

重组人红细胞生成素、甲泼尼龙对大鼠损伤脊髓中肾上腺髓质素表达的调控

郭新庆¹ 郑启新¹

摘要 目的: 观察重组人红细胞生成素(EPO)、甲泼尼龙(MP)在大鼠脊髓损伤中对肾上腺髓质素(AM)表达的调控, 探索其作用机制。**方法:** 试验动物随机分为脊髓损伤组(对照组)、EPO 治疗组与 MP 治疗组 3 组, 每组 18 只, 采用 Allen's WD 法制成大鼠急性脊髓损伤动物模型。**结果:** HE 染色 EPO 治疗组与 MP 治疗组病理变化轻于对照组。免疫组化染色 3 组中均有 AM 的表达; EPO 组及 MP 组 AM 表达 3d、6d 高于对照组($P<0.01$), MP 组 AM 表达 3d 高于 EPO 组 ($P<0.05$), 6d、11d 两组差异无显著性意义。神经功能评分 EPO 组、MP 组高于对照组, MP 组 3d 高于 EPO 组 ($P<0.05$), 6d、11d 两组差异无显著性意义。**结论:** EPO、MP 能上调 AM 的表达, 促进神经功能恢复, 这可能是 MP、EPO 在损伤脊髓中的保护作用机制之一。

关键词 肾上腺髓质素; 脊髓损伤; 红细胞生成素; 甲泼尼龙

中图分类号: R651.2 R493

文献标识码: A

文章编号: 1001-1242(2007)-06-0503-03

The modulation of erythropoietin and methylprednisolone on the adrenomedullin expression in acute spinal cord injured tissue of rats/GUO Xinqing, ZHENG Qixin/Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22 (6):503—505

Abstract Objective: To discuss the modulation of erythropoietin (EPO) and methylprednisolone (MP) on the adrenomedullin expression in acute spinal cord injured tissue of rats and explore the mechanism. **Method:** The rats were divided into three groups by randomization: Control, EPO cure and MP cure groups. There were 18 rats in each group. SD rat model of acute spinal cord injury were established by Allen's weight drop (WD). **Result:** The HE staining pathological changes in MP and EPO cure groups were mitigated than control group. Expression of AM was found in the spinal cord tissues of the three groups. The expression level of AM in EPO and MP cure groups was obviously higher than in control group with significant difference ($P<0.01$) on the 3rd and 6th day. The expression level of AM in MP cure group was higher than that in EPO cure group on the 3rd day ($P<0.05$) and had no significant difference on 6th and 11th day. The scores of nervous condition in MP cure and EPO cure groups were higher than that of control group. The MP cure group's score was higher than EPO cure group's on the 3rd day ($P<0.05$). It had no significant difference on the 6th and 11th day. **Conclusion:** Expression of AM can increased after treatment of MP and EPO. Maybe it is one of the protective mechanisms of MP and EPO in SCI.

Author's address Dept. of Orthopedics Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Wuhan, 430022

Key words adrenomedullin; spinal cord injury; erythropoietin; methylprednisolone

肾上腺髓质素(adrenomedullin, AM)是一种具有多种重要生物学功能的活性多肽, 分布于几乎所有组织, 在中枢神经系统中也有免疫活性 AM 及其 mRNA 的广泛分布^[1]。已有研究表明脊髓损伤后 AM 表达增高, 但重组人红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、甲泼尼龙(methylprednisolone, MP)能否影响 AM 表达及 AM 是否对损伤脊髓有保护作用尚未见报道。本研究应用 EPO、MP 治疗大鼠脊髓损伤, 观察比较两者作用于脊髓损伤后对 AM 表达的调控, 结合神经功能及形态学变化, 探讨两种药物保护机制及效果, 尝试为临床治疗脊髓损伤提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

健康 SD 大鼠 54 只, 购自同济医学院动物部, 雌雄不限, 体重 250 ± 30 g, 用随机数字表法随机分为 3 组: 脊髓损伤组(对照组)、EPO 治疗组、MP 治疗组, 分别分为伤后 3d、6d、11d 3 个时间点, 每个时间点分别有 6 只大鼠。

1.2 动物模型的建立

用 1%戊巴比妥钠 30mg/kg 腹腔注射麻醉, 无菌条件下手术, 背侧正中切口, 长约 4cm, 损伤脊髓段在 T10, 均保持硬脊膜的完整并分别缝合各层。对照组: 采用 Allen's WD 法制备大鼠脊髓背侧损伤模型, 切除椎板, 暴露脊髓, 制作直径为 2mm 的凹型塑

1 华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科东区, 武汉, 430022

作者简介: 郭新庆, 男, 主治医师, 硕士在读

收稿日期: 2006-08-30

料片水平置于脊髓损伤部位, 自制圆柱状金属棒沿细玻璃导管垂直自由落下, 制成脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 模型。金属棒重量 8.5g, 高度 5cm, 损伤能量 8.5×5gcm。同法制备 MP 治疗组、EPO 治疗组大鼠脊髓背侧损伤模型: MP 治疗组损伤后 1h 给予 30mg/kg 尾静脉注射 MP; EPO 治疗组损伤后 1d、3d、5d、7d、9d 给予 600U/kg 尾静脉注射 EPO。损伤动物模型以摆尾反射, 双下肢对称性抽搐为成功标志。纳入 54 只大鼠均成功制模, 无脱失。

1.3 组织病理学检查及免疫组织化学检查

各组动物分别于伤后 3d、6d、11d 再次麻醉, 以损伤脊髓段为中心, 取长约 1.0cm 脊髓组织, 10% 中性甲醛溶液固定、石蜡包埋, 连续切片, 切片层厚 4μm。HE 染色, 观察各组脊髓组织水肿、变性坏死及炎性细胞浸润情况。AM 免疫组化染色采用 SABC 法, AM 兔抗大鼠抗体稀释度 1:150, 用 PBS 液稀释, DAB 显色剂显色, 阴性对照采用正常兔血清代替一抗, 苏木素复染细胞核。兔抗大鼠 AM 多克隆抗体、SABC 免疫组化染色试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 图像分析

每只大鼠随机选取 5 张 AM 免疫组化染色切片, 每张切片分别从灰质前角至后角取 5 个高倍视野, 应用 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统测定 AM 阳性反应物吸光度值 (A), A 值与 AM 的表达强度呈正比。

1.5 运动功能的测定

采用改良 Tarlov 评分及改良 Rivlin/Tator 斜板法于伤后 3d、6d、11d 进行神经功能评分, 观察大鼠下肢运动功能恢复情况。

1.5.1 改良 Tarlov 评分标准: 0 分: 完全瘫痪, 针刺时下肢无反应; 1 分: 完全瘫痪, 针刺时下肢有反应, 但肢体不能活动; 2 分: 肢体可活动, 但不能站立或站立不稳 (<5s); 3 分: 可站立但无法行走; 4 分: 可行走数步但不稳定; 5 分: 能缓慢行走但不灵活, 存在一定缺陷; 6 分: 正常行走。

1.5.2 改良 Rivlin/Tator 斜板法: 采用斜板实验评定大鼠下肢运动功能, 分别将大鼠放置于同一光滑木板上, 身体轴线与斜板纵轴垂直, 斜板每次升高 5°, 以大鼠能够停留 5s 的最大角度为其功能值。

1.6 统计学分析

所有数据均采用均值±标准差表示, 应用 SPSS12.0 统计软件分析数据, 采用 F 检验进行方差分析。

2 结果

2.1 HE 染色结果

各时间点取材, 对照组: 伤后 3d, 灰质内大量红细胞, 中性粒细胞增多, 残存神经元细胞肿胀呈圆形, 大量核固缩、核碎裂, 灰白质交界消失, 灰质内空洞形成。伤后 6d, 红细胞融合成团, 灰白质交界清楚, 残存神经元明显减少, 仍见少量中性粒细胞。伤后 11d, 灰白质交界清楚, 残存神经元明显减少。MP 治疗组、EPO 治疗组各时间点病理变化明显轻于对照组, 残存神经元数量较对照组多。

2.2 AM 免疫组化染色结果

AM 表达主要位于神经元中。应用图文分析系统测定 A 值。3d、6d EPO 治疗组及 MP 治疗组 AM 表达高于对照组 ($P<0.01$); MP 治疗组 AM 表达 3d 高于 EPO 治疗组 ($P<0.05$), 6d、11d 差异无显著性意义 (见表 1、图 1, 见前置彩色插页 11)。

2.3 运动功能的测定

采用改良 Tarlov 评分、改良 Rivlin/Tator 斜板法。神经功能评分 EPO 治疗组、MP 治疗组高于对照组 ($P<0.05$), MP 组 3d 高于 EPO 组 ($P<0.05$), 6d、11d 两组差异无显著性意义 (见表 2)。

表 1 免疫组化 AM 阳性反应物图像分析结果 (A 值, $\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	3d	6d	11d
对照组	0.261±0.006	0.244±0.016	0.243±0.003
EPO 治疗组	0.302±0.007 ^①	0.274±0.025 ^①	0.246±0.007 ^②
MP 治疗组	0.309±0.009 ^③	0.269±0.022 ^④	0.244±0.004 ^④
F	158.99	4.73	1.07
P	<0.01	<0.05	>0.05

与对照组比: ① $P<0.01$, ② $P>0.05$; 与 EPO 治疗组比: ③ $P<0.05$, ④ $P>0.05$

表 2 改良 Tarlov 评分、改良 Rivlin/Tator 法评分结果

($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	改良 Tarlov 评分			改良 Rivlin/Tator 法评分		
	3d	6d	11d	3d	6d	11d
对照组	2.25±0.45	2.38±0.74	2.42±0.67	26.25±4.83	28.50±7.09	30.83±7.93
EPO 治疗组	2.83±0.72 ^①	3.37±0.92 ^①	3.92±0.79 ^②	34.17±7.02 ^②	41.00±9.06 ^②	43.75±5.69 ^②
MP 治疗组	3.50±0.67 ^③	3.63±0.74 ^④	3.83±0.72 ^④	42.50±5.00 ^③	42.50±9.79 ^④	46.25±4.33 ^④
F	11.99	5.39	16.08	16.33	7.76	21.62
P	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

与对照组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$; 与 EPO 治疗组比较: ③ $P<0.05$, ④ $P>0.05$

3 讨论

近年来, 脊髓损伤成为脊柱外科领域中亟待解决的问题, 早期药物治疗和减压是促使损伤脊髓恢

复的主要措施。其中手术减压固定已日趋成熟, 而药物治疗不尽如人意。Bracken 等^[2]研究发现 SCI 后 3h 内应用 MP 疗效优于 3—8h 用药者; 超过 8h 则无确

实疗效。在我国, 伤者入院多在 8h 以后, 失去应用 MP 的机会; 另外, 伤者的经济情况等限制了 MP 的应用。即使对少部分有机会应用 MP 治疗的患者, 大量应用 MP 有较大的副作用。

AM 广泛分布于人体内的各种组织, 在中枢神经系统中也有免疫活性 AM 及其 mRNA 的广泛分布。Chen 等^[3]在培养的大鼠大脑上皮细胞上, 通过过氧化氢诱导产生氧化应激, 证明 AM 能抑制大脑上皮细胞的通透性增加, 减少细胞色素 C 释放, 稳定线粒体膜电位, 通过抗氧化作用, 促进大脑上皮细胞存活。Xia 等^[4]研究表明, AM 能提高缺血性脑病中大脑 NO 水平, 抑制 NAD(P)H 氧化酶活性, 减少超氧负离子产生, 抑制细胞凋亡, 从而起到细胞保护作用。脊髓损伤与大脑损伤有相同的病理基础, 均存在缺血缺氧和氧化应激, 结合本结果, AM 高表达与神经功能恢复和形态学变化一致, 由此推测, 在脊髓损伤及其继发性损伤中, AM 也作为细胞保护因子而存在, 通过抗氧化作用和抑制细胞凋亡而起到减轻脊髓损伤程度的作用。如果能够用药物调控 AM 的表达, 则可能有利于损伤脊髓的恢复。

EPO 是细胞因子超家族的成员之一, 除有促进祖红细胞的增生分化和成熟的功能外, 还具有抗血管痉挛、抗凋亡和抗炎等多种功能^[5]。近年来研究发现, EPO 具有广泛的细胞保护作用^[6], 在急性脊髓损伤及其继发性损伤中也具有保护作用, 但其作用机制还不十分清楚。Gorio 等^[7]用 rhEPO 治疗脊髓损伤时发现, rhEPO 治疗组脊髓损伤部位及其周边的炎性细胞数量明显下降。rhEPO 能明显提高脊髓损伤大鼠后肢运动功能, 认为 rhEPO 可能通过抗炎作用而起到神经保护作用。Kaptanoglu 等^[8]研究表明, EPO 能减少大鼠 SCI 后脂质过氧化, 减小脊髓损伤程度。SUN 等^[9]报道, 应用 rhEPO 治疗低氧缺血大鼠动物模型, 细胞凋亡明显减少, 而 HSP27 含量增加, 推测 rhEPO 通过增加 HSP27 的活性起到抗凋亡作用。MP 是公认对 SCI 有保护作用的药物, 已广泛应用于临床, 但其机制仍不明确。本实验中, 应用 EPO、MP 治疗大鼠 SCI, 均可上调 AM 表达, 形态学及神经功能恢复与 AM 高表达有关, 我们认为 EPO、MP 可能通过上调 AM 表达而起到减轻脊髓损伤的作用, 这可能是 EPO、MP 治疗脊髓损伤的理论基础之一。

继发性脊髓损伤发生后, 内源性抗氧化剂的耗竭和超氧化物歧化酶的减少无法清除不断增多的自由基, 而后者可诱导细胞凋亡, 导致无法逆转的细胞死亡, AM 具有抗氧化和抑制细胞凋亡作用, MP、

EPO 上调 AM 表达提高了 SCI 的抗氧化能力, 减少了细胞凋亡, 从而促进损伤脊髓的功能恢复。同时, 损伤后 1d 开始应用 EPO, 与对照组相比, EPO 明显抑制了继发性脊髓损伤, 形态学及神经功能恢复明显优于对照组; 与 MP 治疗组相比, 6d 后疗效差异无显著性意义。这为临床应用 EPO 治疗脊髓损伤提供了理论依据。

4 结论

EPO、MP 均可影响损伤脊髓中 AM 的表达, 其表达与神经功能恢复及形态学变化一致。其中, MP 早期(3d)促使 AM 表达升高显著, 神经功能评分也高于其他组, 提示早期 MP 作用迅速; 我们于术后 1d 应用 EPO 治疗 2 周, 6d、11d 也达到同样的疗效, 我们认为 EPO 于损伤后 1d 应用, 持续 2 周是安全有效的, 但由于 EPO 无 MP 的相应副作用、用药时间相对宽松, 所以, EPO 的应用有望成为临床治疗 SCI 的新方法。

参考文献

- [1] Serrano J, Uttenthal LO, Martinez A, et al. Distribution of adrenomedullin-like immunoreactivity in the rat central nervous system by light and electron microscopy [J]. Brain Res, 2000, 853(2):245—268.
- [2] Bracken MR, Shepard MJ, Holford TR, et al. Administration of Methylprednisolone for 24 or 48 hours or Terilazed Mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial [J]. JAMA, 1997, 277(20):1597—1604.
- [3] Chen L, Kis B, Busija DW, et al. Adrenomedullin protects rat cerebral endothelial cells from oxidant damage in vitro [J]. Regul Pept, 2005, 130(1-2):27—34.
- [4] Xia CF, Yin H, Borlonqan CV, et al. Postischemic infusion of adrenomedullin protects against ischemic stroke by inhibiting apoptosis and promoting angiogenesis [J]. Exp Neurol, 2006, 197(2):521—530.
- [5] Erbayraktar S, Yilmaz O, Gokmen N, et al. Erythropoietin is a multifunctional tissue-protective cytokine [J]. Curr Hematol Rep, 2003, 2(6):465—470.
- [6] Calvillo L, Latini R, Kajstura J, et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia reperfusion injury and promotes beneficial remodeling [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(8):4802—4806.
- [7] Gorio A, Cokmen N, Erbayraktar S, et al. Recombinant human erythropoietin counteracts enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(14):9450—9455.
- [8] Kaptanoglu E, Solaroglu I, Okutan O, et al. Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal cord injury in rats: effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings [J]. Neurosurg Rev, 2004, 27(2):113—120.
- [9] Sun Y, Zhou C, Polk P, et al. Mechanisms of erythropoietin-induced brain protection in neonatal hypoxia-ischemia rat model [J]. Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24:259—270.