

甲基强的松龙对大鼠脊髓损伤后 环氧化酶-2 表达的影响

曹师锋¹, 倪灿荣², 贾连顺¹, 杨建东¹, 钱列¹, 邵将¹

(1 第二军医大学附属长征医院骨科 200003 上海市; 2 第二军医大学附属长海医院病理科 200433 上海市)

【摘要】目的:观察甲基强的松龙(MP)对正常及损伤脊髓组织中环氧化酶-2(COX-2)表达的影响。**方法:**216只 Sprague-Dawley 大鼠,随机分为正常大鼠生理盐水处理组、正常大鼠 MP 处理组、生理盐水预处理脊髓损伤组、MP 预处理脊髓损伤组、生理盐水治疗脊髓损伤组、MP 治疗脊髓损伤组 6 组,每组又分为处理后 2h、4h、8h、16h、24h、48h 6 个时间点;采用改良 Allen's 打击法制作脊髓损伤动物模型,应用免疫组织化学染色的方法观察脊髓中 COX-2 蛋白表达的变化。**结果:**正常脊髓 MP 处理组 16h 后 COX-2 免疫组化染色程度明显降低,48h 后仅灰质后角内有个别较小直径神经元显示微弱阳性染色;脊髓损伤后 MP 治疗组 4h 开始出现 COX-2 染色程度增高,并在损伤后 48h 达到最强程度的染色,但染色程度比生理盐水治疗组最强染色程度弱;MP 预处理脊髓损伤组 8h 开始出现 COX-2 免疫组化染色程度的增高,并一直持续到损伤后 48h,损伤后 48h 组染色程度比生理盐水预处理组最强染色程度弱、比脊髓损伤后 MP 治疗组染色程度弱。**结论:**MP 能显著抑制正常和损伤脊髓组织中 COX-2 蛋白的表达,延迟其在损伤脊髓中的表达高峰时间,但不影响 COX-2 表达在空间上的分布。MP 预处理比 MP 治疗能更显著地抑制损伤脊髓组织中 COX-2 蛋白的表达。

【关键词】甲基强的松龙;脊髓损伤;环氧化酶-2;免疫组织化学;大鼠

中图分类号:R683.2,R977.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2005)-07-0421-04

Effect of methylprednisolone on cyclooxygenase-2 expression in traumatic rat spinal cord/CAO Shi-feng, NI Canrong, JIA Lianshun, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15(7): 421-424

【Abstract】Objective: To characterize the effect of methylprednisolone(MP) on expression of cyclooxygenase-2(COX-2) in traumatic rat thoracic spinal cord. **Method:** Two hundreds and sixteen Sprague Dawley rats were obtained. Rats spinal cord injury were induced at T8~T9 level by dropping a 10.24g weight from a height of 50mm (Allen's model). All animals were sacrificed at 2, 4, 8, 16, 24, and 48 hours after management. The effect of 30mg/kg MP, which is administrated 30 minutes before and after spinal cord injury, on the expression of COX-2 in the injured thoracic spinal cord were evaluated by immunohistochemistry. The effect of MP on the COX-2 expression in normal spinal cord was studied too. Normal saline were administrated in control groups. **Result:** In rats which were injected with normal saline 30 minutes before or after spinal cord injury, COX-2 protein level increased at 4 hours after contusion, reached the highest level at 24 hours and remained elevated for 48 hours. MP being administrated pre- and post-injury could reduce the production of COX-2 protein in the injured spinal cord, and postponed the subsequent pinnacle level. The prohibitive effect of preliminary MP intervention was significantly stronger than administrated postinjury. MP administration could also inhibit the expression of COX-2 protein in normal rat spinal cord. There were no changes in the cellular and subcellular distribution of COX-2. **Conclusion:** MP not only reduce the production of COX-2 protein in normal or injured spinal cord, but also postpone the point of protein pinnacle level occurred subsequently in injured cord. The effect of preliminary MP intervention is stronger.

【Key words】 Methylprednisolone; Spinal cord injuries; Cyclooxygenase-2; Immunohistochemistry; Rats

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai, 200003, China

第一作者简介:男(1973-),主治医师,医学博士,研究方向:脊柱外科

电话:(021)63610109-73838 E-mail:caoshifeng@sohu.com

甲基强的松龙(methylprednisolone, MP)治疗脊髓损伤的剂量远远超出了糖皮质激素受体的激活剂量,重要的治疗机制有抑制免疫反应、减轻强

烈炎症反应、清除氧自由基、抑制脂质过氧化、减少兴奋性氨基酸的细胞毒作用等,抑制损伤脊髓组织中前列腺素合成是这些机制中的重要环节^[1]。前列腺素是环氧化酶(cyclooxygenase, COX)的合成产物,得到公认的 COX 亚型有两种:COX-1 和 COX-2。Resnick 等^[2]发现正常脊髓组织中同时存在基础性的 COX-1 和 COX-2 表达,脊髓损伤后出现明显表达变化的亚型是 COX-2,主要分布在脊髓灰质神经元。本实验应用免疫组织化学的方法,观察 MP 对损伤脊髓组织中 COX-2 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 216 只,体重 250~300g,由上海市医药工业研究所提供。随机分为 6 组,即正常大鼠生理盐水处理组(NS)、正常大鼠 MP 处理组(MP)、生理盐水预处理脊髓损伤组(NSP)、MP 预处理脊髓损伤组(MPP)、生理盐水治疗脊髓损伤组(NST)、MP 治疗脊髓损伤组(MPT);每组又分为 6 个时间点,分别为脊髓损伤后(正常组为显露硬膜囊后)2h、4h、8h、16h、24h、48h;每组每个时间点 6 只动物。

1.2 主要试剂

注射用甲泼尼龙琥珀酸钠(比利时法玛西亚-普强公司生产);兔抗鼠 COX-2 多克隆抗体 IgG(美国 Cayman 公司生产);Envision 显色剂(美国 DAKO 公司生产);0.04% 3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐(DAB,北京中山生物工程公司生产)。

1.3 动物模型建立

大鼠称重,3%戊巴比妥钠 40mg/kg 腹腔注射麻醉,俯卧位固定,术野 10%硫化钠脱毛,以 T8~T9 棘突为中心背侧正中纵行切口,手术显微镜下咬除 T8 及 T9 的棘突和双侧椎板,显露 1.5~2cm 长的硬膜囊,用直径 2.5mm、长 11.2cm、重 10.24g 的圆柱状金属棒在细玻璃管的引导下从 5cm 高处垂直落下,打击硬膜囊致脊髓损伤,致伤力为 51.2g·cm,术中均见大鼠尾巴痉挛摆动,双侧后肢及躯体回缩扑动,约 1min 后双后肢瘫痪。正常组动物同样方法显露硬膜囊,未打击脊髓。实验过程中动物无死亡。

1.4 给药方法

MP 给药剂量为 30mg/kg,生理盐水给药剂量

为 4ml/kg。预处理脊髓损伤组给药时间为 Allen's 打击脊髓损伤前 30min,脊髓损伤治疗组给药时间为 Allen's 打击脊髓损伤后 30min。麻醉后根据体重计算注射容量,75%酒精棉球反复擦拭大鼠尾部以消毒并软化角质,微量注射器针头以 30°方向进针,进入角质层后以与尾静脉平行的角度刺入左侧或右侧侧方尾静脉并推进少许,见回血后一次性推注药物,棉球压迫。

1.5 标本制备

按照实验设计时间点,深度腹腔麻醉处死实验动物,于左心室插入输液针头,经左心室灌注生理盐水约 100ml,通过右心耳放血至无明显血液流出,继续于左心室灌注 4%多聚甲醛溶液约 200ml 固定半小时。取出长度约为 1cm 的胸段脊髓组织标本(以损伤处为中心),固定于 4%多聚甲醛溶液中,24h 后更换固定液。

1.6 免疫组织化学染色

标本用 0.01M PBS 溶液冲洗,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡浸润,包埋,4μm 切片并脱蜡。3% H_2O_2 常温下孵育 30min,置于 0.01M、pH6.0 柠檬酸钠缓冲液中浸泡,98℃微波炉内 15min 修复,室温冷却 20min,3%正常血清(1:20 稀释)封片后 37℃湿盒中孵育 20min,加入 COX-2 兔抗鼠多克隆抗体(1:100)50μl,4℃湿盒中冰箱内过夜,加入 Envision 显色剂,37℃湿盒中孵育 30min, DAB 显色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片。阴性对照用 PBS 代替一抗或二抗。

1.7 统计分析

每只动物切取 10 张脊髓切片,于 Olympus 光学显微镜下进行定性观察,HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统进行染色灰度测量,数值越低,染色越深。各标本的免疫组织化学染色灰度值为前角、后角、中间带三个区域内各 3 个随机视野测值的平均值。应用 SPSS 统计软件包进行单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

各组 COX-2 免疫组织化学染色灰度测值见表 1。正常脊髓生理盐水处理后各时间点脊髓组织 COX-2 免疫组织化学染色结果相似($P>0.05$),主要分布于脊髓灰质神经细胞。脊髓灰质前角大部分运动神经元和中等直径神经细胞、脊髓灰质中间带(相当于灰质 VII 层)的中等直径神经细胞、

灰质后角较小直径神经细胞都可以观察到阳性染色,灰质和白质内的神经纤维网以及胶质细胞中都没有观察到阳性染色(图 1,后插页 II)。与 NS 组对应时间点相比,正常脊髓 MP 处理后 2h、4h、8h 组染色程度及细胞学分布无明显差异 ($P>0.05$),16h、24h 组免疫染色程度明显降低 ($P<0.01$),48h 组仅灰质后角内有个别较小直径的神经细胞显示微弱阳性染色(图 2,后插页 II),所有时间点免疫染色都仅出现在灰质神经细胞中。

生理盐水预处理组脊髓损伤后 4h,脊髓组织 COX-2 免疫组织化学染色程度开始增高,损伤后 24h 染色程度达到高峰,损伤后 48h 染色程度和损伤后 24h 相似(图 3,后插页 II)。同时出现在脊髓前角、中间带、后角内的神经元中,神经纤维网、

胶质细胞中的染色程度和 NS 组相似,没有观察到任何程度的白质胶质细胞阳性染色。MP 预处理脊髓损伤组织标本中,损伤后 8h 组开始出现 COX-2 免疫组织化学染色程度的增高,于损伤后 48h 达到最强染色,但染色程度比 NSP 组最强染色程度弱($P<0.01$,图 4,后插页 II)。

脊髓损伤后生理盐水治疗组各时间点脊髓组织 COX-2 免疫组织化学染色结果与 NSP 组相似($P>0.05$,图 5,后插页 II)。脊髓损伤后 MP 治疗组损伤脊髓组织标本中,损伤后 4h 组出现 COX-2 染色程度增高,并在损伤后 48h 达到最强程度的染色,但染色程度比 NST 组最强染色程度弱($P<0.05$)、比 MPP 组染色程度强($P<0.01$,图 6,后插页 II)。

表 1 不同组大鼠各时间点脊髓组织中 COX-2 免疫组化染色灰度值

($\bar{x}\pm s, n=6$)

伤后时间	NS组	MP组	NSP组	MPP组	NST组	MPT组
2h	205.2±19.4	209.9±21.6	205.3±22.2	203.4±19.4	207.6±20.4	206.4±20.7
4h	204.7±21.2	204.3±20.4	193.7±20.7	198.6±21.0	194.4±21.3	195.2±21.5
8h	209.1±20.4	211.4±22.3	189.6±20.5	192.3±20.7	190.5±21.8	191.4±19.8
16h	205.8±20.7	221.5±21.7 ^①	186.1±21.9	189.2±19.8	185.1±20.6	186.0±20.5
24h	210.0±22.0	245.3±21.0 ^①	165.2±21.4	181.5±20.7 ^②	163.3±22.1	172.3±21.4 ^{③④}
48h	202.6±21.5	268.4±22.8 ^①	163.4±20.8	175.3±21.3 ^②	162.7±21.4	168.6±22.0 ^{③④}

注:①与 NS 组同时时间点比较 $P<0.01$;②与 NSP 组同时时间点比较 $P<0.01$;③与 NST 组同时时间点比较 $P<0.05$;④与 MPP 组同时时间点比较 $P<0.01$

4 讨论

4.1 MP 抑制脊髓损伤后 COX-2 表达的机制

糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 的表达在脊髓损伤后 15min 开始增高,8h 达到高峰,损伤后 3d 恢复到基础水平^[3]。GR 介导的抗炎作用主要是通过两种转录因子途径:核因子- κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 途径和激活蛋白-1 (activator protein-1, AP-1) 途径,急性脊髓损伤能激活这两种转录因子的表达^[4,5]。NF- κ B 激活后能上调一些炎症基因的表达,包括细胞因子、细胞粘附分子、诱导型一氧化氮合酶、白介素、蛋白激酶等。脊髓损伤后 NF- κ B 的活性增高,损伤后 1~3d 为活性高峰期,MP (30mg/kg) 能抑制脊髓损伤后的 NF- κ B 活性增高^[5]。AP-1 的激活诱导参与炎症反应的一些基因表达;脊髓损伤后 1h 就出现 AP-1 表达上调,损伤后 8h 达到表达高峰并持续 3d 左右,损伤后 7d 表达降低至基础水平。MP (30mg/kg) 能抑制脊髓损伤后的 AP-1 激活^[6]。这两种转录因子的激活都能诱导 COX-2 基因的表

达,并且这两种转录因子可能是 COX-2 表达的主要诱导因素^[6,7]。MP 和 GR 结合形成的活化糖皮质激素受体能抑制 NF- κ B 和 AP-1 两种转录因子的激活,同时也抑制了 COX-2 基因的表达。

脊髓损伤早期表达增高的各种炎症因子(IL-1、IL-6、TNF 等)能诱导 COX-2 表达,这些炎症因子在体内直接应用也能诱导脊髓组织细胞显著表达 COX-2^[8]。通过激活糖皮质激素受体以及直接的抗氧化自由基作用,MP 能显著降低脊髓损伤后多种参与免疫反应和炎症反应的物质局部释放,同时也能降低血清中细胞因子的水平,减少了这些物质对 COX-2 的表达诱导作用^[4,5]。糖皮质激素还能降低 COX-2 的 mRNA 稳定性,从而抑制 COX-2 蛋白的表达。大剂量 MP 是否还抑制 COX-2 酶的活性还需要进步观察。

4.2 MP 抑制脊髓损伤后 COX-2 表达的意义

MP 的重要抗炎机制主要有两个,分别是激活糖皮质激素受体和抑制脂质过氧化。MP 抑制 COX-2 的表达能直接减少损伤脊髓组织中前列

腺素的合成。有研究证实,MP 治疗后,损伤脊髓组织中的前列腺素合成被显著抑制,合成的高峰时间也相应延迟^[1]。环氧化酶合成前列腺素的过程也是一个氧自由基的形成过程,每个花生四烯酸分子被环氧化酶代谢后产生一个羟基自由基,这也是脂质过氧化的一个自由基来源。抑制 COX-2 表达的同时抑制了氧自由基的形成,从而间接抑制了脂质过氧化程度,这是 MP 治疗脊髓损伤的一个重要机制^[1]。抑制 COX-2 活性并不直接影响神经活性物质的基础释放,但 MP 抑制 COX-2 活性后能抑制这些神经活性物质的诱导表达。脊髓损伤后组织中增高的兴奋性氨基酸能诱导 COX-2 的表达^[9];与此同时,COX-2 的表达也参与了兴奋性氨基酸受体的兴奋。1mg/ml 消炎痛、0.1mM 乙酰水杨酸、1mM COX-2 抑制剂 NS398 阻断 IL-1 β 诱导背根节细胞释放 P 物质的作用相似,说明 IL-1 β 诱导 P 物质释放的作用是通过诱导 COX-2 的合成以及 COX-2 合成的前列腺素而发挥作用的^[8]。Resnick 等^[10]发现应用 COX-2 抑制剂能显著降低损伤脊髓组织中 PGE2 和 TXB2 的含量,并且表达高峰也延迟;选择性 COX-2 抑制剂对脊髓损伤具有神经保护功能^[2,11]。还有研究证实应用选择性 COX-2 抑制剂 NS398 能降低脊髓损伤后的病灶范围、提高神经功能恢复程度^[12]。说明 COX-2 是 MP 治疗脊髓损伤的一个重要作用位点,MP 抑制脊髓损伤后 COX-2 的表达延迟了脊髓继发损伤的启动过程,延长了脊髓损伤治疗的窗口时间。

炎症反应是脊髓继发损伤过程中的一个重要方面,抑制炎症反应能降低脊髓损伤程度和范围,并且能提高神经功能的恢复。对炎性细胞因子的研究发现,脊髓损伤后的内部反应机制在脊髓继发损伤过程中起更重要的作用,最显而易见的选择性抑制炎症反应的目标是 COX 家族^[12]。选择性 COX-2 抑制剂可能是 MP 治疗脊髓损伤的有益补充。

4.3 MP 预处理对脊髓损伤后 COX-2 表达的抑制作用

本研究结果提示,MP 预处理比脊髓损伤后应用 MP 治疗更显著地降低了损伤脊髓组织中的 COX-2 表达。MP 预处理能提高脊髓对打击损伤的耐受性,虽然不能保护原发损害造成的脊髓神经结构的损伤,但抑制了脊髓损伤后 COX-2 表达

的程度及高峰时间,从而抑制了脊髓继发损伤的启动和发展。高风险脊柱手术前应用 MP 的临床结果也肯定了 MP 预处理对可能出现的医源性脊髓损伤有一定预防作用^[13]。但其给药方案有待进一步的实验和临床研究。

5 参考文献

1. Liu D, Li L, Augustus L. Prostaglandin release by spinal cord injury mediates production of hydroxyl radical, malondialdehyde and cell death: a site of the neuroprotective action of methylprednisolone [J]. *J Neurochem*, 2001, 77(4): 1036-1047.
2. Resnick DK, Graham SH, Dixon CE, et al. Role of cyclooxygenase 2 in acute spinal cord injury [J]. *J Neurotrauma*, 1998, 15(12): 1005-1013.
3. Yan P, Xu J, Li Q, et al. Glucocorticoid receptor expression in the spinal cord after traumatic injury in adult rats [J]. *J Neurosci*, 1999, 19(21): 9355-9363.
4. Xu J, Fan G, Chen S, et al. Methylprednisolone inhibition of TNF- α expression and NF- κ B activation after spinal cord injury in rats [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998, 59(2): 135-142.
5. Xu J, Kim GM, Ahmed SH, et al. Glucocorticoid receptor-mediated suppression of activator protein-1 activation and matrix metalloproteinase expression after spinal cord injury [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(1): 92-97.
6. Lee KM, Kang BS, Lee HL, et al. Spinal NF- κ B activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity [J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 19(12): 3375-3381.
7. Kalgutkar AS, Crews BC, Rowlinson SW, et al. Aspirin-like molecules that covalently inactivate cyclooxygenase-2 [J]. *Science*, 1998, 280(5367): 1268-1270.
8. Inoue A, Ikoma K, Morioka N, et al. Interleukin-1 β induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system [J]. *J Neurochem*, 1999, 73(5): 2206-2213.
9. 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 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(6): 2317-2321.
10. Resnick DK, Nguyen P, Cechvala CF. Selective cyclooxygenase 2 inhibition lowers spinal cord prostaglandin concentrations after injury [J]. *Spine J*, 2001, 1(6): 437-441.
11. Hains BC, Yucra JA, Hulsebosch CE. Reduction of pathological and behavioral deficits following spinal cord contusion injury with the selective cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 [J]. *J Neurotrauma*, 2001, 18(4): 409-423.
12. Pan JZ, Jornsten R, Hart RP. Screening anti-inflammatory compounds in injured spinal cord with microarrays: a comparison of bioinformatics analysis approaches [J]. *Physiol Genomics*, 2004, 17(2): 201-214.
13. Molano MR, Broton JG, Bean JA, et al. Complications associated with the prophylactic use of methylprednisolone during surgical stabilization after spinal cord injury [J]. *J Neurosurg*, 2002, 96(Suppl 3): 267-272.

(收稿日期: 2005-01-31 修回日期: 2005-03-21)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 卢庆霞)