

神经丝氨酸蛋白酶抑制剂(NSP)对大鼠急性脊髓损伤(SCI)后神经功能的修复作用

吕越昌 施德源[△] 姜晓幸 冯振洲 蒋淳 陈子贤

(复旦大学附属中山医院骨科 上海 200032)

【摘要】 目的 通过检测脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、胶质细胞源性神经生长因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)和轴突生长抑制因子(neurite outgrowth inhibitor A, Nogo-A)的表达情况,来评估神经丝氨酸蛋白酶抑制剂(neuroserpin, NSP)对急性脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)大鼠神经功能的恢复情况并对其机制进行初步探索。方法 130只成年雄性SD大鼠随机分成3组:SCI组($n=60$),用改良Allen's重物打击法制备SCI模型,鞘内注射生理盐水25 μ L。NSP组($n=60$),大鼠SCI后立即鞘内注射NSP 25 μ L。正常对照组($n=10$),只去除椎板,暴露脊髓,不造成SCI。各组定期行为学观察(BBB评分),Western blot检测SCI局部GDNF和Nogo-A的表达,real-time PCR检测SCI局部BDNF、GDNF和Nogo-A的表达情况。结果 随时间延长,术后SCI组和NSP组大鼠BBB评分均逐渐升高,但是两组并无明显差异。Western blot和real-time PCR显示:急性SCI后1天GDNF表达明显升高,且随时间延长其表达量逐渐降低,同时,在1、3、7和14天各时间点NSP组GDNF表达量均高于SCI组。急性SCI后Nogo-A表达成逐渐升高趋势,同时,NSP组在各时间点的Nogo-A表达量均低于SCI组。real-time PCR显示:SCI 1天后BDNF表达水平显著提高,随时间推移,表达水平逐渐下降;同时,NSP组在1、3、7和14天各时间点BDNF水平均明显低于SCI组。结论 急性SCI后,大鼠内源性BDNF、GDNF和Nogo-A的表达水平均升高。外源性给予NSP对大鼠急性SCI后的运动功能无明显改善,但在基因和蛋白质水平对大鼠的神经功能恢复有一定的促进作用。

【关键词】 神经丝氨酸蛋白酶抑制剂(NSP); 脊髓损伤(SCI); 脑源性神经生长因子(BDNF); 胶质细胞源性神经生长因子(GDNF); 轴突生长抑制因子(Nogo-A); 大鼠

【中图分类号】 R 683.2 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2014.02.013

Repair effects of neuroserpin (NSP) on neural function after acute spinal cord injury (SCI) in rats

LÜ Yue-chang, SHI De-yuan[△], JIANG Xiao-xing, FENG Zhen-zhou, JIANG Chun, CHEN Zi-xian
(Department of Orthopedics, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and neurite outgrowth inhibitor A (Nogo-A) in rat spinal cord tissues with acute spinal cord injury (SCI), and then to study whether neuroserpin(NSP) could change these expressions to protect the neural function. **Methods** One hundred and thirty SD rats were randomly divided into 3 groups: SCI group ($n=60$), NSP group ($n=60$) and control group ($n=10$). The acute SCI models were made according to the Allen's weight drop method. SCI group were injected with 25 μ L normal saline, and NSP group were treated with 25 μ L NSP by intrathecal

[△]Corresponding author E-mail: shiaden@yahoo.com.cn

injection immediately after acute SCI. In control group, we only removed the vertebral plate and did not injure the spinal cord. Then we used Basso Beattie Bresnahan(BBB) scores to evaluate the functional deficits of the spinal cord. Western blot and real-time PCR were used to detect the expressions of BDNF, GDNF and Nogo-A. **Results** There were no significant difference in BBB scores between SCI and NSP group. Western blot and real-time PCR both indicated that GDNF expressions increased significantly one day after acute SCI compared with control group, and declined thereafter. GDNF expressions of NSP group were higher than these of SCI group at 1, 3, 7 and 14 d respectively after acute SCI. Nogo-A expressions after acute SCI increased compared with control group, and NSP group was lower than SCI group in every time point respectively. Meanwhile, real-time PCR showed that BDNF expressions after acute SCI reached the highest at 1 day and declined thereafter. However, the BDNF expressions of NSP group were significantly lower than these of SCI group at 1, 3, 7 and 14 d after acute SCI respectively. **Conclusions** The expressions of BDNF, GDNF and Nogo-A after ASCI all increased compared with control group. There were no significant improvement in the motor function of ASCI rats with NSP by intrathecal injection, but NSP could promote the neural function repairment after acute SCI at the gene and protein level.

【Key words】 neuroserpin (NSP); spinal cord injury (SCI); brain-derived neurotrophic factor (BDNF); glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF); neurite outgrowth inhibitor A (Nogo-A); rat

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后的功能重建与恢复是医学界面临的难题,迄今仍缺乏确定性的治疗方法。神经丝氨酸蛋白酶抑制剂(neuroserpin, NSP)是一种轴突选择性的神经源性丝氨酸蛋白酶抑制剂,属于 serpins 超家族^[1],在成人中枢神经系统(central nerves system, CNS)有广泛表达,主要存在于海马、下丘脑、小脑、嗅球、杏仁核以及交感神经系统,脊髓内及背根神经节内也有大量表达^[2]。有研究表明 NSP 在脑缺血进程中起着一定的脑保护作用,外源性应用 NSP 可以降低脑缺血再灌注后梗死体积,同时缺血半暗带区凋亡细胞的数量^[3]。我们之前的研究发现,在大鼠慢性脊髓压迫损伤后 1~2 天 NSP 呈表达高峰,随后进行性下降,而神经元凋亡在受压后 6 周较 2 周时明显升高,且具有统计学意义^[4]。由此我们推测 NSP 对 SCI 后神经功能修复可能具有促进作用。因此,本实验观察 SCI 用 NSP 干预后的神经功能修复情况,并对其机制进行初步研究。

材料和方法

大鼠急性 SCI 模型 健康成年雄性 SD 大鼠 130 只,体质量为 250 g (± 20 g),购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。10%水合氯醛腹腔麻醉

(0.3~0.4 mL/100 g),将大鼠俯卧,在背部沿脊柱由上而下摸至突出最高处为第 10 胸椎棘突,以此为中心备皮,常规消毒,铺无菌手术单,后正中线作约 2 cm 切口,暴露 T₁₀、T₁₁ 椎体,用磨钻将 T₁₁ 横突与椎板连接处磨断,然后用咬骨钳去除棘突和椎板,充分暴露 T₁₁ 脊髓。用改良的 Allen's 撞击器制备 SCI 动物模型,打击时用拉钩拉开脊髓两侧软组织,使脊柱稳定,不受呼吸运动影响,致伤量 5 g \times 6 cm。撞击后发现脊髓组织水肿、出血,硬脊膜完整呈紫红色,紧张、膨隆,大鼠尾巴出现痉挛性摆动,双下肢躯体回缩样扑动,呈迟缓性瘫痪,即造模成功。造模后 NSP 组立即鞘内注射重组人 NSP (PeproTech 公司, 20 μ g/mL) 25 μ L, SCI 组鞘内注射生理盐水 25 μ L。术后常规给予抗生素预防感染,维持 3 天。术后人工排尿,每天 3 次。

BBB 评分法 参照 Basso 等^[5]提出的 SCI 大鼠功能恢复评判标准即 BBB 评分法,双盲法对各组动物后肢运动能力进行评估。根据关节活动、前后肢协调运动、身体支撑、躯干及尾的位置等情况打分(0~21 分)。0 分代表后肢无活动,21 分表示后肢活动正常。

Western blot 检测 GDNF 和 Nogo-A 表达 NSP 组和 SCI 组分别在造模后 1、3、7 和 14 天各取 6 只大鼠,过量 10%水合氯醛腹腔注射致死,严格无菌操作取出伤段脊髓组织,用冰冻生理盐水冲洗后

迅速置于液氮中保存,而后将标本转至 -80°C 保存。按每100 mg标本加1 mL 预冷蛋白裂解液(RIPA),玻璃匀浆器匀浆,至充分裂解, 4°C $12\ 000\times g$ 离心10 min,取上清,即得组织总蛋白产物,然后进行SDS-PAGE电泳,PVDF膜转膜,5%脱脂奶粉封闭,加一抗(兔抗GDNF,1:500,Abcam;兔抗Nogo-A,1:1 000,Abcam;鼠抗 β -actin,1:5 000,Abcam), 4°C 过夜,加HRP标记二抗(1:5 000,abcam),室温孵育1 h,ECL显影。

real-time PCR 检测 NSP组和SCI组分别在造模后1、3、7和14天各取6只大鼠,过量10%水合氯醛腹腔注射致死,严格无菌操作取出伤段脊髓组织。Trizol试剂盒提取总RNA,紫外分光光度法测RNA浓度,然后总RNA反转录为cDNA,进行real-time PCR反应,以 β -actin为内参。引物序列由上海生物工程股份有限公司合成。 β -actin:上游引物5'-AATCAAGATCATTGCTCCACCAG-3',下游引物5'-TTAGAAGCATTTGCGGTGGAC-3';BDNF:上游引物5'-GATGAGGACCAGAAGGTTTCG-3',下游引物5'-GATTGGGTAGTTCGGCATTG-3';GDNF:上游引物5'-CCACACCGTTTAGCGGAATGC-3',下游引物5'-CGGGACTCTAAGATGAAGTTATGGG-3';Nogo-A:上游引物5'-CCGATACAGAAAAAGAG-GACAG-3',Nogo-A:下游引物5'-AGGCTGGCACC-AAACACC-3'。PCR仪为QIAGEN Rotor-Gene Q。

统计学处理 实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 11.0软件进行单因素方差分析。

结 果

BBB 评分 正常大鼠在造模前评分均为21分。对照组因为手术去除椎板的影响,术后1天评分稍有下降,之后迅速恢复为21分并保持稳定。SCI组和NSP组术后1天均表现为丧失所有后肢运动,评分为0,但随时间延长,两组大鼠评分渐渐升高,至14天时均超过8分。然而,NSP组与SCI组同时间段进行比较并无明显差异($P>0.05$,表1)。

表1 3组大鼠 BBB 评分

Tab 1 BBB scores in the 3 groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	BBB score			
		1 d	3 d	7 d	14 d
Control	10	20.5 \pm 0.53	21	21	21
SCI	15	0	1.33 \pm 0.49	3.87 \pm 0.64	8.20 \pm 0.77
NSP	15	0	1.67 \pm 0.49	4.53 \pm 0.64	8.47 \pm 0.74

Western blot 结果 Western blot显示:在正常成年大鼠脊髓内GDNF表达很少,急性SCI后1天GDNF表达明显升高,随时间延长,其表达量逐渐降低,14天时略高于正常对照组;同时,在1、3、7和14天各时间点NSP组GDNF表达量均高于SCI组(图1)。Nogo-A在正常成年大鼠脊髓内的表达量也较少,急性SCI后其表达成逐渐升高趋势,14天时表达最强;同时,NSP组在各时间点的Nogo-A表达量均低于SCI组(图2)。

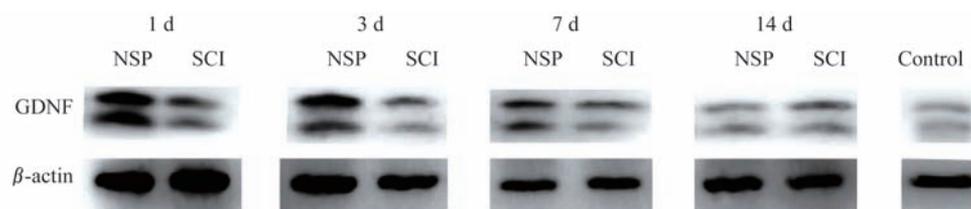


图1 3组大鼠不同时间 GDNF 蛋白表达量

Fig 1 Expressions of GDNF protein in the 3 groups of rats at different time points

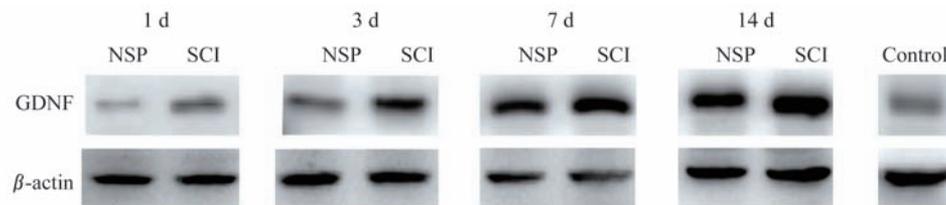


图2 3组大鼠不同时间 Nogo-A 蛋白表达量

Fig 2 Expressions of Nogo-A protein in the 3 groups of rats at different time points

real-time PCR 检测结果 real-time PCR 显示: BDNF 在正常对照组表达极少,造模后 1 天 NSP 组与 SCI 组 BDNF 表达水平均显著升高,随时间推移,表达水平逐渐下降,但总是高于正常对照组。同时,NSP 组在 1、3、7 和 14 天各时间点 BDNF 水平均明显低于 SCI 组(图 3);GDNF 在正常对照组表达极少,SCI 后 1 天 NSP 组与 SCI 组 GDNF 表达水平均显著升高,随时间延长,其表达水平逐渐下降,但总是高于正常对照组。同时,NSP 组在 1、3 和 7 天时间点 GDNF 水平明显高于 SCI 组(图 4)。Nogo-A 在正常组少量表达,SCI 后表达水平缓慢升高,在 14 天时达到最高峰(只观察到术后 14 天),同时,NSP 组在 1、3、7 和 14 天各时间点 Nogo-A 水平明显低于 SCI 组(图 5)。

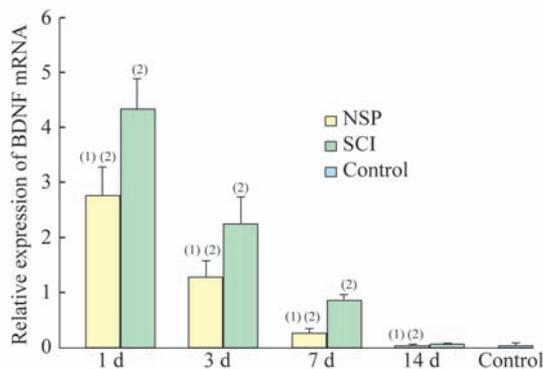


图 3 BDNF mRNA 相对表达量

Fig 3 Relative expression of BDNF mRNA

(¹) vs. SCI group, $P < 0.05$; (²) vs. Control group, $P < 0.05$.

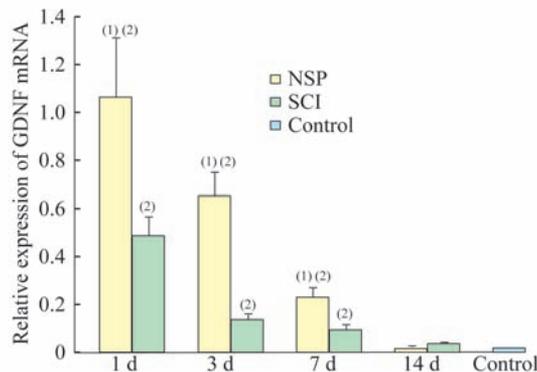


图 4 GDNF mRNA 相对表达量

Fig 4 Relative expression of GDNF mRNA

(¹) vs. SCI group, $P < 0.05$; (²) vs. Control group, $P < 0.05$.

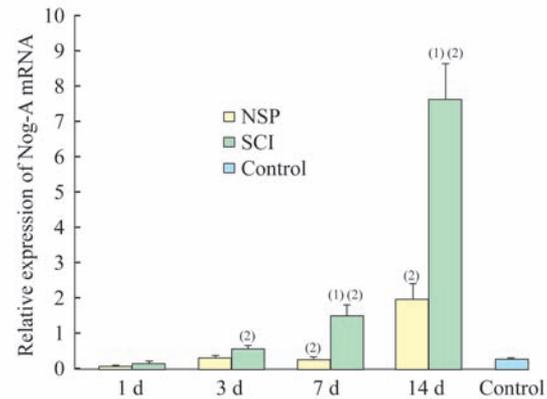


图 5 Nogo-A mRNA 相对表达量

Fig 5 Relative expression of Nogo-A mRNA

(¹) vs. NSP group, $P < 0.05$; (²) vs. Control group, $P < 0.05$.

讨 论

NSP 由神经元的轴突分泌,在轴突生长和对突触连接的形成突触可塑性方面起到重要作用^[6]。同时 NSP 参与调控中枢神经系统细胞外组织型纤溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, tPA)和纤维蛋白溶酶的蛋白水解的活性,两者共同调节神经元的迁移和突触形成,在神经元的重塑和维持上起重要作用^[1,7]。tPA 是一种丝氨酸蛋白酶,在中枢神经系统神经元中以 mRNA 和蛋白水平表达。在外周血中,tPA 是体内纤溶系统的生理性激动剂,在人体纤溶和凝血的平衡调节中发挥着关键性的作用,是一种新型的血栓溶解剂。而在中枢神经系统中,tPA 能够引发兴奋性毒性和缺血性的神经元死亡,可以加速脑缺血和癫痫过程中神经细胞的死亡^[8-10]。然而,NSP 又是 tPA 的天然抑制剂^[6],由此可推测 NSP 对兴奋性毒性介导的神经元死亡起抑制作用。

成熟哺乳动物的中枢神经系统再生能力极其微弱,主要与 3 个因素有关:(1)CNS 神经元自身缺乏足够的再生能力;(2)CNS 缺乏足够的神经营养因子支持其再生;(3)CNS 再生的微环境中主要受大量少突胶质细胞(oligodendrocyte, Oligo)合成的髓磷脂(myelin)相关抑制物的影响^[11]。由于机体客观存在的不可改变的因素,我们试着干预后 2 个因素来探索 NSP 的神经保护作用。神经营养因子是

机体产生的能够促进神经细胞存活、生长、分化的一类蛋白质因子,且为神经元生长与存活所必需^[12]。本实验所涉及的3种因子都与神经元的生长存活关系非常密切。脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)能够防止神经元受损伤死亡、改善神经元的病理状态、促进受损伤神经元再生及分化,而且是成熟的中枢及周围神经系统的神经元维持生存及正常生理功能所必需的一类神经营养因子。胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)是已知的最重要的运动神经元营养因子。髓磷脂相关抑制物包括轴突生长抑制因子(neurite outgrowth inhibitor, Nogo)、髓鞘相关糖蛋白(myelin associated glycoprotein, MAG)、少突胶质细胞髓鞘糖蛋白(oligodendrocyte myelin glycoprotein, OMgp)^[13]。Nogo-A是Nogo的一种主要异构体,是目前已知最强的神经轴突生长抑制因子,具有限制轴突的伸延及中枢系统损伤后轴突的再生能力^[14]。Simonen等^[15]证实,Nogo-A基因敲除小鼠胸部脊髓背侧半切2周后,与野生型小鼠相比,Nogo-A基因敲除鼠有更多的皮质脊髓束纤维长入损伤处。Kim等^[16]也证明,成年Nogo-A/B基因敲除小鼠SCI后,皮质脊髓内的轴突可广泛延伸至横断面,神经纤维大量再生并进入侧索节段。我们设计本实验就是观察NSP对SCI后的神经系统功能修复机制是否与后2个因素有关。

在本实验中,急性SCI后SCI组和NSP组的BBB评分在1、3、7和14天各时间点呈逐渐升高趋势,但两组之间在同时间点比较却无明显差异,说明NSP对SCI后大鼠的后肢运动功能改善无有效的促进作用。同时,Madani等^[17]也发现NSP的缺乏和过表达均对小鼠的运动功能没有任何影响,但是在异常环境中焦虑情况下其反应性会降低,如遇到新事物时所产生的心理上的恐惧。从这方面来看,NSP对急性SCI后大鼠的运动功能似乎无太大的改善作用。当然,也可能与我们的观察时间相对较短或者NSP的有效作用时间不够长有一定关系。

SCI后,BDNF和GDNF在基因和蛋白质水平的表达均上调,这与脊髓的自我修复功能有关。从GDNF和Nogo-A的Western blot及real-time PCR结果来看,NSP的神经保护作用机制与GDNF和Nogo-A在体内的表达量有一定关系。GDNF与

Nogo-A在基因和蛋白质水平上的表达基本一致,NSP组GDNF表达量高于SCI组,Nogo-A表达量低于SCI组,表明NSP可以促进GDNF的释放并抑制Nogo-A的产生,对SCI后神经功能的修复具有积极作用。

然而,real-time PCR显示BDNF mRNA表达量在SCI后1天达最高峰,之后逐渐下降,而NSP组在各时间点BDNF mRNA表达量明显低于SCI组。从结果来看,NSP对SCI后神经元的保护作用与BDNF呈负相关的关系,即NSP抑制了BDNF的表达。在正常机体内,纤维蛋白酶(plasmin)由纤维蛋白酶原(plasminogen)转化而来的过程需要通过tPA的诱导才能进行,而BDNF的前体proBDNF转化为其成熟体BDNF又离不开plasmin的活化作用^[18],而NSP又是tPA的天然抑制剂^[6]。所以,NSP间接地阻断了需要tPA才能完成proBDNF到BDNF转变的正常生理过程。NSP可以抑制tPA介导的神经元死亡,同时又阻断了BDNF的生成,然而BDNF对SCI后神经元的存活具有重要的积极作用,因此,NSP对SCI后神经元的保护作用机制与BDNF无太大关系。

通过本研究,我们观察到NSP对急性SCI后的神经功能修复确实起到积极的促进作用,这可能与内源性GDNF、Nogo-A的表达量的高低有密切关系,NSP通过GDNF的上调和Nogo-A的下调来保护存活神经元的正常功能,促进受损伤神经元的再生及分化,并修复脊髓损伤后轴突的再生能力和可塑性。同时,NSP的神经修复功能对大鼠的运动功能似乎没有有效的作用。但是,NSP对其他神经营养因子是否也有类似的作用,或者NSP修复损伤后中枢神经系统功能的具体机制目前仍不清楚,甚至将来NSP应用于临床的问题,都需要进一步研究和探讨。

致谢 中国科学院上海生命科学研究院的周嘉伟、尹延青及周嘉伟老师组的研究生提供了大力帮助和指导。

参 考 文 献

- [1] Osterwalder T, Contartese J, Stoeckli ET, et al. Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor [J]. *EMBO J*, 1996, 15(12): 2944 - 2953.
- [2] Hastings GA, Coleman TA, Haudenschild CC, et al.

- Neuroserpin, a brain-associated inhibitor of tissue plasminogen activator is localized primarily in neurons. [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(52): 33062 - 33067.
- [3] Yepes M, Sandkvist M, Wong MK *et al*. Neuroserpin reduces cerebral infarct volume and protects neurons from ischemia-induced apoptosis [J]. *Blood*, 2000, 96 (2): 569 - 576.
- [4] Wan S, Feng Z, Chen Z *et al*. Neuroserpin upregulates in the early period of sustained spinal cord compression [J]. *Clin Lab*, 2012, 58(9 - 10): 891 - 896.
- [5] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. *J Neurotrauma*, 1995, 12(1): 1 - 21.
- [6] Yepes M, Lawrence DA. Neuroserpin; a selective inhibitor of tissue-type plasminogen activator in the central nervous system [J]. *Thromb Haemost*, 2004, 91(3): 457 - 464.
- [7] DeGroot DM, Martens GJ. Expression of neuroserpin is linked to neuroendocrine cell activation [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(9): 3791 - 3799.
- [8] Cinelli P, Madani R, Tsuzuki N, *et al*. Neuroserpin, a neuroprotective factor in focal ischemic stroke [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2001, 18(5): 443 - 457.
- [9] Wu J, Echeverry R, Guzman J, *et al*. Neuroserpin protects neurons from ischemia-induced plasmin-mediated cell death independently of tissue-type plasminogen activator inhibition [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(5): 2576 - 2584.
- [10] Simonin Y, Charron Y, Sonderegger P, *et al*. An inhibitor of serine proteases, neuroserpin, acts as a neuroprotective agent in a mouse model of neurodegenerative disease [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(41): 10614 - 10619.
- [11] Horner PJ, Gage FH. Regenerating the damaged central nervous system [J]. *Nature*, 2000, 407(6807): 963 - 970.
- [12] Skaper SD. The neurotrophin family of neurotrophic factors; an overview [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 846: 1 - 12.
- [13] Woolf CJ, Bloechlinger S. It takes more than two to Nogo [J]. *Science*, 2002, 297(5584): 1132 - 1134.
- [14] Goldberg JL, Barres BA. Nogo in nerve regeneration [J]. *Nature*, 2000, 403(6768): 369 - 370.
- [15] Simonen M, Pedersen V, Weinmann O, *et al*. Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury [J]. *Neuron*, 2003, 38(2): 201 - 211.
- [16] Kim JE, Li S, GrandPre T, *et al*. Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B [J]. *Neuron*, 2003, 38(2): 187 - 199.
- [17] Madani R, Kozlov S, Akhmedov A, *et al*. Impaired explorative behavior and neophobia in genetically modified mice lacking or overexpressing the extracellular serine protease inhibitor neuroserpin [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 23(3): 473 - 494.
- [18] Pang PT, Teng HK, Zaitsev E *et al*. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity [J]. *Science*, 2004, 306(5695): 487 - 491.

(收稿日期: 2013 - 02 - 20; 编辑: 沈玲)