

外源性一氧化碳释放分子 2 对大鼠脊髓缺血再灌注损伤的保护作用研究^{*}

刘志刚,熊 敏[△],余化龙,曾 云(湖北医药学院附属东风医院骨科研究所,湖北十堰 442000)

【摘要】 目的 探讨外源性一氧化碳释放分子 2(CORM2)对大鼠脊髓缺血再灌注损伤的保护作用与相关机制。**方法** 将 30 只健康雄性 Wistar 大鼠分为实验组、对照组、空白组,每组各 10 只。实验组在造模前 1 h 尾静脉注射外源性 CORM2。实验组和对照组采用相同的方法造模。对照组造模后 1 h 注射与实验组相同剂量的生理盐水。空白组仅完成开腹和关腹操作,并术后 1 h 注射与实验组相同剂量的生理盐水。在术后不同时间进行神经行为学评分(Tarlov 评分)、脊髓组织病理学检查和白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)检测。**结果** 再灌注后不同时间点,实验组 Tarlov 评分均高于对照组,但实验组和对照组 Tarlov 评分均低于空白组($P < 0.05$)。缺血再灌注 48 h 后,对照组脊髓组织标本可见损伤及坏死神经元,表现为细胞核固缩或溶解,细胞质中的尼氏体消失;空白组脊髓组织标本中可见正常神经元,表现为结构呈多角形,细胞质中可见尼氏体;实验组脊髓组织标本中的神经元坏死表现介于对照组和空白组之间。缺血再灌注 48 h,实验组与对照组 IL-6、TNF- α 表达水平平均高于空白组,但实验组 IL-6、TNF- α 表达水平低于对照组($P < 0.05$)。**结论** 外源性 CORM2 可抑制炎症因子的表达,对大鼠脊髓缺血再灌注损伤具有一定的保护作用。

【关键词】 外源性一氧化碳释放分子 2; 脊髓缺血再灌注损伤; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- α

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.08.009 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)08-1048-03

Protective effects of exogenous carbon monoxide releasing molecules 2 in rat with spinal cord ischemia and reperfusion injury^{*} LIU Zhi-gang, XIONG Min[△], YU Hua-long, ZENG Yun(Institute of Orthopaedics, Affiliated Dongfeng Hospital of Hubei Medical College, Shiyan, Hubei 442000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effects of exogenous carbon monoxide releasing molecules 2 (CORM2) in rat with spinal cord ischemia and reperfusion injury. **Methods** A total of 30 healthy male Wistar rats were divided into experiment group, control group and blank group, with 10 rats in each group. Rats of experiment group were given exogenous CORM2 by intravenous injection 1 h before modeling. Same operation was performed in experiment group and control group to construct rat models. Rats in control group were injected the same dose of saline 1 h after the construction of models. Rat in blank group were given only abdominal operation without any other treatment, and were injected the same dose of saline 1 h after operation. At different time point of operation, evaluation of Tarlov scale, histopathology examination of myeloid tissue, and detection of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were performed. **Results** At different time point of reperfusion, Tarlov scores of experiment group were higher than control group, but those of the two groups were lower than blank group ($P < 0.05$). At 48 h after ischemia-reperfusion, damage of neuron in control group was obvious, which was not found in blank group, and the characteristics of neuron damage in experiment group were between control group and blank group. At 48 h after ischemia-reperfusion, levels of IL-6 and TNF- α in experiment group and control group were significantly higher than blank group, while those in experiment group were significantly lower than control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Exogenous CORM2 could be with protective effects of spinal cord ischemia-reperfusion injury, which might be dependent on the inhibition of the releasing of inflammatory cytokines.

【Key words】 exogenous carbon monoxide releasing molecules 2; spinal cord ischemia-reperfusion injury; interleukin-6; tumor necrosis factor- α

脊髓缺血是比较危重的疾病,可导致组织失活,乃至死亡^[1]。在脊髓缺血的病理生理学发病过程中,对组织造成损伤的主要因素是血液再次灌注后,大量释放的自由基所造成的严重细胞损伤^[2]。由于脊髓的神经元细胞对缺血缺氧极为敏感,

因此脊髓缺血再灌注损伤极易导致脊髓功能障碍和不可逆性脊髓神经元迟发性死亡^[3-4]。一氧化碳(CO)是一种生物信号分子,其活性受到血红素氧合酶(HO)的影响。HO是内源性CO的诱导酶,分为诱导型(HO-1)和结构型(HO-2)^[5]。在脊

^{*} 基金项目:湖北省十堰市科技局基金支持项目[十科发(2013)20号]。

作者简介:刘志刚,男,副主任医师/讲师,硕士,主要从事骨科疾病相关研究。

[△] 通讯作者, E-mail: xiongm4203@163.com。

髓组织缺血再灌注损伤过程中,HO-1 表达水平明显升高,阻断 HO-1 则显著加重组织损伤,间接证实 CO 对于组织缺血再灌注损伤具有保护作用^[6-7]。CO 可以促使血管平滑肌舒张,降低细胞间黏附分子 1(ICAM-1)的表达水平,进而抑制炎症细胞和血小板的聚集和黏附^[8]。此外,CO 可通过抑制核因子 κ B(NF- κ B) 信号途径实现保护效应,抑制炎症介质局部聚集^[9]。本研究探讨了外源性一氧化碳释放分子 2(CORM2)对大鼠脊髓缺血再灌注损伤的保护作用与相关机制。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性 Wistar 大鼠 30 只,体质量 220~260 g,由本院实验动物中心提供。

1.2 仪器与试剂 TB209312 型台式冷冻高速离心机购自美国 Beckman 公司,AB873011 型组织机械匀浆机购自上海瑞赛斯仪器有限公司。炎症因子白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)检测试剂盒购自北京华英生物技术研究所,丝裂原活化蛋白激酶 P38(MAPK P38)抗体购自碧云天生物技术研究所。经去 RNA 酶处理的二乙基焦磷酸胺(DEPC)及 Trizol 试剂购自北京赛百盛生物公司。转录试剂盒、核酸酶抑制剂及 Taq 酶购自日本宝生物工程有限公司。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。用于动脉结扎的 0、4、10 号爱惜康牌外科缝线购自美国强生公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组 将 30 只 Wistar 大鼠分为实验组、对照组、空白组,每组各 10 只。造模前 1 h,实验组按照 8 mg/kg 的剂量尾静脉注射浓度为 40 mmol/L 的外源性 CORM2。对照组及空白组在造模前不进行任何预处理。

1.3.2 动物模型制作 实验组及对照组大鼠经 10%水合氯醛麻醉后,仰卧固定。于左侧肋脊下缘肋中线切口,切口长度 5 cm,依次切开皮肤、腹肌后入腹,找到左侧肾后于肾门部位确定肾动脉,沿动脉游离至腹主动脉;分别使用 10、4、0 号外科缝线结扎动脉,结扎使用活结,留长线头于体外;依次关腹、缝皮后留置线头。于术后 30 min、45 min 和 1 h 抽线松节。实验组大鼠造模后不给予任何处理。对照组大鼠术后 1 h 注射与实验组相同剂量的生理盐水。空白组大鼠麻醉后仅完成开腹及关腹操作,术后 1 h 注射与实验组相同剂量的生理盐水,不对脊髓及血管进行操作。

1.3.3 观察指标 (1)神经行为学评分:实验组与对照组大鼠在松结后,即再灌注后 6、24、48 h,空白组大鼠在术后 6、24、48 h,参照 Tarlov 标准进行神经行为学评分并记录评分结果。0 级(0 分):无可察觉的后肢活动;1 级(1 分):有可察觉的微弱后肢活动,但无法对抗重力;2 级(2 分):后肢能对抗重力,但无法站立;3 级(3 分):可正常站立、行走,但不能正常跳跃;4 级(4 分):后肢功能完全恢复,能正常跳跃。(2)组织病理学检测:在完成神经行为学评分后处死大鼠,切除 L₂~L₄ 椎板,暴露 L₃~L₄ 节段硬膜囊,切断周围神经根;分离脊髓组织,10%甲醛固定 48 h,分节段石蜡包埋、切片,苏木精-伊红(HE)染色后采用光学显微镜及电子显微镜进行观察,计数正常神经元数目,观察神经元损伤情况。(3)炎症因子检测:取部分分离的脊髓组织,研磨、离心处理,提取细胞成分,给予刺激后检测 IL-6、TNF- α 表达水平。IL-6、TNF- α 检测严格按照试剂盒说明书操作。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据处理和统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模情况 在再灌注 48 h 后进行组织病理学检测,结果显示,对照组组织标本镜下可见损伤及坏死神经元,表现为细胞核固缩或溶解,细胞质中的尼氏体消失;空白组组织标本镜下可见正常神经元,表现为细胞呈多角形,细胞核结构清晰,细胞质中可见尼氏体;实验组组织标本坏死神经元的表现介于对照组与空白组之间,镜下可见部分神经元的细胞核固缩或溶解,但结构相对清晰,部分细胞的细胞质中可见尼氏体。见图 1、2。

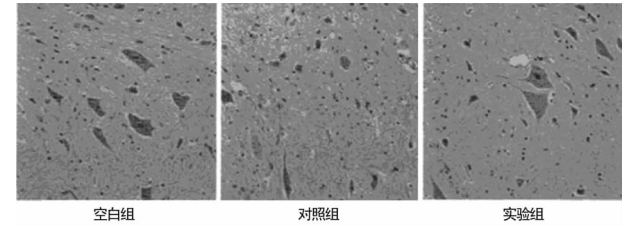


图 1 各研究组大鼠脊髓组织 HE 染色结果(400×)

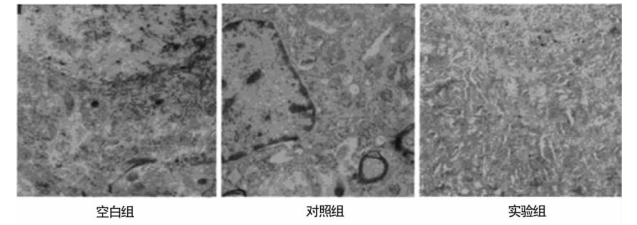


图 2 各研究组大鼠脊髓神经元细胞 HE 染色结果(5 000×)

2.2 神经行为评分 实验组大鼠各时间点 Tarlov 评分均高于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05);实验组和对照组大鼠各时间点 Tarlov 评分均低于空白组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。

表 1 3 组大鼠不同时间点 Tarlov 评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	再灌注 6 h	再灌注 24 h	再灌注 48 h
实验组	10	2.17±0.23	2.78±0.45	3.23±0.34
对照组	10	1.67±0.43	2.16±0.53	2.45±0.45
空白组	10	3.94±0.44	3.97±0.45	3.95±0.42
<i>F</i>		12.983	10.376	7.334
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

2.3 炎症因子表达水平 再灌注 48 h 后,实验组与对照组 IL-6、TNF- α 表达水平均高于空白组,且实验组 IL-6、TNF- α 表达水平低于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 2。

表 2 3 组大鼠再灌注 48 h 后 IL-6 和 TNF- α

表达水平比较(ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-6	TNF- α
实验组	10	7.34±2.13	6.49±1.68
对照组	10	13.67±3.89	11.76±3.22
空白组	10	3.98±1.76	2.76±0.78
<i>F</i>		10.783	12.897
<i>P</i>		<0.05	<0.05

3 讨 论

脊髓缺血再灌注损伤是脊柱外科手术常见的创伤之一,其损伤机制尚未完全明确^[10]。普遍认为脊髓缺血再灌注损伤机制涉及炎症因子与趋化因子表达水平的变化,细胞内外离子水平的变化,脊髓局部脂质过氧化和自由基的产生等^[11-12]。

本研究采用外源性 CORM2 作为 CO 供应源,具有以下优势。(1)外源性 CORM2 在溶解于二甲基亚砜后,其羰基被取代并释放 CO,且 CO 释放时间可以持续 24 h 以上^[13-14]。采用外源性 CORM2 作为 CO 供应源可确保在较长时间内均有足量的 CO 供应。(2)粉末状外源性 CORM2 制剂更易于实现量化控制,更加精确。(3)采用液体制剂静脉注射的方式释放 CO,比 CO 吸入给药具有更高的安全性和可操作性,临床价值也更加显著。此外,与 CO 吸入给药相比,静脉注射外源性 CORM2 可以实现长期小剂量给药,不仅避免了使用呼吸机,方便了动物模型的构建,也不会损伤肝脏、肾脏,避免对研究结果造成影响^[15]。

本研究以动物模型为基础,分析了外源性 CORM2 释放的 CO 在大鼠脊髓缺血再灌注损伤中的保护作用。CO 可以通过环磷酸鸟苷(cGMP)途径发挥调节作用。CO 进入细胞后,与细胞内可溶性鸟苷酸环化酶的血红素基团中的 Fe 结合,通过调节离子通道产生多种生物学效应。此外,CO 可通过一氧化氮合成酶(NOS)-cGMP 途径发挥调节作用,同时降低诱导型 NOS(iNOS)和 HO-1 表达水平,抑制 iNOS 和 HO 的破坏作用,间接保护神经细胞。本研究结果显示,在不同再灌注时间点,实验组大鼠 Tarlov 评分均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),且实验组和对照组大鼠在不同再灌注时间点的 Tarlov 评分均低于空白组,差异有统计学意义($P < 0.05$);此外,组织病理学检查结果显示,在缺血再灌注 48 h 后,对照组大鼠脊髓神经元损伤及坏死较为明显,空白组大鼠几乎不发生神经元损伤,而实验组大鼠神经元损伤表现介于对照组和空白组之间。

在缺血再灌注过程中,NOS-cGMP 途径发挥了重要的调节作用,包括抑制细胞内 NF- κ B 的表达,降低 ICAM-1 等黏附因子的表达,减少炎症因子 IL-6、TNF- α 的释放,以及促进过氧化物的清除,从而减低氧自由基水平等。外界刺激信号可作用于细胞内多种信号转导通路,并最终将信号传导至细胞核内,从而促进 IL-6、TNF- α 等炎症因子的产生和释放^[16]。抑制炎症因子的产生,可降低组织内多形核中性粒细胞的活化水平和聚集能力,避免组织结构和功能损伤,实现组织保护作用。本研究中 IL-6 和 TNF- α 检测结果显示,在缺血再灌注 48 h 后,实验组与对照组 IL-6、TNF- α 水平均高于空白组,差异有统计学意义($P < 0.05$),但实验组 IL-6、TNF- α 水平均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明外源性 CORM2 可抑制 IL-6、TNF- α 的表达。虽然在缺血及再灌注后应用外源性 CORM2 对组织具有一定的保护作用,但组织损伤已经产生,因此 CO 的保护作用有所减弱。

综上所述,外源性 CORM2 可抑制炎症因子的表达,因此对大鼠脊髓缺血再灌注损伤具有一定的保护作用。

参考文献

[1] Pignataro G, Meller R, Inoue K, et al. In vivo and in vitro characterization of a novel neuron protective strategy for

stroke; ischemic post conditioning[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(11): 232-241.

[2] Gao X, Ren C, Zhao H. Protective of ischemic post conditioning compared with gradual reperfusion or preconditioning[J]. J Neurosci Res, 2008, 86(11): 2505-2511.

[3] Schumann J, Alexandrovich GA, Biegon A, et al. Inhibition of NR2B phosphorylation restores alterations in NMDA receptor expression and improves functional recovery following traumatic brain injury in mice[J]. J Neurotrauma, 2008, 25(8): 945-947.

[4] Yu QJ, Hu J, Yang J, et al. Protective effect of propofol preconditioning and post conditioning against ischemic spinal cord injury[J]. Neural Regen Res, 2011, 6(12): 951-955.

[5] Kesslak JP, Keirstead HS. Assessment of behavior in animal models of spinal cord injury[J]. J Spinal Cord Med, 2003, 26(4): 323-325.

[6] Dong HI, Xiong LZ, Zhu ZH, et al. Preconditioning with hyperbaric oxygen and hyperoxia induces tolerance against spinal cord ischemia in rabbits[J]. Anesthesiology, 2002, 96(4): 907-908.

[7] 卢鹏, 权正学, 刘渤. 脊髓损伤动物模型的制备及评价[J]. 颈腰痛杂志, 2008, 29(5): 480-481.

[8] 薛晶, 冯加纯, 杨艺敏, 等. 脑缺血再灌注后炎症和自由基作用的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(6): 644-646.

[9] Otterbein LE, Bach FH, Alam J, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway[J]. Nat Med, 2010, 6(2): 422-428.

[10] Ryter SW, Otterbein LE. Carbon monoxide in biology and medicine[J]. Bioassays, 2004, 26(3): 270-280.

[11] 仇雪枫, 刘大东, 孙炳伟, 等. 外源性一氧化碳释放分子 2 对大肠杆菌活力及毒力的作用[J]. 中华烧伤杂志, 2013, 29(2): 152-157.

[12] 徐银良, 姚猛, 周昌伟. 神经干细胞对脊髓损伤修复的潜在作用与应用前景[J]. 中国医师进修杂志, 2014, 37(5): 72-74.

[13] 徐丽, 鲍红光, 张勇, 等. 外源性一氧化碳释放分子对脓毒症大鼠肺组织高迁移率族蛋白 B1 表达的影响[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(6): 2981-2985.

[14] 陈涵, 王强. 氢水和高压氧预处理对肠缺血再灌注损伤保护作用的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2010: 67-69.

[15] 高亚棉, 檀国军. MBP 与 HO-1 在复发缓解型 EAE 大鼠长期、自然病程中的表达及 α -硫辛酸的保护作用[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2011: 67-69.

[16] 黄庆升, 邓冰清, 聂如琼. 一氧化碳对人外周血内皮祖细胞功能及 NO 生成的影响[J]. 岭南急诊医学杂志, 2014, 19(2): 86-87.