

·基础研究·

脊髓损伤后大鼠 Cdh1 mRNA 表达的变化*

李 平¹ 姚文龙¹ 钱 巍¹ 张传汉^{1,2}

摘要 目的: 探讨大鼠脊髓损伤(SCI)后损伤区脊髓组织 Cdh1 mRNA 的表达变化。**方法:** 32 只雄性 SD 大鼠随机分成对照组(C 组)、SCI 组(M 组), 每组 16 只。M 组采用改良 Allen 打击法建立 SCI 模型; C 组行假手术, 仅暴露脊髓。术后第 1、3、5、7 天对大鼠后肢运动功能采用 Basso-Beattie-Bresnahan(BBB)评分进行评估; 取损伤节段脊髓, 提取组织总 RNA, 采用实时荧光定量 PCR 检测损伤区脊髓组织 Cdh1 mRNA 的表达。**结果:** 术后各时点 M 组 BBB 评分均低于 C 组($P<0.05$)。术后各时点 C 组 Cdh1 mRNA 表达比较, 差异无显著性意义, M 组 Cdh1 mRNA 表达逐渐降低($P<0.05$)。与 C 组相比, M 组术后第 1 天 Cdh1 mRNA 的表达增加 ($P<0.05$), 术后第 5、7 天 Cdh1 mRNA 的表达减少。**结论:** 大鼠 SCI 后损伤区脊髓组织 Cdh1 mRNA 表达降低, 提示 APC-Cdh1 可能参与 SCI 后的病理生理过程。

关键词 脊髓损伤; 细胞周期后期分裂促进复合物; 基因表达

中图分类号: R651.2, R493 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2009)-01-0012-03

Changes of expression of Cdh1 mRNA in injured myeloid tissue after spinal cord injury in rats/LI Ping, YAO Wenlong, QIAN Wei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(1):12-14

Abstract Objective: To investigate the changes of expression of Cdh1 mRNA in injured myeloid tissue after spinal cord injury (SCI) in rats. **Method:** Thirty-two adult SD rats were randomly divided into two groups: sham group (group C) and SCI group (group M). SCI model was established with modified Allen's crush method in rats. The hind limb movement was assessed with Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) scales and mRNA of injured myeloid tissue was extracted for Cdh1 examination with real time PCR at the 1st, 3rd, 5th, 7th d after SCI. **Result:** The BBB scores in group M were significantly lower than that in group C at the 1st, 3rd, 5th, 7th d respectively after SCI ($P<0.05$). The expression of Cdh1 mRNA in group M at the 1st, 3rd, 5th, 7th d decreased gradually ($P<0.05$), while that in group C at different time points was not statistically significant. The expression of Cdh1 mRNA in group M increased significantly at the 1st d ($P<0.05$) and decreased at the 5th, 7th d compared with group C. **Conclusion:** The expression of Cdh1 mRNA in injured myeloid tissue decreased after SCI, which indicated that APC-Cdh1 might be involved in the path of pathophysiological mechanism after SCI.

Authors' address Dept. of Anesthesiology, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Sciences and Technology, Wuhan, 430030, China

Key words spinal cord injury; cell cycle anaphase promoting complex; gene expression

Cdh1 是细胞周期后期分裂促进复合物(anaphase promoting complex, APC)的一个调节亚基, 具有调控细胞周期进程及细胞周期转换的功能^[1]。近年来研究发现, APC-Cdh1 在哺乳动物脑的发育过程中具有调控神经元轴突生长的作用^[2], 但是其在神经损伤及神经再生中的作用目前尚不清楚。本研究拟通过观察大鼠脊髓损伤模型损伤区脊髓组织 Cdh1 mRNA 表达的变化, 为通过调控脊髓损伤区 Cdh1 的表达来改善轴突再生提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验分组

成年雄性 SD 大鼠 32 只, 体重 180—200g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供; 随机分为对照组(C 组)、脊髓损伤组(M 组), 每组 16 只, 每

4 只放一笼内适应性饲养。

1.2 脊髓损伤模型的制作

M 组采用改良 Allen 重物坠落法建立大鼠脊髓损伤模型^[3]。10%水合氯醛(300mg/kg)腹腔注射麻醉动物后, 采用大鼠脑立定位仪(华中科技大学机械学院研制)俯卧位固定。以 T11 棘突为中心, 消毒后在背部正中作长约 2cm 的切口, 切开皮肤和肌肉, 暴露 T10-T12 棘突和椎板, 咬去 T11 及部分 T11-T12 棘突和椎板。以 T11 脊髓为中心显露直径为 5mm 的

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30571788)

1 华中科技大学同济医学院附属同济医院麻醉学教研室, 湖北武汉, 430030

2 通讯作者

作者简介: 李平, 男, 硕士研究生

收稿日期: 2008-05-14

圆形打击区,用肾上腺素庆大霉素盐水清洗创面。采用改良 Allen 重物坠落装置撞击脊髓背侧,即在玻璃管内将质量为 10g 的冲击棒从距脊髓 5cm 高度垂直下落撞击在软质塑料片上,将势能传递给 T11 脊髓。

撞击成功标志:鼠尾痉挛性摆动,双下肢及躯体回缩样扑动,双下肢呈弛缓性瘫痪。依次缝合硬脊膜、竖脊肌、皮下组织与皮肤。术后 3d 内每只大鼠肌肉注射青霉素 2 次(20 万 U/次),如有血尿则注射至血尿消失。每天人工挤压膀胱排尿两至三次直至恢复自主排尿。C 组行假手术,仅暴露脊髓。

1.3 后肢运动功能评估

本实验采用自制长为 120cm,宽为 30cm 底部光滑的泡沫盒。手术前 2 天将大鼠放入泡沫盒中,使其熟悉环境,每天 2 次。分别于术后第 1、3、5、7 天,各组大鼠分别取 4 只放在泡沫盒中,采用 BBB 评分标准^[4](全瘫为 0 分,正常为 21 分),双盲法评估大鼠双后肢的运动功能。

1.4 标本固定取材

术后第 1、3、5、7 天,每组取 1 只大鼠,4%多聚甲醛溶液心内灌注、固定、取材、石蜡包埋、连续纵切片(片厚约 4 μ m),HE 染色,并行组织学观察。

1.5 组织总 RNA 的提取及实时定量 RT-PCR 反应

术后各时间点各组大鼠分别取 3 只,10%水合氯醛腹腔注射麻醉后,按原手术切口切开,取出以打击点为中心长约 15mm 的脊髓节段,匀浆后用 Trizol 试剂(上海华舜公司)提取组织总 RNA。用 8453E 型紫外分光光度计(Agilent 公司,美国)测定 RNA 浓度,按实时定量 RT-PCR 试剂盒(Takara 公司,日本)说明书操作,取 500ng 总 RNA 进行逆转录,反应体系总体积为 10 μ l。以逆转录所得 cDNA 为模板,采用 Light Cycler 实时荧光定量 PCR 仪(Roche 公司,美国)进行实时定量 PCR 反应,检测 Cdh1 mRNA 的表达,以 β -actin 为内参照。Cdh1 上游引物为 5'-AGCTACCCAGGACACCCAA-3',下游引物为 5'-GCAACGCAATCAGAGTCAACG-3',产物长度 104bp; β -actin 上游引物为 5'-TGACAGGATGCA-GAAGGAGA-3',下游引物为 5'-TAGAGCCAC-CAATCCACACA-3',产物长度 104bp。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 5s,60 $^{\circ}$ C 退火及延伸 20s,共反应 40 个循环,分析融解曲线。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 Cdh1 的表达^[5], $\Delta Ct=Ct(Cdh1)-Ct(\beta-actin)$ 。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用 *t* 检验,组内比较采用方差

分析, $P<0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 后肢运动功能评分

M 组脊髓损伤后表现为双后肢软瘫,肌张力降低,损伤平面以下各种反射不同程度的减弱或消失,排尿需人工挤压;C 组大鼠可自由爬行及觅食。术后各时点 M 组 BBB 评分均明显低于 C 组($P<0.05$),两组组内各时点比较差异无显著性意义。见表 1。

表 1 两组不同时间点 BBB 后肢运动功能评分 ($\bar{x}\pm s$)

组别	术后第 1 天	术后第 3 天	术后第 5 天	术后第 7 天
对照组(C 组)	19.8 $\pm$ 1.0	20.0 $\pm$ 0.8	20.5 $\pm$ 0.6	20.8 $\pm$ 0.5
脊髓损伤组(M 组)	0 ^①	0.5 $\pm$ 0.6 ^①	1.2 $\pm$ 0.5 ^①	2.5 $\pm$ 0.6 ^①

①与对照组相比 $P<0.05$

2.2 大鼠 SCI 后组织病理学改变

C 组脊髓组织切片 HE 染色发现脊髓灰质、白质结构清晰,形态完整。M 组脊髓组织切片发现损伤区主要位于脊髓灰质,在术后第 1 天可见损伤区中央灰质出现大片出血、细胞肿胀,并有大量单核或多核炎性细胞浸润;术后第 3—5 天损伤区组织出现大片坏死灶,炎性反应加剧;术后第 7 天脊髓损伤及周围区炎性细胞浸润减轻,有些损伤脊髓组织出现囊腔样变化。见图 1(见前置彩色插页)。

2.3 实时荧光定量 PCR

术后各时点 C 组 Cdh1 mRNA 表达比较差异无显著性意义,M 组 Cdh1 mRNA 表达逐渐降低($P<0.05$)。与 C 组相比,M 组术后第 1 天 Cdh1 mRNA 表达增加($P<0.05$),术后第 5、7 天 Cdh1 mRNA 表达减少($P<0.05$)。见表 2。

表 2 两组大鼠术后不同时间点 Cdh1 表达的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
对照组(C 组)	1.00 $\pm$ 0.05	0.95 $\pm$ 0.05	0.97 $\pm$ 0.04	0.96 $\pm$ 0.05
脊髓损伤组(M 组)	1.64 $\pm$ 0.08 ^①	0.67 $\pm$ 0.03 ^①	0.34 $\pm$ 0.02 ^①	0.30 $\pm$ 0.01 ^①

①与对照组相比 $P<0.05$

3 讨论

细胞周期 APC 及调节亚基 Cdh1 是细胞内主要的泛素蛋白酶小体系统,在有丝分裂晚期及 G1 期 Cdh1 受细胞周期蛋白依赖性激酶(Cdk)的调节发生去磷酸化,激活 APC,泛素化降解细胞周期蛋白,使细胞处于 G1 期,防止未成熟的细胞过早进入 S 期和 M 期^[6]。Cdh1-APC 在哺乳动物大脑皮质、海马、小脑等部位的终分化神经元内有大量表达^[6],从而开始了 Cdh1-APC 在中枢神经系统中的作用探讨。

本实验采用改良的 Allen 打击模型^[3],打击过程能够在很大程度上模拟人类脊髓挫伤时的受力过程,同时保证了硬脊膜的完整,从而避免暴露脊髓、脑

脊液外漏和外源性成分的侵入,并且可以通过选择重物 and 下落高度人为控制致伤程度,减少损伤误差,提高大鼠脊髓损伤模型的标准化和可重复性。SCI 后能通过动物的各种运动行为来综合反映脊髓损伤的程度,采用 BBB 评分法从后肢的运动、躯干的位置、腹部的位置、爪的位置、爬行步态、步态的协调、趾与地面的间隙、先行爪的位置、躯干的稳定性、尾巴的位置等十个方面来相对客观地评定大鼠脊髓的运动功能。实验中发现 M 组大鼠打击后身体痉挛性颤动,尾巴痉挛性摆动,双下肢及躯体回缩样扑动,麻醉苏醒后大鼠双后肢软瘫,肌张力降低,损伤平面以下各种反射不同程度地减弱或消失,出现尿潴留或尿失禁;而 C 组大鼠麻醉苏醒后可自由爬行及觅食。本研究通过 BBB 评分评估后肢运动功能发现术后各时点 M 组 BBB 评分均低于 C 组,表明本实验模型成功建立。

实时荧光定量 PCR 比传统 PCR 特异性更强,灵敏度高,可直接对产物进行定量。本研究结果显示术后 M 组 Cdh1 mRNA 表达逐渐降低,与 C 组相比,术后第 1 天 Cdh1 mRNA 的表达增加,术后第 5、7 天 Cdh1 mRNA 的表达减少。Cdh1 mRNA 的表达随伤后时间呈现一定规律性的变化,提示 APC-Cdh1 可能参与脊髓损伤后的病理生理过程。

脊髓损伤包括原发性脊髓损伤和继发性脊髓损伤,而细胞凋亡是继发性脊髓损伤的重要组成部分。脊髓损伤后出现的脊髓神经细胞死亡不是缘于直接损伤而是细胞凋亡所致^[7-8]。王金光等^[9]观察在脊髓损伤的早期主要以坏死为主,在损伤后 6h 开始出现大量的神经元、胶质细胞凋亡,FOS 凋亡因子大量表达。而脊髓损伤后修复的主要机制是周围区域残留的神经元轴突残端出芽和(或)侧支出芽,并延伸至相应的靶细胞,形成突触联系,重建相应的神经环路,从而恢复或部分恢复对靶细胞的神经支配。因此,在脊髓损伤后早期,保护损伤周围区域残留的神经元,提高神经元的存活质量,抑制细胞凋亡,是促进神经元轴突的再生和恢复脊髓功能的关键;但残存神经元的存活受内、外环境多种因素的影响^[10-11]。研究表明 Cdh1 在神经系统发育过程中具有调控神经元存活及抑制轴突生长的作用,通过抑制 Cdh1 的表达使神经元异常地进入 S 期导致其发生程序性凋亡^[12-15]。因此,我们推测脊髓损伤后 Cdh1 mRNA 的表达降低,可能是影响残存神经元的存活,导致神经元变性、坏死和凋亡的重要因素,

因而 Cdh1 有望成为脊髓损伤后调控神经元存活的新靶点。对于脊髓损伤后 Cdh1 表达的调控机制以及调控 Cdh1 保护和修复脊髓,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Peters JM. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond[J]. Molecular Cell, 2002, 9: 931—943.
- [2] Konishi Y, Stegmüller J, Matsuda T, et al. Cdh1-APC controls axonal growth and patterning in the mammalian brain [J]. Science, 2004, 303(5660):1026—1030.
- [3] Scheff SW, Rabchevsky AG, Fugaccia I, et al. Experimental modeling of spinal cord injury [J]. Neurotrauma, 2003, 20(2): 179—193.
- [4] Metz GA, Curt A, van de Meent H, et al. Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury. [J] Neurotrauma, 2000, 17(1):1—17.
- [5] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method [J]. Methods, 2001,25(4):402—404.
- [6] Gieffers C, Peters BH, Kramer ER, et al. Expression of the CDH1-associated form of the anaphase-promoting complex in postmitotic neurons [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(20): 11317—11322.
- [7] 陈昱,练克俭.脊髓损伤后细胞凋亡的诱导因素研究进展[J].中国骨伤, 2007, 20(suppl):73—74.
- [8] Li GL, Farooque M, Olsson Y, et al. Changes of Fas ligand immunoreactivity after compression trauma to rat spinal cord [J]. Acta Neuropathol, 2000,100:75—81.
- [9] 王金光,郑启新,赵铭,等.大鼠脊髓损伤后细胞凋亡及 Caspase-3、Fas 的表达和意义 [J]. 中国康复医学杂志, 2006,21(4):296—300.
- [10] 董锋,林建华,吴朝阳.骨髓间质干细胞经静脉注射移植对大鼠脊髓损伤后 BDNF、NGF mRNA 表达的影响[J].中国康复医学杂志,2008,23(5):416—419.
- [11] 赵晔,丁文元,张为,等.促红细胞生成素对大鼠急性脊髓损伤后后肢功能及 NF-κB 表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2007,22(10):904—907.
- [12] Stegmüller J, Bonni A. Moving past proliferation: new roles for Cdh1-APC in postmitotic neurons. Trends Neurosci [J]. 2005,28(11):596—601.
- [13] Almeida A, Bolanos JP, Moreno S. Cdh1/Hct1-APC is essential for the survival of postmitotic neurons [J]. Neuro Sci, 2005, 25(36):8115—8121.
- [14] Becker EB, Bonni A. Beyond proliferation: cell cycle control of neuronal survival and differentiation in the developing mammalian brain[J]. Semin Cell Dev Biol, 2005, 16(3): 439—448.
- [15] Stegmüller J, Konishi Y, Huynh MA, et al. Cell-intrinsic regulation of axonal morphogenesis by the Cdh1-APC target SnoN [J]. Neuron, 2006, 50(3):389—400.