

. 实验研究 .

Necrostatin-1 在 小 鼠 脊 髓 损 伤 后 继 发 性 损 伤 中 的 作 用

刘 明 杭 春 华 蔡 智 基 刘 美 秋 李 松 吴 光 辉

【摘要】目的 探讨 Necrostatin-1(Nec-1)在小鼠脊髓损伤后继发性损伤中的作用及机制。方法 将 168 只健康成年雌性 LCR 小鼠随机分为 4 组:对照组(48 只)、脊髓损伤组(48 只)、溶剂组(36 只,鞘内注射 4 μl 二甲基亚砜)和治疗组[36 只,鞘内注射 4 μl Nec-1(4 mmol/L)]。采用血管夹钳夹小鼠脊髓建立脊髓损伤模型。伤后 6、12、24、48 h 采用免疫印迹法检测脊髓组织受体相互作用蛋白(RIP)1、3 的表达;伤后 24 h 采用免疫共沉淀法评估 RIP1 和 RIP3 的相互作用;伤后 24 h 检测脊髓组织丙二醛(MDA)和活性氧簇(ROS)水平,电镜观察小鼠脊髓组织神经元线粒体损伤情况。结果 伤后 48 h 内,小鼠脊髓 RIP1 表达水平无明显变化;伤后 6 h,小鼠脊髓 RIP3 表达水平明显增高,持续到伤后 48 h。伤后 24 h,治疗组和溶剂组 RIP1 和 RIP3 的表达水平均无明显差异;正常脊髓组织 RIP1 和 RIP3 相互作用较弱,脊髓损伤后 RIP1 和 RIP3 相互作用加强,而 Nec-1 显著抑制 RIP1 和 RIP3 相互作用。伤后 24 h,脊髓神经元线粒体不同程度受损,而治疗组小鼠脊髓神经元线粒体结构保存相对较好。伤后 24 h,脊髓组织 MDA 和 ROS 含量明显升高,而 Nec-1 能明显减少小鼠脊髓 MDA 和 ROS 含量。结论 小鼠脊髓损伤后,Nec-1 通过抑制 RIP1 和 RIP3 的相互作用,进而抑制程序性坏死,减轻脊髓继发性损伤。Nec-1 能降低 ROS 产物,减轻氧化应激损伤,保护线粒体功能。

【关键词】脊髓损伤;受体相互作用蛋白;活性氧簇;线粒体;Necrostatin-1;成年小鼠

【文章编号】1009-153X(2018)06-0419-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 641

Role of Necrostatin-1 in secondary injury after spinal cord injury in adult mice

LIU Ming<sup>1</sup>, HANG Chun-hua<sup>2</sup>, CAI Zhi-ji<sup>1</sup>, LIU Mei-qiu<sup>1</sup>, LI Song<sup>2</sup>, WU Guang-hui<sup>1</sup>. 1. Department of Neurosurgery, Ningde Municipal Hospital, Ningde 352100, China; 2. Department of Neurosurgery, Nanjing General Hospital, PLA, Nanjing 210002, China

【Abstract】Objective To study the role of Necrostatin-1 (Nec-1) in secondary injury after spinal cord injury (SCI) in adult mice. Methods One hundred and sixty-eight female adult ICR mice were randomized divided into four groups, i.e. control group (n=48) and SCI group (n=48), vehicle group (n=36, intrathecal injection of 4 μl dimethyl sulfoxide) and treatment group (n=36, intrathecal injection of 4 μl Nec-1 with a concentration of 4 mmol/L). The SCI model was established by clamping the spinal cord with a vascular clamp. The expressions of receptor interaction protein (RIP)1 and RIP3 in the spinal cord tissues were determined by western blot 6, 12, 24 and 48 hours after SCI. The interaction of RIP1 and RIP3 was determined by immunoprecipitation 24 hours after SCI. The levels of malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) in the spinal cord tissues was assessed. The ultrastructure of neuronal mitochondria in the spinal cord was observed by electron microscope 24 hours after SCI. Results Within 48 hours after SCI, there was no significant change in the expression of RIP1. Six hours after SCI, the expression of RIP3 increased significantly and continued until 48 hours after SCI. At 24 hours after SCI, the expression levels of RIP1 and RIP3 were not significantly different between the treatment and solvent groups. The interaction between RIP1 and RIP3 in the normal spinal cord tissue was weak, and was enhanced after SCI. Nec-1 significantly inhibited the interaction between RIP1 and RIP3. Twenty-four hours after SCI, the mitochondria of spinal cord neurons were damaged to certain degree, while the mitochondrial structure of spinal cord neurons in the treated group was preserved relatively well. At 24 h after SCI, the levels of MDA and ROS in spinal cord tissues increased significantly, while Nec-1 significantly decreased the levels of MDA and ROS. Conclusions Nec-1 reduces secondary injury by inhibiting the interaction between RIP1 and RIP3 and programmed necrosis after SCI in mice. Nec-1 can reduce ROS production, reduce oxidative stress and protect mitochondrial function.

【Key words】Spinal cord injury; Necrostatin-1; Receptor interaction protein; Secondary injury; Mice

脊髓损伤常导致永久神经功能缺损,严重影响病人生活质量<sup>[1]</sup>。目前,临床上仍缺乏有效的治疗方法<sup>[2,3]</sup>。我们之前研究发现程序性坏死参与小鼠脊髓损伤后神经细胞死亡的过程,并且通过 Necrostatin-1(Nec-1)抑制程序性坏死可促进成年小鼠脊髓损伤后运动功能恢复<sup>[4]</sup>。但程序性坏死在小鼠脊髓损伤模型中通过何种途径执行,其特异性

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2018.06.012  
基金项目:福建省卫生计生委青年科研课题  
作者单位:352100 福建宁德,福建医科大学附属宁德市医院神经外科(刘 明、蔡智基、刘美秋、吴光辉);210002,南京,中国人民解放军南京总医院神经外科(杭春华、李 松)

抑制剂 Nec-1 是通过何种方式发挥作用尚不清楚。本研究探讨 Nec-1 在小鼠脊髓损伤后神经细胞程序性坏死中的作用及机制。

## 1 材料和方法

**1.1 实验动物及分组** 将 168 只健康成年雌性 LCR 小鼠(体重 25~30 g, 由原南京军区南京总医院比较医学科提供)按随机数字表法将小鼠随机分为 4 组: ①对照组, 48 只, 切除椎板, 充分暴露硬脊膜, 不钳夹脊髓; ②脊髓损伤组, 48 只, 采用血管夹钳夹小鼠脊髓建立脊髓损伤模型; ③溶剂组, 36 只, 采用血管夹钳夹小鼠脊髓后, 鞘内注射二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO); ④治疗组, 36 只, 采用血管夹钳夹小鼠脊髓后, 鞘内注射 Nec-1。

**1.2 小鼠脊髓损伤模型的建立和给药** 采用血管夹钳夹小鼠脊髓建立脊髓损伤模型<sup>[5]</sup>。戊巴比妥(50 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 取背部正中长约 2.5 cm 切口, 在手术显微镜下充分暴露胸<sub>8-10</sub>椎体。小心咬除胸椎椎板, 用血管夹(10 g)硬膜外钳夹脊髓 1 min 后移除。5 min 后在脊髓损伤处, 用 33gauge 微量注射器刺入硬膜下 1 mm 后, 给予 4  $\mu$ l Nec-1(4 mmol/L)或 4  $\mu$ l DMSO, 持续约 5 min。

**1.3 取材** 相应时间点腹腔注射戊巴比妥深度麻醉小鼠后, 以预冷 4  $^{\circ}$ C 无菌生理盐水灌注至肝脏发白及右心耳流出液无色透明液体后, 冰上小心取出胸<sub>8-10</sub>段脊髓(即以损伤部位为中心长约 15 mm); 每组 6 只用于丙二醛(malonaldehyde, MDA)和活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)检测, 其余小鼠脊髓组织于 -80  $^{\circ}$ C 保存, 用于蛋白免疫印迹分析。

**1.4 蛋白印迹法检测受体相互作用蛋白** (receptor-interacting protein, RIP) 1、3 蛋白表达 脊髓组织标本加入适量裂解液后充分匀浆至完全裂解, 15 000 转/min 离心 10 min, 取上清定量, 10% SDS-PAGE 电泳分离, 湿转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 加入 RIP1 和 RIP3 抗体后 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 充分洗脱, 二抗孵育 2 h, 经曝光、显影及定影后, 结果用 Image J 图像分析软件分析。

**1.5 蛋白免疫共沉淀** 按照试剂盒说明书步骤将 50  $\mu$ g RIP 或 IgG 抗体与加强型 AminoLink 偶联树脂结合, 进行抗体固化。然后将脊髓组织蛋白裂解液用对照琼脂糖树脂预处理后加入到固定的抗体中进行免疫共沉淀。然后洗脱缓冲液将目标蛋白溶解下来, 离心并收集过柱液按前面提到的方法进一步行免疫印迹分析。

**1.6 电镜观察** 脊髓损伤后 24 h, 每组取 3 只小鼠麻醉后, 以预冷 4  $^{\circ}$ C 无菌生理盐水灌注至肝脏发白及右心耳流出液无色透明液体后, 再用 3% 戊二醛灌注固定后, 小心取出胸<sub>8-10</sub>段脊髓 3% 戊二醛后固定。然后依次用 3% 戊二醛、1% 锇酸固定, 并按常规经过脱水、浸透、Epon816 包埋, 用 LKB2V 型超薄切片机切片, 制备成铜网经醋酸铀和硝酸铅染色, 用日本生产 JEM1200 型透射电镜观察和照相。

**1.7 MDA 测定** 取 24 h 新鲜小鼠髓组织, 称重后按 1:9 比例加入生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆后, 2 500 转/min 离心 10 min, 取上清匀浆按 MDA 试剂盒说明书进行检测。

**1.8 ROS 测定** 取脊 24 h 新鲜小鼠髓组织剪碎后, 0.25% 胰酶 37  $^{\circ}$ C 消化 15 min, 过滤后收集单细胞悬液, 1 000 转/min 离心 10 min, 留细胞沉淀, PBS 清洗细胞 3 次, 收集细胞沉淀。用缓冲液重悬细胞, 直接加入 DCFH-DA, CO<sub>2</sub> 培养箱 37  $^{\circ}$ C 孵育细胞 60 min。洗涤细胞 3 次, 用缓冲液再次重悬细胞, 用流式细胞仪测定(激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm)。

**1.9 统计学分析** 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 定量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验和单因素方差分析; *P* < 0.05 具有统计学差异。

## 2 结果

**2.1 脊髓损伤后脊髓组织 RIP1 和 RIP3 表达变化** 伤后 48 h 内, 小鼠脊髓 RIP1 表达水平无明显变化(图 1)。伤后 6 h, 小鼠脊髓 RIP3 表达水平明显增高, 持续到伤后 48 h(图 2)。

**2.2 Nec-1 对小鼠脊髓损伤后 RIP1 和 RIP3 表达的影响** 免疫印迹法分析显示, 脊髓损伤后 24 h, 治疗组和溶剂组 RIP1 和 RIP3 的表达水平均无明显差异(图 3、4), 即 Nec-1 不直接影响脊髓损伤后脊髓组织 RIP1 和 RIP3 表达。进一步通过免疫共沉淀法分析脊髓损伤后 24 h RIP1 和 RIP3 相互作用, 结果发现正常脊髓组织 RIP1 和 RIP3 相互作用较弱, 脊髓损伤后 RIP1 和 RIP3 相互作用加强, 而 Nec-1 显著抑制 RIP1 和 RIP3 相互作用(图 5)。

**2.3 Nec-1 对脊髓损伤后脊髓神经元线粒体超微结构的影响** 电镜下观察到线粒体内嵴肿胀、内外膜分离或基本结构明显改变等情况之一, 则被认定为受损线粒体。小鼠脊髓损伤后 24 h, 脊髓神经元线粒体不同程度受损, 而治疗组小鼠脊髓神经元线粒体结构保存相对较好(图 6)。

**2.4 Nec-1 对小鼠脊髓损伤后脊髓组织 MDA 和 ROS**

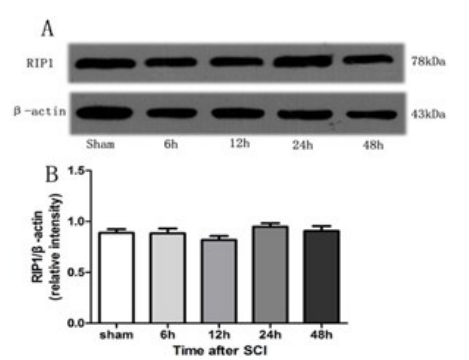


图1 小鼠脊髓损伤后脊髓组织RIP1表达变化  
SCI. 脊髓损伤; RIP1. 受体相互作用蛋白1

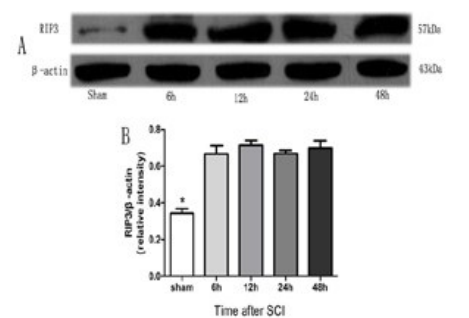


图2 小鼠脊髓损伤后脊髓组织RIP3表达变化  
与假手术组相应比值\*  $P<0.05$ ; SCI. 脊髓损伤;  
RIP3. 受体相互作用蛋白3

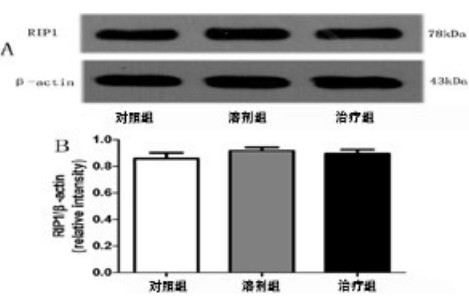


图3 Nec-1对小鼠脊髓损伤后24 h脊髓组织  
RIP1表达的影响

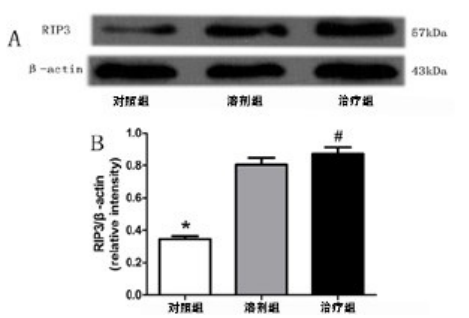


图4 Nec-1对小鼠脊髓损伤后24 h脊髓组  
织RIP3表达的影响  
与对照组相比, \*  $P<0.05$

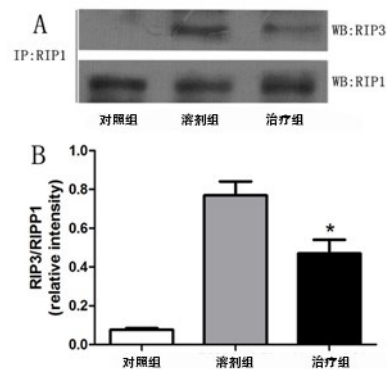


图5 Nec-1对抑小鼠脊髓损伤后24 h脊髓组织  
RIP1和RIP3相互作用的影  
响  
与对照组相比, \*  $P<0.05$ ; 与DMSO组相比, #  $P<0.05$

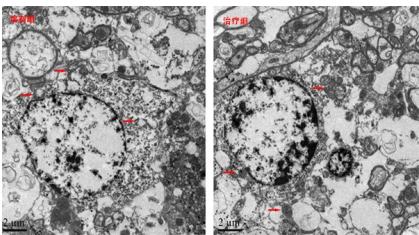


图6 Nec-1对抑小鼠脊髓损伤后24 h脊  
髓神经元线粒体结构的影  
响  
治疗组小鼠脊髓神经元线粒体结构较溶剂组  
保存更为完整; 示线粒体; 标尺=2 μm

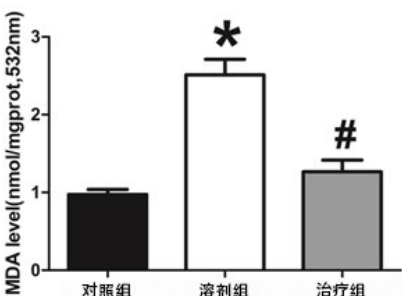


图7 Nec-1对抑小鼠脊髓损伤后24 h脊髓组织  
MDA含量的影  
响  
与对照组相比, \*  $P<0.05$ ; 与DMSO组相比, #  $P<0.05$

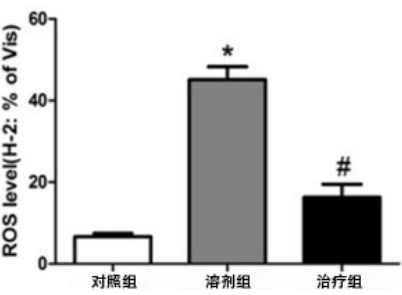


图8 Nec-1对抑小鼠脊髓损伤后24 h脊髓组织  
ROS含量的影  
响  
与对照组相比, \*  $P<0.05$ ; 与DMSO组相比, #  $P<0.05$



含量的影响 小鼠脊髓损伤后 24 h, 脊髓组织 MDA 和 ROS 含量明显升高, 而 Nec-1 能明显减少小鼠脊髓损伤后早期 MDA 和 ROS 含量(图 7、8)。

### 3 讨论

脊髓损伤后的病理生理过程包含一系列复杂的细胞和分子事件, 如大量神经元和胶质细胞死亡、广泛脱髓鞘、轴突变性, 最终导致持续性神经功能障碍<sup>[6]</sup>。关于脊髓损伤后细胞死亡的研究目前主要集中于凋亡和自噬, 很少涉及坏死<sup>[6-8]</sup>。我们以前的研究表明程序性坏死在脊髓损伤后早期细胞死亡的过程中具有重要作用, 通过 Nec-1 抑制程序性坏死能够减轻脊髓组织细胞坏死, 保护神经元, 促进早期运动功能的恢复<sup>[4]</sup>。

2007 年, Degterev 等<sup>[9]</sup>发现 Nec-1 作用靶点为 RIP1。随后, 一系列研究表明 RIP1 和 RIP3 是参与程序性坏死的关键蛋白, 其相互作用是启动程序性坏死的关键<sup>[10-12]</sup>。程序性坏死的发生消耗能量, 增加代谢, 导致线粒体产生大量 ROS, 最终导致细胞出现坏死形态的死亡<sup>[10-12]</sup>。在程序性坏死通路中, RIP3 的激活并和 RIP1 形成坏死小体是其中的关键步骤, 也被认为是程序性坏死发生的一个分子学标志。本研究发现 RIP1 在正常脊髓及损伤的脊髓组织都有较高的表达, 而 RIP3 在正常脊髓组织表达偏低, 但在脊髓损伤后表达明显升高; 同时, 还发现程序坏死特异性的抑制剂 Nec-1 不影响脊髓损伤后早期 RIP1 和 RIP3 在脊髓组织的表达; 进一步通过免疫共沉淀观察 RIP1 和 RIP3 的相互关系, 发现正常情况下脊髓组织 RIP1 与 RIP3 的相互作用极弱, 而在脊髓损伤后早期 RIP1 与 RIP3 的相互作用显著加强; 而 Nec-1 明显抑制 RIP1 和 RIP3 的相互作用。这些结果说明脊髓损伤后可能通过形成 RIP1 和 RIP3 复合物(坏死小体), 启动程序性坏死, Nec-1 在脊髓损伤后通过抑制 RIP1 和 RIP3 相互作用, 阻止坏死小体形成从而发挥神经保护作用。

本研究发现小鼠脊髓损伤后 Nec-1 可以通过减少 ROS 生成, 调节氧化还原系统, 继而减少 MDA 的生成, 减轻最后的氧化应激损伤, 发挥神经保护作用。同时, 电镜观察发现 Nec-1 处理组脊髓损伤后神经元线粒体超微结构保存更好。这提示 Nec-1 可能通过保护线粒体发挥神经保护作用。

综上所述, Nec-1 在小鼠脊髓损伤后通过减少 MDA 和 ROS 生成, 和保护线粒体功能保护神经细胞, 从而展现出神经保护作用。

### 【参考文献】

- [1] 陈星月, 陈 栋, 陈春慧, 等. 中国创伤性脊髓损伤流行病学和疾病经济负担的系统评价[J]. 中国循证医学杂志, 2018, 18(2): 143-150.
- [2] 祁 健, 张俊江, 孟庆溪, 等. 脊髓损伤的病理变化及治疗进展[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(21): 4179-4183.
- [3] Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, *et al.* Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury [J]. Spine J, 2004, 4(4): 451-464.
- [4] Liu M, Wu W, Li H, *et al.* Necroptosis, a novel type of programmed cell death, contributes to early neural cells damage after spinal cord injury in adult mice [J]. J Spinal Cord Med, 2015, 38(6): 745-753.
- [5] Mao L, Wang HD, Wang XL, *et al.* Disruption of Nrf2 exacerbated the damage after spinal cord injury in mice [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2012, 72(1): 189-198.
- [6] Chen KB, Uchida K, Nakajima H, *et al.* Tumor necrosis factor- $\alpha$  antagonist reduces apoptosis of neurons and oligodendroglia in rat spinal cord injury [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011, 36(17): 1350-1358.
- [7] Wada S, Yone K, Ishidou Y, *et al.* Apoptosis following spinal cord injury in rats and preventative effect of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist [J]. J Neurosurg, 1999, 91(1 Suppl): 98-104.
- [8] Yong C, Arnold PM, Zoubine MN, *et al.* Apoptosis in cellular compartments of rat spinal cord after severe contusion injury [J]. J Neurotrauma, 1998, 15(7): 459-472.
- [9] Degterev A, Hitomi J, Gernsheid M, *et al.* Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(5): 313-321.
- [10] Zhang DW, Shao J, Lin J, *et al.* RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis [J]. Science, 2009, 325(5938): 332-336.
- [11] Cho YS, Challa S, Moquin D, *et al.* Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation [J]. Cell, 2009, 137(6): 1112-1123.
- [12] Chen TY, Chi KH, Wang JS, *et al.* Reactive oxygen species are involved in FasL-induced caspase-independent cell death and inflammatory responses [J]. Free Radic Biol Med, 2009, 46(5): 643-655.

(2018-03-23 收稿, 2018-05-02 修回)