

· 基础研究 ·

高压氧预处理对脊髓损伤大鼠神经元线粒体凋亡通路的影响

陈辉强 黄怀 古菁 张旭 叶水林

【摘要】目的 研究高压氧预处理(HBO-PC)对大鼠脊髓损伤(SCI)后运动功能及线粒体凋亡通路的影响。**方法** 共选取健康雄性 Wistar 大鼠 36 只,采用随机数字表法将其分为对照组、模型组及高压氧预处理组。高压氧预处理组大鼠经 7 次高压氧预处理后,采用 Allen's 法将高压氧预处理组及模型组大鼠制成 SCI 模型,对照组未给予特殊处理。于制模 2 周后采用 BBB 运动功能评分对各组大鼠肢体运动功能进行评定,同时采用实时荧光定量 PCR 技术检测各组大鼠脊髓组织内 caspase-3、细胞色素 C(CYC)、Bak、Bax、Bcl-x 及 Bcl-2 mRNA 表达量。**结果** 制模 2 周后发现模型组及高压氧预处理组 BBB 评分[分别为(6.15 ± 1.24)分和(10.80 ± 2.16)分]均较对照组[(21.00 ± 0.00)分]明显降低($P < 0.05$);并且模型组 BBB 评分亦显著低于高压氧预处理组($P < 0.05$)。制模 2 周后模型组 caspase-3 mRNA 表达量(2.46 ± 0.60)较对照组(1.86 ± 0.53)显著增高($P < 0.05$);高压氧预处理组 caspase-3 mRNA 表达量(1.97 ± 0.28)亦较对照组有增高趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$);同时高压氧预处理组 caspase-3 mRNA 表达量较模型组显著降低($P < 0.05$);高压氧预处理组 CYC mRNA 表达量(1.38 ± 0.22)较对照组(1.98 ± 0.62)及模型组(2.69 ± 0.50)均显著降低(均 $P < 0.05$)。高压氧预处理组、模型组 Bak mRNA 表达量[分别为(2.15 ± 0.78)和(1.93 ± 0.61)]均较对照组(1.21 ± 0.46)显著增高($P < 0.05$)。**结论** 高压氧预处理能改善 SCI 大鼠肢体运动功能,其治疗机制可能与减弱 SCI 大鼠神经元线粒体凋亡通路激活程度有关。

【关键词】 高压氧; 预处理; 脊髓损伤; 神经元; 凋亡

The effects of hyperbaric oxygen preconditioning on the mitochondrial apoptosis of spinal cord neurons

CHEN Hui-qiang*, HUANG Huai, GU Jing, ZHANG Xu, YE Shui-lin. * Department of Orthopaedics, Guangzhou General Hospital of the Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China

Corresponding author: HUANG Huai, Email: huanghuai1999@163.com

【Abstract】Objective To study the effects of hyperbaric oxygen (HBO) preconditioning (PC) on motor function and mitochondrial apoptosis after spinal cord injury (SCI) in rats. **Methods** Thirty-six healthy, male Wistar rats were randomly divided into 3 groups (each $n = 12$): a control (CON) group, an SCI model group and an HBO-PC group. The SCI group and the HBO-PC group after 7 sessions of HBO-PC treatment were subjected to SCI modeling using Allen's method. The CON group was not given any special treatment. Two weeks after the modeling, Basso, Beattie, and Bresnahan BBB scale was used to rate the rats' locomotor function, and the T₈ segment of the rats' spinal cords was removed. After extracting total RNA from the spinal cord tissue, real-time quantitative PCR was used to detect the mRNA expression levels of caspase-3, cytochrome C (CYC), Bak, Bax, Bcl-x and Bcl-2 in the spinal cord tissue. **Results** Two weeks after modeling, compared with the CON group, the average BBB locomotion score of the SCI model group had decreased. In contrast, caspase-3, CYC, Bak and Bax mRNA expressions had increased significantly. Compared with the CON group, the average BBB locomotion score of the HBO-PC group had decreased, caspase-3 expression had increased, and Bax mRNA expression had decreased, but the differences in the changes between the two groups were not statistically significant. Bak mRNA expression increased and CYC expression decreased, and the difference between the two groups was statistically significant. Compared with the SCI model group, the average BBB locomotion score of the HBO-PC group increased while caspase-3, CYC, Bak and Bax mRNA expressions decreased, but none of these differences between the two groups was statistically significant. Bak mRNA expression increased and CYC mRNA expression decreased, and those differences between the two groups

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.02.002

基金项目:广东省科技计划项目(2010B031600264);广州市留学人员专项资金项目(20120717)

作者单位:510010 广州,广州军区广州总医院骨科医院(陈辉强);广州军区广州总医院神经医学专科医院神经康复二科(黄怀、古菁、张旭、叶水林)

通信作者:黄怀,Email:huanghuai1999@163.com

were statistically significant. Bcl-x and Bcl-2 mRNA expression in the CON, HBO-PC and SCI model groups were significantly different. **Conclusion** HBO-PC can reduce the loss of motor function after SCI, at least in rats. The mechanism may be related to reducing neuron mitochondrial apoptosis.

【Key words】 Hyperbaric oxygen; Preconditioning; Spinal cord injury; Neurons; Apoptosis

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是中枢神经系统严重创伤,其致残率及病死率均较高,对患者生命健康造成严重威胁,并在很大程度上加重了患者家庭及社会负担。由于 SCI 后机体神经功能恢复较困难,故如何避免 SCI 后继发性神经损伤具有重要临床意义。目前已有多项研究表明,高压氧预处理(hyperbaric oxygen preconditioning, HBO-PC)可减轻继发性 SCI 损伤,保护残存神经轴突及神经元,并促进神经纤维再生及神经传导功能恢复,其治疗机制可能与高压氧预处理能抑制脊髓缺血缺氧部位神经元凋亡有关^[1-2]。

由于线粒体通路在脊髓神经元凋亡中具有非常重要的作用^[3],故本研究拟通过 BBB(Basso, Beattie and Bresnahan)运动功能评分^[4]观察高压氧预处理对 SCI 大鼠运动功能的影响,并同时检测与大鼠神经元线粒体凋亡通路相关的因子,如细胞色素 C(cytochrome C, CYC)、Bcl-2 的同源性拮抗剂(Bcl-2 homologous antagonist/killer, Bak)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因关联 x 蛋白(B cell lymphoma/leukemia-2 associated protein x, Bax)、Bcl-2 异构体 1(Bcl-2-like 1, Bcl-x)、B-细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶 3(cysteine-containing aspartate-specific proteases, caspase-3)的表达情况,从而探讨高压氧预处理对 SCI 大鼠脊髓神经元线粒体凋亡通路的调控机制。

材料与方法

一、主要实验材料

共选取健康雄性 Wistar 大鼠 36 只,鼠龄 8~12 周,体质量 160~180 g,由中国广东省动物中心提供。主要实验试剂包括:5×逆转录 buffer、Hot-Start Taq 酶、M-MLV 酶(中山大学达安基因股份有限公司),Rnasin、dNTPs(美国 Promega 公司),SYBR Green 染料(美国 Invitrogen 公司),CYC、Bak、Bax、Bcl-x、Bcl-2 和 caspase-3(美国 Santa Cruze 公司)。主要实验仪器包括苏泊尔高压锅(苏泊尔公司)、9700 定性 PCR 扩增仪及 7500 定量 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司)。

二、动物分组及制模

实验大鼠经适应性喂养 1 周后,采用随机数字表法将其分为对照组($n=12$)、模型组($n=12$)及高压氧预处理组($n=12$)。各组大鼠均分笼饲养,自由摄食,给予自然光照,饲养环境定期进行清洁、消毒处理。

参考改良 Allen's 打击法^[5]将模型组及高压氧预处理组大鼠制成 SCI 模型,具体制模方法如下:按每千克体重 30 mg 腹腔注射异戊巴比妥钠(浓度为 1%),待麻醉剂生效后背部剃毛,常规消毒铺巾;以 T₈ 棘突为中心行纵向切口,切口长约 2~3 cm,分离软组织至椎板,显露 T_{7,9} 椎板,切除 T₈ 椎板与棘突,充分显露椎管及硬膜囊;采用 30 g 冲击棒(其下端直径 3 mm)自 5 cm 高度自由落体致伤脊髓,缝合伤口后立即腹腔注射生理盐水 5 ml 以补充体液,并在术后 24 h 内使用加热器维持室温在 35℃ 水平。如大鼠出现摆尾反射,双下肢及躯体回缩扑动后双后肢瘫痪,表明 SCI 模型制作成功。对照组大鼠未给予特殊处理,其饲养条件均与模型组及高压氧预处理组保持一致。

三、干预方法

高压氧预处理组大鼠于制模前给予高压氧干预,采用动物实验纯氧舱,经洗舱 10 min 后,在 20 min 内匀速加压至 0.2 MPa(2 ATA),舱内氧浓度维持在 80%~85% 水平,实验大鼠经吸氧 80 min 后,在 20 min 内匀速减压出舱。每天干预 1 次,连续干预 7 d。于最后 1 次高压氧预处理结束 8 h 后将其制成 SCI 大鼠模型。

四、大鼠肢体运动功能评分

于制模 2 周后采用 BBB 评分^[3]对各组大鼠肢体运动功能进行评定(评定时间统一为上午 8:00)。BBB 评分共分为 3 部分,第一部分主要评定大鼠后肢各关节活动功能,分值为 0~8 分;第二部分主要评定大鼠后肢步态及协调能力,分值为 0~5 分;第三部分主要评定大鼠运动中爪的精细动作能力,分值为 0~8 分。BBB 满分为 21 分,分值越高表明大鼠肢体运动功能越好。

五、荧光定量 PCR 检测

制模 2 周后,各组大鼠按每千克体重 30 mg 腹腔注射异戊巴比妥钠(浓度为 1%)进行麻醉,待麻醉剂生效后采用 75% 酒精消毒背部 T_{7,9} 区域,以 T₈ 棘突为中心行纵向切口,切口长 2~3 cm,分离软组织至椎板,切取以打击点为中心、长约 0.5 cm 的受损脊髓组织,迅速投入液氮中备用。

登陆 GeneBank 网站,获取大鼠 caspase-3、CYC、Bak、Bax、Bcl-x 及 Bcl-2 基因的核酸序列数据,采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物如下:caspase-3 上游引物序列为:5'-TGACGACAGGGTGCTACGA-3',下游

引物序列为:5'-ATTTGAGGCTGCTGCATAATC-3';CYC 上游引物序列为:5'-TGCCTTTCAAGTCCACCACA-3', 下游引物序列为:5'-CAGCCATAGTATAG-CAGCGTCTC-3';Bak 上游引物序列为:5'-ATGC-CTACGAACTCTTCACCA-3',下游引物序列为:5'-CAG-GAAGCCAGTCAAACCAC-3';Bax 上游引物序列为:5'-GGTGCTCAAGGCCCTGTG-3',下游引物序列为:5'-GGAGAGGAGGCCTTCCCA-3';Bcl-x 上游引物序列为:5'-GGAGCTGGTGGTTGACTTTC-3',下游引物序列为:5'-CTCCCTTTCTGGTTCAGTTTCT-3';Bcl-2 上游引物序列为:5'-ACGGTGGTGGAGGAAGTCTT-3',下游引物序列为:5'-GGGTGACATCTCCCTGTTGAC-3';同时选用大鼠 β -actin 基因作为内参照基因。采用胍盐裂解/二氧化硅颗粒吸附法提取各组大鼠受损脊髓核酸样本,取 2.5 U c-mmlv、20 U RNasin、250 μ M dNTPs、1 $\times$ 逆转录 buffer,引物各加 0.1 P,配制成 50 μ l 反应体系,通过逆转录反应获得 cDNA。取 5 U Hot-start Taq 酶、1 $\times$ SYBR Green I (Invitrogene)、dNTPs (Promega)、1 $\times$ 定量 buffer,目标引物各加 10 P,配制成 48 μ l 反应体系,并加入 2 μ l 上述逆转录 cDNA。RT-PCR 反应条件如下:95 $^{\circ}$ C 反应 15 min,94 $^{\circ}$ C 变性 15 s,55 $^{\circ}$ C 退火 45 s,共计 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[3] 检测各组大鼠脊髓组织内 caspase-3、CYC、Bak、Bax、Bcl-x 及 Bcl-2 mRNA 相对表达量。

六、统计学分析

本研究所得计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 13.0 版统计学软件包进行数据分析,各组大鼠 BBB 运动功能评分以及 caspase-3、CYC、Bak、Bax、Bcl-x、Bcl-2 mRNA 相对表达量组间比较采用单变量方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、制模后各组大鼠肢体运动功能比较

制模 2 周后发现对照组大鼠 BBB 评分为 (21.00 ± 0.00) 分,模型组及高压氧预处理组 BBB 评分[分别为 (6.15 ± 1.24) 分和 (10.80 ± 2.16) 分]均较对照组明显降低,组间差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.05$);并且模型组 BBB 评分亦显著低于高压氧预处理组,组间差异亦具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

二、制模后各组大鼠脊髓组织内 caspase-3 及 CYC mRNA 表达量比较

造模 2 周后各组大鼠脊髓组织内 caspase-3、CYC mRNA 表达结果详见表 1,表中数据显示,模型组 caspase-3 mRNA 表达量较对照组显著增高 ($P < 0.05$);高压氧预处理组 caspase-3 mRNA 表达量亦较

对照组有增高趋势,但组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与模型组相比较,发现高压氧预处理组 caspase-3 mRNA 表达量显著降低 ($P < 0.05$)。高压氧预处理组 CYC mRNA 表达量较对照组及模型组均显著降低 (均 $P < 0.05$),模型组 CYC mRNA 表达量则较对照组明显增高 ($P < 0.05$)。

表 1 制模 2 周后各组大鼠脊髓组织内 caspase-3 及 CYC mRNA 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	caspase-3 mRNA 表达量	CYC mRNA 表达量
对照组	12	1.86 ± 0.53	1.98 ± 0.62
模型组	12	2.46 ± 0.60^a	2.69 ± 0.50^a
高压氧预处理组	12	1.97 ± 0.28^b	1.38 ± 0.22^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

三、制模后各组大鼠脊髓组织内 Bak、Bax、Bcl-x 及 Bcl-2 mRNA 表达量比较

制模 2 周后各组大鼠脊髓组织内 Bak、Bax、Bcl-x 及 Bcl-2 mRNA 表达结果详见表 2,表中数据显示,高压氧预处理组、模型组 Bak mRNA 表达量均较对照组显著增高 ($P < 0.05$);模型组 Bak mRNA 表达量与高压氧预处理组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组比较,高压氧预处理组及模型组 Bax mRNA 表达量均有增高趋势,但组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。对照组、模型组及高压氧预处理组 Bcl-x、Bcl-2 mRNA 表达量组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 制模 2 周后各组大鼠脊髓组织内 Bak、Bax、Bcl-x 及 Bcl-2 mRNA 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Bak mRNA 表达量	Bax mRNA 表达量	Bcl-x mRNA 表达量	Bcl-2 mRNA 表达量
对照组	12	1.21 ± 0.46	0.92 ± 0.30	1.29 ± 0.40	0.59 ± 0.16
模型组	12	1.93 ± 0.61^a	1.06 ± 0.16	1.35 ± 0.40	0.64 ± 0.19
高压氧预处理组	12	2.15 ± 0.78^a	0.98 ± 0.08	1.25 ± 0.12	0.68 ± 0.15

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

讨 论

目前研究发现,SCI 主要有两种损伤机制,分别是原发性损伤及继发性损伤。针对 SCI 的发病机制,临床常用的治疗方法主要有以下三类:首先是消除外部因素对脊髓的持续损伤作用,避免 SCI 区域扩大,包括手术减压、脱水剂治疗等,这也是 SCI 治疗的基础;其次是保护残存神经元细胞,促进神经元细胞传导功能重建,包括神经营养药物、各类细胞移植、基因治疗及高压氧吸入等;三是通过阻断或局限继发性病理反应,保护残存神经轴突及神经元不再遭受进一步损伤,包括给予甲基强的松龙、钙通道拮抗剂、纳洛酮等药物治疗或给予局部低温保护、人工高压灌流等处理^[6-7]。

近年来高压氧预处理作为一种可减轻脊髓缺血再灌注损伤、保护脊髓神经功能的治疗方法,已越来越多地引起临床关注。有多个研究发现,高压氧预处理保护 SCI 后神经系统功能的机制可能与减少 SCI 后神经元凋亡有关^[1-2]。目前从机制层面分析高压氧预处理抑制 SCI 后神经元凋亡的研究仅见少量报道,这些报道认为高压氧预处理可调控超氧化物歧化酶、过氧化氢酶及 Bcl-2、caspase-3、caspase-9 水平,从而抑制神经元凋亡并发挥神经保护作用^[1,8]。

目前有学者指出,线粒体凋亡通路在脊椎动物细胞凋亡过程中具有重要作用^[7]。当细胞损伤后,CYC 从线粒体中释放,并活化 caspases 前体,进而激活 caspase 3,引发 caspases 级联反应,从而诱发细胞凋亡^[9]。在线粒体凋亡通路中,Bcl-2 家族蛋白对细胞凋亡的控制作用至关重要。Bcl-2 家族蛋白主要分为两大类:一类是抗凋亡蛋白,另一类则是促凋亡蛋白^[10-11]。Bak、Bax、Bcl-x 是 Bcl-2 家族中最具代表性的促凋亡蛋白,当细胞受到死亡信号刺激后,Bak、Bax 及 Bcl-x 在蛋白酶作用下从细胞浆移位到细胞器膜上,并与细胞器膜上和膜内的抗凋亡蛋白相互作用,使抗凋亡蛋白丧失对凋亡的抑制作用,从而导致细胞凋亡;而 Bcl-2 则在 Bcl-2 家族蛋白诱发细胞凋亡过程中对其功能进行限制^[12-15]。

本研究结果显示,模型组大鼠受损脊髓内 CYC、Bak、Bax mRNA 表达量均较对照组明显升高(均 $P < 0.05$),表明发生 SCI 后,大鼠脊髓神经元线粒体中 CYC 被释放,并激活神经元细胞线粒体凋亡通路,引发 caspases 级联反应,从而导致脊髓神经元细胞凋亡。在此过程中大鼠脊髓神经元内 Bak、Bax 活化,从而发挥促神经元凋亡作用。另外本研究同时发现各组大鼠 Bcl-x、Bcl-2 组间差异均无统计学意义($P > 0.05$),提示高压氧预处理对 SCI 大鼠神经元凋亡的调控机制与 Bcl-x、Bcl-2 无显著相关性。通过与模型组大鼠比较,发现高压氧预处理组大鼠受损脊髓内 CYC、Bax mRNA 表达量均显著降低,提示高压氧预处理可减弱 SCI 大鼠神经元线粒体凋亡通路的激活程度,其作用机制可能与高压氧预处理能下调 SCI 大鼠 Bax mRNA 表达、减少神经元细胞 CYC 释放,从而使脊髓神经元 caspase-3 mRNA 表达量下降并减弱 caspases 级联反应有关。

综上所述,本研究结果表明,高压氧预处理能下调

SCI 大鼠脊髓内 caspase-3 表达,改善大鼠肢体活动功能,其治疗机制可能与高压氧预处理能减弱大鼠 SCI 后 caspases 级联反应,从而抑制脊髓神经元凋亡有关。

参 考 文 献

- [1] Wang L, Li W, Kang Z, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates early apoptosis after spinal cord ischemia in rats. *J Neurotrauma*, 2009, 26: 55-66.
- [2] Dong H, Xiong L, Zhu Z, et al. Preconditioning with hyperbaric oxygen and hyperoxia induces tolerance against spinal cord ischemia in rabbits. *Anesthesiology*, 2002, 96: 907-912.
- [3] Liu G, Keeler BE, Zhukareva V, et al. Cycling exercise affects the expression of apoptosis-associated microRNAs after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*, 2010, 226: 200-206.
- [4] Menezes K, de Menezes JR, Nascimento MA, et al. Poly(laminin), a polymeric form of laminin, promotes regeneration after spinal cord injury. *FASEB J*, 2010, 24: 4513-4522.
- [5] Liu J, Tang T, Yang H. Protective effect of deferoxamine on experimental spinal cord injury in rat. *Injury*, 2011, 42: 742-745.
- [6] van Middendorp JJ, Hosman AJ, Donders AR, et al. A clinical prediction rule for ambulation outcomes after traumatic spinal cord injury: a longitudinal cohort study. *Lancet*, 2011, 377: 1004-1010.
- [7] Rossignol S, Frigon A. Recovery of locomotion after spinal cord injury: some facts and mechanisms. *Annu Rev Neurosci*, 2011, 34: 413-440.
- [8] Li Q, Li J, Zhang L, et al. Preconditioning with hyperbaric oxygen induces tolerance against oxidative injury via increased expression of heme oxygenase-1 in primary cultured spinal cord neurons. *Life Sci*, 2007, 80: 1087-1093.
- [9] Shore GC, Papa FR, Oakes SA. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23: 143-149.
- [10] Cullen SP, Henry CM, Martin SJ. Staying alive: defensive strategies in the Bcl-2 family playbook. *Mol Cell*, 2011, 44: 509-510.
- [11] Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, 2005, 435: 677-681.
- [12] Gurzov EN, Eizirik DL. Bcl-2 proteins in diabetes: mitochondrial pathways of β -cell death and dysfunction. *Trends Cell Bio*, 2011, 21: 424-431.
- [13] Soriano ME, Scorrano L. Traveling Bax and forth from mitochondria to control apoptosis. *Cell*, 2011, 145: 15-17.
- [14] Ren D, Tu HC, Kim H, et al. BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the Bax- and Bak-dependent cell death program. *Science*, 2010, 330: 1390-1393.
- [15] Pang X, Moussa SH, Targy NM, et al. Active Bax and Bak are functional holins. *Genes Dev*, 2011, 25: 2278-2290.

(修回日期:2012-12-28)

(本文编辑:易 浩)