

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00703

心脏营养素-1 对大鼠损伤脊髓的保护作用

李 菁, 朱 磊, 林浩东, 陈爱民*

第二军医大学长征医院创伤与修复重建外科, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨心脏营养素-1(cardiotrophin-1, CT-1)对大鼠损伤脊髓的保护作用,并初步探讨其可能的作用机制。**方法** 90只大鼠随机分为9组:脊髓损伤前正常大鼠(0 h)以及脊髓损伤模型建立后1 h、6 h、12 h、1 d、2 d、3 d、6 d、12 d组($n=10$),RT-PCR测定损伤脊髓组织CT-1及其受体糖蛋白130(gp130)、白血病抑制因子受体(LIFR) mRNA表达。大鼠随机分为3组:CT-1干预组、模型组和神经生长因子(NGF)干预组($n=30$),分别给予rhCT-1($100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)或等量生理盐水或NGF硬膜内灌注,给药后第3天、1周、2周于损伤脊髓处取材行H-E和尼氏染色,对比分析各组神经元计数。大鼠随机分为模型组及CT-1干预组($n=30$),损伤后1、4、12周完整剥离大鼠小腿三头肌($n=10$),比较两组肌肉质量及总蛋白量。**结果** 与损伤前(0 h)相比,大鼠脊髓损伤后CT-1 mRNA表达出现一过性增高(1 h, $P<0.05$),而后呈进行性下降趋势;其受体表达出现反馈性增高。CT-1干预组、NGF干预组神经元及尼氏体数量均高于模型组($P<0.05$),前两组间差异无统计学意义。脊髓损伤后4周、12周时CT-1干预组大鼠小腿三头肌湿质量及总蛋白含量均高于模型组($P<0.05$)。**结论** CT-1对大鼠脊髓损伤后神经元存活及功能维持具有一定的保护作用。

[关键词] 脊髓损伤;心肌营养素-1;神经营养因子;神经保护

[中图分类号] R651.21

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2014)07-703-05

Protective effect of exogenous cardiotrophin-1(CT-1) against spinal cord injury in rats

LI Jing, ZHU Lei, LIN Hao-dong, CHEN Ai-min*

Department of Trauma and Reconstruction Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of exogenous cardiotrophin-1 (CT-1) against spinal cord injury and the possible mechanism. **Methods** Ninety rats were evenly randomized into 9 groups, namely, before injury (0 h) and 1, 6, 12 hours, 1, 2, 3, 6 and 12 days after injury. RT-PCR was used to examine the expression of CT-1, its receptor gp130, and leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) in the injured spinal cord tissues. Rats were also divided into spinal cord injury model group, nerve growth factor (NGF) treatment group and CT-1 treatment group, receiving intradural infusion of normal saline, NGF, and rhCT-1($100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), respectively; the injured tissues were harvested at the 3rd day, one week and 2 weeks after injury for H-E and Nissl staining; and the neuron counts were compared between different groups. Sixty rats were divided into model group and CT-1 treatment group ($n=30$); the triceps muscle wet weight and total protein weight were compared between the two groups at 1 week, 2 weeks and 4 weeks after spinal cord injury. **Results** CT-1 mRNA expression had a transient significant increase after injury ($P<0.05$), and then it decreased gradually; meanwhile, expression of its receptors increased consequently. The numbers of neurons and Nissl bodies were similar in CT-1-treated group and NGF-treated group, but the numbers of both groups were significantly more than that in the model control group ($P<0.05$). In addition, the muscle wet weight and protein content in the CT-1-treated group were significantly higher than that in the model control group at 4 weeks and 12 weeks after injury ($P<0.05$). **Conclusion** CT-1 exhibits a protective effect on the survival and function of neurons after spinal cord injury in rats.

[Key words] spinal cord injuries; cardiotrophin-1; nerve growth factor; nerve protection

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(7):703-707]

[收稿日期] 2014-04-01 **[接受日期]** 2014-06-24

[基金项目] 上海市教育委员会人才计划项目(XYQ020111021). Supported by Talent Program of Shanghai Education Committee (XYQ020111021).

[作者简介] 李菁, 硕士生, 住院医师. E-mail: li0j0i0n0g@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81886842, E-mail: aiminchen@aliyun.com

脊柱骨折常伴发严重的脊髓损伤,导致效应器官及组织失神经营养发生功能紊乱,严重损害患者身心健康。因此,保护脊髓损伤后残存神经元功能具有重要的临床意义。心脏营养素-1(cardiotrophin-1, CT-1)是白细胞介素-6(IL-6)家族的新成员^[1],在小鼠心脏、肾脏、骨骼肌和肝脏中均有表达^[2],也表达于小鼠胚胎脑、脊髓、背根神经节、骨骼肌和皮肤中^[3],在交感神经轴突损伤中高度表达其受体 gp130^[4],能够支持脊髓运动神经元、多巴胺能神经元和睫状神经节神经元长期存活^[5-6],具有潜在的神经保护作用。但目前缺乏其对脊髓损伤后神经保护及再生作用的相关研究。因此,本研究观察大鼠脊髓损伤组织中 CT-1 及其受体的表达变化,并进一步观察外源性重组 CT-1 对损伤脊髓神经元修复的可能作用,探讨 CT-1 在脊髓损伤修复中的潜在价值,为其在脊髓损伤中的临床应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 rhCT-1(Peprotech,美国)、苏木精-伊红(H-E)染色试剂盒(北京雷根生物技术有限公司)、尼氏(Nissl)染色试剂盒(南京森贝伽生物科技有限公司)、反转录反应液(美国 e-life Co 公司)、实时荧光定量 PCR 仪(CFX Connect™, Bio-Rad,美国)、计算机图像分析系统(Olympus, BX51WI-DPMC, Japan)、酶标仪(Biotek 公司,美国)。

1.2 动物来源及脊髓损伤模型的建立 雄性 SD 大鼠由第二军医大学动物实验中心提供,6 个月龄,体质量 200~250 g。脊髓损伤模型的建立:大鼠称质量,腹腔注射 0.5% 硫喷妥钠(500 mg/kg)麻醉后,俯卧固定,备皮,常规消毒铺巾。以脊柱为中心纵行切开皮肤、皮下组织,剥离两侧椎旁肌肉,暴露 T₆₋₈ 棘突和椎板,咬除 T₇ 棘突和椎板,暴露硬膜,预打击脊髓上放置 0.4 cm×0.5 cm 垫片。采用 Allen 打击法^[7](10 g×5 cm),以造成截瘫为有效打击,关闭伤口,行椎管内置管术。术后室温控制在 20~28℃,所有动物每日肌注青霉素钠 10 万 U。

1.3 RT-PCR 测定大鼠脊髓损伤组织 CT-1 及其受体的表达 健康雄性 SD 大鼠 90 只,按照取材时间点随机分为 9 组:脊髓损伤前正常大鼠(0 h)以及大

鼠脊髓损伤模型建立后 1 h、6 h、12 h、1 d、2 d、3 d、6 d、12 d 组($n=10$),每只大鼠取损伤处脊髓组织 50 mg,采用 RT-PCR 方法检测 CT-1 及其受体 mRNA 表达。CT-1 引物序列:5'-GGT GTG TTG AAG GAA ACA GG-3'(Forward),5'-GAG TCA GTC TGG TGG TCT TCC-3'(Reverse);糖蛋白 130(gp130):5'-GCA AGG TGT TTG CTG AAG GG-3'(Forward),5'-ACG GCT TCG TCA GCT TTG TA-3'(Reverse);白血病抑制因子受体(LIFR- α):5'-GGA CTG ACT GAA TAG CAC GGA-3'(Forward),5'-CAA TGC CTG GGT ACA TGG TAG-3'(Reverse)。以 GAPDH 管家基因为内参,根据 ΔCt 值比较平均相对表达量的变化。RT-PCR 检测委托上海舜百生物科技有限公司完成。

1.4 外源性 CT-1 对损伤脊髓神经元的影响 雄性 SD 大鼠 90 只,随机分为 3 组:模型组、神经生长因子(NGF)干预组和 CT-1 干预组($n=30$)。CT-1 干预组于脊髓损伤后即刻予 rhCT-1($100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)硬膜内灌注,模型组、NGF 干预组分别给予等量生理盐水和 NGF。给药后第 3 天、1 周、2 周于损伤脊髓处取材,行 H-E 染色及 Nissl 染色,通过计算机图像分析系统(Olympus, BX51WI-DPMC, Japan)于放大 200 倍显微镜视野中进行计数分析。

1.5 外源性 CT-1 对脊髓损伤后失神经营养肌肉的影响 雄性 SD 大鼠 60 只,随机分为模型组及 CT-1 干预组($n=30$),所有大鼠均制备脊髓损伤模型,CT-1 干预组大鼠于脊髓损伤后即刻给予 rhCT-1($100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)硬膜内灌注,损伤后 1、4、12 周完整剥离大鼠小腿三头肌($n=10$),去除脂肪及结缔组织,滤纸吸干表面血液后迅速转送至电子分析天平(R200D,1/10 万,Germany)上称质量。取上述剥离肌肉行总蛋白测定:将肌肉组织于冰上切碎,按试剂盒(美季生物公司)说明应用 Lowry 法测定总蛋白。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 分析软件,应用方差分析及 t 检验比较组间差异,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 大鼠脊髓损伤组织 CT-1 及其受体表达的变化 结果(图 1)表明:损伤脊髓组织中 CT-1 mRNA 的表达出现波动,伤后 1 h 相对表达量显著增高

($P < 0.05$); 随后其进行性下降, 损伤后 24 h 与 0 h 表达水平相当, 随着时间的延长呈现低表达表现。其受体 *gp130*、*LIFR* 的表达出现不同程度的变化, 前者 12 h 内表达平稳, 与 0 h 相当, 48 h 后表达水平逐渐升高, 6 d 出现峰值 ($P < 0.05$), 12 d 后降至 0 h 水平; 后者于 48 h 时形成表达高峰 ($P < 0.05$), 72 h 时略有下降, 6 d 后与 0 h 表达水平相当。

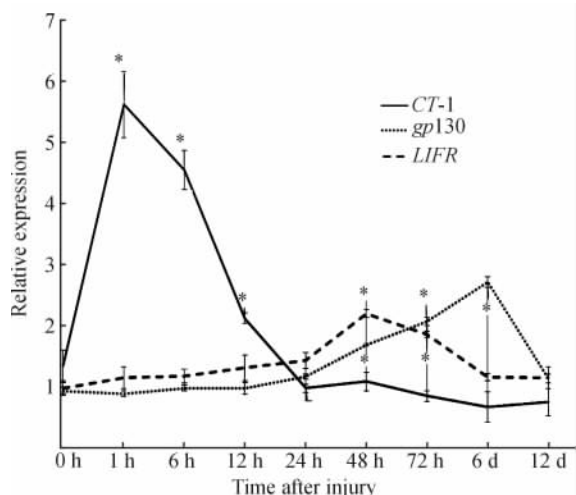
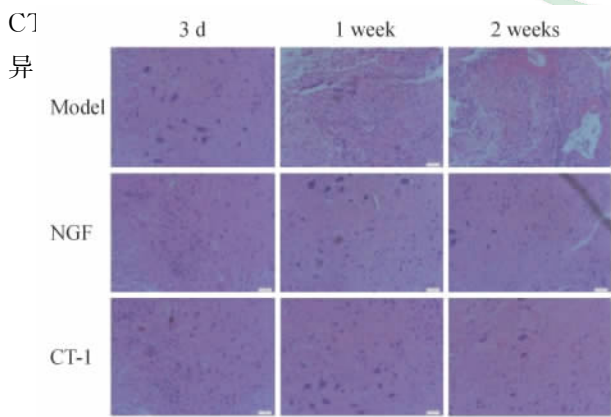


图 1 大鼠损伤脊髓组织 CT-1 及其受体基因表达水平的变化

Fig 1 Changes of CT-1, *gp130*, and *LIFR* mRNA expression in injured spinal cord tissues of rats

* $P < 0.05$ vs 0 h; $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

2.2 外源性 CT-1 干预对大鼠损伤脊髓神经元形态学的影响 H-E 染色结果 (图 2A) 表明: NGF 及



C] 异

意义 (图 2B)。Nissl 染色结果 (图 3A) 表明: NGF 及 CT-1 干预组损伤脊髓神经元计数均高于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 前两组间差异无统计学意义 (图 3B)。

2.3 外源性 CT-1 干预对大鼠失神经营养肌肉的影响 脊髓损伤后, 大鼠肌肉因失神经营养作用, 表现为灰白、弹性差; 比较两组肌肉湿质量, 结果显示: 在损伤后 4 周、12 周时, CT-1 组肌肉湿质量、总蛋白含量均高于模型组 ($P < 0.05$), 1 周时差异无统计意义 (图 4)。

3 讨论

近年来, 随着我国经济的高速发展及基础设施的不断完善, 交通意外的发生不断提高, 脊髓损伤患者也逐年增加, 严重威胁国人健康和生命^[8]。目前临床上对脊髓损伤的治疗疗效均不理想, 是困扰医学界的难题之一^[9-11]。CT-1 在神经系统中是一种重要的调节因子, 可以促进交感神经元、运动神经元、感觉神经元的存活^[4]。不同分化程度的骨骼肌细胞来源的 CT-1 均可以支持脊髓运动神经元、多巴胺能神经元和睫状神经节神经元的长期存活^[12], CT-1 还能刺激体外培养的胎儿运动神经元的存活^[13]。在对小鼠特发性神经元疾病中也证实了 CT-1 对神经元的保护性作用^[14]。这些研究成果证实, CT-1 作为神经活性因子为脊髓损伤实验开展提供了良好的基础。CT-1 还可降低氧自由基诱导剂 $FeSO_4$ 和神经毒性物质 SIN-1 诱导的皮质神经元细胞的死亡^[15]。

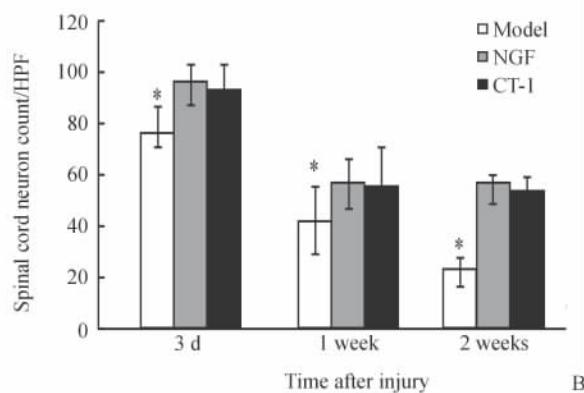


图 2 不同组别大鼠损伤脊髓神经元 H-E 染色 (A) 及神经元计数 (B)

Fig 2 H-E staining (A) and spinal cord neuron count (B) of damaged rat spinal cord in three groups at different time points

A: As time went by the number of neuron further decreased in model group and fibrosis was observed in the injured spinal tissues, but there was no significant difference between NGF and CT-1 group. Original magnification: $\times 200$. B: Spinal cord neuron count per high power field (HPF). * $P < 0.05$ vs NGF or CT-1 treatment group; $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

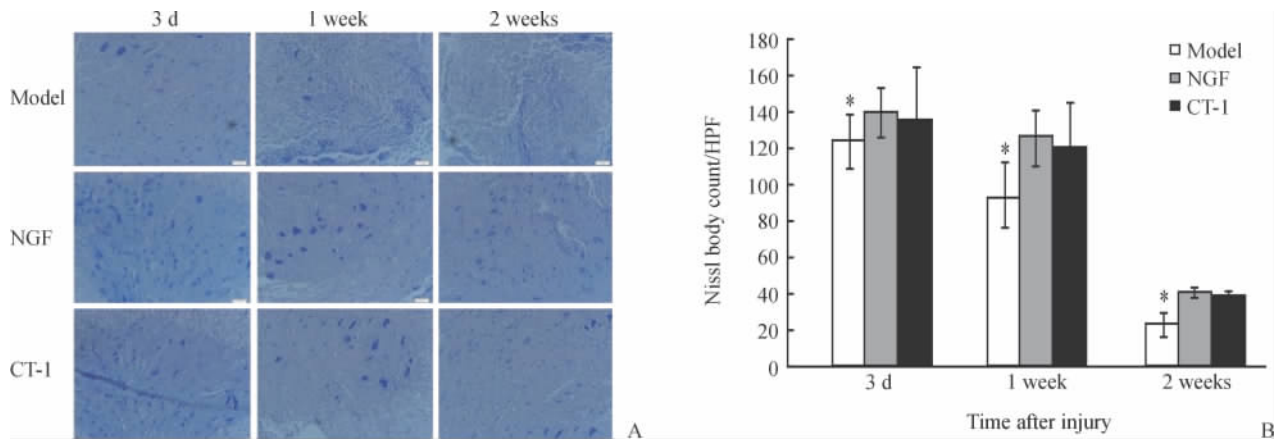


图3 不同组别大鼠损伤脊髓神经元 Nissl 染色(A)及尼氏体计数(B)

Fig 3 Nissl staining(A) and Nissl bodies count(B) of damaged rat spinal cord in three groups at different time points

A: Fibroblasts were increased in the model group 2 weeks after damaging. Original magnification: $\times 200$. B: Nissl body count per high power field (HPF). * $P < 0.05$ vs NGF or CT-1 treatment group; $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

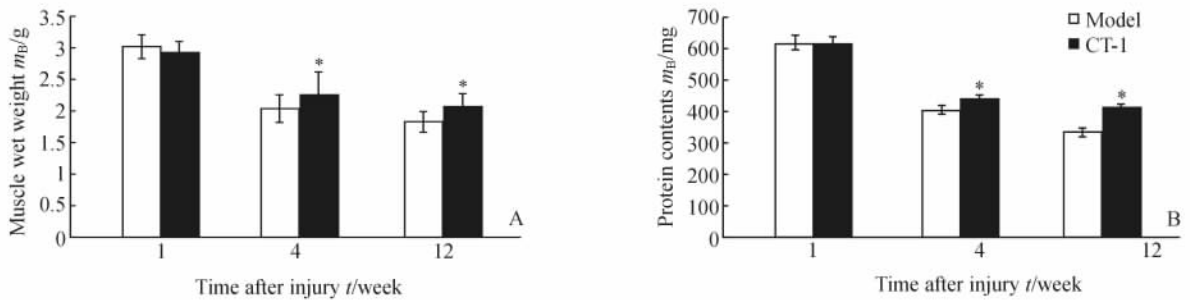


图4 脊髓损伤后不同组别大鼠小腿三头肌肌肉湿质量(A)及肌蛋白含量(B)的比较

Fig 4 Muscle wet weight(A) and the protein contents(B) of rat triceps of different groups at different time points after spinal cord injury

* $P < 0.05$ vs model group; $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

本研究结果表明:CT-1 干预组与 NGF 干预组神经元、尼氏体数量差异无统计学意义,均高于模型组;且随着时间的延长,两者保护效果更为显著。NGF 是传统的神经生长因子,对脊髓损伤后神经元结构重塑、功能恢复具有确切的疗效^[16]。本研究提示外源性 CT-1 对损伤脊髓神经元形态、数量等的保护作用已接近 NGF。CT-1 亦可促进髓鞘细胞的生长,为神经纤维的再生爬行提供了良好的内环境支撑^[17]。本研究的形态学观察结果表明 CT-1 在对抗损伤脊髓神经元死亡的作用上与传统神经生长因子大致相当。需要指出的是,通过观察切片发现,脊髓损伤 2 周后 CT-1 组神经元数量较损伤 3 d 仍有减少,提示继发性损伤因素仍然存在。相比模型组,CT-1 可以部分减缓这种损伤。既往研究表明复合使用不同种类神经营养因子可以有效提高去神经化肌肉质量^[18],而本研究结果表明损伤后 4 周、8 周时 CT-1 干预组肌肉湿质量高于模型组,初步推测其对于肌肉功能的支持保护作用同复合神经营养因子相

当。脊髓损伤后 CT-1 mRNA 表达出现一过性增高,继而出现持续性下降。此过程提示:正常脊髓组织中 CT-1 及其受体亚基表达相对恒定,脊髓损伤后,损伤部位充血水肿,并产生大量炎症介质,结合外周组织中被趋化的炎症介质,共同组成了 CT-1 的高峰;随着炎症反应减弱,CT-1 的表达出现降低。同时,其受体亚基 mRNA 表达相应上调,以增加对 CT-1 的敏感性,与既往研究类似^[19]。本实验结果显示,损伤后 48 h~6 d,CT-1 受体达高峰,故对脊髓损伤患者开展早期临床干预具有重要意义。当然,CT-1 受体在体内多个器官、组织存在,故对用药方式及治疗的安全剂量方面仍需进一步探讨^[20]。

综上所述,CT-1 对脊髓损伤后神经死亡进程起到了一定的减缓作用,为神经轴突的爬行重建提供了良好的环境,可能对脊髓功能的保护起到了一定的帮助作用,值得深入研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Pennica D, King K L, Shaw K J, Luis E, Rullamas J, Luoh S M, et al. Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 1142-1146.
- [2] Kanazawa H, Ieda M, Kimura K, Arai T, Kawaguchi-Manabe H, Matsushashi T, et al. Heart failure causes cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves via gp130-signaling cytokines in rodents [J]. J Clin Invest, 2010, 120: 408-421.
- [3] Jin H, Yang R, Keller G A, Ryan A, Ko A, Finkle D, et al. *In vivo* effects of cardiotrophin-1 [J]. Cytokine, 1996, 8: 920-926.
- [4] Habecker B A, Sachs H H, Rohrer H, Zigmund R E. The dependence on gp130 cytokines of axotomy induced neuropeptide expression in adult sympathetic neurons [J]. Dev Neurobiol, 2009, 69: 392-400.
- [5] Arce V, Garces A, de Bovis B, Filippi P, Henderson C, Pettmann B, et al. Cardiotrophin-1 requires LIFRbeta to promote survival of mouse motoneurons purified by a novel technique [J]. J Neurosci Res, 1999, 55: 119-126.
- [6] Latchman D S. Cardiotrophin-1: a novel cytokine and its effects in the heart and other tissues [J]. Pharmacol Ther, 2000, 85: 29-37.
- [7] Allen A. Surgery for experimental lesions of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: a preliminary report [J]. JAMA, 1911, 57: 878-880.
- [8] 李建军, 周红俊, 洪毅. 2002年北京市脊髓损伤发病率调查 [J]. 中国康复理论与实践, 2004, 10: 412-413.
- [9] Bamford J A, Mushahwar V K. Intraspinal microstimulation for the recovery of function following spinal cord injury [J]. Prog Brain Res, 2011, 194: 227-239.
- [10] Tate D G, Boninger M L, Jackson A B. Future directions for spinal cord injury research: recent developments and model systems contributions [J]. Arch Phys Med Rehabil, 2011, 92: 509-515.
- [11] Ito Z, Sakamoto K, Imagama S, Matsuyama Y, Zhang H, Hirano K, et al. N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1-deficient mice show better functional recovery after spinal cord injury [J]. J Neurosci, 2010, 30: 5937-5947.
- [12] Pennica D, Arce V, Swanson T A, Vejsada R, Pollock R A, Armanini M, et al. Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons [J]. Neuron, 1996, 17: 63-74.
- [13] Lesbordes J C, Cifuentes-Diaz C, Miroglia A, Joshi V, Bordet T, Kahn A, et al. Therapeutic benefits of cardiotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy [J]. Hum Mol Genet, 2003, 12: 1233-1239.
- [14] Mitsumoto H, Klinkosz B, Pioro E P, Tsuzaka K, Ishiyama T, O'Leary R M, et al. Effects of cardiotrophin-1 (CT-1) in a mouse motor neuron disease [J]. Muscle Nerve, 2001, 24: 769-777.
- [15] Wen T C, Rogido M R, Moore J E, Genetta T, Peng H, Sola A. Cardiotrophin-1 protects cortical neuronal cells against free radical-induced injuries *in vitro* [J]. Neurosci Lett, 2005, 387: 38-42.
- [16] Hollis E R 2nd, Tuszynski M H. Neurotrophins: potential therapeutic tools for the treatment of spinal cord injury [J]. Neurotherapeutics, 2011, 8: 694-703.
- [17] 辛泽团, 刘湘泽, 张明进, 李伟, 陈伯华, 马学晓. 外源性心脏营养素 1: 保护 PC12 细胞和许旺细胞的可能性 [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17: 7265-7271.
- [18] Chen J, Chu Y F, Chen J M, Li B C. Synergistic effects of NGF, CNTF and GDNF on functional recovery following sciatic nerve injury in rats [J]. Adv Med Sci, 2010, 55: 32-42.
- [19] 马学晓, 张高孟, 冯勇, 顾玉东, 顾建新. 心脏营养素-1对失神经骨骼肌的营养和保护作用 [J]. 中华手外科杂志, 2006, 22: 112-115.
- [20] Bordet T, Castelnau-Ptakhine L, Fauchereau F, Fricourt G, Kahn A, Haase G. Neuronal targeting of cardiotrophin-1 by coupling with tetanus toxin C fragment [J]. Mol Cell Neurosci, 2001, 17: 842-854.

[本文编辑] 贾泽军