

继发性脊髓损伤的细胞凋亡研究现状

Recent study of cell apoptosis in secondary spinal cord injury

李宏, 朱建平

LI Hong, ZHU Jianping

关键词 脊髓损伤; 细胞凋亡 Key words Spinal cord injuries; Apoptosis

细胞凋亡, 又称程序性细胞死亡, 在继发性脊髓损伤过程中起着关键作用。本文对继发性脊髓损伤细胞凋亡的作用、诱导因素和防治途径作一综述。

1 细胞凋亡在继发性脊髓损伤中的重要作用

脊髓损伤包括原发性脊髓损伤和继发性脊髓损伤, 而细胞凋亡是继发性脊髓损伤的重要组成部分。脊髓损伤后出现的脊髓神经细胞死亡不是缘于直接损伤而是细胞凋亡所致^[1]。细胞凋亡是一种固有的自然生理过程, 它通过清除死亡细胞和代谢产物维持人体各系统组织的稳定, 而且这种清除过程不伴有局部炎症是其最大的特点。有研究证实, 不管是人类还是动物, 继发性脊髓损伤中出现的神经元和神经胶质细胞死亡都是继发细胞凋亡的结果^[2-4]。

1.1 动物模型证实继发性脊髓损伤与细胞凋亡有关 通过压迫或挫伤裸露的脊髓后发现: 动物脊髓随之发生的病理改变与在人类继发性脊髓损伤中所看到变化基本一致, 即损伤都与神经元和神经胶质细胞的细胞凋亡有关。有实验观察到^[5], 脊髓受压后的 4~9 d 内, 凋亡细胞可超过受累平面的数个节段, 以少突神经胶质细胞为主, 集中在白质的长传导束内, 而脊髓灰质中的神经元却未见凋亡细胞。观察鼠脊髓严重挫伤后诱发的细胞凋亡现象^[2], 其凋亡细胞以神经元、星形细胞、少突神经胶质细胞和小神经胶质细胞为主。有学者对脊髓挫伤后 5 min~30 d 不同时间段进行了连续观察研究^[3], 脊髓损伤后 5 min 就出现中央损伤区, 但没有凋亡细胞; 4 h 后, 损伤区内神经元中发现凋亡细胞, 8 h 达到高峰。神经胶质细胞中的凋亡细胞在伤后 4 h 出现, 24 h 时达到高峰。损伤后的 1 周内, 最初的损伤区进行性扩大, 并出现空洞, 同时有更多的神经元和神经胶质细胞相继死亡, Liu 等^[3]认为这种病理现象过程可能与残存轴突髓鞘改变有关。

1.2 人类创伤性及缺血性脊髓损伤后的细胞凋亡特征 E-mery 等^[4]解剖了 14 例因意外创伤死亡的脊髓标本, 对这些在外伤后存活了 3 h~2 个月的脊髓进行分析研究后认为, 人类创伤后继发性脊髓损伤过程中也存在细胞凋亡。他们在脊髓损伤区边缘及其邻近的白质内发现了凋亡细胞, 这就解释了脊髓损伤后损伤区为何会进行性扩大的原因。同时在白质内还发现出现沃勒变性的长传导束中少突神经胶质细胞有明

显的细胞凋亡发生。因此认为, 长传导束迟发性沃勒变性是人类慢性继发性脊髓损伤的一个重要特征。Kato 等^[6]的研究从另一方面也证明继发性脊髓损伤的特征, 即脊髓缺血以后有神经元的坏死和细胞凋亡。他们发现缺血后 6 h 脊髓背侧角内可看到神经元坏死, 但未见细胞凋亡; 直到伤后 1 d, 在灰质周围才出现凋亡细胞。凋亡细胞的滞后出现和主要呈边缘性分布的现象提示, 细胞凋亡的数量和速度与脊髓原发损伤的严重性并不一致。

2 诱导继发性脊髓损伤细胞凋亡的因素

目前, 有关诱导细胞凋亡因素的研究很多, 但研究最多且被公认的诱导因素有三种, 即毒性兴奋作用、自由基和炎性介质。

2.1 毒性兴奋作用与阳离子介导的细胞损害 包括谷氨酸、天门冬氨酸等兴奋性氨基酸是中枢神经系统中重要的兴奋性神经递质。脊髓损伤后兴奋性氨基酸增多, 从而激活配体通道, 如 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)、2-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸(AMPA)和红藻氨酸盐受体等。上述受体的过度刺激可以导致过多的 Ca^{2+} 内流, 从而诱导细胞凋亡, 使神经元出现迟发性细胞坏死。如果将 NMDA 直接用于大鼠脊髓损伤区会加速瘫痪的发生, 激活 AMPA 受体或者红藻氨酸盐受体则将导致脊髓运动神经元死亡。因此, 如采用上述受体拮抗剂治疗, 则可以改善受损脊髓的功能^[7,8]。Yanase 等^[7]发现由于 NMDA 拮抗剂可以在不改变脊髓损伤区血流或者血管通透性的情况下明显减轻水肿, 从而具有显著恢复神经的功能。Wraithall 等^[8]则发现 AMPA 拮抗剂具有缩小损伤区范围、阻止继发性损伤向受累区两侧邻近节段扩散和促进神经恢复的功能。

除了 Ca^{2+} 内流外, 继发性脊髓损伤的程度还与细胞内 Na^+ 的浓度有关^[9]。细胞内高 Na^+ 除导致神经细胞肿胀外, 还会增加 Ca^{2+} 内流, 最终进一步加重神经细胞的损伤。研究证明, Na^+ 和 Ca^{2+} 浓度的增加可损害线粒体功能, 其表现为能量产生减少、细胞损伤更重。因此, 各种 Na^+ 通道阻止剂(如河豚毒素或普鲁卡因等)对受压脊髓均有保护作用^[9]。

2.2 自由基与细胞损害 自由基是具有高度活性的细胞代谢产物, 正常情况下它们被抗氧化剂(如维生素 C、谷胱甘肽和维生素 E 等)清除或者被某些酶(如超氧化歧化酶、谷胱甘肽过氧化酶和过氧化氢酶等)转化成氧气和水。继发性脊髓

损伤发生后,内源性抗氧化剂的耗竭和超氧化物歧化酶的减少,无法清除不断增多的自由基,而后可诱导细胞凋亡,导致无法逆转的细胞死亡。超氧化物歧化酶对缺血性脊髓损伤具有保护作用,而内源性抗氧化剂(如维生素 E)对脊髓创伤的治疗作用已被实验证实^[10]。

无论是损伤区还是邻近未损伤的脊髓,除自由基增多可造成损害作用外,继发性脊髓损伤还与 NO 的升高有关^[11]。NO 是一种特殊自由基,人体的许多组织都能产生,它在扩张血管、免疫活性和神经传递方面具有一定的生理功能。NO 由一氧化氮合酶(NOS)合成,NOS 有多种表现形式,神经元内就有一种。过量的 NO 可诱发细胞凋亡,故对神经细胞具有毒性作用,其损害机制是 NO⁻ 与氧自由基结合生成活性极高的过氧化亚硝酸盐基团(ONOO⁻),该基团与其他的自由基一样,破坏脂质、蛋白质和 DNA。所以,NOS 的存在对运动神经元和脊髓背侧角具有显著的损害效应,如果用 NOS 抗血清治疗就能减轻继发性脊髓损伤后的脊髓肿胀和细胞损害^[12]。

2.3 细胞因子、前列腺素与炎症反应 与炎症和免疫反应有关的细胞因子非常多,包括白介素、干扰素、肿瘤坏死因子(TNF- α)、单克隆刺激因子等,目前研究最清楚的是 TNF- α 。它可以结合细胞膜表面的肿瘤坏死因子受体 1 而诱导细胞凋亡,脊髓外伤后损伤区内 TNF- α 增高,而 TNF- α 则增加中性粒细胞对上皮细胞的黏附力并使其活化,产生出更多的细胞因子^[13]。细胞因子造成细胞损伤的机制之一就是在代谢过程中产生 NO 之类的自由基,再由后者导致最终的细胞损害^[10]。因此,抑制细胞因子或者 NO 的产生对预防继发性脊髓损伤后迟发性少突神经胶质细胞的细胞凋亡具有一定作用。

导致神经损伤后炎症反应的另一种机制可能与细胞膜中花生四烯酸的分解有关^[10]。花生四烯酸在环氧合酶(包括 COX-1 和 COX-2)的作用下降解为前列腺素和甘油类,后者均与继发性脊髓损伤有关。环氧合酶抑制剂通过阻止花生四烯酸的分解达到保护神经目的,并能促进神经功能恢复。此外预防性应用环氧合酶抑制剂(如布洛芬、甲氯芬酸钠)能减轻脊髓创伤后的缺血效应。COX-2 在继发性脊髓损伤过程中对细胞膜的损害与毒性兴奋作用之间似乎有一种联系,Ca²⁺ 内流增加可激活此酶,产生花生四烯酸。神经细胞内兴奋性氨基酸增多可诱导皮质神经元 COX-2 的表达,COX-2 反过来通过其毒性作用导致神经细胞死亡^[14]。

3 细胞凋亡的防治途径

细胞凋亡是一种细胞主动自我消亡的过程,细胞内外的多种因素均可启动该过程,它包含了一组复杂的细胞分子学和生化的连锁反应。尽管目前还不能完全了解这一连锁反应过程中的每个步骤,但一些起关键作用的因素正逐渐被了解,原癌基因 2(Bcl-2)相关的蛋白族就是一组重要的控制因素。该蛋白族至少包括 12 种蛋白,其中有些具有细胞凋亡活性作用,如原癌基因 xs(Bcl-x_s)、凋亡蛋白(Bax)和凋亡促进基因(Bad)等。有些则表现细胞凋亡拮抗功能,即细胞保护作用,如 Bcl-2 和 Bcl-x_l 等^[15],目前对该蛋白族各成员的作用机制开始逐渐认识,这些调控蛋白相对水平的高低决定了细胞是存活还是死亡。例如,Bcl-2 可能与拮抗应激性氧化反应有

关,而 Bax 和 Bad 则通过天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶发挥作用,此酶是一组细胞因子蛋白酶,它们的作用位点在导致细胞死亡的链式反应的终末阶段。

治疗细胞凋亡目前正处于动物试验阶段,有关实验显示,Bcl-2 在受损脊髓的白质内升高。Takahashi 等^[16]将分离出的人类 Bcl-2 基因作为一种 DNA 质粒脂质复合体注入成年大鼠 T₈ 半切后的脊髓内,该基因经逆向转运到神经元的 Clark's 核内,从而最大程度地减轻细胞的萎缩。目前,使神经元充分表达人类 Bcl-2 的转基因小鼠模型已获成功^[17],另外在脊髓缺血损害的实验中发现,当阻断中脑动脉后,这些转基因动物的缺血性损害明显减轻,提示 Bcl-2 也可用于治疗脊髓缺血性病变。总之,新的基因疗法可望用于治疗创伤后的继发性脊髓损伤。

钙激活蛋白酶(Calpain)阻断剂和 G-Jun 神经末端激酶使通道抑制剂也能够抑制运动神经元发生细胞凋亡^[18]。

除了对细胞凋亡途径进行直接的细胞内控制外,也可以通过阻止兴奋毒性作用或自由基损害作用等途径来减轻或避免细胞凋亡。Wada 等^[19]采用 NMDA 受体拮抗剂观察对脊髓受压后细胞凋亡的影响,结果发现 NMDA 受体拮抗剂 MK-801 能够减轻程序性细胞死亡。Rosenberg 等^[20]则通过局部应用 AMPA 拮抗剂来减轻轴突性疾病和髓鞘性疾病,目的是选择性的减少继发性脊髓损伤后少突神经胶质细胞的死亡。结果显示,应用 AMPA 拮抗剂后死亡细胞的数量减少近 50%。另外,有学者通过谷胱甘肽氧化酶的过度表达来减轻自由基损害作用,从而抑制细胞凋亡。实验发现:铜锌 SOD 的高表达可减轻神经元和多种神经细胞的细胞凋亡。就脊髓损伤治疗而言,小剂量注射 NOS 抑制剂(如 N^G 硝基-L-精氨酸)能够明显地减轻运动功能障碍,而对对照组运动功能障碍的进行性加重与 NOS mRNA 高表达有关^[11]。

4 展望

继发性脊髓损伤后细胞凋亡在导致最终神经损害的损伤机制中起着极其重要的作用。充分了解这种细胞死亡方式的分子学基础,应用细胞凋亡拮抗药物,将大大提高神经元和神经胶质细胞的存活率。随着对继发性脊髓损伤后细胞凋亡和对高选择性细胞凋亡靶位阻断剂的研究不断深入,脊髓损伤的治疗必将有一个突破性的进展。

参考文献

- Moricia B. New view of spinal cord injury. Science, 1996, 274: 1466.
- Yong C, Arnold PM, Zoubine MN, et al. Apoptosis in cellular compartments of rat spinal cord after severe contusion injury. J Neurotrauma, 1998, 15: 459-472.
- Liu XZ, Xu XM, Hu R, et al. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. J Neurosci, 1997, 17: 5395-5406.
- Emery E, Aldana P, Bunge MB, et al. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. J Neurosurg, 1998, 89: 911-920.
- Li GL, Brodin G, Farooque M, et al. Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. J Neuropathol Exp Neurol, 1996, 55: 280-289.
- Kato H, Kanellopoulos GK, Matsuo S, et al. Neuronal apoptosis and necrosis following spinal cord ischemia in the rat. Exp Neurol, 1997, 148: 464-474.
- Yanase M, Sakou T, Fukuda T. Role of N-methyl-D-aspartate receptor

- in acute spinal cord injury. *J Neurosurg*, 1995, 83: 884-888.
- 8 Wrathall JR, Choiniere D, Teng YD. Dose dependent reduction of tissue loss and function impairment after spinal cord trauma with the AMPA/kainite antagonist NBQX. *J Neurosci*, 1994, 14: 6598-6607.
 - 9 Agrawal SK, Fehling MG. Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: Role of Na^+ , $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$, the Na^+-H^+ exchanger, and the $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchanger. *J Neurosci*, 1996, 16: 545-552.
 - 10 Jike Lu, Ken WS Ashwell, Phil Waite. Advances in secondary spinal cord injury: Role of apoptosis. *Spine*, 2000, 14: 1859-1866.
 - 11 Hamada Y, Ikata T, Katoh S, et al. Roles of nitric oxide in compression injury of rat spinal cord. *Free Radic Biol Med*, 1996, 20: 1-9.
 - 12 Sharma HS, Westman J, Olsson Y, et al. Involvement of nitric oxide in acute spinal cord injury: An immunocytochemical study using light and electron microscopy in the rat. *Neurosci Res*, 1996, 24: 373-384.
 - 13 Taoka Y, Okajima K, Uchiba M. Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neurosci*, 1997, 79: 1177-1182.
 - 14 Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, et al. COX 2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 2317-2321.
 - 15 Newton K, Strasser A. The Bcl 2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8: 68-75.
 - 16 Takahashi K, Schwarz E, Ljubetic C, et al. DNA plasmid that codes for human Bcl 3 gene preserves axotomized Clarke's nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adult rats. *J Comp Neurol*, 1999, 404: 159-171.
 - 17 Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, et al. Overexpression of Bcl 2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experiment ischemia. *Neuron*, 1994, 13: 1017-1030.
 - 18 Maroney AC, Glicksman Ma, Basma AN, et al. Motoneuron apoptosis is blocked by CEP-1347(KT 7515), a novel inhibitor of the JNK signaling pathway. *J Neurosci*, 1998, 18: 104-111.
 - 19 Wada S, Yone K, Ishidzu Y, et al. Apoptosis following spinal cord injury in rats and preventative effect of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J Neurosurg*, 1999, 91: 98-104.
 - 20 Rosenberg LJ, Teng YD, Wrathall JR. 2, 3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzof quinoxaline reduces glial loss and acute white matter pathology after experiment spinal cord contusion. *J Neurosci*, 1999, 19: 464-475.

(收稿日期: 2003-08-27 本文编辑: 李为农)

急性脊髓损伤非手术治疗的进展

Advanced progress of non operative treatment for acute spinal cord injury

黄平, 董英海

HUANG Ping, DONG Ying hai

关键词 脊髓损伤; 治疗, 非手术 **Key words** Spinal cord injuries; Therapy, nonoperative

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的治疗方法分为手术和非手术治疗。手术治疗的目的是解除脊髓压迫和(或)通过内固定维持脊柱稳定性。而非手术治疗旨在减轻脊髓继发性损伤(secondary tissue damage), 促进神经功能的恢复或再生。10年前人们对SCI治疗的态度仍然是悲观的, 而近10年来已经取得了较大的进展, 文献报道也较多。尽管如此, 急性SCI的非手术治疗绝大多数以实验研究为主, 而真正实际临床应用的非常少见, 本文就近年来实际临床应用的非手术治疗的方法综述如下。

1 甲基强的松龙(methylprednisolone, MP)

近15年人们进行了大量药物实验治疗急性SCI, 其中糖皮质激素一直是研究的重点之一, 且有一些成功的报告。糖皮质激素治疗急性SCI的机制是: ①提高神经的兴奋性与传导性; ②改善脊髓血流量; ③减少由自由基介导的脂质过氧化; ④稳定细胞膜的离子通道, 促进 Ca^{2+} 外移; ⑤抑制损伤后组织内儿茶酚胺的代谢与积聚等。1990年NASCIS II和1997年NASCIS III用MP做临床试验^[1,2], MP治疗急性SCI的标准方法是: 首次剂量按30 mg/kg, 静脉给药, 以后的24 h内用5.4 mg/kg 静脉维持。其中首次剂量最好是在急性SCI

后3 h内给药, 最迟不超过8 h, 如果超过8 h再给予首次剂量, 不仅无益, 而且增加副作用的发生率。因此Bracken^[3]强调损伤后8 h内大剂量MP是惟一通过III期临床实验的药物。但一些穿透性的损伤如火器伤, MP治疗无效。

MP虽然被NASCIS推荐, 但由于过于讲究时效性和大剂量, 严重阻碍了它的发展。Molloy等^[4]调查了在美国NASCIS指定医院使用MP治疗急性SCI的100例病人, 发现只有25%的病人按NASCIS推荐的方案使用了MP, 而另10%的病人不但没有按NASCIS推荐的方案使用, 而且根本就不应该使用MP。其原因是失去了伤后8 h的“黄金”时间而无法使用MP或由于担心大剂量MP产生的副作用而不敢使用MP。加拿大脊髓外科协会发现NASCIS III推荐的MP方案还是最普遍应用的治疗方案。然而, 也有1/4的专科医生从来不用MP, 即使那些使用MP的专科医生大部分也是为了避免事后被诉讼才使用的^[5]。欧洲颈部脊髓研究学会(CSRS)在对参加2000年学术会议的调查后发现, 75%的代表使用过或被推荐使用过MP, 但是他们都有自己的保留意见。这种保留意见来源于NASCIS II上, 许多研究人员评估了数种神经病学药物, 都没有达到预想的疗效, 因此人们更加关心那些在损伤8 h内接受大剂量MP治疗后的急性SCI病人功能恢复如何? 神经是否再生? MP的安全性受