

基础研究

神经营养素-3 对大鼠急性脊髓损伤后
Bcl-2 和 Bax 表达的影响

郭树章, 蒋 涛, 任先军

(第三军医大学新桥医院骨科 400037 重庆市)

【摘要】目的:观察神经营养素-3(NT-3)对大鼠急性脊髓损伤后 B 细胞淋巴瘤/白血病基因-2(Bcl-2)和 B 细胞淋巴瘤/白血病基因伴随蛋白 x(Bax)表达的影响,探讨 NT-3 对脊髓损伤的作用及其可能的分子机制。**方法:**105 只 SD 大鼠随机分为假手术组(A 组)、损伤对照组(B 组)和 NT-3 治疗组(C 组),每组 35 只。B、C 组用改良 Allen's 法以 30g·cm 致伤大鼠 T8 脊髓制作损伤模型,C 组经蛛网膜下腔导管于术后即刻、4h、8h、12h、24h、3d、7d 注入 NT-3 20 μ l(含 NT-3 200ng),B 组在相同时间点给予等量生理盐水;A 组打开椎板后蛛网膜下腔置管,不损伤脊髓,不给药。术后 24h、3d、7d、14d 对大鼠进行脊髓运动功能(BBB)评分。于术后 4h、8h、12h、24h、3d、7d、14d 处死动物($n=5$),取 T8 节段脊髓,甲苯胺蓝(Nissl)染色观察脊髓前角运动神经元变化情况,用免疫组织化学方法检测 Bcl-2 和 Bax 在脊髓前角运动神经元中的表达变化情况。**结果:**各时间点 C 组和 B 组大鼠 BBB 评分均显著低于 A 组($P<0.01$),但 C 组显著高于 B 组($P<0.05$ 或 0.01)。Nissl 染色 C 组大鼠脊髓损伤区较 B 组出血少、残存神经元多,A 组正常。各时间点 C 组和 B 组大鼠损伤脊髓前角运动神经元中 Bax 阳性细胞平均光密度(AOD)值均显著高于 A 组($P<0.01$),但 C 组显著低于 B 组($P<0.05$ 或 0.01);各时间点 C 组和 B 组大鼠损伤脊髓前角运动神经元中 Bcl-2 阳性细胞 AOD 值均显著低于 A 组($P<0.01$),但 C 组显著高于 B 组($P<0.05$ 或 0.01)。**结论:**NT-3 可能通过抑制 Bax 表达,提高 Bcl-2 表达,抑制脊髓损伤后神经元凋亡,从而保护损伤的脊髓组织,这可能是 NT-3 对脊髓损伤具有保护作用的机制之一。

【关键词】脊髓损伤;神经营养素-3;B 细胞淋巴瘤/白血病基因-2;B 细胞淋巴瘤/白血病基因伴随蛋白 x;大鼠
中图分类号:Q786,R683.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2007)-06-0454-04

Influence of neurotrophin-3 on the expression of Bcl-2 and Bax in rats with spinal cord injury/GUO Shuzhang,JIANG Tao,REN Xianjun/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord,2007,17(6):454~457

【Abstract】 Objective:To observe the influence of neurotrophin-3 (NT-3) on the expression of B-cell lymphoma/leukemia gene-2(Bcl-2) and Bcl-associated x protein(Bax) in rats with spinal cord injury and to study the mechanism of NT-3 on spinal cord injury.**Method:**The animal model of acute spinal cord injured was established according to Allen's method,105 SD rats were randomly divided into three groups,sham group (group A),control group(group B) and experimental group(group C).A thin plastic tube was placed in subarachnoid space below the injury level for perfusion.Rats in group C received NT-3 20 μ l (including NT-3 200ng) from the tube at 0h,4h,8h,12h,24h and 3d,7d respectively after injury;animals in group B received the equal volume of normal saline at the same time as control;animals in group A only received vertebral laminectomy and tube placement in subarachnoid space.The BBB score was recorded at 24h,3d,7d and 14d postinjury ($n=5$).The rats were sacrificed at 4h,8h,12h,24h and 3d,7d,14d postinjury ($n=5$) and T8 spinal cord specimen was obtained,then the change of cornu anterius medullae spinalis motor neuron was observed by Nissl stain and the expression levels of Bcl-2 and Bax protein in spinal cord were detected by immunohistochemistry assay.**Result:**The BBB score in both group B and C were significantly lower than that in group A at each time point ($P<0.01$),but the score of group C was significantly higher than that of group B ($P<0.05$ or 0.01).Nissl stain showed the spinal cord of group C has fewer bleeding and more survival neuron than that of group B,while the spinal cord was normal in group A.The average optical density(AOD) of Bax positive of motor neuron in group C and B were significantly higher compared with those in group A ($P<$

第一作者简介:男(1975-),医学博士,主治医师,研究方向:脊柱外科

电话:(023)67292759 E-mail:gszlch@yahoo.com.cn

通讯作者:任先军

0.01), however, the AOD of group C was significantly lower than that of group B ($P < 0.05$ or 0.01) at each time point. The average optical density (AOD) of Bcl-2 positive of motor neuron in group C and B were significantly lower compared with those in group A ($P < 0.01$), the AOD of group C was significantly higher than that of group B at each time point ($P < 0.05$ or 0.01). **Conclusion:** NT-3 can protect spinal cord from injury in vivo. One of the possible mechanisms is that it inhibits abnormal expression of Bax protein, and increase the expression of Bcl-2 protein as to inhibit apoptosis of neuron after spinal cord injury.

[Key words] Spinal cord injury; Neurotrophin-3; B-cell lymphoma/leukemia gene-2; Bcl-associated x protein; Rat

[Author's address] Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China

神经营养素-3 (neurotrophin-3, NT-3) 是神经营养素家族的重要成员。外源性 NT-3 可阻止皮层运动神经元、红核、背核及脊髓感觉投射神经元轴突离断后的凋亡, 促进其存活^[1], 但其作用机制不清。本实验旨在通过观察 NT-3 对大鼠 B 细胞淋巴瘤/白血病基因-2 (B-cell lymphoma/leukemia gene-2, Bcl-2) 和 Bcl 伴随蛋白 x (Bcl-associated x protein, Bax) 表达的影响, 进一步探讨 NT-3 对脊髓损伤后神经细胞的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

兔抗鼠 Bcl-2 多克隆抗体 (一抗)、兔抗鼠 Bax 多克隆抗体 (一抗)、卵白素-生物素-过氧化物酶 (SABC) 试剂盒及二氨基联苯胺 (DAB) 显色试剂盒均购自武汉博士德公司, NT-3 购自 CYTOLAB 公司, SD 大鼠由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。

1.2 动物与分组

健康成年 SD 大鼠 105 只, 体重 220~270g, 雌雄不拘, 随机分为假手术组 (A 组)、损伤对照组 (B 组) 和 NT-3 治疗组 (C 组), 每组 35 只。

1.3 动物模型制作

20% 乌拉坦 (1000mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 以 T8 为中心, 取背部正中切口, 显露 T7~T12 棘突及椎板, 用蚊式钳咬除 T7~T10 棘突, 咬除 T8 全椎板, 以脊髓为中心显露直径 3mm 圆形区。再咬除 T10 右侧半椎板, 暴露硬脊膜, 作为蛛网膜下腔置管区。将薄铜片 (2×3mm) 弯成弧形与脊髓表面形状一致, 以 6g×5cm 致伤力造成大鼠 T8 脊髓损伤模型。以鼠尾痉挛性摆动、后肢及躯体回缩扑动后后肢瘫痪为造模成功标志。造模成功后, 用眼科镊轻提 T10 处硬膜, 偏离后正中血管在硬脊膜上用 1ml 注射器针头制孔, 缓慢向脊髓损伤方

向于蛛网膜下腔插入细导管 (内径 0.1mm) 3mm, 并固定于椎旁软组织及皮肤上。C 组和 B 组在术后即刻、4h、8h、12h、24h、3d、7d 分别经蛛网膜下腔导管给予 NT-3 溶液 20μl (含 NT-3 200ng) 和等量生理盐水; A 组只打开椎板, 不损伤脊髓, 插入导管后固定缝合, 不给予任何处理。

1.4 脊髓神经功能评价

手术后 24h、3d、7d、14d ($n=5$) 对大鼠进行脊髓运动功能 (BBB) 评分^[2], 观察脊髓神经功能恢复情况。根据大鼠昼夜活动习性, 评分均在晚上 8:00 进行。

1.5 标本取材与切片

3 组大鼠分别于术后 4h、8h、12h、24h、3d、7d、14d 时 ($n=5$) 以 20% 乌拉坦 (1000mg/kg) 腹腔麻醉, 剖胸, 经左心室-主动脉插管, 先灌注生理盐水至流出液清亮为止, 再用 4% 多聚甲醛灌注固定, 完整取出 T8 段脊髓组织, 长约 5mm, 置于 4% 多聚甲醛中固定。石蜡包埋后, 连续切片 30 张, 片厚 6μm。

1.6 甲苯胺蓝染色 (Nissl 染色)

每个时间点每只大鼠随机选取 6 张切片进行 Nissl 染色。石蜡切片脱蜡至水, 蒸馏水冲洗 3min; 滴加 50℃ 的 1% 甲苯胺蓝水溶液, 并在 56℃ 温箱中孵育 20min; 蒸馏水充分冲洗, 停止显色; 70% 酒精冲洗约 1min; 95% 酒精迅速分化, 光学显微镜下控制, 以尼氏小体显示清晰为度; 无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。每张切片 400 倍光镜下随机取 6 个视野观察脊髓前角运动神经元和尼氏体改变情况。

1.7 Bcl-2 和 Bax 检测

每个时间点每只大鼠随机选取切片 6 张进行 Bcl-2 和 Bax 免疫组化染色 (SABC 法)。免疫组化染色按 SABC 试剂盒说明书操作, 一抗工作浓度为 1:100, 最后用 DAB 显色, 镜下控制, 蒸馏水清

洗终止显色,苏木素轻度复染,梯度脱水,透明,中性树胶封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。阳性细胞胞浆呈棕黄色。每张切片随机选取 6 个不重叠 400 倍视野,观察脊髓前角运动神经元胞浆中 Bcl-2 和 Bax 表达情况,采用 Leica 图像分析软件分析阳性细胞平均光密度(AOD),AOD 值高代表阳性表达强。

1.8 统计学处理

所有数据采用 SPSS 10.0 软件包处理,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间差异采用独立样本 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有显著性,*P*<0.01 为差异非常显著。

2 结果

2.1 脊髓运动功能 BBB 评分

见表 1。各时间点 C 组和 B 组大鼠 BBB 评分均显著低于 A 组(*P*<0.01),但 C 组显著高于 B 组(*P*<0.05 或 0.01)。

2.2 Nissl 染色结果

表 1 不同时间点 3 组大鼠 BBB 评分变化($\bar{x}\pm s$, *n*=5,分)

组别	术后 24h	术后 3d	术后 7d	术后 14d
A组	19.70±0.95	20.60±0.52	20.90±0.32	21.00±0.00
B组	0.22±0.43 ^①	3.2±2.39 ^①	9.30±1.49 ^①	12.80±0.92 ^①
C组	0.70±0.48 ^{①②}	8.01±2.05 ^{①③}	14.32±2.11 ^{①③}	18.40±1.08 ^{①③}

注:①与 A 组比较 *P*<0.01;与 B 组比较②*P*<0.05,③*P*<0.01

A 组各时间点大鼠脊髓前角运动神经元基本保持多角形态,未见明显细胞肿胀及坏死,Nissl 体染色基本正常(图 1,后插页Ⅲ)。B 组大鼠伤后 4h 损伤脊髓灰质内出现明显出血灶;伤后 8h 脊髓灰质结构破坏,少量前角运动神经元固缩(图 2,后插页Ⅲ),尼氏体呈细砂粒状;伤后 12h 损伤脊髓前角运动神经元数量减少;伤后 24h 神经元数量明显减少,细胞呈现空泡状核,核仁着色明显,核质不着色,核周围尼氏体崩解消失,胞浆内有少量深紫色的呈块状或点状的 Nissl 体;伤后 3d、7d、14d 残存神经元极少。C 组伤后 4h 损伤脊髓灰质内出血量明显少于 B 组,前角运动神经元残存数量较多,Nissl 体染色深;伤后 8h 损伤脊髓前角运动神经元无明显减少,Nissl 体染色呈细砂粒状(图 3,后插页Ⅲ);伤后 12h 损伤脊髓前角运动神经元减少不明显,但可见细胞肿胀;伤后 24h 损伤脊髓前角运动神经元数量减少,部分核周尼氏体崩解;伤后 3d、7d、14d 仍可见较多残存神经元。

2.3 Bcl-2 和 Bax 检测结果

见表 2 和图 4~9(后插页Ⅲ)。各时间点 C 组和 B 组大鼠损伤脊髓前角运动神经元中 Bax 阳性细胞 AOD 值均显著高于 A 组(*P*<0.01),但 C 组显著低于 B 组(*P*<0.05 或 0.01)。各时间点 C 组和 B 组大鼠损伤脊髓前角运动神经元中 Bcl-2 阳性细胞 AOD 值均显著低于 A 组(*P*<0.01),但 C 组显著高于 B 组(*P*<0.05 或 0.01)。

表 2 B 组和 C 组大鼠损伤脊髓及 A 组相应部位脊髓 Bax 及 Bcl-2 阳性细胞平均光密度(AOD) ($\bar{x}\pm s$, *n*=5)

时间点	Bax 阳性细胞 AOD			Bcl-2 阳性细胞 AOD		
	A组	B组	C组	A组	B组	C组
术后 4h	101.11±2.96	141.84±6.78 ^①	131.27±3.74 ^{①②}	198.33±3.11	128.45±6.52 ^①	138.21±2.79 ^{①②}
术后 8h	105.24±1.45	194.27±4.82 ^①	172.89±7.18 ^{①③}	200.46±3.25	140.99±2.32 ^①	169.24±4.24 ^{①③}
术后 12h	104.21±4.29	187.07±4.11 ^①	165.66±1.69 ^{①③}	202.54±1.17	164.65±7.47 ^①	180.36±6.23 ^{①③}
术后 24h	103.55±5.10	184.45±6.36 ^①	161.33±1.66 ^{①③}	206.78±5.62	187.79±3.51 ^①	197.92±2.99 ^{①③}
术后 3d	95.69±1.58	173.85±6.51 ^①	155.65±5.35 ^{①③}	204.53±2.75	184.21±3.26 ^①	196.73±3.67 ^{①③}
术后 7d	96.14±1.23	158.01±11.13 ^①	132.81±6.11 ^{①③}	201.69±3.51	152.01±7.19 ^①	191.18±2.16 ^{①③}
术后 14d	98.52±2.36	141.60±9.65 ^①	130.23±2.42 ^{①③}	196.24±6.23	118.97±2.29 ^①	176.17±13.71 ^{①③}

注:①与 A 组比较 *P*<0.01;与 B 组比较②*P*<0.05,③*P*<0.01

3 讨论

NT-3 是神经营养素家族中的重要成员之一,近年来对其研究逐渐增多,它是本体感受神经元存活的必需因子之一。在 NT-3 基因被敲除小鼠中,去除凋亡前基因 Bax 可以挽救受损神经元,而且在周围和中枢神经系统内的轴突中均可检测到 TrkC 受体表达,但因缺少 NT-3,新生轴突虽然可

以到达远端靶细胞/器官,但不能支配该细胞/器官,轴突在脊髓中出现杂乱或异位再生,甚至已超过中线,因此认为 NT-3 是一种短距离轴突趋化/导向因子,能指导轴突正确到达靶位^[3]。NT-3 在挽救受损神经元和促进轴突再生方面有重要作用。Sahenk 等^[4]研究发现 NT-3 能明显促进小鼠轴突再生并促进运动功能的恢复。Gibbons 等^[5]研究

发现,在鸡运动神经元发育过程中(胚胎 6~10d),连续给予 NT-3 能减少 36% 的神经元丢失,而联合应用脑源性神经营养因子(BDNF)则可减少 62% 的神经元丢失。表明连续给予神经营养因子能有效促进运动神经元的存活。但到目前为止,对于 NT-3 挽救受损神经元及促进功能恢复的机制研究较少。

在脊髓损伤后继发性损伤对于神经元丢失和功能缺失起到了重要作用。细胞凋亡主要包括线粒体途径和死亡受体途径两个基本途径。在线粒体途径中 Bcl-2 家族起着重要作用,其中 Bcl-2 和 Bcl-x 等抑制凋亡,而 Bax、Bad 和 Bik 等促进凋亡^[6]。

Bcl-2 和 Bax 比值是决定细胞凋亡的关键因素。本研究结果显示,损伤对照组脊髓损伤后 Bcl-2 蛋白仅有少量表达而 Bax 蛋白大量表达,说明脊髓损伤后促进凋亡因子占优势,而保护因子明显不足,从而使神经细胞向凋亡方向发展。因此,如果在伤后 24h 内得到有效治疗将大大提高治疗效果,减少伤残。本实验结果显示,Bax 在伤后 8h 达高峰,而研究报道脊髓损伤后 24h 细胞凋亡达高峰^[7,8],我们推测 Bax 为促凋亡的上游基因;Bcl-2 在术后 24h 达高峰,我们认为这是一种反馈机制,机体在受到损伤后首先出现致伤因子的表达,继而反馈性出现保护因子的表达,因而表现出一定的滞后性。本研究结果显示大鼠急性脊髓损伤后及时给予 NT-3 能明显抑制损伤脊髓

Bax 表达,提高 Bcl-2 表达,BBB 评分也明显提高,表明抑制 Bax/Bcl-2 比值从而抑制细胞凋亡可能是 NT-3 对脊髓保护作用的机制之一。

4 参考文献

1. Shibayama M, Hattori S, Himes BT, et al. Neurotrophin-3 prevents death of axotomized Clarke's nucleus neurons in adult rat[J]. J Comp Neurol, 1998, 390(1): 102-111.
2. Basso DM, Beattie MS, Bresnaban JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1-21.
3. Genc B, Ozdinler PH, Mendoza AE, et al. A chemoattractant role for NT-3 in proprioceptive axon guidance [J]. PLoS Biol, 2004, 2(12): e403.
4. Sahenk Z, Nagaraja HN, McCracken BS, et al. NT-3 promotes nerve regeneration and sensory improvement in CMT1A mouse models and in patients[J]. Neurology, 2005, 65(5): 681-689.
5. Gibbons AS, Wreford N, Pankhurst J, et al. Continuous supply of the neurotrophins BDNF and NT-3 improve chick motor neuron survival in vivo [J]. Int J Dev Neurosci, 2005, 23(4): 389-396.
6. Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosis or mitochondria [J]. Genes Cells, 1998, 3(11): 697-707.
7. 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.
8. 刘世清, 周华, 彭昊, 等. 大鼠急性脊髓损伤后细胞凋亡的时空分布特点[J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(24): 1699-1700.

(收稿日期: 2006-10-19 修回日期: 2007-05-09)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 李伟霞)

消息

第二届中华创伤骨科杂志学术年会通知

由中华医学会杂志社、《中华创伤骨科杂志》编辑部主办,哈尔滨医科大学附属第一医院承办的“第二届中华创伤骨科杂志学术年会”定于 2007 年 7 月 5~8 日在哈尔滨友谊宫饭店举行。学术年会包括两项内容:①高能量损伤与关节内骨折诊疗新进展研讨会;②临床科研与 SCI 论文撰写学习班。研讨会于 7 月 6 日举行,会议围绕“高能量损伤与关节内骨折诊疗新进展”的主题进行学术讲座,将邀请裴国献、王满宜、曾炳芳、王钢、毕郑钢、蒋协远、危杰、姜春岩、王蕾、罗从风、王秋根、陆桦教授等多位国内外著名专家与会进行专题报告。本次学术活动为国家级 I 类继续医学教育项目,参加会议的代表可获得国家 I 类学分 10 分。7 月 7 日将由中华创伤骨科杂志社与中华骨科交流学会(台湾)联合举办国家级继续医学教育学习班——“临床科研与 SCI 论文撰写”。届时将由台湾阳明大学郑诚功教授、本刊总编辑裴国献教授、本刊英文编辑梁平教授等就如何进行临床科研设计与 SCI 论文撰写进行详细讲授,参加会议可获得国家级 I 类继续医学教育项目 10 分。

本次学术年会内容丰富、新颖,欢迎在读研究生、临床、教学及科研人员踊跃投稿及参会。有意参加学术论坛者请于 2007 年 7 月 1 日前来电来信报名:①510515 广州市南方医科大学南方医院《中华创伤骨科杂志》编辑部 李广宇收;电话:(020)61641748,传真:(020)61360066;E-mail:chinjot@yahoo.com.cn。②150001 哈尔滨医科大学附属第一医院骨科 毕郑钢或尚剑收;电话:13603600360。传真:(0451)53643849 转 5125;E-mail:bizhenggang@54dr.com;shj1616@sina.com。