

脊髓全横断模型大鼠损伤区白细胞介素17的表达

马超¹, 徐震², 王卓强², 邓诗源¹ (¹徐州医学院江苏省麻醉学重点实验室, 江苏省麻醉与镇痛应用技术重点实验室, 江苏省徐州市221000; ²解放军第309医院麻醉科, 北京市 100091)

文章亮点:

实验创新性地从行为学水平、细胞水平、基因水平、蛋白水平观察白细胞介素17表达与脊髓继发性炎症反应最强烈的时刻存在时间的一致性, 推断白细胞介素17可能参与了脊髓继发性炎症反应过程。

关键词:

实验动物; 组织构建; 脊髓损伤; 白细胞介素17; 炎症反应; SD大鼠; 国家自然科学基金

主题词:

脊髓损伤; 白细胞介素17; 炎症; 大鼠, Sprague-Dawley

基金资助:

国家自然科学基金(81101420)

摘要

背景: 现阶段, 针对已知的炎性递质的干预措施对于减轻脊髓继发损伤的效果局限。白细胞介素17是重要的促炎性细胞因子, 在中枢神经系统疾病发病机制中的作用正逐渐受到关注。

目的: 观察急性脊髓损伤模型大鼠白细胞介素17 mRNA和蛋白表达的变化规律。

方法: 健康雄性SD大鼠随机分为2组: 模型组制作大鼠脊髓完全横断模型, 假手术组仅剪开硬脊膜而不伤及脊髓实质。开放后测定肢运动功能评分观察急性脊髓损伤对大鼠运动功能的影响, 苏木精-伊红染色观察脊髓损伤后不同时间点组织病理学改变, 实时荧光定量PCR、Western blot分别检测各组大鼠脊髓损伤后不同时间点白细胞介素17 mRNA和蛋白水平表达变化。

结果与结论: 开放后肢运动功能评分结果: 假手术组大鼠BBB评分均为20-21分, 脊髓损伤1, 2 d大鼠BBB评分均为0分, 损伤后7 d BBB评分为0-3分($P < 0.05$)。苏木精-伊红染色结果: 与假手术组相比, 脊髓损伤6 h后, 炎性细胞浸润, 神经元和胶质细胞肿胀, 神经元突起减少; 脊髓损伤12 h后, 灰质、白质组织结构疏松、空泡化; 脊髓损伤后7 d, 胶质细胞增生, 组织纤维化明显。RT-qPCR结果显示: 白细胞介素17 mRNA于脊髓损伤后3 h出现, 并于6 h表达出现高峰($P < 0.01$), 随后表达减少, 7 d后表达接近假手术组水平。Western blot结果显示: 脊髓损伤6 h后, 白细胞介素17表达开始升高, 并于损伤后12 h出现高峰($P < 0.05$), 随后表达减少, 至伤后7 d表达接近假手术组水平。结果可见脊髓损伤12 h后组织损伤表现最严重, 并与白细胞介素17表达改变存在时间的一致性, 推断白细胞介素17可能参与了脊髓继发性炎症反应过程。

马超, 徐震, 王卓强, 邓诗源. 脊髓全横断模型大鼠损伤区白细胞介素17的表达[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(18):2824-2829.

Interleukin-17 expression in the injured site of a rat model of complete spinal cord transection

Ma Chao¹, Xu Zhen², Wang Zhuo-qiang², Deng Shi-yuan¹ (¹Key Laboratory of Anesthesiology, Xuzhou Medical College, Jiangsu Key Laboratory of Anesthesia and Analgesia Applied Technology, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China; ²Department of Anesthesiology, the 309 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China)

Abstract

BACKGROUND: Intervention using known inflammatory transmitters has limitations on relieving secondary spinal cord injury. Interleukin-17 is an important proinflammatory cytokine, and is gradually paid attention in the pathogenesis of central nervous system diseases.

OBJECTIVE: To investigate the altered rule of interleukin-17 mRNA and protein in a rat model of acute spinal cord injury.

METHODS: Healthy male Sprague-Dawley rats were randomly assigned to two groups. In the model group, rats were made into complete spinal cord transection models. In the sham surgery group, only spinal dura mater was opened, but parenchyma was not injured. Basso, Beattie, Bresnahan locomotor rating scale was used to observe the effects of acute spinal cord injury on limb motor function of rats. Hematoxylin-eosin staining was used to observe histopathological changes at various time points after spinal cord injury. Real-time fluorescence quantitative PCR and western blotting were used to detect interleukin-17 mRNA and protein levels in each group at various time points after spinal cord injury.

RESULTS AND CONCLUSION: Basso, Beattie, Bresnahan locomotor rating scale: Basso, Beattie, Bresnahan

马超, 女, 1987年生, 河北省保定市人, 汉族, 徐州医学院在读硕士, 主要从事重要脏器保护及其机制的研究。

通讯作者: 王卓强, 主任医师, 解放军第309医院麻醉科, 北京市 100091

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.18.007

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)18-02824-06

稿件接受: 2014-02-06

Ma Chao, Studying for master's degree, Key Laboratory of Anesthesiology, Xuzhou Medical College, Jiangsu Key Laboratory of Anesthesia and Analgesia Applied Technology, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Wang Zhuo-qiang, Chief physician, Department of Anesthesiology, the 309 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China

Accepted: 2014-02-06

scores were 20 to 21 in the sham surgery group. Basso, Beattie, Bresnahan scores were 0 at 1 and 2 days after spinal cord injury. At 7 days, Basso, Beattie, Bresnahan scores were 0 to 3 ($P < 0.05$). Hematoxylin-eosin staining results revealed that compared with the sham surgery group, inflammatory cell infiltration, neuronal and glial cell swelling, and a reduced number of neuronal processes were observed at 6 hours after spinal cord injury. Gray matter and white matter were loose and vacuolated at 12 hours. Gliocyte proliferation and tissue fibrosis were apparent at 7 days. Real-time PCR results demonstrated that interleukin-17 mRNA appeared at 3 hours, and peaked at 6 hours ($P < 0.01$), and then decreased. Interleukin-17 mRNA levels were similar to the sham surgery group at 7 days. Western blotting results revealed that interleukin-17 expression began to increase at 6 hours and peaked at 12 hours ($P < 0.05$), and then reduced, and reached the levels in the sham surgery group at 7 days. Results indicated that tissue injury was most severe at 12 hours, and showed a time consistency with interleukin-17 expression. It is inferred that interleukin-17 is possibly involved in the process of secondary inflammatory reaction of spinal cord.

Subject headings: spinal cord injuries; interleukin-17; inflammation; rats, Sprague-Dawley

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81101420

Ma C, Xu Z, Wang ZQ, Deng SY. Interleukin-17 expression in the injured site of a rat model of complete spinal cord transection. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(18):2824-2829.

0 引言 Introduction

脊髓损伤是常见的中枢神经系统损伤, 致残率高。其病理改变包括原发性和继发性损伤两个方面, 急性机械性损伤造成的椎骨折断或错位导致脊髓受到压迫、撞击或牵拉, 短时间内损伤中心发生不可逆转的原发性被动损伤, 如被膜破坏、脊髓水肿和出血性坏死等。而继发性损伤表现为强烈的炎症反应, 以细胞因子、趋化因子和炎性细胞浸润为特点, 导致神经细胞死亡、轴突脱髓鞘等, 使病变逐渐加重、范围持续扩大, 功能障碍的严重程度和范围也随之发展^[1]。而现研究阶段, 针对已知炎性递质的干预措施对于减轻脊髓继发损伤的效果十分局限。白细胞介素 17 是重要的促炎性细胞因子, 主要由 Th17 细胞分泌, 参与机体防御感染、介导慢性炎症、自身免疫性疾病等多个重要的病理生理过程。本研究通过苏木精-伊红染色, RT-qPCR, Western blot 技术检测脊髓完全横断大鼠不同时间点促炎性细胞因子白细胞介素 17 表达的变化, 探讨白细胞介素 17 与脊髓损伤的相关性。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于 2012 年 6 月至 2013 年 6 月在军事医学科学院毒物药物研究所完成。

材料:

白细胞介素 17 与脊髓损伤相关性实验所用主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
兔抗白细胞介素 17 单克隆抗体	R&D 公司
反转录试剂及 SYBR Premix Ex Taq II	TAKARA 公司
实时荧光定量 PCR 仪、电泳仪、半干电转膜仪和凝胶成像仪	美国 Bio-Rad 公司

实验动物: 健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 112 只, 体重 220-240 g, SPF 级, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。随机分为假手术组 14 只和模型组 98 只, 其中模型组按脊髓横断后不同时间点(1, 3, 6, 12, 24, 72 h,

7 d) 分为 7 组, 每组 14 只。

实验方法:

脊髓完全横断模型的制备: 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 俯卧位固定。以 T₁₀ 椎体为中心剪毛、消毒, 纵行切开背部皮肤, 钝性分离皮下组织和肌肉, 暴露 T₈₋₉ 棘突, 去除棘突及椎板至横突根部, 暴露 T₉₋₁₀ 节段脊髓, 纵行剪开硬脊膜后, 模型组以显微剪一次性完全横行剪断脊髓。假手术组仅剪开硬脊膜而不伤及脊髓实质。术毕逐层缝合肌肉、皮下组织和皮肤。术后大鼠正常饮食, 模型组每日早晚 2 次按摩膀胱以助排尿。

动物模型成功的判定标准: 横断后抬起脊髓两断端, 确认脊髓完全横断, 横断时大鼠出现摆尾反射, 双后肢及躯体回缩样扑动, 清醒后双后肢瘫痪, 双前肢运动功能正常。

开放后肢运动功能评分(BBB 评分)评价行为学改变: 术前评估各组大鼠后肢运动情况, 术后对假手术组和脊髓损伤 7 d 组大鼠进行 BBB 评分, 由 2 名熟悉 BBB 评分的非实验人员独立观察并记录所有大鼠后肢关节活动的数目和范围, 负重程度及前后肢协调性, 前后爪和尾部的活动情况。评分过程选择在晚上 20:00 进行, 时间为 4 min, 最后取均值。评分前检查大鼠有无膀胱充盈、会阴炎症、后肢外伤等, 避免因上述情况而影响评分。

苏木精-伊红染色观察组织病理学改变: 各组大鼠经 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 仰卧位固定于操作台上, 提起剑突下缘上腹部皮肤, 纵行切开胸前部皮肤直至锁骨上, 提起剑突一周沿胸骨前壁剪开膈肌, 沿胸骨旁线剪开胸壁固定, 剪开心包暴露心脏。从心尖部沿左心室插入灌注针至升主动脉入口, 剪开右心耳, 先用 4 °C 生理盐水 200 mL 快速冲洗组织内血液, 然后用 4 °C 40 g/L 多聚甲醛磷酸缓冲液(pH 7.4) 300 mL 冲洗灌注(先 100 mL 快速灌注, 然后 200 mL 缓慢灌注, 共约 1 h), 直至肝脏褪色变硬, 四肢、颈、尾僵硬。充分固定后, 取以损伤区为中心的 1 cm 脊髓, 40 g/L 多聚甲醛固定液后固定 2 h, 20% 蔗糖 4 °C 过夜。组织沉底后用冰冻切片机制连续矢状面切片, 片厚 15 μm,

隔五取一, 贴于明胶预处理的载玻片上。苏木精-伊红染色: 将预存的切片从 -20°C 冰箱取出, 具体染色步骤如下: ①二甲苯透明2次各10 min。②无水乙醇2次各5 min。③梯度乙醇使切片至水: 体积分数为95%乙醇3 min \times 2次, 体积分数为80%乙醇3 min \times 2次, 蒸馏水3 min。④苏木精染色15 min, 清水冲洗5 min。⑤1%盐酸乙醇分化数秒, 清水冲洗3 min。⑥体积分数为70%乙醇2 min, 体积分数为80%乙醇2 min。⑦伊红复染15 s, 自来水冲洗2 min。⑧体积分数为95%乙醇2 min \times 2次, 体积分数为100%乙醇2 min \times 2次。⑨二甲苯2 min \times 2次。⑩中性树胶封固, 通风处晾干。光学显微镜下观察脊髓损伤后局部组织病理变化。染色结果判定: 细胞核被苏木精染成蓝色, 胞质被伊红染成粉红色, 与蓝色的细胞核形成鲜明对比。

BBB评分具体评分标准如下:

后肢运动情况	得分
无可见后肢运动	0分
1或2个关节轻微运动, 通常为髻和/或膝关节	1分
1个关节广泛活动或1个关节广泛活动且有另1个关节轻微活动	2分
2个关节广泛活动	3分
后肢全部3个关节可轻微活动	4分
2个关节轻微活动, 第3个关节可广泛活动	5分
2个关节广泛活动, 第3个关节可轻微活动	6分
后肢全部3个关节可广泛活动	7分
非承重情况下可以爪掌面着地	8分
间或爪掌面承重支撑或爪背面承重移动, 无爪掌面支撑移动	9分
偶见爪掌面承重移动; 无前肢协调动作	10分
可较多的见到掌面承重移动, 但无前肢协调动作	11分
可较多的见到掌面承重移动, 偶见前后肢协调动作	12分
常见掌面承重移动, 可常见前后肢协调动作	13分
有持续性掌面承重移动和前后肢协调动作; 或出现常见的掌面移动, 持续型前后肢协调动作, 偶有爪背侧移动	14分
持续性掌面移动和持续性前后肢协调动作, 前肢前进过程中无或偶有抓地; 初接触时主动爪位置与身体平行	15分
步态中可见持续性掌面移动和持续性前后肢协调动作, 前肢前进过程中常见爪抓地; 初接触时主动爪位置与身体平行, 负重转移后旋转	16分
步态中可见持续性掌面移动和持续性前后肢协调动作, 前肢前进过程中常见爪抓地; 初接触时和负重转移后主动爪位置均与身体平行	17分
步态中可见持续性掌面移动和持续性前后肢协调动作, 前肢前进过程中可持续性爪抓地; 初接触时主动爪位置均与身体平行, 负重转移后旋转	18分
步态中可见持续性掌面移动和持续性前后肢协调动作, 前肢前进过程中可持续性爪抓地; 初接触时和负重转移后主动爪位置均与身体平行。尾巴有时或总是下垂	19分
持续性掌面移动, 持续性协调步态, 足趾持续抓地, 初接触时和负重转移后主动爪位置均与身体平行, 躯干不稳定, 尾巴持续翘起	20分
持续性掌面移动, 持续性协调步态, 足趾持续抓地, 活动过程中主动爪位置始终与身体平行, 躯干持续稳定, 尾巴持续翘起	21分

RT-qPCR检测急性脊髓损伤大鼠局部组织白细胞介素17 mRNA表达水平:

RNA抽提和反转录cDNA: 取以损伤区为中心1 cm的脊髓组织, Trizol法抽提总RNA, 紫外分光光度计检测吸光度 A_{260}/A_{280} , 并计算其纯度和浓度。

在1 μg 总RNA样本中加入gDNA Eraser 0.5 μL , 5 \times 缓冲液2 μL , 无RNase水至10 μL 。反应条件: 42°C 变性2 min, 以消除可能存在的gDNA。PrimeScript RT Enzyme 0.5 μL , Oligo dT 引物(50 $\mu\text{mol/L}$)0.5 μL , 随机引物(100 $\mu\text{mol/L}$)0.5 μL , 5 \times 缓冲液2 μL , 已去除gDNA的RNA10 μL , 无RNase水至20 μL 。反应条件: 37°C 15 min, 85°C 5 s。反应产物置于 -20°C 冰箱长期保存。

实时荧光定量RT-PCR: 根据白细胞介素17和 β -actin基因在GenBank的序列, 经Primer Express3.0软件设计引物(表1), 并由Invitrogen公司合成。应用 SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa)实时荧光定量PCR试剂盒, 以5倍稀释5个浓度梯度的cDNA样本, 分别建立白细胞介素17和 β -actin基因扩增的标准曲线, 确定它们的扩增效率。反应体系25 μL 包括: SYBR Ex Taq 12.5 μL , 上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)0.5 μL , 下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)0.5 μL , cDNA (10 $\mu\text{mol/L}$)0.5 μL , ddH₂O 11 μL 。扩增条件: 95°C 预变性3 min, 95°C 变性30 s, 60°C 退火30 s, 72°C 延伸30 s, 40个循环, 每次循环结束后采集荧光。为确定扩增反应的特异性, 循环结束后进行熔解曲线的分析, 条件如下: $65\text{--}95^{\circ}\text{C}$, 每5 s上升 0.5°C 。每组样品设定无cDNA模板反应孔为阴性对照, 每个样本进行3次重复, 重复间允许差异小于0.5 Ct。用BioRad ManagerTM软件测定每个样本的相对拷贝数。

表1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of real-time fluorescence quantitative PCR

基因	引物序列	引物长度
白细胞介素17	F: 5'-GGA GGA TAA CAG TGT AGA GAG-3'	126 bp
	R: 5'-ATT TCT TGC TGG ATG GGA C-3'	
β -actin	F: 5'-GGG AAA TCG TGC GTG ACA TT-3'	76 bp
	R: 5'-GCG GCA GTG GCC ATC TC-3'	

Western blot法检测急性脊髓损伤大鼠局部组织白细胞介素17蛋白表达水平: 取各时间点以损伤区为中心1 cm的脊髓组织, 加入蛋白裂解液1 mL, 制备组织蛋白匀浆液, BCA法蛋白定量后按每孔40 μg 蛋白加样, SDS-PAGE(分离胶15%, 浓缩胶5%)电泳分离后, 利用半干法将蛋白转移至PVDF膜上。5%脱脂奶粉室温封闭3 h。加入5%脱脂奶粉稀释的一抗, 分别为兔抗白细胞介素17单克隆抗体(1:250), 内参小鼠抗 β -肌动蛋白抗体(1:1000), 4°C 孵育过夜。次日用Tris缓冲液-吐温-20溶液(TBST)洗去多余的一抗。加入TBST稀释的HRP标记的山羊抗兔/小鼠二抗(1:2000), 室温振摇孵育1 h。用TBST洗去多余的二抗, 加入ECL发光液, 暗室中曝光。凝胶图像分析其积分吸光度

值, 白细胞介素17的相对表达量用 β -肌动蛋白的表达量校正, 即目的蛋白相对表达量= $IA_{\text{白细胞介素17}}/IA_{\beta\text{-肌动蛋白}}$ 。

主要观察指标: ①脊髓损伤大鼠后肢运动功能恢复情况。②脊髓损伤大鼠局部组织病理改变。③脊髓损伤大鼠局部组织白细胞介素17 mRNA表达水平。④脊髓损伤大鼠局部组织白细胞介素17蛋白表达水平。

统计学分析: 实验结果数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用SPSS 16.0统计学软件进行处理。组间比较采用单因素方差分析。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 由于实验取损伤区为中心1 cm的脊髓组织, 组织质量不足以同时进行实时荧光定量PCR与Western blot, 因此实时荧光定量PCR进入结果分析数量每组8只, Western blot进入结果分析数量每组6只。

2.2 BBB评分评价大鼠脊髓损伤后后肢运动功能变化 所有大鼠术前BBB评分均为21分, 脊髓损伤后7 d组大鼠均出现了典型的截瘫综合征, 表现为双后肢完全瘫痪, 腹部贴地, 尾部无明显活动, 伴有尿潴留、血尿等症状。损伤后1, 2 d大鼠BBB评分均为0分, 大鼠双后肢呈拖行, 足背着地, 5 d后部分大鼠后肢运动功能开始恢复, 膝或髋关节有轻微活动, BBB评分为0-2分; 损伤后7 d, 大鼠后肢1或2个关节可有广泛活动, 但仍拖行, 足背着地, BBB评分为0-3分($P < 0.05$, 图1)。

2.3 脊髓损伤大鼠局部组织病理改变 损伤区为中心1 cm的脊髓组织苏木精-伊红染色结果: 假手术组神经细胞体呈球形、锥形、梭形或星形, 细胞形态规则, 核大而圆, 核异染质少, 着色浅(图2A)。脊髓损伤组神经细胞肿大、空泡化、细胞核浓缩、崩解, 主要结构消失。脊髓损伤后1 h, 损伤区以灰质出血为主, 神经元和胶质细胞未见明显改变。脊髓损伤6 h后, 出现一些炎性细胞, 以中性粒细胞为主, 神经元和胶质细胞肿胀, 神经元突起减少(图2B)。脊髓损伤12 h后, 灰质白质组织结构疏松、空泡化, 神经元水肿进一步加剧(图2C)。脊髓损伤后7 d, 继发损伤区组织损伤程度较破坏前明显加重, 灰、白质结构破坏, 细胞凋亡现象逐渐减少, 胶质细胞增生, 组织纤维化明显(图2D)。

2.4 脊髓损伤大鼠局部组织白细胞介素17 mRNA表达水平 采用实时荧光定量PCR技术, 检测脊髓损伤大鼠不同时间点白细胞介素17表达变化: 假手术组为 0.26 ± 0.25 , 脊髓损伤后1 h组为 0.60 ± 0.70 , 脊髓损伤后3 h组为 0.28 ± 0.17 , 脊髓损伤后6 h组为 1.78 ± 1.26 , 脊髓损伤后12 h组为 0.61 ± 0.48 , 脊髓损伤后24 h组为 0.60 ± 0.32 , 脊髓损伤后72 h组为 0.64 ± 0.35 , 脊髓损伤后7 d组为 0.29 ± 0.17 。结果表明, 与假手术组相比, 脊髓损伤后6 h组白细胞介素17 mRNA水平表达显著升高($P < 0.01$), 12 h后降低, 7 d后表达接近假手术组水平。

2.5 脊髓损伤大鼠局部组织白细胞介素17蛋白表达水平 图3结果显示, 脊髓损伤6 h后, 白细胞介素17表达开始升高, 并于损伤后12 h表达出现高峰($P < 0.05$), 24 h后表达逐渐减少, 至伤后7 d表达接近假手术组水平。在其他时间点, 白细胞介素17蛋白表达与假手术组无明显差异。

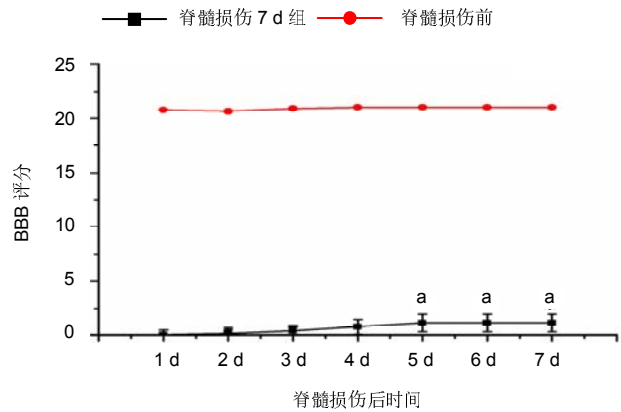


图1 BBB评分评价大鼠脊髓损伤后后肢运动功能变化
Figure 1 Basso, Beattie, Bresnahan locomotor rating scale for evaluation of the changes in hind limb motor function in rats with spinal cord injury

图注: 与脊髓损伤前相比, $^aP < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

脊髓损伤涉及损伤即刻的原发性损伤和后续的继发性损伤^[2]。原发性损伤是指受伤时脊柱骨折移位、脱位而造成的脊髓受压、冲击、挫裂及剪切伤, 是在受伤的一瞬间因外力产生的不可逆损伤, 如血脊髓撕裂、血屏障破坏、脊髓水肿和出血性坏死等^[3]。本实验采用脊髓完全横断模型, 具有良好的重复性和可控性, 能模拟临床脊髓损伤的病理生理改变。实验中大鼠脊髓横断所致的原发损伤导致大鼠出现后肢瘫痪及尿潴留现象, BBB评分均为0分, 考虑是皮质下行传递运动指令的皮质脊髓束的离断, 损伤节段脊髓前角运动神经元的坏死, 以及因脊髓神经元兴奋性暂时地降低, 而进入无反应状态的脊髓休克现象。致使脊髓横断平面以下双侧肢体感觉、运动、反射以及膀胱、肛门括约肌功能丧失。脊髓继发性损伤是在原发性损伤的基础上, 损伤局部发生的复杂的病理生理改变, 包括缺血缺氧、兴奋性氨基酸毒性、自由基生成、蛋白酶释放、中枢神经系统小胶质细胞活化以及周围巨噬细胞浸润导致的炎症反应等^[4]。局部出血坏死引起小胶质细胞、巨噬细胞等吞噬、清除组织碎片, 释放大量具有调节作用的炎症细胞因子, 包括白细胞介素1 β 、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 和集落刺激因子等, 启动一系列细胞和分子水平的级联反应, 进而导致神经细胞凋亡、轴突脱髓鞘等继发性损伤。苏木精-伊红染色切片显示: 脊髓损伤3 h后, 继发性炎症反应明显, 出现中性粒细胞浸润, 神经元和胶质细胞肿胀, 神经元突起减少; 12 h后, 灰质、白质组织结构疏松、空泡化, 炎性细胞浸润明显, 病变范围扩大。脊髓损伤后7 d, 细胞凋

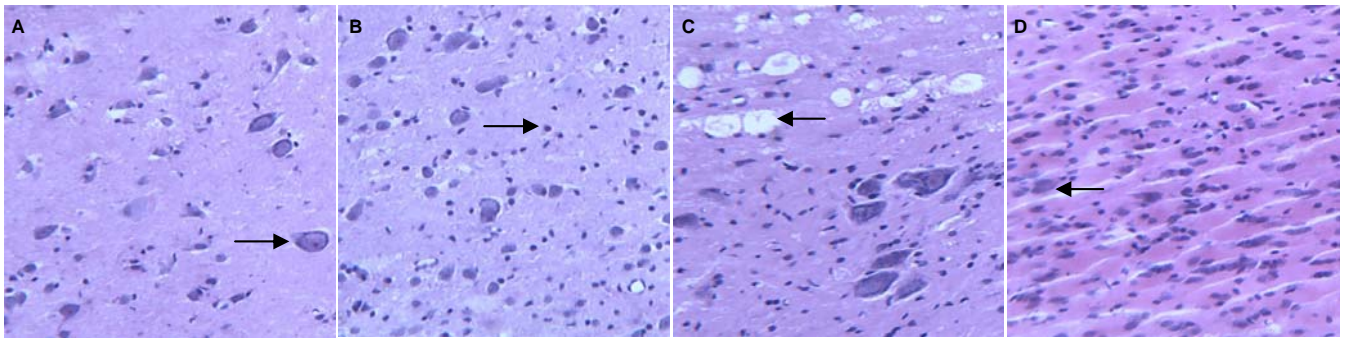


图2 脊髓损伤后不同时间点脊髓组织病理改变(苏木精-伊红染色, $\times 100$)

Figure 2 Pathological changes of the spinal cord at different time points after spinal cord injury (hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)

图注: 图中 A 为假手术组(箭头所示神经元呈梭形, 细胞形态规则, 核大而圆); B 为脊髓损伤后 6 h 组(箭头所示为浸润的中性粒细胞); C 为脊髓损伤后 12 h 组(箭头所示细胞空泡样变性); D 为脊髓损伤后 7 d 组(箭头所示细胞纤维化)。

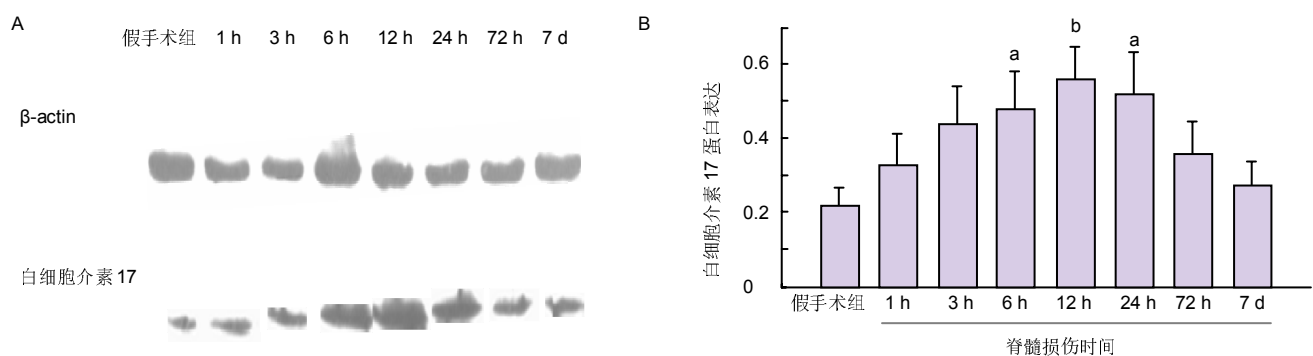


图3 脊髓损伤后不同时间点白细胞介素 17 蛋白表达水平

Figure 3 Expression of interleukin-17 protein at different time points after spinal cord injury

图注: 图中 A 为各时间点白细胞介素 17 和 β -肌动蛋白的蛋白条带, B 为各时间点白细胞介素 17 相对 β -肌动蛋白的表达量。n=6, 与假手术组比较, ^aP < 0.05, ^bP < 0.01。

亡现象减少, 星形胶质细胞增生, 组织纤维化明显, 继发性炎症反应明显减轻。大鼠 BBB 评分于损伤后 7 d 轻微回升, 大鼠出现后肢一或两个关节的广泛活动, 可能是损伤后 7 d 继发性炎症反应减轻, 促炎性细胞因子表达减少, 损伤进入修复阶段; 部分脊髓离断不完全, 残留了少量的皮质脊髓束, 当渡过脊髓休克期后, 这部分束支恢复了传递大脑指令的功能。目前还缺乏有效的治疗手段, 许多新的治疗方法如低温、干细胞移植等还处在基础研究和探索阶段^[5-6]。因此, 亟需对脊髓损伤后早期的继发性损伤的机制进行深入研究, 了解免疫炎症反应的始动或关键调节因素, 全面阐述细胞因子、趋化因子和损伤区周围白细胞浸润为特点的炎症反应引起神经元坏死或凋亡的确切机制, 进而寻找通过免疫学干预, 改善中枢神经系统损伤修复的切入点。

白细胞介素 17 是 1993 年在啮齿动物的克隆 T 细胞中发现的促炎性细胞因子, 是含有 155 个氨基酸的糖蛋白。原始 T 细胞在白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、转化生长因子 β 和白细胞介素 23 存在的条件下分化为 Th17 细胞, 进而分泌白细胞介素 17, 是白细胞介素 17 的主要来源。白细胞介素 17 家族在人类和小鼠中至少存在 6 个家族成员(白细胞介素 17A-F), 均为白细胞介素 17 的同源性分子, 与白细胞介素

17 有相同或相近的生物学效应。白细胞介素 17 受体表达于包括上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、神经元和骨髓细胞等在内的几乎所有细胞^[7]。当白细胞介素 17 与其受体结合后, 主要通过 SEFIR (SEFs and IL-17Rs) 结构域募集细胞内的 ACT1 (NF- κ B activator 1), 随后, ACT1 通过其自身的 TRAF 结合位点募集 TRAF6 到达白细胞介素 17 受体复合物, 激活 NF- κ B, 进而调控基因转录, 促进白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 、趋化因子、黏附分子和集落刺激因子等的表达, 引发细胞、分子水平的炎症级联反应^[8]。白细胞介素 17 复合物也能通过 MAPK 信号通路转导信号, 其中最主要的是细胞外调节蛋白激酶、c-Jun 氨基末端激酶和 P38 通路^[9]; 还可以通过 JAK/STAT 途径转导信号, 调节基因表达^[10]。白细胞介素 17 通过与其受体特异性结合参与机体防御胞外菌感染、抗寄生虫免疫、介导慢性炎症、器官移植免疫排斥、自身免疫疾病和肿瘤发病等多个重要的病理生理进程, 尤其在自身免疫性疾病如多发性硬化、类风湿性关节炎的发病机制研究中, 白细胞介素 17 的作用受到广泛关注^[11-13]。

本实验采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 技术, 对脊髓损伤大鼠不同时间点白细胞介素 17 mRNA 和蛋白表达变化进行检测。结果表明, 与假手术组相比, 脊髓损

伤后6 h, 白细胞介素17 mRNA水平显著升高($P < 0.01$), 并达到高峰, 随后降低, 并于7 d后接近假手术组水平。脊髓损伤6 h后, 白细胞介素17蛋白表达开始升高, 并于损伤后12 h表达出现高峰($P < 0.01$), 24 h后表达逐渐减少, 至伤后7 d表达接近假手术组水平。其他时间点, 白细胞介素17蛋白表达与假手术组无明显统计学差异。Hill等^[14]研究发现, 在遭受相同程度脊髓损伤的情况下, 白细胞介素17基因敲除小鼠, 损伤区的面积明显缩小, B细胞、树突状细胞以及中性粒细胞在脊髓内的募集也有所减少。Ho等^[15]也证实, 适当调节白细胞介素17信号轴有助于脊髓损伤后运动功能恢复, 而异常调节可能会加重脊髓继发性损伤。上述观点与本实验结果相符, 本实验结果显示白细胞介素17表达高峰与脊髓早期继发性炎症反应最强烈的时刻存在时间的一致性, 提示其可能通过与其受体结合, 在脊髓继发性损伤中发挥调节作用。

综上所述, 白细胞介素17可能通过与其受体结合激活NF- κ B, 引起脊髓损伤后细胞、分子水平的炎症级联反应, 加重神经系统的损伤。然而, 从白细胞介素17生成的上游阻止Th17细胞分化和增殖, 可能对患者的免疫系统造成损害, 因为Th17细胞不仅分泌白细胞介素17, 还分泌白细胞介素22、白细胞介素21等, 二者是宿主抗感染免疫的关键因子^[16]。鉴于通过上游干预白细胞介素17生成的风险, 可以考虑靶向干预白细胞介素17与其受体结合, 抑制白细胞介素17下游的信号转导, 进而减少白细胞介素1 β 、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 等的表达, 减弱脊髓损伤后的继发性炎症反应。因此, 可以通过尝试干预白细胞介素17上游或下游的信号转导, 探寻减弱脊髓继发性损伤的新方法和新思路。

致谢: 感谢骆媛老师在课题研究过程中的悉心指导。感谢王永安主任、李万华老师、杨军老师提供良好的研究条件。

作者贡献: 实验设计为徐震、王卓强, 实验实施为马超、邓诗源, 实验评估为徐震, 资料收集为徐震、马超。马超成文, 徐震、王卓强审校, 马超、王卓强对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 白细胞介素17-是重要的促炎性细胞因子, 主要由Th17细胞分泌, 参与机体防御感染、介导慢性炎症、自身免疫性疾病等多个重要的病理生理过程。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Chen A, Springer JE. Neuroproteomic methods in spinal cord injury. *Methods Mol Biol.* 2009;566:57-67.
- [2] Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, et al. Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clin Neuropharmacol.* 2001;24(5): 254-64.
- [3] Alexander JK, Popovich PG. Neuroinflammation in spinal cord injury: therapeutic targets for neuroprotection and regeneration. *Prog Brain Res.* 2009;175:125-137.
- [4] Oyhbo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Act Neurobiol Exp.* 2011;71(2):281-299.
- [5] Tang XN, Yenari MA. Hypothermia as a cytoprotective strategy in ischemic tissue injury. *Ageing Res Rev.* 2010;9(1):61-68.
- [6] Sinha AC, Cheung AT. Spinal cord protection and thoracic aortic surgery. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2010;23(1):95-102.
- [7] Hartupee J, Liu C, Novotny M, et al. IL-17 enhances chemokine gene expression through mRNA stabilization. *J Immunol.* 2007;179:4135-4141.
- [8] Tzartos MA, Friese MJ, Craner MJ, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Pathol.* 2008;172:146-155.
- [9] Roussel L, Houle F, Chan C, et al. IL-17 promotes p38MAPK-dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. *J Immunol.* 2010;184(8):4531-4537.
- [10] Meyer DM, Jesson MI, Li X, et al. Anti-inflammatory activity and neutrophil reductions mediated by the JAK1/JAK3 inhibitor, CP-690,550, in rat adjuvant-induced arthritis. *J Inflamm (Lond).* 2010;11(7):41-46.
- [11] van den Berg WB, Miossec P. IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2009;5(10):549-553.
- [12] Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, et al. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol.* 2010;162(1):1-11.
- [13] Huang F, Kao CY, Wachi S, et al. Requirement for both JAK-mediated PI3K signaling and ACT1/TRAF6/TAK1-dependent NF- κ B activation by IL-17A in enhancing cytokine expression in human airway epithelial cells. *J Immunol.* 2007;179(10): 6504-6513.
- [14] Hill F, Kim CF, Gorrie CA, et al. Interleukin-17 deficiency improves locomotor recovery and tissue sparing after spinal cord contusion injury in mice. *Neurosci Lett.* 2011;487(3): 363-367.
- [15] Ho AW, Gaffen SL. IL-17RC: a partner in IL-17 signaling and beyond. *Semin Immunopathol.* 2010;32(1):33-42.
- [16] Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. 2012,11(10):763-776.