

罗西格列酮对脊髓损伤大鼠神经功能恢复的作用及机制

吴燕峰, 孟庆奇, 梁新军, 叶记超, 唐 勇, 黄 霖, 杨 睿, 王 鹏, 沈慧勇

(中山大学孙逸仙纪念医院骨科 510120 广州市)

【摘要】目的:观察罗西格列酮对脊髓损伤(SCI)大鼠后肢运动功能恢复的作用,探讨其作用机制。**方法:**75 只成年 SD 大鼠,应用 Allen 改良法制作大鼠 T10 SCI 模型,随机分为 A、B、C 三组,每组 25 只,B、C 组于损伤后 5min、6h、24h 腹腔注射罗西格列酮,C 组在腹腔注射罗西格列酮前 1h 给予 G3335,A 组于相应时间点腹腔注射等体积生理盐水作为对照组。每组取 6 只大鼠于伤后 1d、7d、2w、4w、6w 时对后肢运动功能进行 BBB 评分;伤后 3d 每组取 4 只动物脊髓组织行免疫组织化学染色法检测核转录因子 κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells,NF- κ B)的表达;伤后 1、3、5、7d 和 2w 每组取 3 只应用 Western blot 法检测脊髓组织中凋亡相关蛋白 caspase-3 和 Bcl-2 的表达。**结果:**伤后 1d、7d 时 3 组大鼠 BBB 评分均为 0 分,伤后 2w 开始 B 组 BBB 评分高于 A 组和 C 组,4w 和 6w 时与 A、C 组比较有显著性差异($P<0.05$);伤后 3d 时三组 NF- κ B 表达均为阳性,但 B 组平均光密度值明显低于 A、C 组($P<0.05$),B 组与 C 组比较无显著性差异($P>0.05$);伤后各时间点 B 组 caspase-3 表达量均低于 A 组和 C 组($P<0.05$),而 Bcl-2 表达均高于 A 组和 C 组($P<0.05$),其差异均在伤后 5d 达到高峰,A 组与 C 组同时点比较无显著性差异($P>0.05$)。**结论:**罗西格列酮可促进 SCI 大鼠神经功能恢复,其机制可能与抑制炎症反应及细胞凋亡有关。

【关键词】脊髓损伤;罗西格列酮;细胞凋亡;核转录因子 κ B;凋亡相关蛋白;大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.11.08

中图分类号:R683.2,R965.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2010)-11-0913-05

Effect of rosiglitazone on neurofunction recovery after spinal cord injury in rats/WU Yanfeng,MENG Qingqi,LIANG Xinjun,et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord,2010,20(11):913~917

【Abstract】Objective:To investigate the effect and mechanism of rosiglitazone on neurofunction recovery after spinal cord injury(SCI) in rats.**Method:**SCI model at T10 from 75 Sprague Dawley(SD) rats was induced by modified Allen method.All rats were divided into 3 groups:group B($n=25$,rosiglitazone were injected at 5min, 6h,24h after SCI),group C ($n=25$,rosiglitazone were injected as well as group B and G3335 were injected at 1h before the rosiglitazone were injected),and group A was sham control group ($n=25$,the same dose of normal saline were injected).The BBB scoring system was employed to evaluate the behavioral changes of each group ($n=6$) at 1d,7d,2w,4w,6w after SCI.The protein expression of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells(NF- κ B) of each group($n=3$) was observed by immunohistochemistry at 3d after SCI,and the total protein of each group was extracted for detection of expression of caspase-3 and Bcl-2 at 1d,3d,5d,7d,2w after SCI ($n=3$,each group at every time point).**Result:**The BBB score of each group was 0 at 1d and 7d,while the BBB scores of group B were higher than that of group A and C at 4w after SCI, which showed significant difference between group B and the other two groups at 4w and 6w after SCI ($P<0.05$).The expression of NF- κ B protein were positive in every group,but the average optical density(AOD) of NF- κ B protein in group B was lower than that of group A and C ($P<0.05$),which showed no significant difference between group A and C ($P>0.05$).The expression of caspase-3 in group B was lower than that of group A and C($P<0.05$),the expression of Bcl-2 in group B was higher than that of the other two groups($P<0.05$),and the difference reached peak at 5d,there were no significant difference between group A and C at

基金项目:广东省产业技术研究与开发资金计划项目(2008B030301326)

第一作者简介:女(1966-),副主任技师,研究方向:脊髓损伤与生物治疗

电话:(020)81332612 E-mail:doctorlxj@yahoo.com.cn

each time point. **Conclusion:** Rosiglitazone can promote the neurofunction recovery after spinal cord injury through inhibition of inflammation reaction and process of apoptosis.

【Key words】 Spinal cord injury; Rosiglitazone; NF- κ B; Apoptosis; Caspase-3; Bcl-2; Rat

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Sun-Yat-Sen Memorial Hospital, Sun-Yat-Sen University, Guangzhou, 510120, China

新近研究表明, 过氧化物酶增殖体激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptor- γ , PPAR- γ) 在抑制中枢神经系统损伤、损伤后的炎症反应及细胞凋亡中起着重要作用^[1]。激活 PPAR- γ 可调控许多靶基因表达, 包括在炎症反应中发挥重要作用的核转录因子 κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) 及与细胞凋亡密切相关的蛋白, 如 caspase-3 和 Bcl-2^[2]。在脑缺血再灌注损伤中, PPAR- γ 配体能够显著减少脑组织继发性炎症反应、促进大脑功能的恢复; 激活 PPAR- γ 可抑制癫痫、帕金森等中枢神经系统退行性疾病中的神经元凋亡^[3,4]。脊髓损伤后 (spinal cord injury, SCI) 激活 PPAR- γ 能否抑制脊髓损伤后的炎症免疫反应, 保护残余的神经功能尚未见相关报道。本实验拟通过建立大鼠 SCI 模型, 观察 PPAR- γ 配体罗西格列酮对 SCI 大鼠神经功能恢复的作用, 为 SCI 临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

成年 SD 大鼠 75 只, 性别不限, 体重 220~250g (由中山大学北校区实验动物中心提供)。罗西格列酮购自 Cayman 公司, PPAR γ 拮抗剂 G3335 购自 Merck 公司; NF- κ B 一抗购自 Sigma 公司, 羊抗兔二抗试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。兔抗大鼠 caspase-3 多克隆一抗和兔抗大鼠多克隆 Bcl-2 一抗购自美国 Santa Cruz 公司; 化学发光试剂盒购自 BestBio 公司。

1.2 SCI 模型的制作与分组

SCI 模型在中山大学脊髓损伤研究所完成, 手术场所及所用器械均经严格消毒。采用改良 Allen 法造模: 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉动物后 (剂量为 3.5ml/kg), 暴露 T9~T11 椎板, 将 T10 椎板全切除, 暴露硬膜。固定 T9、T11 棘突, 接通打击器电源, 调节打击高度为 5cm, 选择打击锤重量为 10g。打击后大鼠后肢伸直及鼠尾震颤抖动为造模成功标志。造模成功后依次缝合硬脊膜、皮下

组织与皮肤。造模成功的 75 只 SD 大鼠随机分为 A 组: 阴性对照组; B 组: 罗西格列酮组; C 组: 罗西格列酮加 G3335 组, 每组 25 只。罗西格列酮注射时间点为损伤后 5min、6h、24h, C 组每次在给罗西格列酮前 1h 给予 G3335。给药剂量和方法参照 Yu 等的方法^[5]: 腹腔注射, B 组罗西格列酮 1mg/kg; C 组: 罗西格列酮 1mg/kg + G3335 1.5mg/kg; A 组给予与 B 组药物等体积的生理盐水。麻醉苏醒后分笼饲养, 术后 3d 应用抗生素 (青霉素钠, 10000U/100g)。每天两次给予人工排尿、排便。

1.3 后肢运动功能的测试 (BBB 评分)

每组取 6 只大鼠, 于术后 1d、7d、2w、4w、6w 观察大鼠后肢运动功能, 由熟知 BBB 评分标准者专门负责评分, 不参与实验的其他步骤。非课题组参与者对数据进行统计分析。

1.4 NF- κ B 的检测

在 SCI 后 3d 时, 各组取 4 只大鼠麻醉, 经主动脉灌注后, 以脊髓损伤处为中心取上下共 1cm 长脊髓, 4% 多聚甲醛固定, 横切片, 经二甲苯和梯度酒精脱蜡水化后, 用含 0.1% TritonX-100 的磷酸缓冲液 (PBS) 浸泡冲洗 30min, 用 pH 6.0 的枸橼酸盐修复液在微波炉中进行热修复 (中档两次沸腾, 中间间隔 8~10min), 3% H₂O₂ 封闭 20min, PBS 冲洗 5min, 共 3 次, 加入一抗 (1:100), 4℃ 过夜 (12~15h), 一抗孵育完毕后, 用 PBS 冲洗 5min, 共 3 次, 滴加即用型二抗, 室温下孵育 30min, DAB 显色, 中性树胶封片, 以 PBS 代替一抗做阴性对照。胞核棕黄色深染为阳性细胞。每张切片随机选取 10 个不重复 400 倍视野, 利用 Image Pro Plus 图像分析软件 (IPP 6.0) 对采集的图像进行阳性细胞平均光密度值 (AOD) 分析, AOD 与 NF- κ B 表达成正比例关系。

1.5 caspase-3 和 Bcl-2 检测

在造模后 1、3、5、7d 和 2w 时各组取 3 只大鼠, 以打击点为中心取长约 15mm 的脊髓, 提取其总蛋白后, 采用 Western blot 法检测 caspase-3 和 Bcl-2 表达情况: 取 50 μ g 蛋白质样品进行 SDS-

PAGE电泳,转膜后封闭 30min, TBST 缓冲液漂洗 3 次后,分别加入相应的兔抗大鼠 caspase-3 多克隆一抗(1:1000)和兔抗大鼠多克隆 Bcl-2 一抗(1:1000) 孵育,4℃过夜, TBST 漂洗 3 次后加入相应的辣根过氧化物标记的二抗,37℃孵育 2h, 增强化学发光(ECL)显色,曝光。 β -actin 作为内参照。利用 IPP 6.0 分析各组结果(各组 AOD 值/内参照 AOD 值)。

1.6 统计学处理

数据用均数 $\pm$ 标准差表示, 各组间行单因素方差分析, 应用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学处理。 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

实验过程中非正常死亡大鼠 7 只, 其中正常对照组 3 只, 实验组死亡 4 只, 均按随机条件进行追加。

造模后 1d、7d、2w、4w、6w 各组大鼠的后肢功能 BBB 评分见表 1。术后 2w, B 组大鼠后肢有少许功能恢复, A、C 两组大鼠后肢功能无恢复; 术后 4w, B 组大鼠后肢功能进一步恢复, A、C 组大鼠后肢功能有少许恢复; 术后 6w 各组 BBB 评分均有所增加, B 组从 2w 开始各个时间点评分均高于 A、C 组($P<0.05$), A、C 两组评分无统计学差异($P>0.05$)。

免疫组化染色显示造模后 3d, 三组大鼠脊髓组织中都存在 NF- κ B 表达, 表达位于小胶质细胞和星形胶质细胞的胞浆和胞核中(图 1~3)。A、C 组细胞核深染且胶质细胞的胞体均增大, 神经纤维

表 1 造模后不同时间点各组大鼠后肢功能 BBB 评分 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

	A组	B组	C组
1d	0	0	0
7d	0	0	0
2w	0	1.36 $\pm$ 0.53	0
4w	0.47 $\pm$ 0.11	3.50 $\pm$ 0.63 ^①	0.44 $\pm$ 0.12 ^②
6w	1.34 $\pm$ 0.30	6.20 $\pm$ 0.46 ^①	1.41 $\pm$ 0.52 ^②

注:①与 A 组、C 组比较 $P<0.05$, ②与 A 组比较 $P>0.05$

断裂, 排列紊乱; B 组较 A 组和 C 组的着色浅, 胞体和胞核的增大较少, 神经纤维排列和连续性较好。A 组 AOD 值为 0.26 $\pm$ 0.05, B 组为 0.17 $\pm$ 0.04, C 组为 0.24 $\pm$ 0.06。B 组与 A、C 比较有统计学意义($P<0.05$); A 组与 C 组比较无统计学意义 ($P>0.05$)。即 B 组损伤脊髓组织中 NF- κ B 表达较 B、C 组少。

造模后不同时间点三组大鼠损伤部位脊髓组织中 caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达见图 4、5 和表 2、3。伤后 1d 时, 三组间比较无统计学差异($P>0.05$)。B 组 caspase-3 的表达从伤后 3d 起低于 A 组和 C 组, 5d 时其表达最低, 7d 后逐渐恢复; B 组与 A 组、C 组比较从伤后 3d 起在各个时间点的 caspase-3 表达量均有统计学差异($P<0.05$), A 组和 C 组比较无统计学差异($P>0.05$)。Bcl-2 的表达在 B 组从伤后 3d 起高于 A 组和 C 组, 5d 时表达量达到高峰, 7d 后逐渐恢复; B 组与 A 组、C 组比较在伤后 3d 起各个时间点的 Bcl-2 的表达量均有差异 ($P<0.05$), A、C 组间无统计学差异 ($P>0.05$)。

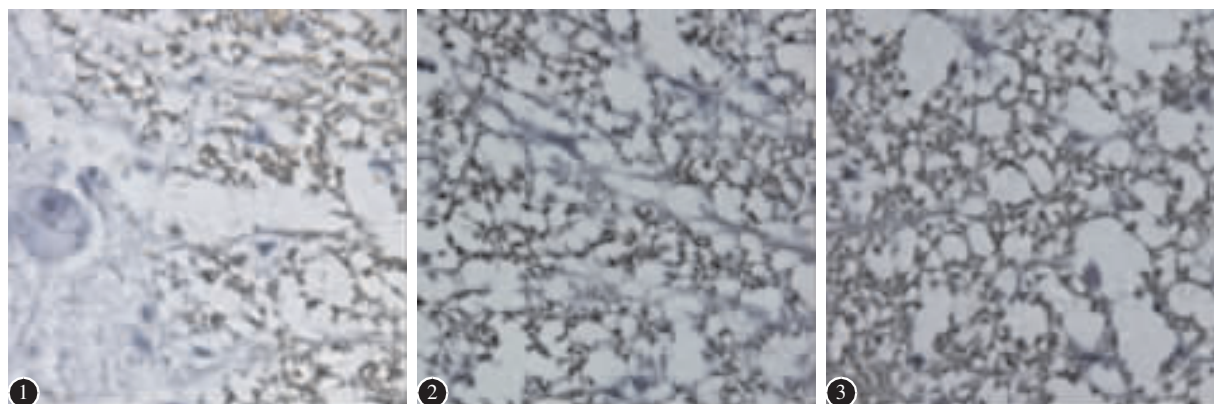


图 1 对照组(A 组)伤后 3d 损伤区脊髓白质区可见胞核深染、胞浆浅染的胶质细胞, 胞体增大, 神经纤维排列紊乱 (免疫组化染色 $\times 400$) 图 2 罗西格列桐组(B 组)伤后 3d 损伤区脊髓白质中可见胞核深染、胞浆浅染的胶质细胞, 胞体无明显增大, 神经纤维基本成辐射状排列 (免疫组化染色 $\times 400$ 倍) 图 3 罗西格列桐+G3333 组(C 组)伤后 3d 损伤区脊髓白质中可见胞核深染、胞浆稍浅染的胶质细胞, 胞体增大, 神经纤维排列紊乱 (免疫组化染色 $\times 400$)

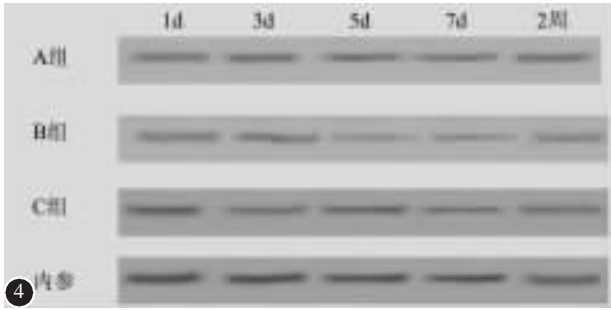


图 4 Western blot 法检测大鼠脊髓损伤后不同时间点损伤脊髓组织 caspase-3 的表达情况

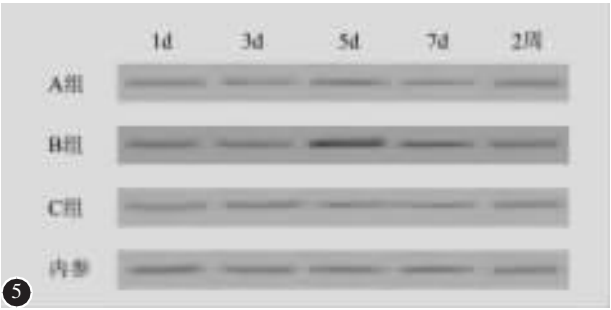


图 5 Western-blot 法检测大鼠脊髓损伤后不同时间点损伤脊髓组织 Bcl-2 的表达情况

表 2 各组大鼠脊髓损伤后不同时间点损伤脊髓组织中 caspase-3 表达量 ($\bar{x} \pm s, n=3, OD$ 值)

	A组	B组	C组
1d	0.768±0.032	0.752±0.024	0.747±0.039
3d	0.844±0.012	0.643±0.032 ^①	0.868±0.017 ^②
5d	0.857±0.026	0.437±0.039 ^①	0.891±0.042 ^②
7d	0.815±0.037	0.514±0.029 ^①	0.795±0.041 ^②
2w	0.871±0.035	0.603±0.027 ^①	0.819±0.032 ^②

注:①与 A 组、C 组比较 $P<0.05$;②与 A 组比较 $P>0.05$

表 3 各组大鼠脊髓损伤后不同时间点损伤脊髓组织中 Bcl-2 表达量 ($\bar{x} \pm s, n=3, OD$ 值)

	A组	B组	C组
1d	0.843±0.035	0.818±0.014	0.784±0.028
3d	0.817±0.031	0.957±0.025 ^①	0.790±0.037 ^②
5d	0.908±0.021	1.752±0.014 ^①	0.876±0.029 ^②
7d	0.920±0.042	1.521±0.023 ^①	0.887±0.036 ^②
2w	0.805±0.033	1.033±0.041 ^①	0.812±0.024 ^②

注:①与 A 组、C 组比较 $P<0.05$;②与 A 组比较 $P>0.05$

3 讨论

SCI是人类致残率最高的疾患之一。SCI除了损伤本身所引起的原发性损害外, 主要还有由于炎症免疫反应引起的局部微环境的改变、氧自由基的释放等所引起的继发性损害^[6,7]。脊髓继发性损伤可引起残存的少突胶质细胞和神经元凋亡, 从而加重神经损害, 进一步影响神经功能的恢复, 这也是导致脊髓功能丧失的主要原因^[8]。SCI后少突胶质细胞是最常见的凋亡细胞类型, 也是最易受到微环境变化影响的一类细胞。及时阻断凋亡过程中的 caspase 级联反应, 保护少突胶质细胞和残存的神经元, 对脊髓继发性损伤的治疗有重要意义^[9,10]。

PPARs 分为 PPAR- α 、PPAR- γ 、PPAR- δ 三种亚型, 分别由不同基因编码的配体激活, 在脂质、脂蛋白、糖代谢平衡, 细胞增殖、分化和凋亡, 以及抑制非特异性炎症中起到重要的作用^[1,2]。本研究中我们使用 PPAR- γ 配体罗西格列酮激活 PPAR- γ 信号通路, 并设置激活剂加 PPAR- γ 拮抗剂组和阴性对照组进行对比, 观察其对脊髓损伤的恢复作用。BBB 评分结果显示实验组高于两个对照组, 两个对照组之间无统计学差异, 提示罗西格列酮可促进 SCI 大鼠的后肢功能恢复, 而这

种作用可以被 PPAR- γ 配体的拮抗剂所阻断。

目前已知 NF- κ B 在炎症的发生和发展中发挥重要作用, 可被一些细胞因子、细菌、病毒颗粒、氧自由基等激活^[11]。激活后无活性的 NF- κ B 由胞质快速转移至核内, 结合到启动子序列 κ B 位点上, 使转录增加, 蛋白质的合成增加。有研究证实, 在神经系统受损后, 破裂的髓鞘碎片可通过 FAK/PI3K/Akt 信号转导途径激活 NF- κ B, 并进一步导致中枢神经系统的炎症反应^[12]。本研究中 NF- κ B 免疫组化染色提示脊髓白质中均有胞核的深染和胞质浅染的胶质细胞, 说明三组在损伤后均有炎症反应的发生, 但 B 组的胶质细胞和神经纤维发生的增粗和排列紊乱的状况要好于 A、C 两个对照组, 胞核的深染程度也较低。通过 AOD 比较, B 组 NF- κ B 表达要低于 A 组、C 组 ($P<0.05$), 而两对照组之间没有统计学差异 ($P>0.05$)。提示大鼠 SCI 后经罗西格列酮的干预可以抑制炎症传导通路中 NF- κ B 的表达, 抑制大鼠 SCI 后的炎症发生, PPAR- γ 拮抗剂可以阻断这种抑制作用。

脊髓继发性损伤中神经细胞的凋亡是神经功能丧失的主要原因。caspase 家族参与细胞凋亡的信号转导过程。有研究证实 caspase-3 与神经干

细胞的凋亡有关,可促进神经干细胞和处在有丝分裂后期的神经元发生凋亡^[13]。Bcl-2 蛋白家族分为两大类:一类抗凋亡,一类促细胞死亡。Bcl-2 因子可保护细胞在受到外界刺激时免于凋亡。caspase-3 和 Bcl-2 在细胞凋亡调控过程中均发挥着重要作用,其中 caspase-3 在细胞凋亡程序中起到最后枢纽的作用,而 Bcl-2 则在抑制凋亡的过程中起关键作用^[14]。本研究通过 Western blot 法检测罗西格列酮干预后 SCI 局部 caspase-3 和 Bcl-2 的表达,结果发现从伤后 3d 起,B 组 caspase-3 的表达低于 A 组和 C 组,5d 时表达最低,7d 后逐渐恢复;B 组凋亡抑制蛋白 Bcl-2 从 3d 时表达高于 A 组和 C 组,5d 达到高峰,7d 后逐渐恢复。提示罗西格列酮可能通过抑制细胞凋亡而发挥神经保护作用。C 组 caspase-3 和 Bcl-2 的表达与 A 组无统计学差异,可以推断罗西格列酮的作用能被 PPAR- γ 的拮抗剂所抑制。尽管 PPAR- γ 信号通路在 SCI 中所起的确切作用尚不十分清楚,但 PPAR- γ 激活可能通过抑制细胞凋亡和抑制炎症反应促进 SCI 大鼠神经功能的恢复。

4 参考文献

1. Kapadia R, Yi JH, Venmuganti R. Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR- γ agonists [J]. Front Biosci, 2008, 13: 1813-1826.
2. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation [J]. Inflammation Res, 2000, 49(10): 497-505.
3. Schintu N, Frau L, Ibba M, et al. PPAR- γ -mediated neuroprotection in a chronic mouse model of Parkinson's disease [J]. Eur J Neurosci, 2009, 29(5): 954-963.
4. Hunter RL, Choi DY, Ross SA, et al. Protective properties afforded by pioglitazone against intrastriatal LPS in Sprague-Dawley rats [J]. Neurosci Lett, 2008, 432(3): 198-201.
5. Yu X. Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma exerts neuroprotection by inhibiting oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus [J]. Brain Res, 2008, 47(1): 146-159.
6. Guimaraes JS, Freire MA, Lima RR, et al. Mechanisms of secondary degeneration in the central nervous system during acute neural disorders and white matter damage [J]. Rev Neurol, 2009, 48(6): 304-310.
7. Alexander JK, Popovich PG. Neuroinflammation in spinal cord injury: therapeutic targets for neuroprotection and regeneration [J]. Prog Brain Res, 2009, 175(8): 125-137.
8. Wu B, Ren X. Promoting axonal myelination for improving neurological recovery in spinal cord injury [J]. J Neurotrauma, 2009, 26(10): 1847-1856.
9. Ambrozaitis KV, Kontautas E, Spakauskas B, et al. Pathophysiology of acute spinal cord injury [J]. Medicina (Kaunas), 2006, 42(3): 255-261.
10. Casha S, Yu W, Fehlings MG. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat [J]. Neuroscience, 2001, 103(1): 203-218.
11. Chen F, Castranova V, Shi XL, et al. New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases [J]. Clin Chemistry, 1999, 45(1): 7-17.
12. Sun X, Wang X, Chen TX, et al. Myelin activates FAK/Akt/NF- κ B pathways and provokes CR3-dependent inflammatory response in murine system [J]. Plos One, 2010, 5(2): 1-15.
13. Eldadh BA, Faden AI. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury [J]. J Neurotrauma, 2000, 17(10): 811-829.
14. Springer JE, Azbill RD, Nottingham SA, et al. Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury [J]. J Neuroscience, 2000, 20(19): 7246-7251.

(收稿日期: 2010-06-22 修回日期: 2010-09-01)

(英文编审 蒋欣/刘思麒)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

欢迎订阅《中国脊柱脊髓杂志》合订本

《中国脊柱脊髓杂志》2006~2010 年合订本均为精装本(上、下册),2006 年定价 180 元/套,2007~2009 年定价 200 元/套,2010 年上半年定价 110 元/册,有需要者请与本刊经理部联系。

联系地址:北京市朝阳区中日友好医院内《中国脊柱脊髓杂志》经理部,邮编:100029。联系电话:(010)64206649,64284923。E-mail 地址:cspine@263.net.cn。

汇款时请在汇款单上注明所需物品及数量。