

2-甲氧基雌二醇对脊髓损伤大鼠运动功能及神经细胞凋亡的影响*

张鸿日¹ 郭孝龙² 彭静华³ 张茂营⁴ 徐如祥^{4,5}

摘要

目的:探讨2-甲氧基雌二醇(2ME2)对脊髓损伤(SCI)大鼠运动功能及细胞凋亡的影响。

方法:将成年雄性SD大鼠72只随机分为假手术组(n=24)、脊髓损伤组(n=24)、2ME2治疗组(n=24)。采用改良的Allen法制作脊髓损伤模型,造模成功后1、3、7、14、21、28d应用BBB运动评分系统对各组大鼠运动功能进行评估,造模成功后连续7天对2ME2治疗组大鼠腹腔注射2ME2(24mg/kg),第7天应用免疫荧光技术检测各组大鼠caspase-3表达,应用TUNEL染色进行凋亡细胞计数。

结果:脊髓损伤组及2ME2治疗组损伤后随时间延长BBB评分升高,其中2ME2治疗组损伤后第14、21、28天BBB评分显著高于脊髓损伤组,差异具有显著性意义($P<0.05$)。与假手术组(4.583 ± 2.234)比较,脊髓损伤组(33.417 ± 4.274)及2ME2治疗组(22.250 ± 4.048)免疫荧光染色caspase-3蛋白表达阳性细胞数显著增加,2ME2治疗组caspase-3蛋白表达阳性细胞数较脊髓损伤组显著减少,差异具有显著性意义($P<0.05$)。与假手术组(12.25 ± 2.67)相比,脊髓损伤组(49.17 ± 4.75)及2ME2治疗组(38.67 ± 4.44)凋亡细胞数显著增多,2ME2治疗组凋亡细胞数较脊髓损伤组显著减低,差异具有显著性意义($P<0.05$)。

结论:2ME2改善脊髓损伤大鼠模型脊髓损伤后的运动功能,具有神经保护作用;2ME2降低脊髓损伤大鼠模型脊髓损伤后caspase-3蛋白表达,抑制神经细胞凋亡。

关键词 2-甲氧基雌二醇;脊髓损伤;凋亡;运动功能

中图分类号:R651.1, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2015)-08-0761-04

The effect of 2-methoxyestradiol on the motor function and nerve cells apoptosis in rats with spinal cord injury/ZHANG Hongri, GUO Xiaolong, PENG Jinghua, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(8): 761—764

Abstract

Objective: To investigate the effects of 2-methoxyestradiol(2ME2) on the movement function and nerve cells apoptosis in rats with spinal cord injury(SCI).

Method: A total of 72 adult male SD rats were randomly divided into 3 groups: sham group(n=24), SCI group(SCI, n=24) and SCI+2ME2 treated group (SCI+2ME2, n=24). The rats of SCI group and SCI+2ME2 group were sacrificed after perfusion. Models of SCI were created by modified Allen's method. At 1, 3, 7, 14, 21, 28 days after modeling, rats' movement function were evaluated with Basso, Beattie, Bresnahan(BBB) score. After modeling, 2ME2(24 mg/kg) were injected peritoneally for 7 days consecutively and at the 7th day were observed for expression of caspase-3 with immunofluorescence staining. The nerve cells apoptosis was counted with TUNEL staining.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.08.002

*基金项目:国家自然科学基金项目(81371345)

1 南方医科大学附属珠江医院神经外科, 510282; 2 河南科技大学第一附属医院新区医院神经外科, 471003; 3 河南科技大学第一附属医院神经内科; 4 北京军区总医院附属八一脑科医院; 5 通讯作者

作者简介:张鸿日,男,主治医师;收稿日期:2014-07-02

Result: After SCI and 2ME2 treatment in SCI group and SCI+2ME2 group the BBB scores were elevated gradually compared with sham group ($P<0.05$). BBB score in SCI+2ME2 group were higher obviously compared with SCI group ($P<0.05$) on the 14th, 21th, 28th days ($P<0.05$). After 2ME2 treatment the expression of caspase-3 and the amount of nerve cells apoptosis reduced ($P<0.05$).

Conclusion: 2ME2 can offer protection for movement function in rats with SCI and maybe inhibit the expression of caspase-3, and finally reduce apoptosis of nerve cells.

Author's address Dept. of Neurosurgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, 510282

Key word 2-methoxyestradiol; spinal cord injury; apoptosis; motor function

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是临床常见疾病,容易产生严重的后遗症,合理治疗可以获得良好的效果^[1]。目前早期治疗脊髓损伤最常用方法之一是激素冲击疗法,可以减轻细胞水肿等,但可能出现消化道出血、心律失常等并发症。2-甲氧基雌二醇(2-methoxyestradiol, 2ME2)是雌激素的正常代谢产物,存在于人体的血液与尿液中^[2],有报道在全脑缺血大鼠模型、局灶性脑缺血模型、蛛网膜下腔出血大鼠模型及颅脑损伤大鼠模型中,2-甲氧基雌二醇均可以通过抑制神经凋亡起到神经保护作用^[3-5],但对脊髓损伤后的作用目前国内很少报道。本实验旨在探讨2ME2对脊髓损伤大鼠运动功能、凋亡及凋亡相关基因的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康成年雄性 SPF 级 SD 大鼠 72 只动物,由北京维通利华公司提供,体重 $305\pm 20\text{g}$,随机分为假手术组 ($n=24$)、脊髓损伤组($n=24$)和 2ME2 治疗组($n=24$)3 组。

1.2 动物模型制作及组织获取

采用改良的 Allen 法制作脊髓损伤大鼠模型^[6]。用 3% 水合氯醛腹腔麻醉,取背部正中长约 3cm 切口,显露 C9—11 棘突及椎板。咬除棘突及椎板,显露脊髓 6mm。用 10g 打击棒,高度 12.5cm,实施打击脊髓。撞击成功标准:击打部位脊髓组织出血,肿胀,大鼠出现摆尾及双下肢扑动数秒,双后肢瘫痪,麻醉苏醒后出现后肢瘫痪,尿潴留。每日给予大鼠挤尿 2—3 次。每亚组在相应时间点取样进行 BBB 评分、免疫荧光及 TUNEL 染色。腹腔注射 50mg/kg 戊巴比妥钠麻醉大鼠,剪开胸腔,从心尖插入灌注针头,剪开右心耳,灌注加入肝素钠的生理盐水直到肝

脏变白,右心耳流出澄清液,再灌注 4% 多聚甲醛 PBS 溶液 1h。打开椎弓板暴露胸段脊髓取材,置入 4% 多聚甲醛中 4℃ 冰箱固定 24h。

1.3 干预剂应用及评估检测

脊髓损伤大鼠模型建立后第 1 天开始,2ME2 治疗组大鼠按 24mg/kg 给予 2ME2 (购于 Sigma 公司)腹腔注射,连续注射 7d。脊髓损伤组大鼠给予等剂量生理盐水腹腔注射,假手术组不给予干预措施。

应用 Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) 评分法对损伤后动物后肢功能进行评分。将大鼠置于 7cm 高、直径 90cm 的平坦不滑的塑胶模板上,于模型制作后 1、3、7、14、21、28d 进行评估。

建模后第 7 天各组大鼠进行脊髓取材,并制作冰冻切片。加入 3% Triton X-100 破细胞膜,室温孵育 30min,加入 10% 小牛血清封闭 1h,加入兔抗鼠 caspase-3 一抗(购于 abcam Invitrogen 公司)4℃ 孵育过夜,次日加入荧光标记的驴抗兔二抗(购于 abcam Invitrogen 公司)。将切片置于荧光显微镜下进行阳性细胞计数。

模型建立后第 7 天各组大鼠进行脊髓取材, TUNEL 免疫荧光标记染色操作。细胞凋亡检测采用 TUNEL 凋亡原位检测试剂盒,按照 TUNEL 试剂盒说明书操作,显微镜下切片进行阳性细胞计数。

1.4 统计学分析

采用 SPSS17.0 软件包进行统计分析,计量资料采用均数±标准差形式表示, caspase-3 蛋白表达阳性细胞计数及凋亡阳性细胞计数数据方差齐,脊髓损伤、脊髓损伤 2ME2 治疗组和假手术组之间比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance), BBB 评分数据方差不齐应用近似(校正) F 检验 Welch 法分析。进一步组间两两比较采用 LSD 的方法,方差不齐时采用 Dunnett's T_3 法。两因素情

况下,即分组因素、重复测量因素时,采用重复测量资料的方差分析。以 $P<0.05$ 示差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 BBB评分

脊髓损伤组和2ME2治疗组脊髓损伤后随着时间延长BBB评分升高,评分明显低于假手术组,差异有显著性意义($P<0.05$),损伤后第14,21,28天2ME2治疗组评分明显高于脊髓损伤组,差异有显著性意义($P<0.05$),见表1。

2.2 免疫荧光检测caspase-3表达

与假手术组(4.583 ± 2.234)比较,脊髓损伤组(33.417 ± 4.274)及脊髓损伤2ME2治疗组(22.250 ± 4.048)免疫荧光染色caspase-3蛋白表达阳性细胞数显著增加,差异具有显著性意义($P<0.05$),脊髓损伤2ME2治疗组caspase-3蛋白表达阳性细胞数较脊髓损伤组显著减少,差异具有显著性意义($P<0.05$)。见图1。

2.3 TUNEL染色

与假手术组(12.25 ± 2.67)相比,脊髓损伤组(49.17 ± 4.75)及脊髓损伤2ME2治疗组(38.67 ± 4.44)凋亡细胞指数显著增多,差异具有统计学意义($P<0.05$),脊髓损伤2ME2治疗组凋亡细胞指数较脊髓损伤组显著减低,差异具有显著性意义($P<0.05$),见图2。

3 讨论

脊髓损伤是常见疾病,给患者及家庭带来严重的负担。激素冲击疗法是脊髓损伤早期治疗的一种常用手段之一,激素在脊髓损伤的治疗中通过改善微循环,清除氧自由基,抗氧化作用等抑制脊髓损伤早期神经细胞和胶质细胞的凋亡,从而减轻脊髓继发性损伤,促进脊髓神经功能的恢复。但激素的应

用有可能出现较严重的并发症。

2ME2是雌激素的正常代谢产物,存在于人体的血液与尿液中,目前研究表明2ME2在一些病理性神经系统损伤过程中具有神经保护作用^[7],Yan J等^[8]研究发现,2ME2通过抑制HIF-1 α 及下游靶基因VEGF表达,抑制内皮生长,抑制BNIP3通路的凋亡,减少血管增生,从而减轻蛛网膜下腔出血后48h大鼠脑血管痉挛。Wu C等^[9]研究显示,HIF-1 α 通过上调其下游靶基因BNIP3、VEGF表达,在蛛网膜下腔出血引起的早期脑损伤,包括细胞凋亡、血脑屏障破坏、脑水肿过程中,扮演重要角色,2ME2抑制HIF-1 α 表达,从而降低了上述损伤。Yeh SH等^[9]在研究局灶性脑缺血大鼠模型过程中发现,HIF-1 α 表达早期诱导细胞凋亡,晚期可诱导细胞存活,因此,早期选择性的抑制HIF-1 α 具有神经保护作用。Chen C等^[4]研究表明2ME2在局灶性脑缺血大鼠模型中具有明显的神经保护作用,其机制是通过抑制HIF-1 α 表达,从而减少VEGF的过度表达所引起的血脑屏障破坏并抑制BNIP3通路神经细胞凋亡。Li Y等^[5]制作全脑缺血大鼠模型,发现2ME2通过抑制HIF-1 α 表达,上调survivin表达,抑制caspase-3,具有抗凋亡作用。

目前,2ME2在脊髓损伤中的作用国内外研究尚少,我们在研究脊髓损伤大鼠模型中发现,2ME2改善脊髓损伤后的运动功能,具有神经保护作用,其可能的机制是通过降低脊髓损伤后caspase-3蛋白表达,抑制神经细胞凋亡来实现的。Wang YF等^[10]研究表明2ME2可以通过抑制HIF-1 α 表达,从而经依赖于VEGF通路和非依赖于VEGF通路抑制aquaporin-4(AQP4)和aquaporin-1(AQP1)的表达,进而减轻脊髓损伤后的水肿,具有神经保护作用。这与我们的结论相符。但2ME2的神经保护机制尚不明确,因此,2ME2的神经保护作用机制尚需进一步研究探讨。

表1 假手术组、脊髓损伤和脊髓损伤2ME2治疗组脊髓损伤后不同时间BBB评分

($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

组别	手术后天数						F值	P值
	1天	3天	7天	14天	21天	28天		
假手术组	21.00 $\pm$ 0.00	21.00 $\pm$ 0.0	21.00 $\pm$ 0.0	21.00 $\pm$ 0.0	21.00 $\pm$ 0.0	21.00 $\pm$ 0.0	0.00	1.000
脊髓损伤组	1.00 $\pm$ 0.60	1.67 $\pm$ 0.49	2.67 $\pm$ 0.65	4.00 $\pm$ 0.95	4.92 $\pm$ 0.90	6.00 $\pm$ 1.04	70.60	<0.001
2ME2治疗组	1.00 $\pm$ 0.60	2.00 $\pm$ 0.60	3.75 $\pm$ 0.75	5.67 $\pm$ 0.89	9.08 $\pm$ 0.67	12.83 $\pm$ 0.83	15.153	0.014
F值	6666.67	7346.35	3866.30	1865.21	1992.02	1146.79		
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		

图1 各组 caspase-3 蛋白免疫荧光染色 (×40)

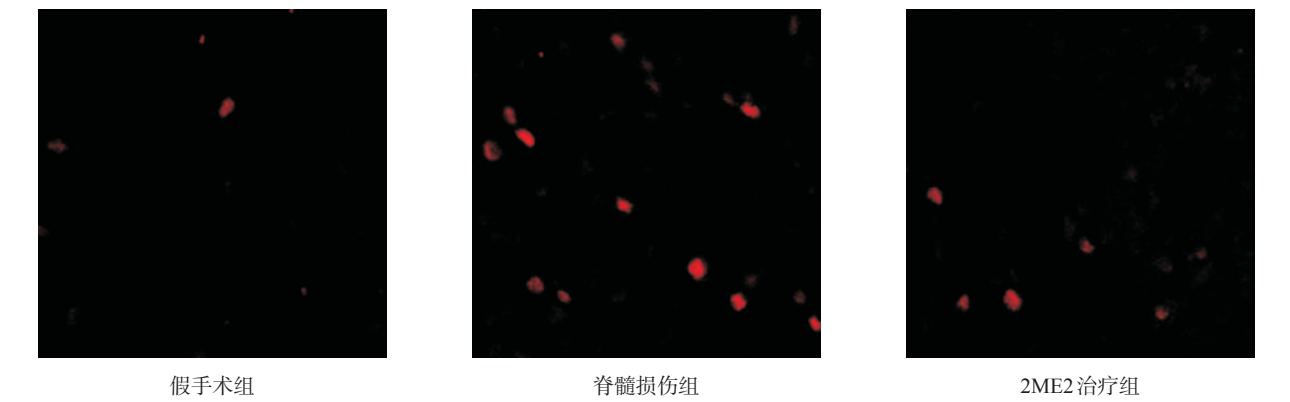
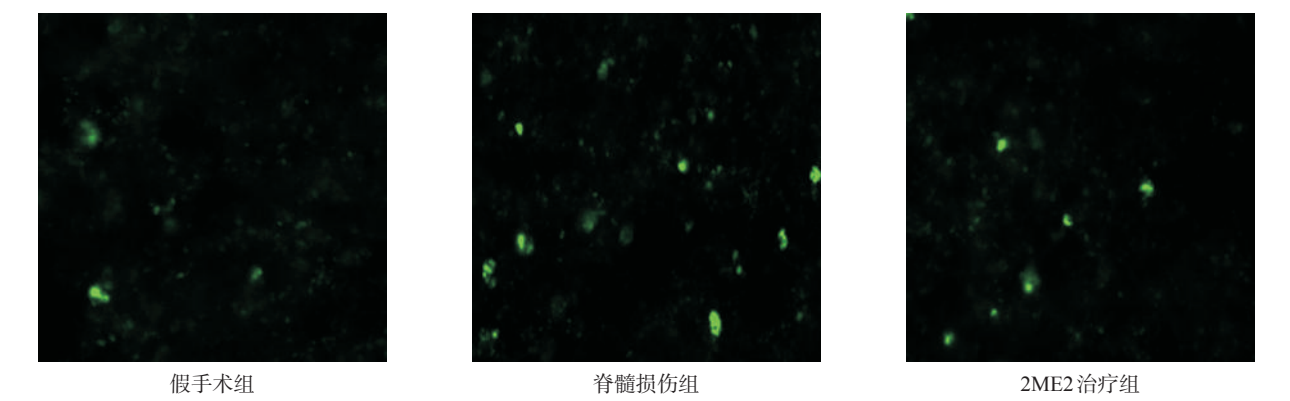


图2 各组 TUNEL 免疫荧光染色



参考文献

[1] Wilson JR, Cadotte DW, Fehlings MG. Clinical predictors of neurological outcome, functional status, and survival after traumatic spinal cord injury: A systematic review[J]. Neurosurg Spine,2012,17(1):11—26.

[2] Ricker JL, Chen Z, Yang XP, et al. 2-Methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor 1alpha, tumor growth, and angiogenesis and augments paclitaxel efficacy in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer, 2013, 15: 525—530.

[3] Wu C, Hu Q, Chen J,et al. Inhibiting HIF-1α by 2ME2 ameliorates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats[J].Biochem Biophys Res Commun, 2013,437(3):469—474.

[4] Chen C, Hu Q, Yan J,et al. Multiple effects of 2ME2 and D609 on the cortical expression of HIF-1alpha and apoptotic genes in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia rat model[J].J Neurochem,2007,102(6):1831—1841.

[5] Li Y, Xia ZL, Chen LB. HIF-1-α and survivin involved in the anti-apoptotic effect of 2ME2 after global ischemia in rats[J].Neurol Res,2011,33(6):583—592.

[6] Young W. Spinal cord contusion models[J]. Prog Brain Res, 2002,137:231—255.

[7] Schaible EV, Windschügl J, Bobkiewicz W, et al. 2-Methoxyestradiol confers neuroprotection and inhibits a maladaptive HIF-1α response after traumatic brain injury in mice[J]. J Neurochem,2014,129(6):940—954.

[8] Yan J, Chen C, Lei J,et al. 2-methoxyestradiol reduces cerebral vasospasm after 48 hours of experimental subarachnoid hemorrhage in rats[J].Exp Neurol,2006,202(2):348—356.

[9] Yeh SH, Ou LC, Gean PW,et al. Selective inhibition of early--but not late--expressed HIF-1α is neuroprotective in rats after focal ischemic brain damage[J].Brain Pathol, 2011, 21 (3):249—262.

[10] Wang YF, Fan ZK, Cao Y,et al. 2-Methoxyestradiol inhibits the up-regulation of AQP4 and AQP1 expression after spinal cord injury[J]. Brain Res,2011,25(1370):220—226.