

• 基础研究 •

大剂量甲基强的松龙对大鼠急性脊髓损伤后神经细胞 Bcl-2 表达及细胞凋亡的影响

马利杰¹, 张军军², 吴昊天³

(1.华北煤炭医学院附属医院骨科,河北 唐山 063000;2.唐山市第二医院;3.河北医科大学第三医院)

【摘要】 目的:观察大剂量甲基强的松龙(MP)治疗对大鼠急性脊髓损伤(ASCI)后神经细胞凋亡及凋亡基因 Bcl-2 的影响。**方法:**选取 48 只雌性 SD 大鼠随机等分为 2 组,对照组与治疗组,按 Nyström 法制备大鼠急性脊髓损伤模型。治疗组伤后 30 min 经腹腔注入 MP 30 mg/kg,以后每小时腹腔注入 MP 5.4 mg/kg,维持 24 h;对照组应用生理盐水替代 MP,处理方法同治疗组。两组分别于伤后 4、8 h 及 1、3、7、14 d 灌注固定后取材。免疫组织化学检测损伤段脊髓内 Bcl-2 蛋白表达,TUNEL 检测细胞凋亡,染色结果应用图像分析仪进行半定量分析。**结果:**大鼠 ASCI 后 4 h 即可见脊髓内 TUNEL 阳性细胞,8 h 表达达高峰,此后表达量逐渐下降,14 d 时仍可见少量阳性细胞。凋亡相关蛋白 Bcl-2 在伤后 4 h 即可见表达,伤后 1 d 达高峰,伤后 14 d 仍有表达。与对照组相比,治疗组伤后 8 h、1 d 和 3 d 时凋亡细胞数减少有统计学意义,伤后 8 h 和 1 d Bcl-2 蛋白表达增高有统计学意义。**结论:**大剂量甲基强的松龙治疗可抑制大鼠 ASCI 后神经细胞凋亡,并增加凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达。

【关键词】 脊髓损伤; 激素类; 细胞凋亡; 基因,Bcl-2; 动物实验

Effects of high dose methylprednisolone on cell apoptosis and Bcl-2 expression after acute spinal cord injuries in rats
MA Li-jie, ZHANG Jun-jun, WU Hao-tian. *Department of Orthopaedics, the North of China Coal Medical College, Tangshan 063000, Hebei, China*

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of high dose methylprednisolone (MP) on cell apoptosis and Bcl-2 expression after acute spinal cord injury (ASCI). **Methods:** The 48 female rats were randomly divided into two groups: control group and experimental group. The spinal cord of rats were wounded at the level of T_{9,10} in moderate degree for each group. Thirty minutes after ASCI, the subjects in experimental group received MP injection through intraperitoneal with dosage of 30 mg/kg. Then a dosage of 5.4 mg/kg of MP was given through intraperitoneal injection every hour in 24 hours. The subjects in the control group received Normal Saline instead of MP with the same method. The impaired spinal cords were harvested on 4 h, 8 h, 1 d, 3 d, 7 d and 14 d after injury, and at each time point 4 rats were sacrificed in each group. The terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated DUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) and immunohistochemical measurement were used to observe neural apoptosis and Bcl-2 expression. **Results:** Apoptosis cells were noted primarily at 4 h after injury, with a maximum presence in lesion center at 8 h. The apoptotic index of MP-treated group had distinctly less than that of control group in 8 h, 1 d and 3 d after trauma. The Bcl-2 increased in the experimental group. **Conclusion:** The administration of the high dose methylprednisolone(MP) can inhibit the apoptosis after acute spinal cord injury in rats and increase the expression of Bcl-2.

Key words Spinal cord injuries; Hormones; Apoptosis; Genes, Bcl-2; Animal experimentation

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(9):692-694 www.zggszz.com

急性脊髓损伤(acute spinal cord injury, ASCI)是一种及其严重的损伤,病死率、致残率很高。近年来随着 ASCI 和细胞凋亡研究的不断深入,现已认识到脊髓损伤后神经细胞死亡的方式不仅仅是坏死,同时细胞凋亡也广泛存在。伤后大剂量甲基强的松龙(MP)冲击是目前急性脊髓损伤公认治疗方法,

它的作用机制复杂^[1-2],但是否存在着抗凋亡机制,目前仍有着不同的看法。Mallei 等^[3]通过实验证实糖皮质激素可以减少脊髓损伤后低亲和性神经生长因子受体 P75 的表达,从而抑制神经细胞的凋亡。我们将通过对大鼠 ASCI 后大剂量 MP 治疗,同时测定不同时间点神经细胞凋亡数及其凋亡基因表达蛋白各时间点量的变化来推断 MP 在 ASCI 治疗中是否存在抗凋亡作用及可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 选取 48 只雌性 SD 大鼠,体质量(250±10) g。35 g

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30500509),河北省自然科学基金资助项目(编号:C2006000840)

通讯作者:马利杰 E-mail:malijie126@126.com

砣码, 2.2 mm×5.0 mm 大小的光滑金属垫片, 开椎板手术器材, 4%多聚甲醛 PBS(磷酸缓冲液)固定液。Bcl-2、TUNEL 检测试剂盒(由北京中山试剂公司提供), 甲基强的松龙注射用粉剂。

1.2 实验方法

1.2.1 分组与造模 48 只雌性 SD 大鼠随机等分为 2 组, 对照组(control group, CG)与治疗组(experimental group, EG), 各行 T₉₋₁₀ 椎板去除术, 去除椎板后按 Nyström 等^[4]大鼠急性脊髓损伤模型制模(用 35 g 重物通过 2.2 mm×5.0 mm 大小的光滑金属垫片压迫脊髓 5 min 造成大鼠中度急性损伤模型), 致伤后每日按压大鼠膀胱促进排尿, 定时喂食。治疗组伤后 30 min 腹腔腔注入 MP (30 mg/kg), 以后每小时腹腔腔注入 MP(5.4 mg/kg), 24 h 内维持至取材。对照组以生理盐水替代 MP, 按同样方法给药。两组分别于伤后 4、8 h 及 1、3、7、14 d 取材。

1.2.2 取材与固定 各组在预定取材时间点, 给予 40 ml/L 多聚甲醛 PBS 心脏灌注固定, 以压迫处为中心取 1 cm 长的损伤脊髓, 取材后用同样的固定液浸泡固定 2 h, 蔗糖 PBS (300 g/L)液中浸泡过夜, 做 5 μm 厚的超薄冰冻切片备用。

1.3 观察指标及方法 以伤后神经细胞凋亡情况作为评价治疗效果的指标, 图像分析系统进行半定量分析, TUNEL 法标记细胞凋亡, 以数密度(目标个数与统计场面积的比值)作为 TUNEL 法检测的定量标准。免疫组织化学法检测凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 以平均积分光密度(平均光密度与所测细胞面积的乘积)作为 Bcl-2 表达的定量标准。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 10.0 软件对两组数据进行两样本均数的 t 检验。

2 结果

2.1 Bcl-2 表达结果 两组均于损伤后 4 h 即可见阳性细胞, 为胞浆着色, 核不着色, 神经元和胶质细胞均有表达。图像分析结果显示, 两组于 4 h 开始 Bcl-2 表达量逐渐增高, 1 d 时达高峰, 此后逐渐下降, 14 d 时仍有表达。治疗组与对照组相比, 前者 8 h、1 d 组较后者 Bcl-2 表达量多, 且此增多差异有统计学意义(见表 1)。

2.2 TUNEL 染色结果 对照组和治疗组, 伤后 4 h 时阳性细胞数较为稀疏, 8 h、1 d 和 3 d 时阳性细胞较为稠密, 图像分

析系统分析结果显示, 凋亡细胞数密度在 8 h 时达高峰, 以后略有下降, 3 d 后即开始迅速下降, 14 d 时仍有少量凋亡细胞, 与对照组相比, 治疗组各时点凋亡细胞数均有所下降, 4 h、7 d 和 14 d 时凋亡细胞数与对照组差异无统计学意义, 8 h、1 d 和 3 d 时凋亡细胞数下降差异有统计学意义(见表 2)。

3 讨论

3.1 大剂量 MP 治疗脊髓损伤 急性脊髓损伤是一种严重的外伤, 致死、致残率很高, 给患者带来极大的痛苦, 也给家庭和社会造成了很大的经济负担, 如何有效地治疗急性脊髓损伤所致的肢体功能丧失是目前世界范围内的难题, 目前早期大剂量 MP 冲击是 ASCI 治疗的主要药物, 第 2 次(美国)全国急性脊髓损伤研究会(NASCIS II)研究结果显示: 大剂量 MP (一次性给药 30 mg/kg, 然后 5.4 mg·kg⁻¹·h⁻¹ 连续 23 h)在 ASCI 后 8 h 内的应用, 可显著改善患者的神经功能, 减少伤后神经功能的进一步损害^[5-7]。大剂量 MP 在急性脊髓损伤的治疗中是否存在抗神经细胞凋亡的作用, 仍未有明确认识。

3.2 凋亡蛋白 Bcl-2 急性脊髓损伤后不仅存在神经细胞的坏死, 同时也存在着神经细胞的凋亡, 两者都是造成大量神经细胞死亡的主要原因。急性脊髓损伤后神经细胞凋亡是一些凋亡基因启动的结果, 常见的凋亡基因有, Bax、Bcl-2、Fas 等, 其中 Bcl-2 和 Bax 是相互拮抗的两个基因, 在细胞凋亡的调控中起着重要作用。Bcl-2 即(B-cell lymphoma/leukemia-2), 是主要的抗凋亡基因, 它可以抑制多种途径的凋亡^[8]。属于 Bcl-2 基因家族成员, 通过编码相应功能蛋白起作用。Bcl-2 蛋白是一种 Mr 为 26 000 的蛋白分子, 羧基端由 19 个氨基酸组成的疏水段, 紧接其后的为 2 个带电荷的氨基酸残基, 此疏水结构使该蛋白质可能锚定在膜上, 这一特点是其阻断细胞凋亡的结构基础。Bcl-2 家族都具有 BH (Bcl-2 同源体, Bcl-2 homologue), BH 有 4 个区域, 分别是 BH1、BH2、BH3 和 BH4。Bcl-2 4 个区域都有, 其中抗凋亡所必须的是 BH1、BH2, 和 BH4, BH1、BH2 和 BH4 可构成一个疏水结构, 此疏水结构可与促凋亡蛋白的 BH3 相结合形成复合体, 从而抑制对方的活性。Bcl-2 蛋白主要分布于线粒体膜内外侧, 核膜、内质网膜也有分布, 它对维持这些细胞器稳定起着重要作用^[9]。Bcl-2 基因表达蛋白的增高意味着抗凋亡作用的启动^[10-11]。

表 1 对照组和治疗组 Bcl-2 各时间点表达量($\bar{x} \pm s, \times 10^{-3}$)

Tab.1 Amount of Bcl-2 expression at different time in each group($\bar{x} \pm s, \times 10^{-3}$)

组别	鼠数(只)	4 h	8 h	1 d	3 d	7 d	14 d
对照组	24	6.97±1.42	10.68±1.81	22.64±1.45	18.16±2.78	12.72±2.82	9.96±3.05
治疗组	24	7.38±2.60	15.26±2.16*	26.14±1.57 [▲]	20.86±2.41	12.33±3.10	10.96±3.53

注: 与对照组相比, *t=3.25, P<0.05, [▲]t=3.28, P<0.05

Note: Compared to control group, *t=3.25, P<0.05, [▲]t=3.28, P<0.05

表 2 对照组和治疗组各时间点凋亡细胞数密度($\bar{x} \pm s, \times 10^{-4}$)

Tab.2 Number of apoptosis cells at different time in each group($\bar{x} \pm s, \times 10^{-4}$)

组别	鼠数(只)	4 h	8 h	1 d	3 d	7 d	14 d
对照组	24	3.08±1.15	7.42±0.72	5.03±0.89	3.36±0.95	1.60±0.89	1.52±0.76
治疗组	24	2.84±1.41	5.75±0.79 [△]	3.13±0.61 [□]	1.93±0.87 [△]	1.21±1.03	1.49±0.49

注: 与对照组相比, [△]t=3.12, P<0.05, [□]t=3.52, P<0.05

Note: Compared to control group, [△]t=3.12, P<0.05, [□]t=3.52, P<0.05

中医正骨手法中的力学机制

潘良春,周太安,周奉皋,唐小波
(成都骨科医院,四川 成都 610061)
关键词 正骨手法; 力学; 中医学

Mechanism of TCM manipulative maneuvers PAN Liang-chun, ZHOU Tai-an, ZHOU Feng-gao, TANG Xiao-bo. The Orthopaedics Hospital of Chengdu, Chengdu 610061, Sichuan, China

Key words Bone setting manipulation; Mechanics; Medicine, Chinese traditional

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(9): 694-696 www.zggszz.com

中医正骨手法作为一种以力的实施为主的治疗手段,其本质应该与物理学中力的相互作用有关,所以可以试用用经典力学原理进行研究。我们认为,纷繁复杂的中医正骨手法可能存在一些误区和重复,可以通过其力学实质的研究,变得简明扼要、浅显易懂,易于交流传授和仿真模拟,最终实现“人机对话”、“计算机辅助医疗正骨”的梦想。我们将大部分正骨手法归类简化为:“轴向用力”,“侧方用力”,“旋转用力”3类^[1],

现分别举例分析如下。

1 轴向用力的力学分析(以“拔伸牵引”手法为例)

“拔伸牵引”是中医骨科最基本的正骨手法,其目的是对抗局部肌肉收缩导致肢体短缩的趋势,我们发现该手法符合以下力学规律。

1.1 “拔伸牵引”与牛顿第三定律 牛顿第三定律:“两个物体间的作用力和反作用力大小相等,方向相反,作用在一条直

3.3 大剂量 MP 治疗对大鼠急性脊髓后神经细胞凋亡的影响 在实验中我们发现,脊髓损伤后治疗组和对照组中均可见大量的处于凋亡状态的神经细胞,伤后 8 h 凋亡的细胞数达到高峰,此后逐渐下降。Bcl-2 蛋白的表达也经历一个逐渐增高后再次下降的过程,在伤后 8 h、1 d 和 3 d 时治疗组损伤段脊髓内凋亡的细胞数量较对照组明显减少,同时神经细胞 Bcl-2 表达量较对照组明显增高。作为细胞凋亡过程中关键的抗凋亡因子,Bcl-2 表达量的增多,一方面拮抗细胞凋亡的起始作用因子 Bax 的促凋亡作用;另一方面稳定线粒体膜、核膜、内质网膜,从而起到抑制细胞凋亡的作用,使伤后脊髓神经细胞凋亡数减少。因此脊髓损伤后 Bcl-2 的表达的增多可以抑制神经细胞的凋亡,减少神经细胞的丢失,大剂量甲基强的松龙的应用可以增加损伤脊髓 Bcl-2 的表达,这可能是其减少损伤脊髓细胞凋亡、保护脊髓进一步损伤的原因之一。

综上所述,早期大剂量 MP 治疗可以增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,减少脊髓神经细胞的凋亡,但大剂量 MP 减少细胞凋亡的作用机制仍不明确,我们认为一方面可能是由于大剂量 MP 改善了损伤脊髓的微环境,使细胞凋亡的平衡机制向抑制凋亡方向发展;另一方面大剂量 MP 可能存在着直接影响凋亡基因的作用,这还有待于进一步研究。

参考文献

[1] Tsutsumi S, Ueta T, Shiba K, et al. Effects of the second national acute spinal cord injury study of high-dose methylprednisolone therapy on acute cervical spinal cord injury—results in spinal injuries center. *Spine*, 2006, 31(26): 2992-2996.

[2] Tator CH. Review of treatment trials in human spinal cord injury:

issues, difficulties, and recommendations. *Neurosurgery*, 2006, 59(5): 957-982.

[3] Mallei A, Aden SA, Bachis A, et al. The nitrosteroid NCX 1015, a prednisolone derivative, improves recovery of function in rats after spinal cord injury. *Brain Res*, 2005, 1062(1-2): 16-25.

[4] Nyström B, Berglund JE, Bergquist E. Methodological analysis of an experimental spinal cord compression model in the rat. *Acta Neurol Scand*, 1988, 78(6): 460-466.

[5] Sayer FT, Kronvall E, Nilsson OG. Methylprednisolone treatment in acute spinal cord injury: the myth challenged through a structured analysis of published literature. *Spine J*, 2006, 6(3): 335-343.

[6] Baptiste DC, Fehlings MG. Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. *J Neurotrauma*, 2006, 23(3-4): 318-334.

[7] 黄平, 董英海. 急性脊髓损伤非手术治疗的进展. *中国骨伤*, 2004, 17: 699-701.

[8] Nescic-Taylor O, Cittelly D, Ye Z, et al. Exogenous Bcl-xL fusion protein spares neurons after spinal cord injury. *J Neurosci Res*, 2005, 79(5): 628-637.

[9] Culmsee C, Plesnila N. Targeting Bid to prevent programmed cell death in neurons. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34(Pt 6): 1334-1340.

[10] Antignani A, Youle RJ. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18(6): 685-689.

[11] Er E, Oliver L, Cartron PF, et al. Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1757(9-10): 1301-1311.

(收稿日期: 2009-04-15 本文编辑: 王宏)