

复方丹参对大鼠脊髓损伤后细胞凋亡及诱导型一氧化氮合酶表达的影响

刘世清, 赵东明, 王海斌, 周 华

(武汉大学人民医院骨科 430060 武汉市)

【摘要】目的:探讨大鼠脊髓损伤后应用复方丹参对细胞凋亡及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达的影响。**方法:**成年大鼠随机分为正常组、脊髓损伤后应用复方丹参组(A组)和应用生理盐水对照组(B组),损伤后不同时间点(8h、1d、3d、7d、14d、28d)处死大鼠,用HE染色观察损伤脊髓组织病理变化,原位末端标记法(TUNEL法)标记凋亡细胞,用免疫组化染色检测iNOS阳性细胞。**结果:**HE染色镜检发现脊髓组织病理学改变A组明显轻于B组。A、B两组均发现凋亡细胞及iNOS表达,神经细胞凋亡指数及iNOS表达均为B组>A组($P<0.01$)。**结论:**复方丹参能抑制大鼠脊髓损伤后细胞凋亡及iNOS表达。

【关键词】脊髓损伤;复方丹参;凋亡;诱导型一氧化氮合酶;大鼠

中图分类号:R683.2,R695 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2005)-02-0109-04

Effect of salvia miltiorrhiza on apoptosis and expression of iNOS after spinal cord injury in rats/LIU Shiqing, ZHAO Dongming, WANG Haibin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15(2): 109~111, 116

【Abstract】 Objective:To investigate the effect of salvia miltiorrhiza on apoptosis and expression of iNOS after spinal cord injury (SCI) in rats.**Method:**Adult SD rats were divided at random into three groups;with Allen's weight drop to cause spinal cord injury and use salvia miltiorrhiza group(group A)、use normal saline group (group B) and normal group.After operation,the rats were sacrificed at 8 hours and 1,3,7,14,28 days after surgery,then the tissue sections were stained with hematoxylin and eosin,immunohistochemistry and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling method,and the injured spinal cord tissue was observed.**Result:**The histopathology changes in spinal cord tissue observed with HE staining microscopic examination in group B was worse than that in group A.Expression of apoptotic cells and iNOS were observed in the two groups,and the apoptotic index and expression of iNOS on group B is higher than that in group A ($P<0.01$).**Conclusion:**Salvia miltiorrhiza could inhibit apoptosis and expression of iNOS after spinal cord injury in rats.

【Key words】 Spinal cord injuries;Salvia miltiorrhiza;Apoptosis;Inducible nitric oxide synthase;Rat

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430060 China

大量研究表明,除了急性机械性组织损伤及随后炎症反应的被动过程,细胞凋亡这一主动性细胞死亡方式对脊髓损伤(SCI)后神经功能损害起重要作用^[1]。一氧化氮(NO)与细胞凋亡的关系一直是研究的热点,二者在SCI继发性损害中的作用日益受到关注。实验证实过量NO可诱导细

胞凋亡^[2],而细胞凋亡被认为是脊髓损伤继发性改变的重要方式。已有研究证实复方丹参具有改善微循环、抗脂质过氧化和提高超氧化物歧化酶活性、清除损伤后血液和脊髓组织中的自由基、阻止钙超载所引发的一系列病理生理损害以及抑制脑神经细胞凋亡的作用^[3-6]。本实验旨在观察脊髓损伤后应用复方丹参对细胞凋亡及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达的影响,探讨复方丹参治疗急性脊髓损伤的机制。

基金项目:湖北省卫生厅资助课题(W99001)

第一作者简介:男(1945-),教授,博士生导师,研究方向:脊髓损伤

电话:(027)88073477 E-mail:liushq@163.com

1 材料与方法

1.1 动物及试剂

清洁级成年雄性 SD 大鼠, 体重 250~300g, 由武汉大学人民医院实验动物中心提供[许可证号: SCXK (鄂)2003-0005]。主要试剂为兔抗大鼠 iNOS 多克隆抗体及 SP 试剂盒 (购自北京中山生物技术有限公司)、TUNEL 试剂盒 (德国宝灵曼公司提供) 和复方丹参注射液 (上海通用药业有限公司生产, 批号 0308011)。

1.2 动物模型制作

将 65 只大鼠随机分为正常组 (5 只)、脊髓损伤后应用复方丹参组 (A 组, 30 只) 和应用生理盐水对照组 (B 组, 30 只)。A 组和 B 组均进行如下操作: 7% 水合氯醛 0.6ml/100g 腹腔注射麻醉大鼠, 将其俯卧固定于手术台上, 无菌条件下进行背中段正中切口, 显露 T9、T10 棘突椎板, 切除椎板, 暴露脊髓硬膜。用 Allen's 打击法 (10g 重锤从 2.5cm 高处落下所致的打击强度) 造成中度脊髓损伤模型。术毕肌注青霉素 3d (10 万 u/只/d), 室温保持在 20~25℃, 每天人工挤压膀胱排尿 1~2 次直至恢复自主排尿。A 组大鼠每只术前 30min 腹腔缓慢注射复方丹参注射液 300mg/kg, B 组静滴等量的生理盐水; 术后 A 组动物分别腹腔注射复方丹参注射液 50mg/kg, 每天 2 次, B 组在术后注射等量生理盐水, 共持续 10d。正常组仅行 T9、T10 椎板切除术。

1.3 病理学检查

脊髓损伤大鼠分别于术后 8h、1d、3d、7d、14d、28d (每个时间点 5 只) 麻醉下剖胸, 心脏插管, 先灌注生理盐水约 200ml 冲洗 (至流出液呈清亮), 再用 4% 多聚甲醛约 200ml 灌注固定, 解剖椎管取出损伤段脊髓, 再置于 4% 多聚甲醛液内进行后固定。将损伤段及损伤上下段各约 0.5cm 常规石蜡包埋, 4μm 连续切片。所有部位切片均进行 HE 染色, 观察病理改变。

1.4 免疫组化检查

染色按 SP 染色试剂盒 (北京中山公司) 说明操作, 一抗的工作浓度为 1:100, 最后用二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 苏木素复染, 封片。以 PBS 代替一抗作阴性对照, 阳性细胞胞浆棕黄色染色。每张切片随机选取 10 个不重叠 400 倍视野, 采用全自动图像分析仪, HPIAS-2000 型图像分析软件, 分别扫描记录阳性细胞的吸光度 (A 值), 取其平均

值作为此切片 iNOS 的相对含量。

1.5 细胞凋亡的原位检测

采用 TUNEL 法对大鼠脊髓损伤组织切片进行检测。在 TdT 介导下, 使生物素化的 dUTP 标记至 DNA 断裂后形成的 3'-OH 末端, 借助生物素与亲合素的特异结合, 使辣根过氧化物酶连接至 DNA 断点, 最后加入底物。DAB 显色, 苏木素复染, 同时设立阳性对照及阴性对照片。阳性细胞核呈棕黄色颗粒状。显微镜高倍视野 (×400) 下计算凋亡指数 (apoptosis index, AI), 即每组选 5 张切片, 每张切片随机选取 10 个不重叠 400 倍视野, 计算平均阳性细胞数。

1.6 统计学处理

应用 SPSS 11.5 版本统计软件进行统计分析, 各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, iNOS 阳性细胞率及神经细胞凋亡指数在 A、B 两组间比较采用独立样本 *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

2.1 病理学改变

光镜下见 B 组大鼠脊髓组织有较多片状出血及出血坏死后形成的囊腔, 组织疏松水肿, 神经细胞变性, 细胞肿胀较重, 部分神经纤维溶解消失, 炎症细胞浸润明显 (图 1, 后插页 II)。A 组大鼠脊髓组织点灶状出血、坏死, 范围较局限, 组织水肿较轻, 空泡变性较少, 神经细胞肿胀较轻 (图 2, 后插页 II)。正常组脊髓组织未见出血、坏死及组织水肿、变性等损伤表现。

2.2 免疫组化检测 iNOS 表达

见表 1。iNOS 阳性细胞主要见于神经元、神经胶质细胞、血管内皮细胞等。B 组大鼠脊髓损伤后 8h 上述细胞 iNOS 表达增加, 3d 达较高水平 (图 3, 后插页 II), 7d 达高峰, 以后逐渐降低; A 组大鼠脊髓 iNOS 表达较 B 组低 (图 4, 后插页 II), 高峰亦发生在损伤后 7d。A、B 两组间比较有显著性差异 (P<0.01)。正常组仅发现极少量的 iNOS 阳性细胞。

2.3 TUNEL 原位末端标记结果

见表 2。B 组大鼠脊髓损伤后 8h 在灰质及白质中可见散在的 TUNEL 阳性细胞, 损伤 3d 凋亡指数达较高水平, 7d 达高峰 (图 5, 后插页 II), 以后逐渐下降; A 组大鼠脊髓神经细胞凋亡较 B 组

表 1 三组大鼠 iNOS 阳性细胞吸光度

组别	iNOS 阳性细胞吸光度 (%)		
	正常组	复方丹参组	生理盐水组
	4.87±1.65		
伤后 8h		18.76±5.32	20.59±6.34
1d		22.15±7.24 ^①	29.85±7.75
3d		30.03±7.32 ^②	39.82±7.21
7d		43.04±8.65 ^②	53.85±7.95
14d		24.35±6.95 ^①	32.82±7.56
28d		16.31±5.11 ^①	21.75±6.25

注:各时间点复方丹参组、生理盐水组与正常组比较 $P<0.01$;与生理盐水组比较^① $P<0.05$,^② $P<0.01$

表 2 三组大鼠细胞凋亡指数

组别	细胞凋亡指数 (%)		
	正常组	复方丹参组	生理盐水组
	1.24±0.21		
伤后 8h		15.34±3.41 ^①	19.46±3.85
1d		27.28±3.52	29.52±4.73
3d		35.48±4.54 ^②	42.34±4.64
7d		37.83±5.80 ^②	45.48±5.50
14d		25.65±4.95 ^②	32.56±5.45
28d		10.24±3.08 ^①	13.45±3.21

注:各时间点复方丹参组、生理盐水组与正常组比较 $P<0.01$;与生理盐水组比较^① $P<0.05$,^② $P<0.01$

少(图 6,后插页 II),凋亡指数高峰亦发生在损伤后 7d,以后逐渐降低。A、B 两组间比较差异有显著性($P<0.01$)。正常组仅有少量散在的 TUNEL 阳性细胞。

3 讨论

细胞凋亡是一种细胞主动死亡方式,在生理状态有三种主要机能:淘汰机体反应差、受损伤后不能恢复的细胞;平衡机体过度增生的各类细胞(如炎性细胞);凋亡细胞不发生破裂,被吞噬细胞吞噬后不引起炎症反应。与坏死细胞被吞噬过程完全不同,故可有效限制炎症保护机体。然而在严重损伤时,细胞内外环境发生极度紊乱,细胞凋亡出现严重异常,可产生凋亡过快或延迟、凋亡比例过多或清除障碍,进而产生机体组织继发性损伤改变。研究脊髓损伤后神经细胞凋亡最主要的是认识继发性改变机制,了解脊髓原始损伤后自毁过程,分析影响细胞凋亡因素,探索抑制影响因素的各种方法,改善、预防脊髓组织继发性不良变化。

脊髓损伤后多种因素都可诱导神经细胞凋亡。近来,随着对一氧化氮(NO)研究的深入,其在继发性脊髓损伤中的作用日益受到重视。NO 与细胞凋亡的关系是目前 NO 生物学研究的前沿领域。体内大量的 NO 可诱导细胞凋亡,NOS 是体内催化 L-精氨酸合成 NO 的关键酶,iNOS 在生理状态下表达量较低,但缺血、缺氧、外伤以及内毒素、细胞因子等刺激可诱导其表达。Xu 等^[7]用免疫组化和 Western blot 方法检测脊髓损伤后 iNOS 及蛋白氧化应激代谢产物亚硝基酪氨酸表达时发现二者均于损伤后 1d 增加,7d 达高峰;而且 iNOS 表达强度与其活性检测在时间变化上是一致的。敖强等^[8]用免疫组化、Western blot 方法检测脊髓损伤后 iNOS、P53 阳性细胞和蛋白表达及 TUNEL 法标记凋亡细胞时发现,脊髓损伤后 iNOS 表达与神经细胞凋亡指数及脊髓损伤程度呈正相关,提示 iNOS 表达增加可能在脊髓继发损伤的发生发展中起重要作用,抑制 iNOS 可能是防治脊髓继发损伤的有效方法。另外,脊髓损伤后,由于损伤组织缺血、缺氧的继发性病理改变,造成组织内氧自由基产生增加,清除能力下降,导致氧自由基聚集。这种氧化应激(oxidative stress)能诱导神经细胞凋亡^[9],也是造成中枢损伤后继发性病理损害的主要机制之一。

复方丹参注射液主要由丹参酮、隐丹参酮等脂溶性成分和丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛等水溶性成分组成。复方丹参具有改善微循环,抗脂质过氧化和提高超氧化物歧化酶活性,清除损伤后血液和脊髓组织中的自由基,阻止钙超载所引发的一系列病理生理损害以及抑制脑神经细胞凋亡的作用^[3-6]。本实验采用 TUNEL 原位末端标记法及免疫组化染色法观察了大鼠脊髓损伤后应用复方丹参对细胞凋亡及 iNOS 表达的影响,结果显示,脊髓损伤后应用复方丹参组神经细胞凋亡指数及 iNOS 表达均低于应用生理盐水对照组。复方丹参注射液对抗脊髓损伤细胞凋亡的可能机制如下:(1)清除氧自由基。氧自由基具有强烈引发脂质过氧化作用,在缺血再灌注条件下,可引发链式脂质过氧化反应,损伤细胞膜。复方丹参注射液中的丹参素是一种较强的超氧阴离子清除剂,而丹参酮亦能清除线粒体膜脂质过氧化作用产生的脂质自由基。(2)保护线粒体,改善能量代谢。

(下转第 116 页)

通路而实现其电生理作用和细胞保护作用的。

4 参考文献

1. Wang CX, Olschowka JA, Wrathall JR. Increase of interleukin-1 β mRNA and protein in the spinal cord following experimental traumatic injury in the rat [J]. *Brain Res*, 1997, 759(2): 190-196.
2. Kerchner GA, Wilding TJ, Li P, et al. Presynaptic kainate receptors regulate spinal sensory transmission [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(1):59-66.
3. 杨胜, 刘振伟, 张和平, 等. 快速老化小鼠海马神经元电压门控离子通道的特点[J]. *中国神经科学杂志*, 2003, 19(1):36-40.
4. Kimura M, Sawada K, Miyagawa T, et al. Role of glutamate receptors and voltage-dependent calcium and sodium channels in the extracellular glutamate/aspartate accumulation and subsequent neuronal injury induced by oxygen/glucose deprivation in cultured hippocampal neurons [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 285(1):178-185.
5. Yeziarski RP, Liu S, Ruenes GL, et al. Excitotoxic spinal cord

injury: behavioral and morphological characteristics of a central pain model [J]. *Pain*, 1998, 75(1):141-155.

6. Nesić O, Xu GY, McAdoo D, et al. IL-1 receptor antagonist prevents apoptosis and caspase-3 activation after spinal cord injury [J]. *J Neurotrauma*, 2001, 18(9):947-956.
7. Diem R, Hobom M, Grottsch P, et al. Interleukin-1 β protects neurons via the interleukin-1 (IL-1) receptor-mediated Akt pathway and by IL-1 receptor-independent decrease of transmembrane currents in vivo [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 22(4):487-500.
8. Plata-Salamán CR, French-Mullen JM. Interleukin-1 β inhibits Ca^{2+} channel currents in hippocampal neurons through protein kinase C [J]. *Eur J Pharmacol*, 1994, 266(1):1-10.
9. Sawada M, Hara N, Maeno T. Ionic mechanism of the outward current induced by extracellular ejection of interleukin-1 onto identified neurons of Aplysia [J]. *Brain Res*, 1991, 545(1-2): 248-526.

(收稿日期: 2004-07-07)

(英文编审 王忠植)

(本文编辑 卢庆霞)

(上接第 111 页)

线粒体是能量代谢和自由基产生的主要场所, 能由基相互作用, 互为因果, 促进脊髓损伤的发展, 而丹参素对线粒体呼吸链功能有明显保护作用。(3)减轻钙超负荷, 调节钙稳定。脊髓损伤后损伤组织存在严重的钙超载, 钙超载可造成能量代谢障碍, 促进氧自由基的大量产生, 增加膜磷脂的分解^[10]。复方丹参可抑制细胞内钙超载, 增加能量代谢, 减少膜磷脂的分解, 从而起到保护作用。(4)本实验结果证实, 复方丹参可抑制损伤脊髓组织内 iNOS 的过量表达, 抑制损伤组织的细胞凋亡。

综上所述, 复方丹参能对抗脊髓损伤后神经细胞凋亡, 并能显著抑制 iNOS 的过量表达, 进一步证实了复方丹参对脊髓损伤的保护作用。为临床应用丹参注射液治疗脊髓损伤提供了有力的实验依据。

4 参考文献

1. Martin LJ, Liu Z. Injury-induced spinal motor neuron apoptosis is preceded by DNA single-strand breaks and is P53- and Bax- dependent [J]. *J Neurobiol*, 2002, 50(3): 181-197.
2. Nishio E, Fukushima K, Shiozaki M, et al. Nitric oxide donor SNAP induces apoptosis in smooth muscle cells through

cGMP-independent mechanism [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 221(1):163-168.

3. 马永刚, 刘世清, 彭昊, 等. 复方丹参对大鼠实验性脊髓损伤的保护作用 [J]. *山东中医药大学学报*, 2002, 26(3):216-218.
4. 许翔, 江曙. 脊髓损伤后自由基变化及丹参对自由基影响和实验研究 [J]. *中国骨伤*, 1999, 12(5):16-18.
5. 王钢, 刘世清, 陶海鹰, 等. 丹参对兔脊髓损伤段钙水含量改变的保护作用 [J]. *武汉大学学报 (医学版)*, 2002, 23(1):51-52.
6. 朱健, 蔡文伟, 陈朝婷, 等. 丹参对衰老鼠海马神经细胞凋亡作用的研究 [J]. *中国老年学杂志*, 2001, 21(1):46-48.
7. Xu J, Kim GM, Chen SW, et al. iNOS and nitrotyrosine expression after spinal cord injury [J]. *J Neurotrauma*, 2001, 18(5): 523-532.
8. 敖强, 吕德成, 姜长明, 等. 大鼠脊髓损伤后细胞凋亡特点及其与一氧化氮合酶表达的相关性 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2003, 12(7):460-462.
9. Enokido Y, Hatanaka H. Apoptotic cell death occurs in hippocampal neurons cultured in a high oxygen atmosphere [J]. *Neuroscience*, 1993, 57(4):965-972.
10. Tymianski M, Tator CH. Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury [J]. *Neurosurg*, 1996, 38(6):1176-1195.

(收稿日期: 2004-05-08 修回日期: 2004-08-30)

(英文编审 王忠植)

(本文编辑 卢庆霞)