

甲泼尼龙对受损脊髓组织中抗菌肽相关基因表达的调节

袁 聪, 黄 颖, 张春强, 杜开利, 王 兵, 黄 河, 赵学凌
(昆明医科大学第一附属医院, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨甲泼尼龙对受损脊髓组织中抗菌肽相关基因表达的影响. **方法** 6只成年家兔随机分为2组, 即模型组(M组, $n=3$)和药物治疗组(D组, $n=3$). 进行L₄椎板切除术后采用Allen法建立外伤性脊髓损伤模型. 药物组在造模后2h给予大剂量甲泼尼龙冲击治疗. 于造模后8h处死所用家兔获取以创伤部位为中心长约8mm的脊髓组织, 分别提取总RNA. 采用Agilent兔子全基因4×44K芯片进行检测, Genespring 11.0软件进行数据分析. 结合P值和倍数变化(Fold Change, FC)筛选出差异表达基因. 差异表达的筛选条件为 $P<0.05$ 且 $FC>2$. 显著性差异表达的筛选条件为 $P<0.01$ 且 $FC>10$. **结果** 成功建立脊髓损伤模型. 6个脊髓组织总RNA样本2100 RIN ≥ 7.0 并且28S/18S ≥ 0.7 . 全部基因芯片质控指标CV值均 $<15\%$. D组和M组比较, 共有477个探针呈现差异表达, 抗菌肽相关基因中防御素NP-3、NP-4和CAP18呈现显著差异($P<0.05$). **结论** 大剂量甲泼尼龙对急性脊髓损伤中抗菌肽相关基因表达有显著的调节作用, 防御素NP-3、NP-4和CAP18可能是其发挥神经保护作用的主效应分子.

[关键词] 脊髓损伤; 甲泼尼龙; 抗菌肽; 基因芯片

[中图分类号] Q786 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706(2012)12-0011-04

Modulation of Antimicrobial Peptides Related Gene Expression in Injured Spinal Cord by Methylprednisolone

YUAN Cong, HUANG Ying, ZHANG Chun-qiang, DU Kai-li, WANG Bing, HUANG He,
ZHAO Xue-ling

(The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To explore the influence of methylprednisolone on antimicrobial peptide related gene expression in injured spinal cord. **Methods** Six adult rabbits were divided into 2 groups: injury model group ($n=3$) and medicine treatment group ($n=3$). All the 6 rabbits underwent laminectomy. Spinal cord injury model was set up by Allen method in injury model group and medicine treatment group. Large dose of methylprednisolone was given in treatment group 2 hours after injury. Spinal cord tissues at the site of injury were obtained 8 hours after injury. Total RNA was extracted from each sample, and tested by Agilent 4×44K rabbit gene chip. Genespring 11.0 software was applied for data analysis. The difference was considered statistically significant if $P<0.01$ and Fold Change >10 . **Results** Rabbit spinal cord injury models were successfully set up. Total RNA of each samples was with 2100 RIN ≥ 7.0 and 28S/18S ≥ 0.7 . Quality control index CV was less than 15% in all gene chips. Between group D and group M, there were 477 probes showing expression difference, and significant expression difference was showed in three antimicrobial peptides related genes (Alexin NP-3, NP-4, and CAP18). **Conclusion** Large dose methylprednisolone significantly regulates the expression of antimicrobial peptide related genes, and Alexin NP-3, NP-4, and CAP18 may be the effective molecules for neural protection.

[Key words] Spinal cord injury; Methylprednisolone; Antimicrobial peptides; Gene chip

[基金项目] 云南省自然科学基金资助项目 (2010148)

[作者简介] 袁聪 (1985~), 男, 云南石屏县人, 在读硕士研究生, 主要从事骨科临床工作.

[通讯作者] 张春强. E-mail: zcq75@yahoo.com.cn

抗菌肽 (Antibacterial peptide) 是一类由多种生物细胞特定基因编码、经外界条件诱导产生的多肽, 广泛存在于从细菌到哺乳动物的生物中, 是天然免疫防御系统的一个重要组成部分, 被称为“第一防御体系”; 抗菌肽具有广谱抗细菌、真菌、病毒、原虫、抑杀肿瘤细胞、调节炎症与免疫等多重作用^[1]。甲泼尼龙是治疗急性脊髓损伤“唯一”有效药物, 然而甲泼尼龙是否对脊髓损伤组织中的抗菌肽的表达产生影响目前尚不清楚。

1 材料和方法

1.1 SCI 动物模型的建立

健康成年日本大耳白兔 6 只 (成都军区昆明总医院实验动物管理中心提供), 雌雄不限, 体重 ($3\ 100 \pm 140$) kg, 随机分为 2 组: 模型组 (M 组, $n=3$) 和药物组 (D 组, $n=3$)。进行 L₄ 椎板切除后沿用 Allen 法建立急性脊髓损伤模型, 瞬间击打的力量为 250 g·cm ($10\text{ g} \times 25\text{ cm}$)。

1.2 药物治疗方案

D 组在造模后 2 h 按人-兔等效剂量给予大剂量甲强龙冲击治疗 (NASCIS 方案: 30 mg/kg 体重 15 min 内滴完, 间隔 45 min 后按 5.4 mg/(kg·h) 维持 23 h; 人-兔等效剂量系数 =3.08^[2])。M 组给予同体积的生理盐水。造模后 8 h 处死全部实验动物, 分别获取损伤区为中心的长约 8 mm 的脊髓组织, 洗净后液氮冻存。

1.3 脊髓组织总 RNA 提取

按 TRIzol 试剂使用说明书提取脊髓组织总 RNA。采用 Lab-on 质检系统对 6 个 RNA 样品按标准流程进行检验, 评估总 RNA 的质量。2100 RIN ≥ 7.0 并且 28S/18S ≥ 0.7 为样品合格。

1.4 基因芯片检测

所用芯片为美国 Agilent 公司的兔全基因组表达谱芯片 (Agilent Rabbit Oligo Microarray, $4 \times 44\text{ K}$), 检测由上海生物芯片有限公司-上海国家工程研究中心按标准流程完成。在本实验中, 用重复探针点 (10 次重复) 信号的 CV 值 (变异系数) 来计算芯片的稳定性和技术的稳定性, 质控标准: CV 值 $< 15\%$ 。

1.5 统计学处理

经标准化处理后的数据采用 GeneSpring 软件进行分析。绘制箱线图 (Box-whisker Plot), 利用最小值、第一四分位数 (25%)、中位数 (50%)、第三四分位数 (75%) 和最大值来描述数据, 显示

数据的对称性、分散程度等信息。绘制火山图, 图中每一个点代表芯片上的探针点, 该点在二维平面中的位置由其 X 轴坐标和 Y 轴坐标确定。X 轴坐标: 该探针差异倍数的对数转换值, 即 \log_2 (Fold Change); Y 轴坐标: 该探针点的显著性 p 值 (p-value) 以 10 为底的负对数, 即 $-\log_{10}$ (p-value)。用于直观的体现单荧光芯片组间差异基因的 p 值和 Fold Change 联合分布情况。差异表达基因的筛选条件, $P < 0.05$ 且 $FC \geq 2$ 视为差异表达基因; $P < 0.01$ 且 $FC \geq 10$ 为显著差异表达基因。

2 结果

6 只实验动物均存活至造模后 8 h, 麻醉清醒后双侧后肢无针刺反应, 髋、膝、踝关节和各脚趾均无活动, 呈现完全性脊髓损伤表现, 拽双侧肢爬动进食、水。各组 RNA 样品的提取和质检结果, 见表 1、图 1。基因芯片检测质控, 见表 2。上表显示: 所有芯片的 CV 均 $< 15\%$, 说明芯片稳定性和技术稳定性良好。基因芯片数据分析结果: (1) 2 组样品基因芯片杂交数据的分布情况 (见图 2)。上图显示: 2 组样品基因芯片杂交数据均呈现近似对称性分布; (2) 差异表达基因的分布情况 (见图 3)。上图显示: 药物组^[1]和模型组^[2]差异表达基因的 P 值和 Fold Change 联合分布情况。红色区域: p-value < 0.05 且 Fold Change ≥ 2 基因; (3) 差异表达基因的统计结果见表 3; (4) 抗菌肽相关基因表达检测结果见表 4。

3 讨论

脊髓损伤是由于外伤或其他原因导致的脊髓的结构和功能异常, 即损伤平面以下的感觉、运动、反射、括约肌和性功能的障碍^[3]。1911 年, Allen 首先将 SCI 分为原发性损伤和继发性损伤两个阶段, 二者共同决定了脊髓损伤的程度和预后。由于原发性损伤的瞬间性和不可逆性, 重点在于预防。一旦出现脊髓损伤, 企图阻止细胞膜的障碍、血流中断等原发性损伤所致的直接影响是很困难的。大多数的临床和实验研究的重要目标是如何使脊髓外伤引起的继发性障碍控制到最低限度^[4]。根据美国国家急性脊髓损伤研究组 (national acute spinal cord injury study, NASCIS) 的 3 次临床研究报告: MP 是急性脊髓损伤的唯一“有效药物”, 并通过了美

表 1 6 个 RNA 样品 Lab-on 质检结果

Tab. 1 Results of six RNA samples checked by Lab-on system

ID	样本编号 Sample ID	浓度 (μg/μL)	纯化前总量 pre-purified (μg)	A260/ A280	2100RIN	28S/18S	Result
1	6	0.120	6.0	1.85	8.0	1.4	合格
2	7	0.114	5.7	1.92	7.5	1.2	合格
3	8	0.183	9.1	1.92	7.7	1.2	合格
4	32	0.207	10.3	1.88	7.1	1.2	合格
5	33	0.249	12.4	1.93	7.8	1.3	合格
6	39	0.200	10.0	1.91	7.6	1.4	合格

表 2 各组基因芯片质控指标 CV 值和检出率

Tab. 2 Control index CV and recall factor of each genechip

原始样品名称 (Cy3)	CV 值 (%)	检出率 (%)
32	3.96	82.20
33	4.54	83.58
39	2.66	76.54
6	3.78	81.87
7	4.69	82.99
8	4.62	84.31

表 3 差异表达基因的统计结果 (p-value < 0.05 且 FC ≥ 2) (n = 43 603)

Tab. 3 Statistical results of differentially expressed genes (p-value < 0.05 and FC ≥ 2) (n = 43 603)

差异表达	D/M
上调	272
下调	205
合计	477

表 4 抗菌肽相关基因表达检测结果

Tab. 4 The detection results of antimicrobial peptide related gene expression

探针名称	UniGene 号	P 值	FC	基因名称
A_04_P003136	Ocu.1866	0.005	52.48	防御素 NP-4
A_04_P000451	Ocu.1865	0.009	17.21	防御素 NP-3a
A_04_P000452	Ocu.1865	0.008	18.34	防御素 NP-3a
A_04_P000453	Ocu.1865	0.005	26.10	防御素 NP-3a
A_04_P000454	Ocu.1865	0.005	28.73	防御素 NP-3a
A_04_P000455	Ocu.1865	0.006	20.02	防御素 NP-3a
A_04_P000041	Ocu.1839	0.004	20.73	CAP18
A_04_P000042	Ocu.1839	0.004	20.04	CAP18
A_04_P000043	Ocu.1839	0.003	21.50	CAP18
A_04_P000044	Ocu.1839	1.02E-04	18.53	CAP18
A_04_P000045	Ocu.1839	0.002	20.02	CAP18

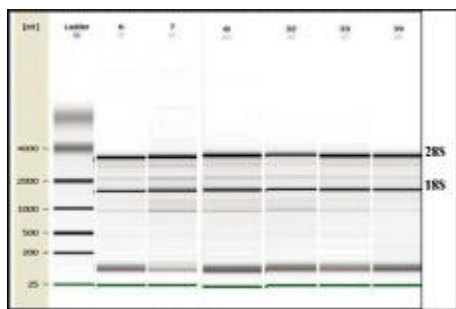


图 1 6 个 RNA 样品凝胶电泳图

Fig. 1 Gel electrophoregram of 6 RNA samples

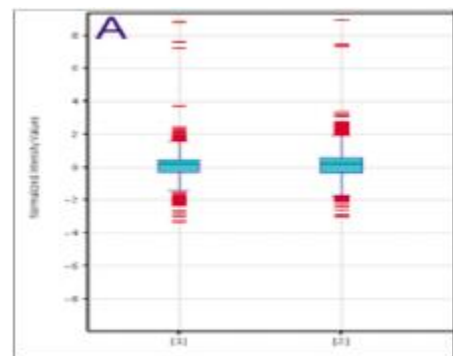


图 2 GeneSpring10.0 绘制的箱线图

Fig. 2 The box and line figure made by GeneSpring10.0

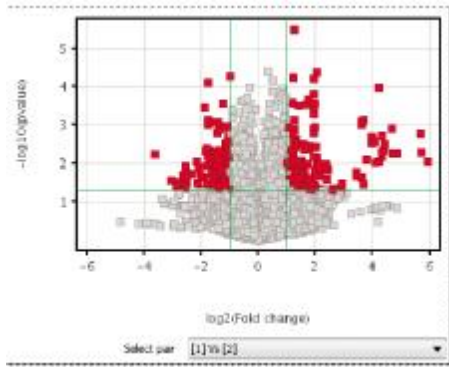


图 3 GeneSpring 10.0 绘制的火山图

Fig. 3 The volcano figure made by GeneSpring10.0

国 FDA 的认证。

MP 防治急性 SCI 的机制在于 (1) 对抗继发性炎症反应, MP 可通过抑制核因子- κ B (nuclear factor kappa, NF- κ B)、蛋白激活物-1 (activator protein-1, AP-1) 等主要炎症转录因子活化表达, 减轻炎症反应, 保护脊髓组织^[5]; (2) 减轻脂质过氧化反应, 减少自由基生成^[6]; (3) 减轻局部水肿; (4) 抑制钙离子细胞内蓄积; (5) 促进 SCI 后自身神经保护因子、营养因子、促进再生长因子的含量增加^[7]。然而, 大部分仍局限于机能、电生理和代谢等方面的总体性描述研究, 而确切的分子靶点、分子通道或效应分子尚不清楚。

本研究结果表明: 在脊髓损伤早期, 受损组织中许多基因呈现差异性表达。D 组与 M 组比较, 共有 477 个探针存在统计学差异 ($P < 0.05$ 且 $FC > 2$), 其中 272 个探针呈现上调, 205 个探针呈现下调。炎症效应基因如 IL-6、IL-1 α 、IL-1 β 等在损伤早期呈现上调, 而在药物干预后出现明显下调, 说明大剂量 MP 确实可以抑制炎症反应。另外, 一些参与物质代谢的基因如低密度脂蛋白受体 (VLDLR)、葡萄糖载体-3 (GLUT3) 等却呈现相反变化。这些结果与前人研究相一致。然而, 上述基因 FC 均在 2~4 之间。本研究发现一群基因呈现显著性差异性表达 ($P < 0.01$ 且 $FC > 10$), 它们是防御素 NP-4、防御素 NP-3 和 CAP18, 它们均属于抗菌肽家族。近年研究表明: 人抗菌肽 hCAP18 具有通过结合并中和、阻断内毒素的作用, 10 mg 和 100 mg hCAP18 均能够显著抑制由 LPS 诱导增加的炎症细胞数, 降低 NO, TNF- α , PGE2, MCP-1 和 MIP-2 水平^[8]。抗菌肽通过对靶细胞的凋亡、基因转录调节、调节巨噬细胞、树

突状细胞和其它抗原递呈细胞趋化性的调节作用, 调节宿主细胞因子的产生和 B 细胞和 T 细胞的抗原特异性免疫应答而作用于先天及获得性免疫^[9]。这一结果提示: 抗菌肽在急性 SCI 中发挥重要作用, 大剂量 MP 可能通过调节防御素 NP-4、防御素 NP-3 和 CAP18 等的表达发挥神经保护作用。

综上所述, 大剂量 MP 治疗急性 SCI 可引起多基因的表达变化, 特别是抗菌肽家族的变化最为显著。但该结果仅限于组织和转录层面, 抗菌肽在脊髓损伤的作用仍待深入研究。

[参考文献]

- [1] LAI Y, GALLO R L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense [J]. Trends Immunol, 2009, 30(3): 131 - 141.
- [2] 黄继汉, 黄晓辉, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1 069 - 1 072.
- [3] 赵文良, 周天健, 李建军主编. 脊柱脊髓损伤现代康复与治疗 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 483 - 484.
- [4] MCCORMICK M T, ROBINSON H K, BONE I, et al. Blunt cervical spine trauma as a cause of spinal cord injury and delayed cortical blindness [J]. Spinal Cord, 2007, 45(10): 687 - 689.
- [5] JIMENEZ-GARZA O, CAMACHO J, IBARRA A, et al. Early effects of modulating nuclear factor- κ B activation on traumatic spinal cord injury in rats [J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1 053: 148 - 150.
- [6] HALL E D, SPRINGER J E. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal [J]. Neuro Rx, 2004, 1(1): 80 - 100.
- [7] DONG D M, YAO M, LI K S, et al. Gene expression profile in acute spinal cord injury screened by cDNA microarray: experiment with rats [J]. Zhong hua Yi Xue Za Zhi, 2006, 86(35): 2 495 - 2 501.
- [8] OHGAMI K, ILIEVA I B, SHIRATORI K, et al. Effect of human cationic antimicrobial protein 18 Peptide on endotoxin-induced uveitis in rats [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(10): 4 412 - 4 418.
- [9] DI NARDO A, BRAFF M H, TAYLOR K R, et al. Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization [J]. J Immunol, 2007, 178(3): 1 829 - 1 834.

(2012-09-10 收稿)