

椎管减压对大鼠内质网跨膜蛋白 Ire1 α 与细胞凋亡的影响

李 京 任振峰

(济宁医学院基础学院, 山东 济宁 272067)

摘 要 **目的** 观察椎管减压对于大鼠脊髓内质网跨膜蛋白 Ire1 α 与细胞凋亡表达变化的影响。**方法** 健康成年 SD 大鼠 60 只, 随机分为: 1) 椎管减压组(模型组) 40 只, 每个时相点 10 只, 采用压迫装置制备椎管减压模型; 2) 对照组 10 只, 行脊髓持续压迫; 3) 假手术组 10 只, 只做椎板切除。模型组分别于脊髓受压 0.5、3、6、12h 后解除压迫。采用免疫组化、Tunel 染色观察压迫段脊髓内 Ire1 α 的表达变化及细胞凋亡情况。**结果** 细胞凋亡数与 Ire1 α 阳性细胞数均于 0.5h 减压时开始增高, 二者随减压时间的延迟而不断增加。假手术组与对照组、各减压组之间相比均有显著性差异($P < 0.05$)。**结论** 大鼠脊髓压迫性损伤, 尽早进行椎管减压, 能够减轻内质网应激反应, 减少 Ire1 α 的表达与细胞凋亡的发生, 促进神经功能恢复。

关键词 抑制物阻抗性酯酶 1; 减压; 内质网应激; 细胞凋亡

中图分类号: R322.8 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2012)10-322-03

Effects of vertebral canal decompression on Ire1 α expression and apoptosis following spinal cord injury in the rats

LI Jing, REN Zhen-feng

(Academy of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of vertebral canal decompression on Ire1 α expression and apoptosis following spinal cord injury in the rats. **Methods** Sixty adult SD rats (250 ± 20 g) were randomly divided into consistently compressive group (control group, $n = 10$), decompressive groups ($n = 40$) and sham-operation group ($n = 10$). The spinal cord was compressed posteriorly at the level of the first lumbar vertebra with a custom-made screw for 0.5, 3, 6 and 12 hours respectively, followed by decompression by removal of the screw. The sections were detected by immunohistochemistry and TUNEL staining. **Results** TUNEL- and Ire1 α -positive cells were increased at 0.5 hour after decompression, and gradually elevated with the delay of decompression. The number of Ire1 α -positive neurons was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The results indicate that the dynamic changes of Ire1 α and apoptosis were correlated to decompression. Early decompression could reduce Ire1 α expression and relieve the apoptosis following secondary spinal cord injury.

Key words: Ire1 α ; Decompression; Endoplasmic reticulum stress (ERS); Apoptosis

脊柱骨折、椎管内韧带钙化、脊髓或椎管内肿瘤等均可以引起脊髓压迫性损伤, 引起椎管内压力升高, 脊髓内神经组织、细胞水肿、变性, 严重影响患者的运动和感觉功能。许多基础研究和手术学资料表明, 尽早行椎管减压, 能够改善神经系统的功能^[1], 但其机制并不十分清楚。经资料查阅, 椎管减压后, 脊髓神经元内部出现了应激反应, 然而对于内质网跨膜蛋白 Ire1 α 与神经细胞凋亡的情况却知之甚少。因此, 本实验在制作大鼠椎管减压模型的基础上, 观察 Ire1 α 的表达变化规律及其与细胞凋亡的关系, 探讨减压与内质网应激之间的联系, 以明确减压在加快神经功能恢复的作用机制,

为临床干预提供治疗策略。

1 材料与方法

1.1 主要材料

羊抗鼠 Ire1 α (美国 santa cruz 公司), Tunel 染色盒 (德国 Roche 公司), 免疫组化试剂盒、DAB 显色液、细胞裂解液 (碧云天生物公司)。

1.2 实验动物分组

健康、成年、清洁级 SD 大鼠 60 只, 由山东大学实验动物中心提供, 雌雄不限, 体重 250 ± 20 g。动物随机分为: 1) 椎管减压组(模型组) 40 只, 每个时相点 10 只, 采用压迫装置制备椎管减压模型; 2)

持续压迫组(对照组)10 只,行脊髓持续压迫;3)假手术组 10 只,只做椎板切除而不压迫脊髓。

1.3 椎管减压模型制作

参照 KanXu^[2] 的方法制作大鼠脊髓压迫模型。大鼠俯卧位,3.5%水合氯醛腹腔注射麻醉,逐层显露第一腰椎椎弓,去除第一腰椎的部分椎弓板,直至暴露硬脊膜。将一下端平整、光滑,长 2 mm,直径为 2 mm 的螺钉缓慢、垂直拧入椎管中,脊髓压迫深度为 1 mm,缝合伤口。模型组分别于脊髓压迫 0.5、3、6 及 12 h 后解除螺钉,12 h 后处死动物;对照组待螺钉固定后,将伤口缝合,24 h 后处死;假手术组切除椎板后将伤口缝合。

1.4 组织取材

每组动物 10 只,将动物麻醉后,暴露心脏,用平头针经左心室插至升主动脉,剪开右心耳,用灌注泵灌入 4℃生理盐水 280 ml,再灌入 4℃的 4%多聚甲醛 300 ml(0.1mol/L PBS 配制,pH 7.35~7.45);取压迫段脊髓,4℃环境下,4%多聚甲醛固定 48 h,30%蔗糖中脱水,待组织块沉底后用制作冰冻切片,片厚 10 μm,用做 HE、Nissl、Tunel 染色及免疫组化检测。

1.5 免疫组织化学

将冷冻切片放置在 0.3% H₂O₂-甲醇液中,室温下 16 min,血清封闭 25 min,1:400 羊抗鼠 Irelα 4℃孵育 24 h;生物素标记的二抗 37℃反应 2.5 h;(SABC 复合物)37℃反应 1.5 h;每次换液前均用 0.01 mol/L PBS 冲洗 3 遍;DAB 显色。阳性产物为胞质内棕黄色颗粒。光学显微镜下,每张切片随机选取 6 个视野对 Irelα 阳性细胞计数。

1.6 原位细胞凋亡检测(Tunel)

按照说明书的步骤进行 Tunel 染色。阳性产物为细胞核棕褐色颗粒。光学显微镜下,每张切片随机选取 6 个视野计数凋亡细胞。

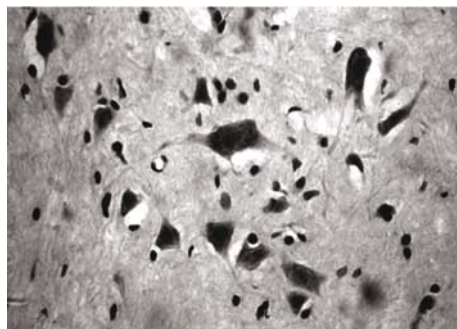
1.7 统计学方法

所有实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计学处理。

2 结果

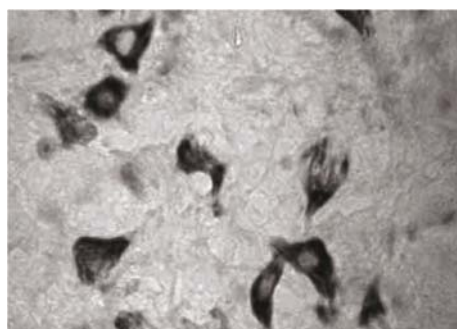
2.1 HE 和 Nissl 染色

脊髓压迫 0.5 h 后减压,神经元和胶质细胞轻度肿胀;受压 12 h 后减压,神经元突起大量减少。对照组灰白质结构疏松,细胞周围间隙增宽,神经元水肿严重,核浆比增大(图 1)。Nissl 染色可见神经元及胶质细胞的数量随减压时间延迟而减少;对照组尼氏体大量崩解甚至消失;假手术组未见细胞形态、数量明显变化(图 2)。



神经元水肿,细胞周围间隙增宽,核浆比增大

图 1 对照组大鼠脊髓压迫段 HE 染色(×400)

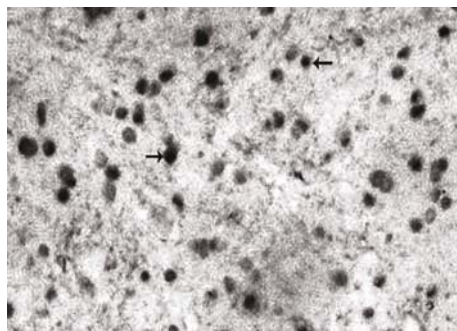


尼氏体大量减少甚至消失

图 2 对照组大鼠脊髓压迫段 Nissl 染色(×400)

2.2 原位细胞凋亡检测(Tunel)

假手术组,未见明显神经细胞凋亡;3 h 减压组,Tunel 阳性细胞开始增多,主要分布于脊髓灰质前角和中间带;12 h 减压组凋亡细胞进一步增多,有些神经元细胞核向一侧偏移。对照组凋亡细胞广泛分布于脊髓灰质前角、中间带和后角(图 3)。假手术组与对照组、各减压组之间相比均有显著性差异,各减压组之间相比有显著性差异($P < 0.05$,表 1)。



凋亡细胞广泛分布于脊髓灰质前角、中间带和后角

图 3 对照组大鼠脊髓压迫段 Tunel 染色(×400)

表1 大鼠脊髓受压后各实验组凋亡细胞数
及 Irel α 阳性细胞数 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	Tunel(+)	Irel α
假手术组	1.02 $\pm$ 0.17*	2.23 $\pm$ 1.56*
椎管减压组		
0.5h 减压组	6.21 $\pm$ 0.22* Δ	9.60 $\pm$ 1.24* Δ
3h 减压组	15.41 $\pm$ 1.23* Δ	19.84 $\pm$ 0.55* Δ
6h 减压组	30.67 $\pm$ 0.75* Δ	31.20 $\pm$ 1.63* Δ
12h 减压组	44.09 $\pm$ 0.76* Δ	40.34 $\pm$ 0.09* Δ
对照组	64.32 $\pm$ 1.99	59.02 $\pm$ 0.25

注: * $P < 0.05$, 与对照组比较; $\Delta P < 0.05$, 各减压组之间比较

2.3 免疫组织化学检测

各组神经元内均有 Irel α 的表达, 阳性产物定位于神经元胞浆及突起, 呈卵圆形, 阳性神经元分布于脊髓灰质前角、侧角; 对照组细胞间隙明显增宽, Irel α 阳性神经元深染色, 广泛分布于脊髓灰质(图4)。假手术组与对照组、各减压组之间相比均有显著性差异($P < 0.05$, 表1)。



Irel α 阳性细胞数量显著增加, 分布于脊髓前角、侧角神经元胞浆及突起

图4 对照组大鼠脊髓压迫段 Irel α 免疫组化染色($\times 400$)

3 讨论

本研究在制作脊髓压迫模型的基础上, 在压迫持续时间分别为 0.5、3、6 和 12 h 之后解压, 以模拟外科学的椎管减压术。各模型组脊髓受压深度均为 1 mm, 减压后持续时间均为 12 h; 而各组压迫持续的时间不同, 其结果能够反映出不同时相减压后的组间差异。

脊髓压迫性损伤除脊髓本身受到的机械性压迫损害外, 还由于缺血、炎症反应等导致压迫段局部微循环的改变; 当压迫解除后, 脊髓遭受再灌注损伤, 其内部释放氧自由基、NO 等神经毒性物质, 神经细胞出现凋亡等继发性改变^[3]。脊髓继发性损伤引起的残存神经细胞凋亡是导致神经功能丧失的重要原因^[4]。

Irel 属内质网腔 I 型跨膜蛋白, 是启动内质网应激反应的重要分子之一^[5]。Irel α 具有丝/苏氨

酸特异的蛋白激酶活性和内切核酸酶活性。在生理状态下, Irel α 与伴侣蛋白 Grp78、Grp94 等形成稳定的复合物。当细胞受损, 内质网腔出现葡萄糖耗竭、蛋白糖基化的抑制、二硫键形成受阻、 Ca^{2+} 浓度失衡等微环境变化时, 引起蛋白质折叠出现严重障碍, 其天然构象难以形成, 大量蛋白滞留于内质网内, 不能运输至高尔基体, 称为内质网应激^[6]。解离后的 Irel α 协助蛋白折叠并运出内质网, 维持细胞内环境的稳定。如果应激反应过重, Irel α 不能及时协助蛋白转运出去, 细胞将启动凋亡程序; 此时的 Irel α 作为细胞凋亡的始动因子, 招募肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (TNF associated factor 2, TRAF2), Irel α 与 TRAF2、JIK 形成稳定的复合物, Irel α -TRAF2-JIK 激活 caspase-12, 后者促进 caspase-9 酶原的聚合及活化, caspase-9 进一步激活了 caspase-3, caspase-3 阻止细胞内 DNA 的复制和修复, 破坏细胞骨架, 影响 DNA 和 RNA 拼接, 诱导细胞成分崩解, 形成凋亡小体^[7]。

本研究结果显示, 与假手术组相比, 对照组及各减压组 Tunel 及 Irel α 阳性细胞数均随着减压时间的延迟而增加, 二者阳性细胞的时空表达规律相一致, 提示早期减压不仅可以减少 Irel α 的表达, 还通过减轻内质网应激反应, 减少细胞凋亡的发生, 加快神经功能恢复。

参考文献:

- [1] Urakawa T, Ito T, Hirano T, et al. Thoracic myelopathy due to idiopathic epidural ossifications in a child; a case report[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2008, 33(14): E478-E481.
- [2] Xu K, Chen QX, Li FC, et al. Spinal cord decompression reduces rat neural cell apoptosis secondary to spinal cord injury[J]. Zhejiang Univ Sci B, 2009, 10(3): 180-187.
- [3] Guimarães JS, Freire MA, Lima RR, et al. Mechanisms of secondary degeneration in the central nervous system during acute neural disorders and white matter damage[J]. Rev Neurol, 2009, 48(6): 304-310.
- [4] Wu B, Ren X. Promoting axonal myelination for improving neurological recovery in spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 2009, 26(10): 1847-1856.
- [5] Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ, et al. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease(Irelp) in mammalian cells[J]. Genes Dev, 1998, 12(12): 1812-1824.
- [6] Paschen W, Aufenberg C, Hotop S, et al. Transient cerebral ischemia activates processing of xbp1 messenger RNA indicative of endoplasmic reticulum stress[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23(4): 449-461.
- [7] Luo D, He Y, Zhang H, et al. AIP1 is critical in transducing IRE1-mediated endoplasmic reticulum stress response[J]. J Biol Chem, 2008, 283(18): 11905-11912.

(收稿日期 2012-08-21)