

甲泼尼龙对脊髓持续压迫节段神经细胞凋亡影响的动物实验

高 博¹, 董明岩¹, 于 洋¹, 关 鑫¹, 高 平²

¹ 辽宁医学院附属第一医院 骨科脊柱病区, 辽宁锦州 121000; ² 锦州市卫生监督所 传染病科, 辽宁锦州 121000

摘要: **目的** 探讨甲泼尼龙 (methylprednisolone, MP) 对脊髓持续受压节段神经细胞的保护作用。**方法** 选取成年日本大耳白兔 145 只, 空白组 5 只, 手术组和 MP 治疗组各 70 只。空白组取颈后正中切口, 逐层钝性剥离肌肉组织, 不予脊髓压迫, 缝合切口; 手术组和 MP 治疗组均在颈后路 C6、C7 间隙拧入平头螺钉造成脊髓轻度压迫, 7 d 后开始减压, MP 治疗组在脊髓受压 30 min 时经耳缘静脉注射大剂量 MP, 手术组在脊髓受压 30 min 时仅注射 0.9% 氯化钠注射液。脊髓受压 6 h、24 h、3 d、7 d 以及脊髓减压 3 d、7 d、14 d 时取压迫段脊髓行透射电镜观察神经细胞凋亡, 流式细胞术检测脊髓神经细胞凋亡率和免疫组化检测凋亡相关 Bax 蛋白的表达情况。**结果** 手术组和 MP 组在压迫 6 h 时均出现神经细胞凋亡, 两组神经细胞凋亡率在脊髓受压 3 d 时达最大值, 但 MP 组细胞凋亡率数值在各时间点均低于手术组, 脊髓减压后 MP 组和手术组神经细胞凋亡率均降低, 且各减压时间点神经细胞凋亡率有统计学差异。**结论** 早期给予 MP 可以降低脊髓持续受压节段神经细胞凋亡率, 脊髓压迫减压术联合 MP 可以保护受压脊髓神经功能。

关键词: 甲泼尼龙; 脊髓压迫; 凋亡

中图分类号: R 651.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-5227(2014)11-1147-05 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-5227.2014.11.018

网络出版时间: 2014-07-23 10:00

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20140723.1000.001.html>

How methylprednisolone affect the apoptosis of nerve cells in the compressed spinal cord: An experimental study

GAO Bo¹, DONG Ming-yan¹, YU Yang¹, GUAN Xin¹, GAO Ping²

¹ Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China;

² Infectious Diseases Department, Health Authority of Jin Zhou, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Corresponding author: DONG Ming-yan. Email: mydong16@163.com

Abstract: Objective To investigate the protective function of methylprednisolone on the nerve cells in the continuously compressed spinal cord. **Methods** One hundred and forty-five Japanese white rabbits were enrolled in this experiment. Five of these rabbits were put in the blank group, seventy of them were put in the operation group and the other 70 rabbits were put in the MP treating group. Rabbits in blank group received cervical median incision to bluntly peel off the muscles without compression of spinal cord and then the incisions were sutured. Meanwhile rabbits in both operation group and MP treating group received mild spinal cord compression by setting a flap head screw between C6 and C7 after the neck. The spinal cord decompression was conducted seven days later. After 30 minutes, rabbits in the MP treating group were injected with a large amount of MP through ear border veins, while the rabbits in the operation group only received 0.9% sodium chloride injection. The transmission electron microscope were used to observe the apoptotic bodies at 6 hours, 24 hours, 3 days and 7 days after compression and 3 days, 7 days, and 14 days after decompression, flow cytometry were used to test the rate of apoptosis of spinal cord cells, and immunohistochemistry were used to test the expression of Bax protein related to apoptosis. **Results** The neuronal apoptosis appeared after six hours' compression in both operation group and MP treating group. The neuronal apoptosis rates in both groups peaked after three day's compression, but the apoptosis rate in MP group was lower than that in the operation group at every time point. The rates of the apoptosis in MP group and operation group became lower after the decompression of spinal cord, and there were significantly statistical differences in neuronal apoptosis rates among those decompression time points. **Conclusion** MP given at the early stage can reduce the neuronal apoptosis rate when spinal cord compression happens. In conclusion, using the spinal cord decompression along with MP can protect the nerve function of the compressed spinal cord.

Key words: methylprednisolone; spinal cord compression; apoptosis

收稿日期: 2014-05-19

基金项目: 辽宁省科技厅基金项目 (2013225305)

Supported by the Science and Technology Committee Foundation of Liaoning Province(2013225305)

作者简介: 高博, 男, 在读硕士。研究方向: 骨科脊柱方向。Email: gaobo305@163.com

通信作者: 董明岩, 男, 硕士, 主任医师, 教授。Email: mydong16@163.com

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是常见的中枢神经系统损伤, 甲泼尼龙 (methylprednisolone, MP) 因其抗脂质氧化作用而对急性脊髓损伤的神经具有保护作用, 大剂量 MP 冲击疗法治疗急性脊髓损伤已经得到广泛应用^[1]。但是在临床实践中, 由于大多数脊髓损伤患者并不能立即接受脊髓减压

治疗而使脊髓处于持续受压状态。为探讨在脊髓持续压迫早期大剂量 MP 冲击疗法对脊髓持续压迫节段神经细胞凋亡的影响及其对脊髓压迫节段神经细胞的保护作用,设计本实验。

材料和方法

1 材料 高温高压消毒平头螺钉,长 8 mm,直径 2 mm,螺距 0.25 mm;甲泼尼龙;链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组化染色超敏试剂盒(SP 超敏试剂盒)。

2 动物及分组 日本大耳白兔 145 只,6 月龄,体重(2.9±0.1) kg,性别不限,辽宁医学院实验动物中心提供。分为 A、B、C 3 组,A 组(5 只)为空白对照组,B 组(70 只)为手术组,C 组(70 只)为 MP 治疗组。

3 实验方法 各组动物术前单笼饲养 7 d,术前行动物脊髓损伤评分(BBB 评分),有神经功能障碍的动物给予排除。预实验期间解剖相同体质量的日本大耳白兔,测量 C7 椎体内径,并计算不同压迫深度对脊髓的压迫率。

4 手术操作 所有实验动物术前禁食 8 h,饮水正常供给。兔全身麻醉,固定于自制兔固定架上。手术区域碘伏消毒 3 次,铺无菌洞巾。A 组(空白组)以 C7 棘突为中心沿后正中中线做长约 5 cm 的切口,钝性剥离肌肉组织,注意保护血管以免造成大量失血,暴露 C6、C7 和 T1 棘突不给予脊髓压迫即逐层缝合切口,0.9% 氯化钠注射液冲洗伤口,碘伏消毒后加压包扎。B 组(手术组)手术切口同 A 组,逐层钝性剥离肌肉暴露 C6、C7 和 T1 棘突后将钝头螺钉拧入 C6 和 C7 间隙但不能向下触及脊髓,若此时实验动物双下肢出现抽搐则表明螺钉已经压迫脊髓,应给予排除,选择神经功能正常兔给予补充。C 组(MP 治疗组)手术切口同 A 组,螺钉拧入节段和 B 组相同,亦不能向下触及脊髓,若拧入螺钉时实验动物双下肢抽搐则选择神经功能正常兔给予补充。手术切口闭合后,各组动物单笼饲养,正常饮食。

5 脊髓压迫模型制作 B、C 两组术后观察 24 h 行动物脊髓损伤评分(BBB 评分),确认无神经功能损伤,开始制作脊髓压迫模型^[2]。打开手术切口将螺钉缓慢拧入 1 mm(0.25 mm/min)对兔脊髓造成轻度压迫,碘伏消毒,闭合切口,加压包扎,单笼饲养。为确认脊髓压迫程度,在脊髓受压 6 h 和 24 h 两个时间点行 BBB 评分,排除不符合轻度压迫的实验动物并予补充^[2]。B、C 两组均压迫 7 d

后开始减压。各组实验动物术后均一次性给予青霉素 800 kU 肌肉注射预防感染,每天早、中、晚 3 次按摩膀胱,促进排尿。

6 脊髓压迫后处理 A 组术后正常饲养。B 组在螺钉压迫脊髓后 30 min 经耳缘静脉注射 0.9% 氯化钠注射液(30 mg/kg)。C 组在螺钉压迫脊髓后 30 min 经耳缘静脉注射 MP(30 mg/kg)^[3]。B、C 两组兔脊髓压迫 7 d 后给予减压。在脊髓压迫 6 h、24 h、3 d、7 d 以及脊髓减压后 3 d、7 d、14 d 时随机选取 10 只兔,行 BBB 评分并取手术节段脊髓送检。脊髓损伤 BBB 评分:各组实验动物在术前、术后 24 h 及各取材时间点行脊髓损伤 BBB 评分。

7 透射电镜观察神经细胞凋亡 B、C 两组在对应时间点分别随机选取 10 只实验动物,快速取出压迫段脊髓组织,切成 1 mm³ 小块固定脱水,环氧树脂包埋,37℃、45℃、60℃ 依次聚合 24 h,超薄切片后行醋酸铀和枸橼酸铅双染 2 min,烘干后电镜观察。

8 流式细胞术检测神经细胞凋亡率 压迫段脊髓组织剪碎后放入组织研磨器中,滴加 2 ml 0.9% 氯化钠注射液研磨至匀浆,加 10 ml 0.9% 氯化钠注射液过滤后 700 r/min 离心沉淀 2 min,0.9% 氯化钠注射液冲洗 2 次离心沉淀 1 次,备用。行流式细胞仪检测,弃上清液,PBS 冲洗 2 次,Annexin V 400 ml 结合细胞悬液,细胞密度 1×10⁶/ml。5 μl Annexin V FITC 染色液滴加到细胞悬浮液中,混匀,4℃ 避光孵育 15 min,加 10 μl 碘化丙啶(PI)染色液,混匀后 4℃ 避光孵育 5 min,流式细胞仪检测。

9 免疫组化检测 Bax 蛋白阳性细胞百分率 5 μm 厚压迫段脊髓切片置于防脱载玻片上。脱蜡后酒精梯度脱水,抗原修复 2 min,依次滴加一抗(1:100 稀释后兔抗兔多克隆抗体)和二抗(山羊抗兔 IgG),滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶后 DAB 显色,苏木素复染,脱水,封片,显微镜下观察。Bax 蛋白表达阳性细胞的标准为细胞呈黄色或黄棕色。

10 统计学方法 应用 SPSS17.0 统计软件处理各组实验数据。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对各组数据进行单因素方差分析, $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各时间点脊髓损伤 BBB 评分 各实验动物术前 BBB 评分显示无神经功能损伤,术后 24 h 神经功能正常,证明术中未伤及脊髓组织,无急性脊髓

损伤发生, 脊髓受压后 BBB 评分下降, 压迫 6 h 及 24 h 评分符合脊髓轻度压迫^[4]。B 组和 C 组相比, 脊髓受压期间及减压 3 d 的 BBB 评分差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 减压 7 d 和 14 d 评分差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2 脊髓受压节段神经细胞凋亡 透射电镜观察显示 B、C 两组压迫 6 h 时均出现神经细胞凋亡。见图 1。

3 各时间点神经细胞凋亡率 流式细胞学检测 B、C 两组脊髓受压后神经细胞凋亡率均上升, 各时间点 C 组凋亡率数值均低于 B 组, 且 C 组在减压期间细胞凋亡率降低速率高于 B 组, 手术组和 MP 治疗组在压迫 6 h 至减压 14 d 这一时间段神经细胞

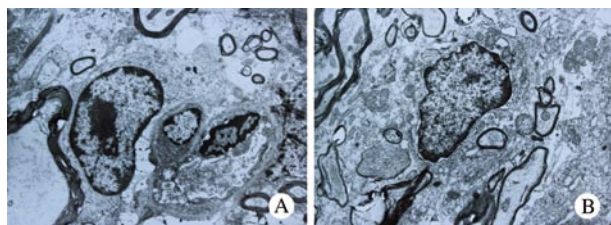


图 1 脊髓受压 6 h 时电镜显示神经细胞凋亡

A: 手术组神经细胞凋亡 ($\times 5\ 000$); B: MP 治疗组神经细胞凋亡 ($\times 5\ 000$)

Fig.1 Apoptosis of neurons after 6 h spinal cord compression

A: Apoptosis of neurons in control group ($\times 5\ 000$);

B: Apoptosis of neurons in MP treating group ($\times 5\ 000$)

表 1 手术组和 MP 治疗组兔脊髓损伤 BBB 评分

Tab.1 BBB score of spinal cord injury rabbits in control group and MP treating group ($\bar{x} \pm s$)

Time	Control group (n=10)	MP treating group (n=10)	P
Before operation	21	21	
After operation 24 h	21	21	
Compression 6 h	17.4 $\pm$ 0.55	17.4 $\pm$ 1.14	1.000
Compression 24 h	17.2 $\pm$ 0.84	17.0 $\pm$ 0.71	0.694
Compression 3 d	14.6 $\pm$ 0.55	14.4 $\pm$ 0.55	0.580
Compression 7 d	9.4 $\pm$ 0.55	9.6 $\pm$ 0.55	0.580
Decompression 1 d	9.4 $\pm$ 0.55	9.6 $\pm$ 0.55	0.580
Decompression 3 d	10.2 $\pm$ 0.45	10.4 $\pm$ 0.55	0.545
Decompression 7 d	10.60 $\pm$ 0.89	12.6 $\pm$ 0.55	0.003
Decompression 14 d	11.60 $\pm$ 0.89	15.00 $\pm$ 0.71	0.000

表 2 压迫段脊髓神经细胞凋亡率和表达 Bax 蛋白阳性细胞率

Tab.2 Apoptosis rate of compression neurons and the positive rate of Bax-protein ($\bar{x} \pm s$)

Time	Neurons apoptosis rate (%)			Positive rate of Bax-protein (%)		
	Control (n=10)	MP treating (n=10)	P	Control (n=10)	MP treating (n=10)	P
Compression 6 h	26.90 $\pm$ 0.57	18.80 $\pm$ 0.85	0.008	13.98 $\pm$ 2.00	13.33 $\pm$ 1.66	0.554
Compression 24 h	33.87 $\pm$ 1.07	23.89 $\pm$ 0.79	0.009	18.73 $\pm$ 2.33	15.03 $\pm$ 2.41	0.022
Compression 3 d	38.74 $\pm$ 1.24	30.50 $\pm$ 0.57	0.011	22.67 $\pm$ 2.31	19.04 $\pm$ 1.85	0.001
Compression 7 d	36.15 $\pm$ 0.64	27.47 $\pm$ 2.48	0.029	20.65 $\pm$ 3.45	16.38 $\pm$ 2.86	0.042
Decompression 3 d	34.32 $\pm$ 0.66	24.43 $\pm$ 1.75	0.017	18.76 $\pm$ 2.79	15.73 $\pm$ 2.29	0.067
Decompression 7 d	28.15 $\pm$ 1.20	20.70 $\pm$ 0.85	0.019	12.17 $\pm$ 1.01	11.72 $\pm$ 0.83	0.436
Decompression 14 d	20.05 $\pm$ 0.64	16.05 $\pm$ 0.35	0.017	10.52 $\pm$ 0.96	9.77 $\pm$ 0.79	0.169

凋亡率差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2, 图 2。

4 Bax 蛋白表达阳性细胞率 免疫组化 Bax 蛋白表达阳性细胞为黄色或黄棕色, 统计 Bax 阳性细胞数 B 组多于 C 组, 手术组和 MP 治疗组在压迫 24 h 至压迫 7 d 这一时间段 Bax 蛋白阳性细胞率差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 压迫 6 h 和减压期间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2, 图 3。

讨论

目前 MP 治疗脊髓损伤的时间点有两个: 一为脊髓损伤后 8 h, 目的为减轻脊髓组织水肿和炎症反应; 二为围术期, 多选择在术前 30 min, 目的在于减轻脊髓组织的缺血再灌注损伤^[5-7]。但亦有文献报道行 MP 冲击治疗与未行 MP 治疗的患者神经功能恢复差异无统计学意义^[8-9]。本实验中观察到, 早期给予 MP 治疗不能推迟受压节段神经细胞开始发生凋亡的时间, 手术组和 MP 治疗组在压迫 6 h 时均出现神经细胞凋亡, 与文献报道相符^[10]。Bax 蛋白作为调节细胞凋亡的主要蛋白, 在本实验中其变化幅度和神经细胞凋亡率呈正相关^[11-12]。在脊髓压迫早期, 手术组和 MP 组神经细胞凋亡率和 Bax 蛋白阳性细胞数均增高, 在脊髓减压阶段两组神经功能均明显改善, 神经细胞凋亡率降低, Bax 蛋白阳性细胞数降低; 但 MP 治疗组细胞凋亡情况轻于手术组 ($P < 0.05$); 脊髓减压后 MP 治疗组神经功能恢复好于手术组, 减压 7 d、14 d BBB 评分、细胞凋亡率差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在脊髓受压节段, MP 组虽然给予了药物治疗, 但是脊髓损伤因素持续存在, 因此 MP 组与手术组相比在脊髓压迫阶段和减压后 3 d 内 BBB 评分差异无统计学意义。当脊髓减压 7 d 时, MP 组恢复情况则优于手术组 ($P < 0.05$)。可以认为在脊髓持续受压早期给予大剂量 MP 治疗可以保护神经细胞, 降低神经细胞的凋亡率, 对于减压后的神经功能恢复有促进作用^[13-16]。

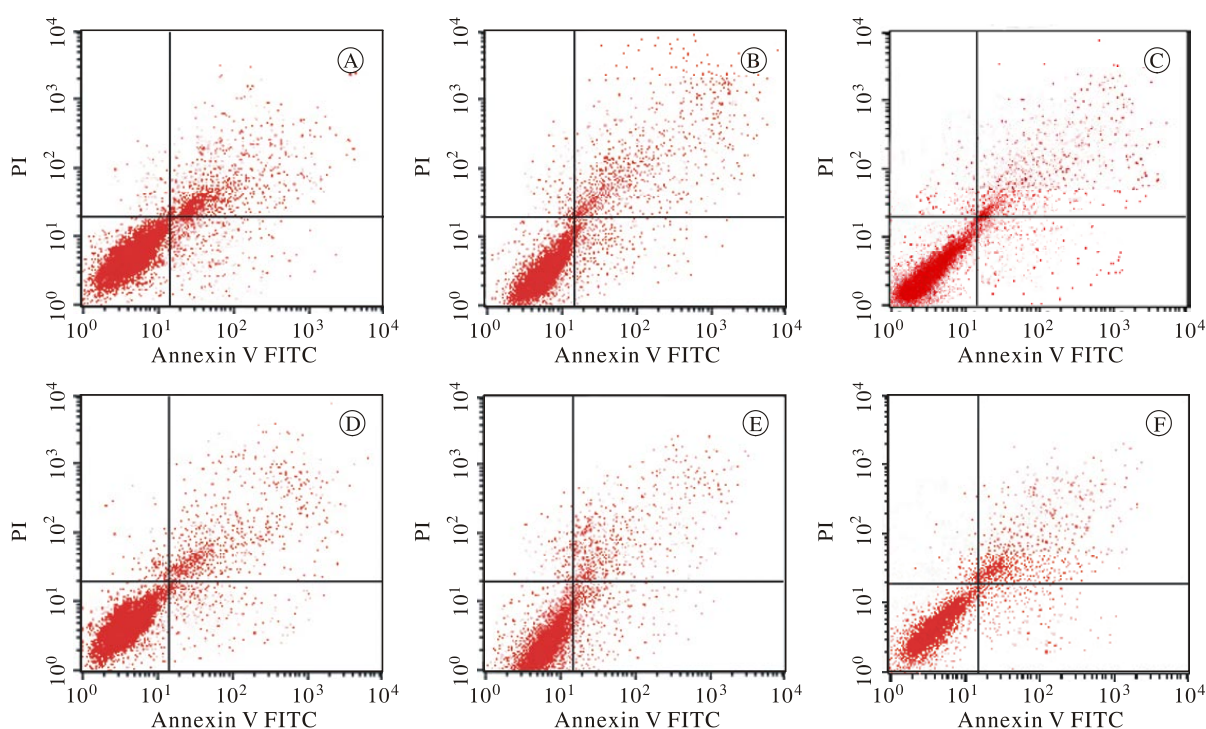


图 2 受压节段减压期间细胞凋亡流式细胞术检测结果 A、B、C 为手术组减压 3 d、7 d、14 d 时流式细胞术检测结果；D、E、F 为 MP 治疗组减压 3 d、7 d、14 d 时流式细胞术检测结果

Fig.2 Flow cytometry showing apoptosis of neuron cells after spinal cord decompression A, B, C: Apoptosis for spinal cord decompression at 3 d, 7 d, 14 d in control group; D, E, F: Apoptosis for spinal cord decompression at 3 d, 7 d, 14 d in MP treating group

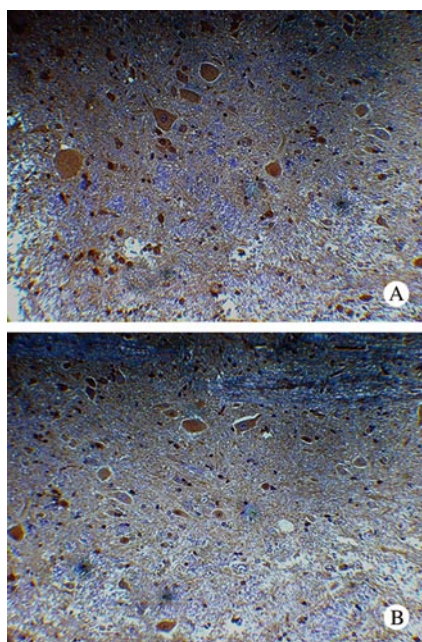


图 3 脊髓受压 3 d 时免疫组化检测 Bax 表达阳性细胞 A: 手术组压迫 3 d 时 Bax 蛋白表达阳性细胞 ($\times 400$); B: MP 组压迫 3 d 时 Bax 蛋白表达阳性细胞 ($\times 400$)

Fig.3 Expression of Bax protein after spinal cord compression at day 3 detected by immunohistochemical study A: Expression of Bax protein in control group ($\times 400$); B: Expression of Bax protein in MP treating group ($\times 400$)

本实验研究中, 脊髓受压 30 min 即给予 MP 治疗。美国急性脊髓损伤研究会 (NASCIS II) 认为

脊髓损伤后 8 h 内均属于 MP 治疗的时间窗^[17]。但研究显示, 脊髓持续受压 6 h 时即有神经细胞凋亡发生^[5]。Hall 等^[18]报道脊髓损伤后 4.5 h 给予 MP 不能有效治疗脊髓损伤。本次实验数据支持神经细胞受压 6 h 即开始凋亡的情况。笔者认为, MP 的注射时间至少应在脊髓受损 6 h 内, 但是在 MP 治疗时间窗内的不同时间点注射 MP 是否会对持续受压节段脊髓神经细胞凋亡产生不同影响亦需要实验验证。大剂量 MP 虽然可以减少持续受压节段脊髓神经细胞的凋亡, 但不能阻止脊髓神经功能受损, 脊髓压迫损伤还需早期解除压迫, 促进神经功能恢复。

本实验观察到, 在脊髓持续受压初期给予大剂量 MP 冲击治疗不能推迟受压节段神经细胞开始凋亡的时间, 但可以减少脊髓持续压迫期间神经细胞的凋亡, 抑制凋亡相关蛋白 Bax 的表达。

参考文献

- Breslin K, Agrawal D. The use of methylprednisolone in acute spinal cord injury: a review of the evidence, controversies, and recommendations [J]. *Pediatr Emerg Care*, 2012, 28 (11): 1238-1245.
- 陈伟, 羊明智. 实验性脊髓损伤动物模型的制备及研究进展 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2014, 22 (6): 520-523.

(下转 1154 页)

(上接1150页)

- 3 杨建东,王静成,贾连顺,等.采用预防性甲基强的松龙保护脊髓损伤的最佳时间和剂量[J].颈腰痛杂志,2007,28(4):279-282.
- 4 Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1-21.
- 5 尹其翔,刘志祯,梁亚鹏.甲泼尼龙早期冲击治疗急性脊髓损伤[J].临床急诊杂志,2011,12(5):301-304.
- 6 邓桂,杜远立,王华.甲泼尼龙在胸髓损伤手术治疗中的应用[J].医学综述,2010,16(1):147-148.
- 7 刘建东,卢承志,林斌,等.甲泼尼龙在颈椎前路减压术中的应用[J].东南国防医药,2013,15(4):355-357.
- 8 Pointillart V, Petitjean ME, Wiart L, et al. Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase [J]. Spinal Cord, 2000, 38(2): 71-76.
- 9 吴炳华,邓高荣,徐聪,等.大剂量甲泼尼龙冲击对治疗急性脊髓损伤的影响[J].广东医学,2011,32(20):2699-2700.
- 10 Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, et al. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys [J]. Nat Med, 1997, 3(1): 73-76.
- 11 Er E, Lalier L, Cartron PF, et al. Control of Bax homodimerization by its carboxyl terminus [J]. J Biol Chem, 2007, 282(34): 24938-24947.
- 12 李仁斌,郑忠,梁硅清,等.大鼠脊髓缺血再灌注损伤后脊髓细胞热休克蛋白27、Bcl-2、Bax蛋白的表达[J].中国修复重建外科杂志,2013,27(6):715-719.
- 13 Park SJ, Oh IS, Kwon JY, et al. The effect of irradiation and methylprednisolone in spinal cord injured rats [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011, 36(6): 434-440.
- 14 Yin Y, Sun W, Li Z, et al. Effects of combining methylprednisolone with rolipram on functional recovery in adult rats following spinal cord injury [J]. Neurochem Int, 2013, 62(7): 903-912.
- 15 汪红林,徐祝军.脊髓损伤后细胞凋亡基因调控研究进展[J].国际骨科学杂志,2010,31(3):187-189.
- 16 吴月欣,梅希凡,李增炎,等.甲基强的松龙对脊髓损伤后脊髓病理生理变化的影响[J].军医进修学院学报,2011,32(11):1117-1119.
- 17 Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, et al. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study [J]. N Engl J Med, 1990, 322(20): 1405-1411.
- 18 Hall ED, Wolf DL, Braughler JM. Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental posttraumatic spinal cord ischemia. Dose-response and time-action analysis [J]. J Neurosurg, 1984, 61(1): 124-130.