

马尾受压后腰骶部脊髓中 P75 神经营养因子受体的表达及其与神经元凋亡的关系

李浩鹏, 陈 杰, 贺西京, 徐思越, 刘 宇

(西安交通大学医学院第二附属医院骨二科 710004 陕西省西安市)

【摘要】目的:观察大鼠马尾受压后腰骶部脊髓中 P75 神经营养因子受体(P75 neurotrophic receptor, P75NTR)的表达,探讨 P75NTR 与前角神经元凋亡的关系。**方法:**48 只雌性成年 SD 大鼠,随机分为正常组($n=6$)、对照组($n=6$)和实验组($n=36$),正常组不作任何处理,对照组行假手术,实验组在 L4 平面置入半圆柱体硅胶棒,占椎管截面积约 75%~80%,造成马尾急性受压。实验组分别于造模后 1d、3d、5d、7d、14d、28d 时取 L4 压迫节段近端脊髓组织(L2 水平脊髓),正常组和对照组在第 7 天时处死取相应部位脊髓组织,切片后进行 P75NTR 免疫组织化学染色,观察 P75NTR 的表达;末端转移酶标记技术(TUNEL 法)检测脊髓前角运动神经元凋亡情况。用 SPSS 13.0 统计软件进行组间 t 检验和相关性分析。**结果:**正常组和对照组脊髓前角有少量 P75NTR 表达;实验组造模后 1d 脊髓前角即有 P75NTR 表达,7d 达到峰值,14d、28d 表达呈减少趋势,实验组除 1d 时外其余各时间点与正常组和对照组比较均有显著性差异($P<0.05$)。正常组和对照组脊髓组织中可见少量神经元凋亡,实验组造模后 1d 脊髓前角神经元凋亡数量明显增多,7d 达到峰值,14d、28d 凋亡呈减少趋势,实验组各个时间点与正常组和对照组比较均有显著性差异($P<0.05$)。神经元凋亡率与 P75NTR 表达存在平行变化关系。**结论:**马尾受压后脊髓前角运动神经元表达 P75NTR,其表达量与神经元凋亡率呈正相关。

【关键词】马尾综合征;P75 神经营养因子受体;脊髓;神经元;凋亡;大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2009.10.10

中图分类号:R683.2,Q513 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2009)-10-0753-05

Expression of P75 neurotrophic receptor in lumbosacral spinal cord after cauda equina compression and its relationship with neuron apoptosis/LI Haopeng, CHEN Jie, HE Xijing, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2009, 19(10):753~757

【Abstract】Objective:To investigate the expression of P75 neurotrophic receptor(P75NTR) at different time-point in lumbosacral spinal cord after cauda equina compression, and its relationship between it and the apoptosis of anterior horn neurons.**Method:**48 female adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups as control group ($n=6$), normal group ($n=6$) and experimental groups ($n=36$). The acute cauda equine compression model was established as placing a silicon gel rubber at L4 level of the vertebral canal which represented about 75%~80% compression to the cross section, while the vertebral canals in control group were opened and sutured leaving spinal cord intact. L4 level of spinal cords were harvested at 1d, 3d, 5d, 7d, 14d, 28d after operation in experimental group, and at 7d in control group and normal group respectively, and then used immunohistochemistry to observe the expression of P75NTR and TUNEL method was applied to observe cell apoptosis. SPSS 13.0 statistical software was employed to help analysis.**Result:**There was a less amount of P75NTR expressed in normal group and control group than in test groups, however no significant difference were noted among the unexperimental two groups ($P>0.05$), one day after operation, P75NTR was found expressed in anterior horn neurons of spinal cord in experimental group, and went to peak at 7th days, which decreased in 14d and 28d. There were significant difference with respect to expression of P75NTR between experimental group and control group as well as normal group except datas of 1d ($P<0.05$). Small amount of neurons apoptosis were evidenced in normal group and control group, while neurons apoptosis increased remark-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30672136)

第一作者简介:男(1962-),教授,硕士研究生导师,研究方向:脊柱脊髓损伤与修复

电话:(029)87679583 E-mail:LHP-3993@163.com

ably in experimental group, which went to peak at 7th day, and then decreased at 14th day and 28th day. At all six time-points, there were significant differences between experimental group and control group ($P < 0.05$), which changed parallelly. **Conclusion:** P75NTR are expressed in anterior horn motor neurons after cauda equina compression, which are positively correlated with neuron apoptosis rate.

【Key words】 Cauda equine syndrome; P75 neurotrophine receptor; Spinal cord; Neuron; Apoptosis; Rat

【Author's address】 Department of Orthopaedics, the Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710004, China

马尾综合征是临床较常见疾病,愈后不佳,发病机理尚不清楚。近年的研究发现,其可能与脊髓前角细胞凋亡有关^[1,2]。有文献表明 P75 神经营养因子受体(P75 neurotrophic receptor, P75NTR)和神经生长因子前体(Pro-NGF)结合诱导神经细胞凋亡^[3],但是脊髓前角神经元的凋亡与 P75NTR 的关系尚未见报道。本研究拟制作马尾综合征的动物模型,探讨脊髓前角神经元的凋亡与 P75NTR 的关系,为临床防治马尾综合征提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

正常成年雌性 SD 大鼠 48 只(西安交通大学动物实验中心提供),体重 280 ± 30 g。硅胶棒(长 4mm, 直径 2mm)。兔抗大鼠 P75NTR (Anti-P75NTR) 多克隆抗体(购自 Chemicon 公司), TUNEL 试剂盒(购自美国 Promega 公司), SP 法试剂盒(购自武汉博士德公司)。

1.2 动物模型制作

48 只大鼠随机分为正常组($n=6$),对照组($n=6$)和实验组($n=36$),实验组参考 Sekiguchi 等^[4]的建模方法建立马尾受压模型:用 4%水合氯醛(0.5ml/100g)腹腔注射麻醉大鼠,沿 L4~S1 棘突行后正中切口,打开 L5 椎板,将半圆柱体硅胶棒置入 L4 椎管内,硅胶棒占椎管横截面积的 75%~80%。待动物苏醒后,按 Salzman 等^[5]改良的 Torlov 法测定神经功能在 2 级以下,后肢行走困难,大小便障碍,达到马尾综合征模型要求。正常组不做任何处理,对照组只进行脊柱手术,不放入硅胶棒。手术组动物术后注射青霉素 20 万 u, 2 次/d, 共 3d;单笼饲养管理,若有死亡,随时补新。

1.3 取材

实验组造模后 1d、3d、5d、7d、14d、28d 各取 6 只大鼠,常规麻醉后用 4%多聚甲醛进行心脏灌注,切取 L4 压迫节段近端脊髓组织(L2 椎体水平脊髓组织),4%多聚甲醛后固定 24h, 逐次进入

10%、20%、30%蔗糖内梯度脱水, -26℃ 制成 10 μ m 厚冰冻水平切片(即脊髓横切片), -80℃ 保存。对照组和正常组在第 7 天时用相同方法取相应节段脊髓组织,相同方法处理,切片保存。

1.4 检测方法

从每只动物脊髓组织切片中随机抽取 3 张切片,行 Nissl 染色:切片置于 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液中(4℃)固定 15min,再置于 1%甲苯胺蓝(toluidine blue)染液中 54℃、20min,自来水冲洗,乙醇梯度脱水,透明,封片。在显微照相系统下观察脊髓前角神经元染色的情况。

从每只动物脊髓组织切片中随机抽取 3 张切片,行免疫组化染色:复温后,3%双氧水浸泡 30min, 0.1mol/L PBS 洗 3 次, 5min/次, 5%山羊血清 37℃封闭 30min,滴加兔抗大鼠 P75NTR 多克隆抗体(1:1000), 4℃孵育过夜, PBS 洗涤,加生物素标记山羊抗兔二抗(1:100), 37℃孵育 30min, PBS 洗涤,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液, 37℃孵育 30min, PBS 冲洗 3 次, 5min/次。DAB/H₂O₂ 反应染色,自来水充分冲洗后,苏木素复染,常规脱水,透明,干燥,封片。

从每只动物脊髓组织切片中随机抽取 3 张切片,行 TUNEL 染色:严格按照 Dead End™ Fluorometric TUNEL System 试剂盒说明书进行操作。

1.5 统计方法

统计 3 张切片阳性染色区域,于脊髓前角区域内随机取 10 个视野($\times 400$),计数阳性细胞个数。数据资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS 13.0 统计软件进行组间 t 检验和相关性分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

尼氏染色结果显示,正常组与对照组脊髓前角神经元胞体和突起轮廓清晰(图 1、2);实验组各时间点脊髓组织中均有程度不同、数量不等的

染色较深的神经元,可见核固缩,胞浆溶解,尼氏体模糊(图 3),随着马尾受压时间延长,神经元的病理改变明显,尼氏体崩解,神经元结构模糊,7d 后,神经元死亡数目不再增加(图 4)。

P75NTR 免疫组化染色结果显示正常组及对照组极少见 P75NTR 的表达(图 5)。实验组各时间点脊髓组织中神经细胞出现黄色或棕黄色染色

阳性,主要分布于前角,细胞体呈不规则形状,核质透亮,有的明显可见发自胞体的突起,7d 时达到表达高峰,后逐渐降低,并持续到手术后 28d (图 6、7)。实验组不同时间点 P75NTR 表达阳性细胞数见表 1,与对照组和正常组比较阳性细胞数有显著性差异($P<0.05$)。

TUNEL 染色结果显示正常组与对照组有极

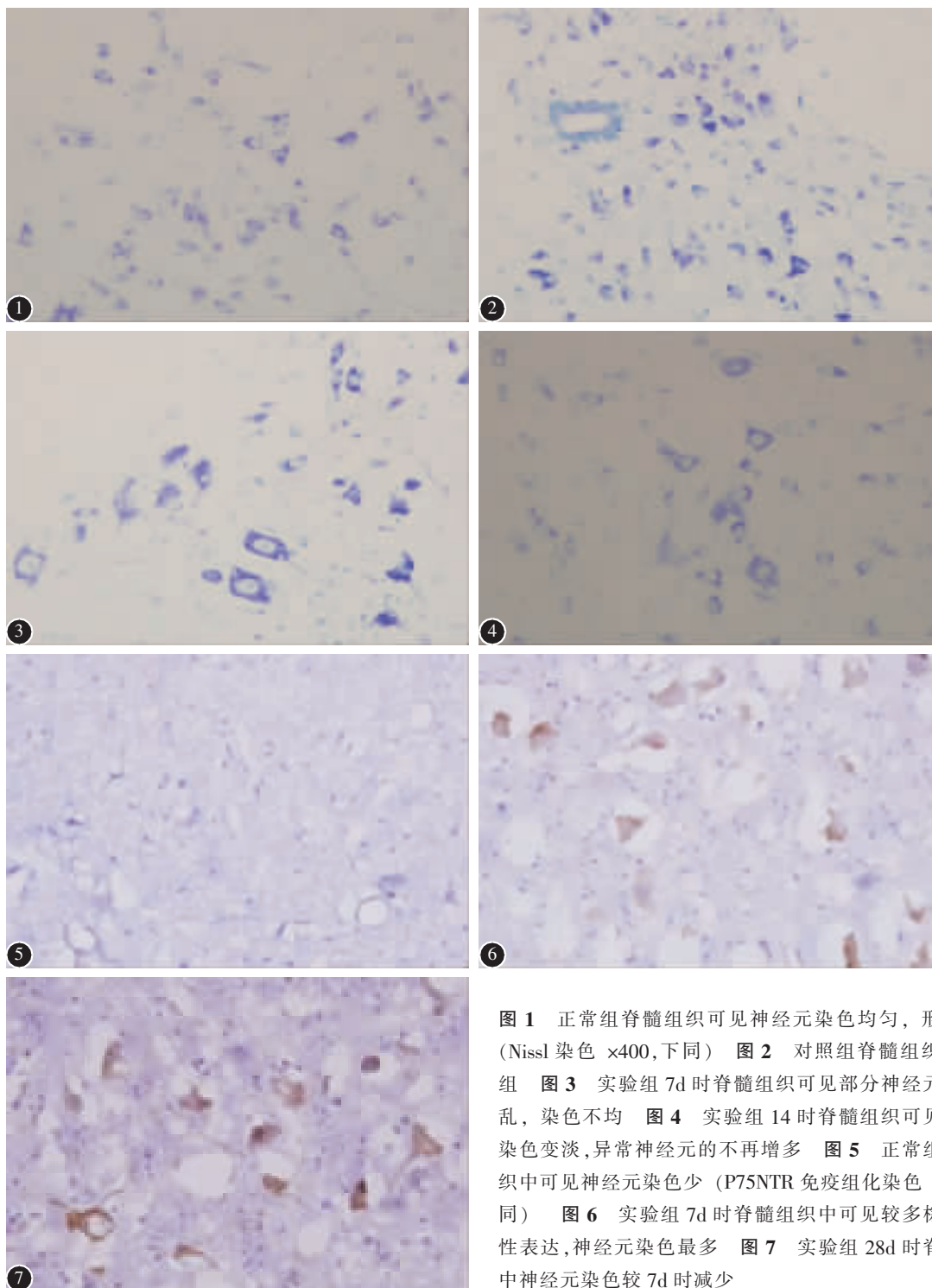


图 1 正常组脊髓组织可见神经元染色均匀,形状规则(Nissl 染色 $\times 400$,下同) 图 2 对照组脊髓组织同正常组 图 3 实验组 7d 时脊髓组织可见部分神经元结构紊乱,染色不均 图 4 实验组 14 时脊髓组织可见神经元染色变淡,异常神经元的不再增多 图 5 正常组脊髓组织中可见神经元染色少(P75NTR 免疫组化染色 $\times 400$,下同) 图 6 实验组 7d 时脊髓组织中可见较多棕黄色阳性表达,神经元染色最多 图 7 实验组 28d 时脊髓组织中神经元染色较 7d 时减少

少量凋亡神经元(图 8),两组间无统计学意义($P>0.05$);实验组术后 1d 即在脊髓前角发现神经元少量凋亡,随时间推移,凋亡神经元增多,术后 7d 达顶峰(图 9),后逐渐减少,但至 28d 时仍有神经元凋亡(图 10),与正常组和对照组比较有显著性

意义(表 1, $P<0.05$)。对神经元 P75NTR 的表达与 TUNEL 阳性表达进行皮尔森相关分析,相关性系数 r 为 0.747,神经元凋亡的出现与 P75NTR 表达呈正相关(图 11, $P<0.05$)。

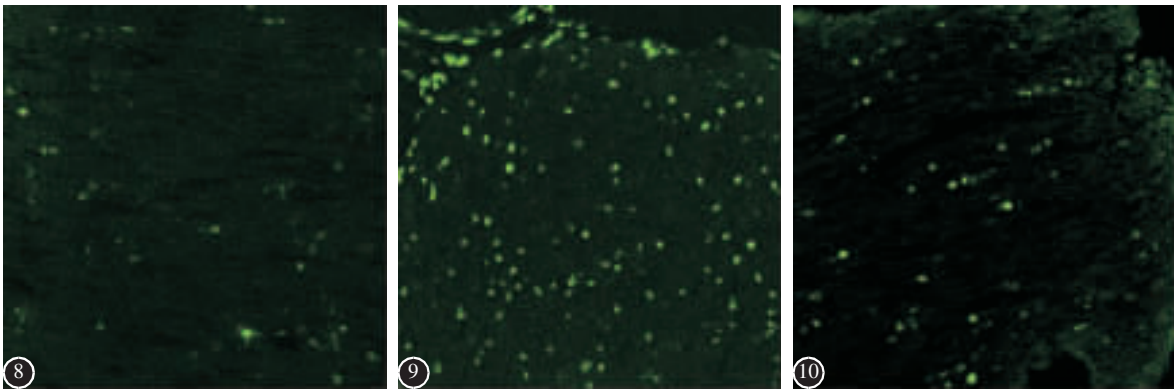


图 8 正常组脊髓组织 TUNEL 染色可见少量绿色发亮荧光,为凋亡细胞核($\times 200$) 图 9 实验组 7d 时脊髓组织 TUNEL 染色可见较多凋亡神经元($\times 200$) 图 10 实验组 28d 时脊髓组织 TUNEL 染色,凋亡细胞呈减少趋势($\times 200$)

表 1 各组脊髓 L4 节段免疫染色阳性神经元数目 ($n=6, \bar{x} \pm s$, 个/10HP)

	正常组	对照组	实验组					
			1d	3d	5d	7d	14d	28d
P75NTR	0.1±0.03	0.9±0.2 ^①	0.6±0.2 ^②	3.0±0.2 ^{③④}	36±1.1 ^{③④}	76.5±1.3 ^{③④}	67.5±1.5 ^{③④}	55.5±1.7 ^{③④}
TUNEL	1.3±0.1	1.0±0.2 ^①	16.5±0.28 ^③	22.5±0.4 ^{③④}	31.5±0.5 ^{③④}	49.5±1.0 ^{③④}	40.5±0.8 ^{③④}	37.5±2.1 ^{③④}

注:①与对照组 $P>0.05$;与正常组和对照组比较② $P>0.05$,③ $P<0.05$;④与实验组前一个时间点比较④ $P<0.05$

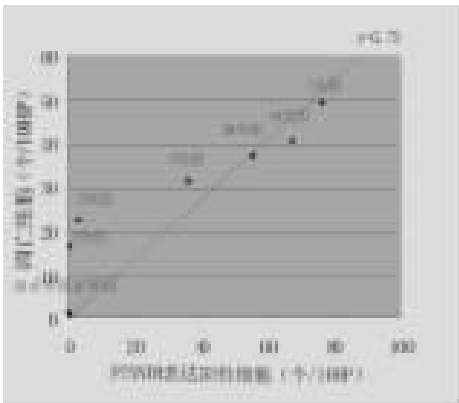


图 11 马尾压迫后腰骶部脊髓神经元 P75NTR 表达与凋亡的关系

3 讨论

马尾综合征(CES)是由腰椎间盘突出、腰椎管狭窄、腰椎滑脱、椎管内肿物、创伤等原因压迫椎管内马尾神经所致,临床表现为间歇性跛行,鞍区感觉异常,下肢运动功能减退和大小便及性功能障碍,严重影响患者生活质量。一旦发生,预后

不佳。本实验 CES 动物模型参考 Sekiguchi 等^[4]的建模方法,采用大鼠腰椎管内置入半圆柱体硅胶棒压迫马尾神经来模拟马尾综合征的发病原因,这种压迫物形状与椎管形状相似,受力面积广,压力均匀,较之前有学者使用螺钉拧入椎管压迫马尾的动物模型相比,更具有简易性、稳定性、安全性的优点,术后按 Salzman 等^[5]改良的 Torlov 法评分标准测定神经功能均在 2 级以下,表现为后肢行走困难,大小便障碍,符合马尾压迫模型实验要求。

马尾神经受压后病理表现为马尾神经华勒氏变性和腰骶脊髓前角运动神经元的凋亡,而且压迫的程度越重变性和凋亡也就越明显^[6],并且华勒氏变性只发生在脊髓前角运动神经元轴突压迫区及其周围端、脊神经节中枢轴突压迫区及其中枢端,马尾神经轻度和中度受压(占椎管截面的 25%和 50%)并不引起脊髓神经元的明显凋亡,只有重度压迫(占椎管截面的 75%)才出现神经元的凋亡^[7],而且重度压迫引起的疾病症状较中轻度

压迫明显,持续时间长,不容易恢复,这可能与脊髓神经元凋亡相关。既往的研究表明,P75NTR是低亲和力的神经营养因子受体,在神经系统的正常发育以及某些神经病理状态中有诱导神经细胞凋亡的作用^[8]。P75NTR在神经系统损伤时呈现高表达并与凋亡相关。有研究显示P75NTR基因敲除大鼠在面神经切断后其中脑面神经运动核细胞凋亡显著减少,新生鼠在脊髓切断后给予NGF反而会激活P75NTR,增加面神经元的凋亡^[9]。P75NTR促细胞凋亡的作用在转基因动物模型上也得到了很好的证实^[10]。近年发现Pro-NGF与P75NTR高亲和力结合表现出细胞凋亡现象^[11],逐步形成了P75凋亡通路的概念,P75NTR的凋亡作用越来越引起人们的重视。但文献对P75NTR凋亡作用及它的凋亡通路在马尾综合征分子机制方面没有系统研究报道。

本研究应用免疫组化和原位细胞凋亡检测观察大鼠马尾重度受压后相应发出段脊髓神经细胞凋亡和P75NTR表达的时空分布,初步探索P75NTR与马尾综合征中神经元凋亡的关系。实验组尼氏染色结果发现,马尾受压后脊髓神经元发生病理性改变,压迫1d到7d神经元尼氏颗粒染色下降,结构不规则,显示了存在神经细胞死亡增加情况,7d以后病理改变依旧存在;对照组、正常组神经元染色均匀,结构完整。免疫组化染色结果显示,急性马尾受压后受压马尾相应发出段脊髓中有P75NTR的高表达,7d时达到了顶峰,主要出现在神经元和白质中的少突胶质细胞,而正常脊髓组织中只有少量P75NTR的表达。TUNEL凋亡检测结果显示,实验组1d时即神经元凋亡增加,与正常组和对照组比较有显著差异($P<0.05$),随着压迫时间延长,凋亡数量不断增加,于7d达到最大值,到14d、28d凋亡细胞有减少趋势。和免疫组化结果对比分析,急性马尾受压后受压马尾相应发出段脊髓组织中,神经元凋亡与P75NTR的表达存在平行变化的关系,对实验组的神经元P75NTR表达阳性数和神经元凋亡数行直线相关分析,发现两者呈正相关关系($r=0.75, P<0.05$),提

示马尾重度受压后,P75NTR与腰骶部神经元凋亡有关,说明P75NTR在马尾综合征神经元凋亡发生机制中起了重要作用,为CES的发病机理提供了一定的理论依据。

4 参考文献

1. Kennedy JG, Soffe KE, McGrath A, et al. Predictors of outcome in cauda equina syndrome[J]. *Eur Spine*, 1999, 8(4): 317-322.
2. Flood HD, Downie JW, Awad SA. Urethral function after chronic cauda equina lesion in cats (II): the role of automatically-innervated smooth and striated muscle in distal sphincter dysfunction[J]. *Urol*, 1990, 144(4): 1029-1035.
3. Nykjaer A, Lee R, Teng KK, et al. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death [J]. *Nature*, 2004, 427(6977): 843-848.
4. Sekiguchi M, Kikuchi S, Myers R. Experimental spinal stenosis: relationship between degree of cauda equina compression, neuropathology, and pain[J]. *Spine*, 2004, 29(10): 1105-1111.
5. Salzman SK, Puniak MA, Liu ZJ, et al. The serotonin antagonist mianserin improves functional recovery following experimental spinal trauma[J]. *Ann Neurol*, 1991, 30(4): 533-541.
6. Yamaguchi K, Murakami M, Takahashi K, et al. Behavioral and morphologic studies of the chronically compressed cauda equine: experimental model of lumbar spinal stenosis in the rat [J]. *Spine*, 1999, 24(9): 845-851.
7. Kobayashi S, Yoshizawa H, Yamada S. Pathology of lumbar nerve root compression (Part II): intradiscal inflammatory changes induced by mechanical compression [J]. *J Orthop Res*, 2004, 22(1): 170-179.
8. Kovacs GG, Kloppel S, Fischer I, et al. Nucleus-specific alteration of raphe neurons in human neurodegenerative disorders [J]. *Neuroreport*, 2003, 14(1): 73-76.
9. Chen Y, Zeng J, Chen Y, et al. Multiple roles of the p75 neurotrophin receptor in the nervous system [J]. *Int Med Res*, 2009, 37(2): 281-288.
10. Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, et al. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease [J]. *Progress in Neurobiology*, 2000, 62(1): 63-88.
11. Arnett MG, Ryals JM, Wright DE. Pro-NGF, sortilin, and P75NTR: potential mediators of injury-induced apoptosis in the mouse dorsal root ganglion [J]. *Brain Res*, 2007, 1183(9): 32-42.

(收稿日期: 2009-06-29 修回日期: 2009-09-15)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 卢庆霞)