

大剂量甲基强的松龙对大鼠急性脊髓损伤后 c-fos 及 HSP 70 表达的影响

马旭, 吕刚[△], 王岩峰, 于德水, 黄涛

(中国医科大学附属第一医院骨科, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] 目的:探讨大剂量甲基强的松龙(MP)对大鼠急性脊髓损伤(ASCI)后 c-fos 及热休克蛋白 70(HSP 70)表达的影响。方法:选用 48 只大鼠建立 ASCI 模型,应用免疫组化方法和图像分析技术研究 MP 组和 NS 组在伤后 1,3,6 h 和 1,2,3 d 脊髓组织中 c-fos、HSP 70 的表达。结果:MP 组与 NS 组脊髓损伤组织中存在 c-fos、HSP 70 的阳性表达。ASCI 后 c-fos 表达增加,3 h 最为显著,MP 组在伤后 1,3,6 h c-fos 的表达明显低于 NS 组($P < 0.05$);ASCI 后 HSP 70 表达增加,1 d 最为显著,MP 组在伤后 6 h($P < 0.05$)、1 d($P < 0.01$)、2 d($P < 0.01$)HSP 70 的表达明显高于 NS 组。结论:MP 可以抑制 c-fos 和促进 HSP 70 的表达,对 ASCI 的治疗有效。

[关键词] 脊髓损伤;甲基强的松龙;c-fos 蛋白;热休克蛋白 70

[中图分类号] R681.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-4646(2007)01-0035-03

Effect of high-dose methylprednisolone on expressions of c-fos and heat shock protein 70 after acute spinal cord injury in rats

MA Xu, LÜ Gang[△], WANG Yan-feng, YU De-shui, HUANG Tao

(Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the effect of high-dose methylprednisolone (MP) on the expressions of c-fos and heat shock protein 70 (HSP70) after acute spinal cord injury (ASCI) in rats. **Methods:** The rat model of ASCI was established by using Allen's method in 48 female Wistar rats, and the rats were treated with MP (MP group) or normal saline (NS group) after ASCI. The expressions of c-fos and HSP70 were determined by immunohistochemical method and image analytical technology 1, 3, and 6 hours and 1, 2, and 3 days after ASCI, respectively. **Results:** The expressions of c-fos and HSP70 in spinal cord tissues were positive in both NS group and MP group. The expression of c-fos increased after ASCI, and reached the peak 3 hours after ASCI. The expression of c-fos in MP group was significantly lower than that in NS group 1, 3, and 6 hours after ASCI (all $P < 0.05$). The expression of HSP70 increased after ASCI and reached the peak 1 day after ASCI. The expression of HSP70 in MP group was significantly higher than that in NS group 6 hours, 1 day, and 2 days after ASCI ($P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.01$, respectively). **Conclusion:** MP could inhibit the expression of c-fos and stimulate the expression of HSP70, and thus it is effective in treating ASCI.

[Key words] spinal cord injury; methylprednisolone; c-fos protein; heat shock protein 70

临床治疗脊髓损伤药物中,甲基强的松龙(methylprednisolone, MP)是应用非常广泛的皮质类固醇激素类药物,但其作用机制仍在不断地探索之中。本实验通过检测 MP 对大鼠急性脊髓损伤(acute spine cord injury, ASCI)后 c-fos 及热休克蛋白 70(heat shock protein, HSP 70)表达的影响,进一步探讨 MP 治疗 ASCI 的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物分组:选用 Wistar 雌性大鼠 48 只(中国

医科大学实验动物中心提供),体质量(220 ± 20) g,随机分为 MP 组和 NS 组,损伤后 1,3,6 h 和 1,2,3 d 采取脊髓标本,每组每个时间点 4 只。

1.1.2 药物及试剂:MP 为甲泼尼龙琥珀酸钠(Pharmacia & Upjohn 公司,比利时);HSP 70 及 c-fos—抗(SANTA CRUZ 公司,美国);S-P 免疫组化染色试剂盒(ZYMED 公司,美国)

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备及取材:应用 Allen 法建立大鼠 ASCI 模型^[1];损伤部位为胸椎 10、11 节,打击力为 $10 \text{ g} \times 2.5 \text{ cm}$,大鼠尾巴痉挛性摆动,双下肢及躯体回缩扑动后,双下肢瘫痪,表明撞击成功。MP 组大鼠于伤后 15 min,按首次剂量 30 mg/kg 尾静脉内注射 MP,1 h 后按 $5.4 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ 给药,共 23 h;NS

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助项目(20052096)

[作者简介] 马旭(1973—),男,主治医师,硕士。

[△]Corresponding Author's E-mail: ganglv_sy@163.com

组在同时间点注入等量生理盐水。因麻醉过量术中死亡 2 只,术后并发症死亡 2 只,随即补充动物。

1.2.2 取材及染色处理:按实验要求的时间点断头处死相应实验组的大鼠,迅速取出伤段(含上、下至少两个椎体)脊柱,剪去肋骨,浸泡于 10%中性福尔马林溶液中,12 h 后小心去除椎骨,完整取出脊髓组织,每一标本以损伤段为中心横切为两段,任选一段脱水、包埋,制成蜡块标本,连续切片,片厚 5 μm。切片脱蜡水化后,分别行 HE 染色,c-fos、HSP 70免疫组化 S-P 法染色。

1.2.3 图像分析:各组每只分别选取 6 张 c-fos、HSP 70免疫组化染色切片,光镜下阳性反应物为突出背景的棕黄色颗粒,阴性对照物则染成蓝色。每张切片取灰质后角及周围白质的高倍视野,所有图像经 Metamorph Image System(V 4.6)处理,通过对阳性信号平均积分光密度值(integrated optical density average,IOD)的分析,测定 c-fos及 HSP 70的表达。IOD 与 c-fos、HSP 70的免疫反应强度呈正比关系。

1.3 统计学分析

所有指标 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件,各时间点组间先行方差齐性检验,组间差异再用两均数的 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组组织病理学变化

光镜下可见 NS 组脊髓组织水肿、出血,出血主要位于灰质及灰质与白质交界处,神经元肿胀、轮廓不清、破裂、溶解,胞浆尼氏体边聚,有噬神经现象;MP 组脊髓组织水肿、出血较 NS 组明显减轻。

2.2 各组 c-fos表达的比较

表达 c-fos蛋白的阳性细胞主要是细胞核染成棕黄色的神经胶质细胞,多见于后角浅层及周围白质,部分分布于后角深层及中央管周围。ASCI 后阳性细胞数增加,以 3 h 最为显著,且灰质后角神经元细胞核也见少量 c-fos蛋白阳性表达产物,1 d 后表达明显减少。而 MP 可进一步减少 c-fos蛋白的表达,1,3,6 h MP 组的表达与 NS 组相比,具有显著性差异($P < 0.05$),而其他组的表达无明显差异(表 1)。

表 1 2 组大鼠 ASCI 后 c-fos、HSP 70表达的比较(IOD 值, $n = 24, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Expressions of c-fos and HSP 70 after acute spinal cord injury (IOD value, $n = 24, \bar{x} \pm s$)

时间	c-fos		HSP 70	
	NS 组	MP 组	NS 组	MP 组
1 h	7.28 ± 1.48	6.42 ± 1.03 ¹⁾	8.17 ± 1.06	8.45 ± 1.74
3 h	11.81 ± 2.82	10.30 ± 1.77 ¹⁾	8.29 ± 1.22	8.90 ± 1.83
6 h	7.26 ± 2.01	6.20 ± 1.44 ¹⁾	9.36 ± 2.16	10.73 ± 2.37 ¹⁾
1 d	5.43 ± 0.81	5.14 ± 1.10	12.80 ± 2.90	15.41 ± 3.71 ²⁾
2 d	4.94 ± 1.22	4.69 ± 1.20	11.20 ± 3.25	13.37 ± 2.09 ²⁾
3 d	4.58 ± 1.24	4.24 ± 1.11	8.41 ± 1.87	8.97 ± 1.79

注:与 NS 组比较 1) $P < 0.05$,2) $P < 0.01$

2.3 各组 HSP 70表达的比较

表达 HSP 70蛋白的阳性细胞较集中地分布于脊髓灰质及后角周围白质的细胞浆染成棕黄色的神经胶质细胞。ASCI 后阳性细胞数增加,1 d 组表达最多,然后减少。而 MP 可进一步增加 HSP 70 蛋白的表达,6 h 和 1 d,2 d MP 组的表达与 NS 组比较有显著差异,而其他组的表达无明显差异(表 1)。

3 讨论

近年来的研究表明,c-fos蛋白是即刻早期基因(immediate-early genes, IEGs)的产物^[2]。正常情况下,c-fos在神经元中呈低表达。多种刺激因子,如缺氧、光线、机械、疼痛刺激等均可诱导其表达增强,是神经元受损伤的一种标志^[3]。本实验发现脊髓损伤后即有 c-fos的表达增加,3 h 达高峰,1 d 后逐渐减

少。HSP 70是生物细胞在受热、缺血、缺氧、病毒感染、机械性损伤后产生的具有保护作用的应激蛋白。本实验对机械性损伤中 HSP 70的作用进行了研究,发现伤后 HSP 70的表达增加,1 d 达高峰,2 d 后逐渐减少。目前认为 HSP 70 是主要的伴侣蛋白之一^[4]。其作用是与新生、未折叠、错折叠或聚集的蛋白质相结合,加速正确的肽链折叠;维持某些肽链的伸展状态;促进某些变性蛋白的降解和清除;维持或重新激活某些酶的作用,保护细胞功能。

本研究表明,ASCI 后 c-fos及 HSP 70的表达均增加。脊髓损伤后 c-fos表达增高,是脊髓继发性损伤过程中神经元受损伤的一种标志;而 HSP 70对细胞的保护作用,也使得 HSP 70在 ASCI 后表达增强。由于 c-fos蛋白在细胞核中表达,而 HSP 70蛋白在细胞浆中表达,因此,通过免疫细胞化学方法可以将二

者很好地区分开来。ASCI 后机体同时发生了损伤性反应和保护性反应:c-fos 的快速增加说明机体能够在非常短的时间内对损伤性刺激做出反应;HSP 70 随后也增加说明机体对损伤性刺激能够快速做出保护性反应。c-fos 和 HSP 70 的表达在时间上的连续性提示我们,二者在发生机制上是否存在某种相关性和促进作用,值得我们进一步探讨。

脊髓损伤分为原发性损伤和继发性损伤。目前,ASCI 的治疗重点已延伸到了继发性损伤及慢性损伤阶段。本研究表明,早期大剂量使用 MP 能显著控制 ASCI 后的炎症反应并减轻伤后的继发性损伤,是治疗 ASCI 有效的药物。MP 可进一步减少 c-fos 的表达,增加 HSP 70 的表达,其作用机制在于 MP 可以逆转 Ca^{2+} 在 ASCI 后的不平衡分布,提高钠-钾泵($Na^+/K^+-ATPase$)活性,抑制脂质过氧化反应,使其免遭自由基攻击;还能够抑制磷脂酶 A_2 的活性,促进前列腺素的合成,增加损伤脊髓血流量,并促进脊髓组织修复和再生,减轻组织渗出和水肿。

综上所述,ASCI 后 MP 可以抑制 c-fos 的表达,促进 HSP 70 的表达,从而达到治疗作用,为 MP 治疗 ASCI 提供了新的理论依据。

参考文献:

- [1] BLACK P, MARKOWITZ RS, DAMJANOV I, et al. Models of spinal cord injury: Part 3. Dynamic load technique [J]. *Neurosurgery*, 1988, 22(1): 51-60.
- [2] ASAMOTO K, TAMAMAKI N, NOJYO Y. Distribution of preganglionic terminals in the cervical sympathetic ganglia detected by the expression of c-Fos like protein after electric stimulation of the ventral root [J]. *Kaibogaku Zasshi*, 2001, 76(3): 303-311.
- [3] LANDRUM LM, JONES SL, BLAIR RW. The expression of Fos-labeled spinal neurons in response to colorectal distension is enhanced after chronic spinal cord transection in the rat [J]. *Neuroscience*, 2002, 110(3): 569-578.
- [4] WILLEM VAN EDEN, RUURD VAN DER ZEE, BERENT PRAKKEN. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(4): 318-320.

[收稿日期] 2005-12-19

(上接第 32 页)

蛋白酶激活后主要是通过 PI3K/PKB 信号转导通路来传递信息并调节细胞活化的,一旦 PI3K/PKB 信号转导通路被阻断,炎症介质的释放就被有效地抑制了。

大量研究显示 G 蛋白偶联受体活化后可以通过细胞内 G 蛋白的 α 及 $\beta\gamma$ 亚单位 (G_i 、 G_q 及 $G_{\beta\gamma}$) 激活 PI3K^[8], 作为 G 蛋白偶联受体 PAR-2 细胞内的 G 蛋白也有 G_i 、 G_q 及 $G_{\beta\gamma}$ 偶联^[9], 因此 PAR-2 活化 PI3K 具有良好的分子基础,但要证实是通过哪个亚单位激活 PI3K 还需要进一步的实验。

本实验结果首次证实了 PI3K 信号转导通路在胰蛋白酶激活中性粒细胞过程中的作用,并且证明了胰蛋白酶可以直接激活中性粒细胞产生炎症介质,参与炎症反应。这使我们进一步理解了 SAP 时炎症反应的放大机制,将有助于我们从新的角度认识和了解 SAP 的发病本质,为采取有效的干预措施提供了理论依据。

参考文献:

- [1] OSSOVSKAYA VS, BUNNETT NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(11): 579-621.
- [2] HOWELLS GL, MACEY MG, CHINNI C, et al. Proteinase-activated

receptor-2; expression by human neutrophils [J]. *J Cell Sci*, 1997, 110(4): 881-887.

- [3] HARTWIG W, WERNER J, JIMENEZ RE, et al. Trypsin and activation of circulating trypsinogen contribute to pancreatitis-associated lung injury [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(3): G1008-G1016.
- [4] NAMKUNG W, HAN W, LUO X, et al. Protease-activated receptor 2 exerts local protection and mediates some systemic complications in acute pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 2004, 126(7): 1844-1859.
- [5] YUM HK, ARCAROLI J, KUPFNER J, et al. Involvement of Phosphoinositide 3-Kinases in Neutrophil Activation and the Development of Acute Lung Injury [J]. *J Immunol*, 2001, 167(11): 6601-6608.
- [6] LI, Z., H, JIANG, W, XIE, et al. Role of PLC- β 2 and - β 3 and PI3K γ in chemoattractant-mediated signal transduction [J]. *Science*, 2000, 287(5455): 1046-1049.
- [7] HIRSCH E, KATANAEV VL, GARLANDA C, et al. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation [J]. *Science*, 2000, 287(5455): 1049-1053.
- [8] RAHMAN A, TRUE AL, ANWAR KN, et al. Alpha (q) and Gbetagamma regulate PAR-1 signaling of thrombin-induced NF-kappaB activation and ICAM-1 transcription in endothelial cells [J]. *Circ Res*, 2002, 91(2): 398-405.
- [9] MIYATA S, KOSHIKAWA N, YASUMITSU H, et al. Trypsin Stimulates Integrin alpha (5)beta (1)-dependent adhesion to fibronectin and proliferation of human gastric carcinoma cells through activation of proteinase-activated receptor-2 [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(7): 4592-4598.

[收稿日期] 2006-07-10