

FTY720 对大鼠急性脊髓损伤后神经功能恢复的影响及相关机制

杨 梁¹, 吕德成², 郑连杰¹, 王朝晖¹, 张 伟³, 李晓天³

(1 大连医科大学附属二院骨科 116027 辽宁省大连市; 2 大连医科大学附属一院骨科 116011 辽宁省大连市; 3 大连医科大学研究生院 116021 辽宁省大连市)

【摘要】目的:观察 FTY720 对大鼠急性脊髓损伤(ASCI)后神经功能的影响,并探讨其相关机制。**方法:**168 只雌性 SD 大鼠,随机分成 A、B、C 三组,每组 56 只,A 组(假手术组)大鼠麻醉后仅切除 T9 椎板,不打击脊髓,缝合后立即以 0.3ml 生理盐水灌胃。B、C 组采用 Allen's 法制作 T9 脊髓损伤模型,B 组(对照组)以 0.3ml 生理盐水灌胃,C 组(治疗组)以 FTY720 按 3mg/kg 生理盐水稀释至 0.3ml 灌胃。每组取 8 只大鼠分别于术后 1d、3d、7d、14d、21d 行斜板试验及 BBB 评分。分别于术后 6h、12h、24h、48h、72h、7d、21d 处死大鼠,每个时间点每组 8 只,取损伤段(A 组取相应部位)脊髓行超薄切片,HE 染色观察各组脊髓坏死情况、炎细胞浸润情况、胶质瘢痕形成情况及脊髓空洞大小,并计数各组术后 12h 淋巴细胞数、术后 12h 与 72h 炎性细胞、术后 7d 胶质瘢痕区细胞,计算伤后 21d 脊髓空洞面积与脊髓面积比值;取术后 6h、12h、24h、72h 的切片行 SP 免疫组化染色观察 caspase-3 表达及 Tunel 染色观察细胞凋亡情况,计算相应时间点免疫组化染色阳性细胞比值和凋亡指数。所有数据以 SPSS 13.0 进行统计学分析。**结果:**B、C 两组各时间点斜板实验及 BBB 评分均较 A 组同时点差($P < 0.05$),在术后 1d 时 B、C 组之间无显著性差异($P > 0.05$),术后 3d、7d、14d、21d 时 C 组优于 B 组($P < 0.05$)。HE 染色结果显示 A 组各时间点脊髓形态正常;B、C 组脊髓术后 6h 可见脊髓内出血、水肿形成,术后 12h~48h 脊髓进行性水肿、损伤中心区出现液化坏死,伴有炎细胞浸润,以中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞为主,至术后 72h,损伤中心区形成无组织结构空洞,空洞周围有大量炎细胞浸润,以小胶质细胞/单核细胞为主;术后 12h 及 72h, B 组炎细胞浸润程度明显重于 C 组 ($P < 0.05$), 术后 12h C 组淋巴细胞浸润程度相对 B 组明显减少 ($P < 0.05$), 术后 7d, 脊髓水肿减轻,空洞周围形成胶质瘢痕,胶质瘢痕细胞计数 B 组明显大于 C 组 ($P < 0.05$), 术后 21d 脊髓空洞形成,脊髓空洞比值 B 组明显大于 C 组 ($P < 0.05$)。SP 免疫组化染色和 Tunel 染色结果显示 A 组各时间点几乎见不到 caspase-3 和细胞凋亡表达阳性细胞,B、C 组脊髓损伤后 6h 即可见凋亡细胞,到术后 24h 达高峰,而后随术后时间延长而逐渐减弱,但是仍然保持在较高水平;caspase-3 表达与细胞凋亡同步,各时间点 C 组 caspase-3 表达阳性细胞比值和细胞凋亡指数均显著低于 B 组 ($P < 0.05$)。**结论:**FTY720 可以显著改善大鼠 ASCI 后神经功能,其可能是通过抑制脊髓损伤后的炎症反应,减少 caspase-3 的表达及神经细胞凋亡,从而减轻脊髓继发性损伤。

【关键词】急性脊髓损伤;FTY720;半胱氨酸蛋白酶-3;凋亡;大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2012.04.11

中图分类号:R683.2,R961 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2012)-04-0339-07

Effects and mechanism of FTY720 on neurofunctional recovery after acute spinal cord injury in rats/YANG Liang, LÜ Decheng, ZHENG Lianjie, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2012, 22(4): 339-345

【Abstract】Objectives: To observe the effect of FTY720 on acute spinal cord injury (ASCI) and explore its possible mechanism. **Methods:** One hundred and sixty-eight pre-numbered Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups of 56 each as group A, B and C. In group A (sham operation group), rats were administered with 0.3ml saline by gavage after laminectomy but without contusion. In group B and group C, animal ASCI model was established by Allen's WD method at the T9 level of spinal cord. After operation,

基金项目:辽宁省教育厅资助课题(编号:L2010105)

第一作者简介:男(1973-),医学博士,副教授,研究方向:脊柱外科

电话:(0411)84671291-3053 E-mail:yangliangyang@126.com

rats in group B(control group) were also administered with saline at same dose, and rats in group C(treated group) were administered by gavage with 0.3ml FTY720-saline (3mg/kg body weight). For 8 rats of every group, functional recovery was evaluated after ASCI via inclined plane test and standardized Basso, Beattie and Bresnahan(BBB) locomotor scoring system at 1d, 3d, 7d, 14d, 21d. Rats of each group were sacrificed at 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 7d, 21d($n=8$ per different time point) after spinal cord injury, and spinal cord tissues were collected and sections were made to do HE stain to observe the necrosis of injured spinal cord, infiltration of inflammatory cells, formation of glial scar and the size of syringomyelia cavities. Then, the numbers of lymphocytes(12h), inflammatory cells(12h, 72h), scar cells(7d) and syringomyelia cavity size(21d) were calculated or measured. Sections of the time point at 6h, 12h, 24h, 48h, 72h were made to do SP immunohistochemical stain to observe expression of caspase-3 and Tunel stain to observe apoptosis of cells, then immunostain positive cells were calculated. All the data were statistically analyzed using SPSS 13.0 computer package. **Results:** The BBB scores and the results of inclined plane at the different time points in group B and C were both lower than those in group A($P<0.05$), but no significant difference between group B and group C at 1d after spinal cord injury($P>0.05$), therefore functions of group C were better than group B at 3d, 7d, 14d, 21d ($P<0.05$). HE stain showed normal in group A at each time point; in group B and C, it showed bleeding and hematoma at 6h, gradual hydroncus, liquefaction necrosis combined with inflammatory cells infiltrating(neutrophil, lymphocyte, mononuclear cells mainly) at 12h to 48h, syringomyelia cavities forming surrounded by lots of inflammatory cells (gitter cells/mononuclear cells mainly) at 72h, the number of inflammatory cells in group B was significantly more than that in group C at 12h and 72h($P<0.05$), the number of lymphocytes in group C was less than that in group B at 12h($P<0.05$); at 7d, hydroncus decreased, glial scar formed around syringomyelia cavities, the glial scar density in group B was significantly higher than that in group C($P<0.05$); at 21d, the syringomyelia cavities in group B were significantly larger than those in group C($P<0.05$). Positive caspase-3 expression or neural apoptosis was not observed in group A at the different time points. The number of apoptotic cells increased with time increasing of acute spinal cord injury, peaked at 24 hours following injury, and then gradually reduced. However, neural apoptosis remained at a high level. Caspase-3 expression positively correlated with neural apoptosis. Caspase-3 expression and neural apoptosis in group C were significantly lower than those in group B ($P<0.05$). **Conclusions:** FTY720 can inhibit the expression of caspase-3 and the apoptosis of cells after ASCI and provide neuroprotective effects, so as to reduce secondary spinal cord injury and improve spinal nerve recovery.

【Key words】 Acute spinal cord injuries; FTY720; Caspase-3; Apoptosis; Rat

【Author's address】 Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, 116027, China

近年来,免疫损伤在脊髓继发性损伤中的作用越来越受到重视^[1-4]。一些免疫抑制剂(如甲基强的松龙、环孢霉素 A、FK506 等)相继被发现对脊髓损伤有治疗作用^[5-8],但是由于其副作用较大而限制了其临床应用。FTY720 是一种来源于冬虫夏草的新型免疫抑制剂^[9],与传统免疫抑制剂相比,具有毒副作用小,不影响外周血中性粒细胞数量,无明显肝、肾功能损害,不影响免疫记忆,在发挥免疫调节剂作用的同时并不降低患者的免疫功能等优点^[10,11]。目前关于 FTY720 对中枢神经系统损伤作用的研究较少^[12-14]。本研究采用 Allen's 脊髓损伤模型,观察 FTY720 对大鼠急性脊髓损伤后神经功能恢复的影响,并探讨其可能的作用

机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂

雌性 SD 大鼠 168 只,体重 180~220g,由大连医科大学动物实验中心提供 [合格证编号:SCXK(辽)2008-0002]。FTY720(购自武汉远城科技发展有限公司),caspase-3 抗体(美国 NeoMarkers For Lab Vision Corporation 生产),Tunel 试剂盒(德国 Roche Diagnostics GmbH Mannheim 生产),SP 试剂盒[即用型,内含过氧化氢(H_2O_2)、5%羊血清、羊抗兔多克隆抗体、过氧化物酶,购于北京中杉金桥生物技术有限公司]。

1.2 脊髓损伤模型制作及实验分组

大鼠称重后,随机分为 A、B、C 3 组,每组 56 只。以 2%水合氯醛 60mg/kg 腹腔内麻醉、固定、消毒,切除 T9 棘突及椎板。A 组(假手术组)大鼠不打击脊髓,缝合切口后立即以 0.3ml 生理盐水灌胃。B、C 组大鼠以 Allen's 动物脊髓打击器制作急性脊髓损伤模型,打击能量 5g×5cm,打击面积 2.5×1.5mm,打击后大鼠迅速出现摇尾反射,双后肢及躯体回缩扑动,双后肢呈迟缓性瘫痪表明造模成功。B 组(对照组)造模后立即以 0.3ml 生理盐水灌胃,C 组(治疗组)造模后立即以 FTY720 按 3mg/kg^[9]生理盐水稀释至 0.3ml 灌胃。术后各组大鼠分笼饲养,定时按压下腹部促进排尿,观察进食情况和切口愈合情况等。

1.3 检测指标

1.3.1 斜板试验和 BBB 评分 每组取 8 只大鼠分别于术后 1d、3d、7d、14d、21d 进行斜板试验及 BBB 评分。由熟知斜板试验和 BBB 评分标准的专人负责评分,不参与其他实验步骤。数据由非课题组成员统计。

1.3.2 组织学检查 分别于术后 6h、12h、24h、48h、72h、7d、21d 每组各时间点取 8 只大鼠,以 2%水合氯醛 60mg/kg 腹腔内注射麻醉后,用含 4%多聚甲醛的 0.1M pH 值 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)50ml 心脏灌注,以损伤区为中心取损伤段脊髓长约 1cm,并从损伤区中心切为 2 段,任取 1 段置于 4%多聚甲醛 0.1M pH 值 7.4 的 PBS 中固定,24h 后常规石蜡包埋,连续横断切片,切片厚度 4μm。术后 6h、12h、24h、48h、72h 的标本隔 10 取 3 张切片,第 1 张用于 HE 染色,第 2 张用于 SP 免疫组化染色,第 3 张用于 Tunel 染色,每份标本共取 15 张切片备用;术后 1 周、3 周每份标本取 5 张切片备用。

分别取术后各时间点每只动物 5 张切片行 HE 染色,观察脊髓组织破坏、炎细胞浸润、脊髓空洞大小、胶质瘢痕形成及脊髓修复情况。由数码相机摄片后,将图像输入计算机,术后 12h、72h、7d 的切片每张选取 4 个不重复脊髓损伤区域高倍视野图像,应用 Image-pro plus 6.0 医学图像分析系统计数术后 12h、72h 炎细胞数,了解炎细胞浸润情况;术后 7d 行胶质瘢痕细胞计数,了解胶质瘢痕形成情况;分类计数术后 12h 浸润的淋巴细胞数;术后 21d 切片在低倍镜下计算脊髓空

洞面积与脊髓总面积的比值(S), $S = \text{空洞面积} / \text{脊髓面积} \times 100\%$ 。

分别取术后 6h、12h、24h、48h、72h 每只动物 5 张切片行 SP 免疫组化染色:切片脱蜡,用 0.01mol/L 的 PBS 洗涤 2 次,每次 3min;室温下加入 3%的 H₂O₂ 溶液浸泡 10~15min,以消除内源性过氧化物酶;0.01mol/L 的 PBS 洗涤 2 次,每次 3min;切片浸泡于浓度 0.01mol/L、pH 6.0 的碳酸盐缓冲液(CB)200ml 中,微波修复 10min,修复温度 100℃;自然冷却后取片;0.01mol/L 的 PBS 洗涤 2 次,每次 3min;室温下加入 5%羊血清蛋白封阻 10~15min 后,倾倒去除血清;加兔抗 caspase-3 多克隆抗体(1:50),4℃过夜 18h 以上;0.01mol/L 的 PBS 洗涤 3 次,每次 3min;加羊抗兔多克隆抗体,37℃温箱中孵育 15~20min;0.01mol/L 的 PBS 洗涤 3 次,每次 3min;加过氧化物酶(POD),37℃温箱中孵育 15~20min;0.01mol/L 的 PBS 洗涤 3 次,每次 3min;加入二氨基联苯胺(DAB)显色 5~10min,流水冲洗 10min,苏木精复染 10s。脱水、透明、封固。

分别取术后 6h、12h、24h、48h、72h 每只动物 5 张切片行 Tunel 染色:切片脱蜡,0.01mol/L 的 PBS 洗涤 5min;室温下加入 3%的 H₂O₂ 溶液浸泡 10min,以消除内源性过氧化物酶;0.01mol/L 的 PBS 洗涤 2 次,每次 5min;切片浸泡于浓度 0.01mol/L、pH 值 6.0 的 CB 200ml 中微波修复 1min;加入 80ml 双蒸水,自然冷却;0.01mol/L 的 PBS 洗涤 5min;室温下加入 5%羊血清蛋白封阻 30min;0.01mol/L 的 PBS 洗涤 2 次,每次 5min;加 Tunel 反应液,37℃温箱避光孵育 1h;0.01mol/L 的 PBS 洗涤 3 次,每次 5min;避光,多功能显微镜下观察免疫荧光阳性表达,并摄片;加入 POD,37℃温箱孵育 30min,0.01mol/L 的 PBS 洗涤 3 次,每次 5min;加入 DAB 显色 5~10min;流水冲洗 10min;苏木精复染 3s;流水冲洗 10min;脱水、透明、封固。

SP 免疫组化染色和 Tunel 染色切片均由数码相机摄片后将图像输入计算机,每张切片选取 5 个不重复脊髓损伤区域高倍视野图像,应用 Image-pro plus 6.0 医学图像分析系统分别计数染色阳性细胞数和细胞总数,计算每个标本染色阳性细胞数与细胞总数的比值。caspase-3 表达阳性细胞数与细胞总数的比值记作 C,C=每个标本

caspase-3 表达阳性细胞数/每个标本细胞总数 $\times 100\%$ 。细胞凋亡表达阳性细胞数与细胞总数的比值记作凋亡指数(H), $H = \text{每个标本凋亡细胞数} / \text{每个标本细胞总数} \times 100\%$ 。

1.3 统计学分析

将所得数据输入 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理。数据均以均数 $\pm$ 标准差表示, 多组比较采用单因素方差分析, LSD 法多重组间比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

术后共有 7 只大鼠死亡, B 组 6 只, C 组 1 只, 均及时补充。各组大鼠切口均愈合良好, 取材时未发现明显感染征象。B、C 组大鼠在造模后 1 周双足均出现不同程度的皮肤角化异常及脱屑。

3 组大鼠不同时间点的斜板试验和 BBB 评分结果见表 1、2。术后各时间点 B、C 组最大爬升角度均低于 A 组, 除 C 组 21d 外与 A 组同时时间点比较均有显著性差异 ($P < 0.05$); 术后 1d 时 B、C 两组间比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 以后各时间点两组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$)。A 组大鼠术后各时间点 BBB 评分变化不大; B、C 两组伤后第 1 天 BBB 评分都为 0 分, 以后各时间点 BBB 评分均为 A 组 $>$ C 组 $>$ B 组, 三组间比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。提示 FTY720 可以促进大鼠急性脊髓损伤后脊髓神经功能恢复。

HE 染色 A 组各时间点脊髓形态均完整, 未见明显破坏及液化坏死。B、C 组在脊髓损伤后 6h 可见明显的脊髓挫伤及脊髓内出血, 局部形成血肿, 但脊髓的大致形态仍完整, 神经元的形态正常, 未见明显的炎性细胞浸润; 伤后 12h, B、C 组脊髓出现不同程度水肿, 损伤中心区出现液化坏死及炎细胞浸润, 以中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞为主; 伤后 24h、48h, 损伤中心区液化坏死吸收形成空洞, 并逐渐增大, 炎细胞浸润减少, 损伤区周围炎细胞浸润逐渐增加, B 组脊髓液化坏死及炎细胞浸润程度明显重于 C 组; 伤后 72h, 损伤中心区形成无组织结构空洞, 空洞周围有大量炎细胞浸润, 以小胶质细胞/单核细胞为主; 伤后 7d, B、C 组脊髓液化坏死未见明显加重, 水肿减轻, 脊髓内血肿基本消失, 高倍镜下显示 B 组脊髓损伤中心区周围小胶质细胞/单核细胞浸润进一步增加, 星形胶质细胞和少突胶质细胞大量增

生, 形成胶质瘢痕, 结构致密, C 组脊髓损伤中心区周围小胶质细胞/单核细胞浸润较 72h 无明显增加, 星形胶质细胞和少突胶质细胞增生不明显。伤后 24h 和 48h, B、C 组脊髓液化坏死空洞内几乎没有组织结构, 未行炎细胞计数; 伤后 12h 及 72h, 每只动物 5 张切片 4 个不同视野下炎细胞计数 B 组分别为 1750 ± 441 个、 5310 ± 890 个, 均明显高于 C 组的 861 ± 302 个、 2406 ± 607 个 ($P < 0.05$); 伤后 12h, B 组淋巴细胞计数为 402 ± 78 个, 明显高于 C 组的 59 ± 21 个 ($P < 0.05$); 伤后 7d, B 组胶质瘢痕细胞计数为 9980 ± 1210 个, 明显高于 C 组的 3438 ± 596 个 ($P < 0.05$)。伤后 21d, B、C 组损伤区中心均形成明显空洞, B 组脊髓空洞面积与脊髓面积的比值为 $(45.06 \pm 4.25)\%$, C 组为 $(21.24 \pm 1.53)\%$, B 组明显大于 C 组 ($P < 0.05$)。B 组脊髓空洞周围被致密胶质瘢痕包绕, 空洞与正常脊髓组织间有宽大的移行带; C 组脊髓空洞周围几乎看不到胶质瘢痕, 空洞周围基本为正常脊髓组织包绕。说明 FTY720 可以抑制大鼠 ASCI 后炎细胞的浸润, 减轻胶质瘢痕的形成, 减小脊髓空洞。

SP 免疫组化染色 A 组各时间点几乎见不到

表 1 3 组大鼠不同时间点斜板试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=8, ^\circ$)

Table 1 Inclined plane test results in the 3 groups at each time-point

	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C
1d	43.75 $\pm$ 1.75	25.13 $\pm$ 0.99 ^①	25.38 $\pm$ 0.92 ^①
3d	48.13 $\pm$ 1.25	31.75 $\pm$ 2.43 ^{①②}	38.88 $\pm$ 2.36 ^①
7d	49.25 $\pm$ 0.71	35.13 $\pm$ 1.25 ^{①②}	42.50 $\pm$ 2.33 ^①
14d	49.63 $\pm$ 0.52	37.75 $\pm$ 1.67 ^{①②}	45.50 $\pm$ 1.60 ^①
21d	49.75 $\pm$ 0.71	38.63 $\pm$ 1.69 ^{①②}	47.13 $\pm$ 1.64

注: ①与 A 组同时时间点比较 $P < 0.05$; ②与 C 组同时时间点比较 $P < 0.05$

Note: ①VS group A, $P < 0.05$; ②VS group C, $P < 0.05$

表 2 3 组大鼠不同时间点 BBB 评分结果 ($\bar{x} \pm s, n=8, \text{分}$)

Table 2 BBB scores in 3 groups at each time-point

	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C
1d	20.50 $\pm$ 0.54	0.00 $\pm$ 0.00 ^①	0.00 $\pm$ 0.00 ^①
3d	21.00 $\pm$ 0.00	2.38 $\pm$ 1.51 ^{①②}	6.25 $\pm$ 3.06 ^①
7d	21.00 $\pm$ 0.00	5.88 $\pm$ 2.42 ^{①②}	12.38 $\pm$ 2.00 ^①
14d	21.00 $\pm$ 0.00	11.25 $\pm$ 2.25 ^{①②}	15.13 $\pm$ 1.25 ^①
21d	21.00 $\pm$ 0.00	13.75 $\pm$ 1.83 ^{①②}	18.62 $\pm$ 1.06 ^①

注: ①与 A 组同时时间点比较 $P < 0.05$; ②与 C 组同时时间点比较 $P < 0.05$

Note: ①VS group A, $P < 0.05$; ②VS group C, $P < 0.05$

caspase-3 表达阳性细胞(图 1a),B、C 组各时间点大鼠脊髓损伤区均可见到 caspase-3 阳性细胞,伤后 24h 内 caspase-3 表达主要集中在灰质区神经元,48~72h 神经元 caspase-3 表达减少而损伤区周边的小胶质细胞胞浆表达 caspase-3 增加。同时时间点 B 组明显多于 C 组(图 1b、1c)。各时间点 caspase-3 表达阳性细胞比值见表 3。伤后 6~48h 各时间点 caspase-3 表达阳性细胞比值 B 组>C 组>A 组($P<0.05$)。伤后 72h,C 组 caspase-3 表达阳性细胞比值与 A 组无显著性差异($P>0.05$)。

Tunel 染色观察 A 组各时间点几乎见不到凋亡细胞(图 2a)。B 组、C 组均在伤后 6h 开始出现凋亡细胞表达,伤后 24h 达高峰(图 2b、2c),伤后 48h 开始减弱,伤后 72h 进一步减少;两组伤后 24h 以前凋亡细胞主要集中在灰质区的神经元,胞核明显黄染,染色依时间逐渐加深;伤后 48h 及 72h,神经元凋亡减少而损伤区周边的小胶质细胞凋亡增加。三组各时间点凋亡细胞指数见表 4。说明 FTY720 可以明显减少大鼠脊髓损伤后 caspase-3 表达和细胞凋亡。

3 讨论

Flugel 等^[1]发现正常中枢神经系统中存在 T 淋巴细胞。Jones 等^[15,16]的研究表明,在脊髓免疫损伤机制中 T 淋巴细胞具有重要作用。脊髓损伤后大量活化 T 淋巴细胞会在损伤区聚集,同时局部浸润的 T 淋巴细胞还可以加重残存神经轴突的脱髓鞘改变。脱髓鞘反应的产物髓磷脂碱性蛋白

表 3 三组各时间点 caspase-3 表达阳性细胞数与细胞总数的比值 ($\bar{x}\pm s, n=8, \%$)

Table 3 Quantification of caspase-3-positive cells in 3 groups at each time-point

	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C
6h	1.39±0.39	20.12±5.47 ^{①②}	6.56±2.90 ^①
12h	1.74±0.80	28.95±6.11 ^{①②}	12.29±3.54 ^①
24h	1.13±0.46	34.51±6.98 ^{①②}	11.44±3.39 ^①
48h	1.26±0.37	19.35±5.30 ^{①②}	6.06±2.73 ^①
72h	1.37±0.43	11.51±3.17 ^{①②}	3.41±2.37

注:①与 A 组同时时间点比较 $P<0.05$;②与 C 组同时时间点比较 $P<0.05$

Note:①VS group A, $P<0.05$;②VS group C, $P<0.05$

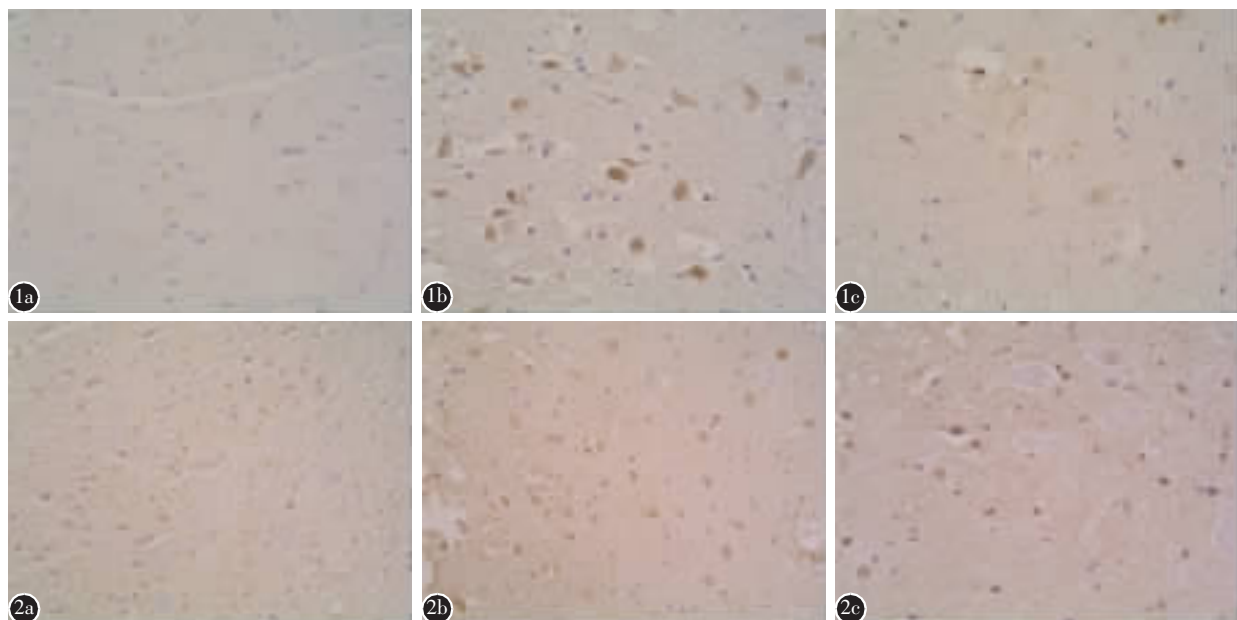


图 1 术后 24h,三组大鼠脊髓组织中 caspase-3 表达情况(SP 免疫组化染色 $\times 400$) a A 组未见 caspase-3 表达阳性细胞 b B 组可见较多黄褐色 caspase-3 表达阳性细胞,染色深 c C 组可见 caspase-3 表达阳性细胞,数量较 B 组少,染色较 B 组浅 图 2 术后 24h,三组大鼠脊髓组织细胞凋亡情况(Tunel 染色 $\times 400$) a A 组几乎看不到凋亡细胞 b B 组可见较多细胞核呈黄褐色的凋亡细胞 c C 组可见细胞核呈黄褐色的凋亡细胞,数量较 B 组少

Figure 1 caspase-3 expression after ASCI 24h (SP immunohistochemistry, $\times 400$) a caspase-3 positive cells are not observed in group A b, c More caspase-3 positive cells(yellow brown) were noted in group B than in group C Figure 2 Neural apoptosis after ASCI 24h(TUNEL, $\times 400$) a Apoptotic cells are not observed in group A b, c More apoptotic cells were noted in group B than in group C

表 4 三组各时间点脊髓组织神经凋亡指数

($\bar{x} \pm s, n=8, \%$)

Table 4 Apoptotic index in 3 groups at each time-point

	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C
6h	3.33±1.39	19.49±3.87 ^{①②}	8.66±1.55 ^①
12h	3.24±1.12	39.93±6.43 ^{①②}	13.73±4.74 ^①
24h	2.88±1.11	53.62±8.55 ^{①②}	26.82±6.30 ^①
48h	2.73±1.21	39.32±7.06 ^{①②}	12.65±3.53 ^①
72h	2.92±1.11	22.16±7.58 ^{①②}	7.63±2.54 ^①

注:①与 A 组比较 $P<0.05$;②与 C 组比较 $P<0.05$ Note: ①VS group A, $P<0.05$;②VS group C, $P<0.05$

作为抗原,可以与 T 淋巴细胞表面受体结合活化 T 淋巴细胞,活化后 T 淋巴细胞表面表达大量的黏附因子,易与血管内皮细胞相接触,从而穿过血管内皮进入中枢神经系统。损伤区早期浸润的中性粒细胞可释放趋化因子促进 T 细胞向损伤区聚集。活化的 T 淋巴细胞可以产生谷氨酸、氧自由基等毒性物质,还可以促进巨噬细胞和小胶质细胞分泌肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素-1、白细胞介素-6 等细胞因子,而这些细胞因子可诱导其他趋化因子、TNF、NO、氧自由基等的生成,进而诱发细胞凋亡和坏死,加重脊髓损伤^[17-23]。可见,T 淋巴细胞与脊髓损伤之间关系密切,如果减少 T 淋巴细胞的数量,可能会减少引起脊髓损伤的毒性物质的释放,减轻脊髓损伤。FTY720 可通过抑制淋巴细胞从次级淋巴组织中游出和在胸腺积极竞争 S1P 受体,使外周循环的淋巴细胞进入淋巴结,并通过多种途径诱导淋巴细胞发生细胞凋亡,从而减少外周血淋巴细胞,发挥免疫抑制功能^[24-27]。本研究结果显示,造模后 1d,B、C 组大鼠 BBB 评分、斜板试验结果均明显低于对照组,B、C 组间差异无显著性,伤后 3d~21d,C 组大鼠的 BBB 评分、斜板试验结果均优于 B 组($P<0.05$),可见 FTY720 可以明显促进大鼠急性脊髓损伤后神经功能的恢复。

HE 染色结果显示,伤后 12h,FTY720 治疗组的淋巴细胞计数显著低于对照组,说明 FTY720 可以显著减少大鼠急性脊髓损伤后淋巴细胞的浸润。伤后 12h、72h,FTY720 治疗组炎细胞计数均显著低于对照组,说明 FTY720 可以减少大鼠急性脊髓损伤后 12h 以中性粒细胞为主的炎细胞浸润,减少大鼠急性脊髓损伤后 72h 的小胶质/单核

细胞浸润。伤后 7d,FTY720 治疗组胶质瘢痕区细胞计数显著低于对照组,说明 FTY720 可以减轻大鼠急性脊髓损伤后胶质瘢痕的形成。伤后 21d,FTY720 治疗组的空洞面积比值显著低于对照组,说明 FTY720 可以减小大鼠急性脊髓损伤后脊髓空洞的形成。

免疫组化染色结果显示,B 组细胞凋亡在损伤后 6h 出现,到伤后 24h 达高峰,伤后 48h 开始减弱,伤后 72h 进一步减弱,但仍维持较高水平。C 组在细胞凋亡表达的周期上与损伤组相同,但在 6h~48h 细胞凋亡表达阳性的细胞数却显著低于 B 组,并且在 72h 细胞凋亡阳性细胞的表达已接近假手术组。说明 FTY720 可以显著抑制大鼠急性脊髓损伤后的细胞凋亡。

B 组大鼠急性脊髓损伤后 6h 出现 caspase-3 表达,12h 明显升高,24h 达高峰,伤后 48h 开始减弱,伤后 72h 进一步减弱。caspase-3 表达周期与细胞凋亡的表达周期吻合。C 组 caspase-3 表达同样在伤后 6h 出现,12h 达高峰,持续到 24h,伤后 48h 减弱,伤后 72h 接近正常水平;各时间点 caspase-3 表达阳性细胞明显低于对照组。说明 FTY720 可以明显减少大鼠急性脊髓损伤后 caspase-3 的表达,FTY720 可能是通过抑制大鼠急性脊髓损伤后 caspase-3 的表达来减轻神经细胞凋亡的。

总之,FTY720 可以明显促进大鼠急性脊髓损伤后神经功能的恢复,其机制可能是通过减少外周血淋巴细胞的数量,减少损伤早期脊髓组织中淋巴细胞(包括 T 淋巴细胞)的浸润,从而减少相关细胞因子及毒性物质的释放,抑制单核巨噬细胞的浸润,进而抑制 caspase-3 表达和细胞凋亡,减少胶质瘢痕和脊髓空洞的形成,达到减轻脊髓继发性损伤、保护脊髓目的。

4 参考文献

1. Flugel A, Bercowicz T, Ritter T, et al. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Immunity*, 2001, 14(5): 547-560.
2. Merkler D, Metz GA, Raineteau O, et al. Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(10): 3665-3673.
3. Hauben E, Agranov E, Gothilf A, et al. Posttraumatic therapeutic vaccination with modified myelin self-antigen prevents

- complete paralysis while avoiding autoimmune disease [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(4): 591–599.
4. 廖维宏, 张光铂. 进一步加强脊髓损伤修复研究[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2003, 13(9): 517–519.
5. Rabchevsky AG, Smith GM. Therapeutic interventions following mammalian spinal cord injury[J]. *Arch Neurol*, 2001, 58(5): 721–726.
6. Lambrecht D, Carmeliet P. VEGF at the neurovascular interface: therapeutic implications for motor neuron disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1762(11–12): 1109–1112.
7. Lopez-Vales R, Garcia-Alias G, Fores J, et al. FK506 reduces tissue damage and prevents functional deficit after spinal cord injury in the rat[J]. *J Neurosci Res*, 2005, 81(6): 827–836.
8. Ibarra A, Correa D, Willms K, et al. Effect of cyclosporine A on immune response tissue protection and motor function of rats subjected to spinal cord injury[J]. *Brain Res*, 2003, 979(1–2): 165–178.
9. Fujita T, Inoue K, Yamamoto S, et al. Fungal metabolites: a potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite[J]. *Antibiot*, 1994, 47(2): 208–215.
10. Budde K, Schumouder RI, Brunkhorst R, et al. First human trial of FTY720, a novel immunomodulator, in stable renal transplant patients[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(4): 1073–1083.
11. Kappos L, Antel J, Comi G, et al. Oral fingolimod (FTY720): for relapsing multiple sclerosis[J]. *N Engl J Med* 2006, 355(11): 1124–1140.
12. Zhang Z, Zhang Z, Fauser U, et al. FTY720 attenuates accumulation of EMAP-II and MHC-II + monocytes in early lesions of rat traumatic brain injury [J]. *J Cell Mol Med*, 2007, 11(2): 307–314.
13. Zhang Z, Fauser U, Schluesener HJ. Early attenuation of lesional interleukin-16 up-regulation by dexamethasone and FTY720 in experimental traumatic brain injury[J]. *Neuropath Appl Neurobiol*, 2008, 34(3): 330–339.
14. 孙思鑫, 曹晓健, 汪雷, 等. FTY720 与他克莫司对脊髓损伤有显著疗效[J]. *南京医科大学学报*, 2008, 28(1): 20–23.
15. Jones TB, Basso DM, Sodhi A, et al. Pathological CNS autoimmune disease triggered by traumatic spinal cord injury: implications for autoimmune vaccine therapy [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(7): 2690–2700.
16. Jones TB, Hart RP, Phillip G, et al. Molecular control of physiological and pathological T-cell recruitment after mouse spinal cord injury[J]. *Neurosci*, 2005, 25(28): 6576–6583.
17. Yanase M, Sakou T, Fukuda T. Role of N-methyl-D-aspartate receptor in acute spinal cord injury [J]. *J Neurosurg*, 1995, 83(5): 884–888.
18. Agrawal SK, Fehlings MG. Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro role of Na⁺, Na⁺-K⁺-ATPase, the Na⁺-H⁺ exchanger, and the 16 Na⁺-Ca²⁺ exchanger [J]. *J Neurosci*, 1996, 16(2): 545–552.
19. Happel RD, Smith KP, Banik NL, et al. Ca²⁺ accumulation in experimental spinal cord trauma[J]. *Brain Res*, 1981, 211(2): 476–479.
20. Nesic O, Xu GY, McAdoo D, et al. IL-1 receptor antagonist presents apoptosis and caspase-3 activation after spinal cord injury [J]. *J Neurotrauma*, 2001, 18(9): 947–956.
21. Yune T, Chang M J, Kim S J, et al. Increased production of tumor necrosis factor- α induces apoptosis after traumatic spinal cord injury[J]. *Neurotrauma*, 2003, 20(2): 207–219.
22. Zurita M, Vaquero J, Zurita I. Presence and significance of CD95(Fas/AP01): expression after spinal cord injury [J]. *J Neurosurg*, 2001, 94(2): 257–264.
23. Yang L, Blumbergs PC, Jones NR, et al. Early expression and cellular localization of proinflammatory cytokines interleukin-1[β], interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in human traumatic spinal cord injury[J]. *Spine*, 2004, 29(9): 966–971.
24. Chiba K, Matsuyuki H, Maeda Y, et al. Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus [J]. *Cell Mol Immunol*, 2006, 3(1): 11–19.
25. Suzuki S, Li XK, Shinomiya T, et al. The in vivo induction of lymphocyte apoptosis in MRL-lpr/lpr mice treated with FTY720[J]. *Clin Exp Immunol*, 1997, 107(1): 103–111.
26. Suzuki S, Li XK, Enosawa S, et al. A new immunosuppressant, FTY720, induces bcl-2-associated apoptotic cell death in human lymphocytes[J]. *Immunology*, 1996, 89(4): 518–523.
27. Shinomiya T, Li XK, Amemiya H, et al. An immunosuppressive agent, FTY720, increases intracellular concentration of calcium and induces apoptosis in HL-60[J]. *Immunology*, 1997, 91(4): 594–600.

(收稿日期:2011-09-05 修回日期:2011-12-12)

(英文编审 孙浩林/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)