重庆维普 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)09-1103-05

胰岛素在大鼠脊髓损伤治疗中的实验研究

江 伟,蒋电明

(重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察胰岛素对急性脊髓损伤是否有保护作用及其可能的机理。方法:60 只 SD 大鼠,雌雄不限,随机分为 A 组(损伤对照组)和 B 组(胰岛素组),每组各 30 只大鼠,Allen 法建立脊髓损伤模型,B 组给与 1IU/kg 的胰岛素,1 日 3 次腹腔灌注,连续 7d,A 组给与等量同次数的生理盐水腹腔灌注,在伤后 8h、第 3d、第 7d、第 14d、第 28d 观察脊髓凋亡细胞,在第 1d、第 3d、第 7d、第 14d、第 28d 观察尼氏体和神经元数量、GAP-43 阳性细胞、BBB 评分。结果:B 组神经元数量、GAP-43 阳性细胞、BBB 评分在多个时相点要好于 A 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),凋亡细胞 B 组明显少于 A 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:胰岛素能通过抑制脊髓神经细胞的凋亡坏死、促进神经轴突的修复和再生来达到保护脊髓神经细胞、促进功能恢复的目的。

【关键词】胰岛素;脊髓损伤;GAP-43;凋亡;BBB 评分

【中国图书分类法分类号】R651.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-10

Empirical study on application of insulin in treating traumatic spinal cord injury in rat models

JANG Wei, et al

(*Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe neuroprotective effects of insulin on traumatic spinal cord injury in rat models and discuss its potential mechanisms. *Methods*: 60 SD rats were randomly divided into A group(control group) and B group(insulin group), with 30 rats in each group, The animal SCI model was established according to method Allen's, A group and B group were respectively infused with isotonic Na chloride or 1Iu/kg insulin through abdominal cavity, three times a day, for 7 days. apoptosis neurons were observed on 8 hours, 3 days, 7 days, 14 days, and 28 days after SCI, and tigroid body, neurons, GAP-43 positive cells, and BBB score were measured on 1 day, 3 days, 7 days, 14 days, and 28 days after SCI. *Results*: Neuron number, GAP-43 positive cells, and BBB score in multitude time points were significantly higher in B group than in A group($P<0.05$ or $P<0.01$). The number of apoptosis neurons in B group was less than in A group's($P<0.05$ or $P<0.01$). *Conclusions*: Insulin has neuroprotective effects on traumatic spinal cord injury in rat models. It can promote recovery of function by depressing apoptosis of neurons and promoting recovery and regeneration of neuraxon.

【Key words】 Insulin; Spinal cord injury; GAP-43; Apoptosis; BBB score

随着工业及交通工具的飞速发展,创伤所致的脊髓损伤逐渐增多,致残率相当高,目前对脊髓损伤的治疗仍无特效的治疗方法。近年来发现胰岛素及胰岛素样生长因子广泛存在于中枢神经系统,而有实验发现胰岛素可刺激神经细胞的存活及神经元再生及神经元的突触分化和成熟[1,2],本试验将研究在大鼠脊髓损伤后给于胰岛素的治疗作用及可能的作用机制。

作者介绍:江 伟(1976-),男,硕士,研究方向:脊髓损伤。

通讯作者:蒋电明,男,教授,E-mail:jdm571026@vip.163.com。

1 材料与方法

1.1 动物模型的制作

给大鼠以 10%的水合氯醛 300mg/kg 腹腔灌注,麻醉后根据改良 Allen 法建立中等脊髓损伤模型。后正中切口,逐层切开至椎板,将 T_{8-10} 椎板全部咬除,暴露硬脊膜,在硬脊膜表面放置一 4mm×3.0mm 大小的曲度与脊髓表面弧度相似的铜制垫片,用 5g 重物在玻璃试管的引导下从 8cm 高处垂直自由落下,打击垫片,形成致伤力为 40gcf,建立中等脊髓损伤,撞击成功的标志为:大鼠出现摆尾反射。双下肢及躯体回缩扑动,双下肢弛缓性瘫痪。

1.2 材料、动物及分组

重庆维普 http://www.cqvip.com

试剂:胰岛素(万邦医药),GAP-43 抗体及 SABC 试剂盒(博士德),TUNEL 试剂盒(Roche)。选用 60 只健康的 8～10 周 SD 大鼠(由重庆医科大学动物中心提供),体重 200～250g,雌雄不限,动物随机分为 2 组,每组 30 只,A 组(对照组),脊髓损伤后给于等量生理盐水腹腔灌注处理,连续 1 周;B 组(胰岛素组),腹腔灌注胰岛素 1IU/kg(血糖不低于 3mmol/L,低于时给与葡萄糖注射液),3 次 /d,连续给药 1 周。给药期间进行人工膀胱排尿,直到膀胱反射恢复。

1.3 取材及标本制作

各组大鼠在脊髓损伤后 8h、第 1d、第 3d、第 7d、第 14d、第 28d(n=5)麻醉后,开胸左心室插管至主动脉弓,右心耳剪一小口,生理盐水灌注至清亮液体流出后换 4%多聚甲醛灌注 30min,取包括伤段的脊髓约 1cm,继续置于 4%多聚甲醛内作后固定。石蜡包埋,做连续切片,片厚约 5μm 备用。

1.4 观察指标和资料收集

①BBB 评分(The Basson、Beattle、Bresnahan rating scale):BBB 评分表是根据观察脊髓损伤大鼠的肢体恢复情况而建立的,其评分根据脊髓损伤大鼠的肢体恢复的不同情况而分为 0～21 分,由熟悉 BBB 评分的非本实验的人员观察、记录大鼠后肢运动情况,进行 BBB 评分。

②Nissl 染色:从每只大鼠连续切片中随机抽取,作 Nissl 染色,观察尼氏体和神经元数量的变化。

③生长相关蛋白(Growth-associated protein-43,GAP-43)免疫组织化学染色:从每只大鼠连续切片中随机抽取切片,采用系统卵白素 - 生物素免疫组化法(SABC)法,按说明书上的操作步骤进行染色,即脱蜡,3%双氧水消除内源性过氧化物酶,微波修复抗原,BSA 封闭,再加一抗(GAP-43 抗体),再加二抗和 SABC,经二胺基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染。组织细胞中出现棕黄色颗粒为阳性细胞。以每张切片,选取阳性细胞最多的 5 个高倍视野进行阳性细胞计数,算出每个高倍视野的阳性细胞的均数。

④神经细胞凋亡检测:采用原位末端标记(TUNEL)法,从每只大鼠连续切片中随机抽取切片,染色步骤按说明书进行。棕色颗粒为阳性细胞。每张切片,选取阳性细胞最多的五个高倍视野进行阳性细胞计数,计数阳性细胞百分比。

1.5 统计学处理

用 SPSS11.5 统计软件包进行数据统计,数据用均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采取两组独立样本 t 检验。

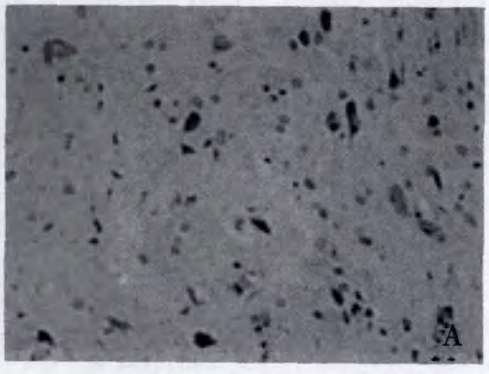
2 结 果

2.1 Nissl 染色结果

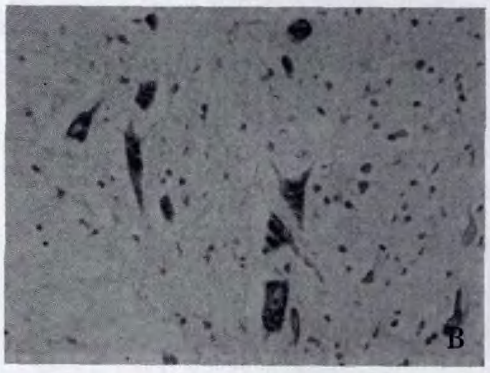
脊髓损伤后,神经元肿胀,细胞核偏位,尼氏体由正常的虎斑粗颗粒状逐渐溶解淡染,神经纤维水肿明显,病变以脊髓灰质中央部最为严重。其中,A 组(对照组)病变较 B 组(胰岛素组)严重,神经元肿胀明显,尼氏体溶解胞浆呈空泡状改变,着色神经元数量也较 B 组(胰岛素组)为少(P<0.05),见表 1,上述病变在第 1 周内最为显著(见图 1)。以后尼氏体逐渐有所恢复,神经元着色也逐渐加深。

2.2 生长相关蛋白(GAP-43)染色结果

在脊髓损伤后第 1d,GAP-43 阳性细胞就开始出现,GAP-43 阳性细胞主要在脊髓灰质中,在白质中有少量表达,损伤后第 7d 阳性细胞数达到高峰(图 2),以后逐渐下降,而尤其是对照组下降迅速,到第 28d 时两组仅偶有阳性细胞的表达。在第 3d,第 7d,第



A 组(对照组) Nissl 染色



B 组(胰岛素组) Nissl 染色

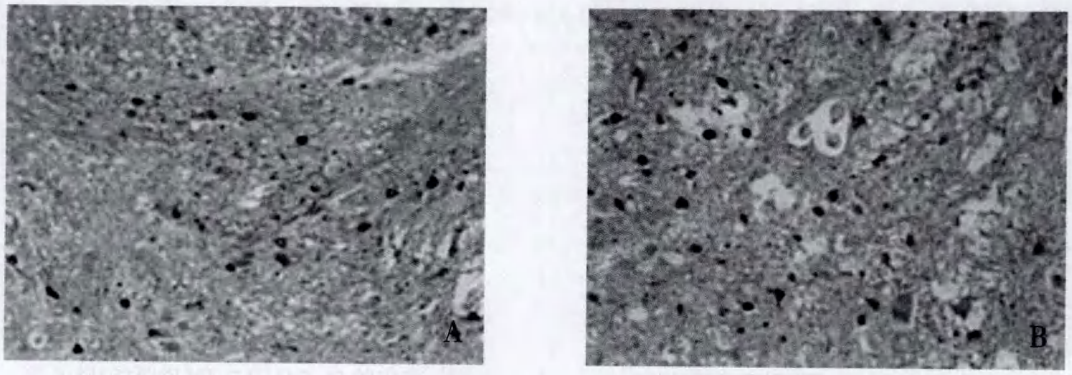
图 1 第 7d 脊髓 Nissl 染色×400

表 1 Nissl 染色神经元数量(个)

	1d	3d	7d	14d	28d
损伤对照组	31.60 ± 3.36	20.60 ± 2.70	22.20 ± 3.42	25.20 ± 3.03	25.60 ± 3.36
胰岛素组	33.80 ± 4.14	25.60 ± 3.78[a]	27.40 ± 3.65[a]	29.60 ± 2.30[a]	30.20 ± 2.86[a]

[a]:损伤对照组和胰岛素组 t 检验,P<0.05

重庆维普 http://www.cqvip.com



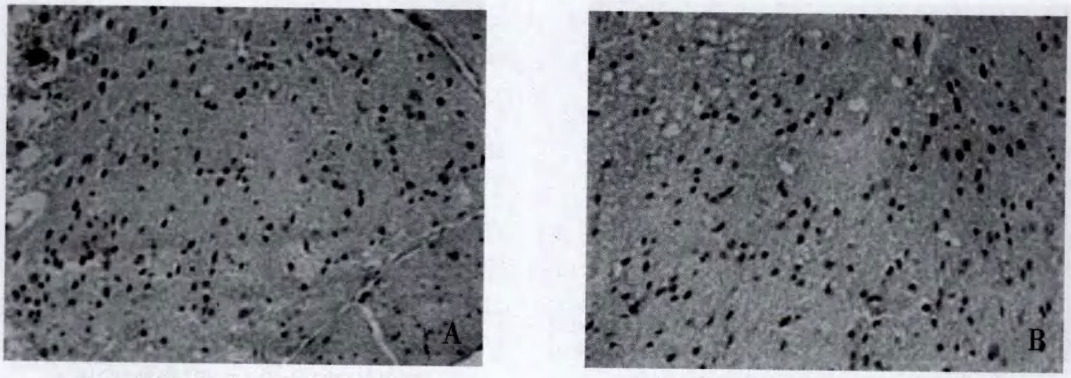
A 组(对照组)第 7d GAP-43 的表达　　B 组(胰岛素组)第 7d GAP-43 的表达

图 2　第 7d GAP-43 表达的检测×400

表 2　GAP-43 阳性细胞(个/高倍视野)

	1d	3d	7d	14d	28d
损伤对照组	15.80 ± 2.49	18.60 ± 3.05	20.20 ± 2.17	9.80 ± 2.39	1.00 ± 1.00
胰岛素组	18.00 ± 2.65	23.80 ± 3.11	31.20 ± 2.77[b]	17.00 ± 2.92[b]	0.80 ± 1.30

[a]:损伤对照组和胰岛素组 t 检验 $P<0.05$,b:损伤对照组和胰岛素组 t 检验,$P<0.01$



A 组(对照组)第 7d 凋亡细胞的检测　　B 组(胰岛素组)第 7d 凋亡细胞的检测

图 3　第 7d 凋亡细胞的检测×400

14d 这 3 个时间点,胰岛素组较损伤对照组阳性细胞数多且着色深,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),见表 2。

2.3　脊髓细胞凋亡的染色结果

损伤后 8h 脊髓组织中即开始出现凋亡的阳性细胞,在灰质和白质中均有表达,3d 时阳性细胞数较前明显增多,在第 7d 时,阳性细胞表达达高峰(图 3),以后逐渐下降,在第 28d 时,凋亡的阳性细胞已很少有表达,在 8h、3d、7d、14d 时,胰岛素组凋亡细胞数明显较损伤对照为低,差异有统计学意义,见表3。

2.4　BBB 评分结果

实验前各组大鼠评分均为 21 分,损伤后第 1d 时(动物已从麻醉中完全苏醒),两组 BBB 评分无显著差异,随后双下肢功能逐渐有所恢复,在 3d 时,两组 BBB 得分有差异,胰岛素组得分大于损伤对照,但无统计学意义,在 1 周后胰岛素组得分就明显好于损伤对照组($P<0.05$),在第 2、4 周表现得更为明显($P<0.01$)。见表 4。

3　讨　论

脊髓损伤,可由外伤等直接引起神经细胞坏死进而造成功能障碍的原发性损伤引起,也可由继发出血、水肿等多因素引起神经细胞的凋亡、坏死的继发性损伤引起,二者共同加重脊髓的损伤。而近年研究表明细胞凋亡在继发性脊髓损伤中起着重要的作用[3]。

胰岛素在很多组织中都具有抑制细胞凋亡的作用,如在心肌缺血再灌注损伤中,胰岛素能抑制心肌细胞的凋亡[4],Rizk NN 等在大鼠大脑局部缺血

重庆维普 http://www.cqvip.com

表 3 各个时相点凋亡细胞百分比(%)

	8h	3d	7d	14d	28d
损伤对照组	19.80 ± 2.59	40.2 ± 4.09	43.80 ± 4.15	28.2 ± 3.03	10.40 ± 3.05
胰岛素组	15.00 ± 3.54[a]	33.6 ± 3.65[a]	34.00 ± 3.81[b]	24.00 ± 3.39[a]	8.60 ± 2.07

[a]:损伤对照组和胰岛素组 t 检验 $P<0.05$,[b]:损伤对照组和胰岛素组 t 检验 $P<0.01$

表 4 BBB 评分值

	1d	3d	7d	14d	28d
损伤对照组	1.48 ± 1.33	1.95 ± 1.50	5.20 ± 2.08	10.10 ± 2.13	12.80 ± 2.49
胰岛素组	1.44 ± 1.19	2.45 ± 1.15	7.07 ± 2.60[a]	14.60 ± 2.12[b]	17.60 ± 1.14[b]

[a]:损伤对照组和胰岛素组 t 检验 $P<0.05$,[b]:损伤对照组和胰岛素组 t 检验 $P<0.01$

损伤后应用胰岛素,能明显降低凋亡神经细胞的数量,减少大脑的损伤面积[5]。我们在实验中也发现,胰岛素组脊髓神经元凋亡细胞数在损伤早期各个时相点(8h、1d、3d、7d、14d)明显低于损伤对照组($P<0.05$),这说明胰岛素能抑制脊髓损伤后的神经细胞凋亡,从而降低因凋亡而引起的脊髓继发性损害。胰岛素抑制细胞凋亡的机理可能是通过如下途径来实现:胰岛素在胰岛素受体(Insulin receptor,IR)介导下,主要通过 IRS-I-Ras-MAPK(丝裂原激活蛋白激酶途径)和 IRS-I-PI3K-PKB(磷脂酰肌醇 -3- 激酶途径)2条信号传导通路参于神经细胞的生存及凋亡调控。在 IRS-I-Ras-MAPK 途经中,胰岛素与胰岛素受体结合后与 IR 底物结合,级联激活丝裂原激活蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase,MAPK),通过进而调控转录因子的表达,启动相应的基因转录系统发挥抗细胞凋亡的作用[6]。在 IRS-I-PI3K-PKB 信号传导通路中,胰岛素与胰岛素受体结合后与 IR 底物结合,经过一系列反应,激活 PKB/AKT(蛋白激酶 B),而 PKB/AKT(蛋白激酶 B)能促进细胞生存及抑制细胞的凋亡[7]。此外,由于胰岛素和胰岛素生长因子(Insulin growth factor,IGF),IR 和胰岛素生长因子Ⅰ(IGF-IR)具有高度同源性,结构相似,而且 IGF-IR 和 IR 有许多相同的底物[8],高浓度的胰岛素也能和 IGF-Ⅰ受体结合,这使得胰岛素也能发挥 IGF-Ⅰ的生物功能,而 IGF-Ⅰ已被大量实验证实,它在脊髓损伤中对神经细胞有很重要的保护作用。以前人们认为由于有血脑屏障的存在,胰岛素难以进入中枢神经系统,也无中枢性作用。但近年来发现中枢神经系统内广泛存在 IR。而且外周胰岛素可以通过血脑屏障进入大脑和脊髓,这就使得外周给与的胰岛素能在脊髓损伤中发挥其抗凋亡的作用。

脊髓损伤后,损伤神经的修复,无疑也能促进机体功能的恢复。胰岛素在中枢神经系统中的生理功能有很多,可促进蛋白质等生物大分子的合成,细胞的增殖、分化等,正常生理浓度的胰岛素及其它胰岛素生长因子系统(IGFS)成员可维持神经元的存活,而高浓度的胰岛素和其它胰岛素生长因子系统成员可刺激神经细胞的存活和增加胸腺嘧啶核苷的合成[1]。较早就有人证实胰岛素可刺激培养的神经元再生及神经元的突触分化和成熟[9]。同时也有体外人体神经胚瘤细胞培养试验表明,通过胰岛素的作用,神经生长因子和受体具有高亲合性和很高的神经轴突的出芽反应[9],而生长相关蛋白(GAP-43)被认为是神经元生长发育和轴突再生的一个分子标记物[10],其主要位于生长锥内,与轴触再生有密切的关系。因此我们通过检测生长相关蛋白(GAP-43)表达的情况来了解胰岛素是否能影响神经轴突的修复和再生,本试验发现在脊髓损伤后,胰岛素组的 GAP-43 的表达在多个时相点高于对照组。这说明胰岛素对脊髓损伤后神经轴突的修复和再生确有促进作用。

在组织形态学观察上,我们选择了 Nissl 染色,这是由于尼氏体实质上是神经元内的粗面内质网,在 Nissl 染色后在光镜下呈虎斑状,当神经元受损时,粗面内质网肿胀、核糖体脱落,在 Nissl 染色下尼氏体逐渐分解、消散成空泡状,整个神经元 Nissl 染色变得淡染。因此,Nissl 染色的结果能较好地反映脊髓神经元是否发生病理性改变。正是因为胰岛素具有上述抑制凋亡及促进神经轴突的修复和再生的作用,在 Nissl 染色形态学观察中,我们也能发现 B 组(胰岛素组)神经元数量在多个时相点都较 A 组(损伤对照组)为多,且 Nissl 染色的着色情况也较 A 组为好。

同时,可能正是因为有上述的作用机理及形态

重庆维普 http://www.cqvip.com

学基础,我们在行为学观察上发现,B 组(胰岛素组)的 BBB 评分要好于 A 组(损伤对照组)。

总之,脊髓损伤后,由于胰岛素能抑制细胞凋亡、促进神经轴突的修复和再生,给与胰岛素治疗,的确能起到一定的神经保护作用,有利于脊髓损伤后功能的恢复,而且,胰岛素相对于其他神经营养及保护药而言,价格便宜,用药方便,这为临床治疗脊髓损伤又开辟出一条新的治疗途径。

参 考 文 献

[1] Recio-Dinto E,Ishii DN. Insulin and insulin like growth factor receptors regulating neurite formation in cultured human neuroblastoma cells[J]. Neurosic Res,1988;19(3):312-320.

[2] Fernyhough P,Willars GB,Lindasy RM,et al. Insulin and insulin-like growth factor I enhance regeneration in cultured adult rat sensory neurons[J]. Brain Research,1993;607(6):117-124.

[3] LI GL,Farooque M,Olsson Y,et al. Changes of Fas ang Fas ligang immunoreactivity after compression trauma to rat spinal cord [J]. Acta Neuropathol(Ber),2000;100(8):75-81.

[4] Gao F,Gao E,Yue TL,et al. Nitric oxide mediates the anti-apoptotic effect of indulin in myocardial ischemia-reperfusion the roles of PI3-kinase,AKT,and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation[J]. Circulation,2002;105(12):1497-1502.

[5] Rizk NN,Rafols JA,Dunbar JC. Cerebral ischemia-induced apoptisis and necrosis in normal and diabetic rat effects of insulin and c-peptide[J]. Brain Research,2006;1096(1):204-212.

[6] Khokhlatchev AV,Canagarajah B,Wilsbacher J,et al. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation[J]. Cell,1998;93(4):605-615.

[7] Robey RB,Hav N. Mitochondrial hexokinases,novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt[J]. Oncoqene,2006;25(34):4683-4696.

[8] Winnay JN,Bruning JC,Burks DJ,et al. Gab-1-mediated IGF-I signaling in IRS-1-deficient 3T3 fibroblasts[J]. Biol Chem,2000;275(14):10545-10550.

[9] Recio-Pinto E,Ishii DN. Effects of insulin,insulin-like growth factor-II and nerve growth factor on neurite outgrowth in cultured human neuroblastoma cells[J]. Brain Res,1984;302(2):323-334.

[10] Wang XY,Zhang JT. Effects of ginsenoside Rgl on synaptic plasticity of freely moving rats and its mechanism of action[J]. Acta Phamacol Sin,2003;22(1):657-662.

(责任编辑:冉明会)

(上接第 1091 页)

血管的形成和黄斑水肿,这与我们的结果基本一致。虽然我们初步证实 TA 可能通过降低视网膜组织中 VEGF 及 IL-6 的表达从而减轻视网膜水肿程度,但是否存在与其它协同因子的相互作用尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] T ranos PG,Wickremasinghe SS,Stangos NT, et al. Macular edema[J].Survey of Ophthalmology,2004;49(5):470-490.

[2] Dubey AK. Intravitreal injection of triamcinolone acetonide for diabetic macular edema: principles and practice[J]. Indian Journal of Ophthalmology,2006;54(4):290-291.

[3] Hofman P,Blaauwgeers HG,Tolentino MJ,et al. VEGF-A induced hyperpermeability of blood-retinal barrier endothelium in vivo is predominantly associated with pinocytotic vesicular transport and not with formation of fenestrations. Vascular endothelial growth factor-A [J].Current Eye Research,2000;21(2):637-645.

[4] Barouch FC, Miyamoto K, Allport JR, et al. Integrin-mediated neutrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2000;41(5):1153-1158.

[5] 马 进,吴德正,高汝龙,等. 兔视网膜细胞间水肿及玻璃体收缩性状改变的相关研究[J].中华眼底病杂志,2004;20(1):29-32.

[6] Dick JS. Macular edema[J]. Int Ophthalmol Clin,1999;39(4):1-18.

[7] Antonetti DA, Barber AJ, Khin S, et al. Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occluding content:vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells[J]. Diadetes,1998;47(12):1953-1959.

[8] Shimizu E, Funatsu H, Yamashita H. Plasma level of interleukin-6 is an indicator for predicting diabetic macular edema[J]. Jan J Ophthalmol,2002;46(1):78-83.

[9] Martidis A, Duker JS, Greenberg PB, et al. Intravitreal triamcinolone for refractory diabetic macular edema[J].Ophthalmology,2002;109(5):920-927.

[10] Jonas JB, Kreissig I, Sofker A, et al. Intravitreal injection of triamcinolone for diffuse diabetic macular edema[J]. Arch Ophthalmol,2003;121(1):57-61.

[11] Ebrahem Q, Minamoto A, Hoppe G, et al. Triamcinolone acetonide inhibits IL-6 and VEGF induced angiogenesis downstream of the IL-6 and VEGF receptors [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2006;47(11):4935-4941.

[12] Tong JP,Lam DS,Chan WM,et al. Effects of triamcinolone on the expression of VEGF and PEDFin human retinal pigment epithelial and human umbilical vein endothelial cells[J]. Molecular vision,2006;12(4):1490-1495.

(责任编辑:谭乐勤)