

· 基础研究 ·

## 孟鲁司特对大鼠脊髓损伤保护作用的研究

杨 拯<sup>1#</sup>, 邱有波<sup>2</sup>, 包 旭<sup>1△</sup>, 钟明镜<sup>1</sup>, 叶晓琳<sup>1</sup>

(1. 四川大学华西药学院, 成都 610041; 2. 成都医学院 610081)

**摘要:**目的 观察孟鲁司特对大鼠脊髓损伤(SCI)的保护作用,以及对星形胶质细胞反应性增生的抑制作用。方法 健康 SD 大鼠 54 只,采用 Allen 法在 T<sub>9</sub> 造成急性 SCI 模型。随机分为孟鲁司特治疗组(A 组)、对照组(B 组)和甲泼尼松龙组(C 组),每组 18 只。伤后 1、3、7 d 分别用 BBB 评分和斜板试验观察大鼠运动功能的恢复情况;分别测定血清超氧化物歧化酶(SOD)活力和丙二醛(MDA)浓度,观察自由基变化;用 HE 染色进行正常神经元计数,采用免疫组织化学检测胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)和 IL-1 $\beta$  的表达。结果 大鼠 SCI 后 3、7 d BBB 评分和斜板试验 A 组明显优于 B 组( $P < 0.05$ );大鼠 SCI 后 A 组 1、3、7 d MDA 浓度明显低于 B 组( $P < 0.05$ ),A 组 SOD 活性明显高于 B 组( $P < 0.05$ )。脊髓损伤后 A 组 GFAP 和 IL-1 $\beta$  的表达以及正常神经元计数明显优于 B 组( $P < 0.05$ )。结论 大鼠脊髓损伤后早期使用孟鲁司特,能有效抑制脊髓损伤后的脂质过氧化反应、星形胶质细胞反应性增生和炎症反应,对脊髓损伤具有保护作用。

**关键词:**孟鲁司特;脊髓损伤;神经胶质原纤维酸性蛋白质;白细胞介素-1 $\beta$ ;自由基

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.31.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)31-3291-04

## The study on protective effect of montelukast on spinal cord injury in rats

Yang Zheng<sup>1#</sup>, Qiu Youbo<sup>2</sup>, Bao Xu<sup>1△</sup>, Zhong Mingjing<sup>1</sup>, Ye Xiaolin<sup>1</sup>

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China;

2. Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610081, China)

**Abstract: Objective** To observe the protective effect of montelukast on spinal cord injury(SCI) in rats and the inhibition of reactive hyperplasia of astrocytes. **Methods** 54 healthy rats were randomly divided into group A, B and C, and SCI was made by Allen's mode(10 g $\times$ 25 mm) on spinal cord T<sub>9</sub> extradurally. Each group had twelve rats. At the 1 d, 3 d and 7 d after SCI, the recovery of motor function after spinal cord injury in rats was assessed with Basso-Beattie-Bresnahan(BBB) scale and slanting board test, Superoxide dismutase(SOD) activity and malondialdehyde(MDA) level in the plasma were measured, and was observed the change of free radicals. HE staining was used for normal neuron counting and immunohistochemical staining detected the expression of GFAP and IL-1 $\beta$ . **Results** BBB scores and slanting board test of group A were better than those of group B, which had significant difference at 3 d and 7 d after SCI( $P < 0.05$ ). After 1, 3, 7 d of SCI in rats, concentration of malondialdehyde of group A was lower than that of group B( $P < 0.05$ ). SOD activity of group A was higher than that of group B, which had significant difference after injury( $P < 0.05$ ). The normal neuron counting, expression of GFAP and IL-1 $\beta$  of group A was better than that of group B, which had significant difference after 1, 3, 7 d of SCI( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Early montelukast can inhibit the lipid peroxidation, reactive hyperplasia of astrocytes and inflammatory reaction after spinal cord injury in rats. It has a protective effect on spinal cord injury.

**Key words:** montelukast; spinal cord injury; glial fibrillary acidic protein; interleukin-1 $\beta$ ; free radicals

长期以来,国内外学者对脊髓损伤(Spinal cord injury, SCI)的可能机制做了大量的探索。研究表明,损伤后局部炎症因子、氧自由基的积聚,促使损伤脊髓的细胞发生坏死和凋亡<sup>[1]</sup>。炎症在 SCI 的发生、发展过程中至关重要,炎症细胞因子可以加重继发性 SCI 的程度;炎症细胞向损伤部位聚集,释放弹性蛋白酶及反应性氧自由基,破坏血管内皮并加重组织水肿、坏死程度,引起神经元凋亡,刺激星形胶质细胞增殖,导致局部形成胶质瘢痕<sup>[2-3]</sup>。星形胶质细胞的细胞质内含胶质原纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein, GFAP),通常用 GFAP 的含量反映星形胶质细胞活性高低。而在 SCI 缺血后期,胶质瘢痕的形成阻碍神经元轴突的再生,如何有效地干预星形胶质细胞的活性,有利于 SCI 后功能的恢复。而最近报道,半胱氨酰白三烯(CysLTs)促进体外培养的星形胶质细

胞增殖,CysLT1 受体拮抗剂 MK-571 能拮抗上述作用<sup>[4]</sup>。体内研究也发现,CysLT1 受体拮抗剂普鲁司特抑制小鼠局灶性脑缺血 10 周脑内疤痕形成<sup>[5]</sup>,这些发现提示 CysLT1 受体参与缺血损伤后的胶质增生。孟鲁司特是新一代的白三烯受体拮抗剂,是我国常用抗炎药,临床上广泛用于治疗支气管哮喘和肺炎。目前,国内对孟鲁司特在中枢神经系统保护方面的作用研究较少,在 SCI 方面尚少见报道。因此,本实验探讨孟鲁司特对大鼠 SCI 的保护作用。

## 1 材料与方法

**1.1 动物及药品** 清洁级健康成年 SD 大鼠 60 只,雌雄不拘,体质量(200 $\pm$ 20)g,由四川大学实验动物中心提供;孟鲁司特钠咀嚼片购自四川大冢制药有限公司,批号:100103;注射用甲泼尼松龙琥珀酸钠购自天津药业焦作有限公司,批号:

# 现工作单位:成都医学院。 △ 通讯作者, Tel:(028)85503783; E-mail: bao\_xu@163.com。

10031501;注射用青霉素钠购自石药集团中诺药业(石家庄)有限公司,批号:09119209;戊巴比妥钠(德国进口分装)购自北京化学试剂公司,批号:100808;氯化钠注射液购自安徽双鹤药业有限责任公司,批号:100825 1E;丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所,批号:20100719,超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒购自南京建成生物工程研究所,批号:20100719;兔抗 IL-1 $\beta$  抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗 GFAP 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;SP 检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。自制数字式 SCI 动物模型制备仪,TGL-16G 台式离心机购自上海安亭科学仪器厂。721E 型可见分光光度计购自上海光谱仪器有限公司。

**1.2 模型制备方法** 大鼠术前按常规进行行为测试,确认其运动功能正常后,用 1.5%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉,然后将大鼠俯卧固定于手术台上,背部去毛,聚维酮碘常规消毒。无菌条件下,沿正中线切开大鼠背部皮肤,显露椎板及棘突,明确 T<sub>7</sub>。后咬除棘突及其椎板,暴露脊髓,用自制数字式 SCI 动物模型制备仪打击器并制成 SCI 模型(Allen 法),打击强度为 10 g $\times$ 25 mm,打击后以大鼠身体抖动、摆尾及后肢抽动表明模型制备成功。造模成功后,用医用明胶海绵填塞椎骨孔,逐层缝合切口,术后立即腹腔注射氯化钠注射液(0.9%)9 mL/kg 补液。腹腔注射青霉素钠,待动物清醒后放回笼中饲养。术后大鼠自由进食、饮水,定时清洁笼具,保持适宜室温,每天挤压膀胱排尿 3 次,直至膀胱功能恢复;术后每天腹腔注射 1 mL(8 万 U)青霉素钠,连续 3 d。

**1.3 动物分组及治疗方法** 从造模成功的实验动物中随机挑选 54 只大鼠,按照随机数字表法随机分为 3 组:孟鲁司特治疗组(A 组)、对照组(B 组)和甲泼尼松龙组(C 组),每组 18 只。A 组:损伤后 1、6 h 经灌胃给予孟鲁司特 5 mg/kg<sup>[6]</sup>(5 mg 溶于 5 mL 生理盐水),之后每天给予 1 次,连续 7 d;B 组:灌胃等量的氯化钠注射液(0.9%);C 组:损伤后即刻前肢皮下注射甲泼尼松龙(80 mg/kg),此后分别间隔 6、12、18 h 再次注射甲泼尼松龙 40 mg/kg。

#### 1.4 观察指标及检测方法

**1.4.1 丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)测定** 3 组动物均术后 1、3、7 d 选取 4 只经右心室取血 3 mL 后,立即 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,存于 -20 °C 冰箱,7 d 内分析完毕。分别用 MDA 和 SOD 试剂盒测定血清中 MDA 浓度及 SOD 活性,操作方法按试剂盒说明进行。

**1.4.2 BBB 评分** 3 组动物均于术后 1、3、7 d 进行 BBB 评分。按照 Basso 等<sup>[7]</sup>报道的 BBB 评分方法,将动物置于宽大活动场地,采用双人双盲法观察其后肢运动情况,联合考察大鼠后肢的运动,躯干的位置及稳定性、步态、协调性、爪的置放、足趾间隙及尾的位置。左右两侧肢体取平均值,作为每只大鼠每次功能的得分。

**1.4.3 斜板试验** 3 组动物均于术后 1、3、7 d 进行斜板试验。采用 Rivlin 等<sup>[8]</sup>的方法,将大鼠放置于自制斜板上,上面垫一橡胶垫,将大鼠身体纵轴与斜板纵轴平行放置,大鼠头朝斜板抬高侧,斜板倾斜角度从 0°开始缓慢上升。判断标准为大鼠停留在斜板上维持至少 5 s 时的最大角度,每次测试 3 遍,取

其平均值。

**1.4.4 HE 染色** 各组大鼠分别在术后 1、3、7 d 取材。大鼠以 1.5%戊巴比妥钠麻醉后,开胸暴露心脏和升主动脉,将灌注插管经左心室插入升主动脉,固定插管剪开右心房。快速灌注冰生理盐水冲净血液至肝脏及肌膜苍白为止,立即转换灌注 4 °C 的 4%多聚甲醛液,先快速,后慢速。灌注完毕后立即切取 1 cm 损伤区域脊髓组织,行石蜡包埋,损伤段做横切切片,片厚 5  $\mu$ m,行 HE 染色。由一位病理学专业人员的光镜下( $\times$ 200)进行观察,每个标本随机选择 3 张切片,各随机选取一前角,自该前角顶点作一直线连接中央管中点,沿该直线自外向内连续采集 3 个视野,按如下标准计数正常运动神经元:(1)细胞呈多角形,细胞质染为红色,内有正常尼氏体(均匀分布的嗜碱性颗粒);(2)细胞核居中,呈圆形,轮廓清晰,核仁明显;(3)细胞体直径 30~60  $\mu$ m。

**1.4.5 免疫组织化学染色** 采用生物素二步法进行 GFAP 和 IL-1 $\beta$  免疫组织化学染色。将各组切片置于二甲苯中脱蜡,梯度乙醇水化,高压热抗原修复,用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭内源性过氧化物酶,正常山羊血清封闭非特异性抗原。分别滴加 GFAP 抗体(1:200)或 IL-1 $\beta$  抗体(1:100),37 °C 1 h。用兔抗二抗 37 °C 恒温孵育 40 min。加入 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色液,室温下反应,显微镜下显色充分,及时用 0.01 mol/L PBS 漂洗;苏木素复染,梯度乙醇逐级脱水,二甲苯透明,树胶封片。显微镜下观察 GFAP、IL-1 $\beta$  的表达,阳性结果为棕黄色反应。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件处理,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间均数比较采用单因素方差分析。检验水准取  $\alpha = 0.05$ ,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠 SCI 后一般情况** 大鼠造模苏醒后,静卧少动,气息较微,双后肢感觉迟钝、运动功能丧失,肌力降为零,无食欲,不进水,尿失禁或下腹部膨隆,膀胱发生尿滞留,呈现出不完全 SCI 的表现。8 h 后 A 组、C 组大鼠后肢都有 1 个或 2 个关节的轻微活动,能够主动进水;对照组后肢无任何运动表现,有进水需求。术后前 3 d,大鼠活动较少,进食少,尿滞留现象比较严重,伴血尿及腹胀。术后 7 d 内所有大鼠均需人工排尿。实验期间 A 组大鼠死亡 1 只,B 组死亡 2 只,C 组死亡 2 只,死亡原因未知,推测可能与严重的血尿、膀胱破裂、腹水及多脏器衰竭有关。为满足最终统计学要求,及时补充同批次动物完成实验,使每组实验动物保持一致。

**2.2 运动功能评价** (1)BBB 评分:术前所有动物评分均为正常 21 分,术后 1 d A、B、C 组均较低,3 组间 BBB 评分差异无统计学意义( $P > 0.05$ );术后 3、7 d,A、C 组 BBB 评分明显高于 B 组( $P < 0.05$ );A、C 两组动物损伤后 7 d 内各时间点 BBB 评分差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。(2)斜板试验:术后 1 d A、B、C 组间斜板试验临界角度差异无统计学意义( $P > 0.05$ );术后 3、7 d,A 和 C 组斜板试验临界角度明显高于 B 组( $P < 0.01$ );A、C 两组动物损伤后 7 d 内各时间点斜板试验临界角度差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1、2。

**2.3 MDA 及 SOD 测定** (1)MDA 浓度:损伤后 1、3、7 d 的 MDA 测定浓度 A、C 组明显低于 B 组( $P < 0.05$ ),且 A、C 两组间比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 3。(2)SOD 活性:

损伤后 1、3、7 d 的 SOD 活性 A、C 组明显高于 B 组 ( $P < 0.05$ ), 且 A、C 两组间比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 4。

表 1 3 组 SCI 大鼠 BBB 评分结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 分)

组别	1 d	3 d	7 d
A 组	0.69 ± 0.67	3.09 ± 0.98 <sup>b</sup>	6.89 ± 1.03 <sup>b</sup>
B 组	0.52 ± 0.20	1.53 ± 0.93	3.50 ± 1.14
C 组	0.71 ± 0.88	3.06 ± 1.38 <sup>a</sup>	6.13 ± 0.78 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与 B 组比较。

表 2 3 组 SCI 大鼠斜板试验结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	1 d	3 d	7 d
A 组	32.95 ± 1.48	35.84 ± 1.41 <sup>b</sup>	38.79 ± 1.25 <sup>b</sup>
B 组	31.75 ± 2.02	33.92 ± 0.90	34.86 ± 0.96
C 组	32.95 ± 2.44	36.25 ± 0.67 <sup>b</sup>	37.69 ± 0.63 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与 B 组比较。

表 3 3 组 SCI 大鼠 MDA 结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ , nmol/mL)

组别	1 d	3 d	7 d
A 组	4.12 ± 1.37 <sup>a</sup>	3.12 ± 1.07 <sup>a</sup>	2.21 ± 0.27 <sup>b</sup>
B 组	6.22 ± 0.85	5.40 ± 1.36	4.30 ± 0.67
C 组	4.08 ± 0.37 <sup>b</sup>	3.61 ± 0.40 <sup>a</sup>	2.76 ± 0.33 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与 B 组比较。

表 4 3 组 SCI 大鼠 SOD 结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ , U/mL)

组别	1 d	3 d	7 d
A 组	93.57 ± 17.53 <sup>a</sup>	104.31 ± 3.33 <sup>b</sup>	125.09 ± 12.55 <sup>b</sup>
B 组	63.59 ± 9.06	89.39 ± 6.69	96.08 ± 5.61
C 组	92.17 ± 7.13 <sup>b</sup>	104.87 ± 4.32 <sup>b</sup>	121.46 ± 5.58 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与 B 组比较。

**2.4 HE 染色观察** 损伤后 1、3、7 d 的正常神经元计数 A、C 组明显高于 B 组 ( $P < 0.05$ )。光镜下观察组织病理学改变, B 组可见正常神经元数量明显减少, 神经细胞缺血变性严重, 细胞质深染、缩小, 细胞核固缩, 核仁消失, 细胞周围有空泡形成。而 A、C 组可见正常运动神经元较多, 细胞体呈多角形, 核仁清晰, 细胞质中尼氏体清晰。见表 5、封 3 图 1。

表 5 脊髓损伤大鼠正常神经元计数 ( $\bar{x} \pm s$ , 个)

组别	1 d	3 d	7 d
A 组	8.60 ± 1.52 <sup>a</sup>	7.80 ± 1.48 <sup>a</sup>	6.80 ± 1.30 <sup>b</sup>
B 组	4.80 ± 1.48	3.60 ± 1.52	4.40 ± 1.52
C 组	8.20 ± 1.30 <sup>a</sup>	8.40 ± 1.14 <sup>a</sup>	7.20 ± 1.92 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与 B 组比较。

**2.5 免疫组织化学检测 GFAP 和 IL-1 $\beta$  的表达** (1) GFAP 的表达: 损伤后 1 d, 3 组可观察到 SCI 区、损伤邻近区、中央管周围室管膜区、灰质和白质中 GFAP 阳性表达, 但 A、C 组平均积分光密度值明显低于 B 组 ( $P < 0.01$ ); 损伤 3 d 后, 在损伤区及周围灰质、白质中 GFAP 阳性表达与损伤后 1 d 比较均增

多, GFAP 阳性细胞肥大, 染色变深, GFAP 阳性表达逐渐达到高峰, A、C 组平均积分光密度值明显低于 B 组 ( $P < 0.01$ ); 损伤 7 d 后, A、C 组和 B 组 GFAP 阳性表达较 3 d 时减少。与 B 组比较, A、C 组较低 ( $P < 0.01$ , 见封 4 图 2、表 6)。(2) IL-1 $\beta$  的表达: 各组损伤后 1 d IL-1 $\beta$  大量表达, B 组阳性细胞数明显高于 A、C 组 ( $P < 0.01$ ); 损伤后 3、7 d, IL-1 $\beta$  阳性细胞数逐渐降低, 但 B 组阳性细胞数仍明显高于 A、C 组 ( $P < 0.01$ )。见封 4 图 3、表 7。

表 6 3 组 SCI 大鼠 GFAP 平均积分光密度值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	1 d	3 d	7 d
A 组	13.27 ± 1.67 <sup>a</sup>	22.10 ± 3.46 <sup>a</sup>	9.91 ± 1.60 <sup>a</sup>
B 组	17.91 ± 2.51	38.48 ± 4.52	15.57 ± 1.29
C 组	13.14 ± 2.09 <sup>a</sup>	22.34 ± 4.26 <sup>a</sup>	9.59 ± 1.49 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与 B 组比较。

表 7 3 组 SCI 大鼠 IL-1 $\beta$  阳性细胞计数比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 个)

组别	1 d	3 d	7 d
A 组	21.56 ± 4.16 <sup>a</sup>	11.67 ± 3.04 <sup>a</sup>	6.11 ± 1.76 <sup>a</sup>
B 组	37.89 ± 9.62	19.78 ± 6.24	9.44 ± 2.60
C 组	20.78 ± 5.38 <sup>a</sup>	11.33 ± 2.60 <sup>a</sup>	5.89 ± 1.69 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与 B 组比较。

### 3 讨 论

在脊髓的继发性损伤过程中, 炎症渗出及其所产生的细胞因子都参与了加重脊髓组织结构损害和神经细胞凋亡<sup>[9-10]</sup>。研究表明, 在急性 SCI 后, 脊髓组织中 IL-1 $\beta$  表达快速升高, 且损伤局部组织中 IL-1 $\beta$  表达先于白细胞浸润, 成为诱导神经元、少突胶质细胞和星形细胞凋亡的主要因素之一, 与创伤性 SCI 后的随意运动和感觉功能丧失及晚期神经功能障碍有关<sup>[11-12]</sup>。IL-1 $\beta$  是一种具有多种生物学功能的炎性细胞因子, 可引起白细胞的聚集并可刺激白细胞、内皮细胞等表达细胞间黏附分子, 介导中性粒细胞的浸润, 进而加重损伤区的炎症反应; 可诱导 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等炎性细胞因子的释放, 增加 NO 和兴奋性氨基酸的合成和释放。本实验发现, 各组损伤后 1 d IL-1 $\beta$  大量表达, B 组阳性细胞数明显高于 A、C 组 ( $P < 0.01$ ); 损伤后 3、7 d, IL-1 $\beta$  阳性细胞数逐渐降低, 但 B 组阳性细胞数仍明显高于 A、C 组 ( $P < 0.01$ )。表明, 孟鲁司特和甲泼尼松龙能抑制脊髓损伤后 IL-1 $\beta$  的表达, 减轻脊髓损伤后炎症反应。Nesic 等<sup>[13]</sup>将 IL-1 受体拮抗剂注入 SCI 区发现其抑制 caspase-3 的活性及阻断了由损伤诱导的细胞凋亡, 并认为 SCI 诱导的过度炎症反应及 IL-1 $\beta$  过度表达引发了细胞的凋亡, 因而限制了 SCI 后运动功能的恢复。抑制 SCI 后 IL-1 $\beta$  的过度表达可能减轻脊髓继发性损伤, 抑制神经元凋亡, 可促进 SCI 后运动功能的恢复。本实验结果显示, 损伤后 1、3、7 d 的正常神经元计数 A、C 组明显高于 B 组 ( $P < 0.05$ )。A、C 组 BBB 评分比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 与 B 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。A、C 组斜板试验临界角度比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 与 B 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。表明 A、C 组大鼠的运动功能均得到很大程度的恢复, 孟鲁司特与甲泼尼松龙对脊髓损伤大鼠运动功能恢复均有促进作用。

脊髓组织膜结构含有丰富的脂质,脊髓神经元细胞膜结构中脂质含量极为丰富,SCI 后血流发生改变,脊髓组织缺血、缺氧和出血使神经细胞线粒体传递链发生脱耦联,通过酶系统和非酶系统产生并释放大量的氧自由基<sup>[14]</sup>,氧自由基作用于细胞膜上的多不饱和脂肪酸,生成过氧化脂质,使膜通透性改变、溶酶体崩解,而致细胞坏死,从而引起脊髓的继发性损害。SCI 后自由基反应被公认为引起脊髓组织继发性损伤的主要因素之一<sup>[15]</sup>。Hall<sup>[15]</sup>发现 SCI 后脊髓中 MDA 含量即有明显增加,因此早期对自由基清除是保护脊髓细胞膜结构完整的关键。MDA 是脂质过氧化最终产物,测定 MDA 可直接反应自由基水平<sup>[14]</sup>,是自由基致使组织细胞损伤的重要标志。SOD 为自由基的清除剂,SOD 活性反映机体清除氧自由基的能力。所以 MDA 含量及 SOD 活性均可反映体内自由基的变化。郑望苟等<sup>[16]</sup>研究发现自由基水平与 SCI 后运动功能恢复呈正相关性,即损伤段自由基的变化与神经功能的损害有明显的量效关系。本实验结果显示 A、C 组 MDA 的浓度比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),与 B 组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。A、C 组 SOD 的活性比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),与 B 组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。这说明孟鲁司特在 SCI 后早期能有效清除自由基,有效地控制了膜的自由基反应,保护脊髓细胞膜结构完整,从而保护神经细胞免受损伤,大大减少了脊髓继发性损伤的程度。

星形胶质细胞的主要功能是维持神经组织形态,同时在提供神经营养因子、参与细胞间的通讯等方面也发挥重要作用<sup>[17]</sup>。其可以合成并释放多种神经营养因子:睫状神经营养因子、脑源性神经营养因子、神经营养因子-3。但是 SCI 后,受损的神经纤维发生 Waller 溃变,局部的星形胶质细胞被激活,反应性增生,细胞体增大,突起延长增多,具有活跃的吞噬作用,称为反应性星形胶质细胞。当损伤区的溃变产物被吞噬清除后,星形胶质细胞用其突起填充空隙形成胶质瘢痕,成为胶质瘢痕的主要物质基础,对脊髓损伤后神经再生起机械或化学性阻断作用,在 SCI 后神经再生负面效应中占主要地位。GFAP 是相对分子质量为 $(50\sim 52)\times 10^3$ 的酸性蛋白,是星形胶质细胞的主要成分之一,富含谷氨酸和天冬氨酸,以中间微丝蛋白和可溶性蛋白两种形式存在于胶质细胞的细胞质中,是星形胶质细胞的骨架蛋白。中枢神经系统损伤后,星形胶质细胞反应性增生、突起和胶质丝的过度增加,出现 GFAP 表达上调。GFAP 在星形胶质细胞受到刺激引起反应时,其表达发生变化,因此,GFAP 能够用来特异性地标记星形胶质细胞、并被认为是星形胶质细胞活化的标志。本研究采用免疫组织化学检测 GFAP 表达以反映星形胶质细胞增生情况,结果显示,损伤后 1 d,3 组可观察到 SCI 区、损伤邻近区、中央管周围室管膜区、灰质和白质中 GFAP 阳性表达,A、C 组平均积分光密度值明显低于 B 组( $P<0.01$ );损伤 3 d 后,在损伤区及周围灰质、白质中 GFAP 阳性表达与损伤后 1 d 相比均增多,GFAP 阳性细胞肥大,染色变深,GFAP 阳性表达逐渐达到高峰,A、C 组平均积分光密度值明显低于 B 组( $P<0.01$ );损伤 7 d 后,3 组 GFAP 阳性表达较 3 d 时减少。与 B 组相比,A、C 组较低( $P<0.01$ )。由此得出,孟鲁司特和甲泼尼松龙能抑制星形胶质细胞反应性增生和活化,减少胶质瘢痕的形成,为 SCI 后神

经再生创造有利的微环境,从而促进运动功能恢复。

综上所述,孟鲁司特能有效抑制 SCI 后继发的炎症反应和脂质过氧化反应,对 SCI 早期具有较好的保护作用;能抑制 SCI 后星形胶质细胞反应性增生和活化,减少胶质瘢痕的形成,促进神经再生和运动功能恢复。但是,孟鲁司特对 SCI 的其他作用机制和晚期神经修复方面的作用尚不明了,在有效剂量方面也无确切报道,这些都需要进一步研究,从而为 SCI 治疗开辟一条研究方向。

#### 参考文献:

- [1] Anderson DK, Hall ED. Patlophysiolsy of spinal cord trauma[J]. Ann Emerg Med,1993,22(6):987-992.
- [2] Wang CX, Olschowka JA, Wrathall JR. Increase of interleukin-1 beta mRNA and protein in the spinal cord following experimental traumatic injury in the rat[J]. Brain Res,1997,759(2):190-196.
- [3] Holmin S, Mathiesen T. Intracerebral administration of interkukin-1 beta and induction of inflammation, apoptosis, and vasogenic edema[J]. J Neurosurg,2000,92(1):108-120.
- [4] Ciccarelli R, D'Alimonte I, Santavenere C, et al. Cysteinyl-leukotrienes are released from astrocytes and increase astrocyte proliferation and glial fibrillary acidic protein via cys-LT1 receptors and mitogen-activated protein kinase pathway[J]. Eur J Neurosci,2004,20(6):1514-1524.
- [5] Yu GL, Wei EQ, Wang ML, et al. Pranlukast, a cyseinyll leukotriene receptor-1 antagonist, protects against chronic ischemic brain injury and inhibits the glial scar formation in mice[J]. Brain Res,2005,1053(1/2):116-125.
- [6] Genovese T, Rossi A, Mazzon E, et al. Effects of zileuton and montelukast in mouse experimental spinal cord injury[J]. Br J Pharmacol,2008,153(3):568-582.
- [7] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effete of experience and teamwork on reliability multieenter animal spinal cord injury study[J]. J Neurotrauma,1996,13(7):343-359.
- [8] Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in rat[J]. J Neurosurg,1977,47(4):577-581.
- [9] Kigerl KA, McGaughy VM, Popovich PG. Comparative analysis of lesion development and intraspinal inflammation in four strains of mice following spinal contusion injury[J]. J Comp Neurol,2006,494(4):578-594.
- [10] Gomes-Leal W, Corkill DJ, Picanco-Diniz CW. Systematic analysis of axonal damage and inflammatory response in different white matter tracts of acutely injured rat spinal cord[J]. Brain Res,2005,1066(1/2):57-70.
- [11] Pan JZ, Ni L, Sodhi A, et al. Cytokine activity contributes to induction of inflammatory cytokine mRNAs in spinal cord following contusion[J]. J Neurosci(下转第 3297 页)

的凋亡率的影响却没有相关的研究。本实验用不同浓度的瘦素体外刺激大鼠 ASMCs 48 h 后,用流式细胞仪检测法和 Western blot 法来观察瘦素对细胞凋亡的影响;结果显示了瘦素可与 ASM 细胞膜上的瘦素受体结合通过相应的作用机制及相应的信号转导体系而实现抑制细胞的凋亡,导致裂解的 caspase-3 的减少,Bcl-xl 的增加,并具有明显的浓度依赖性,于 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时达到高峰,当在 F 组中加入 BY-0961RLeptin receptor 后,实验发现 ASMCs 的凋亡率明显升高,从而证实了 BY-0961RLeptin receptor 可通过与受体结合抑制瘦素对细胞的抗凋亡作用。瘦素也可以保护心肌细胞免受缺氧-再灌注或是过氧化氢诱导的凋亡<sup>[11]</sup>,说明瘦素在细胞保护中可能起着重要的作用。

caspase 家族在细胞凋亡中起着至关重要的作用,caspase-3 在凋亡过程中起着重要的作用,细胞凋亡的过程是 caspase-3 不可逆水解底物的级联放大反应过程<sup>[12]</sup>,它可直接破坏细胞结构,在细胞发生凋亡时,核纤层蛋白可被 caspase-3 在一个近中部的固定部位所裂解,使核纤层蛋白崩解,导致细胞凋亡。本研究发现,与对照组相比,不同浓度的瘦素干预 ASMCs 后,可使裂解的 caspase-3 蛋白表达明显增多,且与瘦素浓度呈负相关,说明 caspase-3 参与瘦素对 ASMCs 的凋亡作用。

Bcl-xl 蛋白是 BCL 蛋白家族的成员之一,是细胞中抑制细胞凋亡的重要分子之一,Bcl-xl 是结构上与 Bcl-2 具有 43% 同源性的蛋白与 Bcl-2 的作用相同,可抑制细胞凋亡。Bcl-xl 的过度表达可引起细胞核谷胱甘肽(GSH)的积聚,导致核内氧化还原平衡的改变,从而降低 caspase-3 酶的活性。本研究发现不同浓度的瘦素可以通过增加 Bcl-xl 蛋白的表达使 caspase-3 蛋白减少且与瘦素浓度呈正相关( $P < 0.01$ )。当加入瘦素受体抑制剂时,caspase-3 蛋白的表达明显增多,Bcl-xl 蛋白表达明显减少。这说明了二者在瘦素对 ASMCs 的抑制凋亡作用中发挥重要的作用,共同参与细胞的凋亡过程。

总之,瘦素可以在体外与大鼠 ASMCs 的瘦素受体结合,增加 Bcl-xl 的表达,抑制裂解 caspase-3 的表达,从而实现了 ASMCs 的保护。其中的作用机制尚不清楚,可能是 PI-3K 和 MAPK 通路发挥其作用,这有待进一步的研究来证实。

#### 参考文献:

[1] Matarese G, Mantzoros C, La Cava A. Leptin and adipocytokines: bridging the gap between immunity and athero-

sclerosis[J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(36):3676-80.

- [2] Conus S, Bruno A, Simon HU. Leptin is an eosinophil survival factor[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116(6): 1228-1234.
- [3] Shore SA, Schwartzman IM, Mellema MS, et al. Effect of leptin on allergic airway responses in mice[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 115(1):103-109.
- [4] 苏毅,王欣,唐彩月,等.瘦素在肥胖哮喘小鼠气道重构中的作用[J]. *实用临床医药杂志*, 2010, 14(7):6-9.
- [5] 何淑敏,朱述阳,李慧婷,等.瘦素对大鼠气道平滑肌细胞增殖的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(8): 849-855.
- [6] Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. Leptin in immunology[J]. *J Immunol*, 2005, 174(6):3137-3142.
- [7] Hoggard N, Trahum P, Mecer JG. Leptin and leptin receptor mRNA and Proteins expression in the murine foetus and placenta[J]. *Proc Natl Acad Science USA*, 1997, 94(20):11073-11078.
- [8] Bruno A, Pace E, chain P, et al. Leptin receptor expression in asthma[J]. *J Allergy Clin Immune*, 2009, 124(21):230-237.
- [9] Hersoug LG, Linneberg A. The link between the epidemics of obesity and allergic disease: does obesity induce decreased immune tolerance? [J]. *Allergy*, 2007, 62(10): 1205-1213.
- [10] Nair P, Radford K, Fanat A, et al. The effects of leptin on airway smooth muscle responses[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 39(4):475-481.
- [11] Shin EJ, Schram K, Zheng XL, et al. Leptin attenuates hypoxia/reoxygenation-induced activation of the intrinsic pathway of apoptosis in rat H9c2 cells[J]. *J Cell Physiol*, 2009, 221(2):490-497.
- [12] Lakhani SA, Masud A, Kuida K, et al. caspase 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis[J]. *Science*, 2006, 311(5762):847-851.

(收稿日期:2012-03-24 修回日期:2012-06-29)

(上接第 3294 页)

- Res, 2002, 68(3):315-322.
- [12] Wang CX, Olschowka JA, Wrathall JR. Increase of interleukin-1beta mRNA and protein in the spinal cord following experimental traumatic injury in the rat[J]. *Brain Res*, 1997, 759(2):190-196.
- [13] Nestic 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.
- [14] Hall ED. Inhibition of lipid peroxidation in CNS trauma [J]. *J Neurotrauma*, 1991, 8(1):31-40.

[15] Hall ED. Lipid antioxidants in acute central nervous system injury[J]. *Ann Emerg Med*, 1993, 22(6):1022-1027.

[16] 郑望苟,潘卫红,陈家禄.脊髓损伤后脊髓内丙二醛含量变化及其与神经功能损害的关系[J]. *中国康复医学杂志*, 2004, 19(2):103-104.

[17] Gimenez Ribotta M, Menet V, Privat A. The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS [J]. *Prog Brain Res*, 2001(132):587-610.

(收稿日期:2012-03-02 修回日期:2012-06-28)