

甲基强的松龙对脊髓损伤后伤段 脊髓线粒体功能的影响

蔡卫华, 贾连顺, 叶晓健, 袁文, 陈雄生, 周许辉, 宋滇文

(第二军医大学长征医院骨科 200003 上海市)

【摘要】 目的:探讨脊髓损伤后伤段脊髓线粒体呼吸功能和线粒体内游离钙的变化和早期使用甲基强的松龙(MP)对其的影响。**方法:**54只SD大鼠,随机分组为假手术组(对照组)、脊髓损伤组(SCI组,采用Allen's打击法造成大鼠脊髓损伤模型)和脊髓损伤后应用MP治疗组(MP组),每组又分为处理后6h、12h、24h三个时间相,每个时间相6只。在各时间相处死动物后提取伤段脊髓线粒体,测定线粒体呼吸Ⅲ态(R3)、呼吸Ⅳ态(R4)、呼吸控制率(RCR)、磷氧比(P/O)和线粒体内游离Ca²⁺浓度。**结果:**SCI组在伤后6h、12h和24h R3、RCR和P/O显著低于对照组,R4和线粒体内游离Ca²⁺浓度显著高于对照组,差异有显著性($P<0.01$);伤后6h和12h MP组R3、RCR和P/O高于SCI组,R4和线粒体内游离Ca²⁺浓度低于SCI组,差异有显著性($P<0.01$);MP组R3、R4和RCR在6h和12h时与对照组之间无显著性差异,24h时R3、RCR和P/O低于正常对照组,有显著性差异($P<0.05$)。**结论:**脊髓损伤后伤段脊髓线粒体呼吸功能和线粒体内游离Ca²⁺浓度明显受到影响,线粒体内膜通透性增加,线粒体氧化磷酸化的偶联程度明显受到抑制。早期使用甲基强的松龙可明显改善线粒体的呼吸功能,抑制Ca²⁺内流,保护伤段脊髓线粒体的稳定性。

【关键词】 脊髓损伤;线粒体;钙超载;甲基强的松龙

中图分类号:R459.1,Q244,R683.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2005)-12-0749-04

Effects of methylprednisolone on mitochondrial function of injured spinal cord//CAI Weihua, JIA Lianshun, YE Xiaojian, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15(12): 749-752

【Abstract】 Objective: To study the effects of methylprednisolone on the injured spinal cord mitochondrial function in experimental spinal cord injury (SCI) model and its possible mechanisms. **Method:** A total of 54 SD rats were divided randomly into control group, SCI group (spinal cord injury group) and SCI followed MP treatment (MP group). The SCI model in adult SD rats were built based on modified Allen's method. Mitochondria was extracted from injured spinal cord tissue by using modified Estabrook's method at 6h, 12h and 24h prespectively after SCI. Then respiratory function index, including R3, R4, RCR, P/O and the contents of intramitochondria free calcium were measured. **Result:** R3, RCR and P/O in injured spinal cord mitochondria decreased significantly compared to the normal control group ($P<0.01$) at 6h, 12h and 24h after SCI, but the contents of intra mitochondria free calcium and R4 increased evidently ($P<0.01$). In MP group, R3, RCR and P/O in injured spinal cord mitochondria significantly increased compared to SCI group ($P<0.01$), but the contents of intramitochondria free calcium and R4 decreased evidently ($P<0.01$). There were significant difference between MP group and SCI group ($P<0.01$). **Conclusion:** The results suggest that mitochondrial respiratory function and the content of intramitochondria free calcium change significantly after SCI. Early administration of methylprednisolone could improve mitochondrial respiratory function while decrease the overload of intramitochondria free calcium in rats after SCI.

【Key words】 Spinal cord injury; Mitochondria; Calcium overload; Methylprednisolone

【Author's address】 Department of Orthopaedic Surgery, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai, 200003, China

第一作者简介:男(1971-),主治医师,医学博士,研究方向:脊柱伤病(现在南京医科大学第一附属医院脊柱中心 210029)
电话:(025)83714511-6781 E-mail:caiweihua_2008@sina.com

近几年来,线粒体等亚细胞器在中枢神经系统损伤后的继发性损伤中的作用日益受到重视。脊髓损伤后继发性损害可加重局部反应区损伤,

而细胞生命活动所需能量 90% 以上由线粒体氧化磷酸化提供^[1]。因此,脊髓线粒体呼吸功能的改变直接影响到神经细胞的功能^[2]。但有关脊髓损伤后伤段脊髓线粒体功能的变化和甲基强的松龙(methylprednisolone, MP)对其影响的报道较少。我们采用超速离心法分离出伤段脊髓线粒体,观察线粒体呼吸功能和线粒体内游离 Ca^{2+} 浓度等的变化及 MP 对其的影响,拟从亚细胞水平探讨脊髓损伤后继发性损害的病理生理演变过程和使用 MP 对其的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康成年 SD 大鼠 54 只,雌雄不限,体重 $250 \pm 30\text{g}$,上海海军医学研究所实验动物中心提供。随机分为:假手术组(对照组),脊髓损伤组(SCI 组)和脊髓损伤后应用 MP 治疗组(MP 组),每组又分为处理后 6h、12h、24h 三个时相组,每组 6 只,在干预结束后进行伤段脊髓线粒体提取,分别测定线粒体呼吸 III 态(R3)、呼吸 IV 态(R4)、呼吸控制率(RCR)、磷氧比(P/O)和线粒体内游离 Ca^{2+} 浓度等指标。

1.2 动物模型制备

1% 戊巴比妥钠 40mg/kg 行腹腔麻醉,以 T8~T9 为中心,暴露 T8~T9 段脊髓,在暴露的硬膜表面放置一 $3 \times 2\text{mm}$ 的弧形垫片。采用 Allen's 脊髓重物打击损伤模型,致伤能量 $10\text{g} \times 5\text{cm}$ 。MP 组脊髓损伤后立即予以 MP 治疗, 30mg/kg 尾静脉注射(15min 内注射完,仅一次使用 MP,以后不使用维持剂量);对照组仅暴露脊髓,不打击。术后处理:室温维持在 $23 \sim 25^\circ\text{C}$,保持干燥通风。每只大鼠分笼饲养,不限制进食和饮水,术后定时协助脊髓损伤大鼠排尿、排便。

1.3 脊髓组织线粒体的提取

根据邵擎东等^[2]的方法稍作改进。具体改进方法如下:各组在伤后相应时间取大鼠脊髓损伤段及其上下部分长约 2cm ;对照组取与 SCI 组相同节段和长度的脊髓组织。用预冷的生理盐水冲洗脊髓组织,滤纸吸干后称重。按 16ml/g 比例加入分离介质至 Teflon 匀浆器中,匀浆。然后将匀浆液倒入预冷的离心管中, 3000r/min 离心 10min,取上清液后配平, 15000r/min 离心 10min。弃上清液,沉淀部分再用分离介质充分漂洗, 15000r/min

离心 10min。弃上清液,沉淀中加入少许分离介质,约 0.5ml ,充分打匀制成线粒体悬液约 10mg/ml ,置于冰浴中待用。整个分离过程在冰浴中进行,离心在 $0^\circ\text{C} \sim 4^\circ\text{C}$ 条件下进行。

1.4 线粒体功能指标的测定

采用 Clark 氧电极法^[1]测定线粒体呼吸功能,根据线粒体呼吸耗氧量换算出 R3、R4、RCR、P/O 比值;参照 Reers 等方法^[3]测定线粒体内游离 Ca^{2+} 浓度。

1.5 统计学处理

所有参数用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 t 检验判定各实验组之间差异显著性。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 线粒体的呼吸功能和氧化磷酸化的变化

见表 1~4。SCI 组在伤后 6h、12h 和 24h R3 和 RCR 低于对照组, R4 高于对照组,差异有显著性($P < 0.01$);伤后 6h 和 12h MP 组 R3 和 RCR 高于 SCI 组, R4 低于 SCI 组,差异有显著性($P < 0.01$);MP 组 R3、R4 和 RCR 在 6h 和 12h 时与对照组之间无明显差异, 24h 时 R3 和 RCR 低于正常对照组,差异有显著性($P < 0.05$)。

SCI 组在伤后各时相 P/O 明显低于对照组,差异有显著性($P < 0.01$);在各时相 MP 组的 P/O 明显高于 SCI 组,有显著性差异($P < 0.01$);伤后 6h 和 12h MP 组和对照组之间无明显差异,但 24h 仍低于对照组($P < 0.05$)。

2.2 线粒体内游离 Ca^{2+} 水平的变化

见表 5。SCI 组在 6h 时伤段脊髓线粒体内游离 Ca^{2+} 水平明显升高,随着时间推移,线粒体内游离 Ca^{2+} 水平有所下降,但仍维持较高水平,与对照组相比,差异有显著性($P < 0.01$)。MP 组与 SCI 组之间差异亦有显著性($P < 0.01$),说明早期使用 MP 可以明显抑制 SCI 后线粒体内 Ca^{2+} 内流和积聚,从而减轻线粒体的损伤。

表 1 各组不同时间点线粒体 R3 变化

	$(\bar{x} \pm s, \text{nmol/mg/min})$		
	6h	12h	24h
对照组	16.75 ± 0.56	16.51 ± 0.65	16.41 ± 0.70
SCI 组	14.40 ± 0.65^{①}	15.03 ± 0.79^{①}	15.40 ± 0.79^{②}
MP 组	16.78 ± 0.44^{③}	16.44 ± 0.57^{③}	15.33 ± 0.57^{①③}

注:与对照组比较① $P < 0.01$;② $P < 0.05$;与 SCI 组比较③ $P < 0.01$

表 2 各组不同时间点线粒体 R4 变化

	($\bar{x} \pm s$, nmol/mg/min)		
	6h	12h	24h
对照组	5.11±0.46	4.99±0.30	5.13±0.36
SCI组	6.21±0.47 ^①	5.79±0.40 ^①	5.59±0.38 ^①
MP组	5.18±0.19 ^②	5.05±0.20 ^②	5.25±0.18 ^③

注:与对照组比较^① $P<0.01$;与 SCI 组比较^② $P<0.01$;^③ $P<0.05$ 表 3 各组不同时间点线粒体 RCR 变化 ($\bar{x} \pm s$)

	6h	12h	24h
对照组	3.31±0.41	3.33±0.31	3.22±0.30
SCI组	2.33±0.22 ^①	2.61±0.27 ^①	2.77±0.27 ^①
MP组	3.24±0.18 ^③	3.26±0.20 ^③	2.30±0.20 ^{②④}

注:与对照组比较^① $P<0.01$; ^② $P<0.05$; 与 SCI 组比较^③ $P<0.01$; ^④ $P<0.05$ 表 4 各组不同时间点线粒体 P/O 变化 ($\bar{x} \pm s$)

	6h	12h	24h
对照组	2.40±0.02	2.39±0.09	2.40±0.03
SCI组	2.04±0.02 ^①	1.76±0.04 ^①	1.64±0.02 ^①
MP组	2.41±0.02 ^②	2.39±0.03 ^②	2.21±0.05 ^{①②}

注:①与对照组比较 $P<0.01$; ②与 SCI 组比较 $P<0.01$ 表 5 各组不同时间点线粒体 Ca^{2+} 水平的变化

	($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/g}$)		
	6h	12h	24h
对照组	727.23±24.20	724.38±23.10	715.52±20.1
SCI组	1008.34±20.36 ^①	902.11±42.35 ^①	880.42±52.77 ^①
MP组	766.30±20.74 ^{②③}	790.61±16.35 ^①	820.36±47.10 ^{①④}

注:与对照组比较^① $P<0.01$; ^② $P<0.05$; 与 SCI 组比较^③ $P<0.01$; ^④ $P<0.05$

3 讨论

3.1 伤段脊髓线粒体呼吸功能的变化

脊髓损伤后继发性损害是导致脊髓神经功能难以逆转的主要因素,而细胞生命活动所需能量 90%以上由线粒体氧化磷酸化提供。因此,线粒体功能的改变直接影响神经细胞的功能。线粒体的呼吸被分为五种状态^[4]:呼吸 I 态,即缺乏苹果酸、谷氨酸或琥珀酸等氧化底物和 ADP 时;呼吸 II 态为 I 态状况下加入 ADP 后;呼吸 III 态为 II 态时再加入氧化底物(即快速氧化期);呼吸 IV 态为 III 态状态下 ADP 耗尽以后(此期氧吸收减少);呼吸 V 态为 IV 态状态下氧耗尽后(此时呼吸作用停止)。评价线粒体更多的注重于呼吸 III、IV 态,通过对它

们的研究,可以得到代表线粒体呼吸功能的几个重要参数如 RCR(RCR=R3/R4)和 P/O。RCR 是评价线粒体完整性和氧化磷酸化偶联程度的灵敏指标。而 P/O 比值是代表氧化磷酸化效率的重要指标,P/O 的下降预示氧化磷酸化脱偶联。

有研究报道脑创伤后早期(伤后 6~12h)线粒体呼吸活性 R3、RCR、P/O 和氧化磷酸化效率(OPR)均明显下降,R4 相对正常或升高^[5]。本实验中 SCI 组在伤后 R3、RCR、P/O 显著低于对照组,同时 R4 显著高于对照组,差异有显著性。表明脊髓损伤后伤段脊髓线粒体内膜底物通透性、呼吸链和 ATP/ADP 移位体等明显受到影响,线粒体内膜通透性增加,也说明损伤的线粒体 RCR 的变化是由 R3 降低和 R4 升高共同变化造成。线粒体氧化磷酸化偶联程度明显受到抑制,利用氧化释放能量转化为 ATP 的效率明显降低。

本实验中,伤后 6h 和 12h MP 组的 R3 明显高于 SCI 组,R4 明显低于 SCI 组,有显著性差异;在 6h 和 12h 时 MP 组的 RCR 明显高于 SCI 组,有显著性差异,在 24h 低于 SCI 组,有显著性差异;伤后 6h 和 12h MP 组的 RCR 和 P/O 与对照组之间无明显差异,但 24h 仍低于对照组。说明早期大剂量 MP 的使用可明显减轻对线粒体内膜底物通透性、呼吸链的影响,降低线粒体内膜通透性,改善线粒体氧化磷酸化的偶联程度和提高线粒体能量转化的效率,对伤段脊髓线粒体的稳定性和功能有一定的保护作用。

3.2 伤段脊髓线粒体游离钙的变化

游离钙在线粒体中的变化虽然早已引起人们重视,但研究结果尚不多,原因是测定线粒体游离钙比较困难。当组织细胞缺血缺氧时,细胞能量代谢障碍,细胞内钙超负荷,线粒体膜通透性增高,线粒体内游离钙水平上升。随着荧光探针的应用逐渐普及,这一难题已得到初步的解决,常用的方法为 Reers 等提出的 Fura-2 法^[3]。

神经细胞一旦发生 Ca^{2+} 超载,则可触发一系列有害反应:(1)干扰能量代谢,过剩的 Ca^{2+} 沉积于线粒体内,干扰线粒体内的氧化磷酸化过程,使线粒体氧化磷酸化电子传递脱偶联,ATP 产生锐减, $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP 酶}$ 、 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP 酶}$ 等活性受抑制。(2)脂质代谢紊乱, Ca^{2+} 可激活磷脂酶 A2 和 C,使神经细胞膜系统磷脂降解,游离脂肪酸特别是花生四烯酸大量释放,并诱发脂质过氧化反应,

使细胞膜系统受损,流动性降低,通透性增加,导致细胞肿胀^[6]。此外,在氨基酸代谢过程中产生的血栓素 A2、前列腺素、白三烯等物质,可造成微循环障碍,使血流更加减少。(3)作用于血脑(脊髓)屏障,细胞内 Ca^{2+} 积聚时, Ca^{2+} 进入血管内皮细胞增加,刺激内皮细胞使之收缩,使内皮细胞紧密连接扩大,胞饮作用增强,血脑(脊髓)屏障通透性增高,加重脑或脊髓水肿^[7]。

游离钙在细胞功能中的作用愈来愈受到重视。它不仅参与细胞兴奋过程,而且调节细胞许多生化、代谢过程,如激素的分泌释放,离子通道开闭、细胞内许多酶反应的激活和抑制^[8]。同时,胞质内钙离子的异常分布和增加,能直接严重影响细胞功能,并导致细胞死亡^[7]。本实验结果表明,SCI 组和伤后 6h,伤段脊髓线粒体游离 Ca^{2+} 水平明显升高,随着时间推移,线粒体游离 Ca^{2+} 水平有所下降,但仍维持较高水平,说明脊髓损伤后早期线粒体内 Ca^{2+} 蓄积明显;MP 组与 SCI 组之间差异有显著性,说明早期使用 MP 可以明显抑制脊髓损伤后线粒体内 Ca^{2+} 内流和积聚,从而减轻线粒体的损伤。

3.3 MP 对脊髓损伤的保护作用

MP 对脊髓损伤的保护作用有:(1)减轻脂质过氧化反应,维持和稳定细胞膜完整;(2)改善伤段脊髓的血流^[8]。本实验结果显示,SCI 组 R3、RCR、P/O 明显上升,R4 明显下降,MP 治疗组 RCR 和 P/O 比值明显升高,线粒体内 Ca^{2+} 明显下降,表明 MP 能改善脊髓线粒体氧化磷酸化功能。线粒体有摄取、积聚二价阳离子如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等作用,调节胞浆游离 Ca^{2+} 的浓度,从而实现细胞的释放反应、受体调节、信息传递。研究表明,细胞内和线粒体内 Ca^{2+} 超载是脊髓损伤后线粒体功能障碍、结构受损的重要原因。MP 对 Ca^{2+} 有高度亲和力,减少 Ca^{2+} 内流,从而降低磷脂酶活性,使线粒体膜结构保持完整性,又使自由基形成减少。本研究表明,早期使用 MP 治疗可提高伤段脊髓线粒体的呼吸功能,对脊髓损伤有一定的保护作用。

4 参考文献

1. Zorov DB. Mitochondrial damage as a source of diseases and aging:a strategy of how to fight these [J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1275(122):10-15.
2. 邵擎东,肖建如,杨金华,等.颈髓损伤对颈髓细胞线粒体膜流动性与线粒体呼吸功能的影响[J].中华创伤杂志,2000,16(8):469-470.
3. Reers M, Kelly RA, Smith TW. Calcium and protein activities in rat cardiolo mitochondria: effect of matrix environment on behaviour fluorescent probes[J]. J Biochem, 1989, 257(2):131-142.
4. 张增明译. 生物化学精华[M]. 上海:上海科学普及出版社, 1989.298-301.
5. Vink R, Golding EM, Headrick JP. Bioenergetic analysis of oxidative metabolism following traumatic brain injury in rats [J]. J Neurotrauma, 1994, 11(3):265-268.
6. McKenzie AL, Hall JJ, Aihara N, et al. Immunolocalization of endothelin in the traumatized spinal cord: relationship to blood spinal cord barrier breakdown [J]. J Neurotrauma, 1995, 12(3):257-268.
7. Salzman SK, Acosta R, Beck G, et al. Spinal endothelin content is elevated after moderate local trauma in the rat to levels associated with locomotor dysfunction after intrathecal injection [J]. J Neurotrauma, 1996, 13(1):93-101.
8. Liu D, Li L. Prostaglandin release by spinal cord injury mediates production of hydroxyl radical, malondialdehyde and cell death: a site of neuroprotective action of methylprednisolone [J]. J Neurotraum, 2001, 77(4):1036-1047.

(收稿日期:2005-03-14 修回日期:2005-07-04)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)

消息

《中国脊柱脊髓杂志》编辑部征文与倡议

腰椎疾患是骨科常见病,是脊柱外科或相关论文评定的重要内容,采用正确的评估方法和实用的评定标准,对腰椎疾患的病情判断、治疗方法选择、治疗效果及预后评估有着重要意义。由于评定方法不统一,使治疗效果的横向比较产生困难,不利于学术交流。目前国内采用的多为“洋”标准,与 13 亿人口大国极不相称,且有的标准也比较陈旧,如常用的“JOA”标准,并不全面,也缺乏时代特点。

故我们建议专家们参照过去国内外相关标准,结合我国实际情况,提出自己对评定标准的见解或新的标准(单一疾病的或腰椎疾患的),供同道们讨论。对大家认为较好的或满意的标准,编辑部将在一定时间组织全国有关专家进一步讨论认定后,供全国同道参照!