

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)15-1397-04

褪黑素对大鼠慢性压迫脊髓损伤 Caspase-3 表达及细胞凋亡的影响

潘文杰¹, 汪玉良¹, 王栓科¹, 夏亚一¹, 贺艳², 李延宏¹, 王景¹¹兰州大学第二医院骨科研究所, 甘肃 兰州 730030; ²延安市人民医院药剂科, 陕西 延安 716000

Effect of melatonin on caspase-3 expression and neural cell apoptosis in chronic compression spinal cord injury in rats

PAN Wen-Jie¹, WANG Yu-Liang¹, WANG Shuan-Ke¹, XIA Ya-Yi¹, HE Yan², LI Yan-Hong¹, WANG Jing¹¹Institute of Orthopaedics, Second Affiliated Hospital, Lanzhou University, Lanzhou 730030, China, ²Pharmaceutical Preparation Section, People's Hospital of Yan'an city, Yan'an 716000, China

【Abstract】 AIM: To observe the effect of melatonin on expression of caspase-3 and apoptosis in chronic compression spinal cord injury in rats. **METHODS:** The chronic compression spinal cord injury model was established by compression to the posterior spinal cord in 70 healthy male Wister rats, then the rats were randomly divided into 2 groups: treatment group receiving melatonin (group A) and control group receiving physiological saline containing 50 mL/L ethanol (group B). The rats were killed at day 1, 4, 11, 21, 35, 60, 90 after injury, and then the tissue slices of injured spinal cord were cut for morphological studies by HE staining. The expression of caspase-3 was detected with immunohistochemistry. TUNEL was used to label apoptotic cells. Neurological function changes were assessed with improved Tarlov scores and inclined plane test. **RESULTS:** The histopathological changes in injured spinal cord tissue observed with HE staining and microscopic examination in group A was distinctly less than those in group B. Expression of caspase-3 and TUNEL-positive cells were both seen in the 2 groups, and the expression of caspase-3 and apoptosis index in group B was higher than those in group A ($P < 0.05$), which was parallel to changing trend of neurological function after chronic compression spinal cord injury. **CONCLUSION:** Melatonin could suppress caspase-3 expression and apoptosis in chronic compression spinal cord injury in rats.

【Keywords】 melatonin; chronic spinal cord injury; apoptosis; caspase-3; neurological function

【摘要】目的 探讨褪黑素(MT)对大鼠慢性压迫脊髓损伤半胱-天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)表达和细胞凋亡的影响。方法 将70只大鼠建立慢性压迫损伤动物模型,随机分为MT治疗组(A组)和含50 mL/L无水乙醇的生理盐水对照组(B组),于损伤1、4、11、21、35、60和90 d取材,采用HE染色观察慢性压迫脊髓损伤脊髓组织病理变化,用免疫组化法染色检测Caspase-3表达阳性细胞,原位末端标记法(TUNEL法)标记凋亡细胞,并用改良的Tarlov评分法和斜板实验观察大鼠脊髓神经功能变化情况。结果 HE染色光镜下观察脊髓组织病理学改变A组明显轻于B组,A、B两组均发现Caspase-3表达及TUNEL标记阳性凋亡细胞,Caspase-3表达和神经细胞凋亡指数均B组>A组($P < 0.05$),与大鼠脊髓神经功能变化有平行的变化趋势。结论 MT能抑制大鼠慢性压迫脊髓损伤Caspase-3表达和神经细胞凋亡。

【关键词】 褪黑素;慢性脊髓损伤;细胞凋亡;Caspase-3;神经功能

【中图分类号】 R744.2

【文献标识码】 A

0 引言

脊髓损伤一直是世界性重要的医学课题。近年来研究证实了脊髓损伤后存在大量神经细胞以凋亡的形式死亡,可见细胞凋亡是脊髓损伤继发改变的重要病理过程^[1-2]。有效抑制神经细胞凋亡已成为脊髓损伤治疗的一个途径。褪黑素(melatonin, MT)是松果体分泌的一种激素,研究发现其具有强大的自由基清除作用,对脑损伤、帕金森病、外周神经损伤等多种神经系统疾病有保护作用^[3],但相关的机制却少见报道。本实验用大鼠慢性压迫脊髓损伤模型,腹腔注射MT,通过观察其对细胞凋亡和半胱-天冬氨酸蛋白酶(Caspase-3)表达的影响,进一步探讨MT保护神经细胞的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 220~280 g健康成年雄性Wister大鼠70只(由兰州军区总医院实验动物中心提供);MT(美国Sigma公司)用无水乙醇溶解,生理盐水稀释,最终乙醇浓度为50 mL/L,兔抗鼠Caspase-3 p20亚单位一抗,原位末端标记(TUNEL)试剂盒,SABC免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

收稿日期 2006-12-22; 接受日期 2007-04-10

通讯作者 汪玉良. Tel (0931) 8942560 Email sxhz938@163.com

作者简介:潘文杰,硕士生(导师汪玉良),主治医师. Tel (0931) 8942560 Email pwj6592@yahoo.com.cn

1.2 方法

1.2.1 动物分组 将 70 只大鼠随机分为脊髓压迫 + MT 治疗组 (A 组) 和脊髓压迫 + 含 50 mL/L 无水乙醇生理盐水对照组 (B 组), 每组动物 35 只。

1.2.2 动物模型建立 70 只大鼠用 100 mL/L 水合氯醛 (350 mg/kg) 腹腔麻醉, 常规消毒铺巾, 以椎体 T10 为中心取后正中切口, 明确及咬除 T10 棘突及部分椎板, 置入平头塑料螺钉对大鼠脊髓进行渐进性后路压迫^[4] (在螺钉中央钻孔插入细银丝以便于影像学观察), 以后每隔 10 ~ 15 d 显露螺钉, 将螺钉旋进约 0.1 ~ 0.25 mm, 共 5 ~ 6 次。观察椎管狭窄率 (constrictive rate of spinal canal, CR) 即压迫物占椎管矢状径的百分比, 同时观察脊髓受伤平面以下的神经功能状况, 定期行受压脊柱脊髓影像学检查, 直至脊髓受压程度达 40% ~ 60% (中度程度压迫)。分别于损伤 1 d, 11, 21, 35, 60 和 90 d 取材, 每组各时相点 5 只动物。

1.2.3 给药方法 A 组: 在暴露的硬膜下注射 MT (5 mg/kg), 伤后即刻经腹腔注射 MT (10 mg/kg), 之后每日 11:00 经腹腔注射同等剂量 MT 1 次。B 组: 注射方法同 A 组, 给予等量的含 50 mL/L 无水乙醇生理盐水作为对照治疗。

1.2.4 神经功能检查 A、B 两组各时相点动物处死前分别行改良的 Tarlov 评分、斜板试验, 对大鼠进行行为及肢体运动功能检查, 观察慢性压迫脊髓损伤各时相点大鼠后肢活动、肌力等的变化, 以此评定 MT 对大鼠慢性压迫脊髓损伤脊髓神经功能的影响。

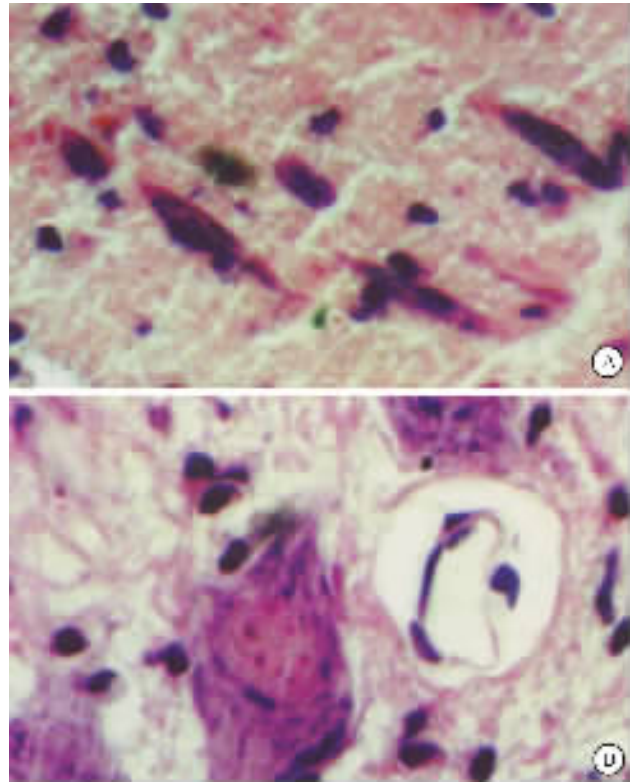
1.2.5 取材及固定 将两组大鼠在各相应取材时间点用 100 mL/L 水合氯醛 (350 mg/kg) 腹腔麻醉, 经左心室灌注生理盐水 200 mL 冲洗至流出澄清液, 再用 40 g/L 多聚甲醛约 200 mL 灌流固定, 解剖椎管, 以损伤处为中心完整切除约 1.5 cm 脊髓组织, 立即用 40 g/L 中性甲醛固定 72 h 后, 常规石蜡包埋连续切片, 片厚 4 μm , 以备 HE 染色和免疫组化染色及 TUNEL 染色。

1.2.6 免疫组化染色及 TUNEL 染色 免疫组化染色参照 SABC 试剂盒说明书进行操作, 中性树脂封片保存, 镜下观察每张切片的阳性细胞, 结果判定: 细胞胞质呈棕黄色染色定为阳性细胞, 计数高倍视野 ($\times 400$) 内阳性细胞数并计算阳性细胞率; TUNEL 法标记, 严格按照检测试剂盒说明书对脊髓组织切片进行染色, 结果判定: 细胞核中有棕黄色颗粒定为阳性细胞, 计算高倍视野 ($\times 400$) 下凋亡细胞指数 (apoptotic index, AI), 即每张片选取 6 个阳性细胞最多的高倍视野, 计算出平均阳性细胞百分数。

统计学处理: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 采用 SPSS 10.0 软件包进行数据分析, 差异统计学意义检验采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 病理组织学改变 B 组大鼠压迫初期脊髓灰质水肿, 点状出血, 部分神经元肿胀, 尼氏体淡染, 消失, 有卫星现象, 有少量小胶质细胞和星形胶质细胞增生。白质表现为轴突排列紊乱, 有不规则的片状脱髓鞘区。压迫 2 mo 后灰质内神经元普遍肿胀, 卫星现象、噬神经元现象非常显著, 可见软化灶。白质内脱髓鞘明显增多, 空泡化改变, 有少许炎性细胞浸润, 胶质细胞增生。A 组病理改变较 B 组有所减轻, 早期脊髓组织轻度水肿, 无明显出血点, 神经细胞肿胀不明显, 后期神经元、轴突改变亦较轻微, 胶质细胞增生明显 (图 1)。



A: 褪黑素治疗组; B: 对照组。

图 1 损伤 60 d 大鼠脊髓组织 HE $\times 400$

2.2 Caspase-3 的表达 B 组大鼠脊髓损伤 4 d 时 Caspase-3 表达呈增加趋势, 损伤 11 d 时明显表达, 21 d 时达高峰, 35 d 时表达仍较明显, 60 d 时明显下降, 90 d 时仍有一定的表达。A 组大鼠用 MT 治疗后, Caspase-3 表达较 B 组低, 4 d 时有表达, 11 d 时达高峰, 以后呈下降趋势。A 组与 B 组 Caspase-3 表达除 1

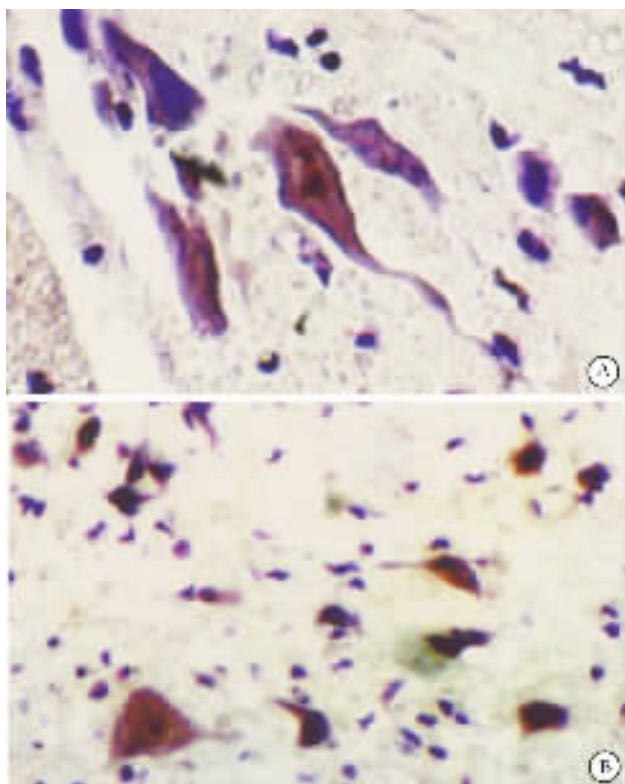
d 外,其它时间点差异均有统计学意义($P < 0.05$, 表 1, 图 2)。

表 1 大鼠慢性压迫脊髓损伤不同时间点 Caspase-3 表达阳性细胞率

($n=5$, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	慢性压迫损伤时间(d)						
	1	4	11	21	35	60	90
A	7.08 ± 3.84	19.90 ± 4.30 ^a	32.37 ± 4.11 ^b	29.03 ± 4.15 ^b	20.69 ± 3.37 ^b	14.72 ± 3.58 ^a	11.04 ± 1.99 ^a
B	9.68 ± 4.60	29.28 ± 6.47	57.14 ± 6.13	64.19 ± 5.05	53.32 ± 4.66	21.11 ± 4.75	15.06 ± 2.23

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs B. A 褪黑素治疗组 B 对照组。



A: 褪黑素治疗组; B: 对照组。

图 2 损伤 11 d 大鼠 Caspase-3 的表达 SABC × 400

表 2 大鼠慢性压迫脊髓损伤不同时间点的凋亡细胞率指数

($n=5$, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	慢性压迫损伤时间(d)						
	1	4	11	21	35	60	90
A	5.61 ± 4.00	13.47 ± 2.48 ^a	20.07 ± 2.37 ^b	16.78 ± 4.94 ^b	11.80 ± 5.07 ^a	8.25 ± 2.31 ^a	6.49 ± 2.56 ^a
B	7.87 ± 5.27	16.80 ± 2.02	31.78 ± 2.16	34.83 ± 4.34	23.44 ± 6.14	13.06 ± 3.14	10.38 ± 2.67

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs B. A 褪黑素治疗组 B 对照组。

Caspase 是一组与秀丽隐杆线虫 CED-3 同源的执行哺乳动物细胞凋亡的主要蛋白酶家族^[6],与凋亡最为密切的蛋白酶。迄今发现有 14 个家族成员,其中 Caspase-3 是最重要的终末剪切酶。正常情况下, Caspase-3 蛋白是以酶原的形式合成并存在于机体细胞中,通过蛋白水解去除氨基酸的一段序列而被活

化, Caspase-3 激活后可裂解细胞内固有的和保护性的酶类导致细胞凋亡。本实验表明在慢性压迫脊髓损伤 4 d 时 Caspase-3 开始表达, 11 ~ 21 d 达到高峰, 以后逐渐减少但仍然有一定数量的表达, 推测可能随着压迫时间的延长和程度的加重部分细胞以坏死的形式死亡有关。与 TUNEL 所检测的阳性凋亡细胞在时

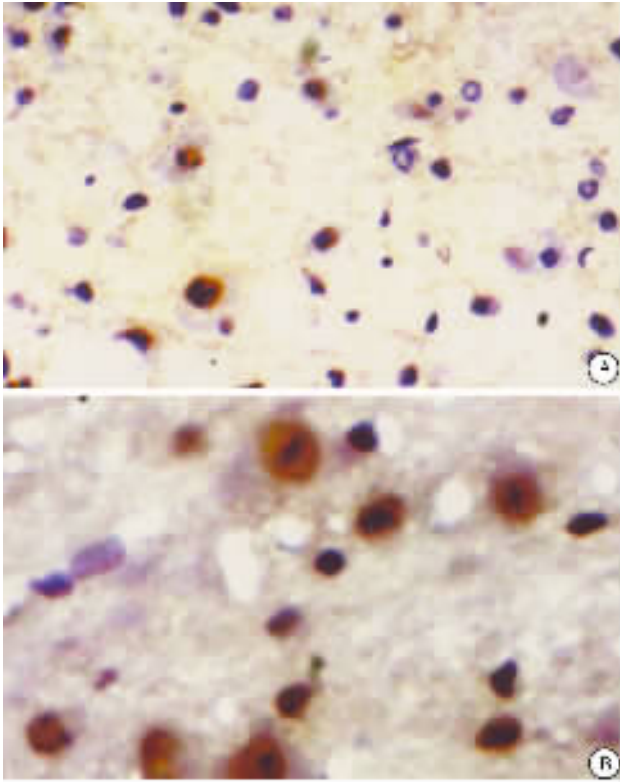
2.3 TUNEL 检测凋亡细胞 B 组大鼠脊髓损伤 4 d 时在脊髓灰质及白质有标记阳性的凋亡细胞, 损伤 11 d 时凋亡指数明显增加, 21 d 时达高峰, 35 d 时仍明显, 60 d 时凋亡指数明显下降, 90 d 时仍可见标记的阳性细胞。A 组大鼠脊髓神经细胞凋亡指数较 B 组低, 高峰发生在损伤 11 d, 以后明显下降。A 组与 B 组神经细胞凋亡指数除 1 d 外, 其它时间点差异均有统计学意义($P < 0.05$, 表 2, 图 3)。

2.4 神经功能变化 慢性压迫脊髓损伤模型制成后脊髓神经功能无明显异常, 随着压迫时间延长及程度加重, 脊髓神经功能出现不同程度的下降。A 组脊髓神经功能明显好于 B 组, A 组与 B 组比较除 1 d 外, 其它时间点差异均有统计学意义($P < 0.05$, 表 3)。

3 讨论

凋亡是一种自然的生理过程。在神经系统的发育过程中对神经细胞的生长、发育、分化及维持细胞的数量和质量、稳定突触联系和神经内环境起着重要作用。研究表明在神经系统损伤和神经系统退行性疾病的过程中也可有凋亡的改变。Liu 等^[5]研究进一步证明在大鼠的脊髓损伤模型中存在神经细胞和胶质细胞凋亡现象。

间上相重叠. 从 Caspase-3 阳性细胞先后出现的区域上看, 与脊髓损伤阳性凋亡细胞一致. 提示 Caspase-3 参与了慢性脊髓损伤细胞凋亡的调节, 进一步推测 Caspase-3 表达增加可能在脊髓继发损伤的病理生理发生发展中起重要作用. 对 Caspase-3 进行选择性抑制可能成为防治脊髓继发性损伤的有效途径之一.



A: 褪黑素治疗组; B: 对照组.

图3 损伤 11 d 大鼠凋亡细胞的表达 TUNEL $\times 400$

表3 大鼠慢性压迫脊髓损伤改良 Tarlov 评分和斜板实验

($n=5, \bar{x} \pm s$)

损伤时间 (d)	Tarlov 评分(分)		斜板实验($^{\circ}$)	
	A	B	A	B
1	4.52 \pm 0.39	4.38 \pm 0.41	67.90 \pm 2.58	66.80 \pm 2.41
4	4.36 \pm 0.23 ^a	4.06 \pm 0.17	66.70 \pm 1.10 ^a	65.10 \pm 1.08
11	4.03 \pm 0.18 ^b	3.60 \pm 0.10	64.94 \pm 1.31 ^b	61.98 \pm 1.34
21	3.56 \pm 0.19 ^b	3.10 \pm 0.22	61.00 \pm 1.46 ^b	58.10 \pm 1.19
35	3.05 \pm 0.21 ^a	2.63 \pm 0.28	57.80 \pm 1.44 ^a	55.50 \pm 1.37
60	2.59 \pm 0.14 ^a	2.36 \pm 0.17	54.30 \pm 2.02 ^a	51.40 \pm 1.85
90	2.33 \pm 0.22 ^a	2.04 \pm 0.15	50.90 \pm 1.14 ^a	49.10 \pm 1.29

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs B. A: 褪黑素治疗组; B: 对照组.

MT 具有高度亲脂性及优先在核中积聚的特性,

与其他亚细胞结构相比, 核中 MT 浓度更高^[7], 因此不仅能保护膜脂质, 而且保护蛋白质、核酸及细胞其它成分^[8]. MT 以电子供体直接清除自由基, 同时能够影响氧化和抗氧化有关酶类的活性^[9]起到间接抗氧化作用. 最近研究 MT 能够上调 Bcl-2 而抑制细胞色素 C 的释放及 Caspase-3 的活性减少培养的松果体细胞凋亡^[10]. 本研究结果显示 B 组神经细胞凋亡指数及 Caspase-3 表达均于损伤 21 d 达高峰, 35 d 开始降低, 90 d 仍可见阳性染色细胞. 而 A 组神经细胞凋亡指数及 Caspase-3 表达均较 B 组低, 11 d 达到高峰, 21 d 开始降低, 与文献报道的结果相一致. HE 染色显示 A 组早期及后期大鼠脊髓组织病理学改变明显较 B 组轻. 这提示 MT 除了能通过清除自由基和抗氧化, 上调 Bcl-2 而抑制细胞色素 C 的释放等防治继发性脊髓损伤外, 还抑制了脊髓损伤后 Caspase-3 的表达, 减少细胞凋亡和损伤, 从而对神经细胞起到保护作用.

【参考文献】

- [1] Yune TY, Kim SJ, Lee SM, et al. Systemic administration of 17-beta-estradiol reduces apoptotic cell death and improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats [J]. Neurotrauma, 2004, 21(3): 293-306.
- [2] Martin LJ, Liu Z. Injury-induced spinal motor neuron apoptosis is preceded by DNA single-strand breaks and is p53- and Bax-dependent [J]. J Neurobiol, 2002, 50(3): 181-197.
- [3] 崔利德, 王立轩, 李陈莉. 褪黑素的抗氧化作用对抗神经损伤的研究进展 [J]. 河北医科大学学报, 2006, 27(3): 218-221.
- [4] 李利军, 孙正义, 王清华, 等. 慢性压迫性脊髓损伤减压后骨骼肌的变化 [J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(4): 345-347.
- [5] Liu XZ, Xu XM, Hu R, et al. Neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury [J]. Neuroscience, 1997, 17(14): 5395-5406.
- [6] Wang X, Karlsson JO, Zhu C, et al. Caspase-3 activation after neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia [J]. Biol Neonate, 2001, 79(3-4): 172-179.
- [7] Reiter RJ, Tan DX. What constitutes a physiological concentration of melatonin [J]? Pineal Res, 2003, 34(1): 79-80.
- [8] Erkan K, Murvet T, Selcuk P, et al. Comparison of the effects melatonin and methylprednisolone in experimental spinal cord injury [J]. Neurosurgery, 2000, 93: 77-84.
- [9] Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury [J]. European J Pharmacol, 2001, 426(1-2): 1-10.
- [10] Yoo YM, Yim SV, Kim SS, et al. Melatonin suppresses NO-induced apoptosis via induction of Bcl-2 expression in PGT-beta immortalized pineal cells [J]. Pineal Res, 2002, 33(3): 146-150.

编辑 杨湘华