

基础研究

神经调节素对缺血再灌注损伤大鼠脊髓
MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响张同星¹, 井万里², 张 涛², 姜文学², 高中玉², 许财元¹, 张 辉¹

(1 天津医科大学第一中心临床学院 300070 天津市; 2 天津市第一中心医院骨科 300192 天津市)

【摘要】目的:观察神经调节素-1 β (neuregulin-1 β , NRG-1 β)对大鼠脊髓缺血再灌注损伤后脊髓组织基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)表达的影响,并初步探讨其作用与机制。**方法:**48 只 SD 大鼠随机分为对照组($n=16$)、缺血再灌注组(模型组, $n=16$)、NRG-1 β 治疗组($n=16$),对照组仅分离暴露腹主动脉,其余两组采用腹主动脉阻断法制备动物模型。治疗组在打开动脉夹后立即经尾静脉注射 NRG-1 β (10 μ g/kg),缺血再灌注模型组在打开动脉夹后立即经尾静脉注射等量的 0.1mol/L 的 PBS 缓冲液。于取材前 3min 根据改良 Tarlov 评分标准进行神经功能评分。分别于术后 3h、6h、12h、24h 取材(每个时间点 4 只),HE 染色观察脊髓病理变化,免疫组化和 Real-time PCR 分别检测 MMP-9、TIMP-1 蛋白和 mRNA 水平的表达。**结果:**模型组在术后各时间点的 Tarlov 评分较对照组显著下降($P<0.05$),治疗组在术后 6h、12h、24h 的 Tarlov 评分较模型组显著增高($P<0.05$)。HE 染色显示模型组和治疗组均存在脊髓组织损伤,但治疗组较模型组减轻。免疫组化结果显示,对照组未见 MMP-9、TIMP-1 阳性表达细胞;模型组 MMP-9 免疫阳性细胞数(个/高倍视野)在术后 3h、6h、12h、24h 分别为 9.00 ± 1.63 、 23.80 ± 1.71 、 28.30 ± 1.50 、 34.80 ± 2.63 ,治疗组分别为 8.50 ± 0.58 、 17.80 ± 0.96 、 20.80 ± 3.50 、 30.00 ± 2.16 ,其中 6h、12h、24h 治疗组与模型组相比阳性细胞数明显减少($P<0.05$)。模型组 TIMP-1 免疫阳性细胞数(个/高倍视野)在术后 3h、6h、12h、24h 分别为 11.80 ± 0.96 、 12.30 ± 1.50 、 7.80 ± 0.96 、 7.80 ± 1.50 ,治疗组分别为 12.30 ± 0.96 、 13.80 ± 0.96 、 10.50 ± 1.73 、 10.30 ± 0.96 ,其中 12h、24h 治疗组与模型组相比阳性细胞数明显增多($P<0.05$)。对照组 MMP-9 在术后 3h、6h、12h、24h 的 mRNA 表达量分别为 4.93 ± 0.21 、 4.95 ± 0.24 、 4.96 ± 0.25 、 4.98 ± 0.23 ,模型组分别为 5.38 ± 0.25 、 6.53 ± 0.31 、 6.87 ± 0.29 、 7.53 ± 0.33 ,治疗组分别为 5.35 ± 0.26 、 5.56 ± 0.22 、 5.74 ± 0.27 、 5.90 ± 0.31 ,其中 6h、12h、24h 模型组与对照组比较 MMP-9 的 mRNA 表达量明显增加($P<0.05$),6h、12h、24h 治疗组 MMP-9 的 mRNA 表达量较模型组明显减少($P<0.05$)。对照组 TIMP-1 在术后 3h、6h、12h、24h 的 mRNA 表达量分别为 4.74 ± 0.23 、 4.76 ± 0.21 、 4.73 ± 0.25 、 4.76 ± 0.24 ,模型组分别为 4.53 ± 0.32 、 4.62 ± 0.21 、 3.83 ± 0.20 、 3.65 ± 0.32 ,治疗组分别为 4.55 ± 0.26 、 4.65 ± 0.27 、 4.28 ± 0.22 、 4.25 ± 0.24 ,其中 12h、24h 模型组与对照组比较 TIMP-1 的 mRNA 表达量明显减少($P<0.05$),12h、24h 治疗组 TIMP-1 的 mRNA 表达量较模型组明显增加($P<0.05$)。**结论:**神经调节素可在大鼠脊髓缺血再灌注损伤过程中发挥神经保护作用,该作用的实现可能与 MMP-9 的表达下调和 TIMP-1 的表达上调有关。

【关键词】脊髓损伤;神经调节素;缺血再灌注;基质金属蛋白酶-9;金属蛋白酶组织抑制剂-1;大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2016.07.11

中图分类号:R683.2,Q593+.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2016)-07-0642-08

Effect of Neuregulin on the expression of MMP-9 and TIMP-1 in spinal cord ischemia reperfusion injury of rats/ZHANG Tongxing, JING Wanli, ZHANG Tao, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2016, 26(7): 642-649

【Abstract】Objectives: Objectives: To observe the effect of Neuregulin-1 β (NRG-1 β) on the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in rats with spinal cord ischemia reperfusion injury, and to investigate its function and mechanism. **Methods:** 48 SD rats were randomly divided into control group($n=16$), ischemia reperfusion model group($n=16$), NRG-1 β treatment group ($n=16$). Abdominal aorta was only exposed in control group. Spinal cord ischemia reperfusion injury was in-

第一作者简介:男(1989-),硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(022)23626353 E-mail:txzhang01@163.com

通讯作者:井万里 E-mail:yunlianghej@163.com;张涛 E-mail:zht70@sina.com

duced by occluding the abdominal aorta in the other two groups. The NRG-1 β (10 μ g/kg) was injected through tail vein immediately after opening the artery clamp in the treatment group, and the ischemia reperfusion model group was injected with an equal amount of 0.1mol/L PBS buffer solution after opening the artery clamp. Neurological function was assessed by using the modified Tarlov standard. Sampling test was performed at 3h, 6h, 12h, 24h respectively after injury(4 rats at each time point). The pathological changes were observed by HE staining. Protein and mRNA expressions of MMP-9 and TIMP-1 were assessed by immunohistochemistry and real-time PCR. **Results:** The Tarlov score in model group decreased significantly at each time point compared with that in control group ($P<0.05$). Neuregulin treatment group induced a markedly improved Tarlov score at 6h, 12h, 24h compared with model group($P<0.05$). Spinal cord injury was identified by HE staining in both model and treatment group. However, the injury in treatment group was alleviated compared with that in model group. Immunohistochemistry result showed that there was no positive expression of MMP-9 or TIMP-1 in control group. The number of MMP-9 positive cells in 3h, 6h, 12h, 24h model group was 9.00 ± 1.63 , 23.80 ± 1.71 , 28.30 ± 1.50 , 34.80 ± 2.63 respectively, which was 8.50 ± 0.58 , 17.80 ± 0.96 , 20.80 ± 3.50 , 30.00 ± 2.16 respectively in treatment group. The number of positive cells significantly decreased in 6h, 12h, 24h treatment group compared with that in model group($P<0.05$). The number of TIMP-1 positive cells in 3h, 6h, 12h, 24h model groups was 11.80 ± 0.96 , 12.30 ± 1.50 , 7.80 ± 0.96 , 7.80 ± 1.50 respectively, which was 12.30 ± 0.96 , 13.80 ± 0.96 , 10.50 ± 1.73 , 10.30 ± 0.96 respectively in treatment group. The number of positive cells significantly increased in 12h, 24h treatment group compared with that in model group($P<0.05$). Real-time PCR result showed that the mRNA expression of MMP-9 in 3h, 6h, 12h, 24h control group was 4.93 ± 0.21 , 4.95 ± 0.24 , 4.96 ± 0.25 , 4.98 ± 0.23 respectively, 5.38 ± 0.25 , 6.53 ± 0.31 , 6.87 ± 0.29 , 7.53 ± 0.33 respectively in model group, and 5.35 ± 0.26 , 5.56 ± 0.22 , 5.74 ± 0.27 , 5.90 ± 0.31 respectively in treatment group, the mRNA expression of MMP-9 in 6h, 12h, 24h model group significantly increased compared with that in control group($P<0.05$). and the mRNA expression of MMP-9 in 6h, 12h, 24h treatment group significantly decreased compared with that in model group($P<0.05$). The mRNA expression of TIMP-1 in 3h, 6h, 12h, 24h control group was 4.74 ± 0.23 , 4.76 ± 0.21 , 4.73 ± 0.25 , 4.76 ± 0.24 respectively, was 4.53 ± 0.32 , 4.62 ± 0.21 , 3.83 ± 0.20 , 3.65 ± 0.32 respectively in model group, and 4.55 ± 0.26 , 4.65 ± 0.27 , 4.28 ± 0.22 , 4.25 ± 0.24 respectively in treatment group, the mRNA expressions of TIMP-1 in 12h, 24h model groups decreased significantly compared with that in control groups, and the mRNA expression of TIMP-1 in 12h, 24h treatment group significantly increased compared with that in model group($P<0.05$). **Conclusions:** Neuregulin plays a role in neural protection in spinal cord ischemia reperfusion injury, and the activation mechanism may be caused by the down-regulated expression of MMP-9 and the up-regulated expression of TIMP-1.

【Key words】 Spinal cord injury; Neuregulin; Ischemia reperfusion; Matrix metalloproteinases-9; Tissue inhibitor of metalloproteinase-1; Rat

【Author's address】 First Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin, 300070, China

神经调节素(neuregulin, NRG)为表皮生长因子家族成员之一,通过激活表皮因子酪氨酸激酶受体(ErbB)发挥抗细胞凋亡、促进血管生成及抑制炎症反应等多重效应。目前国内外研究显示, NRG 在心肌损伤过程中发挥重要的心血管保护作用^[1-3], 临床试验已证实 NRG 具有良好的临床应用前景^[4,5]。NRG 通过改善脑缺血再灌注损伤时神经元生存微环境,实现减小脑梗死体积、减少神经元凋亡,从而发挥重要的脑神经保护作用^[6,7], 而且对神经系统的发育及损伤后髓鞘再生和修复发挥着重要的调节作用^[8,9]。然而, NRG 在脊髓缺

血再灌注中减轻脊髓损伤的作用及机制尚未见报道,为了解其对脊髓缺血再灌注损伤的治疗效果,我们于大鼠脊髓缺血再灌注损伤模型的基础上,选择具有代表性的基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)作为评价脊髓缺血再灌注损伤的重要指标,观察 NRG-1 β 治疗后 MMP-9、TIMP-1 表达的变化,初步探讨 NRG 对脊髓缺血再灌注损伤的神经保护机制。

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂

健康雄性 SD 大鼠 48 只, 体重 200~250g, SPF 级, 购自中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所实验动物中心[SCXK-(军)2014-0001]; NRG (396-HB-050) 购自美国 R&D Systems Inc; MMP-9、TIMP-1 单克隆抗体, SABC 免疫组化试剂盒购自武汉博士德公司; PCR 逆转录、扩增试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.2 动物分组与模型制作

48 只大鼠随机分为对照组($n=16$)、缺血再灌注模型组($n=16$)、NRG-1 β 治疗组($n=16$)。对照组暴露腹主动脉至左肾动脉水平后缝合腹腔, 其余两组均采用改良 Zivin^[10]法制作动物模型, 缺血时间为 30min。NRG 用 0.1mol/L 的 PBS 缓冲液溶解, 治疗组在打开动脉夹后立即经尾静脉注射 NRG-1 β (10 μ g/kg)^[11-13], 缺血再灌注模型组在打开动脉后立即经尾静脉注射等量的 0.1mol/L 的 PBS 缓冲液。

1.3 神经功能学评分

分别于取材前 3min 对各组动物后肢运动功能进行评分。采用改良 Tarlov 评分标准^[14,15]进行评分: 0 分, 完全瘫痪, 针刺下肢无反应; 1 分, 完全瘫痪, 针刺下肢有反应, 但肢体不能活动; 2 分, 肢体可活动, 但不能站立或站立不稳; 3 分, 可站立, 但无法行走; 4 分, 可行走数步, 但不能稳定; 5 分, 能缓慢行走, 但不灵活; 6 分, 正常行走。

1.4 脊髓样本取材

模型组与治疗组分别于再灌注 3h、6h、12h、24h(每个时间点 4 只)麻醉动物, 快速开胸暴露心脏, 经左心室插管至升主动脉, 并剪开右心耳, 灌入 4℃生理盐水 250ml, 待流出液清亮后, 迅速取出 L1~L6 段脊髓, 分为两段: 一段脊髓标本剥离外膜后迅速冻存于 -80℃冰箱备用于 Real-time PCR 检测, 另一段脊髓固定于 4%多聚甲醛中, 分别备用于行 HE 染色及免疫组化。对照组分别于闭合腹腔后 3h、6h、12h、24h(每个时间点 4 只)以相同方法处死动物并取出 L1~L6 段脊髓。

1.5 HE 染色组织学观察

常规石蜡包埋, 4 μ m 连续横切片, 待切出完整脊髓组织后, 每个样本蜡块连续切片 3 张, 捞片固定后进行 HE 染色。具体步骤如下: 脱蜡复水, 苏木素(3min), 水洗(5min), 盐酸酒精(蘸 3 下), 水洗(5min), 伊红(1min), 水洗(5min), 脱水透明, 树胶封片。在光学显微镜下观察脊髓病理变化。

1.6 MMP-9、TIMP-1 免疫组化染色

采用 SABC 免疫组化试剂盒染色, 具体步骤如下: 脱蜡复水, 3% H_2O_2 封闭, 修复抗原, 血清封闭非特异性位点, 一抗 37℃孵育 2h, 二抗 37℃孵育 0.5h, 滴加 SABC, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水透明封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。阳性细胞的胞浆呈棕黄色。结果判读: 每张切片取 4 个不重叠的高倍视野, 计数每个视野阳性细胞数, 以均数 $\pm$ 标准差表示。

1.7 Real-time PCR 检测 MMP-9、TIMP-1 的表达

总体过程如下: 研磨组织提取总 RNA; 参照 PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒合成 cDNA; 参照 TaKaRa SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 试剂盒扩增目的基因; MMP-9 和 TIMP-1 所需引物序列采用 Premier 5.0 设计软件设计, β -actin 作为内参照; 引物委托北京三博远志生物技术有限责任公司合成(表 1)。扩增条件: ①95℃ 30s。②95℃ 5s, 58℃ 30s, 72℃ 30s, 40 个循环。③95℃ 15s, 60℃ 60s, 95℃ 15s。退火期为 58℃ 30s。扩增结束后获得最低循环数 Ct 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法处理数据, 每组实验重复 3 遍。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ (均数 $\pm$ 标准差)表示, 各组之间总体比较采用 ANOVA, 模型组与对照组、治疗组与模型组之间的两两比较采用 SNK-q 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物后肢神经功能评分

对照组大鼠能正常行走。模型组大鼠再灌注

表 1 MMP-9、TIMP-1 及内参基因的引物序列

Table 1 Primer sequence of MMP-9, TIMP-1 and reference gene

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	片段长度(bp) Fragment length
MMP9-qPCR-S	5'TGCTTCTTCCTTCAAGAATCG 3'	162
MMP9-qPCR-A	5'GAGGATCATCTCGGCTACC 3'	
TIMP1-qPCR-S	5'CCAACCCACCCACAGACAG 3'	249
TIMP1-qPCR-A	5'GCCCCGCGATGAGAAACTC 3'	
Rat β -actin-S	5'GCCTGACATTAAAGAGAAGCTG 3'	500
Rat β -actin-A	5'AGAAGCATTTCGCGTGCAC 3'	

3h 出现运动障碍, Tarlov 评分结果随时间延长逐渐降低, 再灌注 24h 运动功能评分最低。NRG-1 β 治疗组 Tarlov 评分结果较模型组明显升高, 再灌注 6h、12h、24h 与模型组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$, 表 2)。

2.2 组织病理学观察

见图 1。对照组: 脊髓灰、白质分界清晰, 神经元呈多角形, 细胞核、核仁轮廓清晰。模型组: 再灌注 3h 脊髓病理变化与对照组比较并不明显, 6h 可见部分神经元固缩, 周围有轻度空泡间隙, 核仁

表 2 各组不同时间点 Tarlov 评分结果 ($n=4, \bar{x} \pm s$, 分)

Table 2 Tarlov scores at different hours in different groups

时间 Time	对照组 Control group	模型组 Model group	NRG 治疗组 NRG treatment group
3h	6 $\pm$ 0	4.50 $\pm$ 0.58 ^①	5.00 $\pm$ 0.82
6h	6 $\pm$ 0	3.50 $\pm$ 0.58 ^①	4.50 $\pm$ 0.58 ^②
12h	6 $\pm$ 0	2.50 $\pm$ 0.58 ^①	4.00 $\pm$ 0.80 ^②
24h	6 $\pm$ 0	2.30 $\pm$ 0.50 ^①	3.50 $\pm$ 0.58 ^②

注: ①与对照组比较 $P<0.05$; ②与模型组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with control group $P<0.05$; ②Compared with model group $P<0.05$

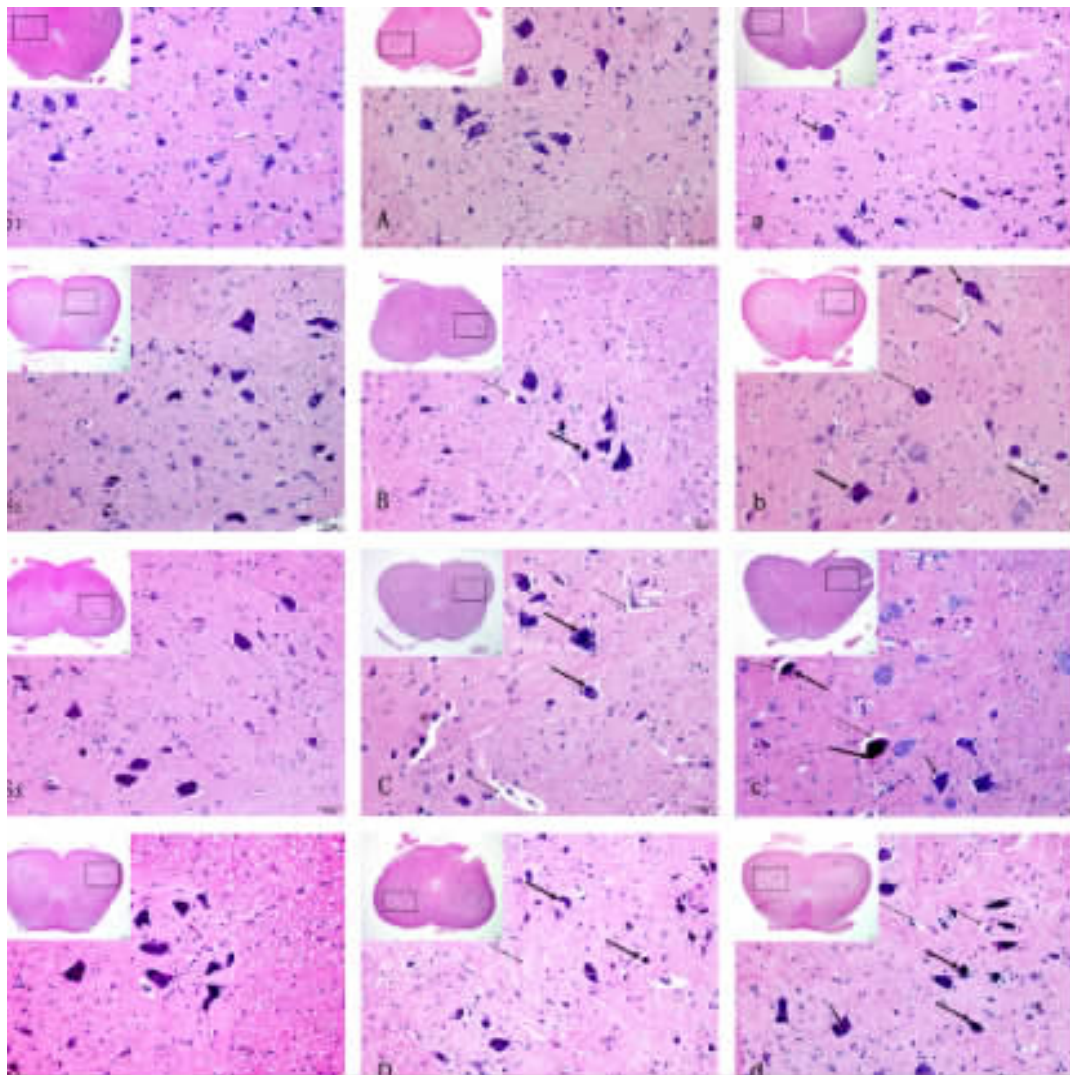


图 1 各组脊髓组织不同时间点的病理改变 (HE, $\times 200$): S1、S2、S3、S4 为对照组; A、B、C、D 分别为再灌注 3h、6h、12h、24h 模型组; a、b、c、d 分别为给药 3h、6h、12h、24h 治疗组。图中短箭头指示正常神经元, 粗箭头指示死亡或凋亡神经元, 细箭头指示组织疏松化改变

Figure 1 Pathologic images of the spinal cord in different groups (HE, $\times 200$). S1, S2, S3, S4: control group. A, B, C, D: model group at 3h, 6h, 12h, 24h after reperfusion. a, b, c, d: treatment group at 3h, 6h, 12h, 24h after treatment. The short arrows indicate normal neurons. The thick arrows indicate death or apoptosis neurons. The thin arrows indicate the tissue vacuoles

不清,胞质、胞核界限模糊,可见轻度疏松化和中性粒细胞浸润;12h 神经元明显固缩,细胞周围空隙明显,细胞核深染、模糊不清,组织疏松化明显,中性粒细胞浸润增多;24h 病理学改变进一步加重,大量神经元变性坏死,组织疏松更加严重,结构紊乱。治疗组:再灌注 3h 脊髓病理变化与对照组无明显差异;6h 固缩神经元数量较模型组减少,少数神经元核仁不清,中性粒细胞浸润减少;12h 组织病理表现较模型组明显改善,可见较多固缩神经元,细胞周围空泡形成,核仁不清,组织

疏松较明显;24h 可见大量变性坏死神经元,组织结构紊乱,灰、白质分界不清,但与模型组相比,病理变化均明显改善,脊髓前角仍可见较多结构完好的神经元。

2.3 MMP-9、TIMP-1 免疫组化结果

见图 2、3 及表 3。对照组未见 MMP-9、TIMP-1 免疫阳性细胞。模型组:再灌注 3h 出现 MMP-9 阳性细胞,阳性细胞表现为神经元胞浆呈现棕黄色淡染,主要位于脊髓前角及中央管周围,阳性细胞数随时间延长增多,再灌注 12h 阳性细胞广泛

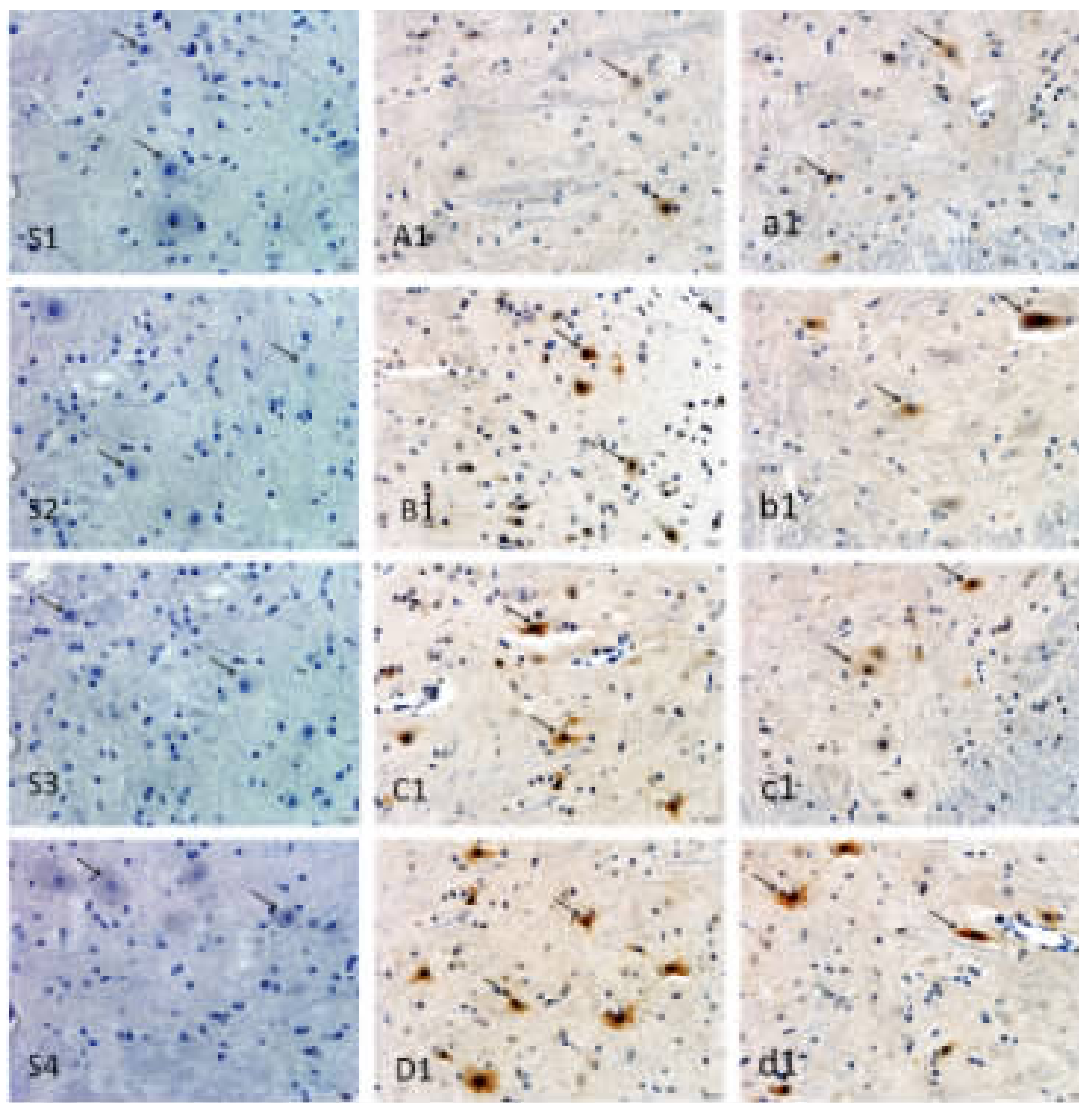


图 2 各组脊髓组织中 MMP-9 的免疫组化图像(SABC,×400)。S1、S2、S3、S4 为对照组,A1、B1、C1、D1 分别为再灌注 3h、6h、12h、24h 模型组,a1、b1、c1、d1 分别为给药 3h、6h、12h、24h 治疗组。对照组未见免疫阳性细胞,模型组与治疗组图中箭头指示免疫阳性神经元(神经元胞浆呈棕黄色淡染)

Figure 2 MMP-9 immunohistochemical images in the spinal cord in different groups (SABC, ×400). S1, S2, S3, S4: control group. A1, B1, C1, D1: model group at 3h, 6h, 12h, 24h after reperfusion. a1, b1, c1, d1: treatment group at 3h, 6h, 12h, 24h after treatment. Control group showing none immunopositive cells, model and treatment group showing immunopositive neurons indicated by thin arrows. The cytoplasm of neurons were brown stained

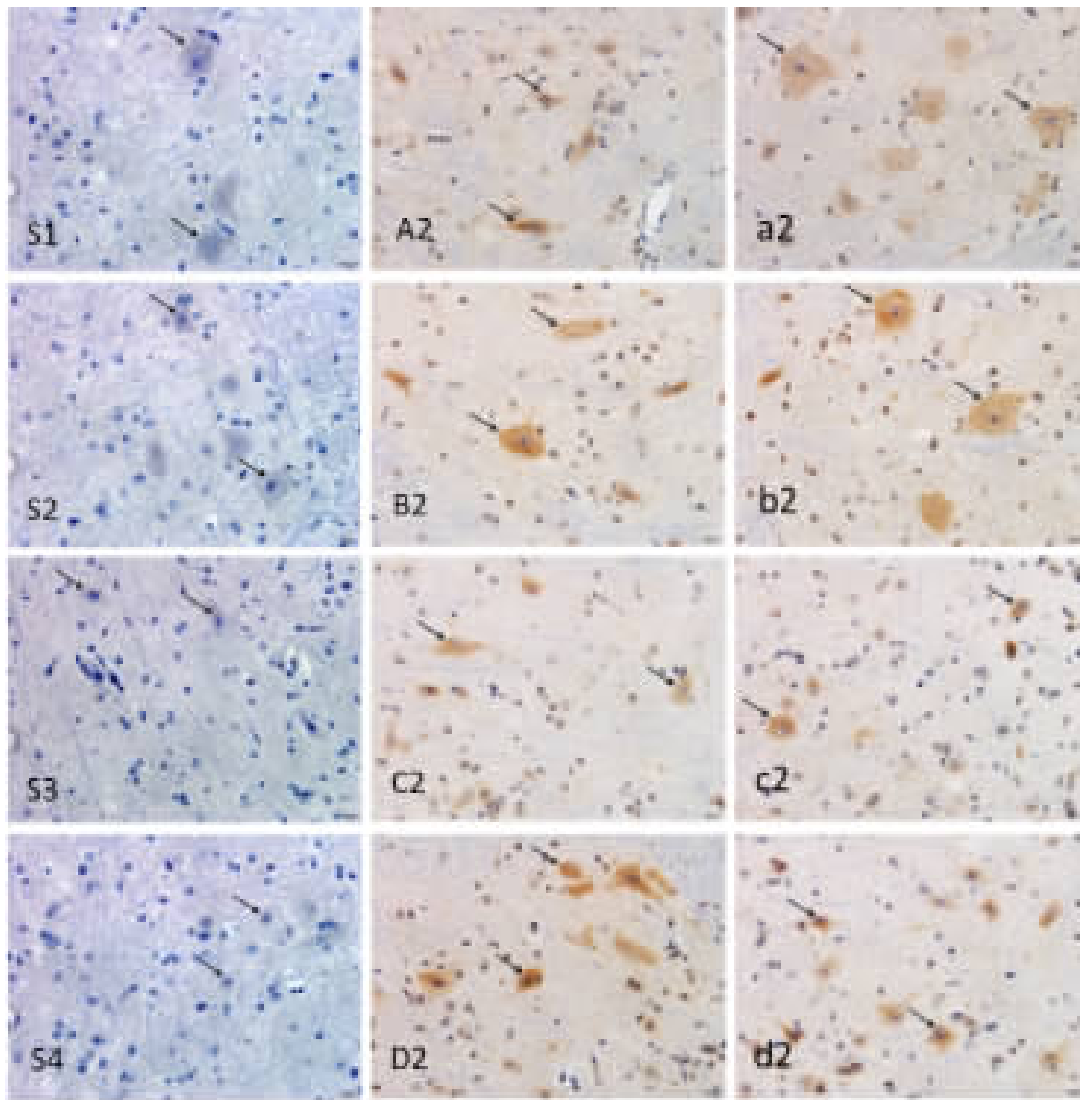


图3 各组脊髓组织中TIMP-1的免疫组化图像(SABC, $\times 400$)。S1、S2、S3、S4均为对照组,A2、B2、C2、D2分别为再灌注3h、6h、12h、24h模型组,a2、b2、c2、d2分别为给药3h、6h、12h、24h治疗组。对照组未见免疫阳性细胞,模型组与治疗组图中箭头指示免疫阳性神经元(神经元胞浆呈棕黄色淡染)

Figure 3 TIMP-1 immunohistochemical images in the spinal cord in different groups(SABC, $\times 400$). S1, S2, S3, S4: control group. A2, B2, C2, D2: model group at 3h, 6h, 12h, 24h after reperfusion. a2, b2, c2, d2: treatment group at 3h, 6h, 12h, 24h after treatment. Control group showing none immunopositive cells, model and treatment group showing immunopositive neurons indicated by thin arrows. The cytoplasm of neurons were brown stained

表3 各组动物不同时间点MMP-9、TIMP-1免疫阳性细胞数 ($n=4, \bar{x} \pm s$, 个/高倍视野)

Table 3 MMP-9, TIMP-1 immunopositive cells at different hours in different groups

	MMP-9			TIMP-1		
	对照组 Control group	模型组 Model group	治疗组 Treatment group	对照组 Control group	模型组 Model group	治疗组 Treatment group
3h	0	9.00 $\pm$ 1.63 ^①	8.50 $\pm$ 0.58	0	11.80 $\pm$ 0.96 ^①	12.30 $\pm$ 0.96
6h	0	23.80 $\pm$ 1.71 ^①	17.80 $\pm$ 0.96 ^②	0	12.30 $\pm$ 1.50 ^①	13.80 $\pm$ 0.96
12h	0	28.30 $\pm$ 1.50 ^①	20.80 $\pm$ 3.50 ^②	0	7.80 $\pm$ 0.96 ^①	10.50 $\pm$ 1.73 ^②
24h	0	34.80 $\pm$ 2.63 ^①	30.00 $\pm$ 2.16 ^②	0	7.80 $\pm$ 1.50 ^①	10.30 $\pm$ 0.96 ^②

注:①与对照组比较 $P<0.05$;②与模型组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with control group, $P<0.05$; ②Compared with model group, $P<0.05$

分布,再灌注 24h 达峰值。治疗组:再灌注 3h 与模型组比较并无明显差异,而再灌注 6h、12h、24h MMP-9 阳性细胞数较模型组明显减少。模型组 TIMP-1 阳性细胞主要为少数神经元细胞及少量血管内皮细胞,阳性细胞数随时间延长减少;治疗组 TIMP-1 阳性细胞数在各时间点均多于模型组,再灌注 12h、24h TIMP-1 免疫阳性细胞数与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 MMP-9、TIMP-1 的 mRNA 表达

见表 4。对照组 MMP-9、TIMP-1 仅有微量表达;模型组再灌注 3h MMP-9 表达升高,表达量随再灌注时间延长增加,再灌注 6h MMP-9 表达较对照组明显升高,并于 24h 达高峰。治疗组 MMP-9 表达较模型组减少,再灌注 6h、12h、24h 差异有统计学意义($P<0.05$)。模型组再灌注 12h、24h TIMP-1 表达较对照组明显降低($P<0.05$)。治疗组再灌注 12h、24h TIMP-1 表达较模型组明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

脊髓缺血再灌注损伤作为原发性脊髓损伤的继发性损害常造成脊髓神经元迟发性死亡,引起神经功能障碍甚至截瘫,给家庭和社会带来沉重的负担。脊髓损伤后的神经功能修复一直是困扰医学界的一大难题,虽然已有大量基础研究探究脊髓损伤的病理生理机制,至今尚无有效的预防和治疗脊髓缺血再灌注损伤的药物及方法。国内外已有大量文献报道 NRG 在心脏、脑、肝等部位的缺血再灌注损伤方面具有重要的保护作用, Hedhli 等^[16]研究发现 NRG/ErbB 信号通路在心肌细胞的存活和血管形成过程中发挥重要作用;李蜜腹等^[9]研究证实 NRG-1 β 对脑缺血再灌注损伤具有潜在的治疗作用。然而 NRG 对脊髓缺血再灌

注损伤的治疗效果尚未见报道。为探究 NRG 对脊髓缺血再灌注损伤是否存在保护作用,为临床治疗脊髓损伤寻找有效的治疗药物,本课题组在大鼠脊髓缺血再灌注损伤模型的基础上开展实验,初步研究 NRG 对脊髓缺血再灌注损伤的治疗效果。

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 是一组细胞外基质降解酶大家族,金属蛋白酶组织抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) 是其天然抑制剂,对维持细胞外基质的平衡起重要作用。近年来很多基础研究^[17,18]表明 MMP 参与了中枢神经系统损伤后多种病理过程。Duchosoy 等^[19]研究证实急性脊髓损伤后,缺血、缺氧作为一种信号,刺激炎性细胞、神经元、内皮细胞和胶质细胞,激活 MMP 系统,导致 MMP 的表达上调。范留欣等^[20]的研究证实脊髓损伤后 MMP-9 参与了继发性脊髓损伤病理过程,并诱导了神经细胞凋亡。本研究选用在脊髓损伤过程中具有代表性的 MMP-9、TIMP-1 作为观察指标,通过观察 NRG 对 MMP-9、TIMP-1 表达的影响初步验证 NRG 在脊髓缺血再灌注损伤过程中是否具有神经保护作用。

本研究结果显示,缺血再灌注模型组的大鼠后肢运动功能评分较对照组明显降低,脊髓组织病理损伤清楚可见;NRG 治疗组的大鼠后肢运动功能评分明显好于模型组,病理表现较模型组明显改善。免疫组化对照组未见 MMP-9、TIMP-1 阳性细胞;模型组 3h 出现 MMP-9 免疫阳性细胞,随再灌注时间延长,免疫阳性细胞数增加,阳性细胞着色程度逐渐加深,于再灌注 24h 达峰值;治疗组 MMP-9 免疫阳性细胞数较模型组减少,再灌注 6h、12h、24h 治疗组与模型组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。此结果与 de Castro 等^[21]的研究

表 4 各组动物不同时间点 MMP-9、TIMP-1 mRNA 的表达

($n=4, \bar{x} \pm s$)

Table 4 Expression of MMP-9, TIMP-1 mRNA at different hours in different groups

	MMP-9			TIMP-1		
	对照组 Control group	模型组 Model group	治疗组 Treatment group	对照组 Control group	模型组 Model group	治疗组 Treatment group
3h	4.93 $\pm$ 0.21	5.38 $\pm$ 0.25	5.35 $\pm$ 0.26	4.74 $\pm$ 0.23	4.53 $\pm$ 0.32	4.55 $\pm$ 0.26
6h	4.95 $\pm$ 0.24	6.53 $\pm$ 0.31 ^①	5.56 $\pm$ 0.22 ^②	4.76 $\pm$ 0.21	4.62 $\pm$ 0.21	4.65 $\pm$ 0.27
12h	4.96 $\pm$ 0.25	6.87 $\pm$ 0.29 ^①	5.74 $\pm$ 0.27 ^②	4.73 $\pm$ 0.25	3.83 $\pm$ 0.20 ^①	4.28 $\pm$ 0.22 ^②
24h	4.98 $\pm$ 0.23	7.53 $\pm$ 0.33 ^①	5.90 $\pm$ 0.31 ^②	4.76 $\pm$ 0.24	3.65 $\pm$ 0.32 ^①	4.25 $\pm$ 0.24 ^②

注:①与对照组比较 $P<0.05$;②与模型组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with control group, $P<0.05$; ②Compared with model group, $P<0.05$

结果一致。模型组 TIMP-1 免疫阳性细胞数较对照组减少;治疗组 TIMP-1 免疫阳性细胞数增多,再灌注 12h、24h 治疗组与模型组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$)。对照组 MMP-9、TIMP-1 的 mRNA 仅有较低水平表达,缺血再灌注模型组 MMP-9 的 mRNA 表达增加而 TIMP-1 的 mRNA 表达减少,NRG-1 β 治疗后 MMP-9 的 mRNA 表达较模型组明显减少,TIMP-1 的 mRNA 表达较模型组增加,并于再灌注后期差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

本研究通过观察缺血再灌注模型组与假手术对照组大鼠的后肢神经功能评分、病理变化及脊髓组织 MMP-9、TIMP-1 蛋白和 mRNA 水平的表达及动态变化,发现 MMP-9、TIMP-1 参与脊髓缺血再灌注损伤的病理过程。通过比较 NRG 治疗组与缺血再灌注模型组脊髓组织 MMP-9、TIMP-1 蛋白和 mRNA 水平的表达及其变化趋势,结果表明 NRG 可在脊髓缺血再灌注损伤过程中发挥神经保护作用,该作用的实现可能与 MMP-9 的表达下调和 TIMP-1 的表达上调有关,其具体保护机制可能是通过维持 MMP-9/TIMP-1 的平衡来稳定血-脊髓屏障,改善神经元生存的微环境,进而对脊髓缺血再灌注损伤发挥积极的神经保护作用。但 NRG 调控 MMP-9/TIMP-1 表达的信号通路机制及其他保护作用机制有待深入研究。

4 参考文献

- Xu Y, Li X, Liu X, et al. Neuregulin-1/ErbB signaling and chronic heart failure[J]. Adv Pharmacol, 2010, 59: 31-51.
- Matsukawa R, Hirooka Y, Ito K, et al. Central neuregulin-1/ErbB signaling modulates cardiac function via sympathetic activity in pressure overload-induced heart failure[J]. J Hypertens, 2014, 32(4): 817-825.
- Solomon W, Wilson NO, Anderson L, et al. Neuregulin-1 attenuates mortality associated with experimental cerebral malaria[J]. J Neuroinflammation, 2014, 11: 9.
- Jabbour A, Hayward CS, Keogh AM, et al. Parenteral administration of recombinant human neuregulin-1 to patients with stable chronic heart failure produces favourable acute and chronic haemodynamic responses[J]. Eur J Heart Fail, 2011, 13(1): 83-92.
- Gao R, Zhang J, Cheng L, et al. A Phase II, randomized, double-blind, multicenter, based on standard therapy, placebo-controlled study of the efficacy and safety of recombinant human neuregulin-1 in patients with chronic heart failure [J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 55(18): 1907-1914.
- 李蜜馥, 李鹏, 周景明, 等. TrkB 表达变化参与神经调节素-1 β 对大鼠脑缺血再灌注损伤保护作用的机制[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(20): 5053-5055.
- Newbern J, Birchmeier C. Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination[J]. Semin Cell Dev Biol, 2010, 21(9): 922-928.
- 卢奎, 胡斌, 黎捷, 等. 神经调节素对大鼠脑缺血再灌注损伤后炎症反应的抑制作用和机制研究 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(35): 6806-6809.
- Guo WP, Wang J, Li RX, et al. Neuroprotective effects of neuregulin-1 in rat models of focal cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2006, 1087(1): 180-185.
- Zivin JA, DeGirolami U. Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model[J]. Stroke, 1980, 11(2): 200-202.
- Wang XH, Zhuo XZ, Ni YJ, et al. Improvement of cardiac function and reversal of gap junction remodeling by neuregulin-1beta in volume-overloaded rats with heart failure[J]. J Geriatr Cardiol, 2012, 9(2): 172-179.
- Sawyer DB, Caggiano A. Neuregulin-1beta for the treatment of systolic heart failure[J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51(4): 501-505.
- 李琴, 张睿, 梅元武, 等. 神经调节素对大鼠脑缺血损伤的预防性治疗作用和机制 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2008, 7(4): 317-324.
- Cheng H, Cao Y, Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function[J]. Science, 1996, 273(5274): 510-513.
- 刘声亮, 范业文, 李岩, 等. 骨髓间充质干细胞移植脊髓损伤小鼠运动功能的恢复[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(45): 8471-8475.
- Hedhli N, Kalinowski A, S Russell K. Cardiovascular effects of neuregulin-1/ErbB signaling: role in vascular signaling and angiogenesis[J]. Curr Pharm Des, 2014, 20(30): 4899-4905.
- Yong VW, Power C, Forsyth P, et al. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system [J]. Nat Rev Neurosci, 2001, 2(7): 502-511.
- Hartung HP, Kieseier BC. The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system[J]. J Neuroimmunol, 2000, 107(2): 140-147.
- Duchossoy Y, Horvat JC, Stettler O. MMP-related gelatinase activity is strongly induced in scar tissue of injured adult spinal cord and forms pathways for ingrowing neurites [J]. Mol Cell Neurosci, 2001, 17(6): 945-956.
- 范留欣, 马龙, 孙长山, 等. 大鼠脊髓损伤后 MMP-9 表达和细胞凋亡的研究[J]. 中国医学创新, 2010, 7(25): 175-177.
- de Castro RJ, Burns CL, McAadoo DJ, et al. Metalloproteinase increases in the injured rat spinal cord[J]. Neuroreport, 2000, 11(16): 3551-3554.

(收稿日期:2016-03-05 末次修回日期:2016-06-29)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 李伟霞)