

基础研究

基质金属蛋白酶-9 与脊髓损伤后脊髓水肿的关系

周 华¹, 刘 华², 黄 坚¹

(1 苏州大学附属第一医院创伤外科 215006 江苏省苏州市; 2 苏州卫生职业技术学院康复科 215009)

【摘要】目的:探讨基质金属蛋白酶-9 与急性脊髓损伤后脊髓水肿的关系。**方法:**健康雄性 SD 大鼠 70 只, 随机分为对照组和损伤组。对照组大鼠 10 只, 仅做椎板切除术, 术后 6h 取材; 损伤组采用改良 Allen 法制作 T8~T9 节段脊髓损伤模型, 分别于伤后 6h、12h、1d、3d、5d、7d (每时间点 10 只) 处死取材。采用干湿重法测定脊髓含水量, 免疫组化检测基质金属蛋白酶-9 的表达。**结果:**急性脊髓损伤后 6h, 损伤组脊髓含水量较对照组增多, 3~5d 时达到高峰。基质金属蛋白酶-9 在对照组未见表达, 而损伤组在损伤后 6h 表达增加, 并在 1~3d 达到高峰, 损伤后 7d 仍有表达。相关性分析显示基质金属蛋白酶-9 的表达与脊髓含水量呈正相关。**结论:**急性脊髓损伤后, 基质金属蛋白酶-9 的表达与脊髓水肿的形成有关, 但两者达到高峰的时间不完全一致。

【关键词】 基质金属蛋白酶-9; 脊髓损伤; 水肿

中图分类号: R683.2, Q599 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2007)-01-0059-03

The relationship between matrix metalloproteinase-9 and edema after spinal cord injury/ZHOU Hua, LIU Hua, HUANG Jian//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2007, 17(1): 59-61

【Abstract】 Objective: To investigate the relationship between the early expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and spinal edema after acute spinal cord injury. **Method:** 70 rats were randomized into two groups, the sham-operated group and the injured group. The 10 rats of sham-operated group were performed laminectomy alone. The models of spinal cord injury were introduced with Allen's way by a 10g×2.5cm impact on the posterior T8-T9 spinal cord. Rats were sacrificed at 6h, 12h, 1d, 3d, 5d, 7d after injury. The water content of injured spinal cord was measured by dry-wet weight method and the expression of MMP-9 was performed by immunohistochemical staining. **Result:** The water content of injured spinal cord increased and reached the maximum at 3-5d. The expression of MMP-9 increased at 6h after spinal cord injury and reached peak in 1-3d. The expression of matrix metalloproteinase-9 wasn't found in the sham-operated group. The data showed that the water content of spinal cord was positively correlated with the level of MMP-9. **Conclusion:** After acute spinal cord injury, the early spinal edema is related to the level of MMP-9, but the time of their reaching peak isn't absolutely consistent.

【Key words】 Matrix metalloproteinase-9; Spinal cord injury; Edema

【Author's address】 Department of Traumatology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu, 215006, China

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是一类能降解细胞外基质成分的蛋白水解酶, 基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 是其中最重要的一种, 能降解内皮细胞基底膜, 开放血脑屏障^[1,2]。它的作用在颅脑损伤中研究较多, 而在急性脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 中的作用国内外的研究报道尚少。本实验通过检测大鼠急性 SCI 后损伤脊髓含水量变化和 MMP-9 的表达, 探讨

MMP-9 的表达与脊髓水肿的关系。

1 材料与方法

1.1 动物分组和模型制作

健康雄性 SD 大鼠 70 只, 体重 200~250g, 购自武汉同济医学院实验动物中心。根据随机数字表编号, 随机分为两组: 对照组和损伤组。对照组大鼠 10 只, 10% 水合氯醛 (35mg/100g 体重) 腹腔注射麻醉成功后, 仅做椎板切除术, 术后 6h 处死取材; 损伤组 60 只大鼠, 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 按改良 Allen 氏法, 暴露 T8~T9 节段脊髓背

第一作者简介: 男 (1977-), 医学硕士, 助教、住院医师, 研究方向: 脊髓损伤

电话: (0512) 62195208 E-mail: zhouhua77@163.com

侧,将 10g 条形重物通过立体固定仪于 2.5cm 高度垂直落下打击该段脊髓后正中制作急性 SCI 模型。于 SCI 后 6h、12h、1d、3d、5d、7d(每时间点 10 只)处死取材。每只大鼠术毕立即肌注青霉素钠 8 万单位/只/次,待麻醉苏醒后进行下肢运动功能评定(约在术后 1h),采用美国 SCI 学会提出的运动评分法(America spinal injury association motor score, ASIA-MS),选取评级为 A、B 级的大鼠。术后每天 8:00、17:00 两次人工膀胱排尿,直至建立反射性膀胱排空。室温保持在 20~25℃。

1.2 损伤区脊髓含水量的测定

取损伤组每个时间点各 5 只大鼠,对照组大鼠 5 只,所有动物称重后低温断头处死。切取 T8~T9 脊髓节段,在高灵敏度分析天平(Mettler AE260)上称重,然后置于 85℃烤箱中连续烘烤 5d,连称 3 次,烤至恒重后称取干重,根据下式计算损伤脊髓组织含水量:(湿重-干重)/湿重×100%。

1.3 MMP-9 的免疫组化检测

取损伤组每个时间点各 5 只大鼠,对照组大鼠 5 只,大鼠麻醉成功后,经左心室-主动脉插管,含 4%多聚甲醛的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液灌注,完整取出损伤段脊髓组织。切取 T8~T9 脊髓组织,石蜡包埋,连续切片,片厚 5μm。每个组织块取连续的 3 张切片。采用 S-P 法。MMP-9 兔多抗购自武汉博士德生物工程公司,S-P 试剂盒购于北京中山生物技术有限公司。具体步骤如下:(1)常规石蜡包埋切片;(2)石蜡切片常规脱蜡;(3)3%过氧化氢,室温反应 10min,蒸馏水漂洗 2min×3 次;(4)将切片浸入 0.01mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),微波炉加热至沸腾后断电冷却,反复 1~2 次,0.01mol/L PBS 洗涤 2min×3 次;(5)加正常山羊血清封闭液,室温下孵育 2h;(6)滴加一抗 MMP-9 兔多抗(浓度 1:100),37℃孵育过夜;(7)滴加生物素化羊抗兔 IgG,室温下反应 20min;(8)滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素(HRP)工作液,室温下反应 20min,0.01mol/L PBS 洗涤 5min×3 次;(9)DAB 显色,苏木素复染,中性树脂封片。阴性对照实验采用替代法,用 PBS 代替一抗,二抗及 HRP 工作液做上述操作。

1.4 图像分析

采用 HPIAS-1000 高分辨彩色病理图像报告分析系统-XZS 进行图像分析处理。取各大鼠损

伤断面水平的连续组织切片,各组每个时间点每只大鼠选取一张切片。每张切片在损伤区(对照组在假手术区)随机采集 5 个高倍镜(400 倍)视野,测定切片的平均光密度值(A 值)。阳性细胞数越多,A 值越大,提示免疫反应越强。

1.5 统计学处理

所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,含水量以组间进行 *t* 检验,A 值以组内进行统计学处理。相关分析采用 Pearson 相关检验。*P*<0.05 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 急性损伤脊髓组织含水量

见表 1。损伤组 SCI 后 6h 含水量较对照组增多,在 3~5d 时含水量达到高峰,以后逐渐减少。

2.2 MMP-9 的表达

损伤组中免疫阳性细胞胞浆呈现棕黄色淡染,细胞核蓝染。对照组脊髓组织未见 MMP-9 的表达(图 1,后插页 III)。损伤后 6h 后,MMP-9 表达增加,SCI 区可见 MMP-9 免疫阳性细胞,主要表达在缺血神经元、血管内皮细胞、中性粒细胞等细胞的胞浆。其中 1~3d 达高峰(图 2、3,后插页 III),之后开始下降,7d 仍有表达(表 1)。Pearson 相关检验显示损伤组各时间点脊髓含水量和 A 值呈正相关(表 1)。

表 1 急性 SCI 后不同时间点含水量和 A 值($\bar{x} \pm s$, *n*=5)

组别	含水量(%)	A 值	相关系数(<i>r</i> 值)
对照组	61.69±0.55	—	—
损伤组			
SCI 后 6h	62.34±0.54 ^①	0.139±0.011	0.84
SCI 后 12h	62.52±0.37 ^①	0.177±0.017 ^③	0.90
SCI 后 1d	65.0±0.64 ^②	0.287±0.029 ^③	0.95
SCI 后 3d	67.86±0.39 ^②	0.245±0.026 ^③	0.75
SCI 后 5d	67.02±0.36 ^②	0.214±0.015 ^③	0.69
SCI 后 7d	65.60±0.58 ^②	0.183±0.014 ^④	0.85

注:与对照组相比^①*P*<0.05,^②*P*<0.01;与上一时间点比较^③*P*<0.01,^④*P*<0.05

3 讨论

急性 SCI 后脊髓水肿的发生、发展会加重神经元的缺血、缺氧,甚至引起神经元凋亡和坏死^[2]。因此,脊髓水肿的发生机制值得深入研究。SCI 后血-脑脊髓屏障遭到破坏,使中枢神经系统正常

内皮的选择性渗透性受到影响。内皮细胞的损害可导致血管源性水肿的形成,表现为在血管外间隙内聚集富含蛋白的血浆样液体。伤后脊髓肿胀、出血,增加了脊髓体积,由于受到软脊膜及硬膜约束,不能向外肿大扩张,而使脊髓内压增高,加重了脊髓内微循环的障碍,使组织缺氧,加重 SCI,加以代谢产物、神经介质等聚集,引起更加严重的细胞毒性水肿。脊髓组织水肿首先由中心部位开始并逐渐向周边扩散而影响白质,其在 SCI 后 72h 最严重,并可能会因为组织压迫加重及微环境异常而进一步恶化^[3]。MMP-9 能破坏血管内皮细胞间的紧密连接和基底膜,导致微血管通透性增加,水肿形成^[4]。

Austin(1983)指出,脊髓原发水肿主要由脊髓缺氧和化学物质的释放引起。水肿早期,水量增加只占据细胞外间隙,大约 2~3d 后,水分由细胞外向细胞内转移,引起细胞内肿胀,而细胞外间隙小于正常,压迫毛细血管小动脉和静脉,使神经组织更为缺氧。此时水肿原因可能涉及 MMP-9 以外的因素,如自由基、兴奋性氨基酸、蛋白酶等^[5]。这种变化可能与急性 SCI 后 MMP-9 介导产生的系列反应和其他多因素共同作用有关^[6]。本实验结果显示,急性 SCI 后,在 MMP-9 含量明显增加的同时,脊髓含水量也增加,并且两者在同一时段内呈正相关,表明 MMP-9 可能参与了急性 SCI 后水肿的发生,但 MMP-9 的表达高峰与脊髓含水量的高峰时间并非完全吻合。

脊髓微血管的内皮细胞间的连接是紧密的,有闭锁带直达基底膜,故在血脊髓屏障中起着重要作用。研究^[3]表明,损伤犬脊髓 2min 后,内皮细胞核轻度浓缩,核染色质呈块状;胞膜变薄,胞质突起减少,3h 后有细胞脱落,使其连续性破坏而暴露更多的基底膜。本研究发现,对照组无 MMP-9 表达,损伤组 MMP-9 较早表达,表达高峰(2~3d)略早于脊髓水肿(3~5d)高峰期;提示急性 SCI

后早期病理改变,如组织缺血、缺氧诱发 MMP-9 表达;MMP-9 能够破坏血管内皮细胞基底膜及其紧密连接,导致血脑脊髓屏障的破坏,造成局部组织进一步缺血、缺氧,形成恶性循环^[7,8]。在我们的实验中,SCI 区有较多神经元表达 MMP-9,与细胞毒性水肿期,神经元肿胀,通透性增加有关。但 MMP-9 参与 SCI 后水肿的具体机制及作用强度,有待于进一步研究。

4 参考文献

1. Ferguson TA, Muir D. MMP-2 and MMP-9 increase the neurite-promoting potential of schwann cell basal laminae and are upregulated in degenerated nerve [J]. Mol Cell Neurosci, 2000, 16(2):157-167.
2. 周华, 刘华, 黄坚, 等. IL-10 对脊髓损伤后细胞凋亡和 CD95 作用的初步研究[J]. 苏州大学学报(医学版), 2005, 25(3):395-401.
3. 胥少汀, 郭世绂. 脊髓损伤的基础与临床[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 220-222.
4. 刘华, 廖维靖, 杨万同, 等. 脑缺血再灌后 MMP-9 的表达与血脑屏障的破坏[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26(4):203-205.
5. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE, et al. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain [J]. Stroke, 1998, 29(10):2189-2195.
6. Duchossoy Y, Horvat JC, Stettler O. MMP-related gelatinase activity is strongly induced in scar tissue of injured adult spinal cord and forms pathways for ingrowing neurites[J]. Mol Cell Neurosci, 2001, 21():945-956.
7. Romanic AM, White RF, Arleth AJ, et al. Matrix metalloproteinase express increase after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size[J]. Stroke, 1998, 29(8):1020-1030.
8. Omura K, Ohbayashi M, Sano M, et al. The recovery of blood-nerve barrier in crush nerve injury: a quantitative analysis utilizing immunohistochemistry[J]. Brain Res, 2004, 1001(1):13-21.

(收到日期:2006-09-01 修回日期:2006-11-02)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)