

甲基强的松龙预处理对缺血再灌注损伤 脊髓中热休克蛋白 27 表达的影响

夏 磊, 杜 琳, 殷铁林, 李来好, 周若南
(郑州大学第一附属医院骨科 450052 河南省郑州市)

【摘要】目的:观察不同时间预防性应用甲基强的松龙(methylprednisolone, MP)后脊髓缺血再灌注损伤局部热休克蛋白 27(HSP27)表达的变化,探讨 MP 预防脊髓缺血再灌注损伤的最佳用药时间。**方法:**75 只 SD 大鼠随机分为 A、B、C、D、E 组,每组 15 只。A 组仅暴露腹主动脉,而不做其他处理;B、C、D、E 组均通过夹闭腹主动脉 30min 造成脊髓缺血再灌注损伤,C、D、E 组分别于损伤前 30min、1h、3h 尾静脉注射 30mg/kg MP, B 组于损伤前 30min 尾静脉注射与 MP 组等容量的生理盐水。A 组于术后 3h、其他组于损伤后 3h 取脊髓标本固定、切片,行 HE 染色观察脊髓神经元胞体、胞核、核仁的形态,神经元的极性和尼氏体的染色情况;行免疫组化染色检测 HSP27 表达,用染色阳性物质平均吸光度值 A 代表相对含量。**结果:**HE 染色显示, A 组为正常的神经元表现; B 组神经元胞体萎缩,胞核、核仁、尼氏体均显示不清,极性消失; C 组胞体萎缩较 B 组明显减轻,可观察到胞核和核仁,极性存在,尼氏体显示欠均匀; D 组胞体萎缩较重,个别神经元内无法分辨胞核、核仁,极性不明显,尼氏体染色不均匀; E 组与 B 组比较无明显差别。A、B、C、D、E 组的 HSP27 染色阳性物质平均吸光度值 A 分别为 63.76 ± 3.02 、 100.32 ± 4.13 、 132.05 ± 5.03 、 121.92 ± 4.68 、 102.16 ± 5.96 , C 组、D 组 HSP27 表达均较 B 组增强 ($P < 0.05$),且 C 组与 D 组比较有显著性差异 ($P < 0.05$), E 组和 B 组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。**结论:**缺血再灌注损伤前 30min 使用 MP 可最大程度上调 HSP27 的表达,减轻脊髓缺血再灌注损伤。

【关键词】甲基强的松龙;脊髓;缺血再灌注损伤;热休克蛋白

中图分类号:R364.1, R459.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-12-0939-03

The expression of heat shock protein 27 in ischemia-reperfusion spinal cord injury interfered with methylprednisolone/XIA Lei, DU Lin, YIN Tielin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(12): 939-941

【Abstract】Objective:To study the interference effect of methylprednisolone(MP) at different time points on the expression of heat shock protein 27 (HSP27) in ischemia-reperfusion spinal cord injury.**Method:**75 SD rats were divided into five groups randomly ($n=15$):Group A, B, C, D and E. In group A, aortic artery was exposed alone as control. Animals in group C, D and E all underwent 30min of occlusion to aortic artery, and animals in group C, D and E received 30mg/kg of MP at 30min, 1h and 3h prior to injury respectively. Animals in group B received same dose of normal saline as control before injury. The spinal cord specimen from group A 3h after surgery and from other groups 3h after injury were harvested, embedded, sliced and stained immunohistochemically. The neuron cell body, nucleus, nucleolus, polarity and Nissl body of the neurons were observed histopathologically, and the level of HSP27 was tested immunohistochemically. The absorbance value (A) of the positive stained substance stand for the intensity of HSP27 expression.**Result:**From HE stained sections, the specimen in group A displayed normal neuron; atrophy of the neurons, blur of nucleus, nucleolus and Nissl body, and disappearance of polarity were observed in group B. Atrophy of the neuron was alleviated in group C than in group B. The nucleus and nucleolus can be seen clearly, polarity existed but the Nissl body was not homogeneous in group C. Compared with group C, neuron atrophy was more severe in group D, Nucleus, nucleolus and polarity can't be seen clearly in certain neurons and the Nissl body was not homogeneous either in group D. No obvious difference of above parameters were seen between group E and group B. The intensity of HSP27 expression differed among each group, and the value of absorbance of each group was

63.76±3.02, 100.32±4.13, 132.05±5.03, 121.92±4.68, 102.16±5.96 respectively. The expression in group C and D was higher than that in group B ($P<0.05$), and also statistical significance was found between group C and group D ($P<0.05$). There is no significant statistical difference between group E and group B ($P>0.05$).

Conclusion: Expression of HSP27 in spinal cord can be upregulated after use of MP 30min prior to ischemia-reperfusion injury.

【Key words】 Methylprednisolone; Spinal cord; Reperfusion injury; Heat shock protein

【Author's address】 Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, 450052, China

在某些导致脊髓缺血因素去除后,脊髓恢复血供,却出现了明显的功能障碍,甚至出现不可逆性脊髓神经元迟发性死亡,此现象称为脊髓缺血再灌注损伤。热休克蛋白 27 (heat shock protein 27, HSP27) 是一种作用广泛的保护性蛋白,能提高细胞对不利环境的适应性反应。有学者^[1]证实,在大鼠急性脊髓损伤模型中,甲基强的松龙 (methylprednisolone, MP) 可使具有保护作用的 HSP27 表达上调。但 MP 对缺血再灌注损伤局部脊髓组织中 HSP27 表达的影响少见报道。本研究旨在观察脊髓缺血再灌注损伤前不同时间点使用治疗量^[2]MP 对脊髓损伤局部 HSP27 表达的影响,探讨应用 MP 预防脊髓缺血性损伤的最佳用药时间。

1 材料和方法

1.1 试验动物和分组

清洁级 4 月龄雌性 SD 大鼠 75 只(郑州大学实验动物中心提供),体重 240±20g。随机分为 A、B、C、D、E 组,每组 15 只。A 组仅手术暴露腹主动脉,而不做其他处理; B、C、D、E 组均通过夹闭腹主动脉 30min 造成脊髓缺血再灌注损伤, C、D、E 组分别于损伤前 30min、1h、3h 尾静脉注射 30mg/kg MP; B 组于损伤前 30min 尾静脉注射与 MP 组等容量的生理盐水。

1.2 动物模型制作及标本制备

采用夹闭腹主动脉的方法建立脊髓缺血再灌注损伤动物模型^[3]: 7%水合氯醛 6ml/kg 腹腔注射麻醉。暴露出腹主动脉,于左肾动脉分支上、右肾动脉分支下夹闭腹主动脉,30min 后松开恢复血流。A 组于术后 3h, B、C、D、E 组均于缺血再灌注后 3h 处死大鼠,用 4%多聚甲醛行心脏灌注固定,取出自圆锥向上 1cm 的脊髓,置 4%多聚甲醛中固定。常规石蜡包埋、连续横切片,片厚 4μm。每个标本切片 6 张,其中 1 张用于 HE 染色,1 张

用于免疫组织化学染色,4 张备用。

1.3 组织学检查

每组每只动物取 1 张切片行 HE 染色,光镜下观察脊髓神经元胞体、胞核、核仁的形态,神经元的极性和尼氏体的染色情况。

每组每只动物取 1 张切片采用 SP 法行免疫组化染色,兔抗鼠 HSP27 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,二氨基联苯胺 (DAB) 染色试剂盒购自北京中杉金桥公司;一抗工作浓度为 1:100。具体操作过程按试剂盒操作说明进行。染色后神经元胞浆、胞核均出现棕黄色颗粒,为 HSP27 染色阳性。400 倍光镜下,每张切片随机选取 6 个不同视野,采用计算机图像分析系统测量染色阳性物质的吸光度 A,取 6 个视野的吸光度平均值代表 HSP27 相对含量。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析。免疫组化阳性物质吸光度 A 以平均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。均值间差异采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行比较,各组间两两比较采用 LSD 法, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

所有动物均造模成功,无动物死亡。A 组脊髓标本无水肿, B 组和 E 组脊髓标本水肿较 C、D 组明显。脊髓切片 HE 染色: A 组神经元胞体较大,呈不规则形;核居中,核膜明显,核仁深染;极性存在;胞质内可见强嗜碱性的尼氏体,呈斑块状分布于核的周围(图 1,后插页 IV)。B 组神经元胞体萎缩,胞核、核仁、尼氏体均显示不清,极性消失,提示局部神经元损伤严重(图 2,后插页 IV)。C 组胞体萎缩较组 B 组明显减轻,可观察到胞核和核仁,极性存在,尼氏体显示稍欠均匀,提示损伤较 B 组为轻(图 3,后插页 IV)。D 组胞体萎缩较重,个别神经元内无法分辨胞核、核仁,极性不明显,

尼氏体染色不均匀(图 4,后插页 IV)。E 组神经元胞体萎缩,胞核、核仁、尼氏体均显示不清,无法分辨树突和轴突,与 B 组比较无明显差别(图 5,后插页 IV)。

免疫组化染色后,A 组胞核、胞浆 HSP27 染色较淡(图 6,后插页 IV),B 组胞核、胞浆染色较 A 组为深(图 7,后插页 IV),C 组染色最深,神经元胞核、胞浆几乎被染成均一的棕褐色(图 8,后插页 IV)。D 组(图 9,后插页 IV)、E 组(图 10,后插页 IV)胞核、胞浆染色趋于浅淡。A、B、C、D、E 组的 HSP27 染色阳性物质平均吸光度值 A 分别为 63.76 ± 3.02 、 100.32 ± 4.13 、 132.05 ± 5.03 、 121.92 ± 4.68 、 102.16 ± 5.96 ,单因素方差分析(ANOVA) $F=472.584$, $P<0.05$;B 组和 E 组比较 $P>0.05$,其余组间比较均 $P<0.05$;C 组、D 组 HSP27 表达均较 B 组增强($P<0.05$),且 C 组、D 组之间有显著性差异($P<0.05$),E 组和 B 组的 HSP27 表达无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

目前认为脊髓缺血再灌注损伤的机制是多因素、多途径的,主要包括以下几个方面:(1)兴奋性氨基酸的释放,引起细胞内 Ca^{2+} 的大量堆积, Ca^{2+} 超载介导神经细胞的凋亡;(2)细胞内氧自由基形成,与膜的组成成分、RNA、DNA、酶或受体共价结合影响膜的结构和功能^[4];(3)细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、白细胞介素-1(IL-1)和 IL-8 表达的提高介导白细胞的粘附和聚集,引发炎症反应^[5]。MP 是一种具有抗炎、抗氧化、减少细胞内钙离子蓄积、减少兴奋性氨基酸释放等作用的合成糖皮质激素,其已经在临床应用于脊髓缺血再灌注损伤的治疗,并取得了满意的疗效^[6],但 MP 预防脊髓缺血再灌注方面的基础研究尚不多见。

HSP27 是热休克蛋白大家族的一员,属小分子热休克蛋白,具有分子伴侣功能,通过多种途径发挥对细胞的保护作用^[7]。HSP27 抑制应激过程中未折叠的蛋白合成,从而减弱对细胞的破坏作用;它可以介导细胞内蛋白质的正确装配和跨膜转运,从而可以稳定细胞骨架的稳定;还具有降低氧自由基损伤、参与细胞凋亡的调节等作用。根据表达诱因的不同,HSP27 可分为结构型和诱导型,前者存在于非应激的正常细胞中,在正常情况下即表达,应激后略增加,与细胞的分化、发育密切相关;后者仅出现于应激细胞中,主要在外界环境

的刺激下表达,具有保护细胞的功能。本研究结果表明,在脊髓缺血再灌注损伤前特定时间点预防使用 MP,能上调缺血再灌注损伤脊髓局部组织中 HSP27 的表达,且在 HSP27 表达增强的同时,伴随着神经细胞病理改变的减轻。这提示,MP 预处理有减轻脊髓缺血再灌注损伤的作用,促使 HSP27 表达的上调可能是 MP 在脊髓缺血再灌注损伤中起保护作用的机制之一。于再灌注损伤前 30min、1h、3h 三个不同的时间点应用 MP 预处理,其减轻脊髓损伤病理改变和上调 HSP27 表达的能力并不相同,以损伤前 30min 使用效果最佳,损伤前 1h 使用效果次之,损伤前 3h 使用则无明显效果。也就是说,预防使用 MP 上调 HSP27 表达的时机存在于一个比较短暂的时间窗内。

鉴于 HSP27 的表达可能与预防使用 MP 的剂量、时间等多个因素有关,是否能以本研究结果作为 MP 最佳预防用药的时间窗口,尚待继续深入研究。

4 参考文献

1. 王文刚,夏磊,刘国强,等.早期应用甲基强的松龙上调受损脊髓细胞内 hsp27 蛋白的表达[J].医药论坛杂志,2007,28(3):6-8.
2. Bracken MB, Holford TR. Neurological and functional status 1 year after acute spinal cord injury: estimates of functional recovery in National Acute Spinal Cord Injury Study II from results modeled in National Acute Spinal Cord Injury Study III[J]. J Neurosurg, 2002, 96(Suppl 3):259-266.
3. Katircioglu SF, Seren M, Parlar AI, et al. Levosimendan effect on spinal cord ischemia-reperfusion injury following aortic clamping[J]. J Card Surg, 2008, 23(1):44-48.
4. Peasley MA, Shi R. Ischemic insult exacerbates acrolein-induced conduction loss and axonal membrane disruption in guinea pig spinal cord white matter[J]. J Neurol Sci, 2003, 216(1):23-32.
5. Naidu KA, Fu ES, Sutton ET, et al. The therapeutic effects of epidural intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody in a rabbit model: involvement of the intercellular adhesion molecule-1 pathway in spinal cord ischemia[J]. Anesth Analg, 2003, 97(3):857-862.
6. 朱守荣,刘郑声,侯克东,等.脊髓手术后迟发脊髓损伤的早期诊断和治疗[J].中国脊柱脊髓杂志,2006,16(Suppl):20-22.
7. Kamada M, So A, Muramaki M, et al. Hsp27 knockdown using nucleotide-based therapies inhibit tumor growth and enhance chemotherapy in human bladder cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(1):299-308.

(收稿日期:2008-09-22 修回日期:2008-11-04)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 李伟霞)