

基础研究

大鼠急性脊髓损伤后内质网应激相关蛋白 CHOP 的表达及其意义

龙智生, 马泽民, 吕国华, 王 冰, 邓幼文

(中南大学湘雅二医院脊柱外科 410011 长沙市)

【摘要】目的:探讨内质网应激相关蛋白 CHOP 在急性脊髓损伤中的表达及其意义。方法:48 只健康 SD 大鼠随机分为实验组与对照组(每组 24 只),实验组采用 Allen 法制作急性脊髓损伤模型,对照组只切开椎板不损伤脊髓。分别于伤后 3h、1d、3d、7d 时(每个时间点 6 只)应用改良 Tarlov 评分法评价其神经功能;然后处死动物,取受损节段脊髓行 HE 染色及免疫组化染色,观察形态学变化和 CHOP 在脊髓组织中的分布特点;并应用 TUNEL 方法检测神经细胞凋亡情况。其量的评定借助于 IPP(Image-Pro Plus 6.0)软件,结果分别用累积光密度(integrated optical density, IOD)及平均光密度(mean density)表示。结果:对照组大鼠均未见明显瘫痪,实验组出现不同程度的下肢功能障碍,对照组各时间点的 Tarlov 评分均高于实验组($P<0.01$)。对照组各时间点未见明显坏死细胞和细胞凋亡,实验组出现不同程度的细胞坏死和凋亡。实验组 CHOP 表达各时间点均明显高于对照组($P<0.01$),实验组内 CHOP 表达 1d 增加,3d 达到高峰,7d 减少。实验组内细胞凋亡 1d 时增加,3d 达到高峰,7d 减少,且 $3h<1d<3d>7d$ ($P<0.01$)。CHOP 表达与细胞凋亡在时间上具有一致性,相关系数为 0.644。结论:急性脊髓损伤能够诱导 CHOP 表达,CHOP 表达的增高可能与内质网应激诱导的神经细胞凋亡有关。

【关键词】脊髓损伤;内质网应激;细胞凋亡;CHOP

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2009.06.15

中图分类号:R683.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2009)-06-0458-06

Expression and significance of CHOP related ERS after acute spinal cord injury in rats/LONG Zhisheng, MA Zemin, LÜ Guohua, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2009, 19 (6):458~463

【Abstract】 Objective: To investigate the significance and expression of CHOP/GADD153 (C/EBP homologous protein/growth-arrest and DNA damage inducible gene 153) after acute spinal cord injury and the role of ERS to spinal cord injury. Method: Rat model of ASCI at level of T8-T10 was established using modified Allen's method. All rats were randomly divided into two groups: test group experienced SCI while sham group were left as control. The nerve function of spinal cord was evaluated by modified Tarlov score, after that the animals were sacrificed at 3h, 24h, 3d, 7d respectively after injury. The morphologic character and expression of CHOP was detected by immunohistochemistry. Cell apoptosis was examined using the TUNEL assay. The expression of CHOP and apoptosis was quantified by the use of IPP(Image-Pro Plus 6.0). The result was showed as the forms of IOD (integrated optical density) and mean density. Result: Paralysis was evidenced in test group rather than sham group with the Tarlov score in the former much higher than that in the latter at each time-point ($P<0.01$). However necrotic cells and apoptotic cells were not evidenced significantly in sham group rather than in test group at each times-point ($P<0.01$). The expression of CHOP and cell apoptosis in test group both elevated at 1d, which peaked at 3d and decreased at 7d after SCI with the same tendency of $3h<1d<3d>7d$ ($P<0.01$). Cell apoptotic was time-consistent with the expression of CHOP with the correlative coefficient (Pearson's) of 0.644. Conclusion: ASCI can induce the expression of CHOP by means of ERS, which is related to the apoptosis of neurocyte.

基金项目:湖南省发改委资助项目(20081491)

第一作者简介:男(1983-),在读研究生,研究方向:脊柱与脊髓损伤

电话:(0731)5295125 E-mail: drywdeng@yahoo.com.cn

通讯作者:邓幼文

[Key words] Spinal cord injury; Endoplasmic reticulum stress; Cell apoptosis; CHOP

[Author's address] Department of Spine Surgery, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, 410011, China

Emery 等^[1]发现急性脊髓损伤 (acute spinal cord injury, ASCI) 后也存在细胞凋亡的现象, 细胞凋亡是 ASCI 后脊髓继发性损伤过程中的重要的病理生理过程。目前认为细胞凋亡主要有两条途径, 线粒体途径和死亡受体途径。内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 是最近几年才发现新的凋亡途径, 现研究表明 ERS 参与了多种常见疾病如视网膜病变^[2]、创伤性出血、糖尿病^[3]、心脑血管组织缺血^[4]和神经系统变性、肝炎等^[5]疾病的发病过程, 越来越受到重视。其中生长停滞 DNA 损害可诱导基因 153 (C/EBP homologous protein/growth arrest-and DNA damage inducible gene 153, CHOP/GADD153) 是 ERS 的经典标志物^[6], 在另外两条途径中无表达。ERS 及相关蛋白 CHOP 在脊髓损伤中的变化国内外未检索到相关方面的研究。本实验通过对 ASCI 前后脊髓组织中 CHOP 表达和细胞凋亡的变化, 旨在探讨 ERS 在 ASCI 病理生理过程中的意义。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

48 只健康 6~8 周 SD 大鼠 (湖南省人民医院动物实验室提供), 雌雄不拘, 体重 320~400g。随机分为 2 组, 对照组和实验组 (SCI 组), 然后再将每组根据损伤的时间点分为 3h、24h、3d、7d 四组, 每组在损伤后开始计时, 到相应时间点处死动物。

1.2 动物模型建立

参照 Allen 法制作脊髓损伤模型, 1%戊巴比妥钠 30mg/kg 麻醉大鼠后, 绳索捆绑固定其四肢和门牙于动物手术台上, 剪净背部 T10 处及其周围 3×4cm 面积的毛, 3%络合碘消毒皮肤后, 在 T10 水平背部正中切开约 3cm 皮肤, 剪开深筋膜, 剥离棘突两侧的肌肉显露 T9~T11 棘突和椎板, 切除 T9、T10 椎板, 显露硬膜囊范围约 1.0×0.4cm 大小。用 10g 质量的条形金属叩击器在导向器内从 2.5cm 高度自由落体运动打击导向器底部, 导向器嘴部撞击脊髓造成脊髓中度损伤, 致伤力为 25gcf (克·厘米·自由落体), 大鼠尾巴和后肢抽搐作为模型制作成功的参考, 逐层关闭切口, 敷料覆盖伤口并固定。对照组大鼠只做 T9~T10 椎板切

除术。切口涂 3%络合碘 1 次。每天每只大鼠肌注青霉素 10 万单位, 生存时间长于 3d 者共给药 3d。术后小心饲养, 定时按压排尿。

1.3 神经功能评价

术后 3h、24h、3d、7d 分别观察实验组和对照组后肢运动情况, 并行 Tarlov 评分: 0 分, 完全性瘫痪; 1 分, 有肌肉自发性收缩; 2 分, 关节活动好, 但不能站立; 3 分, 能站立, 无法行走; 4 分, 可行走, 但晃摆; 5 分, 正常。

1.4 组织学及免疫组化

在相应时间点各取 6 只大鼠用 10%水合氯醛 (6ml/kg) 腹腔内注射麻醉大鼠后, 打开大鼠胸腔, 以 7 号半输液器针头插入大鼠左心房直至主动脉内, 剪开右心耳, 生理盐水 100ml 快速灌注大鼠心脏, 再以 4%多聚甲醛快速灌注约 15min 后, 控制滴速 (20 滴/min) 再灌注 3h。以 T8~T10 为中心, 取损伤节段脊柱约 2cm, 以巩膜咬切器仔细咬去椎板、椎体和周围附着的瘢痕组织, 将完整的脊髓组织剥离出来, 用磷酸缓冲液 (PBS) 清洗组织后, 置于 4%多聚甲醛中保存。常规石蜡包埋, 作损伤中心部位连续切片 5 张, 切片厚度 5μm, 随机抽取 2 张切片均进行 HE 染色和用 ABC 法进行免疫组化。主要过程包括: H₂O₂ 甲醇封闭内源性过氧化物酶, 正常绵羊血清阻断, 胰酶消化, PBS 漂洗。加入适当稀释的一抗 CHOP (中美生物有限公司, 稀释浓度 1:200), 4℃, 冰箱孵育过夜。加生物素化二抗和 ABC 复合物孵育。DAB 显色 (DAB 试剂盒购自中美生物有限公司)。采用 HPIAS-1000 高分辨彩色病理图像报告分析系统进行图像分析处理。每张切片随机采集 5 个高倍镜 (400 倍) 视野, 以细胞染成棕黄色为阳性, 测定切片的 IOD (integrated optical density) 累积光密度。阳性细胞数越多, IOD 值越大, 提示免疫反应越强。

1.5 TUNEL 染色

随机抽取切片 (1.4 中) 1 张, 脱蜡入水后, 室温下用 3% H₂O₂ 处理 10min, 蒸馏水清洗 3 次, 1:200 蛋白酶 K 37℃消化 10min, 将切片置于装有 200ml 0.1mol 柠檬酸钠的湿盒中, 微波修复 5min, PBS 冲洗 2 次。切片滴加脱氧核糖核苷酸末

端转移酶 (TdT) 及标记液 (TUNEL 试剂盒购自 Roche 公司), 用荧光显微镜观察其荧光表达 (绿光, 波长 515~565nm), 激发强度 (450~500nm)。阳性表达细胞发出绿色荧光, 在 40 倍镜下采集图像, 每张切片取 5 个视野, 细胞凋亡的情况用平均光密度 (mean density) 来描述, 荧光越强平均光密度越大, 则凋亡数量越多。

IOD 及平均光密度的测量使用 IPP (Image-Pro Plus 6.0) 软件。

1.6 统计学分析

所有数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 应用 SPSS 16.0 统计分析软件, one way ANOVA 方法, 方差齐时用 SNK 法 (q 检验), 方差不齐时用 Tamhane 法 (q 检验), 各指标间相关分析采用直线相关分析, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学评价

术后对照组各时间点大鼠均未见明显瘫痪, 实验组大鼠出现不同程度的下肢功能障碍, 3d 时最为明显, 各时间点实验组与对照组 Tarlov 评分之间差异有统计学意义 ($P<0.01$), 对照组评分均优于实验组 (表 1)。

2.2 组织学检查

对照组未见明显凋亡与坏死细胞。实验组 3h 时以坏死为主, 可见大量出血, 脂肪液化, 细胞核碎裂, 细胞溶解, 1d 时凋亡较明显, 可见神经细胞固缩及凋亡小体, 3d 时较 1d 时凋亡细胞增多, 7d 时凋亡有所下降 (图 1)。

2.3 CHOP 表达情况

免疫阳性细胞胞浆呈现棕黄色淡染, 细胞核也呈现棕色多数阳性细胞发生形态学改变, 胞核

皱缩, 呈梭形或条索状。对照组中阳性细胞表达不明显, 实验组于术后 3h 即有明显 CHOP 的表达, 但是早期还是以细胞坏死为主 (图 2), 阳性细胞以神经元细胞为主, 胶质细胞表达较少; 损伤后 1d 时 CHOP 表达有所增加, 但与 3h 表达在统计学上无明显差异; 损伤 3d 时 CHOP 的表达达到高峰, 与 1d 时 CHOP 表达有统计学意义 ($P<0.01$); 7d 时表达减少开始 (表 2)。

2.4 细胞凋亡

实验组早期细胞凋亡不明显, 脊髓内出现大片出血坏死和脂肪液化。1d、3d、7d 时实验组与对照组细胞凋亡差别有统计学意义 ($P<0.01$)。实验组内, 伤后 3h 即有细胞凋亡的出现, 1d 时凋亡表达增加, 在 3d 时, 凋亡表达达到高峰期, 7d 时表达又有所下降, 各时间点间细胞凋亡有显著性差异且 $3h<1d<3d>7d$ ($P<0.01$, 表 2, 图 3)。

2.5 CHOP 表达与细胞凋亡的相关性

从两者的时间表达上来讲, 两者的表达趋势类似, 于 3d 达到高峰。对其进行相关分析得出其相关系数 Pearson 系数为 0.644, 表明两者其具有直线相关 (图 4)。

3 讨论

脊髓损伤是人类严重的致残致死的疾病, 国内外大量学者对其病理机制进行了研究, 发现其机制主要是由原发机械损伤和继发循环障碍及生化改变等引起。原发机械损伤指脊髓直接受损伤部位的组织被破坏, 出血, 坏死。随后损伤中心及邻近部位发生缺血、再灌注损伤, 脂质过氧化产生氧自由基损害; 细胞内钙离子超载, 炎症介质产生, 兴奋性神经递质损害, 神经细胞凋亡等等一系列病理生理过程, 称为继发性损伤。原发性损伤是由受伤当时的各种致伤条件所决定的, 无法人工挽回。而继发性损伤可以通过药物或者物理等方法人工干预, 有可能获得脊髓功能的部分恢复。近年来研究表明, 细胞凋亡在脊髓继发性损伤中有重要意义^[7,8]。细胞凋亡又称细胞程序性死亡, 广

表 1 各组大鼠不同时间点 Tarlov 评分 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	3h	1d	3d	7d
对照组	5.00 $\pm$ 0.00	5.00 $\pm$ 0.00	5.00 $\pm$ 0.00	5.00 $\pm$ 0.00
实验组	3.83 $\pm$ 0.75 ^①	3.50 $\pm$ 0.55 ^①	2.33 $\pm$ 1.03 ^①	3.50 $\pm$ 0.55 ^①

注: ①与对照组比较 $P<0.01$

表 2 实验组与对照组不同时间点 CHOP 和 TUNEL 的表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

	CHOP (累积光密度)				TUNEL (平均光密度, $\times 10^{-2}$)			
	3h	1d	3d	7d	3h	1d	3d	7d
对照组	1256.05 $\pm$ 147.37	1149.99 $\pm$ 53.12	2312.87 $\pm$ 60.13	1545.81 $\pm$ 70.62	8.50 $\pm$ 0.40	10.65 $\pm$ 0.27	8.60 $\pm$ 0.28	7.70 $\pm$ 0.28
实验组	2639.4 $\pm$ 150.98 ^①	2828.12 $\pm$ 235.02 ^①	3628.09 $\pm$ 139.25 ^{①②}	3185.21 $\pm$ 47.64 ^①	8.52 $\pm$ 1.27	13.63 $\pm$ 0.27 ^{①②}	17.38 $\pm$ 0.31 ^{①②}	10.35 $\pm$ 0.28 ^{①②}

注: ①与对照组比较 $P<0.01$, ②与同指标前一时间点比较 $P<0.01$

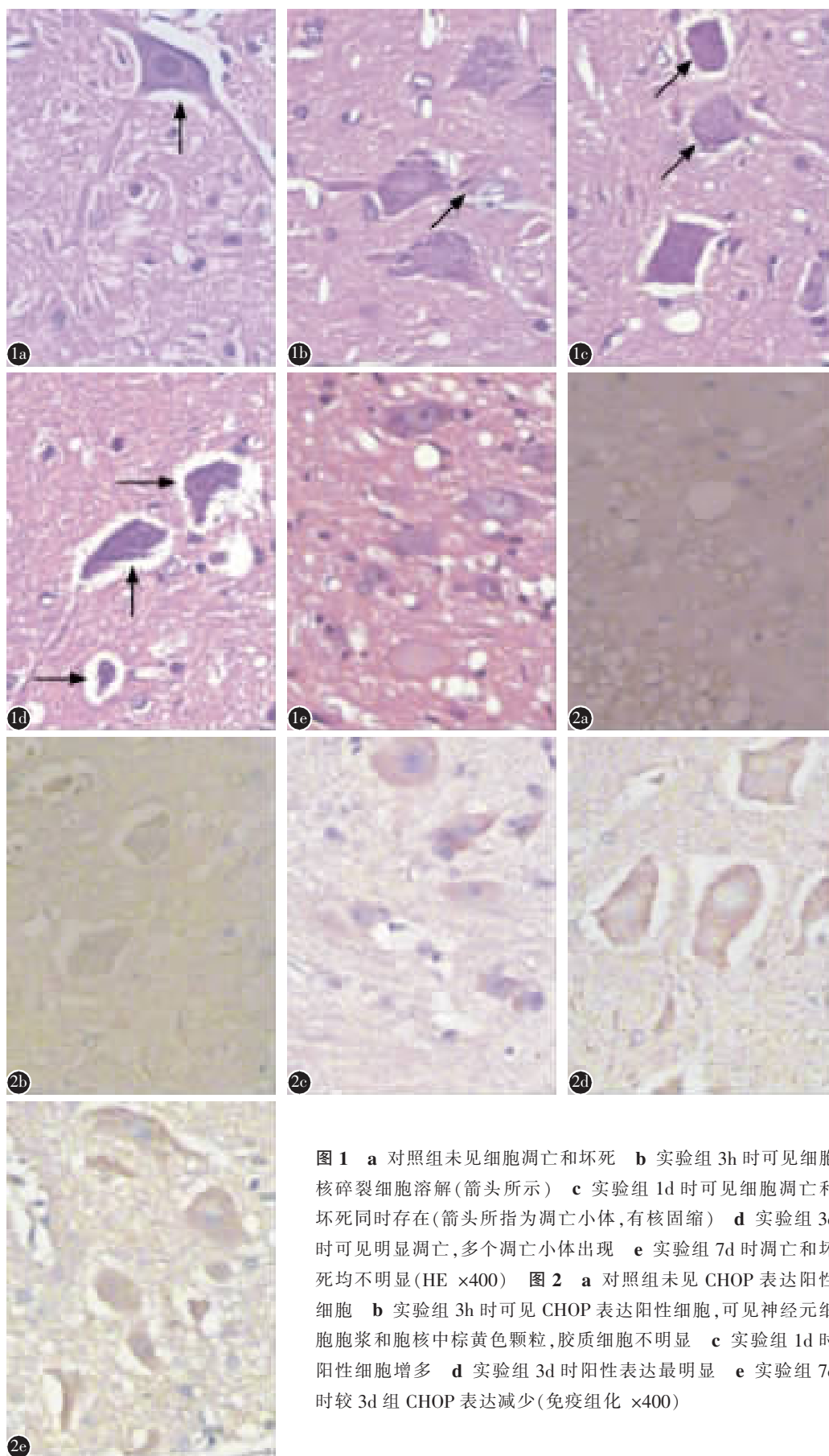


图 1 **a** 对照组未见细胞凋亡和坏死 **b** 实验组 3h 时可见细胞核碎裂细胞溶解(箭头所示) **c** 实验组 1d 时可见细胞凋亡和坏死同时存在(箭头所指为凋亡小体,有核固缩) **d** 实验组 3d 时可见明显凋亡,多个凋亡小体出现 **e** 实验组 7d 时凋亡和坏死均不明显(HE $\times 400$) **图 2** **a** 对照组未见 CHOP 表达阳性细胞 **b** 实验组 3h 时可见 CHOP 表达阳性细胞,可见神经元细胞胞浆和胞核中棕黄色颗粒,胶质细胞不明显 **c** 实验组 1d 时阳性细胞增多 **d** 实验组 3d 时阳性表达最明显 **e** 实验组 7d 时较 3d 组 CHOP 表达减少(免疫组化 $\times 400$)

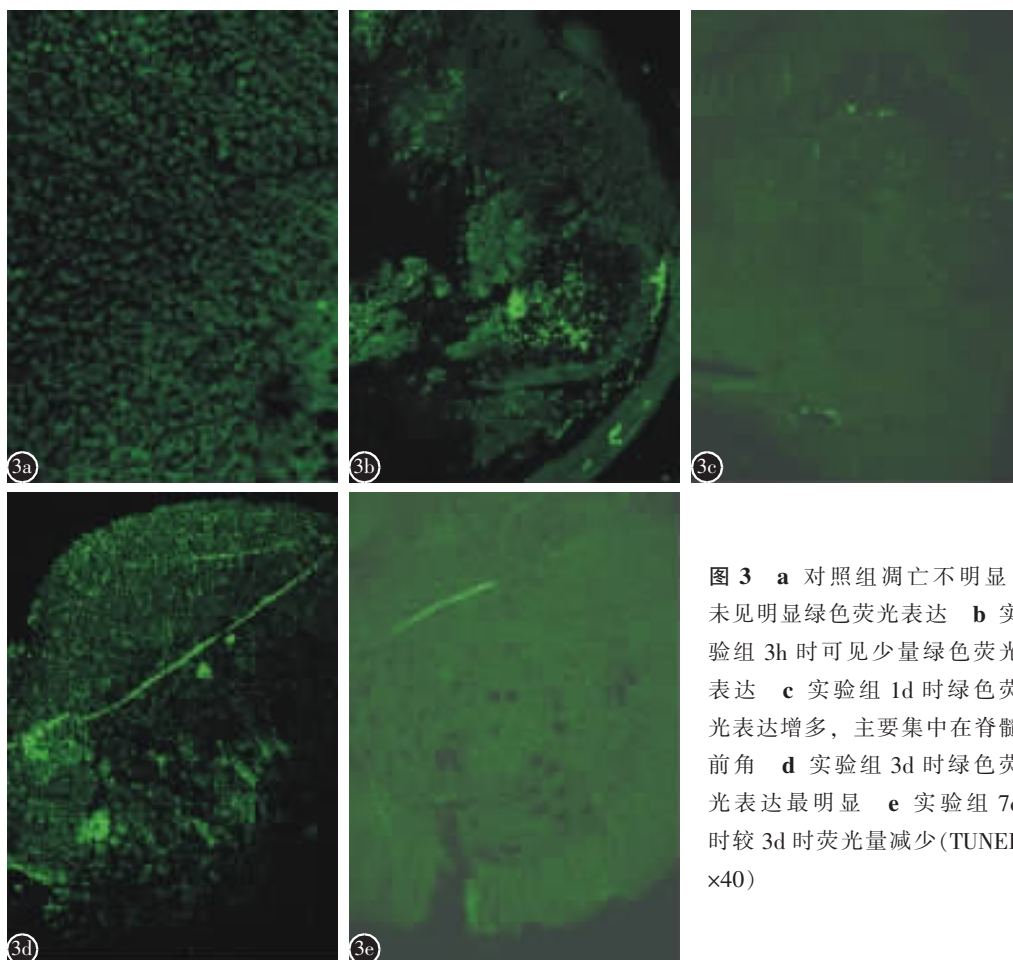


图 3 a 对照组凋亡不明显, 未见明显绿色荧光表达 b 实验组 3h 时可见少量绿色荧光表达 c 实验组 1d 时绿色荧光表达增多, 主要集中在脊髓前角 d 实验组 3d 时绿色荧光表达最明显 e 实验组 7d 时较 3d 时荧光量减少(TUNEL $\times 40$)

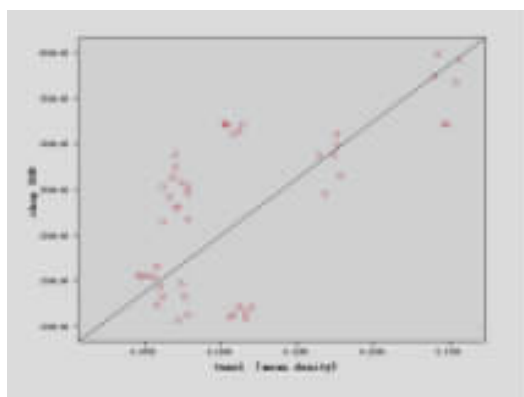


图 4 CHOP 与凋亡相关分析图

泛存在于多细胞生物的各种组织中, 是细胞内一个主动积极的程序性生理过程, 死亡受体活化(外源性途径)和线粒体损伤途径(内源性途径)是细胞内两条经典的途径, ERS 启动的凋亡途径是近年来才发现的一种新的凋亡信号传导途径。缺氧、葡萄糖/营养素缺乏、蛋白质糖基化抑制、二硫键形成障碍、蛋白质转运异常、 Ca^{2+} 耗竭等刺激均可

导致内质网功能失调, 即 ERS^[9]。适量应激会激活未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR), 使蛋白折叠能力提高、蛋白合成抑制, 以适应应激, 但是长时间过强的 ERS 则启动细胞凋亡^[10]。GADD153/CHOP (growth arrest and DNA-damage-inducible gene 153 或 C/EBP-homologous protein) 是 ERS 特异的转录因子^[11,12], 属 C/EBP 转录因子家族成员。PERK、ATF6 以及 IRE-1 都能够诱导 CHOP 的转录, 然而 PERK-eIF2-ATF4 是 CHOP 蛋白表达所必需的^[9]。CHOP 广泛表达于哺乳动物细胞, 其编码的蛋白属于 OCAAT 增强子相连蛋白的转录因子 C/EBP 家族, 与各种细胞活动如能量代谢、增殖、分化、凋亡相关。内质网应激时, IRE1, PERK 和 ATF6 的活化均对 CHOP 产生诱导, 促使 CHOP 的激活。正常情况下, CHOP 表达十分低, 在内质网应激反应时, 其表达显著增, 从而诱导细胞凋亡。Zinszner 等^[13]研究表明, CHOP 的表达情况可显著影响细胞的存活, chop-/-细胞凋亡率明显较 chop+/+细

胞低。小鼠体内实验结果显示,注射 TM 后,野生型小鼠肾皮质 CHOP mRNA 水平在数小时内升高并持续 2~3d,肾功能不良症状也相应出现,组织学检测可见肾小管上皮细胞肿胀坏死, chop+/+ 小鼠上述变化更为明显,而 chop-/- 小鼠症状较轻且肾小管上皮细胞凋亡率较低,揭示 CHOP 在 ERAD 中具有关键作用。

本研究发现,实验组中大鼠的神经功能明显差于对照组,说明 SCI 动物模型复制成功。3d 时的运动评分最低,3h,1d 和 7d 无明显差别,说明原发性损伤后的继发损伤高峰期可能在损伤后的 3d 左右。实验组中 CHOP 的表达明显高于对照组,说明 SCI 能够诱导 ERS;从早期的组织学切片上来看,有大量的出血和脂肪液化,所以早期主要还是以细胞坏死为主。CHOP 在损伤后 3h 后即有表达,1d 和 3h 组表达无明显差别,3d 时达到高峰,7d 组和 3d 组无明显差别,在 3d 左右后开始增加,从表达量来看,可能与早期内质网适当的应激所发生的保护作用有关,也说明了早期内质网应激对细胞凋亡的影响不大,3d 时的高峰正好说明了脊髓损伤后长期的应激导致了内质网功能障碍,从而诱导了 ERS 相关性细胞凋亡(ER associated death,ERAD),造成组织损伤。Tunel 结果也说明了早期凋亡不明显,这与 Wada 等^[14]研究的结果类似。本研究发现 CHOP 与细胞凋亡明显相关,相关系数为 0.644,更进一步说明了 ERS 在脊髓损伤中的作用。本研究同时发现,CHOP 主要表达在神经元细胞中,在胶质细胞表达较少,这可能与两种细胞对缺氧缺血等耐受程度有差别有关。总之,CHOP 表达水平对于 ERS 诱导的细胞凋亡的研究具有至关重要的作用。

综上所述,ASCI 其早期主要以细胞坏死为主,后期细胞凋亡增多。ASCI 能够诱导内质网应激并且能够增加 ERS 相关促进凋亡蛋白 CHOP 的表达,早期 CHOP 表达水平较低,3d 时 CHOP 表达明显增高从而引起相应的细胞凋亡。ASCI 所诱导的 ERS 反应的这种时间特点可以为以后治疗脊髓损伤提供潜在的时间靶点。

4 参考文献

- Emery E, Aldana P, Bunge MB, et al. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury[J]. J Neurosurg, 1998, 5(4):911-920.
- Roybal CN, Marmorstein LY, VanderJagt DL, et al. Aberrant accumulation of fibulin-3 in the endoplasmic reticulum Leads to activation of the unfolded protein response and VEGF expression [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46 (11):3973-3979.
- Meex SJ, Van G, Ayoubi TA, et al. Activating transcription factor 6 polymorphisms and haplotypes are associated with impaired glucose homeostasis and type 2 diabetes in Dutch Caucasians [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92 (7):2720-2725.
- De Gracia DJ, Montie HL. Cerebral ischemia and the unfolded protein response[J]. J Neurochem, 2004, 91(1):1-8.
- Umareddy I, Pluquet O, Wang QY, et al. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response[J]. Virol J, 2007, 4:91.
- Paschen W, Gissel C, Linden T, et al. Activation of gadd153 expression through transient cerebral ischemia; evidence that ischemia causes endoplasmic reticulum dysfunction [J]. Brain Res Mol Brain Res, 1998, 60(1):115-122.
- Li GL, Farooque M, Olsson Y, et al. Changes of Fas and Fas ligand immunoreactivity after compression trauma to rat spinal cord[J]. Acta Neuropathol Berl, 2000, 100(1):75-81.
- Ekshyyan O, Aw TY. Apoptosis in acute and chronic neurological disorders [J]. Front Biosci, 2004, 1(9):1567-1576.
- Pahl HL. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus[J]. Physiol Rev, 1999, 79(3):683-701.
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, et al. Mediators of endoplasmic reticulum stress induced apoptosis [J]. EMBO Rep, 2006, 7(9):880-885.
- Yokouchi M, Hiramatsu N, Hayakawa K, et al. Atypical bidirectional regulation of cadmium induced apoptosis via distinct signaling of unfolded protein response [J]. Cell Death Differ, 2007, 14(8):1467-1474.
- Oda T, Kosuge Y, Arakawa M, et al. Distinct mechanism of cell death is responsible for tunicamycin-induced ER stress in SK-N-SH and SH-SY5Y cells [J]. Neurosci Res, 2008, 60(1):29-39.
- Zinszner H, Kuroda M, Wang X, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum [J]. Genes Dev, 1998, 12 (7):982-995.
- Wada S, Yone K, Nagamine Y, et al. Apoptosis following spinal cord injury in rats and preventive effect of N-methyl D aspartate receptor antagonist[J]. J Neurosurg, 1999, 91 (1):98-104.

(收稿日期:2009-02-09 修回日期:2009-05-11)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)

1. Emery E, Aldana P, Bunge MB, et al. Apoptosis after traumatic