基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0001-04

大鼠椎管减压与细胞凋亡的相关性研究

李 京,孙善全,朱淑娟,刘 辉,张兴业,高宝兵
(重庆医科大学神经科学研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察在大鼠脊髓压迫性损伤后椎管减压与神经细胞凋亡的关系。方法:健康成年 SD 大鼠 36 只,随机分为两组:(1)椎管减压组 30 只,每组 10 只,采用自制压迫装置于 L_1 水平制做椎管减压模型;(2)假手术组 6 只,只做全椎板切除不做脊髓压迫。用 HE、Nissl、TUNEL、免疫组化和 Western blot 等方法,分别于脊髓压迫 6、12 h 和 24 h 后去除压迫装置,观察减压段脊髓组织病理变化、细胞凋亡与 caspase-3 的表达变化情况。结果:TUNEL(+)细胞数于 6 h 减压时开始增高(9.62 ± 3.54),24 h 减压时达峰值(26.09 ± 4.11),与假手术组(3.38 ± 1.04)相比具有显著性差异($P<0.05$);各减压组间比较有显著性差异($P<0.05$)。caspase-3 免疫反应与 TUNEL(+)细胞数量表达变化相符。结论:大鼠脊髓损伤后,神经细胞凋亡的改变与脊髓受压时间长度相关;早期进行椎管减压可减少继发性神经细胞凋亡,加快神经功能恢复。

【关键词】脊髓损伤;减压;凋亡;半胱氨酸蛋白酶 3
【中国图书分类法分类号】R322.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-10-20

A correlative study between early vertebral canal decompression and apoptosis following spinal cord injury in the rats

LI Jing, et al
(*Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate whether spinal cord decompression is related to neural cell apoptosis after spinal cord injury. *Methods*: The spinal cord was compressed posteriorly at L_1 level using a self-designed compression device for 6, 12 h and 24 h, followed by decompression by removal of the screw. Apoptosis and cellular damage were assessed by the staining of HE、Nissl、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) and immunostaining of caspase-3. *Results*: Compared with shame-operation group, the number of TUNEL positive cells was significantly higher in the decompression at 6、12、24 h after spinal cord injury, which was consistent with immunoreactive to caspase-3 ($P<0.05$). *Conclusion*: The results indicate that the dynamic change of apoptosis was correlated with duration of spinal compression. Early decompression could reduce neural cell apoptosis following secondary spinal cord injury.

【Key words】Spinal cord injury; Decompression; Apoptosis; Caspase-3

脊髓压迫性损伤常见于脊柱外伤、脊椎转移性肿瘤、后纵韧带或(和)黄韧带钙化,近年来有报道硬脊膜骨化[1]、蛛网膜囊肿[2]也可引起脊髓受压。当脊髓受压后,可造成患者运动或(和)感觉功能减退;由于神经组织的变性、水肿,可导致椎管内的压力升高。大量临床资料和动物实验显示:早期行椎管减压,有利于神经功能的恢复[3,4],但其机制并不十分清楚。有资料显示,脊髓行椎管减压后,仍存在神经细胞凋亡,然而有关减压后细胞凋亡的动态变化规律却鲜有报道。有鉴于此,本研究在制作大鼠椎管减压模型的基础上,在不同的时间点上,观察减压后,神经细胞的凋亡变化以及 caspase-3 的表达变化,以探讨减压与细胞凋亡之间的关系,为进一步明确减压在促进神经功能恢复中的作用机制。

作者介绍:李 京(1980-),男,硕士,
研究方向:脊髓损伤与修复研究。
通讯作者:孙善全,男,教授,E-mail:sunsq2151@sohu.com
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30270437);教育部春晖计划资助项目(2004 年)。

1 材料与方法

1.1 主要材料及动物分组

健康成年 SD 大鼠 36 只(重庆医科大学实验动物中心提供),雌雄不限,体重 250 ~ 280 g,动物随机分为(1)脊髓椎管减压组(手术组)30 只,每个时间点 10 只;(2)假手术对照组 6 只,只做椎板切除不做脊髓压迫。兔抗鼠 caspase-3(美国

Santa cruz 公司）、免疫组化试剂盒、DAB 显色液（北京中山公司）、TUNEL 试剂盒（德国 Roche 公司）以及细胞裂解液（碧云天生物公司）。

1.2　模型制作

参照本课题组设计的方法[5]制作大鼠脊髓压迫模型。用 3.5%的水合氯醛腹腔注射麻醉动物后，常规逐层显露 L_1 椎弓，去除 L_1 椎板及其前、后关节突，将一钢板固定于 T_{12} 和 L_2 之间，置一压迫钢板于 L_1 对应的硬脊膜表面。从固定钢板中央小孔旋入一螺钉，至其前端与压迫钢板接触，然后逐层缝合伤口，等动物清醒，在局部麻醉下，迅速将螺钉拧入 1 圈，即向里进入 1 mm，分别压迫 6、12、24 h 后立即取出压迫装置，缝合伤口，优质饮食喂养。

1.3　组织取材

实验组每组 5 只，分别于减压 24 h 后麻醉动物，假手术组 3 只，快速开胸暴露心脏，经左心室插管至升主动脉，并剪开右心耳，用灌流泵灌入 4℃生理盐水 280 ml，待流出液清亮后再灌入 4℃的 4%多聚甲醛 300 ml（0.1 mol /L PBS 配制，pH 7.4）；取压迫段脊髓，用 4%多聚甲醛固定 24～48 h（4℃），梯度蔗糖脱水（4℃），待组织块沉底后用冷冻切片机行连续切片，片厚 10 μm，每 6 张 1 组，分别用做 HE、Nissl、TUNEL 和免疫组化染色。

1.4　原位细胞凋亡检测

按试剂盒说明书进行 TUNEL 检测。DAB 显色，阳性细胞为细胞核中有棕褐色颗粒。阴性对照：TDT 酶用含有核苷酸混合液的反应液代替，光学显微镜下每张切片随机拍摄 6 个阳性视野计数凋亡细胞。

1.5　免疫组织化学

冷冻切片置 0.3% H_2O_2- 甲醇室温 15 min，羊血清封闭 15 min，1:300 兔抗鼠 caspase-3 4℃孵育过夜；生物素标记的二抗 37℃、2 h；链霉素 - 亲和素 - 过氧化物酶复合物（SABC 复合物）37℃、1 h；每次换液前用 0.01 mol/L PBS 冲洗 8 min × 3，DAB加 2.5%硫酸镍显色，脱水、透明、封片。阳性细胞为蓝褐色，每张切片随机选取 6 个视野，光镜下计数阳性细胞。空白对照采用 PBS 代替一抗进行孵育。

1.6　Western blot

实验组每组 5 只，分别于减压 24 h 后麻醉动物，假手术组 3 只，迅速取出脊髓，用细胞裂解液提取蛋白；Bradford 方法测蛋白浓度，调节蛋白浓度一致，取等量蛋白样品（30 μg），SDS-PAGE 电泳分离蛋白，湿转将蛋白条带转移至 PVDF 膜上，5%脱脂奶粉封闭 2 h；1:400 的兔抗鼠 caspase-3 4℃孵育过夜；1:500 HRP 标记的羊抗兔 IgG 37℃、2 h；DAB 显色。应用 Quantity One 软件半定量分析 Western blot 条带吸光度，相对表达量以各样本条带吸光度值与内参 β-actin 条带吸光度值的比值计算。

1.7　统计学分析

本实验数据均以均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用 SPSS13.0 统计软件，两组之间比较采用 t 检验，多组之间比较采用方差分析，$P<0.05$ 表明差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　HE 和 Nissl 染色

脊髓受压 6 h 后减压，出现组织轻度水肿，神经元和胶质细胞肿胀，神经元突起减少；24 h 后减压时，灰白质组织结构疏松、空泡化，神经元水肿进一步加剧，核浆比增大，细胞周围间隙增宽（图 1）。Nissl 染色可见神经元数量随压迫时间延长而减少，尼氏体逐渐崩解（图 2）。

2.2　原位细胞凋亡检测

假手术组，偶见神经元和胶质细胞细胞凋亡。脊髓压迫 6 h 减压组，TUNEL 阳性细胞开始增多，主要分布于脊髓灰质前角和中间带；12 h 减压组凋亡细胞进一步增多，有些神经元细胞核深染、固缩，向一侧聚集。24 h 减压组，凋亡细胞广泛分布于脊髓灰质前角、中间带和后角（图 3）。减压组与假手术组之间以及各减压组之间相比较均有显著性差异（$P<0.05$，表 1）。

表 1　大鼠脊髓受压后不同时段减压组凋亡细胞数及 caspase-3 免疫组化阳性细胞数（$\bar{x} \pm s$）

	n	caspase-3	TUNEL(+)
对照组	3	9.23 ± 0.57	3.38 ± 1.04
6 h	5	19.91 ± 1.33*△	9.62 ± 3.54*△
12 h	5	44.16 ± 2.30*△	18.58 ± 2.11*△
24 h	5	71.45 ± 1.23*△	26.09 ± 4.11*△

注：*$P<0.05$，与假手术组比较；△$P<0.05$，各减压组之间相比较

表 2　大鼠脊髓受压后不同时段减压组 caspase-3 蛋白检测结果（$\bar{x} \pm s$）

	n	caspase-3	β-actin
对照组	3	19.46 ± 0.10	18.73 ± 0.09
6 h	5	46.50 ± 0.67*△	19.15 ± 0.83
12 h	5	81.51 ± 1.95*△	19.67 ± 0.19
24 h	5	137.49 ± 2.88*△	19.70 ± 0.40

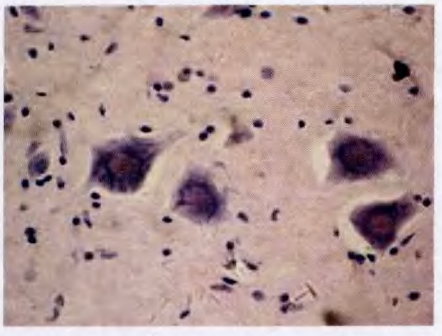
注：*$P<0.05$，与假手术组比较；△$P<0.05$，各减压组之间相比较

2.3 免疫组织化学

各时段减压组神经元均有 caspase-3 表达，阳性产物主要位于神经元胞浆及部分突起，偶有细胞核表达；细胞胞体较大，呈卵圆形或锥体形，阳性神经元散在分布于脊髓灰质前角、侧角；压迫 24 h 减压组，灰白质结构松散，不易辨认，脊髓灰质前角、中间带及后角阳性神经元的数目明显增多，着色加深，细胞间隙明显增宽（图 4）。与假手术组比较，都明显增加（$P<0.05$），各减压组之间比较有显著性差异。（$P<0.05$，表 1）。

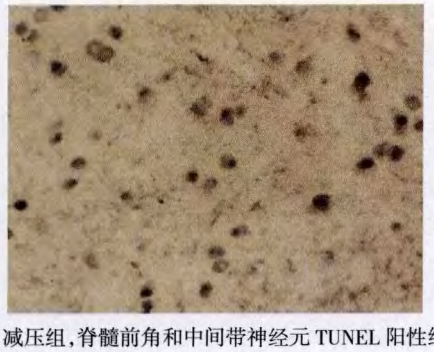
2.4 Western blot

实验组样本在特定的位置均可发生特异的免疫染色反应，将 Western blot 结果条带与标准蛋白分子质量相对比，caspase-3 分子量是 35 kD。不同时段减压组 caspase-3 的蛋白表达量均增加，于 24 h 达到高峰（表 2，图 5）。



24 h 减压组，脊髓前角神经元和胶质细胞肿胀明显，核浆比例增大，细胞间隙增宽(HE 染色 × 400)

图 1 受压段脊髓减压后 HE 染色



24 h 减压组，脊髓前角和中间带神经元 TUNEL 阳性细胞广泛表达，胶质细胞也出现凋亡(TUNEL 染色 × 200)

图 3 受压段脊髓减压后 TUNEL 染色

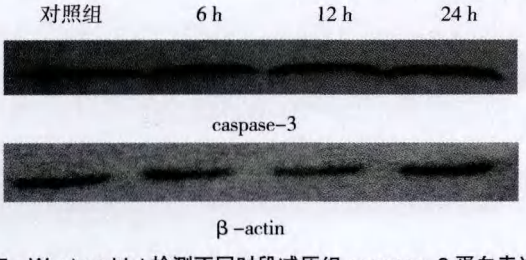
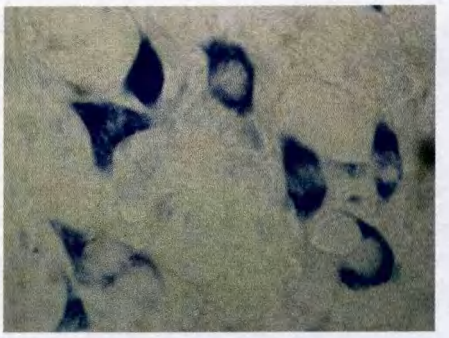


图 5 Western blot 检测不同时段减压组 caspase-3 蛋白表达变化

3 讨 论

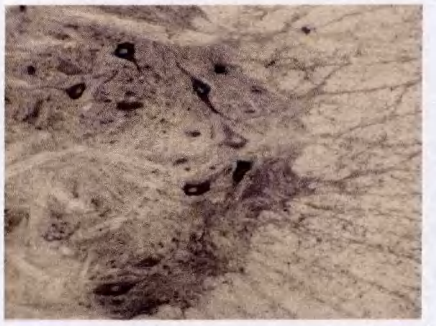
当脊髓受到机械性压迫后，可引起脊髓组织广泛的病理改变和神经功能缺失，其急性损伤不仅引起神经细胞和血脑屏障破坏并最终破坏传导束，还可以引发星形胶质细胞活化以及炎症介质释放等继发性病理反应[6]，并最终导致神经元和神经胶质细胞死亡。大量研究资料表明，凋亡是其死亡的主要方式[7]。

本实验采用自行设计的压迫器制作脊髓压迫模型[8]（图 6）；在压迫持续时间分别为 6、12 h 和 24 h 之后，松解螺丝，以模拟临床上椎管减压术。在实验中，各实验组压迫程度一致，减压后持续时间一致，所不同的是，各组压迫的持续时间



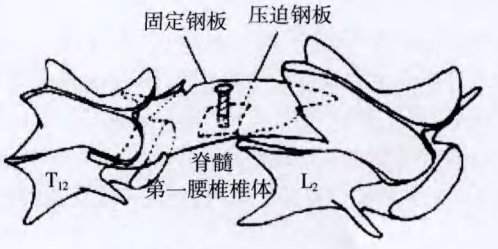
24 h 减压组，神经元数量减少，细胞核碎裂，尼氏体溃变(Nissl 染色 × 200)

图 2 受压段脊髓减压后 Nissl 染色



24 h 减压组，脊髓前角、侧角神经元 caspase-3 表达，阳性产物主要定位于胞浆(DAB 加镍染色 × 200)

图 4 受压段脊髓减压后免疫组化染色



T_{12}：第 12 胸椎，L_2：第 2 腰椎

图 6 大鼠脊髓压迫模型示意图

不同。这样的实验设计使得实验结果具有可比性,其结果能够反映出不同时间点减压后的组间差异。HE 和 Nissl 染色结果显示,在脊髓受压 6 h 后减压即有神经细胞变性、水肿和细胞数量减少。TUNEL 染色提示,6、12、24 h 减压组 TUNEL 阳性细胞数分别为 9.62 ± 3.54,18.58 ± 2.11 和 26.09 ± 4.11,其组间比较具有显著性差异($P<0.05$),表明神经细胞凋亡数随着脊髓减压时间延迟而增加,提示早期减压能够减少细胞凋亡,有助于神经功能恢复。这可能是减压术抑制了继发性损伤所致的细胞凋亡,然而其分子机制尚不十分清楚。

Caspase 是导致细胞凋亡的关键蛋白酶,根据启动活化的 caspase 不同,凋亡活化途径分为 3 种。线粒体途径,由线粒体释放细胞色素 c 启动,引起 caspase-9 活化;死亡受体途径,由细胞表面的死亡受体 Fas 启动,导致 caspase-8 被激活。除此之外,近年来研究表明,细胞凋亡还存在另外一条途径,即内质网应激途径。该途径导致 caspase-12 活化,后者再激活 caspase-9。这 3 条途径可分别通过活化 caspase-8、9、12,并最终激活 caspase-3,从而汇聚为同一条信号通路,引起细胞凋亡。细胞凋亡过程中受到多种因子如 Bcl-2、Bax、IAP 的调节,这些调节因子与凋亡途径共同组成互相交叉的信号调控网络。

Yamaura[9]采用 TUNEL 和 caspase-3 的免疫组化双染技术证实,细胞核碎片与 caspase-3 阳性产物在慢性脊髓压迫损伤的神经元和胶质细胞中共表达,提示 caspase-3 与脊髓压迫性损伤所致的细胞凋亡有关。Trisciuoglio[10]发现,TNF-α 能够诱导 HELA 细胞凋亡,细胞凋亡过程中观察到 HELA 细胞的胞核出现 DNA 断裂、核纤层蛋白崩解、组蛋白 H2B 和 H2AX 被磷酸化等病理变化,这些改变均直接或间接跟 caspase-3 的活化有关。Basil[11]采用剥夺血清钾的方法构建小脑颗粒细胞凋亡细胞模型,然后在培养液中加入 caspase-3 特异性抑制剂 XIAP,结果发现加入抑制剂之后,caspase-3 mRNA 表达水平比对照组显著降低,其凋亡细胞数也明显减少,表明 caspase-3 可促进细胞凋亡。

本研究观察到在不同时段椎管减压组,caspase-3 阳性细胞的表达变化规律。6 h 后减压脊髓前角即出现 caspase-3 少量表达;之后,caspase-3 阳性细胞数逐渐增加;于 24 h 减压,caspase-3 阳性神经元数量达峰值,其广泛分布于脊髓前角、中间带和后角。各实验组之间以及实验组与假手术组之间相比较 caspase-3 阳性细胞数具有显著性差异($P<0.05$)。这一结果表明,早期椎板减压可减少 caspase-3 阳性细胞的数量。Western Blot 结果证实:caspase-3 蛋白表达变化与 TUNEL(+)细胞的表达变化规律相一致,提示 caspase-3 与细胞凋亡相关。以上表明,随着减压时间的延迟,TUNEL(+)细胞数与 caspase-3 阳性神经元数量显著增加,进一步提示,早期减压可以减少神经细胞凋亡细胞,促进神经功能的恢复。最新的临床资料显示[12]:对于脊柱转移性肿瘤,早期椎管减压,可以减少患者瘫痪、提高其生活质量,这从临床角度为我们的实验结果提供了有力的佐证。

以上表明,早期减压可以减少细胞凋亡,加快神经功能恢复。研究显示,脊髓受压后,可引起细胞内的线粒体活化、内质网应激等改变,这些改变可导致多条细胞凋亡途径被激活。因此,除改善神经功能之外,早期椎管减压减少细胞凋亡的机制需要进行深入研究。

参 考 文 献

[1] Urakawa T, Ito T, Hirano T, et al. Thoracic myelopathy due to idiopathic epidural ossifications in a child: a case report[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2008, 33(14): E478-481.

[2] Liu J K, Cole C D, Sherr G T, et al. Noncommunicating spinal extradural arachnoid cyst causing spinal cord compression in a child[J]. J Neurosurg, 2005, 103(3 Suppl): 266-269.

[3] Kasahara K, Nakagawa T, Kubota T, et al. Neuronal loss and expression of neurotrophic factors in a model of rat chronic compressive spinal cord injury[J]. Spine, 2006, 31(18): 2059-2066.

[4] Baydin A, Cokluk C, Aydin K, et al. A new minimally invasive experimental spinal cord injury model in rabbits[J]. Minim Invasive Neurosurg, 2007, 50(3): 170-172.

[5] 梁益建,孙善全,汪克建,等.大鼠脊髓慢性压迫性损伤实验模型的建立[J]. 中国临床解剖学杂志, 2006, 24(3): 320-325.

[6] Popovich P G, Stokes B T, Whitacre C C, et al. Concept of autoimmunity following spinal cord injury: possible roles for T lymphocytes in the traumatized central nervous system[J]. J Neurosci Res, 1996, 45(4): 349-363.

[7] Springer J E, Azbill R D, Knapp P E, et al. Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury[J]. Nat. Med, 1999, 5(8): 943-946.

[8] 梁益建,孙善全,汪克建,等. 大鼠脊髓进行性压迫性损伤半胱氨酸蛋白水解酶 -12 表达与细胞凋亡[J]. 中华医学杂志, 2007, 87(15): 1063-1065.

[9] Yamaura I, Yone K, Nakahara S, et al. Mechanism of destructive path ologic changes in the spinal cord under chronic mechanical compression [J]. Spine, 2002, 27(1): 21-26.

[10] Trisciuoglio L, Bianchi M E. Several nuclear events during apoptosis depend on caspase-3 activation but do not constitute a common pathway[J]. PLoS One, 2009, 4(7): e6234.

[11] Eldadah B A, Ren R F, Faden A I. Ribozyme-mediated inhibition of caspase-3 protects cerebellar granule cells from apoptosis induced by serum-potassium deprivation[J]. J Neurosci, 2000, 20(1): 179-186.

[12] Tanaka M, Nakahara S, Ito Y, et al. Surgical treatment of metastatic vertebral tumors[J]. Acta Med Okayama, 2009, 63(3): 145-150.

(责任编辑:关蕴良)