

抑制 TNFR/RIPK 信号通路对大鼠急性脊髓损伤后神经功能的影响

王 双, 林 斌, 陈志达, 史吉胜, 曾宇哲, 吴松松

(解放军第 175 医院骨科医院脊柱外科 363000 福建省漳州市)

【摘要】目的:探讨应用坏死性凋亡抑制剂 Necrostatin-1(Nec-1)抑制 TNFR/RIPK 介导的坏死性凋亡信号通路对大鼠急性脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的作用。**方法:**72 只雄性 SPF 级 SD 大鼠, 体重 0.25~0.30kg, 随机分为 4 组: 假手术组(Sham 组, A 组)、假手术+Necrostatin-1 组(Sham+Nec-1 组, B 组)、SCI+二甲基亚砜(DMSO)(DMSO 组, C 组)、SCI+Nec-1 组(Nec-1 组, D 组)。C、D 组采用钳夹法制作大鼠急性 SCI 模型。所有大鼠硬膜下置管, A 组不给药, B 组和 D 组造模后 30min 经导管注射 1 μ l Nec-1(25 μ g/ μ l), C 组注射等量 DMSO, 1 次/d, 至取材时间点。各组分别于造模后 12h、24h 和 3d 三个时间点每组取 6 只大鼠, 先行 Basso/Beattie/Bresnahan(BBB)评分, 再处死动物取脊髓组织。12h 时间点动物处死前 1h 腹腔注射碘化丙啶(propidine iodide, PI)1mg/kg, 取材检测脊髓组织 PI 红染细胞数; 24h 时取材采用苏木素-伊红(HE)染色观察脊髓损伤情况、尼氏(Nissl)染色观察神经元存活数目、Western Blot(WB)检测 Bcl-2、坏死性凋亡蛋白 RIPK1 及 RIPK3 的表达水平; 3d 时取材行 Tunel 染色观察细胞凋亡情况。**结果:**造模后 A 组和 B 组各时间点的 BBB 评分均正常, C、D 组各时间点均显著性低于 A、B 组, D 组各时间点的 BBB 评分均显著高于同时间点 C 组($P<0.05$)。造模后 12h, D 组 PI 红染细胞较 C 组明显减少, 神经元崩解减轻($P<0.05$)。造模后 24h, A 组和 B 组脊髓组织 HE 和 Nissl 染色正常, D 组脊髓组织损伤程度和存活神经元数量均优于 C 组, 差异有统计学意义($P<0.05$); A 组和 B 组 Bcl-2、RIPK1 及 RIPK3 均低水平表达, C 组 RIPK1 及 RIPK3 表达显著性升高, D 组 Bcl-2 表达较 C 组上调, RIPK1 及 RIPK3 表达显著性下降, C、D 两组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。造模后 3d, A 组和 B 组可见少量凋亡小体, C 组和 D 组明显增多, 但 D 组凋亡小体数量较 C 组明显减少($P<0.05$)。**结论:**抑制 TNFR/RIPK 信号通路可以减轻大鼠急性 SCI 后的病理变化, 改善行为学评分, 促进脊髓神经功能恢复。

【关键词】 脊髓损伤; RIPK1; RIPK3; Bcl-2; 坏死性凋亡; 功能恢复

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2017.04.10

中图分类号: R683.2, Q426 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2017)-04-0353-08

Inhibition of TNFR/RIPK signaling pathway mitigate acute spinal cord injury in rats/WANG Shuang, LIN Bin, CHEN Zhida, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2017, 27(4): 353-360

【Abstract】 Objectives: To investigate the protective effect of inhibition of TNFR/RIPK signaling pathway by Necrostatin-1 after spinal cord injury(SCI), and to provide new reference for the treatment of SCI. **Methods:** 72 SPF level male S-D rats weighing 0.25-0.30kg were randomized equally into four groups: sham group (group A), sham+Nec-1 group(group B), DMSO group(group C), Nec-1 group(group D). Spinal cord clamp compression method was used to make rat acute spinal cord injury model in group C and D. After subdural catheterization, group A had no treatment, group B and D were injected with 1 μ l Nec-1(25 μ g/ μ l) by using a micro-syringe at 30 minutes after SCI, group C was injected with the same amount of DMSO solution, once a day until the time point of collection tissue. Each group was divided into three subgroups: 12h, 24h and 3d after SCI, and each subgroup included six rats. Rats conducted BBB score in each group to evaluate functional recovery. Six rats were intraperitoneally injected with propidine iodide (PI) 1h before sacrificed to detection PI positive cells at 12h in each group. Six rats were sacrificed in each group at 24h after modeling, then the removed spinal cords were taken HE staining to detect the nerve tissue pathological

第一作者简介: 男(1990-), 医师, 研究生, 研究方向: 脊髓损伤

电话: (0596)2972856 E-mail: wangshuang19900905@163.com

通讯作者: 林斌 E-mail: linbin813@163.com

changes, Nissl staining to observe survivor number of nerve cells, western blot to detect Bcl-2, RIPK1 and RIPK3 protein expression level. And six rats were sacrificed at 3d in each group after modeling to take Tunel staining for the detection of apoptosis of nerve tissue. **Results:** After modeling, BBB scores were normal in group A and B, but in group C and D were significantly higher than those in group A and B. And the scores in group D were higher than those in group C in each time point ($P<0.05$). HE and Nissl staining showed nerve cells with normal morphology in group A and B at 24h after operation. The degree of SCI and the number of neuronal survival in group D were better than those in group C, the difference was statistically significant at 24h ($P<0.05$). The expression levels of Bcl-2, RIPK1 and RIPK3 protein were stable low in group A and B, and RIPK1 and RIPK3 expression upregulated in group C, in group D the expression level of Bcl-2 upregulated, but RIPK1 and RIPK3 expression downregulated, the difference was statistically significant ($P<0.05$). 3d after SCI, there were seldom apoptotic bodies in group A and B, but the numbers of apoptotic body in group C and D was significantly higher than those in group A and B. And the number in group D was lower than that in group C ($P<0.05$). **Conclusions:** Inhibition of TNFR/RIPK signal pathway after rats SCI could reduce the pathological changes of spinal cord, increase the number of surviving neurons, promote nerve functional recovery and improve BBB scores.

[Key words] Spinal cord injury; RIPK1; RIPK3; Bcl-2; Necroptosis; Functional recovery

[Author's address] Department of Spinal Surgery, Hospital of Orthopaedics, the 175th Hospital of PLA, Zhangzhou, 363000, China

坏死性凋亡(necroptosis)是 Degterev 等^[1]首次提出并命名的一种全新的细胞死亡方式。研究显示坏死性凋亡涉及多条可能的信号通路,其中 TNFR/RIPK (tumour necrosis factor receptor /receptor interacting protein kinase)介导的相关信号通路在坏死性凋亡研究中最为广泛^[1-4]。坏死性凋亡抑制剂 Necrostatin-1 (Nec-1)是一种坏死性凋亡的小分子抑制剂,能够通过阻断 RIPK 的信号传导通路,阻止坏死性凋亡的进程发生^[4,5]。有研究发现,Nec-1 在中风、震颤麻痹、阿尔茨海默及神经系统退行性变中有重要的作用^[6,7]。Wang 等^[8]在大鼠脊髓损伤(SCI)的模型研究中发现,使用 Nec-1 能够增强神经细胞的保护作用;近期研究还发现 Nec-1 可减轻 SCI 后线粒体功能障碍,减轻线粒体肿胀^[9]。但目前对细胞坏死性凋亡在 SCI 中的确切作用机制尚不完善,抑制神经细胞坏死性凋亡的信号通路是否能够促进急性 SCI 后的神经功能恢复研究尚少。本研究通过制作大鼠急性 SCI 模型,利用 RIPK1 特异性抑制剂 Nec-1 进行干预,观察大鼠 SCI 后神经功能和病理学变化、相关凋亡蛋白的表达等,探索抑制 TNFR/RIPK 信号通路对急性 SCI 的治疗价值。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

选用雄性 SPF 级 SD 大鼠 72 只,体重 0.25~

0.30kg,购自厦门大学实验动物中心[许可证号 SCXK(闽)2013-0001]。按随机数字表法随机分为假手术组(Sham 组,A 组)、假手术+Nec-1 组(Sham+Nec-1 组,B 组)、SCI+二甲基亚砷(DMSO)(DMSO 组,C 组)、SCI+Nec-1(Nec-1 组,D 组),每组 18 只。每组分为造模后 12h、24h 和 3d 三个时间点,每个时间点 6 只。

1.2 动物模型制作

使用无水乙醚吸入麻醉大鼠。常规消毒、铺巾后暴露手术视野,造模过程严格无菌操作,体表定位大鼠背部最高处即为 T10 棘突,取背部正中约 3cm 长切口,依次切开皮肤、皮下,显露棘突后钝性剥离双侧椎旁肌并向脊柱两侧牵开,充分显露并咬除 T9~T11 棘突和椎板,以 T10 为中心,显露 5mm 长脊髓。C、D 组大鼠使用动脉夹钳夹 T10 节段脊髓 1min,大鼠尾巴出现痉挛性摆动,双下肢呈迟缓性瘫痪并出现回缩样扑动即表明造模成功。A、B 组大鼠不损伤脊髓。造模成功后所有大鼠采用改良 Yaksh 法插管:用显微镊提起 T11 处硬脊膜,用微量注射器针头在 T11 硬脊膜表面刺一小口,于此口内向 T10 方向于蛛网膜下腔插入 PE-0402 导管,深度约 3mm,固定导管,然后缝合切口,并立即使用生理盐水 5ml 腹腔注射以补充丢失体液,术后 24h 内给予保暖,避免术后死亡。术后按摩膀胱排尿 2 次/d,术后 3d 内肌肉注射青霉素 1 万单位。A 组不给药;B 组造模后 30min 导

管内注射 1 μ l Nec-1 (25 μ g/ μ l), 1 次/d, 至取材时; C 组相同时间点向导管内注射 1 μ l DMSO, 1 次/d, 至取材时; D 组同 B 组。于造模后相应时间点每组取 6 只大鼠, 先行 BBB 评分, 再处死动物。

1.3 BBB 评分

每组于造模后 12h、24h 和 3d 每个时间点取 6 只动物行 BBB 评分。

1.4 碘化丙啶(PI)染色

将 PI 用 0.9% NaCl 配成浓度为 0.5mg/ml 的溶液, 每组取 6 只大鼠于造模后 11h 按 1mg/kg 剂量腹腔注射, 12h 时处死大鼠, 以 T10 为中心取 1.5cm 脊髓组织, 液氮中 -80 $^{\circ}$ C 保存。每只大鼠切片中随机抽取 3 张在室温下用 100% 乙醇固定 10min; 将载玻片用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次, 沥干后加入 PI 工作液, 室温孵育 15min; PBS 冲洗 3 次后封片, 荧光显微镜 (Olympus fv1000, 日本) 观察, 拍照, 计数 PI 红染细胞, 3 次取平均值。

1.5 HE 染色

造模后 24h 各组取 6 只大鼠处死, 以 T10 节段为中心取出 1.5cm 脊髓, 一半置于 4% 多聚甲醛溶液中冰上保存, 24h 后行石蜡包埋, 切片; 一半行留作 Western blot 检测。随机抽取 3 张切片, 脱蜡、乙醇脱苯, 苏木精溶液染色 5~10min, 流水洗 1~3s 去除苏木精溶液, 1% 盐酸乙醇分化 1~3s, 蒸馏水洗 10~30s, 伊红染色 3~6min, 光镜下观察脊髓组织的形态学变化。由 2 位不知分组情况的实验人员用图像分析软件定量分析脊髓损伤面积。

1.6 Nissl 染色

从上述石蜡切片中随机抽取 3 张, 脱蜡、乙醇脱苯, 用尼氏 (Nissl) 染色液 37 $^{\circ}$ C 染色 3~10min, 蒸馏水洗 2 次, 脱水, 透明, 封片, 在光镜下观察、拍照, 定量分析存活神经元数量, 3 次取均值。

1.7 细胞凋亡检测

造模术后 3d 各组处死 6 只大鼠, 以 T10 为中心取 1.5cm 长脊髓组织, 石蜡包埋切片, 随机抽取 3 张, 二甲苯脱蜡 5~10min, 重复 1 次; 无水乙醇 5min, 90% 乙醇 2min, 70% 乙醇 2min, 蒸馏水 2min。滴加 20 μ g/ml 不含 DNase 的蛋白酶 K, 20 $^{\circ}$ C ~37 $^{\circ}$ C 作用 15~30min, PBS 洗涤 3 次。制备 Tunel 反应混合液。加 50 μ l Tunel 反应混合液 (阴性对照组仅加 50 μ l 荧光素标记的 dUTP 液) 于标本上, 加盖玻片在暗湿盒中反应 37 $^{\circ}$ C $\times$ 60min。PBS 漂洗 3 次; 加 50 μ l DAB 底物, 15 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 下反应

10min; PBS 漂洗 3 次; 脱水、封片、拍照, 计数 Tunel 阳性细胞, 3 次取均值。

1.8 Western blot 检测

总蛋白提取: 取造模后 24h 取出的脊髓组织置于 EP 管中称重, 按照每 100mg 组织加入 1ml RIPA 蛋白裂解液、10 μ l 丝氨酸蛋白酶及巯基蛋白酶抑制剂 (PMSF) 在冰浴条件下充分研磨, 使组织彻底匀浆化。冰浴 30min, 4 $^{\circ}$ C, 12000 转/min 离心 20min。小心吸取上清, 分装于 EP 管中, BCA 法检测蛋白浓度。每个凝胶孔中加入 20 μ g 蛋白样品, 电泳完成后蛋白再转印到聚偏二氟乙烯膜 (PVDF); 5% 脱脂奶粉室温下封闭非特异性抗原 1h; 加入 1:500 稀释的 RIP1 (abcam, UK)、RIP3 (abcam, UK) 和 Bcl-2 (abcam, UK) 单克隆抗体, 1:5000 的 β -actin (abcam, UK) 单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 用 TBS-T 洗膜 3 次; 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:5000 稀释), 37 $^{\circ}$ C 摇床 1h; TBS-T 洗膜 3 次, 洗膜后 DAB 显色; 条带结果进行光密度值分析, 目的蛋白与 β -actin (43KD) 比值作为目的蛋白表达水平的参数, 对产物相对定量分析, 3 次取均值。

1.9 统计学处理

应用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。各实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 的形式表示。数据符合正态分布及方差齐性, 组间比较用 *t* 检验, $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 大鼠行为学评分

见表 1。A 组和 B 组各时间点的 BBB 评分均正常, C 组和 D 组均显著性低于 A 组和 B 组。造模 12h, D 组大鼠后肢运动功能略有恢复 (0.33 $\pm$ 0.52 分), 而 C 组无显明恢复 (0 分)。造模后 24h 时, C 组大鼠运动功能开始恢复 (0.21 $\pm$ 0.15 分), D 组进一步恢复 (0.58 $\pm$ 0.36 分), 两组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。术后 3d, C 组大鼠 BBB 评分为 1.83 $\pm$ 0.75 分, D 组为 3.17 $\pm$ 1.17 分, 两组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.2 HE 染色

造模后 24h, A 组和 B 组脊髓组织结构完整, 神经细胞形态正常, 分布均匀, 神经纤维排列规整, 细胞基质较均匀; C 组损伤区域脊髓组织坏死, 有炎性细胞浸润; D 组炎性细胞浸润较 C 组

少,组织结构较完整,空洞相对减少(图 1)。D 组坏死区域面积为 $0.83 \pm 0.11 \text{mm}^2$,C 组为 $1.10 \pm 0.24 \text{mm}^2$,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 Nissl 染色

造模后 24h,A 组和 B 组尼氏体数量较多,排列整齐、均匀紧密、染色较深,神经细胞发生坏死性凋亡程度较轻。C 组和 D 组尼氏体分解成细颗粒状,尼氏体着色的神经元数量减少,染色较浅

表 1 四组大鼠造模后不同时间点的 BBB 评分 (n=6, $\bar{x} \pm s$)
Table 1 BBB score at 24h, 3d and 7d after modeling

	A组 (Group A)	B组 (Group B)	C组 (Group C)	D组 (Group D)	P值 (P value)
12h	20.11±0.51	20.06±0.41	0±0 ^①	0.33±0.52 ^{①②}	<0.001
24h	19.88±1.02	20.14±0.49	0.21±0.15 ^①	0.58±0.36 ^{①②}	0.043
3d	19.93±0.99	19.96±0.75	1.83±0.75 ^①	3.17±1.17 ^{①②}	0.003

注:①与同时时间点 A、B 组比较 $P < 0.05$,②与同时时间点 C 组比较比较 $P < 0.05$
Note: ①Compared with group A and B at the same time, $P < 0.05$; ②Compared with group C at the same time, $P < 0.05$

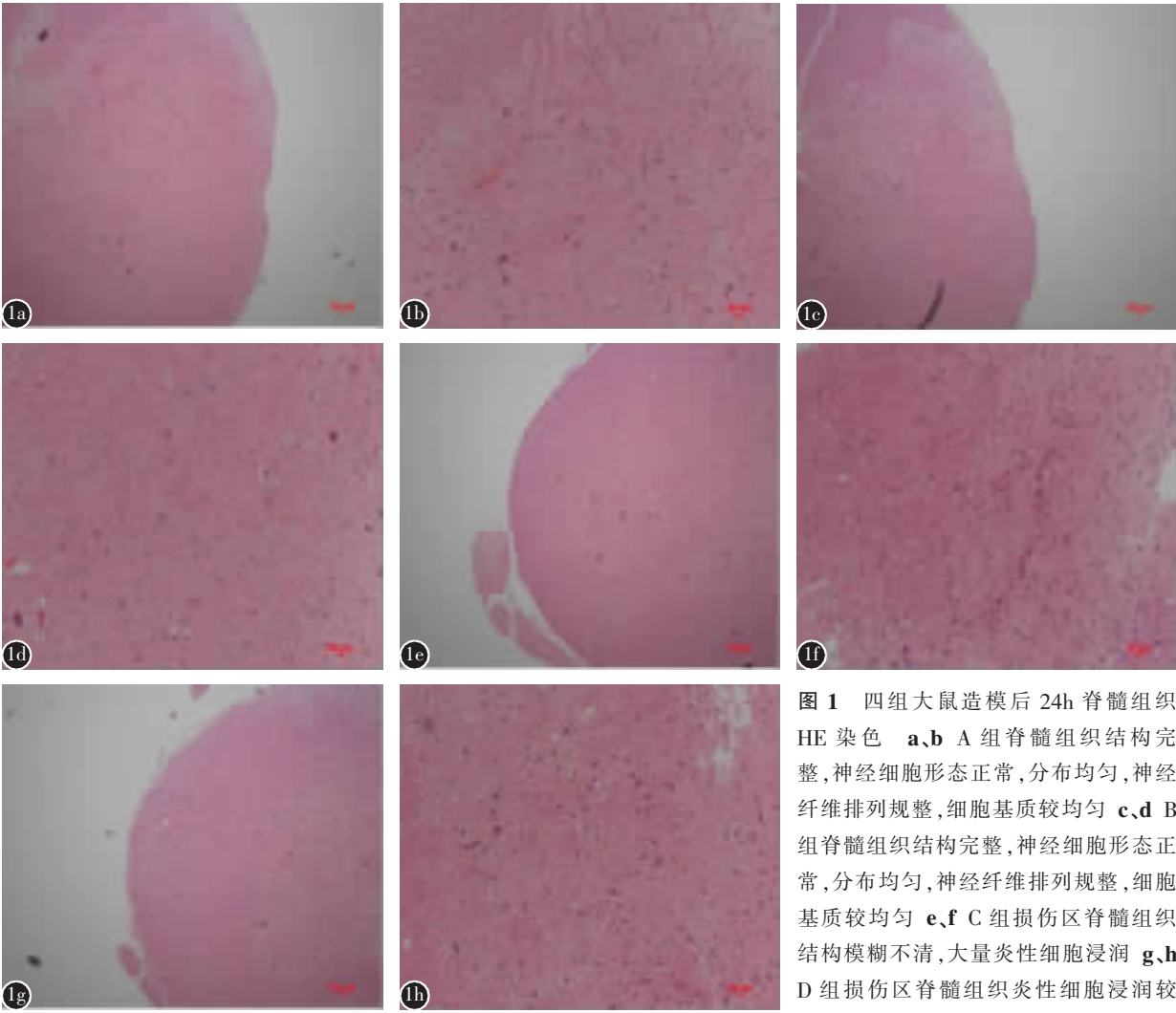


图 1 四组大鼠造模后 24h 脊髓组织 HE 染色 a、b A 组脊髓组织结构完整,神经细胞形态正常,分布均匀,神经纤维排列规整,细胞基质较均匀 c、d B 组脊髓组织结构完整,神经细胞形态正常,分布均匀,神经纤维排列规整,细胞基质较均匀 e、f C 组损伤区脊髓组织结构模糊不清,大量炎性细胞浸润 g、h D 组损伤区脊髓组织炎性细胞浸润较少,组织较连续、结构较清晰

Figure 1 HE staining of spinal cord tissue at 24h after modeling a, b Group A HE staining showed spinal cord tissue structural integrity, nerve cells with normal morphology c, d Group B HE staining showed spinal cord tissue structural integrity, nerve cells with normal morphology e, f Group C HE staining showed amount of inflammatory cell infiltration, organizational structure serious injury and cavity g, h Group D HE staining showed less inflammatory cell infiltration and cavity

(图 2)。C 组存活神经元数量为 80.5 ± 7.2 个/视野 (20 倍光镜), D 组为 115.0 ± 10.8 个/视野 (20 倍光镜), 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 PI 染色

造模后 12h, A 组和 B 组脊髓组织中无明显 PI 红染细胞; C 组和 D 组脊髓损伤区结构破坏严重, 细胞崩解, PI 红染细胞明显增多 (图 3)。C 组 PI 红染细胞为 250.0 ± 16.2 个/视野 (20 倍光镜), D 组为 146.7 ± 8.8 个/视野 (20 倍光镜), 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.5 细胞凋亡检测结果

造模成后 3d, A 组和 B 组脊髓组织中可见少

量 TUNEL 阳性细胞即凋亡小体; C 组和 D 组凋亡小体数量明显增多 (图 4)。C 组凋亡小体为 173.0 ± 12.9 个/视野 (20 倍光镜), D 组为 124.0 ± 10.8 个/视野 (20 倍光镜), 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.6 相关凋亡蛋白表达情况

造模后 24h, 四组大鼠脊髓组织中的 Bcl-2、RIPK1 和 RIPK3 的表达量见表 2。A 组和 B 组低水平表达, 两组表达无统计学差异; C 组 Bcl-2 表达降低, RIPK1 和 RIPK3 表达升高; D 组 Bcl-2 表达较 C 组显著性上调, RIPK1 和 RIPK3 表达显著性下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

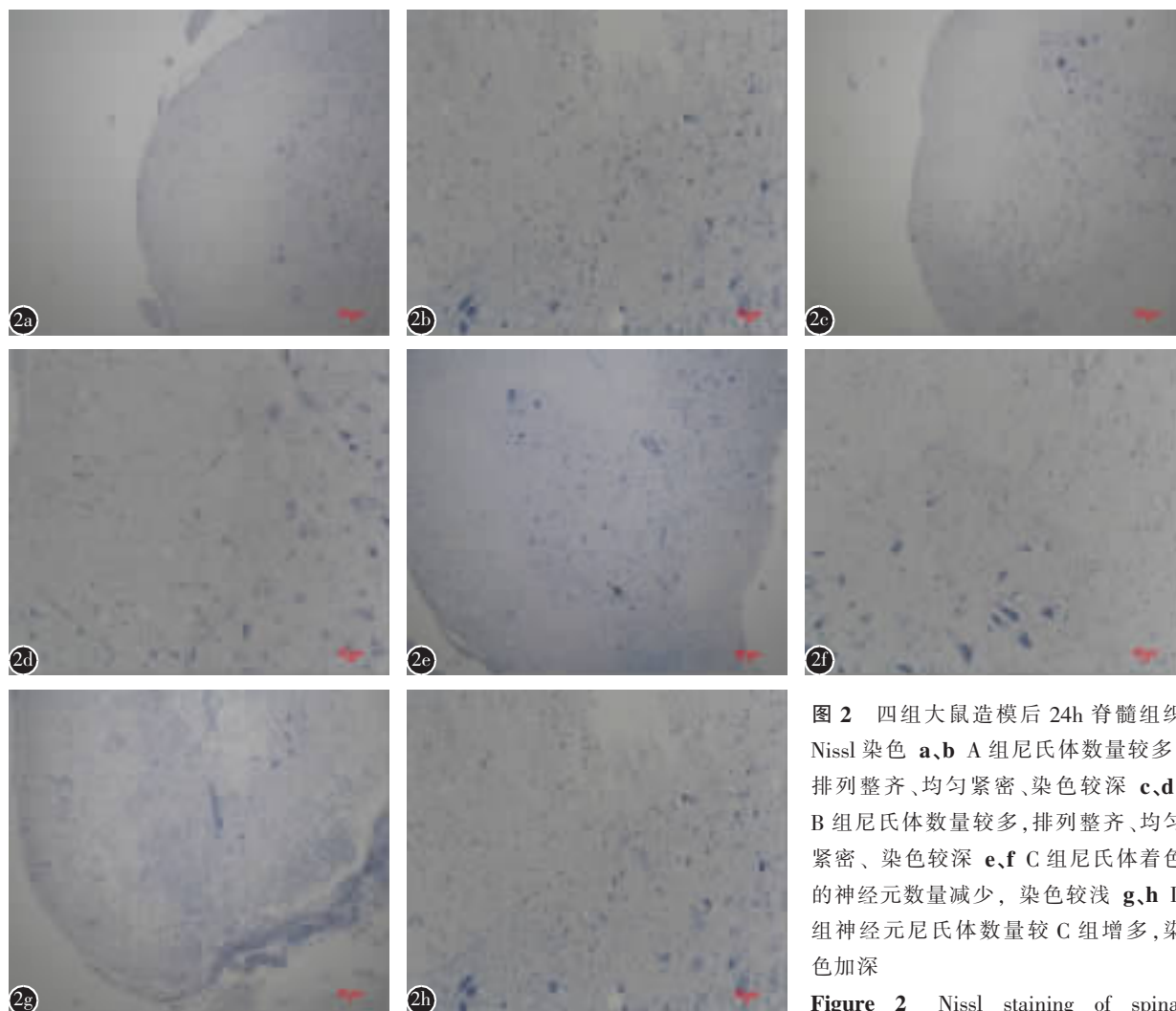


图 2 四组大鼠造模后 24h 脊髓组织 Nissl 染色 a、b A 组尼氏体数量较多, 排列整齐、均匀紧密、染色较深 c、d B 组尼氏体数量较多, 排列整齐、均匀紧密、染色较深 e、f C 组尼氏体着色的神经元数量减少, 染色较浅 g、h D 组神经元尼氏体数量较 C 组增多, 染色加深

Figure 2 Nissl staining of spinal cord tissue at 24h after modeling a, b

Group A Nissl staining showed larger number Nissl's body, orderly rows, uniformly and intimately and deeply stained c, d Group B Nissl staining showed larger number Nissl's body, orderly rows, uniformly and intimately and deeply stained e, f Group C Nissl staining showed the Nissl's body decomposed to fine particulate, Nissl staining positive cell decreased g, h Group D Nissl staining showed a large number of positive cell and the Nissl's body deeply stained



图 3 4 组大鼠造模后 24h PI 染色 a、b A 组和 B 组无明显 PI 红染细胞 c C 组损伤区结构破坏严重, 细胞崩解, PI 红染细胞明显增多 d D 组 PI 红染细胞较 C 组明显减轻, 神经元崩解减轻

Figure 3 PI staining of spinal cord tissue at 24h after modeling a, b Group A and group B had almost none PI positive cell c In group C, cell disintegration, PI positive cells increased significantly d In group D, PI positive cells is less than group C and neurons disintegration mitigation compared with group C

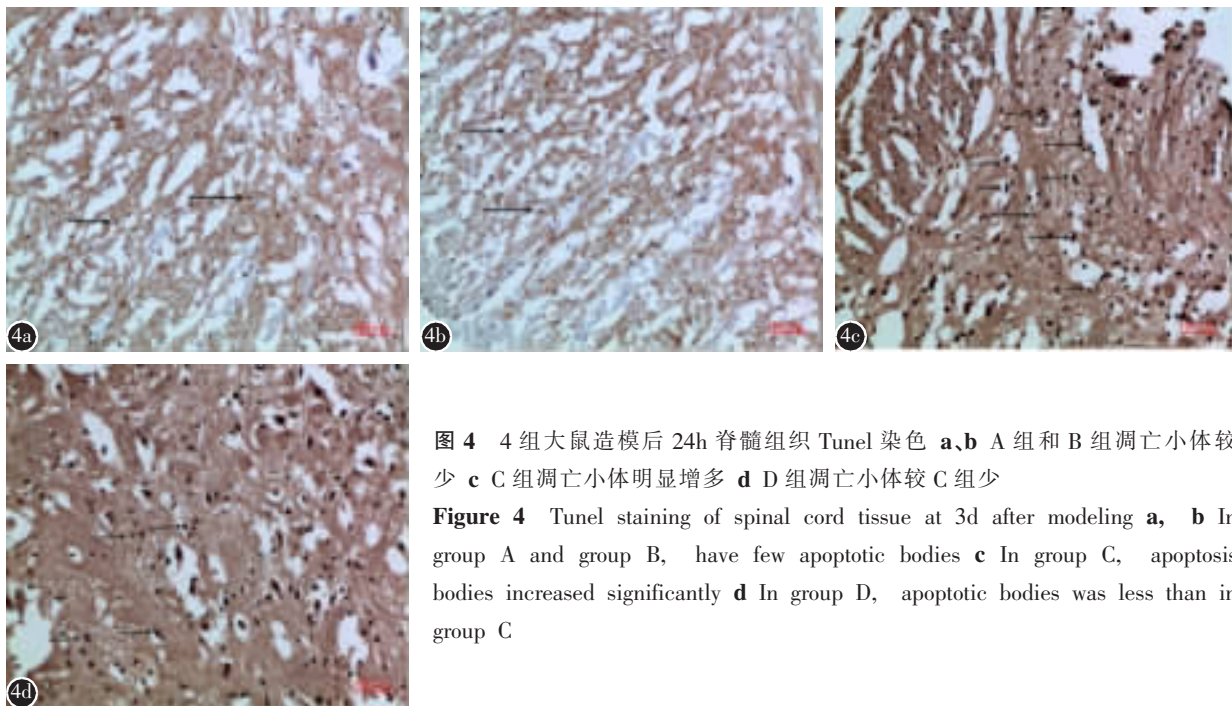


图 4 4 组大鼠造模后 24h 脊髓组织 Tunel 染色 a、b A 组和 B 组凋亡小体较少 c C 组凋亡小体明显增多 d D 组凋亡小体较 C 组少

Figure 4 Tunel staining of spinal cord tissue at 24h after modeling a, b In group A and group B, have few apoptotic bodies c In group C, apoptosis bodies increased significantly d In group D, apoptotic bodies was less than in group C

表 2 四组大鼠造模后 24h 脊髓组织中 RIPK1、RIPK3 及 Bcl-2 蛋白相对表达水平 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Western blot analysis after SCI 24h in four groups

	A组 (Group A)	B组 (Group B)	C组 (Group C)	D组 (Group D)	P值 (P value)
RIPK1/ β -actin	0.27 $\pm$ 0.053	0.38 $\pm$ 0.092	0.85 $\pm$ 0.11 ^①	0.45 $\pm$ 0.056 ^②	0.0050
RIPK3/ β -actin	0.42 $\pm$ 0.041	0.41 $\pm$ 0.048	1.01 $\pm$ 0.067 ^①	0.27 $\pm$ 0.032 ^②	<0.0001
Bcl-2/ β -actin	0.38 $\pm$ 0.053	0.51 $\pm$ 0.063	0.54 $\pm$ 0.065 ^①	1.05 $\pm$ 0.102 ^②	0.0019

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

Note: ①Compared with group A and B, $P<0.05$; ②Compared with group C, $P<0.05$

3 讨论

急性 SCI 是一种严重的中枢神经系统创伤,其可导致损伤平面以下运动和感觉丧失,是严重危害人类健康的疾病。随着社会的发展,急性 SCI 病例日益增多。

急性 SCI 的病理生理过程包括两个阶段:原发性损伤和继发性损伤,前者不可逆,其特点是在损伤区域的中心发生出血和细胞坏死;后者包括细胞兴奋性毒性、氧化应激反应、局部缺血反应、炎症反应、体内离子平衡失调,所有这些最终导致神经细胞和周围支持细胞的死亡^[10]。目前已经证实在 SCI 后主要发生三种形式的细胞死亡:坏死、凋亡和坏死性凋亡^[11-14]。抑制缺血再灌注区域神经元死亡成为急性 SCI 后治疗的热点。既往有研究^[15]表明,在脊髓缺血再灌注损伤模型当中,坏死性凋亡是非常有意义的细胞死亡模式。坏死性凋亡是由死亡受体配体介导的,在泛 caspase 抑制剂(z-vad-fmk)存在的条件下仍可触发的坏死性细胞死亡途径^[1,16]。但关于 SCI 后坏死性凋亡及其信号通路的研究较少且不完善。在本研究中,我们通过抑制 TNFR/RIPK 信号通路来研究调控坏死性凋亡对大鼠急性 SCI 后的保护作用。

在 SCI 早期,神经细胞膜的完整性破坏涉及坏死性凋亡的相关机制。坏死性凋亡具有坏死的一些形态学特征,其质膜完整性破坏,但它不同于坏死,前者是由受体信号触发而不是非特异性的细胞损伤。尽管同一死亡受体激动剂可以触发坏死性凋亡和传统凋亡,但是二者可以从形态学和功能学角度加以区分。质膜完整性破坏或细胞膜通透性改变是坏死及坏死性凋亡的重要特征。本研究中,PI 染色结果示 Nec-1 可减少质膜完整性破坏的细胞数量(PI 染色阳性的数量),与 DMSO 组比较,Nec-1 组大鼠 SCI 病灶周围可以观察到更多的存活神经元,可以减轻急性 SCI 后的坏死性凋亡。说明神经元和一部分其他细胞死亡可以被坏死性凋亡的小分子特异性抑制剂 Nec-1 所抑制。结果也与以往的研究结果一致^[17,18]。

HE 染色结果显示,Nec-1 对大鼠正常脊髓没有毒性作用,在损伤后应用 Nec-1 可以减轻炎症细胞浸润,增加损伤周围神经元存活数量,保持组织结构的完整性,且能减少坏死面积。同样,造模后 Nissl 染色结果显示,D 组损伤区域及周围神经元尼氏体数量较 C 组多。说明 Nec-1 组的神经元

存活数目比 C 组多,且 D 组损伤后存活神经元的功能及状态要好于 C 组。HE 和 Nissl 染色都说明 Nec-1 对于大鼠急性 SCI 早期有保护作用。在造模后 3d,TUNEL 染色发现 D 组的凋亡小体数量较 C 组明显减少,说明 Nec-1 具有减轻 SCI 后神经及胶质细胞凋亡的作用^[1,19]。Western blot 检测结果显示,D 组 Bcl-2 蛋白表达水平较 C 组升高,RIPK1 和 RIPK3 蛋白表达水平降低。Bcl-2 蛋白被定义为抗凋亡蛋白,而 RIPK1 和 RIPK3 蛋白是和坏死性凋亡相关的蛋白,说明 Nec-1 既可以减轻 SCI 后的坏死性凋亡,也可以减轻 SCI 后的凋亡。

BBB 评分是评价 SCI 后功能恢复的重要方法,并可作为一个重要参数评估 SCI 治疗效果^[20]。本研究结果显示,Nec-1 不会影响健康动物正常活动,各时间点 D 组 BBB 评分均明显高于 C 组。证实 Nec-1 可抑制 TNFR/RIPK 信号通路对 SCI 后的神经功能恢复和行为学评分有明显改善作用。

综上,SCI 后应用坏死性凋亡抑制剂 Nec-1 能有效减少大鼠 SCI 面积,减轻损伤区域炎症反应,保护损伤周围神经元,改善损伤区域神经元功能状态,促进受损伤神经元及胶质细胞存活,抑制凋亡及 TNFR/RIPK 信号通路介导的坏死性凋亡,改善大鼠 SCI 后 BBB 评分。但本研究只验证了 Nec-1 减轻 SCI 与 TNFR/RIPK 信号通路有关,未进一步寻找及验证其下游蛋白。对于其确切的分子生物学机制和是否还有其他通路参与 SCI 后坏死性凋亡的调控还需深入研究。

4 参考文献

1. Degterev A, Huang Z, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury[J]. Nat Chem Biol, 2005, 1(2): 112-119.
2. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(10): 700-714.
3. He S, Wang L, Miao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha [J]. Cell, 2009, 137(6): 1100-1111.
4. Cho YS, Challa S, Moquin D, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation[J]. Cell, 2009, 137(6): 1112-1123.
5. Degterev A, Hitomi J, Gernsheid M, et al. Identification of

- RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(5): 313-321.
6. Cho YS. Perspectives on the therapeutic modulation of an alternative cell death, programmed necrosis[J]. Int J Mol Med, 2014, 33(6): 1401-1406.
7. Xu X, Chua CC, Zhang M, et al. The role of PARP activation in glutamate-induced necroptosis in HT-22 cells [J]. Brain Res, 2010, 1343: 206-212.
8. Wang Y, Wang H, Tao Y, et al. Necroptosis inhibitor necrostatin-1 promotes cell protection and physiological function in traumatic spinal cord injury[J]. Neuroscience, 2014, 266: 91-101.
9. Wang Y, Wang J, Yang H, et al. Necrostatin-1 mitigates mitochondrial dysfunction post-spinal cord injury [J]. Neuroscience, 2015, 289: 224-232.
10. Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, et al. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury[J]. Spine J, 2004, 4(4): 451-464.
11. Park E, Velumian AA, Fehlings MG. The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration[J]. J Neurotrauma, 2004, 21(6): 754-774.
12. Li GL, Brodin G, Farooque M, et al. Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1996, 55(3): 280-289.
13. Zhang QL, Niu Q, Ji XL, et al. Is necroptosis a death pathway in aluminum-induced neuroblastoma cell demise [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2008, 21(4): 787-796.
14. Wang YQ, Wang L, Zhang MY, et al. Necrostatin-1 suppresses autophagy and apoptosis in mice traumatic brain injury model[J]. Neurochem Res, 2012, 37(9): 1849-1858.
15. Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, et al. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys[J]. Nature Med, 1997, 3(1): 73-76.
16. Dunai Z, Bauer PI, Mihalik R. Necroptosis: biochemical, physiological and pathological aspects[J]. Pathol Oncol Res, 2011, 17(4): 791-800.
17. Chang P, Dong WW, Zhang MY, et al. Anti-necroptosis chemical necrostatin-1 can also suppress apoptotic and autophagic pathway to exert neuroprotective effect in mice intracerebral hemorrhage model[J]. J Mol Neurosci, 2014, 52(2): 242-249.
18. You ZR, Savitz SI, Yang JS, et al. Necrostatin-1 reduces histopathology and improves functional outcome after controlled cortical impact in mice [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(9): 1564-1573.
19. Kanno H, Ozawa H, Tateda S, et al. Upregulation of the receptor-interacting protein 3 expression and involvement in neural tissue damage after spinal cord injury in mice[J]. BMC Neurosci, 2015, 16: 10.
20. Redondo-Castro E, Torres-Espin A, Garcia-Alias G, et al. Quantitative assessment of locomotion and interlimb coordination in rats after different spinal cord injuries[J]. J Neurosci Methods, 2013, 213(2): 165-178.
- (收稿日期:2016-2016-08-08 末次修回日期:2017-02-06)
(英文编审 唐翔宇/贾丹彤)
(本文编辑 卢庆霞)

消息

第十四届全国脊柱脊髓学术会议征文通知

由中国康复医学会脊柱脊髓专业委员会和《中国脊柱脊髓杂志》主办、南方医科大学第三附属医院承办的第十四届全国脊柱脊髓学术会议将于 2017 年 9 月 21~24 日在广州白云国际会议中心举行。

一、投稿内容与要求

1. 在国内外正式刊物上未发表过的有关脊柱退行性疾病、畸形、脊柱脊髓损伤、肿瘤、感染、护理的临床与基础研究论文,突出科学性、实用性。

2. 800 字以内的结构式摘要,按照目的、方法、结果、结论四部分撰写。

二、投稿方式及时间

请投稿至会议专用邮箱(cspine2017@163.com),邮件名称格式:作者姓名+作者单位+研究方向(退行性疾病、畸形、脊柱脊髓损伤、肿瘤、感染、护理);不接收纸质投稿。

征稿截止时间:2017 年 7 月 31 日。

欢迎广大同仁积极参与、踊跃投稿!