

医药卫生

白藜芦醇对大鼠急性脊髓损伤后 MPO 和 NOS 活性的影响

赵训明 刘世清 梅红军¹ 张 弩 马永刚 邓 明

(武汉大学人民医院骨科, 武汉 430060; 湖北省武汉市五医院骨科¹, 武汉 430060)

摘 要 为探讨白藜芦醇(Resveratrol, Res)对大鼠急性脊髓损伤后脊髓组织中髓过氧化物酶(MPO)和一氧化氮合酶(NOS)活性的影响,将120只SD大鼠随机区组分成4组:假手术组、损伤组、白藜芦醇(Res)组和甲基强的松龙(MPSS)组。假手术组切除椎板但不损伤脊髓,术后腹腔注射等量生理盐水,其余三组采用Allen's法以10 g×5 cm制作大鼠脊髓损伤模型,术后立即分别给予等量生理盐水 Res(100 mg/kg)和 MPSS(100 mg/kg)腹腔注射。术后8 h、12 h、24 h、72 h、168 h取损伤脊髓标本,利用分光光度计测定 MPO、NOS 吸光度来检测其活性变化。结果 SCI 后脊髓组织中各时间点 MPO 和 NOS 活性均增加($P < 0.01$),损伤后3 d达高峰;Res 组和 MPSS 组在伤后各时间点 MPO 和 NOS 活性均小于损伤组($P < 0.05$);Res 组和 MPSS 组比较,72 h、168 h 时间点 MPO 活性无统计学意义;24 h、72 h、168 h 时间点 NOS 活性无统计学意义。说明白藜芦醇能抑制脊髓损伤后中性粒细胞浸润,抑制 NOS 的活性,减轻继发性脊髓损伤,对 SCI 具有保护和治疗作用。

关键词 白藜芦醇 脊髓损伤 髓过氧化物酶 一氧化氮合酶 甲基强的松龙

中图分类号 R651.2; **文献标志码** B

急性脊髓损伤(Spinal Cord Injury, SCI)是一种后果严重的创伤,是致残的主要原因之一,其病理生理过程包括原发性损伤和继发性损伤,其继发性损伤机制复杂且目前还未被完全揭示^[1]。继发性损伤由创伤后损伤节段水肿、炎症反应、局部微循环缺血缺氧、氧自由基、以及血管壁的通透性等变化对脊髓的毒害作用造成^[2],是引起脊髓进行性功能丧失的主要原因^[3]。白藜芦醇(Resveratrol, Res)是一种多酚类化合物,具有多种生物学活性,主要包括抗炎、抗氧化,抗氧自由基和抑制血小板凝聚等作用^[4]。目前,SCI 治疗措施非常有限,甲基强的松龙能有效抑制 SCI 后炎症反应已被成功地运用于临床^[5]。本实验旨在探讨 Res 对大鼠急性脊髓损伤组织中髓过氧化物酶(MPO)和一氧化氮合酶

(NOS)的影响,并与 MPSS 进行比较,为 Res 的市场开发与临床应用提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康成年 SPF 级 SD 大鼠 120 只,雌雄不拘,体重(280 ~ 320) g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。Res 购自南京泽朗医药科技有限公司,MPSS 辉瑞公司生产,MPO 和 NOS 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

随机区组分成四组:假手术组,损伤组,白藜芦醇(Res)组和甲基强的松龙(MPSS)组。每组又随机分成8 h、12 h、24 h、72 h、168 h 五个时间点,每个时间点6只。在武汉大学人民医院实验动物中心饲养。

2010年2月23日收到

第一作者简介:赵训明(1984—),男,湖北荆州人,硕士生。研究方向:脊柱脊髓损伤。E-mail:zxmsy2005@yahoo.com.cn。

* 通讯作者简介:刘世清(1945—),湖北仙桃人,博士生导师。研究方向:骨与关节病,脊柱脊髓损伤。

1.2.2 模型制作及各组处理

用 5% 水合氯醛(6 mL/kg)腹腔注射,麻醉成功后,俯卧位固定于手术台上,背部剪毛,常规消毒术野,铺洞巾,按肋骨确定椎体序列,以 T8 棘突为中心,取后正中切口长约 3 cm,钝性剥离脊旁肌肉,暴露脊柱后,以蚊钳咬除 T7—T9 棘突和椎板,暴露硬脊膜,在硬脊膜表面垫一弯曲度与脊髓表面一致的塑料垫片。除假手术组外,采用 Allen’s 打击法,打击器为质量 10 g,直径 2.5 mm 的圆柱状金属棒,在细玻璃管的引导下从 5 cm 高度垂直打击 T₈。正后方硬脊膜垫片,大鼠出现双后腿痉挛性伸直并有明显摇尾现象,作为制作急性脊髓损伤模型成功的标志,然后逐层缝合伤口。假手术组仅显露硬脊膜,不损伤脊髓;假手术组和损伤组术后给予等量生理盐水腹腔注射;Res 组和 MPSS 组制成脊髓损伤模型后立即分别给予 Res 100 mg/kg 和 MPSS 100 mg/kg 腹腔注射。每日 2 次肌肉注射青霉素,每 8 小时对大鼠人工挤压膀胱排尿一次,直至大鼠建立自主排尿。

1.2.3 标本采集

根据实验设计的要求,分别在相应时间点快速取大鼠损伤脊髓段约 2 cm,每个标本再分等大约相

等的两部分,分别用来检测 MPO 和 NOS 的活性。

1.2.4 脊髓组织中 MPO 和 NOS 测定

标本称重后制成匀浆,按照试剂盒说明书步骤操作,MPO 和 NOS 分别用分光光度计在 460 nm 和 530 nm 下比色后计算(用说明书中公式)样本中 MPO 和 NOS 活性。

1.3 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 软件包进行处理,采用单因素方差分析进行组间比较,采用 LSD 进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 对 MPO 活性的影响

SCI 后,损伤组织 MPO 活性增高,伤后 72 h 达高峰,168 h 时活性减弱,呈动态变化过程。Res 组和 MPSS 组在术后各时间点 MPO 活性均弱于损伤组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Res 组和 MPSS 组比较,72 h、168 h 时间点 MPO 活性无统计学意义($P > 0.05$)(见表 1)。

表 1 Res 对 SCI 后脊髓组织中各时间点 MPO 含量的影响($\bar{x} \pm s$;U/mg prot)					
组 别	8 h	12 h	24 h	72 h	168 d
假手术组	0.080 ± 0.007	0.081 ± 0.007	0.081 ± 0.007	0.075 ± 0.006	0.077 ± 0.007
损伤组	0.50 ± 0.056a	0.81 ± 0.07a	1.16 ± 0.12a	1.39 ± 0.16a	1.03 ± 0.07a
Res 组	0.42 ± 0.038ab	0.61 ± 0.05ab	0.84 ± 0.07ac	1.23 ± 0.09ac	0.95 ± 0.06ac
MPSS 组	0.31 ± 0.033abd	0.54 ± 0.04abe	0.74 ± 0.08ace	1.13 ± 0.11ab	0.89 ± 0.08ab

与假手术组比较,a: $P < 0.01$;与损伤组比较,b: $P < 0.01$,c: $P < 0.05$;与 Res 组比较,d: $P < 0.01$,e: $P < 0.05$

2.2 对 NOS 活性的影响

假手术组 NOS 活性均明显低于其他三组($P < 0.01$),损伤组织 NOS 活性明显增高,伤后 72 h 达到高峰,168 h 时活性减弱,呈动态变化过程。但

Res 组和 MPSS 组脊髓 NOS 活性均低于损伤组($P < 0.05$)。Res 组和 MPSS 组两组间在 24 h、72 h、168 h 三时间点脊髓 NOS 活性差异无显著性($P > 0.05$)(见表 2)。

表 2 Res 对 SCI 后脊髓组织各时间点 NOS 含量的影响($\bar{x} \pm s$, U/mgprot)

组 别	8 h	12 h	24 h	72 h	168 h
假手术组	1.56 ± 0.08	1.46 ± 0.08	1.52 ± 0.09	1.37 ± 0.11	1.41 ± 0.08
损伤组	2.21 ± 0.12a	2.43 ± 0.14a	2.63 ± 0.16a	3.04 ± 0.16a	2.56 ± 0.15a
Res 组	2.06 ± 0.10ac	2.27 ± 0.06ac	2.48 ± 0.08ac	2.85 ± 0.13ac	2.40 ± 0.07ac
MPSS 组	1.91 ± 0.15abd	2.13 ± 0.11abd	2.34 ± 0.14ab	2.67 ± 0.23ab	2.32 ± 0.08ab

与假手术组比较,a; $P < 0.01$;与损伤组比较,b; $P < 0.01$,c; $P < 0.05$;与 Res 组比较,d; $P < 0.05$

3 讨论

目前研究表明,损伤局部免疫炎症反应是继发性脊髓损伤主要机制之一^[6],局部炎症反应不仅能够触发一系列针对损伤组织部位细胞和分子水平上的反应,而且还可以导致损伤组织局部胶质细胞增生和瘢痕形成,并可影响脊髓组织的再生。中性粒细胞是急性免疫炎症反应的主要炎症细胞,也是第一个到达损伤组织的炎症细胞^[7]。而 MPO 是中性粒细胞的特征性酶,存于嗜中性粒细胞的嗜天青颗粒中,在炎症状态下,它被释放入细胞外液中。每个细胞所含酶的量是一定的,约占细胞干质量的 5%^[8],其活性的高低可反映中性粒细胞浸润的程度及活性^[1]。本实验发现,SCI 后,损伤组织 MPO 活性显著升高($P < 0.01$),说明损伤后,局部有免疫炎症反应,有中性粒细胞浸润并参与了脊髓继发性损伤机制;Res 组和 MPSS 组在伤后各时间点 MPO 活性均弱于损伤组($P < 0.05$),表明 Res 和 MPSS 有抗炎作用;Res 组和 MPSS 组比较,3 d、7 d 时间点 MPO 活性无统计学意义($P > 0.05$),Res 与 MPSS 抗炎作用的强弱比较有待进一步研究。

一氧化氮(NO)在机体内有“双刃剑”样的作用,一方面是体内的一种信号分子,具有广泛的生理功能;另一方面在疾病状态下生成过量时也会造成组织的损伤^[9]。NO 由一分子的 L-精氨酸和氧经 NOS 催化生成,性质活泼,不易准确定量测定。NOS 是 NO 生物合成的关键酶,因而 NOS 成为近年缺血性中枢神经疾病研究的热点。NOS 广泛存在于包括中枢系统在内的全身各个系统中^[10]。本实验中,

SCI 后脊髓创伤性损伤后诱导神经元 NOS 大量和持续表达,合成过量的 NO,NO 可以介导脂质过氧化反应与自由基反应,参与细胞内钙超载,造成神经细胞能量代谢障碍、功能损害及坏死^[11];但 Res 组和 MPSS 组脊髓 NOS 活性均低于损伤组($P < 0.05$),Res 组和 MPSS 组两组间在 24 h、72 h、168 h 三时间点脊髓 NOS 活性差异无显著性($P > 0.05$),说明 Res 可用抑制 NOS 活性,减少继发性损伤,其效果可能与 MPSS 相当。

SCI 的治疗仍然是医学界的难题。MPSS 是目前已经应用于临床治疗急性 SCI 且有效的抗炎药物^[5],但其治疗副作用较大,激素类药物的疗效有限,临床应用存在争议^[12]。见于此,开发一种副作用小且对 SCI 治疗有效的药物显得很有必要。本研究可表明,白藜芦醇对脊髓损伤局部组织中性粒细胞和 NOS 活性有抑制作用,可抑制脊髓损伤后早期炎症的发生,可在一定程度上控制脊髓继发性损伤。因此认为,白藜芦醇应用前景比较广阔,有可能成为治疗急性 SCI 的一种新途径。

参 考 文 献

1 李良满,朱悦,范广宇,等. 重组 sCR1 对大鼠急性脊髓损伤组织免疫炎症反应的影响. 中华创伤骨科杂志,2005;7(6): 548—555

2 Ates O,Cayli S R,Gurses I,et al. Comparative neuroprotective effect of sodium channel blockers after experimental spinal cord injury. J Clin Neurosci, 2007;14(7):658—665

3 Bradbury E J,McMahon S B. Spinal cord repair strategies: why do they work. Nat Rev Neurosci,2006;7(8):644—653

4 Ma Z H,Ma Q Y,Wang L C. Resveratrol: a medical drug for acute pancreatitis. World J Gastroenterol,2005;11(21):3171—3174

5

Lee B H, Lee K H, Yoon D H, *et al.* Methylprednisolone on the neural conductive of the motor evoked potentials in spinal cord injured rats. *Korean Med Sci*, 2005;20:132—138

6

Schwartz M, Lazarov S O, Rapalino O, *et al.* Potential repair of rat spinal cord injuries using stimulated homologous macrophages. *J Neurosci*, 1999;44:1041—1045

7

Tjoa T, Strausbaugh H J, Maida N, *et al.* The use of flow cytometry to assess neutrophil infiltration in the injured murine spinal cord. *J Neurosci Methods*, 2003;129(1):49—59

8

祁亚斌, 吴小涛, 付文芹, 等. 大鼠不同程度脊髓损伤后的中性粒细胞活性. *中国临床康复*, 2006;10(28):91—93

9

李琦, 沙焕臣, 马清涌, 等. 白藜芦醇对火鼠重症急性胰腺炎胰腺组织 COX—2 和 iNOS 表达的影响. *西安交通大学学报(医学版)*, 2009;30(1):14—16

10

辛杰, 张忠礼, 张培良, 等. 银杏叶提取物对实验性脊髓损伤后诱导型一氧化氮合成酶表达的影响. *中国矫形外科杂志*, 2007;15(22):1735—1737

11

王晓东, 杨迎暴, 苏薇薇. 白藜芦醇对过氧化氢损伤脊髓神经元分泌一氧化氮的影响. *中药材*, 2004;27(4):275—277

12

Lowry N A, Temple S. Making human neurons from stem cells after spinal cord injury. *PLoS Med*, 2007;4(2):236—238

Effects of Resveratrol on Activity of MPO and NOS
after Acute Spinal Cord Injury of Rats

ZHAO Xun-ming, LIU Shi-qing*, MEI Hong-jun¹, ZHANG Nu, MA Yong-gang, DENG Ming
(Department of Orthopaedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, P. R. China
Department of Orthopaedics, Fifth Hospital of Wuhan¹, Wuhan 430060, P. R. China)

[Abstract] To study the effects of Resveratrol(Res) on activity of MPO and NOS after acute spinal cord injury of rats, 120 SD rats were randomly divided into four groups. Rats in sham operated group had only laminectomy performed and nontraumatized spinal cord; rats in trauma group, Res group and MPSS group were injured by Allen’s weight drop method(10 g×5 cm). Then the normal saline, Resveratrol(Res, 100 mg/kg) and Methylprednisolone(MPSS, 100 mg/kg) were given intraperitoneally immediately respectively. The rats were divided into four subgroups for detecting the activity of MPO and NOS analysis at 8 h, 12 h and 24 h, 72 h, 168 h after surgery. It is resulted that activity of MPO and NOS was increased obviously after SCI($P<0.01$) at each time point, and reach the peak at 72 h after injury; both Res group and MPSS group had less activity of MPO and NOS than trauma group($P<0.05$). For MPO, there is no statistical difference between Res group and MPSS group at 72 h and 168 h. For NOS, there is no statistical difference between Res group and MPSS group at 24 h, 72 h and 168 h. concluded that Res could protect spinal cord from injury in rats and relieve secondary spinal cord injury. One of mechanisms is that Res can lessen the neutrophil and inhibit the activity of NOS.

[key words] resveratrol spinal cord injury myeloperoxidase(MPO) nitric oxide synthase(NOS)
methylprednisolone