

褪黑素对大鼠急性脊髓损伤的保护作用

周宏艳¹ 赵洪波¹ 杨 军² 逯 强²

摘要 目的:探讨褪黑素对大鼠急性脊髓损伤的作用。**方法:**将 72 只 Wistar 成熟健康大鼠随机分为褪黑素组、甲泼尼龙琥珀酸钠组、生理盐水组、无水乙醇组,采用改良 Allen's 技术(5g×10cm)以 T9 为中心制作急性脊髓损伤模型;损伤后 10min 分别予以褪黑素(100mg/kg)、甲泼尼龙琥珀酸钠(30mg/kg)、生理盐水及 5% 无水乙醇腹腔内注射,伤后 2h、24h、72h 分别观察各组 BBB 评分变化,取 T8、T9、T10 3 个脊髓节段,应用免疫组化对脊髓组织及 P53 阳性细胞进行标记,探讨褪黑素对急性脊髓损伤有无保护作用。**结果:**在急性脊髓损伤后,各观测时间点褪黑素组与甲泼尼龙琥珀酸钠组 BBB 评分均较生理盐水组及无水乙醇组明显升高($P<0.01$),褪黑素组与甲泼尼龙琥珀酸钠组之间差异无显著性($P>0.05$);P53 阳性细胞的表达在脊髓损伤后各组均呈逐渐增高趋势,但褪黑素组与甲泼尼龙琥珀酸钠组较生理盐水组及无水乙醇组 P53 阳性细胞表达降低($P<0.01$),褪黑素组与甲泼尼龙琥珀酸钠组之间 P53 阳性细胞表达差异无显著性($P>0.05$),无水乙醇组与生理盐水组差异无显著性($P>0.05$)。**结论:**褪黑素对大鼠急性脊髓损伤具有保护性治疗作用,其作用效果与甲泼尼龙琥珀酸钠相似。

关键词 脊髓损伤; 褪黑素; 甲泼尼龙琥珀酸钠

中图分类号:R683.2, R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-09-0799-03

Experimental study of protective effect of melatonin in the acute spinal cord injury in rats/ZHOU Hongyan, ZHAO Hongbo, YANG Jun, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(9): 799—801

Abstract Objective: To investigate the effects of melatonin in experimental spinal cord injury (SCI) in rats. **Method:** The Wistar 72 adult and health male rats were randomly allocated into four groups: melatonin group, methylprednisolone group, Sodium Chloride group and 5% Vehicle-treated group. The model of SCI was produced by Allen's method at the level of T9 in moderate degree. Melatonin (100mg/kg), Methylprednisolone (30mg/kg), Sodium Chloride-treated group and 5% Vehicle were given intraperitoneally ten minutes after SCI. All rats were evaluated by observing BBB score and the spinal cord of T8、T9、T10 were obtained at 2、24、72 hours postinjury. Samples obtained from all groups were used for further study, including immunohistochemical staining and the expression of P53 to approach the effects of melatonin in experimental rats SCI. **Result:** Following SCI, within all monitoring time, the BBB score was found to increase in melatonin group and methylprednisolone group compared with vehicle-treated group and Sodium Chloride-treated group ($P<0.01$). The difference between melatonin group and methylprednisolone group was not statistically significant ($P>0.05$). The characteristics of P53 was rising in each group. In melatonin group and methylprednisolone group, the characteristics of P53 was found to decrease Compared with the vehicle-treated group and Sodium Chloride-treated group ($P<0.01$). The difference between melatonin group and methylprednisolone group was not statistically significant ($P>0.05$), the difference between vehicle-treated group and Sodium Chloride-treated group was not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion:** Melatonin has protective effect to experimental acute SCI, the effects are correspondent with methylprednisolone.

Author's address Department of Orthopaedics, No.2 Hospital of Tangshan City, Hebei Province, 063000

Key words spinal cord injury; melatonin; methylprednisolone

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种严重的中枢神经系统损伤,致残率较高,预后多不理想。目前许多学者通过动物实验证实褪黑素能直接清除自由基、减轻细胞的过氧化损害,对脊髓损伤具有一定的保护作用。本实验通过测定大鼠脊髓损伤前后 BBB(the Basso Beattie Bresnahan locomotor rating scale, BBB)评分的变化及不同时间点 P53 阳性细胞的表达,来探讨褪黑素对脊髓损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型

健康成年雄性 Wistar 大鼠 72 只,体重 230—280g,随机分为褪黑素组、甲泼尼龙琥珀酸钠(甲强

1 唐山市第二医院,河北,063000

2 中国医科大学附属第二医院

作者简介:周宏艳,女,硕士,住院医师

收稿日期:2007-03-19

龙)组、生理盐水组和无水乙醇组,每组分为伤后2h、24h、72h三个时间点,每个时间点6只大鼠。10%水合氯醛300mg/kg腹腔注射麻醉,背部剪毛,然后将大鼠俯卧位固定于手术台上,消毒、铺巾,行背中段正中切口,以T9为中心显露T8-10棘突椎板,暴露脊髓硬膜,采用改良Allen's^[1]脊髓打击技术,用5g重锤自距硬膜10cm的高度垂直落下,造成大鼠急性脊髓损伤。以打击后鼠尾出现无规则的痉挛性摆动为打击成功的标志。急性脊髓损伤后10min予4组大鼠腹腔内分别注射褪黑素100mg/kg(瑞士Alexis公司)、甲泼尼龙琥珀酸钠30mg/kg(法玛西亚-普强公司比利时分厂)及与褪黑素组等量的生理盐水及无水乙醇。各组大鼠均于损伤后每天8AM,2PM,8PM三次人工膀胱排尿,直至到相应时间点取材。

1.2 取材及切片制备

4组脊髓损伤大鼠分别于术后2h、24h、72h按BBB评分法评价^[2]大鼠双后肢神经功能恢复情况,然后分别在相应时间点麻醉下剖胸,经左心室-主动脉插管灌流固定,先用生理盐水约200ml冲洗至流出澄清液,再用4%多聚甲醛约200ml灌流固定,解剖椎管,完整取出损伤段脊髓组织。迅速用4%甲醛液进行固定,24h后石蜡包埋固定。

切取T8-T10 3个节段脊髓组织,连续横向切片,片厚10 μ m。每个组织块随机取连续切片行免疫组化染色。

1.3 免疫组化

采用SABC法,切片脱蜡至水,微波修复抗原。滴加封闭液。滴加抗P53的一抗工作液(武汉博士德公司),37℃2h。滴加生物素化山羊抗小鼠IgG,37℃20min。滴加HIGH-SABC液37℃40min,以增加敏感性并降低背景。磷酸盐缓冲溶液冲洗,重氮氨基苯显色,苏木素轻度复染,脱水封片。

1.4 图像分析及数据处理

将损伤段免疫组化切片进行图像分析,以细胞中呈含有明显的黄棕色颗粒者为阳性标志,计数高倍视野内染色阳性细胞,计算阳性率。利用图像分析系统(OLYMPUS光学显微镜图像采集系统及显微图像分析系统,型号:Meta Morph/DP10/BX41,生产厂:UIC/OLYMPUS,US/JP)进行图像采集。所有数据资料

均采用SPSS 12.0统计软件进行处理。各组标本阳性细胞的表达数值用均数 $\pm$ 标准差表示,用单因素方差分析进行统计学检验。 $P<0.05$ 视为有显著性意义, $P<0.01$ 视为具有非常显著性意义。

2 结果

2.1 各组不同时间点的BBB评分比较

本实验中死亡动物共6只,存活率为94.4%,其中无水乙醇和生理盐水组在24h分别死亡2只、3只,甲泼尼龙琥珀酸钠组在72h死亡1只,死亡动物均及时重新建立动物模型采集标本进行补充。各组不同时间点的BBB评分参见表1,在每个分组当中,随着损伤后时间的推移,脊髓损伤的程度逐渐加重;在每个时间点(2h、24h、72h),无水乙醇组与生理盐水组之间未见显著性差异,甲泼尼龙琥珀酸钠组、褪黑素组分别与生理盐水组之间差异有非常显著性,而甲泼尼龙琥珀酸钠组与褪黑素组之间则差异无显著性。

2.2 免疫组化

4组实验动物的损伤脊髓切片标本2h P53阳性细胞有少量的表达,24h P53阳性细胞数量增多,72h表达数量继续升高。P53阳性细胞主要分布于损伤段灰质前角神经元、白质外侧索及腹侧柱中胶质细胞。高倍镜下,P53阳性细胞主要分为两种类型:一类细胞阳性信号位于细胞核内,另一类细胞阳性信号主要位于胞浆内。前者细胞形态大多异常,表现为细胞胞体固缩,染色质常呈半月形贴于核膜(见图1,A、B,见前置彩色插页8);后者形态大多比较正常,常位于损伤比较轻的区域(见图1,C、D,见前置彩色插页8)。

图A、B比较可见生理盐水组与褪黑素组均有明显P53阳性细胞表达,表现为细胞胞体固缩,染色质常呈半月形贴于核膜(如箭头所示),且两组之间差异无显著性。图C、D比较可见褪黑素组和甲泼尼龙琥珀酸钠组P53阳性细胞表达与生理盐水组和无水乙醇组相比较少,且损伤程度较轻,细胞阳性信号主要位于胞浆内,形态大多比较正常(如箭头所示)。褪黑素组与甲泼尼龙琥珀酸钠组之间相比则差异无显著性。在伤后各时间点,褪黑素组和甲泼尼龙琥珀酸钠组P53阳性细胞计数与生理盐水组及无水乙醇

表1 不同时间段各组BBB评分及P53阳性细胞计数的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	BBB评分			P53阳性细胞计数		
		伤后2h	伤后24h	伤后72h	伤后2h	伤后24h	伤后72h
生理盐水组	18	2.33 $\pm$ 0.37	3.01 $\pm$ 1.14	3.08 $\pm$ 1.07	11.33 $\pm$ 1.02	50.00 $\pm$ 1.91	194.33 $\pm$ 2.23
无水乙醇组	18	2.83 $\pm$ 0.75 ^①	3.97 $\pm$ 1.31 ^①	4.08 $\pm$ 1.05 ^①	11.83 $\pm$ 0.95 ^①	53.83 $\pm$ 0.95 ^①	189.67 $\pm$ 2.89 ^①
甲泼尼龙琥珀酸钠组	18	2.97 $\pm$ 0.85 ^②	5.82 $\pm$ 0.95 ^②	9.04 $\pm$ 1.08 ^②	9.00 $\pm$ 0.58 ^②	32.00 $\pm$ 1.59 ^②	105.50 $\pm$ 2.59 ^②
褪黑素组	18	3.18 $\pm$ 0.69 ^②	6.08 $\pm$ 1.03 ^②	10.74 $\pm$ 1.47 ^②	7.83 $\pm$ 0.60 ^②	30.33 $\pm$ 1.45 ^②	103.50 $\pm$ 2.59 ^②

①与相应时间段的生理盐水组相比 $P>0.05$;②与相应时间段的生理盐水组相比 $P<0.01$

组相比明显降低, 差异具有非常显著性 ($P < 0.01$), 褪黑素组与甲泼尼龙琥珀酸钠组之间差异无显著性 ($P > 0.05$), 无水乙醇组与生理盐水组之间差异无显著性 ($P > 0.05$), 见表 1。

3 讨论

脊髓损伤是非常严重的疾病, 多见于交通伤和战伤等。脊髓损伤后会发生一系列的原发性和继发性病理生理改变, 包括: 氧自由基、神经递质、神经肽、酶活动的改变等。甲泼尼龙琥珀酸钠作为治疗实验性脊髓损伤的一个药理学手段已经被广泛应用, 在临床当中, 甲泼尼龙琥珀酸钠也被证实早期应用是治疗急性脊髓损伤的一种有效手段。

褪黑素是一类主要由松果体分泌的肽类激素, 具有高度的脂溶性和水溶性, 能透过核膜进入核内发挥作用, 因此不仅能保护膜脂质, 还能保护蛋白质、核酸及细胞其他成分。Erkan 研究表明^[3], 对脊髓损伤褪黑素与甲泼尼龙琥珀酸钠具有相同的抗氧化能力, 但对脊髓继发损伤, 褪黑素具有比甲泼尼龙琥珀酸钠更好的效果。且近年来研究发现褪黑素能直接清除自由基、抑制肿瘤坏死因子和髓过氧化物酶, 减轻中性粒细胞介导的毒性损害^[4-6], 可以减轻细胞损伤和凋亡。而 P53 参与了神经细胞凋亡及 DNA 损伤修复, 并可以调节多种相关基因的表达, 成为调控细胞凋亡的核心物质之一。有研究表明, 中枢神经系统损伤后, P53 mRNA 的表达可能先于神经细胞的凋亡, 而 P53 蛋白可能以突变型为主, 且在一定程度上 P53 阳性细胞的表达与中枢神经系统损伤程度呈正相关^[7-8]。其作用机制可能通过以下几个环节实现: ①神经细胞 DNA 轻微损伤, 诱导 P53 在转录和翻译水平大量表达; ②调节相关基因表达; ③与其他蛋白形成复合物, 参与 DNA 合成、复制、修复。国内刘锦波等^[9]通过动物实验证明褪黑素通过降低脊髓

损伤后游离铁的释放, 降低脂质过氧化过程, 抑制组织谷胱甘肽过氧化物酶活性升高, 从而对脊髓损伤具有一定的保护作用。本研究也证实, 脊髓损伤后 P53 蛋白在损伤区域内细胞核及胞浆内表达增加, 通过测定各组实验大鼠损伤段脊髓 P53 阳性细胞的表达及损伤前后 BBB 评分的变化, 发现甲泼尼龙琥珀酸钠与褪黑素治疗的实验组 P53 阳性细胞明显减少, 损伤后 BBB 评分明显高于对照组, 从而初步推测褪黑素与甲泼尼龙琥珀酸钠一样对脊髓损伤具有一定程度的保护性治疗作用, 到目前为止, 尚未发现褪黑素具有明显的副作用^[10], 故褪黑素是否可作为一种新的治疗脊髓损伤的手段将是我们今后在临床工作中研究的重点。

参考文献

- [1] Allen AR. Surgery of experimental lesions of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation: preliminary Report[J]. JAMA, 1911, 57: 878—880.
- [2] Thomas AJ, Nockels RP, Pan HQ, et al. Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats[J]. Spine, 1999, 24(20): 2134—2138.
- [3] Erkan K, Morvet T, Solcuk P, et al. Comparison of the effects of melatonin and methylprednisolone in experimental spinal cord injury[J]. J Neurosurg, 2000, 93: 77—84.
- [4] Russel JB, Dun XT, Carmen O, et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress [J]. J Biomed Sci, 2000, 7: 444—458.
- [5] Toru FJ, Takafumi, NK, Takamura ID, et al. potent protective effect of melatonin on experimental spinal cord injury[J]. Spine, 2000, 25: 769—775.
- [6] Russel JR, Dun XT, Carmen O, et al. Action of melatonin in the reduction of oxidative stress [J]. J Biomed Sci, 2000, 7: 444—458.
- [7] 傅强, 侯铁胜, 鲁凯伍. 大鼠脊髓急性损伤后 P53 蛋白的表达[J]. 颈腰痛杂志, 2000, 21(4): 280—282.
- [8] 侯铁胜, 傅强, 鲁凯伍. 大鼠脊髓损伤后 DNA 损伤与 P53 蛋白的表达[J]. 第二军医大学学报, 1998, 19(6): 548—550.
- [9] 刘锦波, 唐天驷, 肖德生, 等. 褪黑素对急性实验性脊髓损伤的保护作用[J]. 中华急诊医学杂志, 2002, 11(1): 27—29.
- [10] Jahnke G, Marr M, Myers C, et al. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administration orally to pregnant Sprague-Dawley rats [J]. Toxicol Res, 1999, 50 (2): 271—279.

小儿脑性瘫痪及小儿神经系统疾病诊断治疗进展学习班

北京天坛医院和北京宝蓝贝贝儿童早期发展中心将于 2007 年 10 月 22 日至 10 月 26 日在北京联合主办国家级继续教育项目:《小儿脑性瘫痪及小儿神经系统疾病诊断治疗进展学习班》, 内容: 小儿脑瘫的康复评定、脑瘫的早期诊断及早期干预治疗、A 型肉毒毒素局部注射治疗痉挛型脑瘫、小儿神经系统疾病的影像学检查、小儿癫痫、儿童孤独症、临床医学科研课题设计、早产儿高危儿管理、丹佛发育筛查 (DDST)、0—6 岁儿童量表的临床应用、儿童注意力缺陷多动障碍的诊断治疗。共 30 学时, 授予 10 学分。学费 700 元, 资料费 150 元 (含 3 张光盘)。食宿统一安排, 费用自理。有意参加者请于 10 月 15 日前将回执寄回, 或电话通知我们。

报名地址: 北京市崇文区天坛西里六号, 北京天坛医院儿科, 联系人: 杨伟力, 邓欣; 邮编: 100050。

报名咨询电话: (010)—67096615, 67096619, 13391816209 (邓亚仙)。

E-mail: ywlbjtjy591018@yahoo.com.cn; dengyx1314@sohu.com