

阿魏酸对阻断兔主动脉血流所致脊髓神经元凋亡的影响

柯齐斌 江娅 黄海波 周青山 余奇劲 熊桂仙

【摘要】 目的 探讨阿魏酸对阻断家兔主动脉血流所致脊髓神经元凋亡的影响及其可能的作用机制。方法 将 24 只家兔按随机数字表法分为假手术组、缺血/再灌注(I/R)损伤组和阿魏酸组。采用阻断腹主动脉血流 40 min、再灌注 7 d 制备脊髓 I/R 损伤模型;阿魏酸组于阻断腹主动脉前 15 min 一次性静脉注射阿魏酸 50 mg/kg;假手术组仅松套腹主动脉,不阻断血流。分别测定腹主动脉阻断前 10 min(C-10)、开放前即刻(C40)及开放后 60 min(R60)和处死前即刻(R7d)血清丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平;检测脊髓凋亡神经元以及 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达;观察术后动物后肢神经功能评分。结果 ①I/R 损伤组 MDA 含量明显高于 C-10 值及假手术组相应时间点值($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),SOD 活性变化与 MDA 变化相反;阿魏酸组 MDA 含量明显高于 C-10 值($P < 0.05$),但显著低于 I/R 损伤组相应时间点值($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),较假手术组比较差异无显著性,SOD 活性变化与 MDA 变化亦相反。②I/R 损伤组 Bax 蛋白表达明显高于假手术组($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白表达则明显低于假手术组($P < 0.01$);阿魏酸组 Bax 蛋白表达明显低于 I/R 损伤组,但显著高于假手术组($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),Bcl-2 蛋白表达明显高于 I/R 损伤组及假手术组(P 均 < 0.01)。③I/R 损伤组脊髓神经元凋亡指数明显高于假手术组($P < 0.01$);阿魏酸组明显低于 I/R 损伤组,但高于假手术组($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。④阿魏酸组瘫痪发生率明显低于 I/R 损伤组,其后肢神经功能评分明显高于 I/R 损伤组(P 均 < 0.01)。结论 阿魏酸能显著抑制阻断家兔主动脉所致脊髓神经元凋亡的发生,其机制可能与其通过抗氧化反应进而抑制 Bax 蛋白、增强 Bcl-2 蛋白的表达有关。

【关键词】 阿魏酸; 主动脉血流阻断; 缺血/再灌注损伤; 脊髓; 凋亡

Protective effect of ferulic acid on neuronal apoptosis of spinal cord subsequent to aortic blood cross-clamping in rabbits KE Qi-bin*, JIANG Ya, HUANG Hai-bo, ZHOU Qing-shan, YU Qi-jin, XIONG Gui-xian. * Department of Anesthesiology, Yichang Central People's Hospital, the First Clinical Medical College, China Three Gorges University, Yichang 443003, Wuhan, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the protective effect of ferulic acid on neuronal apoptosis of the spinal cord after aortic blood cross-clamping and its mechanism in rabbits. **Methods** Twenty-four rabbits were randomly divided into sham operation group, ischemia/reperfusion (I/R) injury group and ferulic acid group. Spinal cord I/R injury model was replicated by clamping blood of the infrarenal aorta for 40 minutes followed reperfusion for 7 days. Ferulic acid 50 mg/kg was injected 15 minutes before aortic clamping in ferulic acid group. The aorta was not clamped in sham operation group. Contents of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in plasma were assayed at 10 minutes before clamping (C-10), before removal of occlusion (C40), at 60 minutes (R60) and on the 7th day (R7d) after reperfusion. Apoptosis of neurones of spinal cord and the expressions of Bax and Bcl-2 protein were assayed by immunohistochemical technique. Neurologic function score of hind limb was observed after operation. **Results** ①The activity of MDA after I/R in I/R injury group was increased significantly compared with those before clamping and those in sham operation group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The activity of MDA in ferulic acid group was significantly higher than that at C-10 ($P < 0.05$), while significantly lower than those in I/R injury group at any time point ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but showed no significant difference compared with sham operation group. Changes in SOD activities were opposite to that of MDA. ②The expression of Bax protein in I/R injury group was increased significantly ($P < 0.05$), but the expression of Bcl-2 protein was decreased significantly compared with that in sham operation group ($P < 0.01$). In ferulic acid group, the expression of Bax protein was significantly lower than that in I/R injury group and higher than that in sham operation group ($P < 0.01$ and $P < 0.05$), and the expression of Bcl-2 protein was higher than those in I/R injury group and sham operation group (both $P < 0.01$). ③The index of neuronal apoptosis in I/R injury group was significantly higher than that in sham operation group ($P < 0.01$), and that in ferulic acid group was much lower than that in I/R injury group, but higher than sham operation group ($P < 0.01$ and $P < 0.05$). ④The degree of paralysis in ferulic acid group was significantly lower than that in I/R injury group, and a higher neurologic score was observed (both $P < 0.01$). **Conclusion** Ferulic acid can reduce the spinal cord neuronal apoptosis as a result of aortic occlusion in rabbits. The possible mechanism is that it decreases protein expression of Bax, increases that of Bcl-2 and enhances antioxidation.

【Key words】 ferulic acid; aortic blood cross-clamping; spinal cord ischemia/reperfusion injury; apoptosis

在胸腹主动脉手术中常需阻断主动脉血流以便手术顺利实施,但是这一过程可导致不同程度的脊髓缺血/再灌注(I/R)损伤,其病理基础一般认为是脊髓神经元坏死。我们前期的研究显示,在脊髓 I/R 损伤中也存在脊髓神经元凋亡,特别是迟发性瘫痪与脊髓神经元凋亡密切相关^[1]。阿魏酸为中药当归水提物中重要的活性成分,现代医学认为其在器官 I/R 损伤中具有广泛作用。本实验旨在观察阿魏酸对阻断家兔主动脉血流所致脊髓神经元凋亡的影响,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备及分组:雄性日本大白兔 24 只,体重 2.5~3.5 kg。按照文献[1]方法和步骤制备脊髓 I/R 损伤模型。阿魏酸组阻断腹主动脉前 15 min 静脉注射阿魏酸 50 mg/kg 进行预处理,分别于阻断前 10 min(C-10)、开放前即刻(C40)、开放后 60 min(R60)以及处死前即刻(R7d)各取动脉血 2 ml,检测血清相关指标。观察 7 d 后处死动物取 T₁₁~L₅ 节段脊髓,分别用于制作光镜、免疫组化标本。

1.2 检测指标和方法:①血清丙二醛(MDA)用硫代巴比妥酸法;超氧化物歧化酶(SOD)用黄嘌呤氧化酶法。②脊髓组织免疫组化:用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)检测脊髓凋亡神经元,并在光镜下计数计算出凋亡指数;Bax 和 Bcl-2 蛋白表达用过氧化物酶法(SP),应用 HPIAS2000 图像分析系统测量其平均吸光度(A)值。③后肢神经功能评分:术后 48 h 内每 4 h 观察 1 次兔后肢神经功能,48 h 后则每日观察 1 次,依照 Tarlov 标准^[2]用单盲法记录神经功能评分(0 分为瘫痪;1 分为肌肉有张力,可以自由抽动;2 分为受累肢体可以负重;3 分为可以跛行;4 分为可以行走或奔跑但不灵活;5 分为功能完全正常)。

1.3 统计学处理:计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)

表示,凋亡指数用中位数(全距)表示,组间比较采用 t 检验,组内比较采用方差分析及 q 检验,动物瘫痪率比较用四格表精确概率法,神经功能评分及凋亡指数用秩和检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后各组动物后肢神经功能评分比较(表 1):阿魏酸组术后 7 d 内有 6 只正常,1 只术后 3 d 内评 3 分,1 只术后 7 d 内评 4 分;I/R 损伤组术后 3 d 内 6 只瘫痪,2 只术后 24 h 内评 2 分,2 d 后瘫痪;假手术组术后无瘫痪。阿魏酸组术后 0~24 h、24~48 h 及 2~7 d 的累计神经功能评分均明显高于 I/R 损伤组(P 均 < 0.01)。

表 1 术后各组动物后肢神经功能评分比较(n=8)

Table 1 Comparison of grade of crural nerve function of rabbits postoperation in each group(n=8)

组别	术后 0~24 h		术后 24~48 h		术后 2~7 d	
	瘫痪(只)	总分(分)	瘫痪(只)	总分(分)	瘫痪(只)	总分(分)
假手术组	0	280	0	240	0	200
I/R 损伤组	8 [#]	14 [#]	8 [#]	12 [#]	8 [#]	8 [#]
阿魏酸组	0 ^{△△}	273 ^{△△}	0 ^{△△}	234 ^{△△}	0 ^{△△}	184 ^{△△}

注:总分为同组动物在各时间段累计评分之和;与假手术组比较:[#]P < 0.01;与 I/R 损伤组比较:^{△△}P < 0.01

2.2 血清 MDA 含量、SOD 活性变化(表 2):I/R 损伤组 C40 及 R60、R7d MDA 含量较假手术组及 C-10 均明显升高;阿魏酸组 C40 时 MDA 含量明显高于 C-10、R60、R7d 迅速回降,C40、R60、R7d 均明显低于 I/R 损伤组同时间点值。I/R 损伤组 C40、R60、R7d 时 SOD 活性较假手术组及 C-10 均有显著降低;阿魏酸组各时间点 SOD 活性均较 C-10 略有降低,但较 I/R 损伤组同时间点显著升高(P < 0.05 或 P < 0.01)。

2.3 各组脊髓神经元凋亡指数以及 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达(表 3):I/R 损伤组脊髓神经元凋亡指数显著高于假手术组(P < 0.01);阿魏酸组显著低

表 2 各组血清 MDA 含量和 SOD 活性变化比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Change of serum MDA concentrations and SOD activities in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	MDA(μmol/L)				SOD(μU/L)			
	C-10	C40	R60	R7d	C-10	C40	R60	R7d
假手术组	110.54±29.79	108.36±25.23	105.88±23.68	112.78±30.56	248.28±40.64	250.30±48.12	252.47±39.62	249.64±40.12
I/R 损伤组	109.54±30.12	210.50±65.48 ^{#**}	200.45±50.76 ^{#**}	148.37±30.12 ^{#*}	250.12±46.35	180.38±20.89 ^{#**}	186.75±35.78 ^{#**}	208.63±45.12 ^{#*}
阿魏酸组	99.78±2.17	138.33±17.98 ^{△△}	109.09±35.34 ^{△△}	116.62±40.26 [△]	255.84±50.56	243.12±30.78 ^{△△}	240.63±35.66 ^{△△}	243.45±50.63 [△]

注:与假手术组比较:[#]P < 0.05, ^{**}P < 0.01;与 I/R 损伤组比较:[△]P < 0.05, ^{△△}P < 0.01;与本组 C-10 比较:^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01

基金项目:湖北省宜昌市科技攻关基金资助项目(A04303-10)

作者单位:443003 三峡大学第一临床医学院,湖北省宜昌市中心人民医院麻醉科(柯齐斌);430070 武汉大学人民医院(江娅,黄海波,周青山,余奇劲,熊桂仙)

作者简介:柯齐斌(1971-),男(汉族),湖北省人,副主任医师。

于 I/R 损伤组 ($P < 0.01$), 但明显高于假手术组 ($P < 0.05$)。相关分析显示, 凋亡指数与后肢神经功能累计评分呈显著负相关 ($r = -0.735, P < 0.05$)。I/R 损伤组 Bax 蛋白表达明显高于假手术组 ($P < 0.05$); 阿魏酸组显著低于 I/R 损伤组 ($P < 0.01$), 但高于假手术组 ($P < 0.05$)。I/R 损伤组 Bcl-2 蛋白表达显著低于假手术组 ($P < 0.01$); 阿魏酸组显著高于 I/R 损伤组和假手术组 (P 均 < 0.01)。

表 3 各组脊髓神经元凋亡指数及 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Expression of Bax and Bcl-2 protein and apoptosis index of neurons in spinal cord in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	Bax(A 值)	Bcl-2(A 值)	凋亡指数(%)
假手术组	0.103±0.015	0.095±0.018	3.55
I/R 损伤组	0.140±0.012 [#]	0.065±0.011 [#]	30.16 [#]
阿魏酸组	0.116±0.012 ^{#△△}	0.138±0.018 ^{#△△}	7.56 ^{#△△}

注:与假手术组比较; [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$; 与 I/R 损伤组比较; ^{△△} $P < 0.01$

3 讨论

阻断主动脉血流引起脊髓功能损伤的机制为脊髓缺血、缺氧及再灌注后继发性病理生理改变, 其病理学基础为脊髓神经元的死亡。Hayashi 等^[3] 研究证实, 脊髓 I/R 损伤后, 在死亡的神经元中有很大部分为凋亡神经元。Liu 等^[4] 将抗凋亡启动的药物试用于脊髓 I/R 损伤的防治也取得了良好的保护效果。本研究结果发现: I/R 损伤组脊髓凋亡神经元数量较假手术组明显增多, 且凋亡指数与术后动物后肢神经功能评分呈明显负相关, 提示细胞凋亡在脊髓 I/R 损伤中起重要作用; 阿魏酸组脊髓神经元凋亡指数明显低于 I/R 损伤组, 其后肢神经功能评分也显著高于 I/R 损伤组, 表明阿魏酸在一定程度上能减轻因 I/R 损伤引起的脊髓神经元凋亡程度, 从而起到保护脊髓功能的作用。

关于阿魏酸抑制 I/R 损伤引起的脊髓神经元凋亡的机制, 可能与脊髓 I/R 继发病理损伤有关。本研究结果中, I/R 损伤组 MDA 含量显著高于假手术组, SOD 活性显著低于假手术组; 阿魏酸组 MDA 含量则显著低于 I/R 损伤组, SOD 活性显著高于 I/R 损伤组, 提示在脊髓 I/R 损伤后组织中过氧化反应活跃, 阿魏酸能抑制 I/R 损伤后的过氧化反应。有研究显示, 在脊髓 I/R 损伤过程中, 过氧化反应毒性产物如 MDA 可攻击蛋白质、核酸等物质, 大量生成黄嘌呤、次黄嘌呤^[5], 使黄嘌呤氧化酶浓度显著升高, 促使大量氧自由基产生^[6], 启动线粒体途径的细胞凋亡^[7]。阿魏酸显著抑制缺血脊髓的过氧

化反应, 通过降低氧自由基生成而减少细胞凋亡的发生。阿魏酸清除氧自由基作用与其分子结构中酚羟基有关, 其机制: 一方面, 阿魏酸直接清除氧自由基, 减少氧自由基对细胞的损伤; 另一方面, 阿魏酸与膜磷脂乙醇胺结合使 MDA 产生减少^[8]。

Bax 和 Bcl-2 是在细胞凋亡线粒体途径中起重要调节作用的因子, 可直接或相互作用影响细胞凋亡, 且凋亡程度与二者比值有关^[9]。已知 Bax 为 Bcl-2 家族的重要成员之一, 而它却具有与 Bcl-2 相反的作用, 即较强的诱发细胞凋亡功能; Bax 促凋亡作用主要通过形成同源或异源二聚体实现^[10]。当有凋亡刺激因素存在时, 线粒体膜上的 Bax 表达增强, 其可活化天冬氨酸半胱氨酸特异性蛋白酶 (caspase), 引起细胞凋亡。Bcl-2 通过拮抗 Bax 以维持线粒体的完整性, 还可抑制细胞色素 C 的释放而抑制 caspase 的活化, 从而起抗凋亡作用。本实验中阿魏酸组 Bcl-2 蛋白表达明显高于 I/R 损伤组, Bax 蛋白表达较 I/R 损伤组显著减少, 可见阿魏酸能显著增强 Bcl-2 基因的抗凋亡作用, 但其机制不明, 还有待于进一步深入研究。

参考文献:

- 柯齐斌, 侯俊, 陈春, 等. 异丙酚对兔主动脉阻断脊髓细胞凋亡的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(7): 426-429.
- Jacobs T P, Kempinski O, McKinley D, et al. Blood flow and vascular permeability during motor dysfunction in a rabbit model of spinal cord ischemia[J]. Stroke, 1992, 23(3): 367-373.
- Hayashi T, Sakurai M, Abe K, et al. Apoptosis of motor neurons with induction of caspase in the spinal cord after ischemia[J]. Stroke, 1998, 29(5): 1007-1012.
- Liu X Z, Xu X M, Hu R, et al. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury[J]. J Neurosci, 1997, 17(14): 5395-5406.
- Schoenberg M H, Fredholm B B, Hohlbach G. Change in acid-base status, lactate concentration and purine metabolites during reconstructive aortic surgery[J]. Acta Chir Scand, 1985, 151(3): 227-233.
- Nielsen V G, Weinbroum A, Tan S, et al. Xanthine oxidoreductase release after descending thoracic aorta occlusion and reperfusion in rabbits[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1994, 107(5): 1222-1227.
- Kalyankrishna S, Parmentier J H, Malik K U. Arachidonic acid-derived oxidation products initiate apoptosis in vascular smooth muscle cells[J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002, 70(1-2): 13-29.
- 中国医学科学院药物研究所. 中草药现代研究(第 2 卷)[M]. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1996: 33-44.
- Wood D E, Thomas A, Devi L A, et al. Bax cleavage is mediated by calpain during durg-induced apoptosis[J]. Oncogene, 1998, 17(9): 1069-1078.
- 崔玉芳, 丁彦青, 张莹, 等. 致死剂量 γ 射线射小鼠脾淋巴细胞凋亡特征及与 Bax 和 Bcl-2 表达的关系[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(2): 109-112.

(收稿日期: 2006-10-28 修回日期: 2007-03-10)

(本文编辑: 李银平)