

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)05-0416-04

实验性脊髓空洞前状态神经元凋亡及 NF- κ B, Bcl-2 和 Bax 的调控作用

孙国柱¹ 张庆俊² 张更申¹ 李建峰¹(¹ 河北医科大学第二医院神经外科, 河北 石家庄 050000; ² 北京大学人民医院神经外科, 北京 100044)

Effect of NF- κ B, Bcl-2 and Bax on neuronal apoptosis in experimental presyrinx state

SUN Guo-Zhu¹, ZHANG Qing-Jun², ZHANG Geng-Shen¹, LI Jian-Feng¹¹Department of Neurosurgery, Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China, ²Department of Neurosurgery, People's Hospital, Peking University, Beijing 100044, China

【Abstract】 AIM: To investigate neuronal apoptosis in experimental presyrinx state and the regulatory role and mechanism of NF- κ B, Bcl-2 and Bax in rabbits. **METHODS:** The experimental syringomyelia models of rabbits were established by intracisternal injection of Kaolin. Neuronal apoptosis and the expressions of NF- κ B, I κ B, Bcl-2 and Bax were measured with TUNEL and immunohistochemistry in 1, 3, 7, 14 and 21 d after operation respectively. **RESULTS:** Compared with that in control group, the NF- κ B expression in Kaolin group increased from the 1st day after operation, reached its peak at 3rd day, remained there till 7th day, and returned to a normal level at 14th day approximately. The I κ B expression showed a negative correlation with NF- κ B at the same time points. The Bcl-2 and Bax expressions increased from the 1st day, reached its peak at 7th day, remained there till 14th day, and then began to drop. **CONCLUSION:** In presyrinx state of experimental syringomyelia, the increasing expression of NF- κ B mainly upregulates its target gene Bax, thus inducing neuronal apoptosis to involve in nervous function injury.

【Keywords】 NF- κ B; syringomyelia; TUNEL; immunohistochemistry; apoptosis

【摘要】 目的: 研究实验性脊髓空洞前状态神经元凋亡及 NF- κ B, Bcl-2, Bax 的调控作用。方法: 选用新西兰白兔, 用 TUNEL 法和免疫组化技术检测脊髓空洞前状态脊髓神经元凋亡情况和 NF- κ B, I κ B, Bcl-2, Bax 表达变化。结果: 高岭土组动物在术后各个时段均有神经元凋亡发生, 以 7~14 d 最为多见, NF- κ B 于术后 1 d 就有表达增高, 在 3 d 达到高峰, 维

持至 7 d 后开始回落, 14 d 时基本恢复正常水平; I κ B 的表达与 NF- κ B 的表达呈负相关依存关系, Bcl-2 和 Bax 表达则于术后 1 d 开始增加, 到术后 7 d 达高峰, 持续至 14 d 后开始下降。结论: 脊髓空洞前状态发展过程中, 作为多向转录调节作用的核蛋白因子 NF- κ B 表达增高, 主要上调其靶基因 Bax, 诱导神经元凋亡, 参与实验性脊髓空洞前状态神经功能损害。

【关键词】 NF- κ B; 脊髓空洞症; TUNEL 法; 免疫组化; 细胞凋亡

【中图分类号】 R744.4 **【文献标识码】** A

0 引言

脊髓空洞症(Syringomyelia, SM)是一种发病隐匿、缓慢进展的脊髓退行性病变, 发病机制尚不完全清楚。由于缺乏有效治疗方法, 故预后不佳。我们先前的研究^[1]证实, SM 在形成前 2 wk 内存在着缺血水肿, 称之为脊髓空洞形成前期, 国外称其为空洞前状态(Presyrinx state)^[2]。近年来, 有证据表明在神经系统发育和急性慢性损伤中可见到凋亡发生^[3-4], 但脊髓空洞前状态中是否存在细胞凋亡少见报道。为此, 我们检测脊髓空洞前状态中神经元凋亡情况和 NF- κ B, I κ B, Bcl-2, Bax 表达变化, 探讨 NF- κ B, Bcl-2 和 Bax 对神经元凋亡的调控作用, 为阐明其发病机制和探索有效的治疗手段开辟一条新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料 健康新西兰大白兔 56 只(河北医科大学实验动物中心), 体质量 1.5~2.0 kg, 雌雄不拘。一抗为鼠抗 NF- κ Bp56 多克隆抗体(Parmingen 公司); 鼠抗 I κ B α mAb、鼠抗 Bcl-2 mAb、鼠抗 Bax mAb(Santa Cruz 公司)。SABC 免疫组化试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒(武汉博士德公司产品)。高岭土(分析纯, 上海试剂四厂)。HPIAS-1000 彩色病理图文分析系统(同济医科大千屏影像公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和模型制作 将动物随机分为 3 组, 高岭土组 40 只, 生理盐水组和假手术组各 8 只。动物在氯胺酮(30 mg/kg)耳缘静脉麻醉下, 经皮枕大池穿刺, 缓慢抽出无色透明脑脊液 0.6 mL 后, 高岭

收稿日期 2005-10-08; 接受日期 2005-12-02

基金项目 河北省科技厅基金(002761100)

通讯作者 张庆俊, Tel (010) 68314422 Ext. 3611 Email zhangqjhb@yahoo.com

作者简介 孙国柱, 博士, 副主任医师, Tel (0311) 87222973 Email: Sungzh705@sohu.com

士组动物注入 37℃ 250 g/L 高岭土悬浊液 0.6 mL; 生理盐水组动物注入 37℃ 生理盐水 0.6 mL; 假手术组动物仅行枕大池假穿刺。

1.2.2 术后神经功能判定 按改良的 Tarlov 评分法对动物进行行为学检查评分。0 分: 肢体完全瘫痪; 1 分: 有肢体运动, 但不能站立; 2 分: 可站立, 但不能行走、负重; 3 分: 可行走、负重, 但步态不稳; 4 分: 正常。

1.2.3 标本的制作和采集 生理盐水组和假手术组在术后、高岭土组在第 1、3、7、14、21 日各随机选取动物 8 只, 在氯胺酮过度麻醉下 40 g/L 多聚甲醛经心脏灌注, 经后正中切口, 咬除脊突和椎弓根, 取出上颈髓置入相同固定液中后固定 24 h, 常规脱水、透明、石蜡包埋, 4 μm 切片并裱于经 10 g/L 多聚赖氨酸处理的清洁载玻片, 用于 HE 染色和免疫组织化学染色观察。

1.2.4 免疫组化染色 NF-κB, IκB, Bcl-2 和 Bax 的表达按免疫组织化学常规步骤进行。细胞内有棕黄色粗颗粒分布或棕黄色细腻颗粒分布者为阳性反应细胞。采用病理图文分析系统, 每张切片任取 5 个视野, 高倍镜下记数总细胞数和阳性细胞数。

1.2.5 TUNEL 法检测细胞凋亡 按试剂盒说明书操作。阳性判定: 细胞核中有棕黄色颗粒者为 TUNEL 阳性细胞, 即凋亡细胞。

统计学处理: 各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 专用统计程序进行方差分析。检验结果以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后动物神经功能 高岭土组动物于术后第 7 日出现神经功能障碍, 包括厌食、精神萎靡、四肢无力, 甚至瘫痪, 并随着时间的延长逐渐加重, 与生理盐水组和假手术组对比有显著差异 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 各组动物的 Tarlov 评分及脊髓空洞前状态中上颈髓组织中 NF-κB, IκB 的表达阳性面积百分比 ($n=8$, 分, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	Tarlov 评分(分)	NF-κB (%)	IκB (%)
生理盐水	4.00 ± 0.00	18.42 ± 2.11	65.73 ± 1.24
假手术	4.00 ± 0.00	19.53 ± 1.32	63.24 ± 1.27
高岭土			
1 d	4.00 ± 0.00	56.20 ± 2.14 ^{ac}	27.14 ± 2.35 ^{ac}
3 d	3.75 ± 0.46	82.54 ± 1.13 ^{ac}	23.24 ± 1.53 ^{ac}
7 d	2.50 ± 0.60 ^a	57.75 ± 2.32 ^{ac}	30.64 ± 1.72 ^{ac}
14 d	2.25 ± 0.71 ^a	25.78 ± 1.56 ^a	58.78 ± 1.73 ^a
21 d	1.75 ± 0.22 ^a	23.15 ± 1.64 ^a	57.64 ± 1.27 ^a

^a $P < 0.05$ vs 生理盐水组和假手术组; ^b $P < 0.05$ vs 高岭土组 14, 21 d.

2.2 光镜观察 高岭土组动物于术后第 3 日出现神经元、血管周围间隙增宽, 表现为轻度水肿; 第 7、14 日水肿程度加重(图 1), 核膜、核仁稍显模糊, 神经元胞体内尼氏体减少, 胶质细胞增生, 中央管饱满, 室管膜细胞受压变平, 管周组织疏松, 呈明显水肿改变, 蛛网膜下腔可见高岭土沉积, 大量炎性细胞浸润。第 21 日水肿稍减轻, 但持续存在, 胞质空泡出现, 前角细胞数量减少, 胶质细胞增生明显, 中央管张力增加, 室管膜上皮断裂、脱落, 高岭土肉芽肿形成。生理盐水组和假手术组动物脊髓神经元轮廓正常, 核及核仁清楚, 胞质内尼氏体分布均匀, 神经胶质细胞亦正常。



图 1 高岭土注入后 14 d 上颈髓前角水肿的神经元 HE ×160

2.3 脊髓空洞前状态中不同时段 NF-κB, IκB 的表达 高岭土组动物上颈髓组织中 NF-κB 在神经元和神经胶质细胞质及胞核中均有表达, 于术后第 1 日明显升高, 第 3~7 d 日达高峰(图 2), 到 2 wk 时基本恢复正常。IκB 主要在神经元和神经胶质细胞质中表达, 与 NF-κB 表达呈负相关, 于术后第 1 日明显降低, 维持低水平至第 7 日, 到 2 wk 时基本恢复正常。生理盐水组和假手术组动物上颈髓组织中仅有弱表达。彩色病理图文分析系统测定的切片中阳性反应物中的面积百分比结果见表 1。



图 2 高岭土注入后 7 d NF-κB 在上颈髓前角神经元中的表达 SABC ×40

2.4 脊髓空洞前状态中细胞凋亡情况和 Bcl-2, Bax 表达 高龄土组动物术后不同时段中脊髓灰质神经元均有凋亡发生,以 7~14 d 最为多见(图 3)。典型的凋亡细胞表现为染色质凝集、边集化,呈新月形聚集于核膜下。因切面的不同,凝集的染色质以不同形态散在于核切面的任意位置,或以圆形位于核膜下,或位于核中央。神经元凋亡于术后第 1 日增加,7~14 d 达高峰,以后逐渐降低,21 d 仍可见到凋亡发生。Bcl-2, Bax 阳性表达与神经元凋亡基本一致(图 4, 5)。正常对照组和假手术组动物上颈髓内可见少量凋亡的少突胶质细胞, Bcl-2, Bax 仅有少量弱阳性反应细胞。阳性细胞的百分比结果见表 2。

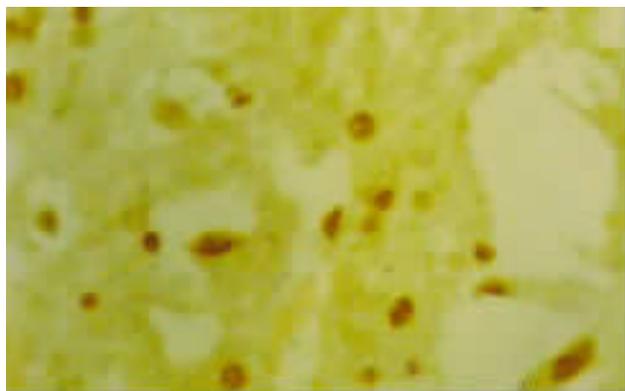


图 3 高龄土注入后 7 d 上颈髓前角 TUNEL 阳性神经元 TUNEL $\times 40$

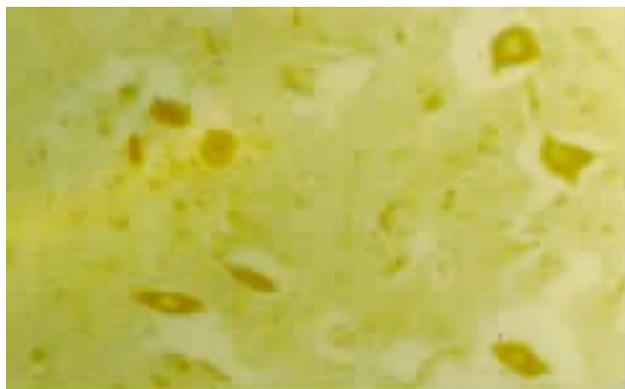


图 4 高龄土注入后 14 d Bcl-2 在上颈髓前角神经元中的表达 SABC $\times 40$

3 讨论

本研究表明,脊髓空洞前状态发展过程中存在两种细胞死亡形式,一种为死亡,另一种为凋亡,两者共同引起脊髓神经功能损害。其中,后者于术后 1 d 出现增加,7 d 达高峰,以后逐渐降低,21 d 时仍可见到凋亡发生,表明细胞凋亡参与了脊髓空洞前状态的发展过程。也有类似报道脊髓缺血诱导凋亡发生。Kato

等^[5]用导管阻塞降主动脉使脊髓急性缺血,观察到凋亡于 1~2 d 出现,主要位于灰质后根背侧的小神经元。Sakurai 等^[6]在兔脊髓缺血模型中发现运动神经元存在凋亡现象,高峰时间在 7 d,脊髓缺血后产生大量自由基、兴奋性氨基酸、NO 积聚,并导致细胞内钙离子超载,最终引起某些原癌基因的表达,诱导细胞凋亡的发生。

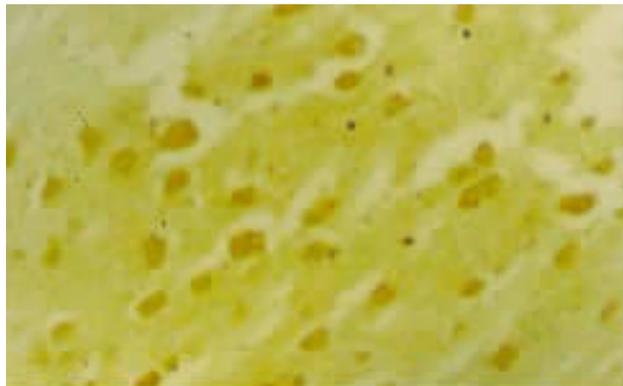


图 5 高龄土注入后 14 d Bax 在上颈髓前角神经元中的表达 SABC $\times 40$

表 2 脊髓空洞前状态上颈髓组织中凋亡细胞、Bcl-2, Bax 阳性细胞数百分比 (n=8, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡细胞	Bcl-2	Bax
生理盐水	1.42 \pm 0.18	3.73 \pm 1.44	5.42 \pm 1.86
假手术	1.38 \pm 0.48	4.17 \pm 2.02	5.76 \pm 2.14
高龄土			
1 d	14.86 \pm 1.74 ^a	7.50 \pm 1.15 ^a	18.27 \pm 2.55 ^a
3 d	23.58 \pm 2.23 ^a	12.92 \pm 3.77 ^a	25.92 \pm 1.78 ^a
7 d	37.75 \pm 4.36 ^{ac}	17.64 \pm 4.52 ^{ac}	40.29 \pm 3.68 ^{ac}
14 d	35.34 \pm 3.52 ^{ac}	19.78 \pm 3.69 ^{ac}	39.35 \pm 3.10 ^{ac}
21 d	26.25 \pm 2.64 ^a	12.25 \pm 3.27 ^a	32.14 \pm 2.99 ^a

^aP < 0.05 vs 生理盐水组和假手术组, ^cP < 0.05 vs 高龄土组 1, 3, 21 d.

有研究证实 NF- κ B 也具有促进中枢神经系统神经凋亡的作用。在静息情况下其位于胞质内,与 I κ B 结合成复合物处于失活状态。细胞受到刺激后, I κ B α 磷酸化后被降解,从 NF- κ B/I κ B α 复合物上解离下来, NF- κ B 恢复活性,通过核膜上的受体进入细胞核,与靶基因 κ B 位点结合,迅速诱导靶基因的转录而发挥作用。Schneider 等^[7]发现小鼠后脑缺血半球的 NF- κ B 激活使 p65 基因敲除小鼠的缺血性脑损伤明显减轻,从而首次利用基因技术证明 NF- κ B 在局灶性脑缺血中具有促神经元凋亡的作用。Ueno 等^[8]利用靶向 NF- κ B 的圈套脱氧寡核苷酸(decoy ODN)方

法证实了 NF- κ B 的活化可加重大鼠全脑缺血模型的神经元凋亡,进一步证明了 NF- κ B 具有促进神经细胞凋亡的作用。Shou 等^[9]观察到鼠脑局部缺血时海马中 NF- κ B 激活能上调促凋亡基因 Bax 蛋白表达。Tamatani 等^[10]也证实,在鼠海马中 NF- κ B 激活能上调 Bax、Bcl-2 的表达且这些种作用能被 I κ B- α 抑制。但 NF- κ B 与脊髓空洞前状态神经细胞凋亡的关系尚未见相关报道。

本实验结果显示,在脊髓空洞前状态形成过程中 NF- κ B 和 I κ B 与 Bcl-2 和 Bax 无论在空间上还是在时间上均存在特定的依赖性。I κ B 的表达与 NF- κ B 的表达呈负相关依存关系。而 Bcl-2 和 Bax 表达则于术后 1 d 开始增加,到术后 7 d 达高峰,持续至 14 d 后开始下降,其中 Bax 表达明显高于 Bcl-2。提示脊髓空洞前状态神经细胞凋亡的发生机制可能是由于高岭土注入枕大池后,广泛地分布于上颈髓蛛网膜下腔,随着病程的进展,逐渐形成无菌性蛛网膜炎,加之其对脊髓前后动脉、静脉产生直接压迫,导致上颈髓缺血、水肿,诱导 NF- κ B 表达增加,上调靶基因 Bax 和 Bcl-2,但 Bax 表达明显高于 Bcl-2,继而引起细胞凋亡。

【参考文献】

- [1] 张庆俊,孙国柱,张更申. 实验性家兔脊髓空洞症发病机制研究[J]. 中华神经外科杂志, 2000, 16(6): 364-366.
[2] Fischbein NJ, Dillon WP, Cobbs C, et al. The "presyrinx" state:

A reversible myelopathic that may precede syringomyelia[J]. AJNR Am J Neuroradiol, 1999, 20(1): 7-20.

- [3] 李文联,王玲,张红爱. Ca^{2+} 对新生大鼠脑缺氧缺血后 CREB 磷酸化及神经元凋亡的影响[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(3): 217-219.
[4] 马利杰,王红,王相利,等. 大鼠急性脊髓损伤后神经细胞 bcl-2 与 bax 比值及细胞凋亡的关系[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(22): 2042-2045.
[5] Kato H, Kanellopoulos GK, Matsuo S, et al. Neuronal apoptosis and necrosis following spinal cord ischemia in the rat[J]. Exp Neurol, 1997, 148(2): 464-474.
[6] Sakurai M, Hayashi T, Abe K, et al. Delayed selective motor neuron death and fas antigen induction after spinal cord ischemia in rabbit[J]. Brain Res, 1998, 797(1): 23-28.
[7] Schenider B, Martin-Villalba A, Weih F, et al. NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia[J]. Nat Med, 1999, 5(5): 554-559.
[8] Ueno T, Sawa Y, Kitagawa-Sakakida S, et al. Nuclear factor-kappa B decoy attenuates neuronal damage after global brain ischemia: a future strategy for brain protection during circulatory arrest[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2001, 122(4): 720-727.
[9] Shou Y, Li N, Li L, et al. NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-X(S) and Bax contributes to cytochrome c release in cyanide-induced apoptosis[J]. J Neurochem, 2002, 81(4): 842-852.
[10] Tamatani M, Che YH, Matsuzaki H, et al. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons[J]. J Biol Chem, 1999, 274(13): 8531-8538.

编辑 王 睿

欢迎投稿 欢迎订阅

《第四军医大学学报》是国内外公开征稿和发行的高级综合性医学学术期刊,曾荣获首届国家期刊奖,第二届国家期刊奖提名奖和百种中国杰出学术期刊,是中国各大检索系统源期刊,《中文核心期刊要目总览》收入期刊,美国化学文摘(CA)和俄罗斯文摘杂志(AJ)源期刊。本刊主要刊载基础医学、临床医学、预防医学、军事医学、口腔医学、航空航天医学、中医中药学、生物医学工程学方面的研究原著、研究快报、经验交流、病例报告、综述和述评等各类学术性中文文稿。

地址 (710033) 西安市长乐西路 169 号

电话 (029) 84774674, 84773456, 84773804, 84773814

传真 (029) 84774499

http://journal.fmmu.edu.cn

Email: edjfmumu@fmmu.edu.cn