

地稔干预对大鼠脊髓缺血再灌注损伤后炎症因子表达的影响

陈科 李晓飞 王济伟

[摘要] 目的 评价地稔干预对大鼠脊髓缺血再灌注损伤(SCII)后脊髓组织中炎症因子表达的影响。方法 选择雄性SD大鼠72只,按照随机数字表法分为假手术组(Sham组)、缺血-再灌注组(SCII组)、地稔干预组(MD组)、甲强龙治疗组(MP组)四组,每组18只。再灌注损伤后6 h、48 h、72 h,比较各组大鼠的后肢运动功能和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)、IL-10的表达。结果 与Sham组比较,SCII组在脊髓缺血再灌注损伤后6 h、48 h和72 h, BBB评分降低(t 分别=26.78、12.54、11.59, P 均 <0.05), TNF- α 、IL-6、IL-10表达均明显升高(t 分别=20.34、25.86、22.17; 26.74、27.66、25.69; 12.40、12.96、14.27, P 均 <0.05);与SCII组比较,MD组和MP组在48 h及72 h BBB评分降低(t 分别=10.25、8.56; 15.47、11.62, P 均 <0.05),在6 h、48 h和72 h TNF- α 、IL-6表达降低,IL-10表达升高(t 分别=12.18、17.20、12.74; 11.79、12.35、13.41; 8.53、11.26、7.74; 14.53、16.32、21.15; 13.14、15.66、16.77; 10.25、12.17、13.13, P 均 <0.05);与MP组比较,MD组48 h和72 h TNF- α 、IL-6较高,IL-10较低(t 分别=9.63、10.36; 10.63、9.88; -6.01、-8.61, P 均 <0.05)。结论 地稔干预可以抑制促炎因子TNF- α 、IL-6,上调抑炎因子IL-10表达,减轻SCII炎症反应,达到保护大鼠脊髓组织作用。

[关键词] 地稔; 脊髓; 缺血再灌注损伤; 炎症

Influence of melastoma dodecandrum pretreatment on the expression of inflammatory factors in rats with the spinal cord ischemia-reperfusion injury CHEN Ke, LI Xiaofei, WANG Jiwei. Department of Orthopedics, Jinhua Central Hospital, Jinhua 321000, China.

[Abstract] **Objective** To observe the effect of melastoma dodecandrum pretreatment on expression levels of inflammatory factors in rats with the spinal cord ischemia-reperfusion injury. **Methods** Totally 72 male SD rats were randomly divided into sham operation group (Sham group), ischemia-reperfusion group (SCII group), melastoma dodecandrum group (MD group) and methylprednisolone treatment group (MP group), 18 mice in each group. At 6h, 48h and 72h after reperfusion injury, the motor function of hind limbs of rats and the expressions of TNF- α , IL-6 and IL-10 were detected. **Results** Compared with the Sham group, the BBB scores decreased significantly ($t=26.78, 12.54, 11.59, P<0.05$), and the expressions of TNF- α , IL-6 and IL-10 significantly increased at 6h, 48h and 72h in SCII group ($t=20.34, 25.86, 22.17, 26.74, 27.66, 25.69, 12.40, 12.96, 14.27, P<0.05$). The BBB scores of the MD and MP group were lower than the SCII group at 48h and 72h ($t=10.25, 8.56, 15.47, 11.62, P<0.05$), and the TNF- α and IL-6 expressions in MD and MP group were lower and IL-10 expression was higher than those in SCII group at 6h, 48h and 72h ($t=12.18, 17.20, 12.74, 11.79, 12.35, 13.41, 8.53, 11.26, 7.74, 14.53, 16.32, 21.15, 13.14, 15.66, 16.77, 10.25, 12.17, 13.13, P<0.05$). Compared with the MP group, the TNF- α and IL-6 expressions increased, the IL-10 expression decreased significantly at 48h and 72h in the MD group ($t=9.63, 10.36, 10.63, 9.88, -6.01, -8.61, P<0.05$). **Conclusion** Melastoma dodecandrum pretreatment can inhibit the TNF- α and IL-6, up-regulate the expression of anti-inflammatory factor IL-10, reduce the inflammatory response of SCII, and protect the spinal cord tissue of rats.

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2023.009.003

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2020KY343)

作者单位:321000 浙江金华,金华市中心医院骨科(陈科、李晓飞),丽水市人民医院骨科(王济伟)

通讯作者:王济伟, Email: wjwa@21cn.com

[Key words] melastoma dodecandrum; spinal cord; ischemia-reperfusion injury; inflammation

脊髓缺血再灌注损伤(spinal cord ischemia-reperfusion injury, SCII)是脊髓缺血损伤一段时间后,相应节段血供恢复,神经功能却在原损伤基础上进一步加重^[1]。目前,炎症反应被认为是造成SCII的最重要的因素之一^[2,3]。甲强龙可通过减轻损伤脊髓炎症反应保护受损神经,但大量使用后并发症较多。地稔是一种传统的药用植物,其抗炎、抗氧化等作用在现代药理研究中逐渐被证实,相关研究发现其可通过降低肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)的表达减轻缺血肢体的再灌注损伤^[4,5]。本次研究建立大鼠脊髓缺血再灌注模型,探讨地稔干预对SCII大鼠脊髓组织中炎症因子表达变化的影响。

1 资料与方法

1.1 材料与试剂 本次研究时间为2018年6月至2018年10月,选择清洁级健康成年雄性SD大鼠72只,鼠龄6~8周,体重(138.24±11.12)g,购自上海斯莱克动物实验中心。实验动物许可证号为[SYXK(浙)2015-0009]。本次研究经温州医科大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 实验分组 按照随机数字表法将大鼠分为假手术组(Sham组)、缺血-再灌注组(SCII组)、地稔干预组(MD组)、甲强龙治疗组(MP组),每组18只。

1.3 模型制备与标本采集 MD组于术前7 d开始灌胃地稔水煎液,浓度0.2 g/ml,每次剂量10 ml/kg,每日1次,连续7 d。SCII组、MP组与Sham组予等量生理盐水灌胃,每日1次,连续7 d。7 d后SCII组、MD组大鼠用10%水合氯醛3 ml/kg腹腔注射麻醉,腹部向上固定操作台上,常规消毒。取腹部正中切口进入腹腔,仔细暴露出腹主动脉,于左肾动脉分支上,右肾动脉分支下,用血管夹夹闭腹主动脉,显微镜下确认夹闭下方血管无血供。45 min后取下血管夹,恢复血流,逐层缝合切口。MP组予术前30 min经舌下静脉注射甲强龙后同样方法建立SCII模型。分别在再灌注后6 h、48 h、72 h再次将大鼠深麻醉。四组各时间点取6只大鼠深麻醉后在冰上快速取下同上位置脊髓组织,放入冻存管中于-80℃中保存。

1.4 观测指标

1.4.1 大鼠后肢功能BBB评分 三名研究者分别在SCII建模成功后6 h、48 h、72 h对四组大鼠后肢运动功能进行盲法评分,采用Basso、Beattie和 Bresnahan(BBB)评分标准。

1.4.2 酶联免疫吸附试验(enzymelinked immunosorbent assay, ELISA)检测脊髓组织中TNF- α 、IL-6、白细胞介素10(interleukin-10, IL-10)表达水平 将脊髓组织称质量后置于冰上融化,取100 mg,按照RAPI裂解液说明书按比例加入裂解液研磨,离心,取上清液待测,严格按ELISA试剂盒(由联科生物生产)说明书操作。

1.5 统计学方法 采用SPSS 19.0 统计软件进行数据统计分析,计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD- t 法。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 四组大鼠再灌注损伤后不同时间点后肢BBB评分比较见表1

表1 四组大鼠再灌注损伤后不同时间点后肢BBB评分比较/分

组别	6 h	48 h	72 h
Sham组	19.64±0.54	19.85±0.47	19.90±0.75
SCII组	2.67±0.50 [#]	12.00±0.71 [#]	14.56±0.53 [#]
MD组	2.78±0.44	15.22±0.67 [*]	15.56±0.73 [*]
MP组	2.88±0.33	16.00±1.12 [*]	16.11±0.33 [*]

注: * :与SCII组比较, $P<0.05$; # :与Sham组比较, $P<0.05$ 。

由表1可见,四组大鼠再灌注损伤后6 h、48 h、72 h后肢BBB评分比较,差异均有统计学意义(F 分别=158112.03、4439.19、6363.55, P 均 <0.05)。进一步两两比较,SCII组再灌注损伤后6 h、48 h、72 h后肢BBB评分明显低于Sham组(t 分别=26.78、12.54、11.59, P 均 <0.05)。再灌注损伤后6 h, MD组和MP组与SCII组比较,差异均无统计学意义(t 分别=0.75、1.14, P 均 >0.05),再灌注损伤后48 h、72 h, MD组和MP组大鼠后肢BBB评分均高于SCII组(t 分别=10.25、8.56; 15.47、11.62, P 均 <0.05)。MD组与MP组各时间点BBB评分比较,差异均无统计学意义(t 分别=0.34、0.94、1.03, P 均 >0.05)。

2.2 四组大鼠再灌注损伤后不同时间点脊髓组织中TNF- α 表达变化见表2

由表2可见,四组大鼠再灌注损伤后不同时间点脊髓组织中TNF- α 表达比较,差异均有统计学意义(F 分别=10799.34、2224.49、8338.45, P 均 <0.05)。进一步两两比较,SCII组各时间点TNF- α 表达均高于Sham组(t 分别=20.34、25.86、22.17, P 均 $<$

0.05), MD组和MP组各时间点TNF- α 表达低于SCII组(t 分别=12.18、17.20、12.74; 14.53、16.32、21.15, P 均 <0.05), 再灌注损伤后48 h、72 h, MP组TNF- α 表达均低于MD组(t 分别=9.63、10.36, P 均 <0.05)。

表2 四组大鼠再灌注损伤后不同时间点脊髓组织中TNF- α 表达变化/ng/ml

组别	6 h	48 h	72 h
Sham组	47.58 \pm 0.66	54.71 \pm 0.43	58.88 \pm 0.30
SCII组	139.50 \pm 0.95 $^{\Delta}$	174.50 \pm 2.10 $^{\Delta}$	168.28 \pm 0.90 $^{\Delta}$
MD组	122.38 \pm 0.83* $^{\Delta}$	148.31 \pm 1.03* $^{\Delta}$	141.25 \pm 1.06* $^{\Delta}$
MP组	106.51 \pm 3.97* $^{\Delta}$	121.12 \pm 2.94* $^{\Delta}$	115.56 \pm 1.06* $^{\Delta}$

注: * : 与SCII组比较, $P < 0.05$; # : 与MD组比较, $P < 0.05$; $^{\Delta}$: 与Sham组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 四组大鼠再灌注损伤后不同时间点脊髓组织中IL-6表达变化见表3

表3 四组大鼠再灌注损伤后不同时间点脊髓组织中IL-6表达变化/ng/ml

组别	6 h	48 h	72 h
Sham组	11.51 \pm 0.45	13.49 \pm 0.43	13.56 \pm 0.64
SCII组	79.85 \pm 1.59 $^{\Delta}$	91.37 \pm 1.23 $^{\Delta}$	86.28 \pm 2.59 $^{\Delta}$
MD组	56.34 \pm 2.90*	79.28 \pm 0.98*	69.33 \pm 1.16*
MP组	50.24 \pm 1.90*	64.27 \pm 2.68* $^{\#}$	58.80 \pm 1.38* $^{\#}$

注: * : 与SCII组比较, $P < 0.05$; # : 与MD组比较, $P < 0.05$; $^{\Delta}$: 与Sham组比较, $P < 0.05$ 。

由表3可见, 各组大鼠再灌注损伤后不同时间点脊髓组织中IL-6表达比较, 差异均有统计学意义(F 分别=628.50、1401.99、1115.35, P 均 <0.05)。进一步两两比较, SCII组各时间点IL-6表达均高于Sham组(t 分别=26.74、27.66、25.69, P 均 <0.05), MD组和MP组IL-6表达低于SCII组(t 分别=11.79、12.35、13.41; 13.14、15.66、16.77, P 均 <0.05)。再灌注损伤后48 h、72 h, MP组IL-6表达低于MD组(t 分别=10.63、9.88, P 均 <0.05)。

2.4 四组大鼠再灌注损伤后不同时间点脊髓组织中IL-10表达变化见表4

由表4可见, 四组大鼠再灌注损伤后不同时间点脊髓组织中IL-10表达变化比较, 差异均有统计学意义(F 分别=627.34、228.75、809.65, P 均 <0.05)。进一步两两比较, SCII组各时间点IL-10表达均高于Sham组(t 分别=12.40、12.96、14.27, $P <$

0.05), MD组和MP组IL-10表达高于SCII组(t 分别=8.53、11.26、7.74; 10.25、12.17、13.13, P 均 <0.05), 再灌注损伤后48 h、72 h, MP组IL-10表达高于MD组(t 分别=-6.01、-8.61, P 均 <0.05)。

表4 四组大鼠再灌注损伤后不同时间点脊髓组织中IL-10表达变化/ng/ml

组别	6 h	48 h	72 h
Sham组	11.51 \pm 0.55	12.19 \pm 0.14	12.14 \pm 0.41
SCII组	18.75 \pm 0.41 $^{\Delta}$	21.31 \pm 1.07 $^{\Delta}$	23.81 \pm 0.36 $^{\Delta}$
MD组	24.63 \pm 0.50*	28.28 \pm 0.69*	28.60 \pm 0.52*
MP组	26.08 \pm 0.36*	31.89 \pm 1.52* $^{\#}$	35.13 \pm 0.91* $^{\#}$

注: * : 与SCII组比较, $P < 0.05$; # : 与MD组比较, $P < 0.05$; $^{\Delta}$: 与Sham组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

SCII由一系列复杂的酶联反应介导发生, 目前相关损伤机制研究主要包括炎症应激反应、离子环境失衡、细胞凋亡等, 其中炎症反应被视为最重要的机制之一, 研究表明血流再灌注后激发黏附分子和趋化因子表达引起包括白细胞募集、血管内皮损伤、神经毒性等一系列炎症反应^[6-8]。

当前针对SCII后抑制炎症反应的治疗, 临床上应用最广的是甲强龙, 但近来研究对其改善神经功能预后存在广泛争议, 同时大剂量甲强龙使用所带来的一系列并发症也限制了其应用, 能否在传统民族药物中寻找新的治疗契机逐渐成为新的热点^[2,3]。地稔长期被瑶族、苗族和畲族等几个少数民族广泛应用于治疗各种不同的疾病。主要以全草煎熬口服为主, 从地稔水煎液中分离出109种化合物, 包括有机酸、黄酮类、多糖、氨基酸和类固醇, 现代药理研究中逐渐证实其具有止血、镇痛、抗炎、抗氧化和抑制高级糖基化终产物的形成等作用^[9,10]。既往研究显示经过地稔水煎液预处理可以降低大鼠肢体缺血再灌注损伤后炎症因子TNF- α 和IL-6的表达水平, 从而达到减轻炎症反应, 保护缺血肢体的作用^[5]。基于以上证据, 本次研究进一步探讨地稔对SCII损伤神经组织炎症因子表达的影响, 结果显示, SCII组、MD组、MP组大鼠后肢BBB评分均低于Sham组(P 均 <0.05), 另外再灌注后48 h、72 h MD组、MP组大鼠后肢BBB评分均高于SCII组(P 均 <0.05), 而MP组各时间点BBB评分并未明显高于MD组($P > 0.05$), 表明地稔与甲强龙预处理均可减轻SCII损伤引起的双下肢神经功能障碍, 且地稔治疗

效果与甲强龙治疗效果相当。

TNF- α 是嗜中性粒细胞有效的激活剂,通常与细胞膜上的p55与p75两个受体结合,不论在大鼠、新西兰兔亦或是猪的SCII模型研究中均可观察到再灌注损伤后TNF- α 增高,不同模型呈现不同的增高幅度,大体呈现一个双向趋势^[11]。IL-6可由单核-巨噬细胞、内皮细胞、成纤维细胞等多种细胞产生,其通过产生急性期反应蛋白参与炎症反应,而在不同的SCII损伤模型中均可发现再灌注损伤后IL-6呈现高表达趋势^[12]。IL-10是一种有效的抑炎因子,研究表明在大鼠SCII损伤后48 h IL-10在脊髓灰质呈现出高表达状态,IL-10可以通过抑制髓过氧化物酶表达减轻炎症反应^[13]。本次研究结果显示,与Sham组比较,其余三组脊髓组织中TNF- α 、IL-6和IL-10表达均出现增高趋势,MD组、MP组促炎因子TNF- α 、IL-6表达较SCII组低,MP组表达相对最少;MD组、MP组抑炎因子IL-10均高于SCII组,MP组表达最高,以上结果表明地稔及甲强龙干预在SCII后均可抑制炎症过度表达,起到保护脊髓组织的作用,但地稔对于脊髓组织内炎症反应抑制水平不及甲强龙,如何提高地稔疗效有待进一步研究。

综上所述,地稔可以通过抑制促炎症因子、提高抑炎因子的表达,减少中性粒细胞浸润等减轻炎症反应,从而对大鼠SCII损伤产生保护作用,但整体疗效不如甲强龙。另外,本次研究仅是研究预处理,有待开展SCII损伤后地稔治疗的进一步研究,同时本次研究地稔为中药制剂,其中成分未经提纯,如何提高地稔药效有待进一步研究。

参考文献

- 1 Aya K, Koichi S, Akira M, et al. Protective effects of hydrogen gas against spinal cord ischemia-reperfusion injury[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2021, 164(6): 269-283.
- 2 郭昌军,程朝辉,张富国.促红细胞生成素联合甲强龙治疗脊髓缺血再灌注损伤效果分析[J]. *医学研究杂志*, 2016, 45(7): 75-79.
- 3 黄星球,廖绪强,史成龙,等.甲基强的松龙抑制脊髓损伤模型大鼠小胶质细胞活化介导的炎症[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(19): 3050-3055.
- 4 刘静,明惠仪,麻秀萍,等.地稔中6种成分含量测定及其与抗氧化活性的相关性分析[J]. *中国药房*, 2022, 33(16): 1962-1967.
- 5 许荣成,王济纬,兰俊,等.地稔预处理对大鼠肢体缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2018, 24(3): 309-312.
- 6 罗智超,周正芳,郭惠明,等.低温联合腺苷预处理对脊髓缺血再灌注损伤后炎症因子的影响[J]. *岭南心血管病杂志*, 2015, 21(1): 107-110.
- 7 Fang B, Qin M, Li Y, et al. Electroacupuncture preconditioning and postconditioning inhibit apoptosis and neuroinflammation induced by spinal cord ischemia reperfusion injury through enhancing autophagy in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2017, 642: 136-141.
- 8 Jiao L, Shuangshuang Z, Xiaona F, et al. Dexmedetomidine preconditioning ameliorates inflammation and blood-spinal cord barrier damage after spinal cord ischemia-reperfusion injury by down-regulation high mobility group box 1-Toll-Like receptor 4-nuclear factor κ B signaling pathway[J]. *Spine*, 2018; 74-81.
- 9 Kertmen H, Celikoglu E, Ozturk CO, et al. Comparative effects of methylprednisolone and tetracosactide (ACTH 1-24) on ischemia/reperfusion injury of the rabbit spinal cord[J]. *Arch Med Sci*, 2017, 14(6): 1459-1470.
- 10 王超平,郑颖,周健.地稔水煎液熏蒸联合小针刀治疗神经根型颈椎病疗效观察[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2023, 33(2): 147-149.
- 11 Kohei M, Taisuke K, Ryota E, et al. Bidirectional modulation of TNF- α transcription via α - and β -adrenoceptors in cultured astrocytes from rat spinal cord[J]. *Biochemical Biophysical Res Com*, 2020, 528(1): 78-84.
- 12 Atousa Z, Maryam S, Behnamedin SJ, et al. Related fluoxetine and methylprednisolone changes of TNF- α and IL-6 expression in the hypothyroidism rat model of spinal cord injury[J]. *Cell J*, 2021, 23(7): 763-771.
- 13 Vanderwall GA, Noor S, Sun SM, et al. Effects of spinal non-viral interleukin-10 gene therapy formulated with D-mannose in neuropathic interleukin-10 deficient mice: Behavioral characterization, mRNA and protein analysis in pain relevant tissues[J]. *Brain Behav Imm*, 2018, 69: 91-112.

(收稿日期 2023-03-26)

(本文编辑 高金莲)