

Meth 对大鼠 SCI 后神经细胞凋亡及 wnt/ β -catenin 信号通路的影响

吴小波 张轶行

【摘要】 目的 探讨甲基强的松龙(methylprednisolone, Meth)对大鼠脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后神经细胞凋亡及 wnt/ β -catenin 信号通路的影响。**方法** 将 60 只 SD 成年大鼠随机分为 3 组,即假手术(Sham)组、甲基强的松龙(Meth)组和生理盐水(Saline)组,每组各 20 只;假手术组仅需切开椎板不损伤脊髓,甲基强的松龙组和生理盐水组采用改良 Allens 法制作大鼠脊髓损伤模型后立即从尾静脉注射大剂量 MP 治疗,并在术后第 1、2 d 相同的时间点分别注射 1 次;采用尼氏染色(Nissl)观察组织形态变化;采用免疫荧光观察蛋白 caspase-3 表达水平;采用 Western Blot 检测各组 wnt/ β -catenin 信号通路蛋白 GSK-3 β 和 β -catenin 的表达水平。**结果** 甲基强的松龙组(Meth)第 7 d SCI 较生理盐水组明显减轻($P<0.01$);Meth 组抑制凋亡蛋白 caspase-3 表达水平明显下调($P<0.01$);大鼠急性脊髓损伤(SCI)后第 3、7 d,甲基强的松龙组呈现抑制蛋白 GSK-3 β 表达($P<0.05$),而蛋白 β -catenin 表达则明显上调($P<0.05$)。**结论** 大鼠急性脊髓损伤后 MP 可能通过激活 wnt/ β -catenin 信号通路来促进大鼠运动功能恢复以及抑制急性脊髓损伤神经细胞的凋亡。

【关键词】 大鼠 甲基强的松龙 脊髓损伤 细胞凋亡 wnt/ β -catenin 信号通路

【中图分类号】 R651.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2019)03-0261-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2019.03.002

The effects of Meth on neuronal apoptosis and wnt/ β -catenin signaling pathway after SCI in rats Wu Xiaobo, Zhang Yixing. Department of Neurosurgery, Fuling Centre Hospital of Chongqing City, Chongqing 408099

【Abstract】 Objective To investigate the effects of methylprednisolone (MP) on neuronal apoptosis and wnt/ β -catenin signaling pathway after spinal cord injury (SCI) in rats. **Methods** Sixty adult SD rats were randomly divided into three groups: sham operation (Sham) group, methylprednisolone (Meth) group and saline group, with 20 rats in each group. The sham operation group only needed to incise the lamina without injuring the spinal cord. The rats in the methylprednisolone group and the saline group were injected with high dose MP through the caudal vein immediately after the model of spinal cord injury was made by modified Allens method. The rats in the methylprednisolone group and the saline group were injected once at the same time points on the first and second day after operation. Nissl staining was used to observe the morphological changes. Immunofluorescence was used to observe the expression level of caspase-3. Western Blot was used to detect the expression levels of wnt/ β -catenin signaling pathway protein GSK-3 β and β -catenin. **Results** Nissl staining showed that the injury of SCI tissue in methylprednisolone(Meth) group was significantly less than that in saline group ($P<0.01$). Immunofluorescence showed that Meth inhibited the down-regulation of apoptotic protein caspase-3 expression level ($P<0.01$). Western Blot showed that the expression of GSK-3 β was inhibited in the methylprednisolone group on the 3rd and 7th day after SCI ($P<0.05$), while the expression of protein β -catenin was significantly up-regulated ($P<0.05$). **Conclusion** MP could promote motor function recovery and inhibit neuronal apoptosis after acute spinal cord injury by activating wnt/ β catenin signaling pathway in rats.

【Key words】 Rats Methylprednisolone Spinal cord injury Apoptosis Wnt/ β -catenin signaling pathway

残率,且呈年轻化趋势,给患者生活质量产生了较大的影响。按病理、生理学机制将 SCI 分为原发性和继发性损伤。由于原发性 SCI 具有不可逆性,继发性 SCI 为目前的研究重点,其主要因素为氧化应激、创伤等引起的神经细胞自噬及凋亡。SCI 的修复一直以来是神经科学领域的重要难题。近年来通过研究表明中枢神经系统有一定的再生能力,通过激活 wnt/ β -catenin 信号通路可以促进神经细胞的修复和再生,使神经细胞功能得以恢复^[2]。

目前治疗脊髓损伤最为常见且疗效明显的药物是具有保护神经组织的甲基强的松龙(methylprednisolone, Meth),Meth 是一种合成的中效糖皮质激素,对急性脊髓损伤(SCI)模型大鼠起到抗炎作用,以此观察 GSK-3 β 、caspase-3 蛋白的表达情况,探讨甲基强的松龙治疗脊髓损伤可能的作用机制,为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组

成年 SD 雄性大鼠 60 只,体重 250~300 g,大鼠均购于重庆医科大学动物中心,动物许可证号:SYXK(渝)2007-0001;随机分为 3 组,即假手术(Sham)组、甲基强的松龙(Meth)组和生理盐水(Saline)组,每组各 20 只;采用改良 Allens 法^[3]建立大鼠脊髓损伤模型;脊髓损伤(SCI)后第 1、2 d 分别从大鼠尾静脉注射等量生理盐水和甲基强的松龙(30 mg/kg)。

1.2 SCI 动物模型建立

假手术组仅需切开椎板不损伤脊髓;甲基强的松龙组:10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔麻醉 SD 大鼠固定于手术台上,以 T9-T10 胸椎棘突为中心切开,分离椎旁肌,然后用咬骨钳咬除 T9-T10 棘突椎板,暴露脊髓(注:保护脊髓硬膜的完整性),用生理盐水清洗伤口;用 Allen 重锤打击法、用重量为 5 kg 的重锤于 10 cm 的高度垂落下打击 T9-T10 节段脊髓致脊髓损伤,建立大鼠 SCI 模型^[3];用生理盐水反复冲洗后逐层缝合伤口再次酒精消毒;术后连续 3 d 腹腔注入青霉素 4 万单位/d,预防感染,以 2 次/d 给予人工按摩膀胱帮助排尿,直至排尿反射功能恢复。

1.3 Nissl 染色

术后第 7 d 对模型大鼠进行灌流($n=6$),以受损脊髓段为中心且距(SCI)3 mm 的尾侧脊髓组织,放

入 4℃ 的 4% 多聚甲醛溶液 24 h 和浓度为 (20%、30%) 蔗糖脱水后制成冰冻切片;石蜡包埋,连续切片(片厚 20 μ m)并置于 37℃ 温箱过夜;将石蜡切片取出脱蜡后逐级依次放入酒精至蒸馏水(无水乙醇、95%酒精、70%酒精、蒸馏水)中,入 0.05% 焦油紫水溶液中染色;接着用蒸馏水迅速冲洗 3 遍,95%酒精分色,脱水,二甲苯透明,封片,观察尼氏体形态。

1.4 Western Blot 检测

脊髓损伤后第 3 和 7 d,麻醉各组 SD 大鼠($n=6$),以 SCI 部位为中心截取长度为 5 mm 的脊髓组织,经 BCA 法蛋白定量后上样,SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质;制备 5% 浓缩胶及 12% 的分离胶;电泳;调解电压至 80 V、90 min 后转为 100 V 至溴酚蓝跑至距分离胶底部 0.5 cm 时停止;转膜:280 mA 恒流 1 h,结束后关闭电源取出 PVDF 膜,在丽春红染液中浸泡 10 min,如有条带显现说明转膜成功,采用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液封闭 1.5 h;加一抗 β -actin (1:2000),4℃ 冰箱过夜;加二抗 37℃ 2 h,结束后用 TBST 漂洗 10 min \times 3 次后显影;用 Quantity One 软件对蛋白质条带进行分析,测定其吸光度值。目的蛋白的相对表达强度 = 目的蛋白的吸光度值/ β -actin 的吸光度值。

1.5 免疫荧光测定法

大鼠 SCI 后第 7 d 麻醉大鼠($n=6$),用含 4% 多聚甲醛的磷酸缓冲液(PB)经心脏灌注,截取脊髓损伤(SCI)处长约 2 cm 的脊髓组织,置于 4% 多聚甲醛液中浸泡至第 2 d;经含 20%~30% 蔗糖的磷酸缓冲液(PB)脱水后制作大鼠脊髓冰冻切片;0.01 mol/L PBS 清洗切片 3 次(5 min \times 3 次),将组织放入柠檬酸(pH 6.0)中进行抗原修复 15 min,滴加 5% 山羊血清在 4℃ 封闭 60 min 后分别滴加入一抗 4℃ 孵育过夜;PBS 漂洗(5 min \times 3 次),滴加荧光素标记二抗(FITC)室温孵育 2 h 后加入 DAPI 进行复染,封片后在 200 倍荧光显微镜下观察。采用 ImageJ2x 软件分析免疫反应强度后进行比较。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据服从正态分布及方差齐性,行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Nissl 染色

急性脊髓损伤后显微镜下观察尼氏体形态发

现,Meth 组第 7 d SCI 区域组织较 Saline 组形态恢复良好,损伤相对较轻,前角运动神经数量较多($P<0.01$)(图 1)。

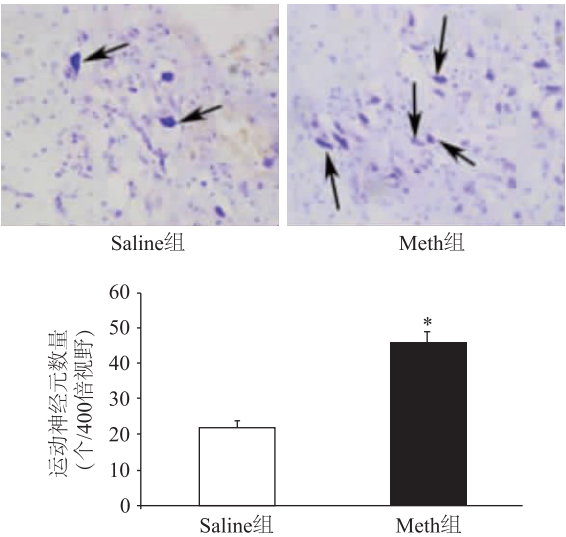


图 1 脊髓损伤后运动神经元数量与 Saline 组比较, * $P<0.01$

2.2 westernblot 检测

在 SD 大鼠急性脊髓损伤后应用 Meth 能够激活 wnt/ β -catenin 信号通路调节 GSK-3 β 及 β -catenin 蛋白的表达,SCI 后第 3、7 d Meth 组呈现抑制

GSK-3 β 蛋白表达,而上调 β -catenin 蛋白表达(图 2)。

2.3 免疫荧光检验 caspase-3 蛋白表达水平

大鼠出现 SCI 后第 7 d 凋亡蛋白 caspase-3 的表达出现明显变化,Meth 组 caspase-3 蛋白表达水平高于假手术组,而与 Saline 组比较则较低。

3 讨论

脊髓损伤 (SCI) 是我国乃至全球的医学难题,一些患者预后不良或出现瘫痪,我国城市 SCI 的罹患率为 60/100 万,其中全瘫为 67%,全球 SCI 的发病率为 10.4%~83%/年^[4]。SCI 分为原发性和继发性损伤,是最严重的脊柱损伤并发症。原发性损伤是在外力的直接作用下引起的 SCI,具有不可逆性,而继发性损伤是原发性后产生一系列病理改变而造成渐行性的破坏^[5]。由于原发性脊髓损伤不能预防,所以防治继发性损伤是临床上的一个重要环节^[6]。

激素药物甲基强的松龙具有显著的抗炎和抗氧化等作用,被美国 FDA 批准的唯一在临床脊髓损伤中应用最为广泛的糖皮质激素类药物,有研究认为甲基强的松龙可以作为 SCI 后的冲击治疗,对神经功能的恢复有促进作用^[7]。本实验通过成功建立

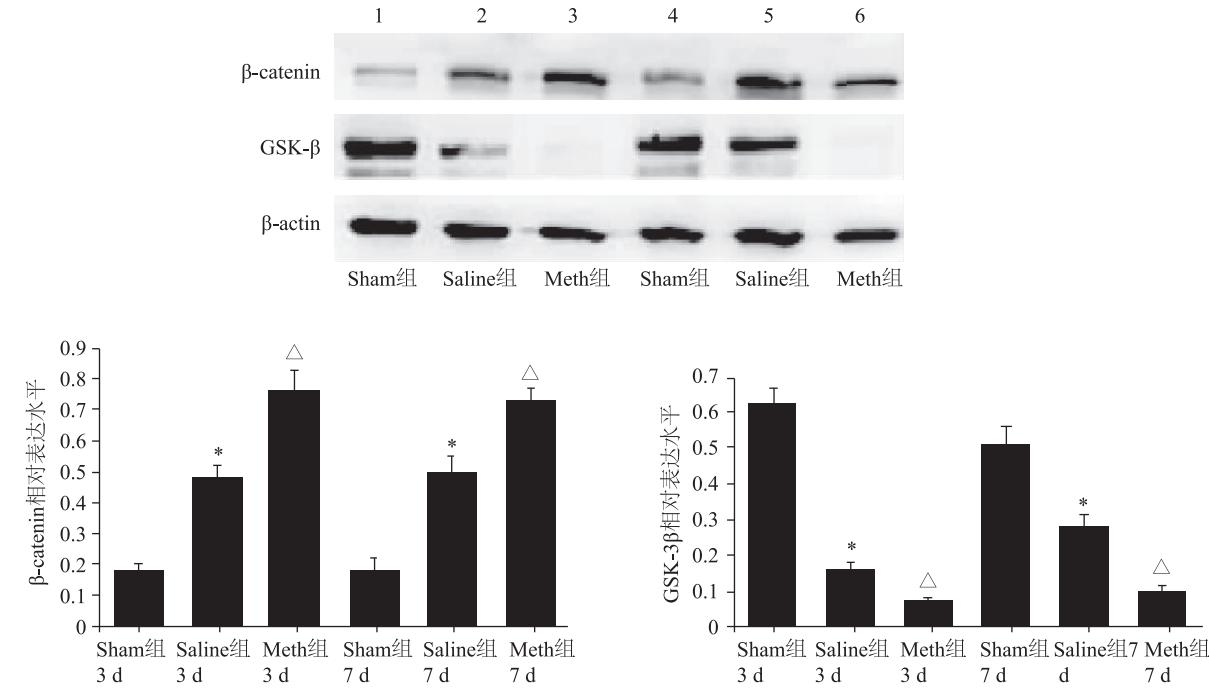


图 2 westernblot 检测 β -catenin、GSK- β 蛋白的表达水平 1、2、3 为第 3 d;4、5、6 为第 7 d; A 为 β -catenin 蛋白表达水平; B 为 GSK- β 蛋白表达水平;与 Meth 组比较, * $P<0.05$, Δ $P<0.01$

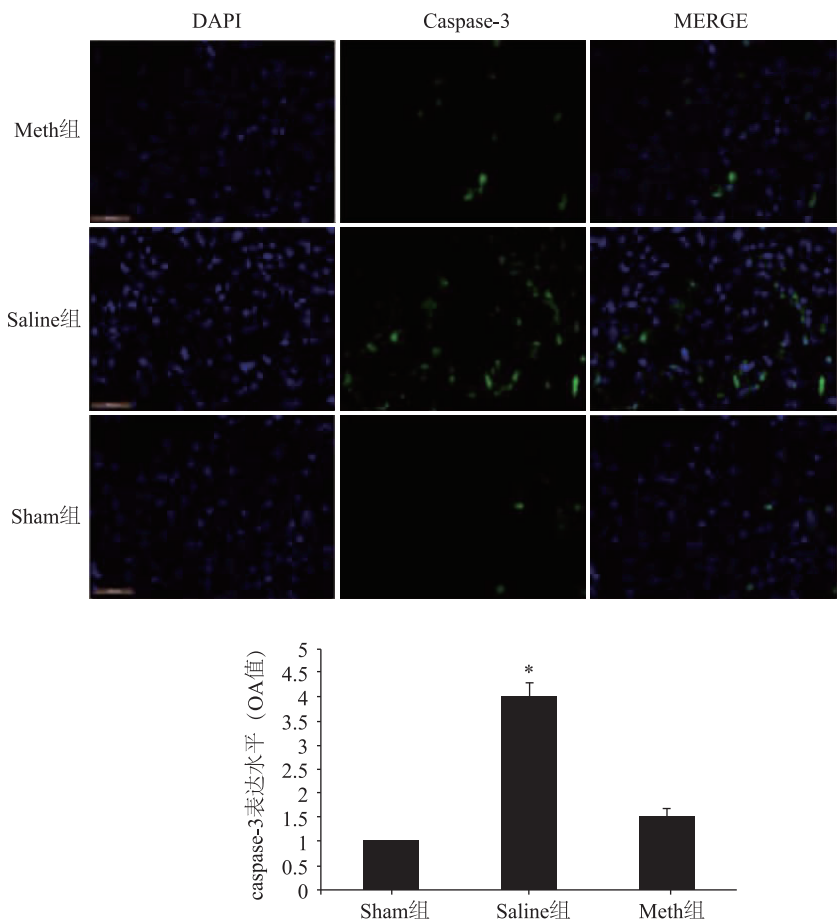


图3 急性脊髓损伤后 caspase-3 免疫荧光(OA 值) 与 Meth 组比较, * $P<0.01$

SCI 大鼠模型,在显微镜下观察尼氏体形态发现 Meth 组与 Saline 组比较,SCI 区域组织形态恢复良好,损伤相对较轻,前角运动神经数量较多。说明甲基强的松龙可以促进神经细胞的修复和再生,有助于神经细胞功能恢复和增加前角运动神经元数量。这也说明 MP 对大鼠急性 SCI 起到了明显的修复作用,为临床进一步研究脊髓损伤的机制及应用提供参考。

Wnts 在细胞增值分化、代谢过程中有着显著的调控作用^[8-9]。Wnt 家族包括 19 个高度保守基因组,根据是否依赖于 β -catenin 发挥作用可分为:(1)以 Wnt3a 为代表的经典信号通路(wnt/ β -catenin);(2)是以 Wnt5a 为代表的非经典信号通路(包括 Wnt-PCP、Wnt- Ca^{2+} 等)。wnt 信号通路激活前,经典通路的 β -catenin 蛋白与核蛋白 Nup62 和 Ran-BP2 等相结合向核内迁移,再与 LEF/TCF 结合,导致 Wnt 靶基因的转录;wnt 经典信号通路被激活后致使细胞质中的 β -catenin 蛋白增加,从而影响细胞核内蛋白的表达^[10-11]。近年来有研究发现 wnt 经

典信号通路在中枢神经系统损伤后阻断 Wnt 信号通路可抑制神经轴突的再生^[12]。当 wnt/ β -catenin 信号通路被激活,能够促进 SCI 后轴突的再生,加速了 SCI 后神经功能恢复的进程^[2,13-15]。Yin 等发现,SCI 后外源性 Wnt3a 可以增加其神经元数量,从而促进神经功能的改善^[16]。本实验结果显示,SD 大鼠急性脊髓损伤后应用 Meth 治疗可抑制 GSK-3 β 蛋白和上调 β -catenin 蛋白的表达。这提示 Meth 可能是通过激活 wnt/ β -catenin 信号通路来促进脊髓损伤的恢复。

脊髓损伤是一种具有较高致残率的中枢神经系统损伤。中枢神经系统损伤后出现的一系列病理改变,主要表现为免疫反应、神经细胞凋亡等。细胞凋亡主要受凋亡调节蛋白的调控^[17],包括促凋亡蛋白(Bax、caspase-3)和抗凋亡蛋白(Bcl-xl)等,恢复这些神经细胞的正常功能^[2,13,18-19]。在 SCI 后 Caspase-3 蛋白活性和表达从某种程度上可反映细胞凋亡情况,是 SCI 后神经细胞破坏和丢失应激表现^[20-21]。本实验结果显示,甲基强的松龙组

caspase-3 蛋白表达水平明显高于假手术组,但低于生理盐水组。说明 SCI 后 MP 可以抑制细胞凋亡,对脊髓损伤组织恢复起到促进作用。

综上所述,SCI 后应用甲基强的松龙能抑制 caspase-3、GSK-3 β 蛋白表达,上调 β -catenin 表达,增加神经元的数量,从而促进运动神经功能的恢复,提示甲基强的松龙对脊髓损伤的作用机制可能与 wnt/ β -catenin 信号通路的激活、抑制神经细胞凋亡有关,但仍需进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Chen Bo-jun, Zuberi M, Borgens RB, et al. Affinity for, and localization of, PEG-functionalized silica nanoparticles to sites of damage in an ex vivo spinal cord injury model[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2012, 6(1):18-27.
- [2] Zhang Yi-ling, Zhang Li-hai, Shen Jing, et al. Two-Photon-Excited fluorescence microscopy as a Tool to investigate the efficacy of methylprednisolone in a mouse spinal cord injury model[J]. *Spine*, 2014, 39(8):E493-E499.
- [3] Hall ED, Braughler JM, Mccall JM. Antioxidant effects in brain and spinal cord injury[J]. *Journal of Neurotrauma*, 1992, 9(Suppl 1):S165-S172.
- [4] Wyndaele M, WyndaeleJJ. Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury; what learns a worldwide literature survey? [J]. *J Spinal Cord*, 2006, 44(9):523-529.
- [5] Beattie MS. Inflammation and apoptosis: linked therapeutic targets in spinal cord injury[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2004, 10(12):580-583.
- [6] Pereira JE, Costa LM, Cabrita AM, et al. Methylprednisolone fails to improve functional and histological outcome following spinal cord injury in rats[J]. *Experimental Neurology*, 2009, 220(1):71-81.
- [7] Hugenholtz H. Methylprednisolone for acute spinal cord injury; not a standard of care[J]. *Canadian Medical Association Journal*, 2003, 168(9):1145-1146.
- [8] Yu Wenzhu, Niu Wenbin, Wang Shuna, et al. Co-culture with endometrial stromal cells enhances the differentiation of human embryonic stem cells into endometrium-like cells[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2015, 10(1):43-50.
- [9] Zhu P, Xu X, Lin X. Both ciliary and non-ciliary functions of Foxj1a confer Wnt/ β -catenin signaling in zebrafish leftcreases proliferation and impairs differentiation of stem cells in the developing cerebellum[J]. *Development*, 2012, 139(10):1724-1733.
- [10] Pandurangan AK. Potential targets for prevention of colorectal cancer; a focus on P13K/Akt/m TOR and Wnt pathways[J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention; APJCP*, 2013, 14(4):2201-2205.
- [11] Xu L, Zhang L, Hu C, et al. Wnt pathway inhibitor pyrvinium pam oate inhibits the self-renewal and metastasis of breast cancer stem cells[J]. *International Journal of Oncology*, 2016, 48(3):1175-1186.
- [12] Liu Y, Wang X, Lu C-c, et al. Repulsive Wnt signaling inhibits axon regeneration following central nervous system injury [J]. *Journal of Neuroscience*, 2008, 28(33):8376-8382.
- [13] Evaniew N, Belley-cote EP, Fallah N, et al. Methylprednisolone for the treatment of patients with acute spinal cord injuries; a systematic review and Meta-Analysis[J]. *Journal of Neurotrauma*, 2016, 33(5):468-481.
- [14] Comi C, Fleetwood T, Dianzani U. The role of T cell apoptosis in nervous system autoimmunity[J]. *Autoimmunity Reviews*, 2012, 12(2, SI):150-156.
- [15] Liu Zhen-feng, Mu Sheng-qun, Wang Xiang. Effect of estrogen on recovering the injured nervous system[J]. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 28(4, S):1471-1475.
- [16] Yin Zong-sheng, Zu Bo, Chang Jun, et al. Repair effect of Wnt3a protein on the contused adult rat spinal cord[J]. *Neurological Research*, 2008, 30(5):480-486.
- [17] 史婷婷, 白建平, 梁月琴, 等. 芹菜素对大鼠缺血/再灌注心肌细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2, Bax, Caspase-3 表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(5):666-671.
- [18] Albayrak S, Atci IB, Kalayci M, et al. Effect of carnosine, methylprednisolone and their combined application on irisin levels in the plasma and brain of rats with acute spinal cord injury[J]. *Neuropeptides*, 2015, 52:47-54.
- [19] Zhang Chen, Zou Yu-long, Ma Jun, et al. Apoptosis associated with Wnt/ β -catenin pathway leads to steroid-induced avascular necrosis of femoral head[J]. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2015, 16:132.
- [20] Bydon M, Lin J, Macki M, et al. The current role of steroids in acute spinal cord injury[J]. *World Neurosurgery*, 2014, 82(5):848-854.
- [21] Maria Fernandez-martos C, gonzalez-fernandez CA, maqueda A, et al. Differential expression of Wnts after spinal cord contusion injury in adult rats[J]. *PLOS One*, 2011, 6(11):e27000.

(2018-11-22 收稿)