

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.16.006

文章编号: 1005-8982(2017)16-0030-05

雌激素对兔脊髓缺血再灌注损伤保护作用的机制研究

刘红光¹, 张超¹, 曾愈程¹, 刘芳¹, 康颖²

(1. 南华大学附属第一医院 乳腺甲状腺外科, 湖南 衡阳 421001;

2. 南华大学医学院 外科学教研室, 湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 研究雌激素对脊髓缺血再灌注损伤保护作用的机制。**方法** 按随机数表法把成年的新西兰大白兔分为 A~E 5 组, 每组 9 只。钳夹肾下腹主动脉 20 min 恢复再灌注; B 组, 接受与 A 组同样的麻醉和手术准备, 但不行缺血/再灌注损伤; C 组, 再灌注开始时从兔耳的缘静脉注射 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 雌激素; D 组, 再灌注开始时从兔耳的缘静脉注射 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 雌激素; E 组, 再灌注开始时从兔耳的缘静脉注射 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 雌激素。再灌注 48 h 后根据 Tarlov 法对下肢的神经功能进行评分, 然后取脊髓组织苏木素-伊红染色法(HE)进行病理分析。**结果** Tarlov 评分中雌激素组的神经功能评分高于 A 组, 与 A 组比较有统计学意义($P < 0.05$)。组织病理表明脊髓的前角运动神经元出现凋亡, 有显著坏死。A 组脊髓的前角运动神经元计数少于雌激素组, 两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 雌激素可明显改善兔脊髓缺血再灌注的下肢神经功能, 使脊髓的前角正常运动神经元的数量增加, 减小缺血再灌注的损伤。

关键词: 雌激素; 脊髓缺血; 再灌注损伤

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Protective effect of estrogen on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits

Hong-guang Liu¹, Chao Zhang¹, Yu-cheng Zeng¹, Fang Liu¹, Ying Kang²

(1. Department of Breast and Thyroid Surgery, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Surgery, School of Medicine, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the protective effect of estrogen on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits and its mechanism. **Methods** According to a random number table method, adult New Zealand rabbits were divided into A-E five groups with 9 in each group. In the rabbits of group A, infrarenal aorta was clamped for 20 min and then blood circulation was restored (reperfusion). The rabbits of group B received the same anesthesia and surgery as group A, but no ischemia-reperfusion injury. The rabbits of groups C, D and E had injection of estrogen 200, 400 and 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectively through ear veins when reperfusion started. The neurological function of the lower extremities was scored according to Tarlov law 48 h after reperfusion. Then hematoxylin-eosin staining was used for pathological analysis of spinal cord. **Results** The neurological function scores of the groups C, D and E were significantly higher than those of the group A ($P < 0.05$). Histopathological study showed apoptosis and marked necrosis of the motor neurons in the anterior horn of the spinal cord. The number of anterior horn motor neurons in the group A was significantly smaller than that of the estrogen groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Estrogen can significantly improve the neurological function of the lower limbs of rabbits with spinal cord ischemia and reperfusion, increase the number of normal motor neurons in the anterior horn of the spinal cord, and reduce ischemia-reperfusion injury.

Keywords: estrogen; spinal cord ischemia; reperfusion injury

临床中在行脊髓手术或者腹主动脉瘤等手术时,需要对动脉进行阻断,因此,会造成脊髓不同程度的缺血,或者发生神经功能的一过性障碍,甚至严重的患者还会表现出急性或者迟发性截瘫^[1-2]。为使患者得到有效治疗,防治上诉情况的方法也成为目前的研究热点与难点。雌激素对帕金森病、脑中风预后以及阿尔茨海默病有缓解作用,但对脊髓缺血再灌注损伤保护作用的机制报道很少^[3-4]。本研究探讨雌激素对兔脊髓缺血再灌注损伤的保护作用以及可能的机制,且初步研究使用的最佳剂量,为临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂与仪器

雄性新西兰大白兔[动物许可证号:SCXK(湘)2010-0004,体重 2.0~2.5 kg]45 只,购自南华大学实验动物中心。雌激素为新疆新资源生物制药有限责任公司产品,戊巴比妥钠购自上海新亚药业有限公司,甲醛溶液购自武汉佳华园化工有限公司,苏木素-伊红染色(hematoxylineosin staining, HE)试剂盒购自天津百浩生物科技有限公司。温度探头购自北京精航远洋科技有限公司,压力传感器购自上海狄佳传感科技有限公司。手术器械:手术刀、手术剪、血管钳、止血钳、注射器、套管针及灌注针头等。

1.2 模型的复制及分组

按随机数表法把成年的新西兰大白兔均分为 A~E 5 组,每组 9 只。A 组单纯阻闭肾下腹主动脉 20 min,再灌注 2 d;B 组接受同样的麻醉和手术准备,但不行缺血/再灌注损伤;C~E 3 组,阻闭肾下腹主动脉 20 min,再灌注开始时分别从兔耳的缘静脉注射 200、400 及 800 μ g/kg 雌激素。

1.3 处理方法

所有的新西兰大白兔在实验的前晚仅给予饮水,饮水量不限,对其禁食。实验前给予 40 mg/kg 戊巴比妥钠(浓度:3% w/v)从兔的耳缘静脉注射麻醉。术中按 4 ml/(kg·h)的复方乳酸钠给予维持。进行股动脉穿刺,股动脉压的监测采用压力传感器,脉率(pulse rate, PR)的读取依据为压力波形。温度的监测采用温度探头测量肛温,术中使肛温保持在 38~39℃。抽取缺血前与缺血 10 min 及再灌注 10 min 的动脉血样对血氧分压(partial pressure of oxygen, PaO₂)、动脉血二氧化碳分压(partial pressure of carbon dioxide in artery, PaCO₂)、pH 等进行测定。

1.4 复制兔脊髓缺血的模型

取兔的腹正中作为切口,剪开兔的皮肤与腹膜,其位置为剑突下两指,使腹主动脉及其左侧肾脏暴露出来,腹主动脉的阻闭选择在左肾动脉的分支下 0.8 cm 之处,恢复再灌注的时间为阻闭后 20 min。腹主动脉阻闭前 5 min 耳缘静脉给予 150 u/kg 肝素钠预防血栓形成,检查腹腔无出血,逐层缝合腹壁,0.25%布比卡因浸润镇痛,移除所有套管针,肌内注射庆大霉素 40 000 u 以预防感染。术后动物室温下苏醒后返回饲养笼观察至再灌注后 48 h 术后动物自由饮水,术后 8 h 恢复自由饮食。对于术后截瘫的动物,必要时挤压下腹部人工辅助排尿。阻闭成功的标志为股动脉的压力波形消失,远端的动脉压力值平均动脉压(mean artery pressure, MAP) \leq 10 mmHg。开放时的标准为股动脉的压力波形恢复。

1.5 后肢运动的功能评分

手术结束后恢复兔的饮食自由。再灌注后 2 d,对兔的后肢运动进行功能评分,评分根据 Tarlov 标准进行:4 分表示后肢的功能恢复完全,可以正常行走;3 分表示能够站立但是不能够行走;2 分表示无法站立但是后肢能够自由活动;1 分表示能够观察到关节的自主活动;0 分表示未能够观察到下肢的活动^[5]。

1.6 病理学观察

兔在再灌注 2 d 完成神经功能的评分后,给予 40 mg/kg 戊巴比妥钠静脉注射进行深麻醉,然后自胸骨处剪开胸腔,使心脏暴露出来,把灌注针头插入到兔的自主动脉根部并用 1 000 ml 生理盐水进行灌注,用 10%的 500 ml 甲醛溶液滴注固定组织。灌注固定完成之后,从背侧使脊髓暴露出来,并取出腰膨大(L₅~L₇)部位的脊髓组织,放在 10%的甲醛溶液中浸泡过夜。24 h 后乙醇脱水变干后,石蜡包埋。沿冠状切面切成 6 μ m 厚的脊髓组织,把蜡膜除去后,进行常规的苏木精伊红染色。病理学的改变在 200 倍的显微镜下进行观察。胞核的固缩或者溶解是损伤及其坏死神经元的表现,胸浆的染色呈嗜伊红,尼氏体在胞浆中消失,部分细胞有明显程度固缩红染。正常的神经元为多角形的结构,胞核具有清晰的结构,胞浆中存在尼氏体。病理的损伤程度根据脊髓前角的正常神经元计数进行评定。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理,计量

资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示, 比较做单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔缺血前后的生理学指标比较

对 A ~ E 5 组的脊髓缺血的过程各组的 MAP、PaO₂、PaCO₂、pH、肛温等指标, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间如动脉阻断前、阻断期、再灌注 10 min 的 MAP、PaO₂、PaCO₂、pH、肛温等指标的水平值比较, 差异无统计学意义 ($F = 3.236, 2.874, 2.998, 1.092$ 和 $4.367, P = 0.092, 0.104, 0.101, 0.145$ 和 0.078); ②A ~ E 5 组间的 MAP、PaO₂、PaCO₂、pH、肛温等指标的水平值比较, 差异有统计学意义 ($F = 9.127, 6.238, 8.945, 5.376$ 和 $7.921, P = 0.000, 0.024, 0.005, 0.031$ 和 0.007); ③A ~ E 5 组间的 MAP、PaO₂、PaCO₂、pH、肛温等指标的水平值的变化趋势比较, 差异有统计学意义 ($F = 11.147, 9.538, 8.905, 8.376$ 和 $10.921, P = 0.000, 0.000, 0.003, 0.006$ 和 0.000),

见表 1。

2.2 兔后肢运动的功能评分比较

A ~ E 5 组在 4、8、12、24 和 48 h 的运动功能评分比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点运动功能评分比较差异有统计学意义 ($F = 11.379, P = 0.000$); ②A ~ E 5 组间的运动功能评分比较差异有统计学意义 ($F = 12.098, P = 0.000$); ③A ~ E 5 组间的运动功能评分的水平值变化趋势有统计学意义 ($F = 19.013, P = 0.000$), 见表 2。

2.3 病理学结果

再灌注 48 h 后, A 组脊髓前角的光镜观察中正常的神经元数量减少, 神经细胞发生严重的缺血变性坏死, 胞浆中可见深色的阳性染色产物, 细胞核发生固缩, 核仁消失, 空泡出现在细胞周围。E 组中箭头所指为细胞核形态, 可见形态正常, 细胞核的核仁清晰可见。而 C 组照片中由于神经细胞发生严重的缺血变性坏死, 箭头所指为细胞核发生固缩, 核仁消失, 空泡出现在细胞周围 (见附图)。A 组正常的神经元数量低于 E 组 ($t = 6.475, P = 0.000$) (见表 3)。E 组

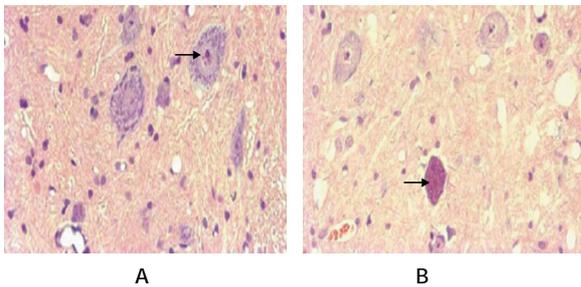
表 1 兔缺血前后的生理学指标比较

组别	动脉阻断前 10 min				
	MAP/mmHg	PaO ₂ /mmHg	PaCO ₂ /mmHg	pH	肛温 / °C
A 组	82.97 \pm 9.10	106.27 \pm 7.08	36.27 \pm 2.48	7.38 \pm 0.05	38.71 \pm 0.14
B 组	76.13 \pm 7.86	109.37 \pm 9.87	40.10 \pm 4.61	7.38 \pm 0.04	38.69 \pm 0.28
C 组	79.57 \pm 8.34	107.94 \pm 7.18	38.34 \pm 4.67	7.41 \pm 0.03	38.57 \pm 0.17
D 组	81.27 \pm 7.15	105.99 \pm 5.10	37.01 \pm 2.81	7.38 \pm 0.04	38.72 \pm 0.16
E 组	75.81 \pm 6.28	105.97 \pm 5.92	37.27 \pm 3.14	7.40 \pm 0.04	38.62 \pm 0.19
组别	阻断期				
	MAP/mmHg	PaO ₂ /mmHg	PaCO ₂ /mmHg	pH	肛温 / °C
A 组	79.57 \pm 9.27	101.27 \pm 10.96	41.04 \pm 2.84	7.34 \pm 0.06	38.37 \pm 0.27
B 组	76.67 \pm 6.84	102.07 \pm 8.64	36.87 \pm 2.67	7.35 \pm 0.05	37.38 \pm 0.19
C 组	77.94 \pm 7.68	107.24 \pm 7.86	25.20 \pm 1.67	7.37 \pm 0.04	38.40 \pm 0.09
D 组	78.29 \pm 5.89	101.07 \pm 5.10	27.21 \pm 4.67	7.36 \pm 0.06	38.47 \pm 0.26
E 组	79.10 \pm 5.37	107.67 \pm 9.67	34.93 \pm 2.83	7.35 \pm 0.05	38.43 \pm 1.05
组别	再灌注 10 min				
	MAP/mmHg	PaO ₂ /mmHg	PaCO ₂ /mmHg	pH	肛温 / °C
A 组	74.67 \pm 8.67	105.13 \pm 4.55	34.21 \pm 1.67	7.36 \pm 0.03	38.57 \pm 0.18
B 组	75.69 \pm 5.67	105.23 \pm 7.93	34.31 \pm 2.67	7.21 \pm 0.05	38.50 \pm 0.16
C 组	79.18 \pm 9.27	100.05 \pm 4.93	39.05 \pm 2.54	7.15 \pm 0.06	38.65 \pm 0.15
D 组	78.97 \pm 8.12	104.15 \pm 6.75	45.12 \pm 1.64	7.39 \pm 0.03	38.56 \pm 0.09
E 组	74.59 \pm 8.06	99.14 \pm 6.05	24.98 \pm 2.69	7.38 \pm 0.04	37.58 \pm 0.15

有较多的正常运动神经元,胞体的形状呈多角形,有较为清晰的核仁,有清晰的胞浆尼氏体。

表 2 兔后肢运动的功能评分 ($n=9$,分, $\bar{x}\pm s$)

组别	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
A 组	1.18 ± 0.56	1.05 ± 0.21	0.99 ± 0.13	0.76 ± 0.09	0.88 ± 0.12
B 组	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
C 组	1.83 ± 0.44	1.63 ± 0.23	1.78 ± 0.23	1.70 ± 0.23	1.73 ± 0.23
D 组	1.97 ± 0.43	1.89 ± 0.36	1.88 ± 0.34	1.98 ± 0.37	2.00 ± 0.34
E 组	2.67 ± 0.55	2.90 ± 0.68	3.09 ± 0.71	3.12 ± 0.59	2.88 ± 0.64



A: E 组; B: C 组; A 中箭头所指为完整形态较好的细胞核,核仁清晰可见; B 中箭头所指为胞核发生固缩,核仁消失,空泡出现在细胞周围

附图 再灌注 48 h 兔的脊髓前角光镜图 ($\times 200$)

表 3 再灌注 48 h 后脊髓前角的正常运动神经元计数的比较 ($n=9$, $\bar{x}\pm s$)

组别	正常神经元计数
A 组	13.65 ± 4.37
B 组	89.37 ± 19.37
C 组	32.48 ± 8.34
D 组	35.19 ± 9.37
E 组	42.18 ± 10.14
F 值	76.298
P 值	0.000

3 讨论

近年来,关于雌激素的研究越来越多。有研究发现 17 β -雌二醇能够有效地降低血浆的肌酸磷酸激酶以及乳酸脱氢酶和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,并能降低 MDA 的活性减轻缺血再灌注的损伤,雌激素对缺血再灌注损伤具有很明显的保护作用。

本实验的研究结果显示,在再灌注刚开始时,经过兔耳缘给予 200、400 和 800 μ g/kg 雌激素静脉注射,剂量的增加能够增加兔脊髓前角正常运动的神经元数目,对兔缺血后造成的下肢功能障碍有明显

的改善效果,可以缓解兔脊髓缺血后再灌注造成的损伤^[6-7]。

组织器官的再灌注以后氧自由基的损伤,于再灌注区的中性粒细胞会发生聚集,很多细胞因子以及炎症介质发生释放,其内皮细胞发生肿胀进而导致微循环发生障碍,NO 以及内皮素的比例失调,NF- κ B 的作用以及其他因素被认为是缺血再灌注后发生组织损伤的重要原因。而雌激素可以降低髓过氧化物酶的活性来降低中性粒细胞聚集的程度。进而导致对脊髓的缺血再灌注损伤形成保护作用。

本研究的病理研究结果发现,A 组脊髓前角中嗜伊红染色坏死神经元的数量很大,雌激素治疗后减少了坏死神经元。C 组与 D 组脊髓前角的正常运动神经元与 E 组比较差异有统计学意义,神经功能的评分结果也得出一致的结论。说明 800 μ g/kg 体内可能发挥出了比较强的生物学作用,相关的参考文献也显示^[8-9],暂时临时的使用该剂量的雌激素没有明显的副作用发生。因此,此剂量可以作为下一步进行雌激素作用机制深入研究的剂量。

脊髓组织缺血会导致三磷酸腺苷的数量减少是脊髓缺血再灌注损伤机制的主要体现,使细胞膜的离子泵功能发生衰竭^[10-11]。钠离子发生内流导致细胞出现水肿,溶酶体发生破裂导致谷氨酸等的兴奋性氨基酸增加其释放量,钙离子大量内流出现钙超载,使多种酶类被激活,引起大量的自由基生成,进而发生严重的炎症反应,最后细胞组织出现水肿性破坏致使血管痉挛阻塞,组织的缺血再灌注损伤由此形成。相关文献报道^[12],雌激素能够对局部炎症反应进行缓解,使抗凋亡的系统得到激活。

雌激素对神经的保护作用可能通过线粒体途径参与。线粒体作为细胞的氧化磷酸化主要场所,是细胞的能量加工厂,死亡扳机点是细胞功能衰竭的原因^[13-14]。再灌注出现后,大量的氧自由基会在线粒体内产生,对细胞的呼吸链造成破坏,使细胞出现能量衰竭导致死亡。本研究应用雌激素治疗的兔缺血脊髓在匀浆后检查,超氧化物歧化酶的活性显著上升,歧化酶是细胞中主要抗氧化酶以及自由基的清除剂,水平出现降低,表明对组织细胞的保护受毒性氧自由基损伤效能降低^[15-16]。进而雌激素对兔脊髓缺血再灌注损伤的作用可能与歧化酶水平的增加密切相关,清除过多的氧自由基使损伤得以减轻,其保护作用得到发挥^[17-18]。下一步更深入的研究,可以

从细胞体内的两个层面开展,对雌激素保护作用和线粒体的损伤关系进行研究^[9]。

综上所述,雌激素可明显改善兔脊髓缺血再灌注的下肢神经功能,使脊髓的前角正常运动神经元的数量增加,减少缺血再灌注的损伤。

参 考 文 献:

- [1] 李春,邱玉琴,杨国忠,等.超高效液相色谱-质谱联用技术同时检测大鼠血浆中蒿甲醚及其主要代谢产物双氢青蒿素[J].分析化学,2015,43(4):588-593.
- [2] HU J, YU Q J, XIE L J, et al. Targeting the blood-spinal cord barrier: A therapeutic approach to spinal cord protection against ischemia-reperfusion injury[J]. Life Sciences, 2016, 158(1): 1-6.
- [3] 刘大力.骨髓间充质干细胞参与肝星状细胞凋亡的机制[J].中国组织工程研究,2015,19(23):3639-3643.
- [4] 区泳芳,伏学坤,梅兴莎,等.三七总皂苷对大鼠骨髓间充质干细胞凋亡的抑制作用[J].生理学报,2016,90(3):149-151.
- [5] 杨成喜,张蕾,吴风雷,等.瘦素、雌激素及雌激素受体在肺癌组织中的表达及其相关性[J].肿瘤防治研究,2013,40(6):572-575.
- [6] 赵丕文,LEE Y W,陶仕英,等.G蛋白偶联雌激素受体在雌激素相关肿瘤发生中的作用[J].中国药理学通报,2014,27(8):1037-1041.
- [7] LIU S Y, YANG Y W, JIN M, et al. Xenon-delayed postconditioning attenuates spinal cord ischemia/reperfusion injury through activation AKT and ERK signaling pathways in rats[J]. Journal of the Neurological Sciences, 2016, 368(15): 277-284.
- [8] 张俐,安国尧,陈凯,等.夹闭腹主动脉和腰动脉的脊髓缺血再灌注损伤模型比较研究[J].医学研究生学报,2014,27(2):124-128.
- [9] 戚朦,刘文佳,马洋,等.亚精胺促进雌激素缺乏小鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化并抑制其成脂分化[J].细胞与分子免疫学杂志,2015,31(6):787-791.
- [10] KAZUMASA T, NORIHIKO S, DAISUKE T, et al. nsesophageal versus transcranial motor evoked potentials to monitor spinal cord ischemia [J]. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2016, 151(2): 509-517.
- [11] 林海泓,罗心平,施海明,等.促红细胞生成素基因修饰对 H2O2 诱导的小鼠骨髓间充质干细胞凋亡的影响[J].中国分子心脏病学杂志,2015,38(3):1350-1353.
- [12] BENJAMIN D, YAKOV F, DROR B D, et al. Minocycline effectively protects the rabbit's spinal cord from aortic occlusion-related ischemia [J]. Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia, 2016, 30(2): 282-290.
- [13] 汪祉霖,方波,谭文斐,等.缺氧预处理骨髓间充质干细胞对大鼠脊髓缺血再灌注损伤保护作用的研究[J].中国医师杂志,2015,17(4):237-239.
- [14] 白超,杨琨,李新喜,等.骨髓间充质干细胞移植治疗肢体缺血的机制[J].中国组织工程研究,2015,19(6):928-933.
- [15] 刘敬霞,任非非,刘会贤,等.扎里奴思方干预骨髓间充质干细胞移植对脑缺血再灌注损伤大鼠黏附分子及 NeuN 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(12):29-32.
- [16] 屈新辉,王万松,吴凌峰,等.动、静脉移植骨髓间充质干细胞治疗急性期缺血再灌注大鼠模型的比较[J].中国老年学杂志,2015,35(24):27-29.
- [17] 李映辰,王瑾茜,刘侃,等.肾脑复元汤联合人脐带间充质干细胞移植对脑缺血再灌注大鼠神经营养因子表达的影响[J].中草药,2016,47(5):128-132.
- [18] 刘轲,鲁红伟,冯静静,等.脑脉通联合骨髓间充质干细胞移植对脑缺血再灌注大鼠神经细胞中 SYN-38 和 PSD-95 表达变化的影响[J].时珍国医国药,2015,26(5):1048-1051.
- [19] 司晓芸,李静静,毕晓红,等.骨髓间充质干细胞表面 CXCR4 过表达影响缺血-再灌注大鼠肾损伤修复的机制研究[J].中华急诊医学杂志,2015,24(12):1523-1525.

(张蕾 编辑)