

## 重组人红细胞生成素对大鼠脊髓损伤后神经细胞凋亡的保护作用

王金光 郑启新 王运涛 赵铭 郭晓东

[摘要] 目的 观察大鼠脊髓损伤(SCI)后损伤段脊髓神经细胞凋亡机制和相关因子的表达,以及重组人红细胞生成素(rHuEPO)对其的影响。方法 30只SD大鼠分为4组,建立SCI模型,观察rHuEPO对大鼠神经功能的影响;免疫组化法检测损伤脊髓神经细胞凋亡因子(Bcl-2、Bax、Fas)的表达;TUNEL标记凋亡细胞;比较各组间差别。结果 治疗组的神经功能较损伤组提高( $P < 0.05$ );损伤组的凋亡阳性细胞多于治疗组;治疗组Bcl-2阳性表达细胞多于损伤组( $P < 0.05$ )。结论 凋亡是SCI后神经细胞死亡的一种重要方式;rHuEPO能抑制脊髓神经细胞凋亡,对损伤脊髓的神经功能有保护作用。

[关键词] 脊髓损伤;凋亡;重组人红细胞生成素; $\beta$ -七叶皂甙钠;大鼠

Protective effect of recombinant Human Erythropoietin on neuronal apoptosis after spinal cord injury in rats WANG Jin-guang, ZHENG Qi-xin, WANG Yun-tao, et al. Department of Orthopedics, Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei, China

[Abstract] Objective To observe the expression of apoptosis factor, the mechanism of neuronal apoptosis and protective effect of recombinant Human Erythropoietin (rHuEPO) after spinal cord injury (SCI) in SD rats. Methods 30 SD rats were divided into four groups including control group, SCI group, treatment groups A and B. The animal SCI model was established with Allen's method. The changes of nerve functions of rats of 4 groups were observed before and after treating with rHuEPO. The expressions of apoptosis factors (Bcl-2, Bax, Fas) were tested with immunocytochemistry technique, and apoptosis neurones were labeled with TUNEL dyeing. Results The grade of nerve function was improved distinctly in treatment groups, but group B was better than group A. The number of the positive cells for Fas and Bax in SCI group was more than that in treatment groups ( $P < 0.05$ ), and group A was more than group B. The number of Bcl-2 positive cells in the treatment groups was greater than that in SCI group ( $P < 0.05$ ). Conclusion Apoptosis is a important death mode of neuron after SCI. rHuEPO can distinctly improve the comeback of the nerve function and protect the nerve tissue.

[Key words] spinal cord injury; apoptosis; recombinant Human Erythropoietin (rHuEPO); sodium  $\beta$ -aescin; rats

中图分类号:R651.2 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2005)02-0084-03

[本文著录格式] 王金光,郑启新,王运涛,等.重组人红细胞生成素对大鼠脊髓损伤后神经细胞凋亡的保护作用[J].中国康复理论与实践,2005,11(2):84-86.

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后,除创伤造成的直接损伤外,脊髓局部还将发生一系列继发性病理改变,而且造成的损害超过原发性损伤<sup>[1]</sup>。近年来的研究显示,中枢神经系统损伤后,神经细胞的凋亡在继发性损伤中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。本研究选用重组人红细胞生成素(recombinant Human Erythropoietin, rHuEPO)和 $\beta$ -七叶皂甙钠治疗SCI,探讨其抑制神经细胞凋亡的作用,研究神经细胞的凋亡机制及相关凋亡因子的表达<sup>[3]</sup>。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 雌性成年SD大鼠30只,购自同济医学院动物中心,体重240~260g,随机分成4组:①空白组( $n=6$ ):只暴露脊髓,不损伤;②损伤组( $n=8$ ):损伤脊髓,不治疗;③治疗A组( $n=8$ ):损伤后

仅用rHuEPO治疗;④治疗B组( $n=8$ ):损伤后用rHuEPO和 $\beta$ -七叶皂甙钠联合治疗。

1.2 SCI模型制作 采用改良Allen氏法,腹腔内注射3%戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉大鼠,以T<sub>12</sub>为正中切口,暴露硬脊膜,用自制9g重锤在玻璃导管引导下从3cm高度自由下落打击脊髓,以双下肢猛烈收缩为有效打击。

1.3 药物治疗 造模成功后1h开始经尾静脉给药。治疗B组注射 $\beta$ -七叶皂甙钠0.1mg/kg/d,每天1次,连用11d;rHuEPO300U/kg/d,静脉推注,每日1次,共治疗5次(术后1d3d5d8d11d)。治疗A组仅给rHuEPO,用药方法同治疗B组。空白组及损伤组尾静脉推注生理盐水。

## 1.4 神经功能评定

1.4.1 行为观察 参照Gale的神经功能行为分析法,结合Means及胥少汀等的方法加以改良,按以下标准计分评估<sup>[4]</sup>:①0分:损伤平面以下无任何反应,双后肢肌力为零,感觉丧失;②1分:有感觉存在,对针刺有

作者单位:430022 湖北武汉市,华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科。作者简介:王金光(1965-),男,河南焦作市人,博士研究生,副主任医师,主要研究方向:脊柱脊髓损伤。

保护性反应,但无自主运动;③2 分:双后肢有轻微运动,但无功能,不能负重;④3 分:双后肢有明显运动,但不能负重;⑤4 分:能负重行走数步,但不稳定,不能持久;⑥5 分:能缓慢行走,不灵活,存在一定的缺陷;⑦6 分:正常行走和跑动。

1.4.2 斜板试验 将大鼠俯卧于一块 40×80 cm 的平整木板上,头侧逐渐抬高至出现动物向下滑行,此时木板与地面的夹角为斜板角度,以此观察大鼠的功能恢复情况。倾斜角度的大小决定于大鼠的抓握能力,因而该项实验能反映神经功能恢复情况。

在动物造模后 1 d、12 d 分别由同一实验者记录功能评分。

1.5 组织学检查 术后 12 d 处死大鼠,心脏灌注冰盐水及 4 %多聚甲醛缓冲液,取损伤段脊髓约 5 mm,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。

1.6 神经细胞凋亡因子检测 术后 12 d 所取各组标本做免疫组织化学染色,检测细胞凋亡因子 Bcl-2、Bax、Fas。免疫组织化学染色方法按 SABC 法,阳性细胞呈棕色。高倍镜下计数阳性染色细胞,计算阳性率。

1.7 凋亡神经细胞检测 采用原位末端标记(TdT-mediated x-DUTP nick end labling, TUNEL)法,镜下观察阳性标记的凋亡细胞(细胞核呈棕褐色),计算凋亡指数(apoptosis index, AI)。

1.8 统计学处理 所得数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 统计软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 神经功能 空白组大鼠神经功能稳定,运动正常。SCI 大鼠双后肢软瘫,肌张力低,损伤平面以下各种反射不同程度减弱或消失,排尿需人工按压。治疗组大鼠神经功能较治疗前提高,治疗 B 组的神经功能好于治疗 A 组(见表 1、表 2)。

表 1 各组行为评分比较

组别	1 d	12 d	<i>P</i> 值
空白组	6	6	1.00
损伤组	0.87±0.64	1.50±0.53	0.053
治疗 A 组	0.75±0.707	3.25±0.707	0.000
治疗 B 组	1.00±0.756	4.25±0.707	0.000

注:损伤组、治疗 A 组和治疗 B 组组间比较, *F* = 41.64, *P* < 0.05。

表 2 各组斜板试验比较(°)

组别	1 d	12 d	<i>P</i> 值
空白组	72.16±3.76	69.50±4.72	0.350
损伤组	22.87±2.23	25.87±3.22	0.048
治疗 A 组	23.13±1.88	37.75±4.23	0.000
治疗 B 组	24.00±2.39	54.00±4.53	0.000

注:损伤组、治疗 A 组和治疗 B 组组间比较, *F* = 41.64, *P* < 0.05。

2.2 组织学检查 损伤组表现为损伤范围固定,损伤段脊髓变细,有大片坏死、囊腔及空洞形成,周围有炎性细胞浸润,大量胶质细胞增生,白质区仍有部分正常结构。治疗组脊髓灰、白质界限清楚,大部分神经组织(细胞及轴突)正常,少数神经细胞及轴突退变;治疗 B 组的脊髓组织结构变化好于 A 组。

2.3 免疫组化检测 空白组脊髓组织未见或仅见极少凋亡细胞。损伤组损伤局部节段神经元及神经胶质细胞中 Bax 大量表达, Bcl-2 表达较低;治疗组 Bcl-2 表达明显增加,且治疗 B 组高于治疗 A 组。损伤组中 Fas 表达较高,凋亡阳性细胞广泛分布于脊髓灰、白质中;治疗组 Fas 表达较低(见表 3)。

表 3 各组免疫组化检测结果比较(%)

组别	Bcl-2	Bax	Fas
损伤组	9.75±1.83	25.75±3.37	41.37±2.83
治疗 A 组	14.63±2.83 <sup>a</sup>	19.87±3.56 <sup>a</sup>	26.00±3.29 <sup>a</sup>
治疗 B 组	21.63±5.34 <sup>a, b</sup>	12.00±2.97 <sup>a, b</sup>	17.50±2.20 <sup>a, b</sup>

注:<sup>a</sup>:与损伤组比较, *P* < 0.05; <sup>b</sup>:与治疗 A 组比较, *P* < 0.05。

2.4 TUNEL 染色 空白组未见凋亡阳性细胞。损伤组及治疗 A、B 组可见 TUNEL 阳性细胞, AI 分别为(50.75±5.39)、(34.75±3.01)和(24.00±3.46)(*F* = 86.72, *P* < 0.05)。

3 讨论

rHuEPO 能增加血液红细胞数,使血氧饱和度和血氧含量增加。最近有人报道用 rHuEPO 治疗缺血性脑病、脊髓缺血性损害<sup>[5]</sup>,显示该药具有神经保护功能,可抑制凋亡和炎症反应,改善局部血流及氧供应,对 SCI 有潜在的保护和治疗意义<sup>[6]</sup>。

β-七叶皂甙钠系由中药娑罗子的成熟果实提取的皂钠盐经冷冻干燥而成。β-七叶皂甙钠能提高机体促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)和可的松的血浆浓度,促进血管壁增加前列腺素(prostaglandin, PG) F<sub>2α</sub>分泌,清除机体内的自由基,从而起到抗炎、抗渗出作用,以及抗水肿、提高静脉血流、促进淋巴回流、改善微循环和保护血管壁作用。SCI 后应用 β-七叶皂甙钠能改善 SCI 处组织淋巴和血液循环,逆转电解质紊乱及失调,抑制炎症,减少自由基,保护脊髓神经细胞亚微结构,抑制凋亡,促进神经功能恢复。

凋亡在神经系统的发育过程中起重要作用<sup>[7-8]</sup>,在神经系统损伤及神经系统退行性疾病的过程中也可见凋亡的发生<sup>[9]</sup>。目前发现,有多种凋亡相关基因参与这一过程。本实验中,作者检测了 Bcl-2、Bax 和 Fas 这 3 个凋亡因子,并用 TUNEL 标记法检测凋亡细

胞<sup>[10]</sup>。

Bcl-2 家族中的 Bax 和 Bcl-2 分别对细胞凋亡起正负调控作用, Bax 相对优势时促进细胞凋亡。Bax 的表达无严格组织特异性, 很多组织器官中均可检出其产物。而 Bcl-x 基因由于其 mRNA 接拼方式的差异, 可产生两种不同的产物: Bcl-x<sub>l</sub> 和 Bcl-x<sub>s</sub>, 前者的作用与 Bcl-2 相同, 可抑制凋亡, 而後者的作用与 Bax 相同。Bcl-2 是一种胞浆蛋白, 在中枢神经系统发育过程中表达水平较高, 随着神经系统的逐渐完善其表达水平逐渐降低。Bcl-2 属原癌基因, 可能通过抑制活性氧的产生<sup>[11]</sup>而抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的凋亡及脂质过氧化物的产生。

Fas 属于肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)家族成员, 为跨膜糖蛋白, 其胞浆区含有与 TNFR 胞浆区高度同源的序列, 参与 Fas 介导细胞凋亡信号的传递, 称为“死亡区”(death domain)。Fas 广泛表达于多种机体组织细胞(尤其是免疫细胞)表面。抗 Fas 抗体或 Fas 配体(FasL)与 Fas 结合后, 可诱导 Fas<sup>+</sup> 细胞凋亡, 故 Fas 又称为“死亡受体”<sup>[12]</sup>。Fas 途径由 FasL-Fas 结合所介导的一系列激活事件组成: 各种内外刺激因子首先作用于细胞膜上的 Fas 系统, FasL 形成同源 3 聚体与 3 个 Fas 分子交联, 使胞内鞘磷脂酶活化, 水解各种鞘磷脂产生神经酰胺, 神经酰胺作为第二信使, 传递凋亡信号, 通过活化 Caspase-8 继而活化 Caspase-3 而引发级联反应, 最终引起 DNA 降解。Fas 系统在维持组织正常发育、调控免疫应答、调节机体生理平衡及某些病理过程中起重要作用<sup>[13]</sup>。

本实验显示, SCI 后, 脊髓发生明显的细胞凋亡; rHu-EPO 具有抑制细胞凋亡、潜在保护神经细胞的作用, 为临床治疗 SCI 提供了一种新的治疗思路。

#### [参考文献]

- [1] Ramer MS, Harper GP, Bradbury EJ. Progress in spinal cord research - a refined strategy for the International Spinal Research Trust[J]. Spinal Cord, 2000, 38(8): 449 - 472.
- [2] Charriaut-Marlangue C, Margaill I, 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.

- [3] Lee TT, Green BA. Advances in the management of acute spinal cord injury[J]. Orthop Clin North Am, 2002, 33(2): 311 - 315.
- [4] Goto T, Hoshino Y. Electrophysiological, histological, and behavioral studies in a cat with acute compression of the spinal cord[J]. J Orthop Sci, 2001, 6(1): 59 - 67.
- [5] Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(4): 2258 - 2263.
- [6] Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, et al. Recombinant human Erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(14): 9450 - 9455.
- [7] Bracken MB. Treatment of acute spinal cord injury with methylprednisolone: result of a multicenter, randomized clinical trial[J]. J Neurotrauma, 1997, 8(Suppl 1): S47 - S50.
- [8] Coleman WP, Benzel D, Cahill DW, et al. A critical appraisal of the reporting of the National Acute Spinal Cord Injury Studies (II and III) of methylprednisolone in acute spinal cord injury[J]. J Spinal Disord, 2000, 13(3): 185 - 199.
- [9] Constantini S, Young W. The effect of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury rats[J]. J Neurosurg, 1994, 80: 97 - 111.
- [10] Bethea JR, Castro M, Keane RW, et al. Traumatic spinal cord injury induce nuclear factor-kappa B activation[J]. J Neurosci, 1998, 18(9): 3251 - 3260.
- [11] Bracken MB, Holford TR. Effects of timing of methylprednisolone of naloxone administration on recovery of segmental and long-tract[J]. Neurosurg, 1998, 79: 500 - 507.
- [12] 章亚东, 候树勋, 刘英炳, 等. 脊髓损伤细胞内 Ca<sup>2+</sup> 变化及其与脊髓神经功能损害的关系[J]. 中华骨科杂志, 1997, 17(5): 291 - 293.
- [13] Yanase M, Sakou T, Fukuda T. Role of N-methyl-D-aspartate receptor in acute spinal cord injury[J]. J Neurosurg, 1995, 83(5): 884 - 885.

(收稿日期: 2004-11-12)