

## · 基础研究 ·

# 锂剂抑制脊髓损伤后大鼠细胞凋亡的机制研究

王放<sup>1</sup>, 周超<sup>2</sup>, 高正超<sup>1</sup>, 李宇欢<sup>1</sup>, 杨文龙<sup>1</sup>, 王栋<sup>1</sup>, 李浩鹏<sup>1</sup>, 贺西京<sup>1</sup>

(1. 西安交通大学第二附属医院骨二科, 陕西 西安, 710004; 2. 西安交通大学理学院, 陕西 西安 710004)

**【摘要】** 目的: 研究锂剂是否通过抑制脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后大鼠神经细胞的凋亡产生神经保护作用。方法: 将 42 只 SD 雄性大鼠, 体重为 200~250 g, 按随机数字法分成 3 组: 空白对照组(6 只)不做手术; 生理盐水(NS)组(18 只)经腹腔注射 NS(40 mg/kg); 氯化锂(LiCl)组(18 只)经腹腔注射 LiCl(40 mg/kg)。按照 Allen 法对大鼠建模后, LiCl 组于脊髓损伤术后 15 min 内开始腹腔注射 LiCl 溶液 (40 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)2 周, NS 组在同时间内注入等量的 NS 作为对照。分别于术后 3、7、14 d 进行 BBB 评分, 利用免疫组化染色观察 Bcl-2 和 Bax 的表达, 并采用 TUNEL 染色观察神经细胞凋亡。结果: BBB 评分: 空白对照组大鼠为 21±0, LiCl 组与 NS 组比较, 术后 7、14 d 时 LiCl 组大于 NS 组( $P<0.05$ )。Bcl-2 蛋白表达: 空白对照组大鼠为 0.081±0.003, 术后 7、14 d 两个时间点 Bcl-2 蛋白表达 LiCl 组分别为 0.151±0.003 和 0.163±0.003, NS 组为 0.143±0.003 和 0.154±0.002, LiCl 组能明显升高其表达( $P<0.05$ )。Bax 蛋白的表达: 空白对照组大鼠为 0.071±0.003, 术后 7、14 d 两个时间点 Bax 蛋白的表达 LiCl 组分别为 0.121±0.002 和 0.106±0.002, NS 组为 0.126±0.001 和 0.120±0.002, LiCl 组可以明显降低其表达( $P<0.05$ )。神经细胞凋亡: TUNEL 染色显示, 空白对照组阳性细胞较少, 凋亡指数(AI)为 1.98±0.19, 术后 7、14 d 两个时间 LiCl 组分别为 13.12±0.69 和 4.29±1.00, NS 组为 18.26±0.87 和 5.48±0.70, LiCl 组能显著抑制细胞凋亡( $P<0.05$ )。结论: 锂剂能够促进 SCI 后大鼠的神经元细胞内 Bcl-2 蛋白的表达, 抑制神经元内 Bax 蛋白的表达, 从而起到了抑制神经细胞凋亡的作用, 这可能是锂剂促进大鼠运动功能恢复的机制之一。

**【关键词】** 脊髓损伤; 锂剂; 神经元; 细胞凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2018.04.016

**Depressant effect of Lithium on apoptosis of nerve cells of adult rats after spinal cord injury** WANG Fang, ZHOU Chao, GAO Zheng-chao, LI Yu-huan, YANG Wen-long, WANG Dong, LI Hao-peng, and HE Xi-jing\*. \*The Second Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi, China

**ABSTRACT Objective:** To study whether lithium agent produces neuroprotective effect by inhibiting the nerve cell apoptosis of rats after spinal cord injury. **Methods:** Forty-two male SD rats weighing 200 to 250 g were randomly divided into 3 groups: blank control group ( $n=6$ ) without surgery, normal saline (NS) group ( $n=18$ ) with intraperitoneal injection of NS (40 mg/kg); and Lithium chloride (LiCl) group ( $n=18$ ) with intraperitoneal injection of LiCl (40 mg/kg). After Allen method modeling, LiCl group started intraperitoneal injection of LiCl solution (40 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) within 15 min after operation to the second week. NS group, during the same interval, was injected with a same amount of NS. Postoperative 3, 7, 14 d, BBB scores in each group were measured; the expression of Bcl-2 and Bax protein were observed by immunohistochemistry staining; TUNEL staining was used to observe the nerve cell apoptosis. **Results:** The BBB scores in blank control group were 21. Postoperative 7, 14 d, BBB scores of LiCl group were higher than that of NS group ( $P<0.05$ ). As for the Bcl-2 protein expression, blank control group has a level of 0.081±0.003; 7 d and 14 d postoperatively, the level in LiCl group was 0.151±0.003, 0.163±0.003 and in NS group, 0.143±0.003, 0.154±0.002, respectively. LiCl group showed significantly increased Bcl-2 protein expression ( $P<0.05$ ). As for the Bax protein expression, blank control group showed a level of 0.071±0.003; 7 d and 14 d postoperatively, the level in LiCl group was 0.121±0.002, 0.106±0.002 and in NS group was 0.126±0.001, 0.120±0.002, respectively. The Bax protein expression is significantly inhibited in the LiCl group ( $P<0.05$ ). In nerve cell apoptosis by TUNEL staining, the positive cells were fewer in the blank control group with apoptosis index (AI) of 1.98±0.19; while 7d and 14d postoperatively, the AI of LiCl group was 13.12±0.69, 4.29±1.00 and of NS group, 18.26±0.87, 5.48±0.70, respectively. LiCl group showed significant inhibition of the cell apoptosis ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** LiCl can promote the Bcl-2 protein expression and inhibit the Bax proteins expres-

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81701223); 陕西省自然科学基金(编号: 2017JQ8019); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(编号: 1191329737)

Fund program: Natural Science Foundation of China (No. 81701223)

通讯作者: 贺西京 E-mail: xijing\_h@vip.tom.com

Corresponding author: HE Xi-jing E-mail: xijing\_h@vip.tom.com

sion in nerve cells of rat after SCI, thereby playing a role in the inhibition of nerve cell apoptosis. This may be one of the mechanisms that LiCl can promote the recovery of motor function of rats after SCI.

**KEYWORDS** Spinal cord injury; Lithium; Neurons; Apoptosis

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2018, 31(4):379-385 www.zgsszz.com

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)指由于外界直接或间接因素导致脊髓损伤,在损害的相应节段出现各种运动、感觉和括约肌功能障碍,给家庭和社会造成巨大的经济、人力和精神负担。其机制主要分为原发损伤和继发损伤,原发损伤是由于脊髓功能受外力创伤破坏所致,继发损伤是在原发损伤基础上,其他相关因素导致的更持久的损伤,其中细胞凋亡是重要的机制之一<sup>[1]</sup>。锂剂作为最轻的金属,常被用来治疗双相情感障碍疾病。最新研究发现,锂剂能对中枢神经损伤后的恢复有显著地促进作用。所以笔者尝试使用锂剂对脊髓损伤大鼠进行治疗,探究锂剂能否对脊髓损伤大鼠有抑制细胞凋亡作用。若能证实锂剂对大鼠 SCI 后的神经细胞有抗凋亡的作用,可将锂剂的应用范围进一步扩展,为 SCI 的研究及治疗开创一条新的道路,将锂剂应用于临床治疗 SCI 获得更有力的证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

NYU-II 型 SCI 打击器(美国纽约大学);光学显微镜(CX41-32C02,日本 Olympus 公司);LiCl 粉剂(西安化学试剂厂);兔抗大鼠 Bcl-2 单克隆抗体(美国 ZYMED 公司);兔抗大鼠 Bax 单克隆抗体(美国 ZYMED 公司);兔 SP 免疫组化染色试剂盒(美国 ZYMED 公司);DAB 显色试剂盒(美国 ZYMED 公司);TUNEL 试剂盒(美国 Promega 公司)。

### 1.2 实验动物

选用 SPF 级体重为 200~250 (225±15) g 的 SD 雄性大鼠(实验动物由西安交大医学院动物中心提供)42 只,实验动物饲养严格遵循动物实验中心标准进行,所有动物处理得到西安交大二附院伦理委员会批准。

### 1.3 分组与造模方法

根据随机数字法将大鼠分为 3 组:空白对照组(6 只),氯化锂组(18 只),生理盐水组(18 只)。空白对照组不进行手术操作,麻醉后直接灌注取材,进行染色及数据分析;氯化锂组及生理盐水组分别给予相应药物后在 3、7、14 d 进行灌注取材。

造模方法采用 Allen<sup>[2]</sup>方法以 10 g × 2.5 cm 致伤力损伤 T<sub>10</sub> 脊髓制作 SCI 模型。将大鼠称重后,计算所需 10% 水合氯醛的量(300 mg/kg),腹腔注射水合氯醛,等大鼠麻醉后,在大鼠背部脊髓两侧触摸最下肋与软组织分界处(浮肋与 T<sub>13</sub> 连接处)作为骨性定

位标志,向上下 5 cm 范围备皮,将此范围内的毛减掉,碘伏消毒 3 遍,铺洞巾,纵向切开大鼠背部皮肤,3 cm 左右,逐层切开皮下组织,暴露棘突,定位 T<sub>10</sub> 棘突(最高的棘突为 T<sub>11</sub>,向前 1 个为 T<sub>10</sub>)后,用剪刀分离椎旁肌肉,使背部脊柱充分暴露,应用骨剪将 T<sub>10</sub> 与 T<sub>9</sub> 和 T<sub>11</sub> 连接处分离开。将 T<sub>10</sub> 两侧的横突剪断,再用咬骨钳将 T<sub>10</sub> 椎板咬除,向上进一步咬除 T<sub>9</sub> 椎板的一半,修整咬除边缘,形成一个略呈长方形的窗口,充分暴露脊髓。应用 NYU-II 型打击器,致伤力为 10 g × 2.5 cm,固定好大鼠后,垂直打击暴露的脊髓,造成中度 SCI。当打击到脊髓瞬间可观察到双下肢及尾巴抽搐,随后出现双下肢瘫痪,表明打击成功。打击后,剪一小块软组织铺放在暴露的脊髓处,依次缝合肌肉、皮下筋膜、皮肤,在切口处再次给予常规消毒。

### 1.4 干预措施

术后 15 min 内给予氯化锂或者生理盐水,每隔 24 h 给药 1 次,直至术后 14 d,终止给药。每只大鼠按体重的不同给药剂量不同,氯化锂组以 40 mg/kg 的腹腔注射氯化锂,生理盐水组以同样剂量注射生理盐水。

### 1.5 观察项目与方法

**1.5.1 运动功能 BBB 评分** 对术后各组大鼠分别于 3、7、14 d 进行运动功能 BBB (basso beattie bresnahan scale, BBB)评分<sup>[3]</sup>,该方法是将脊髓损伤动物放入以开口盆,轻敲盆壁,使其爬行,观察动物的臀、膝、踝关节行走、躯干运动及其协调情况,按照 BBB 评分表进行评分,正常大鼠 BBB 评分为 21 分,评分越高说明下肢运动情况越好。每次评分均采用单盲双人一起进行,取平均值作为最终结果。

**1.5.2 免疫组化染色** 按时间点对大鼠进行多聚甲醛灌注,以受伤区域(region of interest, ROI)为中心上下各 2 cm 取脊髓,按照试剂盒进行 Bcl-2/Bax 染色和 TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling)染色。具体方法:(1)Bcl-2/Bax 染色。所得图片采用专业图像分析软件 IPP6.0 (Image-Pro Plus, IPP 6.0)进行分析。每张切片随机选取神经组织较多的 5 个 400×高倍视野,每个组织随机选取 5 张切片,分别测平均光密度(average optical density, AOD)<sup>[4]</sup>。(2)原位末端转移酶标记(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)染色。通过专业图像分析软件(image-pro plus, IPP6.0)计算凋亡指数(apoptosis in-

dex, AI)进行分析,每张切片随机选取神经组织较多的 5 个 400×高倍视野,每个组织随机选取 5 张切片,计算视野内 TUNEL 染色阳性的神经元细胞数及视野内所有神经元细胞数,两者比值即为 AI<sup>[5]</sup>。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件对所得数据进行统计分析,计数资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,同时间点内氯化锂组与生理盐水组及空白对照组比较分别采用两独立样本均数的 *t* 检验,氯化锂组组内比较应用单因素方差分析(ANOVA)进行检验,组内两两多重比较应用 SNK-*q* 检验法进行检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 运动功能 BBB 评分

3 组大鼠 BBB 评分见表 1。术后各时间点氯化锂组 BBB 评分与空白对照组比较差异有统计学意义。术后 7、14 d 氯化锂组与生理盐水组比较差异有统计学意义。氯化锂组术后 3、7 d 两个时间点 BBB 评分差异有统计学意义;术后 7、14 d 两个时间点 BBB 评分差异有统计学意义。

2.2 Bcl-2 蛋白染色及平均光密度

空白对照组脊髓灰质区神经细胞 Bcl-2 蛋白染色为阴性;术后 3、7、14 d 氯化锂组神经细胞染色阳

性均强于生理盐水组(见图 1)。3 组大鼠不同时间点脊髓神经 Bcl-2 蛋白 AOD 值见表 2。术后 3、7、14 d 氯化锂组与空白对照组 AOD 值相比差异均有统计学意义(*P*<0.01)。术后 3 d 氯化锂组与生理盐水组的 AOD 值比较差异有统计学意义(*P*<0.05);术后 7、14 d 氯化锂组与生理盐水组 AOD 值差异均有统计学意义(*P*<0.01)。术后 3、7、14 d,氯化锂组组内两两比较差异均有统计学意义,术后 3 d 为最高,术后 7 d 为最低。

2.3 Bax 蛋白染色及平均光密度

空白对照组脊髓灰质区 Bax 蛋白染色阳性的神经细胞较少,术后 3、7、14 d 氯化锂组神经细胞染色阳性均弱于生理盐水组(见图 2)。各组大鼠脊髓神经细胞 Bax 蛋白 AOD 值见表 3。术后各时间点氯化锂组与空白对照组 AOD 值相比差异有统计学意义(*P*<0.01)。术后 3 d 氯化锂组与生理盐水组的 AOD 值比较差异有统计学意义(*P*<0.05);术后 7、14 d 氯化锂组与生理盐水组 AOD 值比较差异均有统计学意义。氯化锂组进行组内两两比较,术后 3、7、14 d AOD 值不同,由高到低依次为 3、7、14 d,差异均有统计学意义(*P*<0.01)。

2.4 TUNEL 染色及凋亡指数

空白对照组 TUNEL 染色阳性细胞数较少,术后

表 1 不同时间点各组大鼠 BBB 评分比较( $\bar{x}\pm s$ ,分)

Tab.1 Comparison of BBB scores among three group at different time points( $\bar{x}\pm s$ , score)

组别	鼠数	术后 3 d	术后 7 d	术后 14 d
空白对照组	6	21	21	21
生理盐水组	6	1.06±0.24	2.92±0.67	9.00±1.27
氯化锂组	6	1.17±0.38 <sup>①②</sup>	3.75±0.87 <sup>①③</sup>	11.33±1.63 <sup>①③</sup>

注:与空白对照组比较,①*t*<sub>3d</sub>=7.62, *P*<0.01; ①*t*<sub>7d</sub>=5.72, *P*<0.01; ①*t*<sub>14d</sub>=5.43, *P*<0.01。与同时间内生理盐水组比较,②*t*<sub>3d</sub>=1.67, *P*=0.12; ③*t*<sub>7d</sub>=4.23, *P*<0.05; ③*t*<sub>14d</sub>=4.14, *P*<0.05。同组术后 3、7、14 d 分别两两比较, *F*<sub>3,7</sub>=17.56, *P*<0.01; *F*<sub>7,14</sub>=18.23, *P*<0.01; *F*<sub>3,14</sub>=16.32, *P*<0.01

Note: Compared with blank control group, ①*t*<sub>3d</sub>=7.62, *P*<0.01; ①*t*<sub>7d</sub>=5.72, *P*<0.01; ①*t*<sub>14d</sub>=5.43, *P*<0.01. Compared with NS group at the same time, ②*t*<sub>3d</sub>=1.67, *P*=0.12; ③*t*<sub>7d</sub>=4.23, *P*<0.05; ③*t*<sub>14d</sub>=4.14, *P*<0.05. Comparison of LiCl group at 3, 7 and 14 d after operation, respectively, *F*<sub>3,7</sub>=17.56, *P*<0.01; *F*<sub>7,14</sub>=18.23, *P*<0.01; *F*<sub>3,14</sub>=16.32, *P*<0.01

表 2 不同时间点各组大鼠神经元 Bcl-2 蛋白 AOD 比较( $\bar{x}\pm s$ )

Tab.2 Comparison of AOD of Bcl-2 protein in rat neurons among three groups at different time points( $\bar{x}\pm s$ )

组别	鼠数	术后 3 d	术后 7 d	术后 14 d
空白对照组	6	0.081±0.003	0.081±0.003	0.081±0.003
生理盐水组	6	0.201±0.002	0.143±0.003	0.154±0.002
氯化锂组	6	0.205±0.002 <sup>①③</sup>	0.151±0.003 <sup>①②</sup>	0.163±0.003 <sup>①②</sup>

注:与空白对照组比较,①*t*<sub>3d</sub>=6.34, *P*<0.01; ①*t*<sub>7d</sub>=5.62, *P*<0.01; ①*t*<sub>14d</sub>=6.35, *P*<0.01。与同时间内生理盐水组比较,②*t*<sub>7d</sub>=6.12, *P*<0.01; ②*t*<sub>14d</sub>=5.87, *P*<0.01; ③*t*<sub>3d</sub>=4.56, *P*<0.05。同组术后 3、7、14 d 分别两两比较, *F*<sub>3,7</sub>=18.65, *P*<0.01; *F*<sub>7,14</sub>=17.21, *P*<0.01; *F*<sub>3,14</sub>=18.25, *P*<0.01

Note: Compared with the blank control group, ①*t*<sub>3d</sub>=6.34, *P*<0.01; ①*t*<sub>7d</sub>=5.62, *P*<0.01; ①*t*<sub>14d</sub>=6.35, *P*<0.01. Compared with NS group at the same time, ②*t*<sub>7d</sub>=6.12, *P*<0.01; ②*t*<sub>14d</sub>=5.87, *P*<0.01; ③*t*<sub>3d</sub>=4.56, *P*<0.05. Comparison of LiCl group at 3, 7 and 14 d after operation, respectively, *F*<sub>3,7</sub>=18.65, *P*<0.01; *F*<sub>7,14</sub>=17.21, *P*<0.01; *F*<sub>3,14</sub>=18.25, *P*<0.01



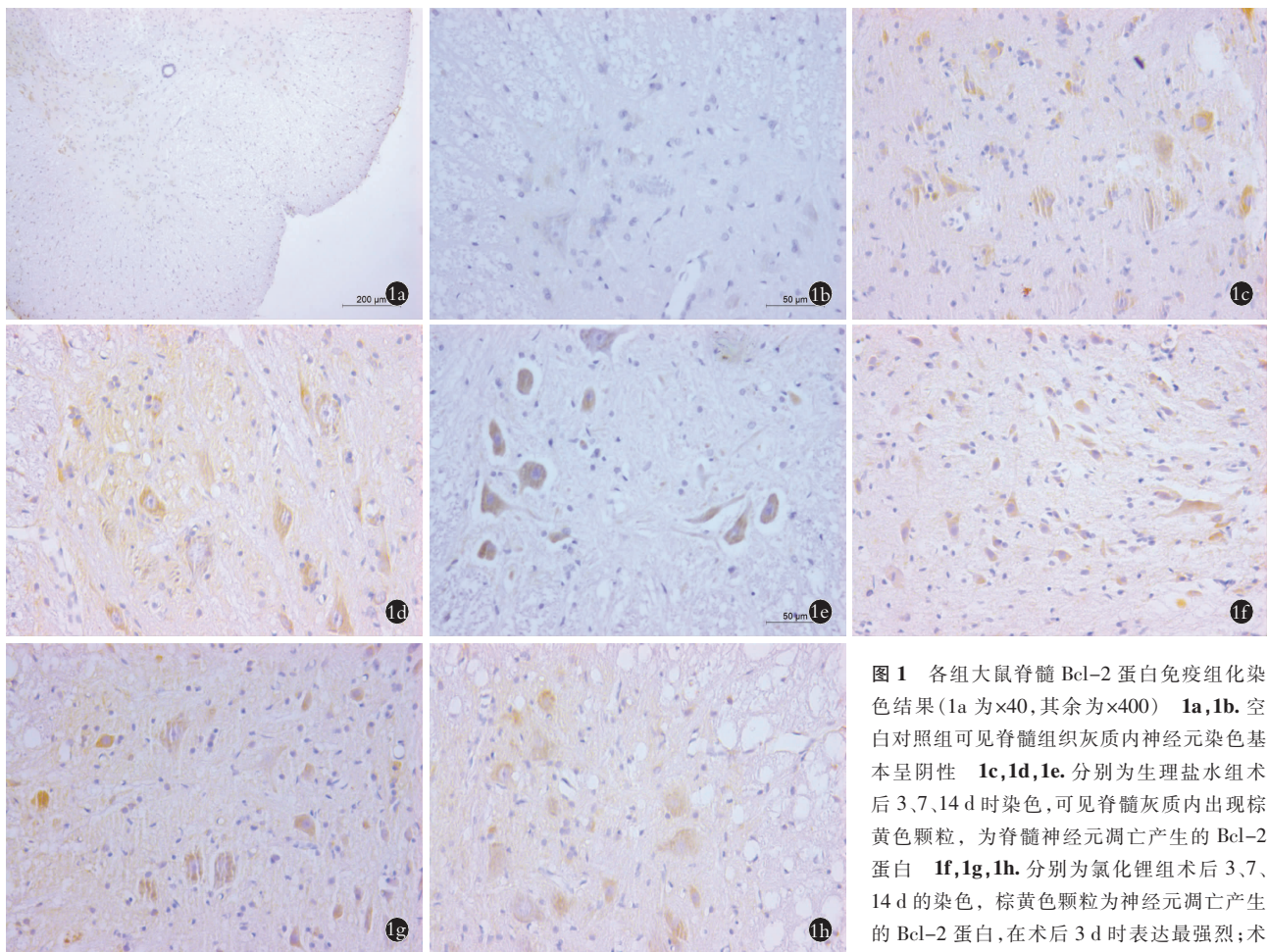


图 1 各组大鼠脊髓 Bcl-2 蛋白免疫组化染色结果(1a 为×40,其余为×400) 1a,1b. 空白对照组可见脊髓组织灰质内神经元染色基本呈阴性 1c,1d,1e. 分别为生理盐水组术后 3、7、14 d 时染色,可见脊髓灰质内出现棕黄色颗粒,为脊髓神经元凋亡产生的 Bcl-2 蛋白 1f,1g,1h. 分别为氯化锂组术后 3、7、14 d 的染色,棕黄色颗粒为神经元凋亡产生的 Bcl-2 蛋白,在术后 3 d 时表达最强烈;术后 3、7、14 d 可见氯化锂组较生理盐水组神

经细胞阳性染色强

Fig.1 Immunohistochemical staining of the Bcl-2 protein in spinal cord in three groups (1a×40, others×400) 1a,1b. Neurons staining in the gray matter of spinal cord tissue was negative in blank control group 1c,1d,1e. Postoperative 3, 7, and 14d, brown granules can be seen in the gray matter of spinal cord tissue by immunohistochemical staining in NS group, revealing the Bcl-2 protein by spinal cord neurons apoptosis 1f,1g,1h. The brown granules were Bcl-2 protein by neurons apoptosis in LiCl group at 3, 7, 14 d after operation, respectively. The expression of Bcl-2 protein at day 3 has the most intensive pattern after operation. The positive staining of LiCl group was stronger than that of NS group at 3, 7, 14 d after operation

表 3 不同时间点各组大鼠神经元 Bax 蛋白 AOD 比较(̄x±s)

Tab.3 Comparison of AOD of Bax protein in rat neuron among three groups at different time points(̄x±s)

组别	鼠数	术后 3 d	术后 7 d	术后 14 d
空白对照组	6	0.071±0.003	0.071±0.003	0.071±0.003
生理盐水组	6	0.150±0.003	0.126±0.001	0.120±0.002
氯化锂组	6	0.146±0.002 <sup>①③</sup>	0.121±0.002 <sup>①②</sup>	0.106±0.002 <sup>①②</sup>

注:与空白对照组比较, <sup>①</sup> $t_{3,d}=6.59, P<0.01$ ; <sup>①</sup> $t_{7,d}=5.78, P<0.01$ ; <sup>①</sup> $t_{14,d}=5.64, P<0.01$ 。与同时间内生理盐水组比较, <sup>②</sup> $t_{7,d}=5.34, P<0.01$ ; <sup>②</sup> $t_{14,d}=6.13, P<0.01$ ; <sup>③</sup> $t_{3,d}=4.57, P=0.02$ 。同组术后 3、7、14 d 分别两两比较,  $F_{3,7}=18.23, P<0.01$ ;  $F_{7,14}=18.41, P<0.01$ ;  $F_{3,14}=17.79, P<0.01$

Note: Compared with blank control group, <sup>①</sup> $t_{3,d}=6.59, P<0.01$ ; <sup>①</sup> $t_{7,d}=5.78, P<0.01$ ; <sup>①</sup> $t_{14,d}=5.64, P<0.01$ . Compared with NS group at the same time, <sup>②</sup> $t_{7,d}=5.34, P<0.01$ ; <sup>②</sup> $t_{14,d}=6.13, P<0.01$ ; <sup>③</sup> $t_{3,d}=4.57, P=0.02$ . Comparison of LiCl group at 3, 7 and 14 d, after operation, respectively,  $F_{3,7}=18.23, P<0.01$ ;  $F_{7,14}=18.41, P<0.01$ ;  $F_{3,14}=17.79, P<0.01$

的大鼠脊髓灰质区神经细胞染色阳性较强, 神经细胞凋亡较多; 术后 3、7、14 d 氯化锂组神经细胞染色阳性数均少于生理盐水组(见图 3)。3 组大鼠脊髓神

经元 AI 值见表 4。术后 3、7、14 d 氯化锂组与空白对照组 AI 值比较差异有统计学意义。术后 3 d 和 7 d 氯化锂组生理盐水组 AI 值差异有统计学意义; 术后

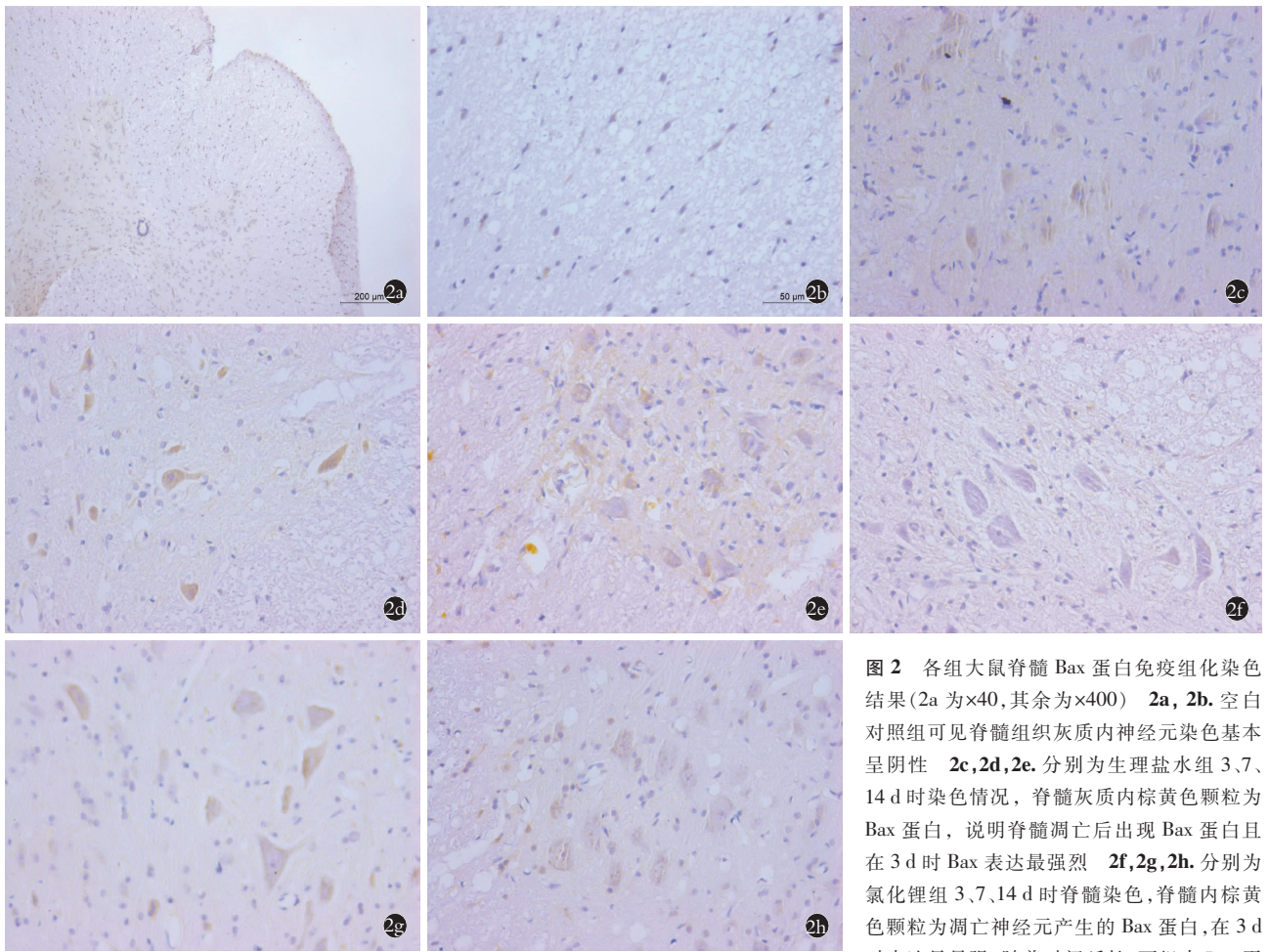


图 2 各组大鼠脊髓 Bax 蛋白免疫组化染色结果(2a 为×40,其余为×400) 2a, 2b. 空白对照组可见脊髓组织灰质内神经元染色基本呈阴性 2c, 2d, 2e. 分别为生理盐水组 3、7、14 d 时染色情况, 脊髓灰质内棕黄色颗粒为 Bax 蛋白, 说明脊髓凋亡后出现 Bax 蛋白且在 3 d 时 Bax 表达最强烈 2f, 2g, 2h. 分别为氯化锂组 3、7、14 d 时脊髓染色, 脊髓内棕黄色颗粒为凋亡神经元产生的 Bax 蛋白, 在 3 d 时表达量最强; 随着时间延长, 两组内 Bax 蛋

白表达显著下降, 但术后 3、7、14 d 可见氯化锂组较生理盐水组神经细胞阳性染色弱

**Fig.2** Immunohistochemical staining of Bax protein in spinal cord in three groups (2a×40, others×400) 2a, 2b. Neurons staining in the gray matter of spinal cord tissue was negative in blank control group 2c, 2d, 2e. Immunohistochemical staining at 3, 7, and 14 d after operation, the brown granules seen in the gray matter of spinal cord in NS group were Bax protein, which can explain its appearance after spinal cord neurons apoptosis. The Bax protein expression at day 3 after operation has the most intensive pattern 2f, 2g, 2h. Immunohistochemical staining of LiCl group at 3, 7, and 14 d after operation, the brown granules in spinal cord were Bax protein by neurons apoptosis. The expression of Bax protein at day 3 after operation has the most intensive pattern. As time went by, the expression of Bax protein in each group had significantly decreased. The level of neurons in LiCl group was weaker than that of the NS group at 3, 7, and 14d after operation

表 4 不同时间点各组大鼠 AI 比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

**Tab.4** Comparison of AI of rats among three groups at different time points ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	鼠数	术后 3 d	术后 7 d	术后 14 d
空白对照组	6	1.98±0.19	1.98±0.19	1.98±0.19
生理盐水组	6	34.61±1.30	18.26±0.87	5.48±0.70
氯化锂组	6	30.76±1.84 <sup>①②④</sup>	13.12±0.69 <sup>①②④</sup>	4.29±1.00 <sup>①③④</sup>

注: 与空白对照组比较, <sup>①</sup> $t_{3,d}=6.54, P<0.01$ ; <sup>①</sup> $t_{7,d}=6.02, P<0.01$ ; <sup>①</sup> $t_{14,d}=5.83, P<0.01$ 。与同时间内生理盐水组比较, <sup>②</sup> $t_{3,d}=5.12, P<0.01$ ; <sup>②</sup> $t_{7,d}=5.70, P<0.01$ ; <sup>③</sup> $t_{14,d}=4.65, P=0.02$ 。同组术后 3、7、14 d 分别两两比较,  $F_{3,7}=18.21, P<0.01$ ;  $F_{7,14}=18.05, P<0.01$ ;  $F_{3,14}=17.47, P<0.01$

Note: Compared with blank control group, <sup>①</sup> $t_{3,d}=6.54, P<0.01$ ; <sup>①</sup> $t_{7,d}=6.02, P<0.01$ ; <sup>①</sup> $t_{14,d}=5.83, P<0.01$ . Compared with NS group at the same time, <sup>②</sup> $t_{3,d}=5.12, P<0.01$ ; <sup>②</sup> $t_{7,d}=5.70, P<0.01$ ; <sup>③</sup> $t_{14,d}=4.65, P=0.02$ . Comparison of LiCl group at 3, 7, 14 d, after operation, respectively,  $F_{3,7}=18.21, P<0.01$ ;  $F_{7,14}=18.05, P<0.01$ ;  $F_{3,14}=17.47, P<0.01$

14 d 氯化锂组与生理盐水组 AI 值差异有统计学意义。氯化锂组进行组内两两多重比较, 术后 3、7、

14 d AI 值均不同, 由高到低依次为 3、7、14 d, 差异有统计学意义。



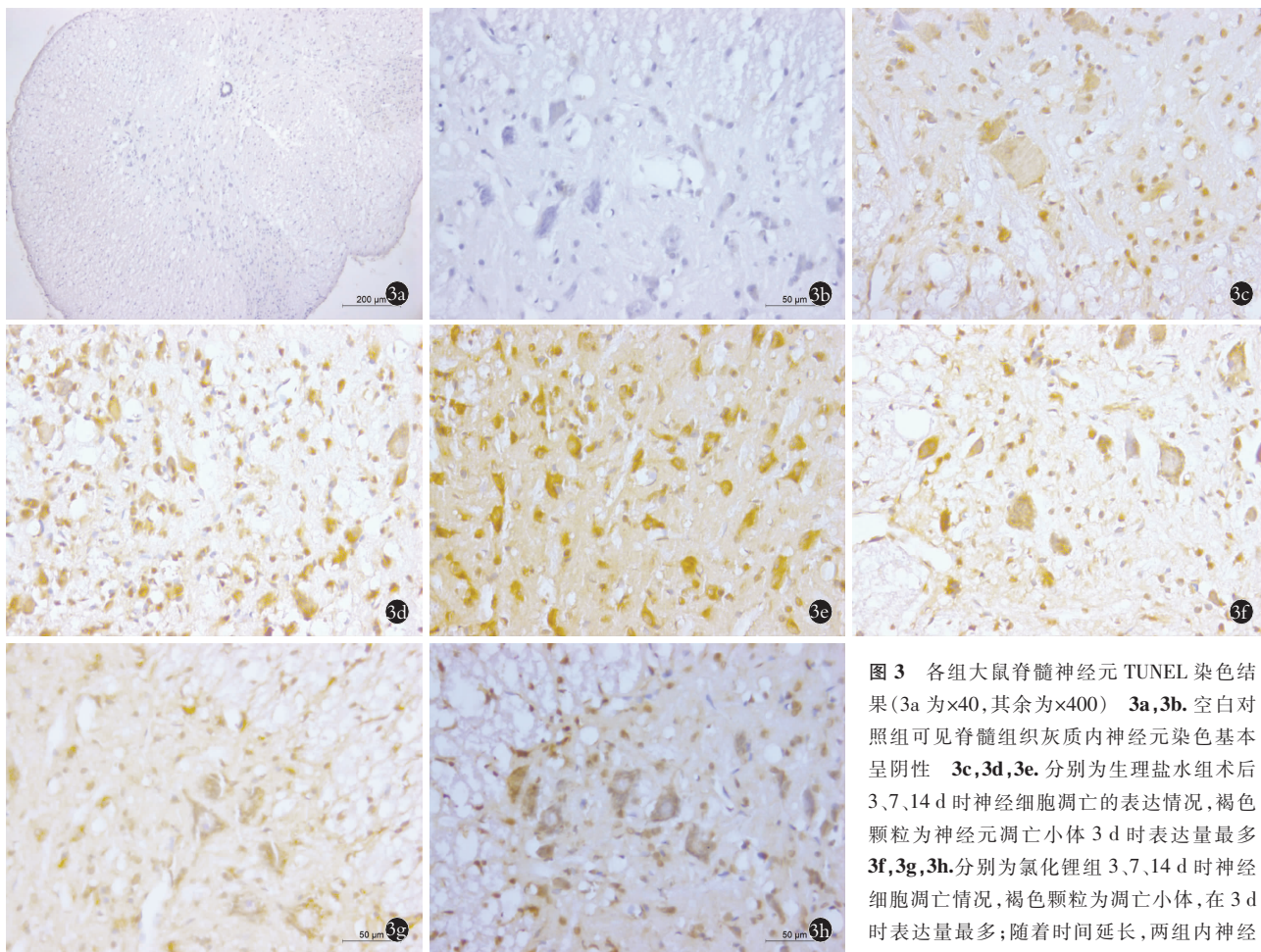


图 3 各组大鼠脊髓神经元 TUNEL 染色结果(3a 为×40,其余为×400) 3a,3b. 空白对照组可见脊髓组织灰质内神经元染色基本呈阴性 3c,3d,3e. 分别为生理盐水组术后 3、7、14 d 时神经细胞凋亡的表达情况,褐色颗粒为神经元凋亡小体 3d 时表达量最多 3f,3g,3h. 分别为氯化锂组 3、7、14 d 时神经细胞凋亡情况,褐色颗粒为凋亡小体,在 3 d 时表达量最多;随着时间延长,两组内神经细胞凋亡表达显著下降,但术后 3、7、14 d

可见氯化锂组较生理盐水组神经细胞凋亡情况少

**Fig.3** The TUNEL staining results of spinal cord neurons in three groups of rats (3a×40,others×400) 3a,3b. TUNEL staining in the gray matter of spinal cord tissue was negative in black control group and almost no apoptosis was found 3c,3d,3e. Apoptotic expression of NS group at 3,7, and 14 d after operation. The brown granules were neuron apoptotic bodies, and the expression was the highest at day 3 after operation 3f,3g,3h. Apoptotic expression of LiCl group at 3,7, and 14 d after operation. The brown granules were neuron apoptotic bodies, and the expression was the highest at day 3 after operation. As time went by, the neurons apoptosis in each group had significantly decreased. At the 3,7, and 14 d after operation, the number of neurons apoptosis of LiCl group was lower than that of the NS group

### 3 讨论

#### 3.1 锂剂治疗脊髓损伤后 BBB 评分变化

锂作为质量最轻的元素,能够透过血-脑屏障是其发挥中枢神经保护作用的基础。已经证实,锂剂能够选择性的活化神经元里 BDNF 的催化剂,并能够增加海马区 BDNF 水平<sup>[6]</sup>,而且还能够增加其他许多的神经营养因子<sup>[7-8]</sup>。笔者对大鼠进行脊髓损伤造模,并进行观察,采用行为学 BBB 评分证实了锂剂对脊髓损伤大鼠的保护作用。因为细胞的凋亡过程一般持续在伤后 2 周左右,所以本实验观测时段设为 2 周。在 2 周后,锂剂治疗组 BBB 评分最高,达到了 11.33±1.63,表明脊髓损伤大鼠在经过锂剂治疗后能有后肢的不规律抽动,并能负担自身部分重量。

#### 3.2 锂剂治疗脊髓损伤后 Bcl-2/Bax 蛋白变化

当中枢神经系统损伤后,神经细胞死亡,神经细胞的凋亡在这一过程中可能起到了主导作用<sup>[9]</sup>,而 Bcl-2/Bax 蛋白主要与线粒体相互作用,诱导抑制/活化凋亡蛋白酶,从而调控细胞凋亡。笔者对脊髓损伤后大鼠进行染色,发现脊髓损伤后大鼠脊髓 Bcl-2/Bax 蛋白染色阳性,说明脊髓损伤后大鼠脊髓神经元确实产生了凋亡现象。而且在脊髓损伤大鼠应用锂剂后,Bcl-2 蛋白表达程度均高于同时间点应用生理盐水组的大鼠,但 Bax 蛋白表达程度则相反,说明 Bcl-2 蛋白有一种抗凋亡作用的效果<sup>[10-11]</sup>,而 Bax 蛋白则参与了诱导凋亡的过程<sup>[12-14]</sup>。而且通过本研究发现,应用氯化锂治疗后,脊髓组织神经细胞凋亡程度减轻,从而证实了锂剂对脊髓损伤大鼠有抑制神经细胞凋亡的作用。这可能是由于应用氯化锂可

以上调 PEBP-2 $\beta$  的表达,促进转录因子与线粒体膜受体结合,进而有效地上调 Bcl-2 蛋白水平。

本研究中还发现,氯化锂治疗 SCI 时,伴随治疗时间的延长,Bcl-2 蛋白呈现短暂回落后回升的趋势,3 d 时 AOD 值最高,7 d 时 AOD 值最低,而 Bax 蛋白 AOD 值随时间延长呈现下降趋势。Tang 等<sup>[15]</sup>经研究报道了,在大鼠脊髓半切模型中,测得的 Bax-2 蛋白及 Bax 蛋白有类似的变化趋势。这可能与神经元的凋亡时程及动力学特征存在多样性有关,而神经元凋亡受局部微环境及损伤程度影响,从而直接影响了 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达。本研究进一步完善了应用氯化锂后,Bcl-2 和 Bax 蛋白在大鼠脊髓组织凋亡神经元内的变化过程,为 LiCl 治疗 SCI 抑制神经元凋亡的时间窗提供了一定的基础。

### 3.3 锂剂治疗脊髓损伤后 TUNEL 变化

TUNEL 可以检测细胞基因组 DNA 断裂时,暴露的 3'-OH 可以在酶的催化下加上荧光素 (FITC) 的标记,从而反应细胞凋亡情况。本研究可以看到,脊髓损伤后细胞均出现凋亡现象,而且随时间延长,凋亡现象逐渐减弱,这与生物体自然凋亡的规律是一致的。但是,经过锂剂治疗的大鼠凋亡程度明显减低,能够在一定程度上减弱这种损伤后脊髓神经元凋亡的现象,从而进行神经保护。

### 3.4 锂剂可以通过抑制凋亡治疗脊髓损伤

总之,应用氯化锂治疗 SCI 的有效性已经得到了很多实验的证实,其能够抑制大脑及体外培养的神经细胞凋亡,保护神经细胞的事实也被大量报道。本研究主要证实了氯化锂对大鼠 SCI 后脊髓神经细胞凋亡有抑制作用,为长期应用氯化锂治疗 SCI 的有效性提供了一定的依据,同时为氯化锂治疗 SCI 抑制神经细胞凋亡的时间窗提供了一定的基础。进一步扩展了氯化锂的应用范围,为 SCI 的治疗开创了一条新的道路,使氯化锂治疗 SCI 机制的研究也得到了进一步的发展,将氯化锂应用于临床治疗 SCI 获得了更有力的证据。

#### 参考文献

- [1] Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, et al. Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms[J]. Clin Neuropharmacol, 2001, 24(5): 254-264.
- [2] Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column[J]. JAMA, 1911, 54(4): 878-880.
- [3] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan, et al. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1-21.
- [4] Song JN, An JY, Hao GS, et al. Role of akt signaling pathway in delayed cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Acta Neurochir (Wien), 2013, 155(11): 2063-2070.
- [5] Sasaki M, Hains BC, Lankford KL, et al. Protection of corticospinal tract neurons after dorsal spinal cord transection and engraftment of olfactory ensheathing Cells[J]. Glia, 2006, 53(4): 352-359.
- [6] Frey BN, Andreatza AC, Rosa AR, et al. Lithium increases nerve growth factor levels in the rat hippocampus in an animal model of mania[J]. Behav Pharmacol, 2006, 17(4): 311-318.
- [7] Overall IP, Bell C, Mallory M, et al. Lithium ameliorates hiv-Gp120 mediated neurotoxicity[J]. Mol Cell Neurosci, 2002, 21(3): 493-501.
- [8] 张舵, 贺西京. 锂剂治疗脊髓损伤机制的研究进展[J]. 中国骨伤, 2015, 28(7): 679-682.  
ZHANG D, HE XJ. Advances in mechanisms of treatment for spinal cord injury with lithium[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(7): 679-682. Chinese with abstract in English.
- [9] 王放, 高中洋, 张廷, 等. 嗅鞘细胞移植联合跑步训练对改善脊髓损伤大鼠后肢运动功能的研究[J]. 中国骨伤, 2016, 29(10): 928-938.  
WANG F, GAO ZY, ZHANG T, et al. Study of olfactory ensheathing cells transplantation and treadmill training on improving hindlimb motor function of spinal cord injury rats[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2016, 29(10): 928-938. Chinese with abstract in English.
- [10] Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked[J]. Science, 1997, 275(5303): 1129-1132.
- [11] Korn MJ, Koppel SJ, Cramer KS. Astrocyte-secreted factors modulate a gradient of primary dendritic arbors in nucleus laminaris of the avian auditory brainstem[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27383.
- [12] Wei MC, Zong WX, Cheng EH, et al. Proapoptotic bax and bak: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death[J]. Science, 2001, 292(5517): 727-730.
- [13] Gupta S, Knowlton AA. Hsp60, Bax, Apoptosis and the heart[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(1): 51-58.
- [14] 谢维凯, 朱振中, 张长青. 锂剂的神经保护作用及其分子机制[J]. 中国医学装备, 2014, 11: 394-395.  
XIE WK, ZHU ZZ, ZHANG CQ. The neuroprotective effect of lithium agent and its molecular mechanism[J]. Zhongguo Yi Xue Zhuang Bei, 2014, 11: 394-395. Chinese.
- [15] Tang P, Hou H, Zhang L, et al. Autophagy reduces neuronal damage and promotes locomotor recovery via inhibition of apoptosis after spinal cord injury in rats[J]. Mol Neurobiol, 2014, 49(1): 276-287.

(收稿日期: 2017-12-21 本文编辑: 李宜)