文章编号:1000-5404(2011)19-2029-05

论著

内毒素预处理激活大鼠急性脊髓损伤 Nrf2 蛋白抑制 Caspase-3 的表达

李维朝[1],蒋电明[1],朱凤臣[1],祁小桐[1],黄英如[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院骨科[1];401331 重庆,重庆医科大学中医药学院骨科教研室[2])

[摘要] **目的** 研究大鼠急性脊髓损伤及经内毒素预处理后损伤脊髓中转录因子 Nrf2 及凋亡蛋白 Caspase-3 的表达。**方法** SD 大鼠132只,随机数字表法分为假手术组、模型组和LPS预处理组。采用改良 Allen's 打击法制作 SD 大鼠急性脊髓损伤(acute spinal cord injury, ASCI)模型,在术后1、3、5、7 d进行 BBB(basso beattie and bresnahan)评分。在建模后6、12 h、1、3、5、7 d获取损伤段脊髓标本,HE 染色观察其组织病理学变化;Nissl 染色观察神经元中尼氏小体的变化;免疫组织化学染色定位观察损伤段脊髓中 Nrf2 和 Caspase-3 的表达变化规律;Western blot 法分析损伤段脊髓中 Nrf2 表达的变化规律。**结果** 模型组和预处理组术后1、3 d大鼠 BBB 评分都有明显降低,5、7 d时预处理组 BBB 评分高于模型组($P<0.05$)。6、12、24 h时 HE 和 Nissl 染色显示模型组和预处理组脊髓有广泛性出血,大量红细胞渗出,间质性水肿严重,核固缩,神经元数目明显减少,细胞体积变小,尼氏体模糊、碎裂。假手术组大鼠脊髓组织低表达 Nrf2 及微量表达 Caspase-3。3、5、7 d时,与模型组相比,预处理组形态学损伤明显减轻,Nrf2 蛋白表达明显增强($P<0.01$,$P<0.05$),凋亡蛋白 Caspase-3 表达明显降低($P<0.01$,$P<0.05$)。**结论** 内毒素预处理大鼠在 SCI 后 Nrf2 蛋白表达明显增加,抑制凋亡信号 Caspase-3 的表达,减轻神经元的死亡与损伤,其可能与 SCI 的病理改变与转归密切相关。

[关键词] 内毒素;急性脊髓损伤;预处理;Nrf2 蛋白;半胱氨酸蛋白酶-3
[中图法分类号] R651.2; R363.22 [文献标志码] A

Nrf2 protein activated by LPS pretreatment inhibits Caspase-3 expression in rats after acute spinal cord injury

Li Weichao[1], Jiang Dianming[1], Zhu Fengchen[1], Qi Xiaotong[1], Huang Yingru[2] ([1]Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Orthopedics, College of Traditional Chinese Medical, Chongqing Medical University, Chongqing, 401331, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the Nrf2 and Caspase-3 expressions in rats with LPS pretreatment after acute spinal cord injury (ASCI). **Methods** One hundred and thirty-two SD rats were randomly divided into a sham group, a model group and a LPS-pretreatment group. The model of ASCI was built by the modified Allen's method, and was assessed by the Basso Beattie and Bresnahan (BBB) score at 1, 3, 5 and 7 d after the operation. The injured spinal cord tissue samples were collected at 6, 12 h, and 1, 3, 5 and 7 d after the operation. The pathological changes of rat spinal cord were observed by HE staining, the Nissl body in neurons was observed by Nissl staining, the expressions of Nrf2 and Caspase-3 were detected by immunohistochemical staining, and the Nrf2 protein level was detected by Western blotting. **Results** The rat BBB scale decreased significantly in both the model group and the LPS-pretreatment group at 1 d and 3 d after operation and was higher in the LPS-pretreatment group than in the model group at 5 d and 7 d after operation ($P<0.05$). The injured spinal cord by HE and Nissl staining showed an extensive focal hemorrhage, large quantity of erythrocyte diapedesis, severe interstitial edema, karyopyknosis, significantly decreased number of neurons, small cell volume and blurring and debris of Nissl bodies in the model group and the LPS-pretreatment group at 6 h, 12 h and 1 d after operation. Low Nrf2 and trace Caspase-3 expressions were detected in the sham group. As compared with those of the model group, the morphological injury was significantly alleviated, the Nrf2 protein expression was significantly enhanced ($P<0.01$, $P<0.05$) and the Caspase-3 expression was significantly

[通信作者] 蒋电明,电话:(023)89011012,E-mail:jdm571026@vip.163.com

decreased ($P<0.01$, $P<0.05$) in the LPS-pretreatment group at 3 d, 5 d and 7 d after operation. **Conclusion** The Nrf2 expression is significantly increased in rats with LPS pretreatment after ASCI. Nrf2 inhibits the Caspase-3 expression and reduces the neuronal death and injury, which may be closely related to the pathological changes and prognosis of ASCI.

[**Key words**] endotoxin; acute spinal cord injuries; pretreatment; Nrf2 protein; Caspase-3

Corresponding author: Jiang Dianming, Tel: 86-23-89011012, E-mail: jdm571026@vip.163.com

脊髓损伤(spinal cord injury)是临床上常见的一种致残率高的严重创伤之一,其治疗仍是当今医学界的一个难题。目前,对急性脊髓损伤后如何逆转或减轻继发性损伤是研究的一个热点。Rubio 等[1]发现,Nrf2-ARE 信号通路是调节细胞防御机制和抗氧化应激的重要途径,通过此途径的激活可以有效地减轻神经元的凋亡与继发性损害。Nrf2(nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2)蛋白是这一途径中起关键作用的转录因子,其介导的信号通路调节下游抗氧化应激、抗炎症等多种基因的表达,以减少神经细胞的损害[2-3]。脊髓损伤后半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的表达与神经细胞的凋亡水平呈正相关,其表达的程度可作为判断神经元凋亡的指标[4]。内毒素(endotoxin)是革兰阴性细菌细胞壁上的主要成分,其低剂量预处理时具有神经细胞保护作用[5],但目前对其保护机制仍不十分清楚。本实验通过建立大鼠急性脊髓损伤模型,观察非致死剂量内毒素预处理对大鼠行为学影响及对损伤段脊髓 Nrf2 蛋白和神经元凋亡的影响,探讨低剂量内毒素对脊髓继发性损伤的保护机制,为临床治疗提供新的靶点及靶分子。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 大鼠(清洁级)132 只, 3 月龄,雌雄不拘,体质量 230 ~ 260 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 实验试剂及仪器

内毒素(*E. coli* 055:B5),Nrf2 抗体(L593,Bioworld 公司),Caspase-3 抗体(博士德公司),过氧化物酶标记的链霉卵白素(S-P 系列,北京中杉),DAB 染色试剂盒(北京中杉),ECL 发光试剂盒(北京中杉),β-actin(北京博奥森),凝胶成像仪(Alpha Innotech 公司),蛋白垂直电泳仪和印迹转膜仪(Bio-Rad 公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究所)。

1.3 急性脊髓损伤动物模型制备

脊髓损伤动物模型建立采用改良的 Allen's 打击法:大鼠 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后,俯卧固定于鼠板,切除大鼠 T9 ~ T10 椎板,10 g 的铁锤从 4.0 cm 高处自由落下,撞击硬脊膜囊,撞击能量为 4.0 cm × 10 g,损伤直径约为 2.0 cm,如重锤下落后大鼠迅速出现尾反射,双后肢及躯体回缩扑动后双后肢瘫痪,表明撞击成功。术后以消毒盐水冲洗损伤脊髓,逐层缝合伤口,待动物苏醒后分别单独饲养,自由进食及饮水,注意保暖,每日按摩膀胱促排尿 2 次。术后肌肉注射青霉素不超过 3 d。

1.4 实验方法及分组

SD 大鼠在动物房饲养 3 d 以适应环境并分组,采用随机数字表法分为 3 组,假手术组($n=12$):只打开椎板,不打击;模型组($n=60$):术前连续 3 d 注射生理盐水,1 mg/kg,1 次/d,再复制脊髓损伤模型;LPS 预处理组($n=60$):用 LPS 替代生理盐水,方法同模型组。各组在 6、12 h、1、3、5、7 d 各时间点取材(损伤段脊髓),模型组和预处理组各时间点处死 10 只大鼠,其中 5 个标本石蜡包埋做组织切片,其余 5 个标本测 Nrf2 蛋白;假手术组各时间点处死 2 只大鼠。

1.5 观测指标

1.5.1 后肢运动神经功能观察 采用脊髓运动功能 BBB 评分法[6]对各组大鼠脊髓损伤后的行为及后肢运动功能进行评定。模型组和预处理组各 5 只,分别在术后 1、3、5、7 d 进行每项指标评定,由 3 位熟悉评分标准的非本组实验人员各自独立进行评分,然后计算平均值。评分前所有动物检查膀胱是否充盈,防止因膀胱充盈而影响活动。

1.5.2 HE 染色观察 与相应时间点各组取 5 只大鼠,用 10% 水合氯醛麻醉后,仰卧固定。经左心室滴入肝素化生理盐水 100 ml,同时剪开右心耳作为血液和灌注液的出口,后滴入 4% 多聚甲醛的磷酸盐缓冲液 150 ~ 200 ml 进行在体脊髓组织固定。完整分离脊髓组织,再用多聚甲醛固定 24 h,脊髓组织冠状切面切片,常规石蜡包埋,连续切片,切片厚约 4 μm,隔 5 取 1,每份标本切取 8 张,即每个时间点共 40 张切片。取 10 张 HE 染色观察脊髓神经元形态及数目变化。

1.5.3 Nrf2 和 Caspase-3 免疫组织化学观察 每个时间点随机取上述切片 20 张,按照免疫组织化学 S-P 试剂盒操作,一抗为 Nrf2 单克隆抗体(1∶100)或 Caspase-3 单克隆抗体(1∶50),切片 DAB 显色后 CHK Olympus 显微镜观察,神经元细胞质、轴突及生长锥着色为棕黄色为阳性表达。Nrf2:每张免疫组化切片随机选择 5 个视野,用 IPP 图像分析软件进行分析,测定阳性产物的累加积分吸光度(IA)值和面积,计算平均 IA 值;Caspase-3:每张免疫组化切片选取 5 个具有代表性的非重叠高倍镜视野,计数其中阳性细胞总数,求均值。

1.5.4 Nissl 染色观察神经元中尼氏小体的变化 剩余大鼠组织切片采用甲苯胺蓝染色法,进行尼氏小体染色。切片入二甲苯脱蜡 2 次,每次不少于 5 min,经无水乙醇、95%、80%、75% 的梯度乙醇脱水,入蒸馏水洗 2 ~ 3 min;放入经预热至 50 ℃ 1% 的甲苯胺蓝水溶液中,并在 56 ℃温箱中浸染 20 min;蒸馏水洗 2 ~ 3 min,70% 乙醇约 1 min,95% 乙醇继续分化,镜下控制,以尼氏小体显示清晰为度。无水酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。每张切片选取 5 个视野,经计算机图像分析系统处理,测定细胞质尼氏小体灰度(以平均密度值表示)取

其平均值。

1.5.5 Western blot 检测损伤段脊髓 Nrf2 蛋白表达 取各组大鼠损伤段脊髓新鲜标本,加入 RIPA 裂解缓冲液,冰浴 1 h,4 ℃、14 000 r/min 离心,取上清为组织总蛋白;采用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。10% SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上;室温下 5% 脱脂奶粉封闭 3 h,洗膜后加入兔抗 Nrf2 单克隆抗体、β-actin 抗体 4 ℃过夜,再度洗膜后加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体,37 ℃孵育 2 h;洗膜后加发光试剂,凝胶成像系统对 PVDF 膜条带进行灰度值测定,用各个样本所对应颜色的光密度值与自身 β-actin 条带的光密度值相比,每组样本独立检测 3 次取平均值作为该组的样本值。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 大鼠脊髓功能评分

所有大鼠术前 BBB 评分为(20.5 ± 0.4)。术后模型组和预处理组评分总体呈增高趋势,两组大鼠在伤后短时间内双后肢功能完全丧失,肌力为零,依靠前肢俯卧位行走,尿潴留,呈脊髓休克表现。术后 1、3 d 两组评分比较差异无统计学意义;术后 5、7 d 预处理组评分高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。假手术组评分高于模型组和预处理组术后各时间点评分,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠脊髓损伤后不同时间后肢功能评分($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	1 d	3 d	5 d	7 d
假手术组	–	21.00 ± 0.00	–	–
模型组	1.92 ± 0.49	3.70 ± 0.50	6.66 ± 0.61	9.35 ± 0.64
预处理组	2.18 ± 0.58	4.16 ± 0.56	8.86 ± 0.62[a]	13.00 ± 0.62[a]

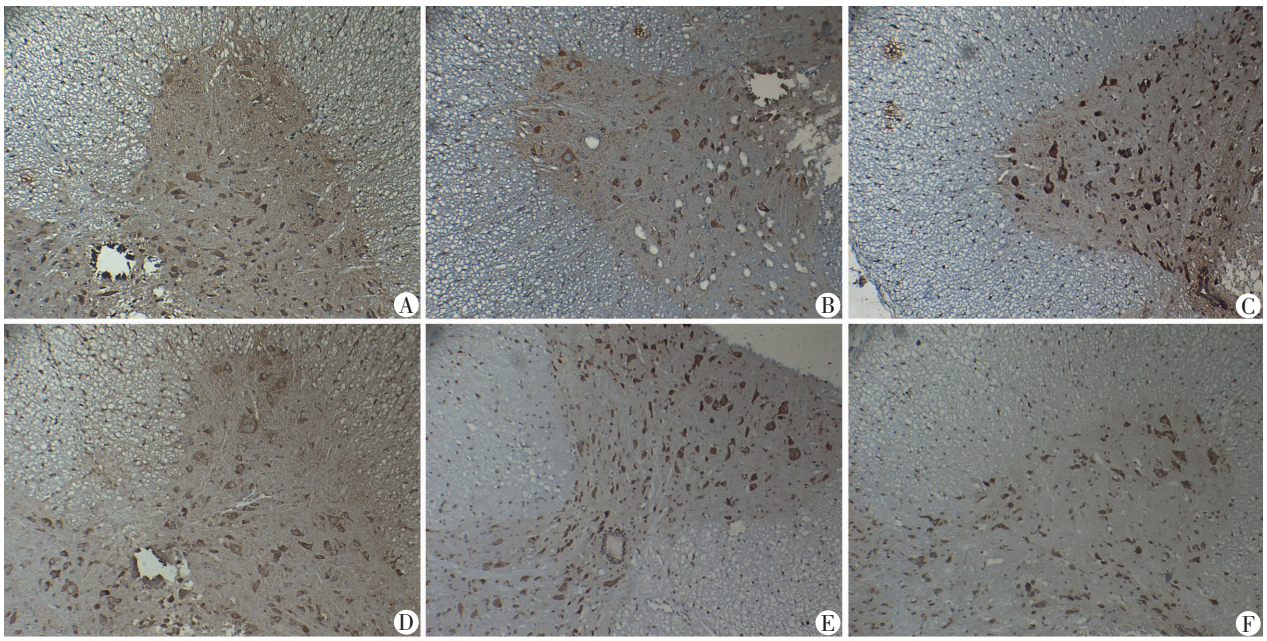
a:$P < 0.05$,与模型组比较

2.2 脊髓组织病理学观察

假手术组:大鼠脊髓组织结构清晰完整,偶有少许红细胞浸润,未见明显出血、坏死及组织水肿、变性等表现。模型组:术后 6 h、12 h、1 d 脊髓灰质有弥漫性出血,大量的红细胞渗出,呈灶状侵入灰质,间质水肿严重,灰质大量神经元死亡,核固缩、溶解碎裂,脊髓背侧白质也有较多红细胞渗出,形成大量空泡,出血灶周围胶质纤维间可见较多炎性细胞浸润;术后 3 d 灰质中神经元丧失,灰质密度显著降低,损伤中心可见坏死性空腔形成,中心边缘有大量胶质细胞增生;术后 5 d,出血部分好转,空腔周围胶质细胞增生明显,神经元数目明显减少,灰质内仍有少量炎性细胞浸润;术后 7 d 灰质大量胶质细胞增生,有形成胶质瘢痕的倾向,神经元大量减少,病灶处出现软化,白质水肿逐渐消退。预处理组:术后 6 h、12 h、1 d,脊髓灰质和白质出血,红细胞渗出,间质水肿、神经元变性坏死及炎性细胞浸润均较模型组轻;术后 3、5、7 d,以上表现减轻,神经元存活较多,胶质细胞增生明显减轻。

2.3 免疫组织化学染色观察

2.3.1 Nrf2 蛋白表达 大鼠脊髓组织免疫组化染色显示,Nrf2 阳性显示为细胞中的棕黄色颗粒,主要位于脊髓灰质前角及后角神经元细胞质和细胞核中,同时脊髓灰质的胶质细胞中也大量表达。假手术组:Nrf2 蛋白微量表达,阳性细胞染色浅淡,平均低于各时间点模型组、预处理组,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型组与预处理组大鼠术后损伤段脊髓灰质神经元 Nrf2 蛋白表达呈相似变化趋势。经图像分析,术后 6、12 h 模型组和预处理组平均 IA 值差异无统计学意义;1 ~ 5 d,预处理组均明显高于模型组,比较差异有统计学意义($P < 0.05$);术后 7 d,两组差异无统计学意义。见图 1、表 2。



A:假手术组(Nrf2);B:模型组(Nrf2);C:预处理组(Nrf2);D:假手术组(Caspase-3);E:模型组(Caspase-3);F:预处理组(Caspase-3)

图 1 5 d 时 LPS 对脊髓组织 Nrf2 和 Caspase-3 的影响 (S-P ×400)

表2 各组大鼠脊髓损伤后不同时间 Nrf2 平均 IA 值测定($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	6 h	12 h	1 d	3 d	5 d	7 d
假手术组	–	–	0.08±0.03	–	–	–
模型组	0.33±0.16^{b}	0.36±0.15^{b}	0.40±0.13^{b}	0.44±0.18^{b}	0.42±0.15^{b}	0.40±0.17^{b}
预处理组	0.35±0.16^{b}	0.38±0.16^{b}	0.55±0.14^{ab}	0.65±0.23^{ab}	0.62±0.19^{ab}	0.53±0.16^{b}

a:$P<0.05$,与模型组比较;b:$P<0.05$,与假手术组比较

2.3.2 Caspase-3 蛋白表达 假手术组极少 Caspase-3 阳性细胞表达(3.25±1.23);术后预处理组和模型组大鼠损伤段脊髓前角 Caspase-3 阳性神经细胞表达呈相似变化趋势。术后6 h开始升高,3 d时达到高峰,以后随时间延长而降低。预处理组术后1、3、5、7 d时表达均明显低于模型组($P<0.05$, $P<0.01$)。见表3、图1。

表3 各组大鼠脊髓损伤后不同时间 Caspase-3 阳性细胞数量($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	6 h	12 h	1 d	3 d	5 d	7 d
模型组	43.55±6.99	45.30±6.44	53.80±6.25	76.35±10.03	61.10±7.63	46.85±6.68
预处理组	39.60±9.13	41.30±9.39	46.10±6.67^{a}	56.20±7.57^{b}	46.45±6.96^{b}	39.45±7.37^{a}

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与模型组比较

2.4 Nissl 染色观察

假手术组:脊髓神经元核大而圆,尼氏体清晰可见,呈虎斑样,尼氏体密度为(0.84±0.33);预处理组和模型组大鼠脊髓损伤段脊髓前角神经元的尼氏小体呈相似变化趋势。术后12 h脊髓神经元损伤达到高峰,神经元内尼氏体稀疏、碎裂,染色变浅,模糊不清。3 d后随着神经元损伤逐渐恢复,尼氏小体在形态上逐渐改善。术后1、3、5、7 d,预处理组与模型组神经元尼氏体密度相比差异有显著意义($P<0.05$, $P<0.01$)。见表4。

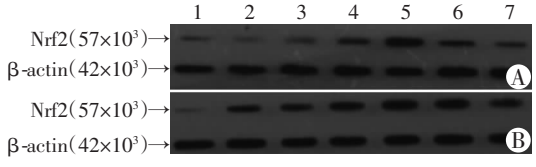
表4 各组大鼠脊髓损伤后神经元尼氏小体平均密度值($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	6 h	12 h	1 d	3 d	5 d	7 d
模型组	0.53±0.16	0.41±0.17	0.42±0.12	0.54±0.14	0.55±0.14	0.61±0.20
预处理组	0.56±0.15	0.46±0.16	0.55±0.15^{a}	0.76±0.18^{b}	0.77±0.17^{b}	0.78±0.15^{a}

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与模型组比较

2.5 Western blot 检测 LPS 对 ASCI 大鼠脊髓 Nrf2 蛋白表达的影响

假手术组大鼠脊髓组织中 Nrf2 少量表达,但表达水平恒定;与假手术组相比,模型组在术后6、12 h、1 、3 d时表达明显增加($P<0.01$),5 d和7 d时表达下降,但仍有统计学差异($P<0.05$)。预处理组12 h、1、3、5 d时表达均显著高于模型组($P<0.05$),7 d时表达略下降,但仍高于模型组,但无统计学意义。见图2、表5。



A:模型组,B:预处理组

1:假手术大鼠;2: 6 h;3: 12 h;4: 1 d;5: 3 d;6: 5 d;7: 7 d

图2 Western blot 检测 LPS 对大鼠脊髓损伤不同时间点 Nrf2 蛋白表达的影响

表5 LPS 对各组大鼠脊髓损伤后不同时间点 Nrf2 蛋白表达的影响

组别	6 h	12 h	1 d	3 d	5 d	7 d
假手术组	–	–	0.515±0.164	0.524±0.171	–	–
模型组	0.687±0.154^{a}	0.719±0.123^{a}	0.785±0.139^{a}	0.921±0.092^{a}	0.759±0.175^{a}	0.703±0.171^{a}
预处理组	0.702±0.172^{a}	0.843±0.129^{ab}	0.945±0.102^{ac}	1.126±0.101^{ac}	0.909±0.093^{ab}	0.746±0.136^{a}

a:$P<0.05$,与假手术组比较; b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与模型组比较

3 讨论

脊髓损伤的病理生理机制十分复杂,包括原发性损伤和继发性损伤2种机制。原发性损伤是在受伤的一瞬间有外力产生的不可逆性损伤;继发性损伤是脊髓原发性损伤之后,由于出血、水肿、微循环障碍、局部组织自由基生化改变等一系列因素引起脊髓再损伤,其所导致的脊髓损害远远超过原发性损伤,但其导致的损伤却是可以逆转和减轻的[7]。目前研究表明[7-9],脊髓继发性损伤的病理改变是多种因素共同作用的结果,包括微循环障碍、自由基损伤、兴奋性氨基酸的毒性作用、炎症介质损伤、电解质失衡及神经细胞凋亡6个主要方面。由于脊髓组织自身含有较多脂质,同时较其他组织器官需要更多的氧供应,因此使得自由基介导的氧化应激损伤占有重要的地位[10]。生物体抗氧化应激的防御机制主要是通过抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)。ARE 是许多抗氧化基因上游中的顺式作用增强元件。近年研究证实 Nrf2 通过介导 ARE 参与调节编码抗氧化蛋白,是细胞氧化反应调节的中枢分子。Nrf2 是机体内一个重要的保护性转录分子,广泛存在于机体的各个器官,属于碱性亮氨酸拉链(bZIP)蛋白家族,生理状态下位于细胞质中,与细胞质蛋白分子伴侣 Keap1 结合,无活性,并随即降解;当受到活性氧(reactive oxygen species, ROS)或其他亲核剂信号攻击后,Nrf2 与 Keap1 解耦联后被激活转位进入细胞核中,与 Maf 蛋白结合成异二聚体,异二聚体与基因中的 ARE 结合后激活靶基因的表达,调节抗氧化酶及蛋白的转录[11-12]。

内毒素在诱导神经细胞耐受或复制动物器官损伤模型中都有较广泛的应用,而将其作为一种保护性干预手段进行脊髓损伤的在体研究较为缺乏。目前临床上对脊髓损伤尚无有效治疗药物。Lin 等[13]研究发现,LPS 预处理可以显著提高中枢神经系统对缺血性损伤的耐受性,提供一个长期的神经保护效应。本实验用低剂量 LPS 预处理 SD 大鼠,预先激活转录因子 Nrf2,激发机体内源性保护机制,减少脊髓损伤后神经元的凋亡,以期达到改善脊髓损伤预后的目的。Jakel

等[14]研究证实,在神经元中 Nrf2 作为一个潜在的保护因子,可以通过诱导抗氧化和Ⅱ相解毒酶的表达抵抗神经毒性物质如 H_2O_2,6-羟基多巴胺等的攻击。实验中模型组和预处理组 Nrf2 蛋白表达均高于假手术组;但与模型组相比, LPS 预处理组在术后 12 h、1 d、3 d 及5 d 时转录因子 Nrf2 显著升高,其中3 d 时达到高峰,表明 Nrf2 蛋白在预处理后表达明显上调,Nrf2-ARE 信号通路被进一步激活,此信号通路的激活将显著抑制脊髓继发性神经元凋亡。

细胞凋亡是指细胞在内、外诱因刺激下产生的一种受其自身基因调控的程序性死亡形式,同时伴有特殊的形态和生化改变。脊髓组织创伤后继发性脊髓损伤过程中脊髓神经元凋亡的多少反应脊髓损伤的程度。目前 Caspase-3 是公认的凋亡过程中最重要的蛋白酶,是多条凋亡途径的共同下游效应部分,与多种细胞发生凋亡变化有密切关系。其中脊髓继发性损伤中神经元和胶质细胞的凋亡都与 Caspase-3 相关联,而且脊髓损伤后 Caspase-3 的表达与神经细胞凋亡水平呈正相关[15]。本研究观察到 Caspase-3 阳性反应产物广泛分布于损伤段脊髓灰质的前角、后角及侧角,不仅见于神经元也见于神经胶质细胞,尤其是大、中型神经元细胞质及细胞核着色均较深;内毒素预处理组在1、3、5、7 d 时 Caspase-3 阳性细胞数较模型组均显著降低,3 d 时达到高峰;同时 Nrf2 蛋白表达明显上升,术后3 d 达到高峰;Nissl 染色和 HE 染色观察显示脊髓组织形态学均较模型组有显著改善。此外,内毒素预处理组大鼠脊髓的行为学评分在5 d 和7 d 时也明显升高。因此推测低剂量内毒素对脊髓神经元的保护作用机制与 Nrf2-ARE 信号通路的激活密切相关。内毒素通过上调 Nrf2 转录因子促进其下游诸多抗氧化酶基因的表达,抑制神经元的凋亡,提高神经元的存活数量,达到改善脊髓损伤预后的效果。

综上所述,采用改良 Allen's 法复制大鼠急性脊髓损伤模型能较好的模拟临床上脊髓创伤的病理生理过程,内毒素预处理可以减轻细胞凋亡引起的脊髓损害,其机制可能是通过激活 Nrf2-ARE 信号通路启动下游抗氧化基因的转录与表达。本研究对如何通过诱导机体内源性保护机制达到减轻病损的目的作了初步探讨,作为药物性预处理的一种新形式,内毒素有可能作为临床中枢神经系统缺血高危人群的预防性用药,以减轻病发后的组织、器官损伤。但其确切的量效关系及更深层的机制尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Rubio V, Valverde M, Rojas E. Effects of atmospheric pollutants on the Nrf2 survival pathway[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2010, 17(2): 369-382.

[2] Sun Z, Zhang S, Chan J Y, *et al*. Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(18): 6334-6349.

[3] Apopa P L, He X, Ma Q. Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2008, 22(1): 63-76.

[4] 易成腊, 陈安民, 徐卫国, 等. 大鼠脊髓损伤后 Caspase-3 表达和神经细胞凋亡相关性研究[J]. 创伤外科杂志, 2004, 6(3): 171-174.

[5] Bordet R, Deplanque D, Maboudou P, *et al*. Increase in endogenous brain superoxide dismutase as a potential mechanism of lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(8): 1190-1196.

[6] Basso D M, Beattie M S, Bresnahan J C. 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.

[7] Kwon B K, Tetzlaff W, Grauer J N, *et al*. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury[J]. Spine J, 2004, 4(4): 451-464.

[8] Genovese T, Mazzon E, Esposito E, *et al*. Role of endogenous glutathione in the secondary damage in experimental spinal cord injury in mice[J]. Neurosci Lett, 2007, 423(1): 41-46.

[9] Luo J, Shi R. Polyethylene glycol inhibits apoptotic cell death following traumatic spinal cord injury[J]. Brain Res, 2007, 1155: 10-16.

[10] Genovese T, Cuzzocrea S. Role of free radicals and poly(ADP-ribose)polymerase-1 in the development of spinal cord injury: new potential therapeutic targets[J]. Curr Med Chem, 2008, 15(5): 477-487.

[11] Mann G E, Bonacasa B, Ishii T, *et al*. Targeting the redox sensitive Nrf2-Keap1 defense pathway in cardiovascular disease: protection afforded by dietary isoflavones[J]. Curr Opin Pharmacol, 2009, 9(2): 139-145.

[12] Yu X, Kensler T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention[J]. Mutat Res, 2005, 591(1/2): 93-102.

[13] Lin H Y, Huang C C, Chang K F. Lipopolysaccharide preconditioning reduces neuroinflammation against hypoxic ischemia and provides long-term outcome of neuroprotection in neonatal rat[J]. Pediatr Res, 2009, 66(3): 254-259.

[14] Jakel R J, Townsend J A, Kraft A D, *et al*. Nrf2-mediated protection against 6-hydroxydopamine[J]. Brain Res, 2007, 1144: 192-201.

[15] Springer J E. Apoptotic cell death following traumatic injury to the central nervous system[J]. J Biochem Mol Biol, 2002, 35(1): 94-105.

(**收稿**:2011-04-07;**修回**:2011-05-12)

(编辑 龙 亮)