

MK-801 在脊髓缺血中的神经保护作用

王立胜¹, 陈春美², 石松生^{2,*}, 王春华³, 欧阳龙强¹

1. 福建医科大学协和临床医学院, 福建 福州 350001
2. 福建医科大学附属协和医院神经外科, 福建 福州 350001
3. 福建省神经外科研究所, 福建 福州 350001

摘要:目的 地佐环平(MK-801)对脊髓缺血中神经保护作用的研究。方法 建立新西兰兔脊髓缺血模型,利用HE染色、原位末端转移酶标记技术(TUNEL)、免疫组化、逆转录反应系统(RT-PCR)等技术检测N-甲基-D-天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR)、诱导型一氧化氮合酶(inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)的表达水平,观察不同剂量MK-801在脊髓缺血中的神经保护作用。结果 对照组脊髓结构完全消失,低剂量组结构较完整,高剂量组缺血损害程度最轻,假手术组脊髓结构正常。NMDAR、iNOS、Caspase-3等蛋白在神经元中有明确表达。凋亡指数、NMDAR、iNOS、Caspase-3 mRNA表达水平在对照组最高,低剂量组、高剂量组,假手术组则逐渐降低,差别具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 MK-801能抑制神经细胞凋亡,对脊髓缺血具有神经保护作用。

关键词: 脊髓缺血; MK-801; NMDAR; 兔

The neuroprotective effect of MK-801 on spinal cord ischemic injury

WANG Li-Sheng¹, CHEN Chun-Mei², SHI Song-Sheng^{2,*}, WANG Chun-Hua³, OUYANG ong-Qiang¹, 1. Union Clinical Medical College, Fujian Medical University, Fuzhou, 350001, China; 2. Department of Neurosurgery, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou, 350001, China; 3. Institute of Neurosurgery, Fuzhou, 350001, China;

Abstract: Objective To study the neuroprotective effect of MK-801 on spinal cord ischemic injury. **Methods** Establishing spinal cord ischemia model of New Zealand white rabbits. Using the HE staining, TUNEL method, immunohistochemistry staining and RT-PCR to detect expression levels of NMDAR, iNOS, caspase-3 and observe the neuroprotective effect of different doses of MK-801 on spinal cord ischemic injury. **Results** Normal structure of the spinal cord completely disappeared in the control group. Structure of low-dose group is better than the control group. Sham group showed normal spinal cord structure. Ischemic damage of high dose group ranged from the low-dose group to the sham group. NMDAR, iNOS, Caspase-3 were mainly located in the cytoplasm. Apoptotic index is the highest in the control group and from low dose group, high dose group to sham group gradually decreased with statistical significance ($P < 0.05$). NMDAR, iNOS, Caspase-3 mRNA levels gradually decreased with statistical significance from control group, low dose group, high dose group to sham group ($P < 0.05$). **Conclusions** MK-801 can inhibit the neuronal apoptosis. It has the neuroprotective effect.

Key words: spinal cord ischemia; MK-801; NMDAR; rabbits

脊髓缺血疾病是临床上常见疾病,世界各国都对其损伤的分子学机制及治疗手段进行了深入的研究。近年来兴奋性神经毒性学说越来越引起国内外学者们的重视。谷氨酸是一种重要的兴奋性神经递质,生理状态下在神经发育、突触可塑性

的维持、神经元回路的形成及学习过程发挥重要作用^[1]。本课题前期研究发现谷氨酸等兴奋性氨基酸通过其重要受体,即N-甲基-D-天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR)与诱导型一氧化氮合酶(inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS)、

基金项目:福建省卫生厅创新课题(2009-CXB-17)

收稿日期:2011-10-21; 修回日期:2012-02-15

作者简介:王立胜(1985),男,在读硕士。研究方向:脊髓缺血。

* 通讯作者:石松生(1961),男,福州协和医院神经外科主任,福建省神经外科研究所所长,主任医师,博士,副教授,硕士生导师。

半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 共同介导了脊髓缺血细胞凋亡通路, 导致神经元损伤^[2]。MK-801, 又名地佐环平, 是一种兴奋性氨基酸受体拮抗剂, 近年来大量研究发现其对多种组织损伤具有保护作用, 但对脊髓缺血性损伤的保护作用研究较少。本文将研究 MK-801 对脊髓缺血性损伤的保护机制, 以探索它对脊髓损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

MK-801 购自厦门泰京生物技术有限公司, NMDAR、Caspase-3 PCR 引物由上海鼎安生物技术有限公司合成, iNOS PCR 引物由上海生工生物工程有限公司设计合成, Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒购自东洋纺(上海)生物技术有限公司, 即用型 PCR 反应体系购自 Fermentas 公司, 羊抗兔 NMDAR 多克隆抗体购自 Lifespan 公司, 羊抗兔 Caspase-3 多克隆抗体与羊抗兔 iNOS 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司, TUNEL 染色试剂盒购自德国默克公司。

1.2 实验动物及脊髓缺血模型建立^[3]

新西兰大白兔 32 只雄性, 体重 2 ~ 2.5 kg。耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠 (30 mg / Kg), 麻醉成功后, 取 24 只结扎其左肾动脉以下 5 根腰动脉, 建立脊髓缺血模型。随机分为对照组、低剂量组、高剂量组, 立即分别腹腔注射等量生理盐水、1 mg / (kg · d) MK-801 和 2 mg / (kg · d) MK-801, 另取 8 只设立假手术组, 只分离腰动脉但不结扎, 给予等量生理盐水, 术后 24 小时及 48 小时再按上述剂量各注射 1 次, 72 小时后过度麻醉动物, 生理盐水心脏灌注后迅速取 L3-L5 节段的脊髓组织, 横断面切断脊髓组织(包括前角和后角), 每块 100 mg 左右, 以备以下实验应用。

1.3 HE 染色观察脊髓前角形态

将脊髓组织迅速置于 4% 多聚甲醛固定 24 小时, 再将固定后的组织常规脱水、石蜡包埋, 制作连续切片。片厚 4 μm, 常规 HE 染色, 观察脊髓前角形态学变化。

1.4 免疫组织化学方法测定

脊髓组织中 NMDAR、iNOS、Caspase-3 蛋白的表达部位将脊髓组织迅速置于 4% 多聚甲醛固定 24 小时, 再将固定后的组织常规脱水、石蜡包埋, 制作连续切片。实验步骤按说明书进行, DAB 显色, 于光学显微镜下观察 NMDAR、iNOS、Caspase-3 蛋白

在脊髓前角细胞的表达定位情况。

1.5 细胞凋亡检测

将脊髓组织迅速置于 4% 多聚甲醛固定 24 小时, 再将固定后的组织常规脱水、石蜡包埋, 连续切片。利用原位末端转移酶标记技术 (TUNEL), 实验步骤按说明书进行, 进行细胞凋亡检测, DAB 显色。于光学显微镜下观察脊髓前角细胞凋亡变化。

1.6 逆转录反应系统 (RT-PCR) 测定脊髓组织中 NMDAR、iNOS、Caspase-3 mRNA 的含量

将脊髓组织迅速置于液氮罐中备用, Trizol 提取总 mRNA, 分光光度计测定 mRNA 浓度及 A260/A280, 取总 mRNA 0.5 μg 进行逆转录, 再以逆转录产物 1 μl 作为模板加入相应引物 (β-actin 作为内参照) 进行 PCR 扩增, 反应体系 25 μl。所用引物序列如下: β-actin (5'-AAGAATAACTAGAGAAGAAGCAG-3', 5'-CTTGTGGAGAAGCTTGTAAATG-3'); iNOS (5'-AGTACTTTGGCAATGGAGACT-3', 5'-CAGGTACATTG-GAGGTGTAGA-3'); NMDAR (5'-TGCAAGTGGGCATC-TACAATGG-3', 5'-TTGTTGCTGTGTTTACCCGC-3'); Caspase-3 (5'-TATCGGCAATGAGCGGT TCC-3', 5'-TATCGGCAATGAGCGGTCC-3')^[4]。扩增条件: 95℃ 预变性 10 min, 95℃ 变性 (NMDAR: 30 s; iNOS: 30 s; NCaspase-3: 45 s), 退火 (NMDAR: 56℃, 30 s; iNOS: 55℃, 30 s; Caspase-3: 56℃, 30 s), 72℃ 延伸 (NMDAR: 30 s; iNOS: 30 s; Caspase-3: 60 s) (以上步骤循环 37 次), 最后 72℃ 继续再延伸 7 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶 (内含核酸燃料 Goldview) 电泳, 美国伯乐 BIO-RAD Gel Doc™ XR 凝胶成像系统观察和照相, 独立重复 3 次实验, 以 β-actin 作为内参照, 与同步产物进行比较, 对 PCR 产物相对定量, 用 quantity one 分析软件半定量分析, 计算所得产物的积分光密度与各自内参照积分光密度的比值来反映该基因 mRNA 的水平。

1.7 统计学分析

实验数据处理结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计学处理采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析及组间比较, $P < 0.05$ 为有差异, 具有统计学意义。

2 结果

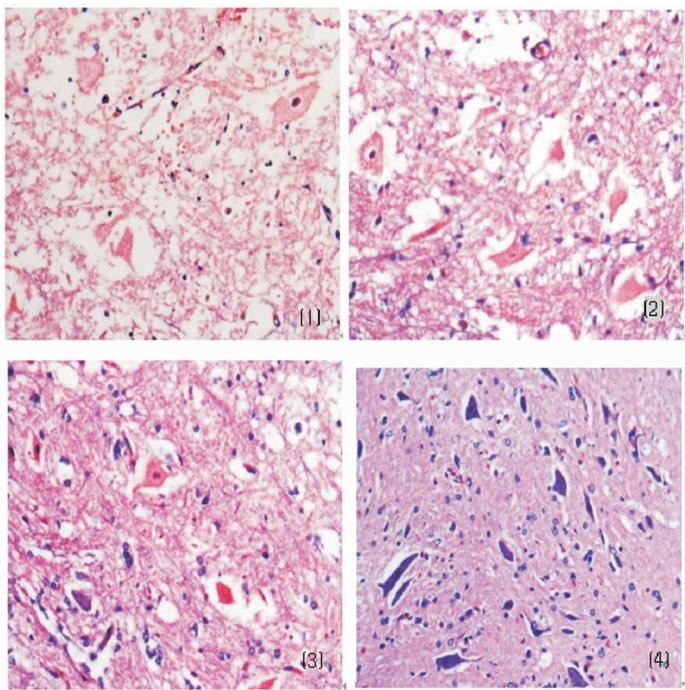
2.1 HE 染色结果

对照组脊髓正常结构基本消失, 显示脊髓广泛充血肿胀, 可见大量的空泡变性, 正常神经元极少, 大多数神经元细胞核萎缩或溶解, 胞质成嗜伊

红染色,胞质中尼氏体消失。低剂量组结构较对照组完整,正常神经原数量较多,神经元变性坏死现象较对照组减轻。假手术组可见正常脊髓结构,神经元形态正常。高剂量组缺血损伤情况介于低剂量组与假手术组之间。(见图1)

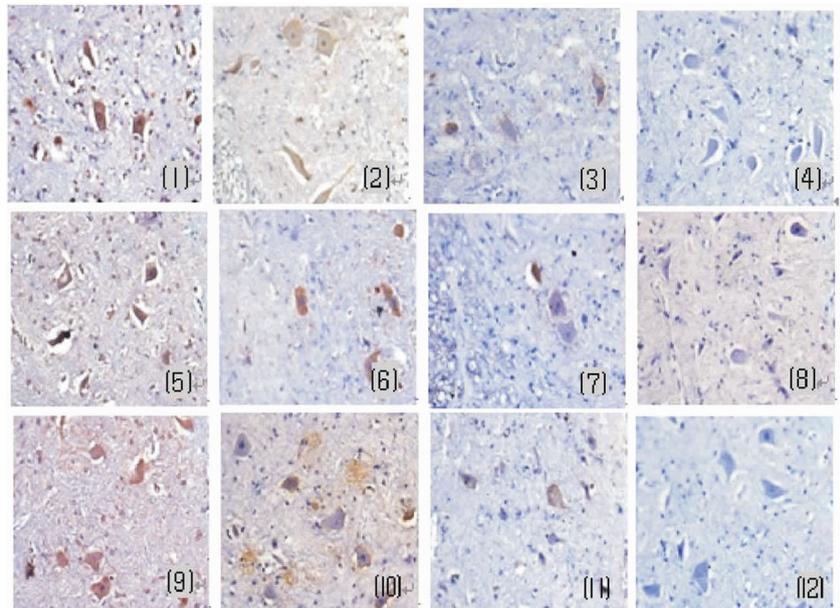
2.2 脊髓组织 NMDAR、iNOS、Caspase-3 蛋白的细胞定位

免疫组织化学显示 NMDAR、iNOS、Caspase-3 阳性细胞呈棕黄色,它们主要表达在细胞浆中,细胞核内也可见少量表达。(见图2)



①:对照组;②:低剂量组;③:高剂量组;④:假手术组.

图1 脊髓前角细胞形态学改变 ×200, HE 染色



(1)-(4): NMDAR; (5)-(8): iNOS; (9)-(12): Caspase-3.

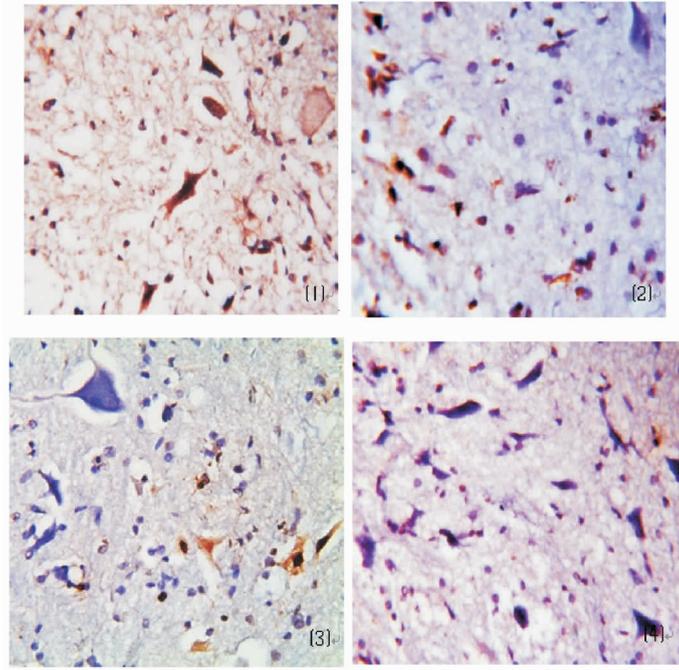
(1)、(5)、(9): 对照组; (2)、(6)、(10): 低剂量组; (3)、(7)、(11): 高剂量组; (4)、(8)、(12): 假手术组.

图2 NMDAR、iNOS、Caspase-3 免疫组化染色 ×200, DAB 染色

2.3 TUNEL 检测结果

光镜下观察脊髓前角细胞 TUNEL 染色,随机计算 5 个高倍视野下调亡细胞数占细胞总数的百分比得出细胞凋亡指数。可见对照组大部分细胞发生萎缩、溶解、核固缩,细胞浆出现深染等细胞凋亡的特征,计算凋亡指数为 $(75.4 \pm 7.9)\%$ 。低剂

量组有较多凋亡细胞 $(53.4 \pm 6.5)\%$,凋亡指数低于对照组。高剂量组为 $(43.4 \pm 6.1)\%$,较低剂量组凋亡指明降低。假手术组细胞保持完好,只见极少量凋亡细胞 $(3.68 \pm 1.0)\%$ 。方差分析及组间比较均有统计学差异 ($F = 93.9, P < 0.05$) (见图 3)

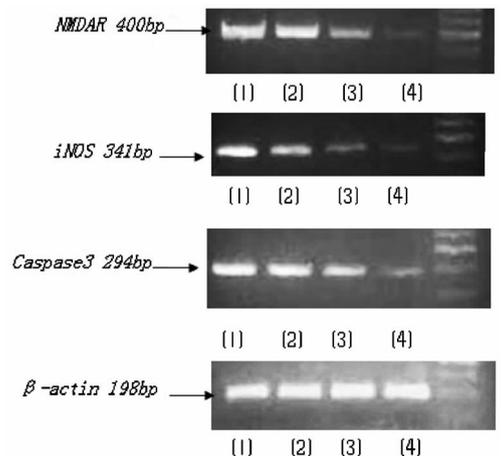


①对照组,②低剂量组,③高剂量组,④假手术组

图 3 脊髓前角细胞凋亡变化 $\times 200$, DAB 染色

2.4 脊髓组织 NMDAR、iNOS、Caspase-3 mRNA 的表达

各组脊髓标本提取总 RNA,分光光度计测定各样本 A260/A280 均在 1.8 ~ 2.0 之间,说明抽提 RNA 质量可,可进行后续实验。NMDAR、iNOS、Caspase-3 mRNA 的片段大小分别为 400 bp、341 bp、294 bp,相对含量在对照组最高,低剂量组、高剂量组、假手术组其相对含量有逐渐降低的趋势,各组 NMDAR mRNA 相对含量经方差分析及各组间比较均有统计学差异 ($F = 122.59, P < 0.05$),各组 iNOS mRNA 相对含量经方差分析及各组间比较均有统计学差异 ($F = 101.44, P < 0.05$),各组 Caspase-3 mRNA 相对含量经方差分析及各组间比较均有统计学差异 ($F = 90.18, P < 0.05$) (见表 1、图 4)。



①:对照组;②:低剂量组;③:高剂量组;④:假手术组。

图 4 NMDAR、iNOS、Caspase-3 mRNA 在不同组别的表达水平

表1 NMDAR、iNOS、caspase-3 mRNA 在不同组别的相对含量 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	NMDAR mRNA 相对含量	iNOS mRNA 相对含量	Caspase-3 mRNA 相对含量
对照组	0.743 ± 0.086	0.753 ± 0.11	0.730 ± 0.12
低剂量组	0.532 ± 0.086	0.534 ± 0.080	0.534 ± 0.085
高剂量组	0.449 ± 0.044	0.449 ± 0.049	0.449 ± 0.052
假手术组	0.080 ± 0.044	0.081 ± 0.0449	0.083 ± 0.046

各组间比较 $P < 0.05$

3 讨论

MK-801, 是一种中枢神经系统保护类药物。可以非竞争性特异性拮抗 NMDAR, 减少谷氨酸的毒性, 大量研究证实其对多种原因造成的神经元损伤具有保护作用^[5-7]。脊髓缺血引起的神经元损伤在临床上较常见, 近年来许多学者对脊髓缺血性损伤的机制做了大量研究。1964年 Olney 首先提出兴奋性神经毒性一词, 认为谷氨酸等兴奋性神经递质的大量释放可能会导致神经元的损伤, Megumu 等^[8]学者运用电生理学方法也首次证实脊髓组织中存在 NMDAR。Liu 等^[9]学者证实大量释放的谷氨酸的递质可介导神经元凋亡, 导致脊髓继发性损伤。在外伤等各种原因引起的脊髓缺血性疾病使脊髓组织兴奋性氨基酸大量释放作用于 NMDAR, 过度激活 NMDAR, 引起细胞内 Ca^{2+} 超载, 从而引起一系列 Ca^{2+} 依赖的分子学变化, 造成神经元损伤。Pradeep 等^[10]研究发现当神经元细胞缺血时, 谷氨酸大量释放, NMDAR 敏感性增加, 介导 Ca^{2+} 大量内流, 激活 iNOS 等神经细胞损伤的关键酶, 产生大量氧自由基, 导致大量神经细胞损伤。本课题组在前期研究中证实激活的 iNOS 催化底物后生成 NO, 后者激活蛋白激酶, 使蛋白质磷酸化, 磷酸化蛋白质能够激活 Caspase-3 的活性, 而 Caspase-3 属于半胱天冬蛋白酶家族, 是已知的该家族成员中执行细胞凋亡的关键酶之一, 活化的 Caspase-3 又进一步切割不同的底物, 导致蛋白酶级联切割放大, 介导缺血缺氧后期迟发性的神经毒性作用, 最终使细胞走向凋亡, 并且证实 NMDAR 与 Caspase-3 存在上下游关系^[2,4,11]。

本研究证实 MK-801 能稳定细胞结构, 保持脊髓结构的完整性。利用免疫组化检测, 明确定位 NMDAR、iNOS、Caspase-3 等蛋白的表达部位, 主要表达于细胞浆中, 细胞核中较少, 这说明 NMDAR、iNOS、Caspase-3 在神经元中有明确表达, 这与国内外研究结果一致。TUNEL 凋亡检测也发现 MK-801 可抑制细胞凋亡, 低剂量组凋亡指数低于对照

组, 高剂量组较低剂量组凋亡指数明显降低, 假手术组细胞保持完好, 只见极少量凋亡细胞。RT-PCR 检测 NMDAR、iNOS、Caspase-3 等基因在对照组表达最高, 经 MK-801 治疗后基因表达水平降低, 且加大剂量后降低更为明显。本研究结果支持 MK-801 能竞争性抑制谷氨酸等兴奋性神经递质与 NMDAR 结合, 降低 NMDAR 的敏感性, 阻断 NMDAR 介导的 Ca^{2+} 内流, 减少 Ca^{2+} 在神经元内的蓄积, 抑制 Ca^{2+} 对 iNOS 等神经细胞损伤关键酶的激活, 阻断 iNOS 对蛋白激酶的激活及蛋白质磷酸化, 从而减弱 Caspase-3 的活性, 使活化的 Caspase-3 导致的蛋白酶级联切割放大作用减弱, 阻断细胞走向凋亡, 从而发挥对脊髓缺血的神经保护作用。本实验结果与本课题组的前期研究及国内外其他学者的研究结果相一致, 希望能为脊髓缺血的临床治疗提供一定的帮助。

参 考 文 献

- [1] Lee I, Kesner RP. Differential contribution of NMDA receptors in hippocampal subregions to spatial working memory. *Nat Neurosci*, 2002, 5(2):162-168.
- [2] 陈春美, 杨卫忠, 王春华, 等. NOS、p38 MAPK、Caspase-3 介导大鼠缺血神经细胞凋亡可能通路的实验研究. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2008, 35(2):107-111.
- [3] Kwun BD, Vacanti FX. Mild hypothermia protects against irreversible damage during prolonged spinal cord ischemia. *J Surg Res*, 1995, 59(6):780-782.
- [4] 杨卫忠 贾建文 陈春美, 等. NMDAR1、Caspase-3 在脊髓缺血性损伤的表达特点及相关性研究. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2009, 36(5):381-385.
- [5] Solberg Y, Rosner M, Turetz J, et al. MK-801 has neuroprotective and antiproliferative effects in tetinal laser injury. *Inves Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38(7):1380-1389.
- [6] Yoles E, Shir Muller S, Schwartz M. NMDA-Receptor antagonist protects neurons from secondary degeneration after partial optic nerve crush. *Neurotra*, 1997, 14(9):665-675.
- [7] Warren J, Alilain PhD, Harry G, et al. MK-801 upregulates NR2A protein levels and induces functional recovery of

- theipsilateral hemidiaphragm following acute C2 hemisection in adult rats. *J Spinal Cord Med*, 2007, 30(4): 346-352.
- [8] Megumu Y, Homas J. Amino acid-mediated epsps at primary different synapses with substantin gelatinosa neurones in the rat spinal cord. *Physiol*, 1990, 340 : 315-335.
- [9] Liu D, Xu GY, Pan E, et al. Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury. *Neuroscience*, 1999, 93(4) : 1383-1389.
- [10] Pradeep KK, Cheriyan J, Suma Priya SD, et al. Regulation of Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase II catalysis by N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B. *Biochem J*, 2009, 419(1) :123-132.
- [11] 陈春美, 杨卫忠 王春华, 等. 一氧化氮合酶、p38 MAPK、Caspase-3 介导缺氧神经细胞凋亡机制的研究. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(2) :213-215.

《国际神经病学神经外科学杂志》征稿、征订启事

《国际神经病学神经外科学杂志》创刊于 1974 年,由教育部主管,中南大学主办,中南大学湘雅医院承办。是目前国内唯一一本同时涵盖神经病学和神经外科学两个相联学科的专业学术期刊。本刊被收录为“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”。《国际神经病学神经外科学杂志》现主要栏目有论著、临床经验交流、疑难病例讨论、病例报道、专家论坛和综述等。杂志立足于国内神经病学、神经外科学领域的前沿研究,及时报道国内外神经科学领域最新的学术动态和信息。促进国内外学术的双向交流,为中国神经科学走向世界搭建新的平台。

我们热忱欢迎国内外神经科学工作者踊跃来稿,通过本刊介绍自己的研究成果和临床经验。对于论著、临床经验交流、疑难病例讨论、病例报道等类型的文章将优先发表。

《国际神经病学神经外科学杂志》刊号为 CN 43-1456/R,ISSN 1673-2642,邮发代号 42-11,全国公开发行。读者对象主要为国内外从事神经病学、神经外科专业及相关专业的医务人员。杂志为双月刊,每期定价 13 元,全年定价 78 元。欢迎各级医师到当地邮局订购。杂志社也可办理邮购。

为更好地筹集办刊资金,保证刊物的健康发展,本刊将竭诚为药品厂商、医疗器械厂商和广告公司提供优质服务,并长期向各级医疗单位征集协办单位,具体事宜请与本刊杂志社联系。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号(中南大学湘雅医院内)国际神经病学神经外科学杂志社,邮编:410008,电话/传真:0731-84327401,E-mail 地址:jinn@vip.163.com,网址:http://www.jinn.org.cn/。