

· 药物研究 ·

白藜芦醇灌胃给药对大鼠脊髓损伤炎症反应中 MPO 和 CCO 的作用

梅红军* 刘洋 张卉
武汉市第五医院, 武汉 430050

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 06-0676-04

摘要: **目的** 探讨白藜芦醇灌胃(管饲)后对脊髓损伤后炎症反应中的髓过氧化物酶和细胞色素 C 氧化酶活性的影响。**方法** 2008 年 2 月至 2012 年 2 月在武汉大学人民医院动物实验中心将 96 只 Sprague-Dawley 健康成年雄性大鼠随机分成 4 组, 根据 Allen's 法制成中度脊髓损伤模型, 术后按照 100 mg/kg 立即管饲白藜芦醇或甲基强的松龙; 通过比色法观察脊髓损伤 8 h, 1 d, 3 d 及 7 d 后白藜芦醇组髓过氧化物酶和细胞色素 C 氧化酶活性的变化, 并与甲基强的松龙组进行疗效对比。结果 在脊髓损伤管饲后 8 h, 1 d, 3 d 及 7 d 白藜芦醇组髓过氧化物酶和细胞色素 C 氧化酶活性与损伤组统计学上具有显著性差异($P < 0.01$), 显示白藜芦醇管饲后对脊髓损伤具有明显神经细胞保护作用, 而且损伤后 1 d 白藜芦醇组与甲基强的松龙组间统计学上具有显著性差异($P < 0.01$); **结论** 在脊髓损伤后管饲白藜芦醇, 能够有效降低髓过氧化物酶活性的升高幅度, 并提高细胞色素 C 氧化酶活性, 对损伤后脊髓起保护作用。

关键词: 脊髓损伤; 白藜芦醇; 髓过氧化物酶; 细胞色素 C 氧化酶

Effect of intragastric resveratrol on the activity of the myeloperoxidase and cytochrome C oxidase in inflammatory reaction after the spinal cord injury in rats

MEI Hongjun, LIU Yang, ZHANG Hui

The 5th Hospital of Wuhan, Wuhan 430050, China

Corresponding author: MEI Hongjun, Email: dreamingmhj@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of intragastric resveratrol on the activity of the myeloperoxidase (MPO) and cytochrome C oxidase (CCO) in inflammatory reaction after the spinal cord injury in rats. **Methods** A total of 96 adult male Sprague-Dawley rats, which were selected from February 2008 to February 2012 in the Animal Department of People's Hospital of Wuhan University, were randomly divided into 4 groups. The model of moderate spinal cord injury was established according to Allen's technique. Rats were fed with resveratrol (100 mg/kg) or methylprednisolone sodium (MPSS, 100 mg/kg) through the tube. At the 8th h, the 1st d, the 3rd d, and the 7th d after the spinal cord injury, the changes of MPO and CCO activity were observed using colorimetry and compared between the two groups. **Results** The difference of the activity of MPO and CCO between the two groups was significant at the 8th h, the 1st d, the 3rd d, and the 7th d after the spinal cord injury ($P < 0.01$), indicating an protective effect of resveratrol on nerve cells after the spinal cord injury. Moreover, the difference of the effect between the resveratrol group and the MPSS group was observed at the 1st d after the spinal cord injury ($P < 0.01$). **Conclusion** Resveratrol can protect the nerval cells after the spinal cord injury by inhibiting the activity of MPO and improving the activity of CCO.

Key words: Spinal cord injury; Resveratrol; Myeloperoxidase; Cytochrome C oxidase

脊髓损伤(Spinal Cord Injury, SCI)是指由直接或间接外力损伤脊髓而在脊柱损害的相应节段出现各种运动、感觉及括约肌功能障碍和肌张力异常及

病理反射等。原发性损伤是永久性,继发性损伤具有可逆性、可控性和可复性^[1]。脊髓损伤机制复杂,有报道认为神经损伤及修复过程可以受到药物干预^[2]。20 世纪 70 年代,藜芦醇(Resveratrol, RES)首次于葡萄中提取,化学名为 3,5,4'-三羟基苯二烯,有一系列的衍生物,广泛存在于种子植物

基金项目: 武汉市卫生局项目(WX08D25)

* 通讯作者: 梅红军, Email: dreamingmhj@163.com

中,性结构以虎杖中含量最高^[3]。有报道认为白藜芦醇存在抗炎和脑神经保护作用^[4,5]。此外白藜芦醇口服后在肠道以葡萄糖醛酸酯形式易于吸收,能快速达到峰值,半衰期较短^[6]。现阶段脊髓损伤药物治疗的报道相当多^[7],但能够用于临床的药物非常少。甲基强的松龙(Methylprednisolone Sodium, MPSS)是唯一被美国联邦食品药品监督管理局批准的脊髓损伤治疗药物,效果明显,但是价格昂贵、并发症多、副作用大,不宜长久使用。

本实验组通过管饲方法研究白藜芦醇在损伤后脊髓组织炎症反应过程中髓过氧化物酶(Myeloperoxidase, MPO)及细胞色素 C 氧化酶(Cytochrome C Oxidase, CCO)的变化,探讨管饲白藜芦醇对损伤后大鼠脊髓神经细胞的影响,并探索白藜芦醇转化为口服药的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

髓过氧化物酶(MPO)ELISA 检测试剂盒和细胞色素 C 氧化酶(CCO)检测试剂盒均购于南京建成生物公司。自南京泽郎医药有限公司购买白藜芦醇(98% 以上)。MPSS 由浙江仙琚制药股份有限公司生产。上海精宏公司生产的隔水式电热恒温培养箱。

1.2 方法

于 2008 年 2 月至 2012 年 2 月在武汉大学人民医院动物实验中心选用 SPF 级雄性 SD (Sprague-

Dawley)大鼠 96 只,体重 250 ± 50g。采取随机区组设计随机分为 4 大组,即假手术组、损伤组、RES 组、MPSS 组;每组 24 只,每组据损伤后处死时间(8 h、1 d、3 d、7d)随机分为 4 个小组。据 Allen 重锤打击法原理,用自制改良打击器(圆形长金属杆,长度 15 cm,质量 10 g,末端打击面光滑,直径 2.5 mm;18 cm 引导管,内壁光滑,垂直支架固定),打击 T8 正对的后方硬脊膜,打击高度 30 mm,人工造成中度脊髓损伤。若大鼠出现双后腿痉挛性伸直并有明显摇尾现象,作为造模成功的标志(破坏硬脊膜完整者除外)。药物按 100 mg/kg 溶解于 20 mL 生理盐水中,术后立即管饲,每日 1 次性管饲 MPSS 或白藜芦醇,最后 1 次给药后至少 8h 处死大鼠。实验中未出现大鼠死亡及失踪情况。断头法处死大鼠,取出以 T8 为中心新鲜脊髓组织,称重后匀浆器中匀浆,制成 10% 脊髓组织匀浆液,离心并提取上清液,恢复匀浆液的体积,-20 ℃冰柜保存。再将上清液利用相应的试剂盒进行检测,最后以比色法测定脊髓组织 MPO 和 CCO 活性。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 16.0 版统计软件进行单因素方差分析,先后通过方差齐性检验($P > 0.05$)和方差分析($P < 0.05$),再采用 LSD 法进行样多本均数间多重比较,分析结果以($\bar{x} \pm s$)显示。

2 结果

2.1 髓过氧化物酶(MPO)活性

表 1 髓过氧化物酶活性($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Activity of myeloperoxidase ($n = 6, \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$) ($\bar{x} \pm s$)

组别(group)	8 h	1 d	3 d	7 d
Sham-oinjury	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01 ^⑤
	0.05 ± 0.06 ^⑤	1.16 ± 0.12 ^⑤	1.39 ± 0.16 ^⑤	1.03 ± 0.07 ^⑤
MPSS	0.31 ± 0.03 ^{①⑤}	0.74 ± 0.08 ^{②⑤}	1.13 ± 0.11 ^{①⑤}	0.89 ± 0.08 ^{①⑤}
RES	0.42 ± 0.03 ^{①③⑤}	0.84 ± 0.07 ^{②④⑤}	1.23 ± 0.09 ^{①⑤}	0.90 ± 0.06 ^{①⑤}

Note: Compared with the injuыр group, ^①: $P < 0.01$, ^②: $P < 0.05$; Compared with the MPSS group, ^③: $P < 0.01$, ^④: $P < 0.05$; Compared with the sham-operation group, ^⑤: $P < 0.01$

据上表(Table 1)可见脊髓损伤后损伤组 MPO 活性明显升高,3 d 达到高峰,其后逐渐减弱,7 d 活性明显减弱。RES 组及 MPSS 组 MPO 升高幅度被抑制,各时间点的 MPO 活性均降低,统计学上具有显著性差异($P < 0.05$),RES 组与 MPSS 组 8h 和 MPSS 组 3 d 及 7 d 时 MPO 活性统计学上具有极其

显著性差异($P < 0.01$),脊髓损伤,8h 及 1d 时 RES 组与 MPSS 组统计学上具有显著性差异($P_{8h} < 0.01$; $P_{1d} < 0.05$),但是 3 d 及 7 d 时两者并无显著性差异($P > 0.05$)。这表明管饲后,RES 组的与 MPSS 组结果类似,但在 8 h 及 1 d 时优于 MPSS 组。

2.2 细胞色素 C 氧化酶活性

表 2 细胞色素 C 氧化酶活性($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Activity of cytochrome C oxidase ($n=6$, $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$) ($\bar{x} \pm s$)

组别 (group)	8 h	1 d	3 d	7 d
sham+oinjury	1.83 ± 0.07	1.88 ± 0.17	1.91 ± 0.19	1.82 ± 0.04
	1.57 ± 0.07 ^④	1.51 ± 0.18 ^④	1.49 ± 0.08 ^④	1.34 ± 0.04 ^④
MPSS	1.67 ± 0.13 ^{②④}	1.70 ± 1.00 ^{②⑤}	1.76 ± 0.15 ^{①⑤}	1.43 ± 0.09 ^{②④}
RES	1.72 ± 0.08 ^{①⑤}	1.71 ± 0.14 ^②	1.81 ± 0.08 ^①	1.49 ± 0.06 ^{①④}

Note: Compared with the injuyr group, ^①: $P < 0.01$; ^②: $P < 0.05$; Compared with the MPSS group, ^③: $P < 0.05$; Compared with the sham-operation group, ^④: $P < 0.01$; ^⑤: $P < 0.05$

以上 (Table 2) 可见, 损伤组脊髓组织 CCO 活性逐渐下降, 7 d 时明显下降。脊髓损伤后 8 h, 1 d, 3 d 及 7 d 时 RES 组及 MPSS 组与损伤组间 CCO 活性明显提高, 统计学上具有极其显著性差异 ($P < 0.01$)。与 MPSS 组比较, RES 组在 8 h, 3 d 及 7 d 时统计学上不具有显著性差异 ($P > 0.05$), 管饲后两者存在明显相似性, 且 RES 组表现更佳; 但在 1 d 时统计学上具有显著性差异 ($P < 0.05$), 表明管饲后两者存在异质性, 两者作用机理可能存在一定程度不同。

3 讨论

脊髓继发性损伤的病理生理机制存在多种假说, 毛伯镛等^[8]总结有关理论主要有: (1) 创伤后缺血损伤, (2) 炎症损伤, (3) 钙内流超载损伤, (4) 自由基损伤, (5) 兴奋性氨基酸继发损伤, (6) 凋亡。上述各种理论实际上构成了一个密不可分的有机体, 共同介导了脊髓继发性损害的病理过程。原发性损伤因素不同, 导致继发性神经细胞凋亡的时空变化有所不同, 涉及到多种调控因子; 在这个过程中, 炎症反应具有重要的作用^[9]。

炎症 (Inflammation) 是机体常见的一个病理过程, 可以发生于各组织和器官, 实质上贯穿机体与致炎因子相互作用全过程。脊髓缺血或损伤时, 免疫屏障遭到破坏, 免疫细胞侵入, 引发血管内皮损伤、血管通透性改变、水肿、炎性介质释放、外周中性粒细胞及巨噬细胞趋化以及脊髓内固有的小胶质细胞活化等一系列炎症反应^[10]。脊髓组织的免疫细胞及外周浸润的中性粒细胞既可介导损害性免疫反应而加重脊髓损伤, 又能在脊髓伤后的重建过程中发挥组织修复的重要作用^[11]。中性粒细胞是是急性炎症反应的主要炎症细胞, 在伤后第一个进入损伤部位, 于 1d 时达高峰, 3d 后开始逐渐减少^[12];

MPO 是中性粒细胞的特征性酶, 中性粒细胞进入外周循环前由骨髓内合成, 并贮存于中性粒细胞的嗜天青颗粒中, 反应了中性粒细胞的浸润程度及

活性^[13]。MPO 在吞噬细胞内催化形成具有氧化能力的自由基, 杀灭微生物; 但是若催化反应生成过量的氧化剂, 超过机体防御能力, 就会导致氧化应激反应, 造成炎症反应过程中的氧化损伤^[14]。

本实验证实脊髓损伤后 MPO 活性逐渐升高, 3 d 达到高峰, 其后逐渐减弱, 7 d 活性明显减弱; 管饲后 RES 能够明显降低 MPO 的升高幅度 ($P < 0.01$), 这既可以减轻炎症反应中过度应激损害, 减轻继发性脊髓损伤, 同时保障了脊髓组织炎症反应时足够的修复能力。实验中未发现不良反应。此外还发现 RES 能够达到 MPSS 作用效果, 但是在损伤 24 h 内两者仍然存在差别 ($P_{8h} < 0.01$, $P_{1d} < 0.05$), 表明两者在炎症反应中的作用机制存在不同。

CCO 是真核生物线粒体内膜和需氧菌细胞膜电子传递链终端酶, 系统名称为“亚铁细胞色素 C 氧气氧化还原酶”, 由线粒体基因组与核基因组各自编码的亚基共同组成的复合物^[15]。CCO 结合来自基质内的 4 个质子, 将一个氧气分子还原为两个水分子, 同时跨膜转运 4 个质子。以上过程既可部分减少细胞内氧自由基堆积, 又有利于形成跨膜的质子电化学势能差, 进而被三磷酸腺苷合酶 (ATP Synthase) 用于制造生物体中最基本的能量分子三磷酸腺苷 (Adenosine Triphosphate, ATP), 改善缺血缺氧神经细胞的能量供应。

本实验结果表明脊髓损伤后 CCO 活性逐渐降低, 1d 处于峰值; 管饲后 RES 能够显著提高 CCO 活性 ($P < 0.01$), 既可减少脊髓组织氧气的堆积, 减轻了过度应激损害, 又增加了最基本的生物能量, 增强了炎症反应中的组织内氧化剂清除和组织修复过程中的能量供应, 显示出神经细胞保护效果。实验中没有发生生物毒性作用。同时本实验还发现 RES 作用效果仅部分时间点 ($P = 0.03$, $P_{1d} < 0.05$) 略强, 其他与 MPSS 类似, 表明两者具有不同的作用机制。

综上所述, 本实验中, RES 通过管饲 (灌胃) 后, 在脊髓损伤后各时点均明显降低 MPO 活性的增加

幅度,提高 CCO 活性,能够抑制炎症损害进程,增强炎症中修复能力,从而保护脊髓神经细胞,具有与 MPSS 的类似作用,但是作用时效存在差异,这为 RES 入药提供的实验依据。本实验证实白藜芦醇能够通过灌胃途径被吸收而发挥生物学作用,且实验结果与本文著者前期白藜芦醇腹腔注射作用相似^[16],并且具有口服制剂的特点。本实验组推测 RES 与 MPSS 能够通过干预 MPO 与 CCO,影响炎症反应进程和预后,从而发挥神经细胞保护作用。但是两者可能在炎症反应中的作用位点不同。

总之,白藜芦醇通过管饲能够被吸收,依然具有较高的生物安全性和生物学作用,可能通过调节髓过氧化物酶与细胞色素 C 氧化酶活性而干预脊髓组织的炎症反应,以保护损伤后的脊髓神经细胞;有利于白藜芦醇口服制剂的研制。

【 参 考 文 献 】

- [1] Engelhard K, Werner C, Eberspacher E, et al. Influence of propofol on neuronal damage and apoptotic factors after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats : a long-term observ ation[J]. Anesthesiology,2004,101(4) :912-917.
- [2] Lin B, He YZ, Huang QLG, et al. Effect of defibrase on the expression of VEGF and apoptosis after spinal cord injury. Chinese Journal of Neurosurgical Disease Research, 2012, 11 (1) :42-46.
- [3] Han PP,Zhu XJ,Chen H. Study on the Biotransformation from Polydatin to Resveratrol. Journal of Zhejiang Shuren University, 12(1) :28-28.
- [4] Zeng XX,Zhang JJ. Research Progress in Experimental Study of Resveratrol on Neuroprotection. Chinese Journal of Clinical Neurosciences,2011,19(1) :79-82.
- [5] Ren JW,Yang Q. Protective mechanism of resveratrol on cerebral ischemia/reperfusion injury via ameliorating oxidative stress. Chinese Pharmacological Bulletin, 2011, 27(4) :448-551.
- [6] Ma N,Wang JF,Xu F,et al. Studies on absorptive characters of

resveratrol derivative (E)-3, 5, 4' - trimethoxystilbene in rat intestine. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis,2010,30 (4) :586-591.

- [7] Deng FJ, Yang YB, Xu JP. Advances in research on pharmacological strategies for spinal cord injury. Chinese Pharmacological Bulletin, 2009,25(2) :147-150.
- [8] Mao BY. Curative strategy and advancement on spinal cord injury. China Journal Traumatology, 2002,18(11) :645-649.
- [9] Zheng JJ,Yao AH,Liu FF, et al. Changes in the expression of inflammatory factor of early mouse spinal cord injury. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology,2012,28(4) :391-394.
- [10] Leal-Filho MB. Spinal cord injury: From inflammation to glial scar. Surgical Neurology International,2011,2: 112.
- [11] David S, Kroner A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. Nature Reviews in Neuroscience,2011,12(7) : 388-399.
- [12] Tjoa T, Strausbaugh HK, Maida N, et al. The use of flow cytometry to assess neutrophil infiltration in the injured murine spinal cord. Journal of Neuroscience Methods,2003,129(1) :49-59.
- [13] Li LMn,Zhu Y,Fan GY,et al. Effects of recombinant sCR1 on the immune inflammatory reaction in a rat model of acute spinal cord injury. Chinese Journal of Orthopaedic Trauma, 2005,7 (6) :548-555.
- [14] Lovell MA, Markesbery WR. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. Nucleic Acids Research 2007,35:7497-7504.
- [15] Ma WK,Zhang HY. Mitochondrial cytochrome C and apoptosis. Journal of Practical Medicine,2007, 23(23) :3786.
- [16] Mei HJ,Zhang SY,Liu SQ,et al. Effects of Resveratrol on the Myelonic Neuronal Apoptosis in the Forepart of Spinal Cord Injury in Rats. Medical Journal of Wuhan University, 2007,28(2) : 226-229.
- [17] Hou Z,Hu XK. Experiments on acute toxicity and genetic toxicity of resveratrol feeding the mice. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2011,23(3) :213-215.

(收稿日期:2013-08-12,修回日期:2013-09-29)

(上接第 639 页)

- [22] Barrett H, McElduff A. Vitamin D and pregnancy: An old problem revisited. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2010, 24(4) :527-539.
- [23] Dror DK, Allen LH. Vitamin D inadequacy in pregnancy: biology, outcomes, and interventions. Nutr Rev, 2010,68(8) : 465-477.
- [24] Morley R, Carlin JB, Pasco JA, et al. Maternal 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone concentrations and offspring birth size. J Clin Endocrinol Metab, 2006,91:906-912.
- [25] Weiler H, Fitzpatrick-Wong S, Veitch R, et al. Vitamin D

deficiency and whole-body and femur bone mass relative to weight in healthy newborns. CMAJ,2005, 172:757-761.

- [26] Leffelaar ER, Vrijkotte TG, van Eijsden M. Maternal early pregnancy vitamin D status in relation to fetal and neonatal growth: results of the multi-ethnic Amsterdam Born Children and their Development cohort. Br J Nutr, 2010,104(1) :108-117.
- [27] Prentice A, Jarjou LM, Goldberg GR, et al. Maternal plasma 25-hydroxyvitamin D concentration and birthweight, growth and bone mineral accretion of Gambian infants. Acta Paediatr 2009, 98:1360-1362.

(收稿日期:2013-08-20,修回日期:2013-11-06)

作者：梅红军，刘洋，张卉，MEI Hongjun，LIU Yang，ZHANG Hui

作者单位：武汉市第五医院, 武汉, 430050

刊名：中国骨质疏松杂志 

英文刊名：Chinese Journal of Osteoporosis

年，卷(期)：2014(6)

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201406020.aspx