

基础研究

甘草酸二铵对大鼠脊髓缺血再灌注损伤后运动神经元 Caspase-3 表达的影响

丁磊, 马玉林, 马国强, 罗小军, 殷刚, 刘秉锐, 马宗军

(宁夏银川市第一人民医院骨科 750001 银川市)

【摘要】目的:观察甘草酸二铵(DG)对大鼠脊髓缺血再灌注损伤后脊髓前角运动神经元 Caspase-3 表达的影响。**方法:**60 只大鼠随机分为 3 组, 每组 20 只。两组采用手术夹闭大鼠左右肾动脉之间的腹主动脉 30min 致脊髓缺血, 然后松开再灌注, 其中一组在缺血前 10min 舌下静脉注射 DG 20mg/kg(DG 干预组), 一组仅造成脊髓缺血损伤(损伤组); 另一组打开腹腔后即关腹, 不进行缺血再灌注(正常对照组)。分别于术后 3、24、72、168h 处死大鼠取腰段脊髓行免疫组化染色, 观察脊髓前角 Caspase-3 光密度变化情况; 72、168h 处死动物前采用 Behrmann 5 点评分法评定大鼠后肢功能。**结果:**损伤组与干预组 72h 时后肢功能评分分别为 4.2 ± 0.45 分、 5.8 ± 1.1 分; 168h 时分别为 5 ± 0 分、 6.2 ± 1.3 分, 两组相同时间比较有显著性差异。Caspase-3 表达位于脊髓前角运动神经元胞浆。术后 3、24、72、168h, 正常对照组前角运动神经元的平均光密度为 0.13 ± 0.04 、 0.15 ± 0.06 、 0.13 ± 0.06 、 0.15 ± 0.06 , 损伤组为 0.18 ± 0.04 、 0.18 ± 0.03 、 0.20 ± 0.04 、 0.20 ± 0.05 , DG 干预组为 0.17 ± 0.06 、 0.15 ± 0.02 、 0.16 ± 0.04 、 0.15 ± 0.02 , 损伤组各时间点与对照比较均有显著性差异, DG 干预组在 24、72、168h 与损伤组比较差异有显著性。**结论:**DG 可下调凋亡信号转导通路中 Caspase-3 的表达水平, 从而抑制脊髓前角神经元凋亡的发生。

【关键词】脊髓缺血再灌注损伤; Caspase-3; 甘草酸二铵; 神经元

中图分类号: R683.2, R453 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2008)-10-0776-04

The effect of diammonium glycyrrhizinate on the expression of caspase-3 in rat spinal cord after ischemia-reperfusion injury/DING Lei, Ma Yulin, MA Guoqiang, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(10): 776-779

【Abstract】Objective:To investigate the effect of diammonium glycyrrhizinate(DG) on expression of caspase-3 in rat comuanterius medullae spinalis using ischemia reperfusion injury model.**Method:**60 rats were divided into blank group, control group and DG treated group, each group contains 20 rats. The protocol was established by intercepting rat abdominal aorta between right and left renal arter branches for 30min. The animals in DG treated group were injected DG 20mg/kg 10min via Vena sublingualis prior to ischemia start, the control group received nothing for ischemia-reperfusion injury, while the blank group received the procedure of open abdomen without introduction of ischemia-reperfusion injury. The expression of caspase-3 optical density in comuanterius medullae spinalis were measured at 3th, 24th, 72th, 168th hour time-point respectively, and the score of limb function at 72th, 168th hour were evaluated using Behrmann method prior to testing the caspase-3 expression.**Result:**The mean score of limb function were 4.2 ± 0.45 and 5 ± 0 for blank group and DG intervention group at 72th hours time point, 5.8 ± 1.1 and 6.2 ± 1.3 at 168th hour time point respectively, which had significant difference. Caspase-3 was expressed in cytolymph of motor neuron at 3th, 24th, 72th and 168th time point respectively. At 3th, 24th, 72th and 168th time point, the average level of caspase-3 optical density in blank group were 0.13 ± 0.04 、 0.15 ± 0.06 、 0.13 ± 0.06 、 0.15 ± 0.06 , while 0.18 ± 0.04 、 0.18 ± 0.03 、 0.20 ± 0.04 、 0.20 ± 0.05 in control group, and 0.17 ± 0.06 、 0.15 ± 0.03 、 0.16 ± 0.04 in DG intervention group. There was statistical significance between groups at each time point.**Conclusion:**DG can down-regulate the level of caspase-3 in signal transduction pathway, which is useful in protecting the spinal cord in ischemia-reperfusion.

【Key words】Spinal cord ischemic-reperfusion injury; Caspase-3; Diammonium glycyrrhizinate

【Author's address】Department of Orthopedics, the First Hospital of Yinchuan, Yinchuan, 750001, China

第一作者简介: 男(1981-), 住院医师, 硕士研究生, 研究方向: 创伤骨科

电话: (0951)6192217 E-mail: pococomodoao@yahoo.com.cn

通讯作者: 马玉林

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的治疗仍是困扰医学界的一大难题。SCI 呈高发生率、高致残率(全瘫占 67%)、高耗费(美国为 5~7 万美元/患者/年)、低死亡率(<5%)的新特点^[1]。成功治疗 SCI 对人类意义重大。脊髓缺血再灌注损伤(spinal cord ischemic-reperfusion injury, SCII)中的神经元凋亡是脊髓损伤的重要机制之一。本研究采用大鼠脊髓缺血再灌注损伤动物模型^[2],观察甘草酸二铵(diammonium glycyrrhizinate, DG)对运动神经元中 Caspase-3 表达的影响,初步探讨 DG 对 SCII 的保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

60 只健康雄性 SD 大鼠,体重 220~270g,由宁夏医学院实验动物中心提供,生产许可证:SCXK(宁)2007-0007。兔抗鼠 Caspase-3 多克隆抗体(一抗)、卵白素-生物素-过氧化物酶(SABC)、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒、多聚赖氨酸均购自武汉博士德生物工程有限公司。DG 购于江苏正大天晴药业股份有限公司(批号:0611061)。

1.2 动物与分组

60 只大鼠随机分为正常对照组(20 只)、损伤组(20 只)和 DG 干预组(20 只)。各组按照不同的时间段分为术后 3h、24h、72h、168h 四个时间点,每组每个时间点 5 只。

1.3 动物模型制作

水合氯醛 0.3mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,仰卧固定于工作台,腹部常规脱毛、消毒,严格按照无菌操作,腹正中纵行切口打开腹腔,暴露腹主动脉,辨认双侧肾动脉。正常对照组只打开腹膜即关腹;损伤组于左肾动脉上方约 1cm,右肾动脉分支下方,以无创伤动脉夹夹闭腹主动脉,30min 后松开动脉夹,关闭腹腔,造成脊髓缺血再灌注损伤;DG 干预组在缺血开始前 10min 舌下静脉注射 DG 20mg/kg,余与损伤组相同。

1.4 肢体运动功能评价

在术后 72h、168h 时取脊髓标本之前用 Behrmann 5 点评分法^[3]评价大鼠后肢功能。均在晚 7 点由同一人评定。0 分,无自发运动,压夹后肢无反应;1 分,无自发运动,但夹后肢有嘶叫、逃避等反应;2 分,有自发运动,但不能负重站立;3

分,能站立但不能行走;4 分,能行走,但不能控制踝关节或足,只能靠膝关节或足内侧行走,不稳;5 分,能行走,前后肢不太协调,后肢负重明显改善,腹部不着地,但数趾拖步;6 分,能行走,仅 1 或 2 个足趾拖步,快速转弯时稍有不稳;7 分,正常步态和行走。后肢功能恢复率=(DG 干预组评分均数-损伤组评分均数)/DG 干预组评分均数×100%。

1.5 标本取材与切片

三组大鼠在术后 3h、24h、72h、168h 四个时间点($n=5$)以水合氯醛 0.3mg/kg 腹腔麻醉,剖胸,经左心室插管,先灌注生理盐水至流出液为清亮,再用 4%多聚甲醛灌注固定,取腰段脊髓,置于 4%多聚甲醛液中固定。固定 24h 后保存于 70%酒精中,经常规酒精梯度脱水、二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋后,作横切面的切片,连续切片,片厚 6 μ m。

1.6 Caspase-3 的检测

每个时间点每只大鼠随机选取切片 6 张进行 Caspase-3 免疫组化染色(SABC 法)。免疫组化染色按照 SABC 试剂盒说明书操作,一抗为工作液浓度,最后用 DAB 显色,镜下控制显色,蒸馏水冲洗终止显色,苏木素轻度复染,梯度脱水,透明,中性树脂胶封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。阳性细胞为细胞浆呈棕黄色。每张切片随机选取 10 个不重复 400 倍视野,利用 BH-2 显微镜照相机和 Mias 病理图文报告系统采集 10 个脊髓前角视野,应用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件分析阳性细胞平均光密度值(AOD),AOD 与 Caspase-3 表达成正比例关系。DG 对 Caspase-3 抑制率=(损伤组 Caspase-3 表达均数-DG 干预组 Caspase-3 表达均数)/损伤组 Caspase-3 表达均数×100%。

1.7 统计学处理

数据采用 SPSS 11.5 软件处理,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。资料均行正态性检测和方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析。方差齐者两两比较采用 LSD 法,方差不齐者采用 Dunnett's t 检验。 $P<0.05$ 为差异有显著性, $P<0.01$ 为差异有非常显著性。

2 结果

术后各时间点动物后肢均出现不同程度的瘫痪,跛行至暂时瘫痪不等,腹部切口愈合好,未见

感染。实验过程中死亡 5 只,同样条件按随机原则追加。

术后 72h 和 168h 时三组大鼠后肢改进 Behrmann 5 点评分结果见表 1。正常对照组各动物后肢功能正常。损伤组 72h 与正常对照组比较后肢功能明显下降($P<0.01$),168h 时亦有显著性差异($P<0.01$)。DG 干预组 72h 时较同时间点损伤组有明显恢复($P<0.01$),168h 时的评分较损伤组 168h 有显著性差异($P<0.01$)。DG 对大鼠后肢功能平均恢复率在 72、168h 时分别为 27.59%、19.35%。

表 1 各组术后 72h 和 168h 大鼠后肢功能评分
($\bar{x}\pm s$, $n=5$, 分)

	正常对照组	损伤组	DG 干预组	恢复率
72h	7±0	4.2±0.4 ^①	5.8±1.1 ^②	27.59%
168h	7±0	5±0 ^②	6.2±1.3 ^②	19.35%

注:①与正常对照组相比较 $P<0.01$;②与损伤组比较 $P<0.01$

免疫组化染色显示正常对照组大鼠脊髓组织中存在 Caspase-3 的表达,表达位于神经元胞浆中(图 1,后插页 IV)。损伤组 3h Caspase-3 表达明显增加,染色强度加深(图 2,后插页 IV);24h 比 3h 时阳性细胞数量增加,面积及染色都加大(图 3,后插页 IV);72h 时阳性细胞增多(图 4,后插页 IV);168h 时阳性细胞的表达面积和染色强度较前三个时间段有减弱(图 5,后插页 IV)。DG 干预组 3h 较损伤组同时间点阳性细胞数量少,染色强度都明显减弱(图 6,后插页 IV);24h 与同时间点损伤组比较脊髓前角运动神经元阳性表达面积和染色强度有下降(图 7,后插页 IV);72h 时与损伤组同时间点比较,表达面积减少(图 8,后插页 IV);168h 与同时间点损伤组比较表达强度和面积减小(图 9,后插页 IV)。三组各时间点的平均光密度值见表 2。损伤组与正常对照组同时间点比较均有显著性差异($P<0.01$)。DG 干预组 3h 与损伤组同时间段相比无统计学差异($P>0.05$),其余 3 时间段皆有显著性差异($P<0.01$)。随着时间的延长,DG 对 Caspase-3 的表达抑制率不断增大。

3 讨论

SCII 的机制为脊髓缺血后引起一系列的瀑布反应,主要包括兴奋性氨基酸毒性、内源性阿片肽减少、自由基损伤、钙通道开放、脂质过氧化反应、

表 2 各组术后不同时间点阳性神经元 Caspase-3 表达的平均光密度水平与抑制率
($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

	正常对照组	损伤组	DG 干预组	抑制率 (%)
3h	0.13±0.04	0.18±0.04 ^①	0.17±0.06	4.85
24h	0.15±0.06	0.18±0.03 ^①	0.15±0.03 ^②	17.45
72h	0.13±0.06	0.20±0.04 ^①	0.16±0.04 ^②	18.29
168h	0.15±0.06	0.20±0.05 ^①	0.15±0.02 ^②	18.24

注:①与正常对照组相比较 $P<0.01$;②与损伤组比较 $P<0.01$

NO 毒性、神经元凋亡等,钙离子内流是最后公共通路。神经元凋亡为其重要机制,且瀑布反应亦是神经元凋亡的启动和促进因素。神经元凋亡通过线粒体途径和死亡受体途径来实现。凋亡发生是一个复杂的、由 Caspases 家族成员介导的蛋白酶级联反应过程,即凋亡信号首先活化启动性 Caspases,进一步活化效应性 Caspases,然后作用于底物蛋白,使蛋白分解引起凋亡。Caspases 家族蛋白的活化可通过多种途径介导,在不同的细胞或信号转导途径诱发的凋亡过程中参与的 Caspase 亦不同,但凋亡的关键蛋白和执行者 Caspase-3 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路。Caspase-3 处于细胞凋亡信号转导通路的下游,通过切断与周围细胞的联络,重组细胞骨架,关闭 DNA 修复和复制,破坏 DNA 和核结构,诱导凋亡小体的形成。细胞凋亡的特征性标志与 Caspase-3 的激活有直接关系。Wang 等^[4]认为 Caspase-3 的表达可加重凋亡的发生,且与 Fas 表达成正相关。Springer^[5]报道在大鼠脊髓损伤后,Caspase-3 凋亡通路上下游基因被激活。Liu 等^[6]发现 Caspase-3 的上调可以作为脊髓损伤早期损伤生物化学信号。Kiyoshima 等^[7]证实脊髓缺血与神经元死亡有重要关系。Caspase-3 成为脊髓损伤神经元凋亡研究中的重要标志。在本研究中发现脊髓缺血再灌注损伤可造成 Caspase-3 表达的明显改变,除证明动物模型的可靠性外也印证了既往学者在该领域的研究。

DG 为中药甘草有效成分的第三代提取物,化学结构与醛固酮相似,具有较强的非特异性抗炎作用^[8],其抗炎作用与皮质醇类似,可减少肝细胞的水肿、坏死,同时调节内源性类固醇水平,无盐皮质激素样副作用;可抑制肥大细胞释放组织胺、花生四烯酸和前列腺素 E2,起到镇痛作用,使过敏物质生成减少而起到抗过敏作用;DG 还能

诱导人末梢血淋巴细胞和 NK 细胞产生 γ -干扰素,具有保护肝细胞和溶酶体膜结构及改善肝功能的作用;能阻滞钙离子内流,以减轻脏器细胞的损害。Yuan 等^[9]在大鼠溃疡性结肠炎模型研究中发现 DG 可以减轻炎性损伤,与 NF- κ B、TNF- α 和 ICAM-1 被抑制有关。刘亚军等^[10]发现 DG 对大鼠脑缺血再灌注损伤后具有显著的抗血管内皮细胞与白细胞的粘附作用。表明 DG 可以从多种途径来发挥保护细胞的作用,其可能的机制为抗炎、抗过敏、保护细胞膜、抑制钙离子内流等,临床上主要应用于急慢性肝炎、荨麻疹。本研究表明,在 SCI 后 Caspase-3 的表达随时间延长表达增加,于第 7 天达到高峰。给予 DG 干预后,大鼠脊髓前角神经元细胞 Caspase-3 的表达在 24、72、168h 时间段上都有显著性下降。这说明 DG 具有明显抑制凋亡信号转导通路下游 Caspase-3 表达的作用。由此可推测 DG 具有抑制脊髓前角运动神经元凋亡的作用,并通过此途径来起到脊髓保护作用。

4 参考文献

1. Schwab ME. Repairing the injured spinal cord[J]. Science, 2002, 295(5557): 1029-1031.
2. 张子峰, 侯铁胜. 甲基强的松龙对大鼠脊髓缺血再灌注损伤后钙蛋白酶表达的影响[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2006, 16(Suppl): 70-72.
3. Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS. A comparison of YM-14673, U-50488H, and nalmefene after spinal cord injury in the rat[J]. Exp Neurol, 1993, 119(2): 258-267.
4. Wang J, Zheng Q, Zhao M, et al. Neurocyte apoptosis and expressions of caspase-3 and Fas after spinal cord injury and their implication in rats [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2006, 26(6): 709-712.
5. Springer JE, Azbill RD, Knapp PE. Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury [J]. Nat Med, 1999, 5(8): 943-946.
6. Liu L, Pei FX, Tang KL, et al. Expression and effect of Caspase-3 in neurons after tractive spinal cord injury in rats[J]. Chin J Traumatol, 2005, 8(4): 220-224.
7. Kiyoshima T, Fukuda S, Matsumoto M, et al. Lack of evidence for apoptosis as a cause of delayed onset paraplegia after spinal cord ischemia in rabbits [J]. Anesth Analg, 2003, 96(3): 839-846.
8. 王吉耀, 刘厚与, 胡德昌, 等. 强力宁对乙型慢性肝炎的治疗作用[J]. 中华传染病杂志, 1991, 9(4): 208-210.
9. Yuan H, Ji WS, Wu KX, et al. Anti-inflammatory effect of di-ammonium glycyrrhizinate in a rat model of ulcerative colitis [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(28): 4578-4581.
10. 刘亚军, 高俊. 甘草酸二铵对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后 ICAM-1 mRNA 的表达与白细胞浸润的影响[J]. 数理医药学杂志, 2004, 17(5): 460-461.

(收稿日期: 2007-10-18 修回日期: 2008-01-08)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

第 3 届湘雅国际脊柱外科学术大会 暨 2009 中国骨科医师协会(长沙)脊柱外科新技术培训班通知

随着脊柱外科新技术的不断进步及脊柱外科新手术在各级医院的逐步开展,使该专业的治疗水平得到很大的提高。但随着技术使用的深入和病例数的增加,也暴露出相关问题。有鉴于此,我们在成功举办前两届会议的基础上,拟于 2009 年 1 月 9~11 日,举办“第 3 届湘雅国际脊柱外科学术大会暨 2009 中国骨科医师协会(长沙)脊柱外科新技术培训班”。本次大会将邀请国内外脊柱外科领域的多位著名专家到会演讲、授课,将就脊柱外科领域疾病的诊断、手术指征的把握、手术策略的制定、术中陷阱的防范及手术并发症的防治等方面展开深入的讨论。

会议征文: 脊柱外科临床新理论、新经验、新技术及基础研究新进展; 稿件通过 E-mail 发至 xiangyaspine@163.com。截稿日期: 2008 年 12 月 10 日。通讯地址: 湖南省长沙市湘雅路 87 号, 中南大学湘雅医院脊柱外科, 邮编 410008。联系人: 刘少华(13054178014), 郭超峰(13873167839), 张宏其(13707313601)。会议时间: 2009 年 1 月 9~11 日, 地点: 长沙好来登大酒店, 注册费: 700 元/人, 食宿统一安排, 费用自理。2009 年 1 月 9 日 11:00~21:00 在好来登酒店一楼报到、注册。参会代表将授予国家级 I 类继续教育学分证书。详情请登录湘雅脊柱外科中心网: [Http://www.xiangyaspine.com](http://www.xiangyaspine.com)。期待您的积极参与、交流, 以便共同进步, 造福患者。