

犬马尾神经受压后腰骶髓中一氧化氮合酶活性与神经细胞凋亡的相关性

姬 钢¹, 贺西京², 李浩鹏²

(1 西安市中心医院 710003; 2 西安交通大学第二医院骨科 710004)

【摘要】目的:研究马尾神经受压后一氧化氮合酶(NOS)活性变化与腰骶髓神经细胞凋亡的关系。**方法:**将 27 只健康家犬随机分为 3 组:A 组 21 只,水囊置于椎管内并注水加压制成马尾神经压迫模型(马尾神经压迫组);B 组 3 只,置入水囊但未注水加压(假手术组);C 组 3 只(正常组)。A 组再分为 7 组,即马尾神经持续受压 4h、8h、12h、24h、48h、72h 和 168h 组(n=3)。检测各组腰骶髓组织中的 NOS 活性变化,用 TUNEL 法标记凋亡神经元和神经胶质细胞,光镜(HE 染色)和透射电镜观察细胞形态学改变。**结果:**B 组和 C 组腰骶髓神经细胞形态未见异常,A 组光镜及电镜观察结果均提示神经细胞发生凋亡。B 组和 C 组未见凋亡神经元,A 组于压迫后 12h 可见凋亡神经元,24~48h 神经元凋亡最多。B 组与 C 组腰骶髓组织中 NOS 活性比较无显著性差异 ($P>0.05$),A 组于压迫 12h 后,NOS 活性即明显增高,与 B 组和 C 组比较有显著性差异 ($P<0.05$),24~48h 达到高峰,72h 后开始下降。**结论:**犬马尾神经受压后腰骶髓组织中 NOS 活性增高,与相应神经元凋亡存在正相关。

【关键词】一氧化氮合酶;马尾神经;凋亡;神经元;腰骶髓

中图分类号:R683.2,Q599 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2007)-01-0055-04

Correlation between the activity of NOS and neuron apoptosis after cauda equina nerve compression in dogs/JI Gang,HE Xijing,LI Haopeng/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord,2007,17(1):55-58

【Abstract】 Objective:To study the relationship between the activity of NOS and neuron apoptosis of lumbosacral marrow after caudal equine nerve compression in dogs.**Method:**27 healthy dogs were randomly divided into three groups;the compression caudal equine nerve group($n=21$);the fake operation group($n=3$);and the normal group ($n=3$).Furthermore,the test group was randomly divided into 7 subgroups,namely,with caudal equine nerve compressed for 4h,8h,12h,24h,48h,72h and 168h($n=3$) respectively.The fake operation group was control group.The caudal equine nerve compressed model made was constructed by putting a hydrosac in vertebral canal.The activity of NOS was detected,and the apoptosis nerve cells were labeled by TUNEL marking method.The morphology changes of cells were observed by microscopic examination (HE staining) and transmission electron microscope.**Result:**No abnormal morphological change of cells was observed in fake operation group and the normal group,but apoptosis of cells in test group were observed under microscopic examination and transmission electron microscope.No apoptosis nerve cells labeled by TUNEL were observed in both the fake operation group and the normal group,the apoptosis neuron were observed in the 12h subgroup in group A,and reached peak between 24h and 48h.No distinct difference in the activity of NOS was detected between the normal group and the fake group (the control group)($P>0.05$).The activity of NOS increased obviously 12h after being pressed in group A,which had significant difference compared with group B and C($P<0.05$),and activity of NOS reached peak at 24-48h,while decreasing after 72h.**Conclusion:** There is positive correlation between the activity of NOS and apoptosis of nerve cells in lumbosacral marrow of caudal equine being compressed.

【Key words】 Nitric oxide synthase(NOS);Caudal equine nerve;Apoptosis neuron;Lumbosacral marrow

【Author's address】 Department of Orthopaedics,Xi'an Center Hospital,Xi'an,710003,China

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271310)

第一作者简介:男(1972-),副主任医师,医学硕士,研究方向:脊柱脊髓损伤

电话:(029)87218916-5010 E-mail:jigangdoctor@163.com

近年来,随着对一氧化氮(NO)研究的不断深入,发现其在中枢神经系统中具有重要的作用,参与很多疾病的发病过程,已成为神经病学和神

经生物研究的热点之一。一氧化氮合酶(NOS)为其唯一限速酶。大量研究表明,中枢神经系统(CNS)在缺血、创伤、感染和免疫疾病等因素作用下引发的神经损伤可诱导 NOS 合成过量的 NO,具有直接的神经毒性作用^[1,2]。赵立等^[3]进一步研究发现 NO 在脊髓继发性损伤中起重要作用。本实验应用空硅胶水囊置入犬椎管内,对犬马尾神经进行一次性压迫造成马尾神经损伤模型,取相应腰骶节段脊髓组织对前角运动神经元细胞进行形态学观察及检测,并于光镜、电镜下进行凋亡神经细胞计数,同时检测相应脊髓组织中的 NOS 活性,探讨在犬马尾神经受压后相应脊髓组织中的 NOS 活性变化及其与相应脊髓神经细胞凋亡的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂

成年健康家犬 27 只,雌雄不拘(雄 15 只,雌 12 只),体重 12~14kg,清洁级,由西安交通大学医学院实验动物中心提供并饲养。所用主要试剂:NOS 检测试剂盒购自南京建成生物技术公司,TUNEL 试剂盒购自华美生物技术公司。

1.2 动物分组

27 只家犬随机分为 3 组,马尾神经压迫组(A 组)21 只,假手术组(B 组)3 只,正常组(C 组)3 只。马尾神经压迫组又分为 7 组,即压迫 4h、8h、12h、24h、48h、72h 和 168h 组($n=3$)。

1.3 动物模型建立

动物手术前 12h 禁食,以 10g/L 硫贲妥钠(40mg/kg)静脉注射麻醉,将犬俯卧置于手术台上,腰背部去毛,严格无菌操作,以 L6 下缘为中心,取腰背部正中切口,长约 40mm,于 L6 下缘咬除椎板约 10×5mm 大小,空硅胶水囊平整贴覆于椎管内壁,注水管穿过腰背肌置于一侧皮下,严密缝合,无菌包扎切口。术后给予青霉素(10 万 U/kg/d)静滴 3d,常规饲养。2 周后,以伤口无感染、无马尾神经损伤症状者为入组标准。A 组于空水囊置入后 2 周开始注水压迫 L6 椎体节段马尾神经至出现马尾综合征表现(大小便失禁,肛门外翻,针刺下肢无反应,双下肢不能站立),于压迫后 4h、8h、12h、24h、48h、72h 和 168h 时各处死 3 只动物并取发出马尾神经的腰骶髓作为标本,分成 3 份,分别进行 NOS 活性检测、光镜观察、电镜观

察。B 组仅置入水囊,未做注水压迫;C 组不作任何处理,直接取材。

1.4 凋亡细胞形态学观察及检测

光镜观察:切片厚约 5 μ m,常规 HE 染色,西安交通大学病理系阅片。电镜观察:2.5%戊二醛固定后由电镜专业人员观察。原位细胞凋亡检测:采用 TUNEL 法,严格按照试剂盒说明操作。阳性标准,光镜下细胞核呈棕黄色者为 TUNEL 染色阳性细胞,高倍镜下随机观察 6 个不同视野,进行凋亡细胞计数,计算阳性细胞平均数。

1.5 NOS 活性测定

将腰段脊髓组织标本加生理盐水制成 10% 组织匀浆,用 4000r/min 离心 15min 取上清,检测 NOS 活性,检测过程严格按照 NOS 试剂盒说明书进行。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件包进行显著性检验和相关性分析。组间比较采用 t 检验,所得数据用均数加标准差($\bar{x} \pm s$)表示,相关分析采用 Pearson 相关检验, $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

本组实验动物 27 只,完成实验并进入结果分析 27 只,无脱失者。

细胞凋亡及 NOS 活性检测结果见表 1。B 组和 C 组均未见阳性神经元细胞。A 组于压迫后 4~8h 未见阳性神经元细胞,12h 后可见阳性神经元细胞,24~48h 神经元凋亡细胞较多(图 1~5,后插图 III)。B 组 NOS 活性与 C 组比较无显著性差异($P > 0.05$)。A 组 12h、24h、48h、72h 及 168h 时间点

表 1 马尾神经受压后不同时间点与对照组腰骶髓组织中凋亡神经元计数及 NOS 活性 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别		凋亡细胞数 (个/高倍视野)	NOS 活性 (U/mg·prot)
A 组	4h	/	2.37±0.41
	8h	/	2.70±0.29
	12h	2.6±1.3	3.85±0.49 ^①
	24h	4.3±2.7	4.42±0.53 ^①
	48h	6.3±1.7	4.69±0.39 ^①
	72h	2.9±2.1	4.27±0.41 ^①
	168h	2.3±3.4	3.65±0.50 ^①
B 组		/	2.41±0.40
C 组		/	2.21±0.32

注:①与 B 组和 C 组比较 $P < 0.05$

的 NOS 活性均明显高于 B 组和 C 组, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。相关性分析显示 NOS 活性增高与神经细胞凋亡检测结果呈显著正相关, 相关系数为 0.941 ($P < 0.01$)。

3 讨论

凋亡是一种能量依赖性的细胞自我死亡的主动过程。近年来已证实脊髓损伤 (SCI) 后广泛存在神经细胞凋亡, 表明神经细胞凋亡在 SCI 后继发性损伤中起重要作用^[4,5]。Martin 以大鼠单侧坐骨神经抽出模型研究认为, 脊髓运动神经元的死亡是 DNA 损伤引起的依赖于 p53 和 Bax 表达的细胞凋亡^[6]。张烽等^[7]经实验证实大鼠坐骨神经挤压伤后腰髓运动神经元和背根神经等感觉神经元均有凋亡细胞出现。史建刚等^[8]发现, 家兔马尾神经受压后骶髓前角细胞病理改变主要方式为凋亡。Olmarker 等^[9]采用猪进行马尾神经压迫试验, 结果当压强达 13.33、26.66kPa (100、200mmHg) 时, 肢体出现瘫痪, 马尾神经发生组织学形态改变。我们在本实验中发现, 当压迫强度达 100mmHg 时, 犬开始出现剧烈反应, 浑身抖动, 双下肢剧烈抽动, 压力持续约 10min 后肌力稍减退约 4 级, 下肢针刺反应能力差, 当压强持续增至 120mmHg 继续维持 10min 后, 出现肛门外翻, 大小便失禁, 下肢肌力进一步减退, 为 1~3 级, 下肢对针刺无明显反应。将压强持续增至 140mmHg 维持约 10min 后, 下肢肌力均完全消失。由此我们认为动物马尾神经对压迫的耐受程度随种属不同而不同, 同种动物之间也可能存在个体差异。当然, 本实验中个体差异也可能与水囊置入深度存在差异有关。但当压强达到一定程度并随着压迫时间的延长, 马尾神经均会严重损害。

NO 是 L-精氨酸在 NOS 作用下氧化生成的一种极不稳定的气体, 具有活跃而广泛的生物学活性, 主要表现为其作为信使分子的功能和对生物体的细胞毒性作用^[10]。NO 导致细胞损伤的生化机制可能是: ①与细胞内产生的 O_2^- 相互作用, 形成超氧亚硝酸化合物, 这些化合物性质稳定并可分解其它细胞, 引起明显的组织损伤; ②引起细胞核酸亚硝酸化, 从而破坏 DNA 双螺旋结构; ③抑制某些与细胞呼吸和 DNA 复制有关的关键酶活性。当 NO 与这些关键酶 (线粒体 NADH、泛醌氧化还原酶及鸟氨酸酶) 的铁离子结合时, 可导致

其灭活, 使线粒体呼吸链的正常功能受抑制和靶细胞中铁的丧失^[11], 表现出细胞毒及组织损伤。NO 除可直接引起 DNA 损伤外, 还可上调 p53mRNA 的表达, 致 p53 蛋白在细胞核内集聚, 直接作用于 DNA 或阻止细胞周期进展, 使受损细胞停滞于 G1 期, 从而诱导细胞凋亡^[12]。

由于 NOS 为 NO 合成的唯一限速酶, 所以常用测定 NOS 活性的方法来反映 NO 的含量。根据 NOS 功能分为原生型 (cNOS) 和诱生型 (iNOS)。目前比较一致的结论是 iNOS 具有组织损伤的作用, iNOS 主要存在于巨噬细胞及单核细胞等内, 其产生的 NO 最初被发现与这些细胞杀灭肿瘤细胞及真菌的作用有关, 但在损伤等病理情况下, iNOS 常有过度表达的倾向, 生成过量的 NO, 而过量的 NO 可通过参与强毒性氧自由基的形成、抑制多种与细胞代谢有关的酶、直接损伤 DNA 等途径造成或加重组织、细胞的损伤^[13-15]。

本实验对犬马尾神经进行一次性压迫造成马尾神经损伤模型, 取发出马尾神经的腰骶髓组织对前角运动神经元细胞进行形态学观察及检测, 并于光镜、电镜下进行凋亡神经元细胞计数, 同时检测相应脊髓组织 NOS 活性。结果表明, 马尾神经受压后 8h 以内, NOS 活性未见明显升高, 压迫 12h 后, 相应脊髓组织中 NOS 活性明显升高, 与对照组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 24~48h 达到高峰, 72h 开始下降, 至 168h 与对照组比较, 差异仍有显著性。结合脊髓神经细胞凋亡检测结果, 行 Pearson 相关分析提示 NOS 活性升高与神经细胞凋亡在犬马尾神经受压实验中呈正相关。NOS 通过生成大量的 NO 可能参与了犬马尾神经受压后腰骶髓神经细胞凋亡过程。

4 参考文献

1. Dawson VL, Dawson TM, Bartly DA, et al. Mechanism of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures [J]. J Neurosci, 1993, 13(6): 2651-2661.
2. Maiese K, Boniece I, DeMeo D, et al. Peptide growth factors protect against ischemia in culture by preventing nitric oxide toxicity [J]. J Neurosci, 1993, 13(7): 3034-3040.
3. 赵立, 李涛, 贾连顺. 一氧化氮合酶活性的变化对大鼠继发性损害的影响 [J]. 中华医学杂志, 1998, 78(1): 27-29.
4. Liu XZ, Xu XM, Hu R, et al. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury [J]. J Neurosci, 1997, 17(14): 5395-5406.
5. Nesic O, Xu GY, Mcadoo D, et al. IL-1 receptor antagonist

- prevents apoptosis and caspase-3 activation after spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 2001, 18(9):947-956.
6. Altman J. Programmed cell death: the paths suicide[J]. TINS, 1992, 15(8):278-281.
7. 张烽, 顾玉东, 徐建光. 大鼠坐骨神经损伤后神经元细胞凋亡的初步观察[J]. 中华手外科杂志, 2000, 16(1):53-55.
8. 史建刚, 贾连顺, 李家顺, 等. 实验性马尾神经综合征家兔骶髓前角细胞凋亡的观察[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(1):83-86.
9. Olmarker K, Holm S, Rydevik B. Importance of compression onset rate for the degree of impairment of impulse propagation in experimental compression injury of the porcine cauda equina[J]. Spine, 1990, 15(5):416-419.
10. Davies M, Fulton G, Hagen P. Clinic biology of nitric oxide[J]. J Bone Joint Surg (Br), 1995, 82(12):1598-1610.
11. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway[J]. New Engl J Med, 1993, 329(27):2002-2012.
12. Amore A, Emancipator SN, Cirina P, et al. Nitric oxide mediates cyclosporine-induced apoptosis in cultured renal cells[J]. Kidney Int, 2000, 57(4):1549-1559.
13. Iadecola C, Zhang F, Casey R, et al. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene [J]. J Neurosci, 1997, 17(23):9157-9164.
14. Zhao X, Hoensel C, Araki E, et al. Gene-dosing effect and persistence of reduction in ischemic brain injury in mice lacking inducible nitric oxide synthase [J]. Brain Res, 2000, 872(1-2):215-218.
15. Castaneda AA, Denning JW, Chang L, et al. Does upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) render the stomach more susceptible to damage[J]? J Surg Res, 1999, 84(2):174-179.

(收稿日期:2005-11-14 末次修回日期:2006-10-30)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)

消息

第二届全国微创脊柱外科学术会议 暨 2007(长沙)国际内镜脊柱外科技术高峰论坛

现代外科的发展趋势是手术的有限化、微创化、替代化和智能化,微创脊柱外科(minimal invasive spine surgery, MISS)的时代已经来临。在中国康复医学会的领导下和国内很多老专家的支持下,2003 年中国脊柱脊髓损伤专业委员会成立了微创脊柱外科学组,进一步推动了 MISS 在我国的迅猛发展,并已取得不少成绩,但同时也存在一些问题。为总结经验和教训、规范治疗,以及促进 MISS 在我国的健康发展。中国康复医学会脊柱脊髓损伤专业委员会决定于 2007 年 6 月 15 日至 6 月 17 日在湖南省长沙市主办第二届全国微创脊柱外科学术会议。会议期间将邀请国内外知名微创脊柱外科专家作专题学术报告,并就相关问题进行深入讨论。本次大会将充分展示近年来国内外微创脊柱外科最新成果与进展,是广大脊柱外科医生切磋技艺、交流信息、总结经验的良好机会,必将使我国微创脊柱外科水平迈上一个新台阶。

主办单位:中国康复医学会脊柱脊髓损伤专业委员会微创脊柱外科学组,《中国脊柱脊髓杂志》编辑部。

承办单位:中南大学湘雅二医院。

学科分类:创伤及骨科学。

会议内容与形式:专家报告、专题讨论与成果交流、继续教育等。

征文内容:与微创脊柱外科相关的临床与基础研究。

征文要求:(1)2007 年 5 月 10 日前未曾公开发表的论文;(2)论文应具有先进性、科学性和实用性;(3)提供 500~800 字用 A4 纸 4 号字体打印的论著摘要,一律按结构式摘要书写(目的、方法、结果、讨论与结论)并附光盘(Word 文档格式)。请注明作者姓名、工作单位、通讯地址、邮政编码和联系电话。

截稿日期:2007 年 5 月 10 日(以当地邮戳为准),逾期不予受理。

投稿地址:湖南省长沙市人民中路 139 号,中南大学湘雅二医院脊柱外科王冰先生收,邮政编码:410011;电话:0731-5295825 或 5295624/13607445269

E-mail:gh_lv@2118.cn 或 Bingwang20021972@yahoo.com.cn。

欢迎踊跃投稿、参会!