

丙戊酸对大鼠急性脊髓损伤的保护作用*

李新枝¹ 聂 政¹

摘要

目的:探讨丙戊酸对脊髓损伤后神经细胞凋亡和热休克蛋白70(HSP70)表达的影响。

方法:44只雄性SD大鼠随机分为3组:假手术组(C组)、损伤组(SCI组)和丙戊酸保护组(VPA组)。采用改良的Allen法制作脊髓损伤动物模型。于损伤后第6、24、48、72小时取材。利用BBB评分标准进行不同时段的行为学评分,通过TUNEL法、免疫组化法等观察各组大鼠脊髓损伤后神经细胞凋亡和HSP70表达的变化。

结果:VPA组的BBB评分与SCI组相比,在损伤后第48小时和第72小时显著增高($P<0.01$)。SCI组和VPA组均出现大量神经细胞凋亡和HSP70阳性表达,VPA组各时间点凋亡指数均明显低于SCI组($P<0.05$),而HSP70表达VPA组均明显高于SCI组($P<0.05$)。

结论:丙戊酸通过减少神经细胞凋亡和诱导HSP70表达,对脊髓损伤起到保护作用。

关键词 脊髓损伤;丙戊酸;凋亡;热休克蛋白70

中图分类号:R651.2 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2011)-04-0347-04

The protective effects of valproic acid on acute spinal cord injury in rats/LI Xinzhi, NIE Zheng//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(4): 347—350

Abstract

Objective: To investigate the effects of valproic acid(VPA) on apoptosis of neural cells and expression of heat shock protein 70(HSP70) after acute spinal cord injury(SCI) in rats.

Method: Forty-four adult rats were randomly divided into three groups: sham operation group, SCI group and VPA treated group. SCI model was made by modified Allen technique. The rats were sacrificed at the 6thh, 24thh, 48thh, 72thh after injury. The recovery of locomotor function after injury was evaluated with Basso, Beattie and Bresnahan(BBB) scale. Apoptotic cells were examined by TUNEL method and the expression of HSP70 was detected with immunohistochemistry.

Result: The BBB scores were significantly higher in VPA treated group than that in SCI group at the 48thh, 72thh. Both TUNEL-positive cells and the expression of HSP70 could be seen in SCI group and VPA treated group. Compared with SCI group, in VPA treated group the TUNEL-positive cells decreased significantly, while the expression of HSP70 elevated significantly at the 6thh, 24thh, 48thh, 72thh after SCI($P<0.05$).

Conclusion: VPA could exert neuroprotection effect through attenuating apoptosis of neural cells and inducing high expression of HSP70.

Author's address Department of Anatomy and Histo-Embryology, Chengdu Medical College, Chengdu, 610083

Key word spinal cord injury; valproic acid; apoptosis; heat shock protein 70

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后由于神经
元无法再生以及继发性的炎症反应、细胞凋亡等,不

仅导致患者运动麻痹,同时造成感觉缺失和膀胱等
内脏器官功能障碍,严重影响患者生存质量,改善和

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.04.011

*基金项目:成都医学院校基金(07Z037)

¹ 成都医学院解剖与组胚教研室,成都,610083

作者简介:李新枝,女,硕士,讲师; 收稿日期:2010-04-08

促进患者运动功能的恢复是SCI康复治疗的首要目标^[1-2],但至今尚无有效的治愈方法。近年来大量研究表明丙戊酸(valproic acid, VPA)具有多方面的神经营养效应和神经保护作用^[3-4],但其保护作用的机制尚不明确。本研究通过观察VPA对SCI后大鼠运动功能恢复的调节,以及对神经细胞凋亡和HSP70表达的影响,进而探讨VPA对SCI的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组和模型制作

健康成年雄性SD大鼠44只,体重250—300g,随机分为损伤组(SCI组)、丙戊酸保护组(VPA组)和对照组(C组),每组又分为伤后第6、24、48、72小时4个时间点,SCI组和VPA组每个时间点5只大鼠,C组每个时间点1只大鼠。动物在1%戊巴比妥(40mg/kg)腹腔内注射麻醉后,采用改良的Allen法:以T11为标志,暴露大鼠T9—11椎板,咬除T10的棘突及椎板,以12.5mm×10g的能量撞击,金属杆下落后大鼠迅速出现摇尾反射,双后肢及躯体回缩扑动,表明撞击成功。C组只做T10椎板切除术;VPA组术后即刻及其后每12h皮下注射VPA(杭州)300mg/kg^[5];SCI组在相应时间点注射等体积的生理盐水。

1.2 取材及样品制备

动物在相应时间点1%戊巴比妥(50mg/kg)腹腔内注射麻醉后行灌流固定:打开胸腔暴露心脏及主动脉根部,左心室插管至主动脉根部,剪开右心耳,灌注生理盐水约200ml,至流出液体澄清,换用4%多聚甲醛灌注约300ml,40min,灌流固定成功后,依次剪开动物背部皮肤、肌肉,暴露损伤段脊髓,以损伤段为中心,切取约1.5cm的脊髓段,4%多聚甲醛固定24h,常规石蜡包埋,连续切片,片厚5μm备用。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 运动功能评分:术后第24、48、72小时3个时间点行BBB评分。为保证评分的准确性,由3位非实验人员了解评分标准后,各自评分,取平均值。

1.3.2 HE染色:每只动物随机抽取一张切片进行HE染色,光镜下观察各组动物的脊髓损伤情况。

1.3.3 TUNEL法检测细胞凋亡:TUNEL细胞凋亡检测试剂盒购于武汉博士德,按照说明书进行。石蜡

切片常规脱蜡至水,0.01M蛋白酶K消化10min,TdT反应液37℃孵育2h,生物素化抗地高辛抗体37℃反应30min,SABC法染色,DAB显色,苏木素复染,封片。胞核中出现棕黄色颗粒为阳性,光镜下(10×40)每组每个时间点分别随机拍摄10个视野,计算凋亡指数(AI)=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

1.3.4 HSP70免疫组化检测及图像分析:切片常规脱蜡水化后,用SABC法进行免疫组织化学染色,一抗(博士德)为兔抗大鼠HSP70,抗体工作浓度为1:100,4℃孵育过夜,DAB显色,苏木精复染、脱水、透明、封片。阴性对照用PBS替代第一抗体,以胞浆或胞膜出现棕黄色颗粒作为阳性判断标准。光镜下(10×40)每组每个时间点分别随机拍摄10个视野,用Image-Pro Plus(IPP)图像分析软件测量HSP70免疫反应产物的平均光密度AOD值。

1.4 统计学分析

所得数据均以平均值±标准差表示,采用SPSS12.0统计软件进行单因素方差分析,组间两两比较用 q 检验, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 BBB评分结果

假手术组运动功能未受影响,评分均在21分左右,SCI组和VPA组评分均显著下降,但VPA组运动功能恢复明显好于SCI组,两组在脊髓损伤后第48小时和第72小时差异有显著性($P<0.01$),见表1。

表1 SCI组和VPA组BBB评分结果 ($\bar{x}\pm s$,分)

组别	鼠数	治疗时间		
		第24小时	第48小时	第72小时
SCI	5	0.33±0.27	2.42±0.32 ^①	4.50±0.43 ^①
VPA	5	0.42±0.17	4.08±0.31	7.67±0.54

①相同时间点SCI组与VPA组相比, $P<0.01$

2.2 脊髓组织的病理变化

HE染色光镜观察见SCI组和VPA组在SCI后第6小时即出现神经元肿胀坏死、胞浆尼氏体溶解,胶质细胞亦肿胀坏死,损伤中央区可见明显出血灶;第24—48小时,仍可见坏死的神经元和胶质细胞,出血灶的界限更清楚,白质神经束肿胀,在损伤区及其周围均可见炎症细胞浸润;SCI后第72小时,上述病理变化仍明显。VPA组和SCI组相比,损伤没有明显减轻。C组脊髓组织形态正常。

2.3 TUNEL检测细胞凋亡结果

C组各时间点偶见或未见凋亡阳性细胞,SCI组和VPA组在SCI后第6小时即可见细胞凋亡,包括神经元和胶质细胞,第24小时达高峰,以后逐渐减少,第72小时仍可见凋亡细胞。虽然SCI和VPA两组均出现大量凋亡阳性细胞,但VPA组的凋亡指数在各时间点均明显低于SCI组($P<0.05$,图1—2,表2)。

表2 三组大鼠凋亡指数的比较 ($\bar{x}\pm s, n=5, \%$)				
组别	第6小时	第4小时	第48小时	第72小时
SCI	25.59±6.48 ^{①②}	52.35±5.06 ^{①②}	39.92±4.85 ^{①②}	32.63±7.64 ^{①②}
VPA	8.59±1.63 ^①	21.32±2.54 ^①	13.02±3.33 ^①	10.39±2.38 ^①
C	1.61±0.33	1.24±0.28	1.53±0.42	1.33±0.21

①与C相比, $P<0.05$;②相同时间点SCI组与VPA组相比, $P<0.05$

图1 SCI组SCI后24h细胞凋亡情况 (TUNEL染色,×400)

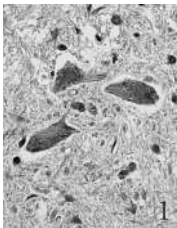
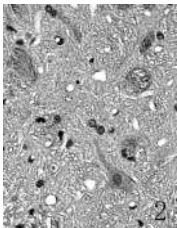


图2 VPA组SCI后24h细胞凋亡情况 (TUNEL染色,×400)



3 讨论

VPA是一种情绪稳定剂和抗癫痫剂,常用于双相性情绪障碍的治疗。近年来VPA的神经保护作用日益受到关注,研究发现VPA具有抑制组蛋白脱乙酰基酶活性、抗凋亡和促进神经营养因子表达等效应,对帕金森病、阿尔茨海默病等神经退行性疾病具有保护作用^[6-7]。迄今为止,尚无VPA对SCI影响的相关报道。本研究结果显示SCI组和VPA组的BBB评分在SCI后第48小时和第72小时差异有显著性,表明VPA能促进SCI后大鼠运动功能的恢复。

脊髓损伤包括原发性损伤和继发性损伤,SCI后由于缺氧、缺血-再灌注、谷氨酸兴奋性中毒、氧化应激、自由基形成和炎症反应等,造成神经细胞进一步坏死和凋亡^[8-10],通过药物来打破这种级联反应,减轻继发性损伤的程度和范围,是临床促进患者神经功能恢复的有效途径。细胞凋亡是脊髓继发性损伤的重要组成部分,也是SCI药物治疗的重要靶点。本研究结果显示SCI后第6小时至第72小时均

2.4 HSP70免疫组化结果

C组各时间点偶见HSP70阳性表达,SCI组和VPA组在SCI后第6小时即可见HSP70阳性表达,阳性产物广泛表达于神经元和胶质细胞的胞浆内和胞膜上,第24小时达高峰,以后逐渐减少,第72小时仍可见。与SCI组相比,VPA组的HSP70阳性表达在各时间点均明显增加($P<0.05$,图3—4,表3)。

表3 三组大鼠HSP70平均光密度的比较 ($\bar{x}\pm s, n=5$)				
组别	第6小时	第4小时	第48小时	第72小时
SCI	72.77±4.83 ^{①②}	131.70±6.87 ^{①②}	97.05±4.92 ^{①②}	70.24±3.83 ^{①②}
VPA	90.14±4.36 ^①	160.24±6.23 ^①	119.80±9.55 ^①	78.60±5.43 ^①
C	5.77±1.21	6.93±1.17	5.32±1.38	5.96±1.84

①与C相比, $P<0.05$;②相同时间点SCI组与VPA组相比, $P<0.05$

图3 SCI组SCI后24h HSP70表达情况 (DAB染色,×400)

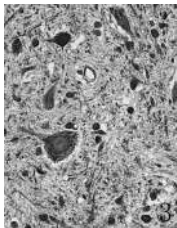
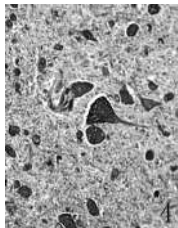


图4 VPA组SCI后24h HSP70表达情况 (DAB染色,×400)



可见细胞凋亡,包括神经元和神经胶质细胞,24h达高峰,以后逐渐减少,72h仍可见凋亡细胞,VPA保护组的凋亡指数在各时间点均明显少于损伤组,由此可见VPA在SCI后具有抗神经细胞凋亡的作用,Ren等^[11]的研究也证明在多种体内和体外缺血、中毒等神经细胞损伤模型中,VPA具有抗凋亡作用。还有研究发现VPA在体外可诱导活化的小胶质细胞凋亡^[4,12],而小胶质细胞在脊髓损伤后的炎症反应中扮演了重要角色,研究发现抑制小胶质细胞增殖活化将减少SCI后神经元和少突胶质细胞凋亡,从而改善神经功能。本研究证明VPA可抑制神经元和胶质细胞凋亡,但对胶质细胞未作进一步分类,VPA抗神经元凋亡的作用是否与其诱导小胶质细胞凋亡有关,将在后续研究中进一步探讨。VPA延缓受损神经细胞凋亡的准确机制目前还不清楚,Biermann等^[9]的研究显示VPA通过抑制caspase-3的活性,促进CREB的活化和pERK1/2的激活,从而减少受损的视网膜神经节细胞凋亡;还有研究发现VPA的视

网膜神经节细胞凋亡;还有研究发现VPA上调bcl-2和bcl-xl基因表达,同时下调bax、Fas-L和IL-6等基因表达而发挥抗凋亡作用^[13]。本研究VPA减少神经细胞凋亡可能与诱导HSP70表达增加相关。

HSP70是热休克蛋白家族中最保守和最主要的成员,已有研究证明热休克蛋白家族包括HSP70在兴奋性中毒、氧化应激和创伤等SCI模型中均有表达,并且对SCI具有保护作用^[14]。HSP70在正常脊髓组织中表达很少,SCI后表达增加,但持续时间短,表达量较少,因此通过药物诱导HSP70大量表达将进一步增强其保护作用。本研究与上述研究相符,SCI组HSP70阳性表达与对照组相比明显增加,而VPA组各时间点的HSP70阳性表达又明显高于SCI组,说明VPA可诱导HSP70过量表达,增强HSP70的保护作用。HSP70神经保护作用的机制可能与下列因素相关:①抗凋亡作用:HSP70抑制caspase-3等凋亡相关蛋白表达,诱导bcl-2等抗凋亡基因表达;②抗炎作用:HSP70抑制NF- κ B激活,抑制炎症相关基因表达和小胶质细胞激活^[15];③HSP70作为分子伴侣可与折叠的蛋白结合,从而阻止异常的蛋白聚集等^[16]。其中HSP70的抗凋亡作用及其机制是诸多相关疾病的研究热点。

综上所述,VPA对SCI的保护作用可能与其抗凋亡和诱导HSP70表达相关,而进一步研究VPA的抗凋亡机制以及VPA促进SCI康复的其他可能原因,将有助于为SCI及其他神经退行性疾病的康复治疗提供新的实验依据。

参考文献

- [1] 王瑾,王红星,王彤,等.运动对脊髓损伤功能改善作用机制的研究进展[J].中国康复医学杂志,2008,23(8):753—755.
- [2] 李平,姚文龙,钱巍,等.脊髓损伤后大鼠Cdh1 mRNA表达的变化[J].中国康复医学杂志,2009,24(1):12—14.
- [3] Biermann J, Grieshaber P, Goebel U, et al. Valproic acid-mediated neuroprotection and regeneration in injured retinal ganglion cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(1):526—534.
- [4] Peng GS, Li G, Tzeng NS, et al. Valproate pretreatment protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in rat primary midbrain cultures: role of microglia[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2005, 134(1): 162—169.
- [5] Cui SS, Yang CP, Bowen RC, et al. Valproic acid enhances axonal regeneration and recovery of motor function after sciatic nerve axotomy in adult rats[J]. Brain Res, 2003, 975(1—2): 229—236.
- [6] Eleuteri S, Monti B, Brignani S, et al. Chronic dietary administration of valproic acid protects neurons of the rat nucleus basalis magnocellularis from ibotenic acid neurotoxicity[J]. Neurotox Res, 2009,15(2):127—132.
- [7] Monti B, Gatta V, Piretti F, et al. Valproic acid is neuroprotective in the rotenone rat model of Parkinson's disease: involvement of alpha-synuclein[J]. Neurotox Res, 2010, 17(2): 130—141.
- [8] 席绍松,刘维钢,黄瑾.神经营养因子与脊髓损伤的基因治疗[J].中国康复医学杂志,2009,24(4):381—383.
- [9] Baptiste DC, Fehlings MG. Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord[J]. J Neurotrauma, 2006, 23(3—4): 318—334.
- [10] Yeo JE, Kim JH, Kang SK. Selenium attenuates ROS-mediated apoptotic cell death of injured spinal cord through prevention of mitochondria dysfunction; in vitro and in vivo study[J]. Cell Physiol Biochem, 2008, 21(1—3):225—238.
- [11] Ren M, Leng Y, Jeong M, et al. Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction[J]. J Neurochem, 2004, 89: 1358—1367.
- [12] Chen PS, Wang CC, Bortner CD. Valproic acid and other histone deacetylase inhibitors induce microglial apoptosis and attenuate lipopolysaccharide-induced dopaminergic neurotoxicity[J]. Neuroscience, 2007, 149(1):203—212.
- [13] Sinn DI, Kim SJ, Chu K, et al. Valproic acid-mediated neuroprotection in intracerebral hemorrhage via histone deacetylase inhibition and transcriptional activation[J]. Neurobiol Dis, 2007, 26(2):464—472.
- [14] Zhang P, Abraham VS, Kraft KR, et al. Hyperthermic preconditioning protects against spinal cord ischemic injury[J]. Ann Thorac Surg, 2000,70:1490—1495.
- [15] Heneka MT, Gavrilyuk V, Landreth GE, et al. Noradrenergic depletion increases inflammatory responses in brain: effects on IkappaB and HSP70 expression[J]. J Neurochem, 2003, 85:387—398.
- [16] Hendrick JP, Hartl FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins[J]. Annu Rev Biochem, 1993, 62:349—384.