(2003-150)
[通信作者] 田晓滨,电话:(0851)5600978,E-mail:txb6@vip.163.com

急性脊髓损伤(acute spinal cord injury, ASCI)是临床上截瘫的常见原因和高致残率的疾患之一,至今国内外尚缺乏满意临床疗效的治疗方法,如何采取更有效的措施促进ASCI患者神经功能的恢复成为脊柱外科界的难题和研究重点。大量实验证明脊髓损伤后损伤区域及邻近部位的神经细胞早期可能以神经细胞坏死为主,而在亚急性期,则可能以诱导神经细胞凋亡为主[1]。已有实验证明汉防己甲素(tetrandrine, Tet)治疗急性脊髓损伤有效[2,3],本研究旨在进一步探讨其对大鼠ASCI后神经细胞凋亡相关蛋白表达和运动功能的恢复的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

100只成年SD大鼠(贵阳医学院实验动物中心),雌雄不限,体质量(250±50)g,分为4组:假手术组10只,手术显露脊髓但未造成损伤,损伤对照组、甲基强的松龙(methylprednisolone, MP)治疗组、Tet治疗组各30只。

纯度95%以上汉防己甲素粉剂(江西澎泽制药厂);兔抗鼠Bcl-2/Bax多克隆抗体(一抗)、链霉亲和素-生物素-过氧化物酶免疫组织化学染色,SABC试剂盒及DAB显色试剂盒(武汉博士德公司提供)。

1.2 脊髓损伤模型的建立

4%戊巴比妥钠40 mg/kg腹腔麻醉成功后,取胸背部后正中切口2 cm,显露并切除胸8、9椎板,造成0.4 cm×0.7 cm椎板缺损,显露硬膜。按加速压迫型Allen's打击法制成脊髓损伤模型[4],重物质量10 g,高度10 cm,致伤能量100 g·cm。损伤处脊髓出血、后肢出现全瘫征象为动物复制成功的标志。

1.3 实验步骤及方法

Tet治疗组于制模前,伤后24、48 h尾静脉注射1% Tet 22.5 mg/kg,损伤对照组注入同等剂量的生理盐水作为对照,MP治疗组按同法于制模前,伤后24、48 h尾静脉注射MP 90 mg/kg。术后3 d所有动物均每天肌肉注射青霉素80万U,室温控制在22~26 ℃,每天人工挤压膀胱排尿2次。各组大鼠于术后8 h,1、3、7、14 d行运动功能BBB(Basso-Beattie-Bresnahan score)评分,根据大鼠昼伏夜出习性,评分于19:00进行,由熟悉评分标准的非本组实验人员实行双盲评分。

假手术组动物于饲养14 d后处死,余3组动物分别于术后8 h,1、3、7、14 d评分后随机取6只处死,麻醉成功后心脏灌注冰盐水至流出液清凉为止,再用4%多聚甲醛缓冲液灌注固定,沿原手术切口进入,显露损伤段脊髓,以损伤点为中心取损伤段脊髓约3 mm,用4%多聚甲醛缓冲液固定过夜,脱水,石蜡包埋,横切面4 μm厚度连续切片,HE染色,观察脊髓组织的形态、结构变化,并用免疫组化方法检测凋亡调控蛋白分子的表达量。

1.4 观察指标和方法

1.4.1 HE染色 每个时间点每只大鼠取6张切片行HE染色,切片脱蜡后蒸馏水清洗,苏木精染色10 min,洗去多余染液,1%盐酸分色20 min,碱性溶液促蓝后流水冲洗,伊红染色10 min,酒精逐级脱水后封片。每张切片取5个不重叠视野观察脊髓组织的形态结构变化(Biomias2001图像分析系统,四川大学图像图形研究所)。

1.4.2 bcl-2、bax蛋白免疫组化检测 按SABC试剂盒说明书操作,每个时间点每只大鼠取6张切片进行bcl-2、bax免疫组织化学染色,切片脱蜡至水,微波修复抗原,滴加封闭液,室温10 min,分别滴加bcl-2、bax单抗(工作浓度为1∶100),37 ℃放置2 h,PBS液洗净后滴加生物素羊抗鼠lgG,37 ℃放置20 min,再次PBS液洗净后DAB显色,蒸馏水清洗终止显色,苏木精复染,脱水后封片,以PBS液代替一抗作为阴性对照。每张切片随机选取5个不重叠400倍视野计阳性细胞数,观察脊髓前角运动神经元胞浆中bcl-2、bax表达情况,bcl-2阳性细胞为细胞质均匀染色呈棕色或褐色,bax阳性细胞为细胞质及核周染色呈棕色或棕褐色。

1.5 统计学分析

所得数据经过SPSS 13.0统计软件进行分析,数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用独立样本的t检验。

2 结果

2.1 脊髓运动功能BBB评分

术后8 h、1 d、3 d,损伤对照组、MP治疗组、Tet治疗组间评分无明显差异,术后7、14 d,MP治疗组、Tet治疗组均显著高于损伤对照组($P<0.01$,$P<0.05$),但MP治疗组、Tet治疗组间差异无显著性($P>0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠术后不同时间运动功能评分比较($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	8 h	1 d	3 d	7 d	14 d
假手术组	20.24±2.24	20.41±3.41	21.16±2.84	20.86±3.14	20.58±2.58
损伤对照组	3.63±1.37[a]	4.28±1.28[a]	5.01±1.99[a]	5.85±1.15[a]	7.66±2.34[a]
MP治疗组	4.52±1.48[a]	4.93±2.07[a]	5.72±1.72[a]	8.29±1.71[ab]	10.91±2.91[ab]
Tet治疗组	4.35±1.65[a]	5.29±1.29[a]	5.99±2.01[a]	8.54±2.46[ab]	12.01±3.01[ab]

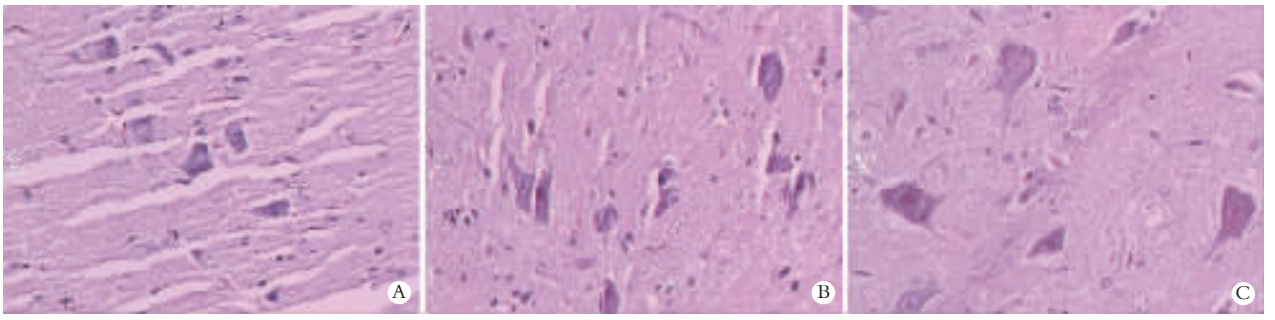
a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与损伤对照组比较

2.2 HE染色

假手术组的脊髓组织HE染色正常,未见出血坏死及组织水肿等表现;损伤对照组8 h可见脊髓组织出现片状出血,组织开始出现水肿,1 d时组织呈中重度水肿及神经元变性,7 d时可见大量神经元变性,灰白质有微小空腔形成,14 d时灰白质中出现坏死后形成的囊腔,少量神经元残留(图1A)。Tet治疗组脊髓组织8 h呈轻度水肿,少量出血,1 d时神经元轻中度肿胀,少量神经元变性,7 d时组织肿胀开始消退,留有少量点状坏死灶,14 d织肿胀基本消退,少量坏死后形成小囊腔,较7 d时有所增大,大量神经元残留(图1B)。MP治疗组脊髓组织8 h轻度水肿,神经元轻度肿胀变性,术后1、3、7 d可见组织肿胀、组织坏死轻于Tet治疗组,术后14 d可见少量坏死后形成的小囊腔,少于Tet组,大量神经元残留(图1C)。

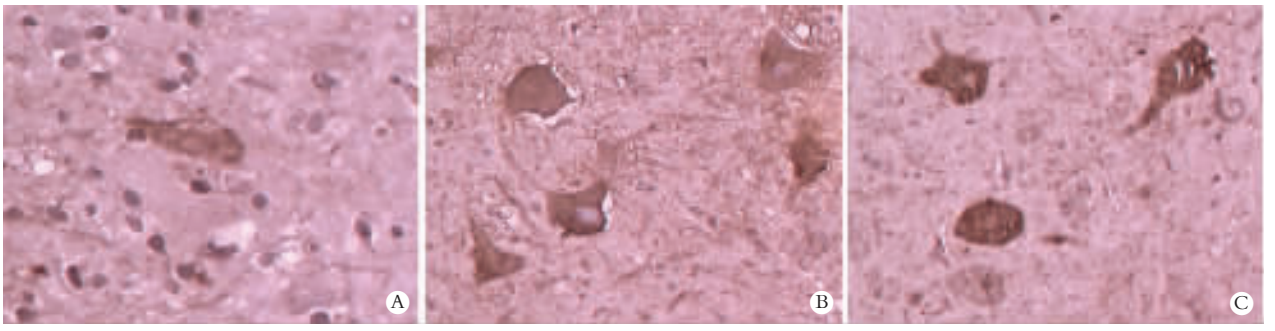
2.3 免疫组化检测bcl-2、bax的表达

bcl-2、bax阳性反应物定位于细胞质,呈棕黄色,脊髓损伤3个组均于损伤后1 d开始表达bcl-2蛋白、bax蛋白,损伤后7 d时bcl-2和bax均达到表达高峰,14 d已开始下降。损伤对照组bcl-2表达较少,在同时间点均低于Tet和MP治疗组,差异有统计学意义($P<0.05$),Tet治疗组略低于MP治疗组,但差异无统计学意义($P>0.05$),见图2,表2。损伤对照组bax表达较多,在同时间点均高于Tet和MP治疗组,差异有统计学意义($P<0.05$),Tet治疗组略高于MP治疗组,但差异无统计学意义($P>0.05$),见图3,表3。



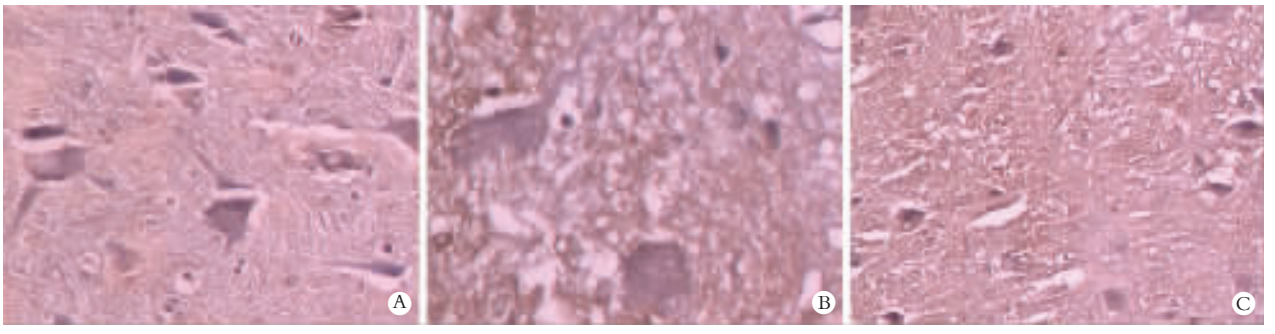
A:损伤对照组;B:Tet 治疗组;C:MP 治疗组

图 1　各组大鼠术后 14 d 脊髓损伤组织的病理学观察　(HE ×200)



A:损伤对照组;B:Tet 治疗组;C:MP 治疗组

图 2　各组大鼠术后 7 d 脊髓损伤组织 bcl-2 的阳性表达　(SABC ×400)



A:损伤对照组;B:Tet 治疗组;C:MP 治疗组

图 3　各组大鼠术后 7 d 脊髓损伤组织 bax 的表达　(SABC ×200)

表 2　各组大鼠 bcl-2 阳性细胞数比较($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	8 h	1 d	3 d	7 d	14 d
假手术组	–	–	–	–	3.20±1.40
损伤对照组	15.60±1.78^{a}	23.10±2.74^{a}	26.10±2.13^{a}	30.10±2.57^{a}	21.30±2.42^{a}
MP 治疗组	27.21±1.89^{ab}	31.00±3.02^{ab}	38.10±2.73^{ab}	42.00±3.23^{ab}	33.80±2.24^{ab}
Tet 治疗组	28.10±2.51^{ab}	34.10±3.46^{ab}	40.60±3.23^{ab}	44.66±2.91^{ab}	35.23±2.34^{ab}

a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与损伤对照组比较

表 3　各组大鼠 bax 阳性细胞数比较($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	8 h	1 d	3 d	7 d	14 d
假手术组	–	–	–	–	3.40±0.65
损伤对照组	28.20±2.45^{a}	32.10±2.21^{a}	46.72±3.13^{a}	49.40±4.24^{a}	38.72±2.32^{a}
MP 治疗组	20.21±2.24^{ab}	27.60±2.45^{ab}	35.24±2.34^{ab}	40.30±2.56^{ab}	29.70±2.64^{ab}
Tet 治疗组	18.94±2.19^{ab}	26.70±2.92^{ab}	34.20±2.73^{ab}	38.53±3.31^{ab}	27.58±2.38^{ab}

a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与损伤对照组比较

3　讨论

ASCI 后的继发性损伤主要包括细胞坏死和细胞凋亡。研究[5]表明脊髓在缺血损伤和创伤后出现的神经元及神经胶质细胞死亡是继发性细胞凋亡的结果。由于原发性损伤的不可逆性,所以 ASCI 的药物治疗的关键在于减少神经细胞的凋亡,有效阻断继发性损伤。

Li 等[6]于 1996 年首次报道在大鼠 SCI 模型中采用免疫组化方法发现大量神经细胞凋亡相关基因及凋亡蛋白的表达。bcl-2、bcl-x 等抑制凋亡,Bax、Bad 和 Bik 等促进凋亡,赵景霞等[7]研究脑损伤时发现 Fas 蛋白增高,神经细胞凋亡增加,其中 bcl-2、bax 公认与

凋亡的关系最为密切[8]。bcl-2是一种细胞质蛋白,在中枢神经系统发育进程中表达水平较高,随着神经系统的逐渐完善,其表达水平维持在较低水平。bcl-2是抗凋亡基因,可抑制脊髓损伤后各种途径的凋亡[9]。研究表明,bcl-2是可诱导基因,通过转基因手段使实验动物过度表达bcl-2而减轻神经损伤,提高组织对抗损伤的功能,促进轴索向外生长及损伤的中枢神经系统组织修复,并有效阻止神经细胞凋亡[10,11]。Bax存在于细胞质,接受凋亡信息后激活使线粒体膜通透性改变促使神经细胞发生凋亡[12],实验[13]证明去除Bax基因的小鼠脊髓损伤后,少突胶质细胞的凋亡明显减少,可减轻轴突的脱髓鞘改变,Scorrano等[14]实验发现bcl-2和bax可通过调节钙离子流动改变细胞的通透性,Fan等[15]实验证明bcl-2与Bax的表达强度直接或间接影响脊髓神经细胞凋亡,且凋亡程度与其比值相关。

MP是目前临床应用的药物,其疗效已得到认可。Tet是一种天然的选择性钙通道阻滞剂,具有散热、降压、抗感染、抗氧化、防腐、抗细胞毒素等药理作用,在抗肿瘤作用实验方面,发现其能诱导凋亡,在缺血、灌注损伤模型中发现其通过防止钙内流、改善微循环、抑制过氧化损伤,抑制凋亡,对组织器官起保护作用,其作用呈剂量依赖性[16]。已有实验[2,3]证明其通过改善微循环、抑制自由基的生成、防止钙超载、改善组织的代谢的机制,对急性脊髓损伤有效。

本研究发现脊髓损伤后bcl-2、bax的表达量较假手术组高,提示脊髓损伤后有大量细胞凋亡存在,bcl-2表达量在MP、Tet治疗组较损伤对照组多,而bax表达量损伤对照组最多,MP、Tet治疗组较少,表明Tet、MP对凋亡调控因子的表达起到了明显的积极干预作用,通过提高bcl-2表达,降低Bax表达,抑制细胞凋亡。bcl-2、bax的表达量在脊髓损伤后3~7 d达到峰值,然后下降,提示术后3~7 d是受损细胞凋亡的高峰,如能及时干预,仍能挽救部分亚损伤脊髓功能,MP、Tet治疗组术后7、14 d BBB评分明显优于对照组,亦证实了这一点。已有实验[16]证明组织缺血缺氧、氧自由基的过量产生及脂质过氧化反应导致膜通透性增加,钙超载启动内源性核酸内切酶诱导细胞凋亡,而Tet已证实能改善微循环、抑制自由基的生成、防止钙超载[17],从而推测其可能通过这一药理作用抑制细胞凋亡,对脊髓损伤有一定的保护作用。本研究为临床上应用汉防己甲素来治疗急性脊髓损伤提供了实验依据。

参考文献:

[1] Charriant-Marlangue C, Margaill L, Represa A, *et al*. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1996,16(2): 186-194.

[2] 安荣泽, 罗春山. 汉防己甲素治疗急性脊髓损伤的实验研究[J]. 中国骨伤,2003,16(1): 26-28.

[3] 罗春山,安荣泽,田晓滨,等. 汉防己甲素对大鼠急性脊髓损伤的作用及意义[J]. 中国脊柱脊髓杂志,2003,13(3): 160-163.

[4] 史可中, 安荣泽,张天宏,等. 蝮蛇抗栓酶对脊髓损伤影响的实验研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志,1996,6(6): 257-259.

[5] Liu X Z, Xu X M, Hu R, *et al*. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury[J]. J Neurosci, 1997, 17(14): 5395-5406.

[6] 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): 280-289.

[7] 赵景霞,刘清军,崔建忠,等. 大鼠脑创伤后海马区Fas蛋白表达与神经细胞凋亡[J]. 第三军医大学学报,2005,27(12): 1226-1228.

[8] Moskowitz M A, Lo E H. Neurogenesis and apoptotic cell death[J]. Strike, 2003,34(2): 324-326.

[9] Seki T, Hida K, Tada M, *et al*. Role of the bcl-2 gene after contusive spinal cord injury in mice[J]. Neurosurgery,2003,53(1): 192-198.

[10] Lou J, Lenke L G, Xu F, *et al*. *In vivo* Bcl-2 oncogene neuronal expression in the rat spinal cord[J]. Spine,1998, 23(5): 517-523.

[11] Yukawa Y, Lou J, Fukui N, *et al*. Optimal treatment timing to attenuate neuronal apoptosis *via* Bcl-2 gene transfer *in vitro* and *in vivo*[J]. J Neurotrauma,2002,19(9): 1091-1103.

[12] Lebedeva I V, Sarkar D, Su Z Z, *et al*. Bcl-2 and Bcl-x(L) differentially protect human prostate cancer cells from induction of apoptosis by melanoma differentiation associated gene-7, mda-7/Il-24[J]. Oncogene, 2003, 22(54): 8758-8773.

[13] Dong H, Fazzaro A, Xiang C, *et al*. Enhanced oligodendrocyte survival after spinal cord injury in Bax-deficient mice and mice with delayed Wallerian degeneration[J]. J Neurosci, 2003,23(25): 8682-8691.

[14] Scorrano L, Oakes S A, Opferman J T, *et al*. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+}: a control point for apoptosis[J]. Science, 2003, 300(5616): 135-139.

[15] Fan L H, Wang K Z, Cheng B, *et al*. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of Tetramethylpyrazine following spinal cord ischemia in rabbits[J]. BMC Neurosci, 2006, 7: 48.

[16] Lu J, Ashwell K W, Waite P. Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis[J]. Spine, 2000,25(14): 1859-1866.

[17] Jin Q, Kang C, Soh Y, *et al*. Tetrandrine cytotoxicity and its dual effect on oxidative stress-induced apoptosis through modulating cellular redox states in Neuro 2a mouse neuroblastoma cells[J]. Life Sci, 2002, 71(17): 2053-2066.

(**收稿**:2009-12-15;**修回**:2010-02-03)

(编辑 王 红)