

人参皂苷 Rg1 通过改善氧化应激、线粒体损伤及炎症反应对大鼠脊髓缺血再灌注损伤的保护作用研究*

叶劲涛¹ 李锋涛¹ 宋焕瑾¹ 薛建利¹ 吴昊¹ 林磊² 程斌^{1,3}

摘要

目的:观察人参皂苷 Rg1 预处理对于大鼠脊髓缺血再灌注损伤后的干预效果,从氧化应激、线粒体损伤及炎症反应等方面探讨人参皂苷 Rg1 对抗脊髓缺血再灌注损伤的可能机制。

方法:构建大鼠脊髓缺血再灌注损伤模型,随机分为假手术组、缺血组、缺血再灌注组及药物组 4 组。于损伤后 6、12、24、48h 分别检测血 SOD、MDA 含量;并取脊髓组织检测 SOD、MDA、COX、IL-6、NF- κ B 水平;行 HE 染色。

结果:人参皂苷 Rg1 的干预可以使大鼠血清及脊髓组织 SOD 活性升高、MDA 含量减少,脊髓组织 COX 活性升高、IL-6 及 NF- κ B 水平降低、神经细胞萎缩变形减少。

结论:人参皂苷 Rg1 可以通过抑制线粒体损伤,以及减轻大鼠脊髓缺血再灌注损伤后的氧化应激、炎症反应,达到保护神经细胞的目的。

关键词 脊髓缺血再灌注损伤;人参皂苷 Rg1;氧化应激

中图分类号:R651.2, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2019)-09-1021-07

Research of the ginsenoside Rg1 protective effect on rat spinal cord ischemia-reperfusion injury by improving oxidative stress, mitochondrial damage and inflammatory response/YE Jintao, LI Fengtao, SONG Huanjin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2019, 34(9): 1021—1027

Abstract

Objective: To evaluate the effect of ginsenoside Rg1 preconditioning on spinal cord ischemia-reperfusion injury model in rats, and investigate the possible mechanisms of ginsenoside Rg1 against SCI focusing on the oxidative stress, mitochondrial injury and inflammation.

Method: The rat SCI model was established, SD rats were randomly divided into 4 groups: sham group, ischemia group, ischemia-reperfusion group and drug group. At different time points after reperfusion, the serum was gathered for SOD and MDA; Rats were sacrificed and the injured spinal cords were immediately removed at every reperfusion time points (6/12/24/48 hours), some samples were isolated for HE staining, the rest were frozen in liquid nitrogen for the evaluation of SOD, MDA, COX, IL-6, NF- κ B.

Result: Ginsenoside Rg1 intervention can make the SOD activity of rat serum and spinal cord tissue increased, MDA level decreased; the COX activity of spinal cord tissue increased, the IL-6 and NF- κ B activity decreased; the atrophy and distortion of nerve cells decreased.

Conclusion: Ginsenoside Rg1 can inhibit neuron injury after rat SCI through suppressing the mitochondrial injury, oxidative stress and inflammatory response after spinal cord ischemia-reperfusion injury.

Author's address Department of Orthopedics, The 2nd Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710004

Key word spinal cord ischemia-reperfusion injury; ginsenoside Rg1; oxidative stress

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.09.003

*基金项目:陕西省自然科学基金面上项目(2014JM2_8157);陕西省自然科学基金面上项目(2016JM8129)

1 西安交通大学医学院第二附属医院,西安,710004; 2 汉中市中心医院; 3 通讯作者

作者简介:叶劲涛,男,博士研究生; 收稿日期:2018-05-04

脊柱骨折、脊髓供血动脉本身疾病、脊柱外科手术均可引起脊髓缺血导致脊髓的损伤。当这些致缺血因素被去除,恢复脊髓血流后的脊髓,神经功能不仅得不到改善,反而在原缺血所致的损伤基础上进一步加重,甚至出现不可逆性脊髓神经元迟发性死亡的现象,这被称为脊髓缺血再灌注损伤(spinal cord ischemia-reperfusion injury, SCIRI)^[1]。目前针对SCIRI尚无有效治疗手段,一般处理为予以大剂量的糖皮质激素,以及配合使用营养神经药物,用来恢复受到损失的脊髓功能,预防脊髓神经细胞的死亡,避免损伤进一步加重^[2-3]。

人参是五加科多年生草本植物,中医应用人参已有两千多年,具有广泛的药理作用。人参的化学成分包括人参皂苷及人参多糖等。其中最主要的有效成分为人参皂苷,具有抗凋亡、抗氧化等作用^[4]。目前已有研究显示人参皂苷Rg1能明显减轻心肌、大脑、肝脏、小肠等脏器缺血再灌注损伤^[5-8]。但在SCIRI方面研究仍较少,本实验目的在于观察人参皂苷Rg1干预对于SCIRI后神经细胞的氧化应激、线粒体损伤及炎症反应的影响,并探讨其在临床中的意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年健康的SD大鼠154只,体重(215±13)g,购于西安交通大学医学部实验动物中心,动物等级为清洁级。将实验动物按随机数表法分为4组。

假手术组(Sham组):本组大鼠将接受同其他处理组一样的麻醉与手术,但不诱导脊髓缺血及进行再灌注处理。脊髓缺血组(i组):麻醉满意后采用经股动脉插入Fogarty导管阻断胸主动脉的方法,构建大鼠脊髓缺血模型。脊髓缺血再灌注组(r组):在麻醉、脊髓缺血完成后拔除导管,开始再灌注。分别设立4个观察时间点(6、12、24、48h),即r6、r12、r24及r48 4个亚组。人参皂苷Rg1药物组(d组):造模方法同r组,在操作前加以人参皂苷Rg1药物干预(药物剂量为30mg/kg/d),观察时间点同r组,亦有4个亚组,即d6、d12、d24、d48亚组。

假手术组、脊髓缺血组各有12只大鼠,脊髓缺血再灌注组及人参皂苷Rg1药物组各有48只大鼠(每个亚组12只)。20只大鼠用于预实验。

1.2 主要仪器及试剂

超氧化物歧化酶活性测试盒、丙二醛测试盒、总蛋白定量测试盒:南京建成生物工程研究所。动物硬组织活性线粒体分离试剂盒、细胞色素C氧化酶活性测定试剂盒:上海杰美基因医药科技有限公司。IL-6 ELISA试剂盒、NF-κB试剂盒:美国RB公司。多聚甲醛:天津化学试剂厂。人参皂苷Rg1粉剂:上海研生生物技术科技有限公司。甲苯胺蓝:美国Amresco公司。苏木素伊红染液:温州康泰生物科技有限公司。苯巴比妥钠粉剂:美国Sigma公司。Fogarty导管:美国Edwards Lifesciences公司。PE50导管:美国AHMSIC公司。721分光光度仪:上海第三医学仪器厂。

1.3 大鼠急性脊髓缺血再灌注损伤模型的建立

所有动物术前禁食12h,不禁水。药物组大鼠脊髓缺血前30分钟腹腔注射人参皂苷Rg1,30mg/kg,术后腹腔注射人参皂苷Rg1(30mg/kg/d)。注射3%苯巴比妥钠(40mg/kg)进行腹腔麻醉。保持大鼠体温波动在37.1—37.5℃。显露左侧颈总动脉及尾动脉,置入PE50导管并与监护仪连接,监测近、远端血压(近端导管连接放血装置)。暴露左侧股动脉,置入2F Fogarty导管,置入10.8—11.4cm,使得球囊位于左锁骨下动脉分支处。充盈球囊,阻断胸主动脉,同时通过位于近端导管的放血装置开始放血,将近端平均动脉压维持在45mmHg左右。胸主动脉阻断10min后,放松球囊,恢复胸主动脉血流,同时将所放出的血液匀速回输。处理完成后缝合伤口,术后皮下注射0.4mL硫酸鱼精蛋白(4mg)。将动物放置25—30℃的保温箱内,等待动物苏醒后放回饲养笼中。

1.4 动物术后饲养及护理

术后所有大鼠均在SPF清洁级实验室内饲养。大鼠按组放入铺有锯末的饲养笼内,室温控制在25℃左右,自由进食及饮水。人工膀胱按摩2次/日。清洗消毒会阴部及腹部1次/日,以避免伤口感染,经常更换笼内锯末,保持笼内干燥、清洁。术后腹腔注射青霉素20万U,2次/日。

整个实验过程中因术后感染或者麻醉意外死亡的动物数目具体如下:假手术组2只、脊髓缺血组3只、脊髓缺血再灌注组5只、人参皂苷Rg1药物组4

只,分别在相同条件下予以补充。

1.5 标本采集

动物按组分别于脊髓缺血完成,再灌注 6h、12h、24h 及 48h 时心脏采血、处死。麻醉后,打开动物胸腔,心脏采血 3ml,室温下放置 2h 后于 1000r/min 离心 10min 取上清,得到血清,置于 -20℃ 冰箱保存待测。部分动物立即取出腰段脊髓组织,长度约 1cm。用于超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、细胞色素 C 氧化酶(cytochrome oxidase, COX)、NF-κB、IL-6 检测。

其余动物行左心室升主动脉插管,同时剪开右心房,250ml 生理盐水快速灌注后,4%多聚甲醛先快后慢继续灌注约 30min 左右,至右心房流出清亮多聚甲醛、动物尸体僵硬即可。立即同法取出腰段脊髓组织放入 4℃ 4%多聚甲醛中后固定 24h,再放入自来水中浸洗 24h,中间换水 2—3 次,然后进行石蜡包埋,于腰 3 节段 2mm 范围内连续切片,厚度为 10μm。

1.6 HE 染色

将所取各组动物脊髓组织切片进行 HE 染色,切片在二甲苯(I)、(II)中各脱蜡 10min。顺次将切片移入无水乙醇 2min、95%、90%、80%乙醇各 1min,蒸馏水洗 2min。苏木素染色 5min,自来水冲洗。使用 0.5%盐酸乙醇(70%乙醇配制)分化,提插数下。自来水浸泡 15min。使用 0.5%伊红染液染色 2min。依次移入 80%、90%、95%及无水乙醇中各 1min 进行脱水。二甲苯透明 2 次,各 5min。中性树脂封片。最后在光镜下观察,并用图像采集系统留取图片。

1.7 血清及脊髓组织中 SOD 活性及 MDA 含量的测定

脊髓组织总蛋白含量测定:采用考马斯亮兰法测定总蛋白含量,制备脊髓组织匀浆,严格按照试剂盒说明操作。

超氧化物歧化酶活性测量:采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性,严格按照活性测试盒说明书进行检测。

丙二醛含量测量:采用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量,严格按照活性测试盒说明书进行检测。

1.8 脊髓组织线粒体 COX 活性测定

1.8.1 脊髓组织线粒体的提取及其蛋白含量测定:脊髓组织线粒体的提取:准确称取脊髓组织的重量,冰上操作,加入适量清洗液清洗后切碎,严格按照动物硬组织活性线粒体分离试剂盒说明书操作。

1.8.2 细胞色素 C 氧化酶活性测定:严格按照细胞色素 C 氧化酶活性测定试剂盒说明书进行检测。

1.9 脊髓组织 IL-6 及 NF-κB ELISA 方法

采用双抗体夹心酶标免疫分析法测定脊髓组织匀浆中 IL-6 和 NF-κB 的量,应用 ELISA 定量试剂盒。实验前将试剂盒从 4℃ 冰箱取出,室温放置 30min。严格按照说明书操作步骤进行(加入酶标记溶液后 37℃ 孵育 60min、加入底物后 37℃ 孵育 15min),用全自动酶标仪于 450nm 波长下在 30min 时读取各孔的 OD 值。用 CurveExpert 1.3 分析软件,以 OD 值为纵坐标,标准品浓度为横坐标绘制标准曲线。根据样本的 OD 值在标准曲线上读出样本中所测物质的浓度值。

1.10 统计学分析

所有数据均应用 SPSS 18.0 软件进行软件分析,分析结果采用均数±标准差来表示,组间比较采用 Student-*t* 检验。

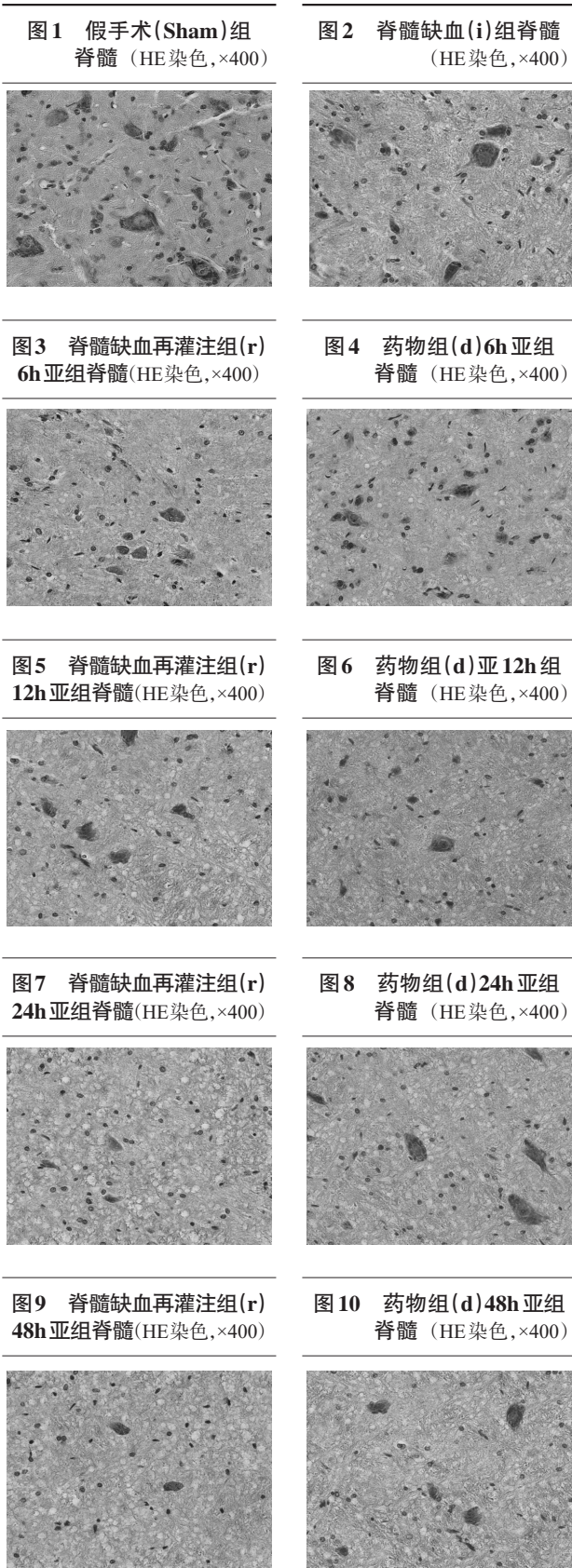
2 结果

2.1 HE 染色

从脊髓组织切片 HE 染色可以看出,正常脊髓组织神经细胞饱满,胞浆内尼氏体清晰可见,缺血后神经细胞开始皱缩,尼氏体模糊,神经细胞数量减少,脊髓组织开始出现空泡,至再灌注开始后这一趋势继续,且随着再灌注时间延长其进行性加重。药物组各亚组虽然均可见这种损伤性改变,但同再灌注组各亚组相比,其损伤程度明显较轻。见图 1—图 10。

2.2 血清及脊髓组织 SOD 活性及 MDA 含量

2.2.1 血清 SOD 活性及 MDA 含量:Sham 组血清的 SOD 活性最高,为(84.15±3.37)U/ml,缺血后 SOD 活性明显下降,至再灌注 12h SOD 活性下降至最低值,为(44.78±4.41)U/ml,此后 SOD 活性缓慢上升,到再灌注 48h SOD 活性仍未恢复到 Sham 组水平($P<0.05$)。药物组各亚组值虽都较 Sham 组降低,但与单纯缺血再灌注组相比,各时间节点值均上升($P<0.05$)。见表 1。



Sham 组血清 MDA 含量最低,为(4.59±0.27) nmol/ml,缺血后即见上升,至再灌注后 12h 上升至最高值,为(15.69±2.40)U/ml,此后缓慢下降,到再灌注后 48h 仍未恢复到缺血前水平($P<0.05$)。药物组各亚组值虽都较 Sham 组升高,但与单纯缺血再灌注组相比,各时间节点值均较低($P<0.05$)。

2.2.2 脊髓 SOD 活性及 MDA 含量:缺血前脊髓 SOD 活性最高,为(170.07±6.63)U/mg prot,缺血后 SOD 活性立即下降,至再灌注后 12h 时活性下降至最低值,为(99.52±7.54)U/mg prot,此后 SOD 的活性缓慢上升,到再灌注后 48h 时仍明显低于 Sham 组 SOD 活性($P<0.05$)。药物组各亚组值虽都较 Sham 组降低,但与单纯缺血再灌注组相比,各时间节点值均上升($P<0.05$)。见表 1。

缺血前脊髓 MDA 含量最低,为(1.21±0.09) nmol/mg prot,缺血后即见上升,至再灌注后 12h 上升至最高值,为(5.89±1.16)nmol/mg prot,此后缓慢下降,到再灌注后 48h 仍未恢复到缺血前水平($P<0.05$)。药物组各亚组值虽都较 Sham 组升高,但与单纯缺血再灌注组相比,各时间节点值均较低($P<0.05$)。见表 1。

2.3 脊髓组织线粒体 COX 活性

Sham 组脊髓 COX 活性最高,为(1.99±0.05)U/mg,缺血后即见下降,至再灌注后 12h 下降至最低值,为(1.12±0.20)U/mg,此后缓慢上升,到再灌注后 48h 仍未恢复到缺血前水平($P<0.05$)。药物组各亚组值虽都较 Sham 组降低,但与单纯缺血再灌注组相比,各时间节点值均上升($P<0.05$)。见表 2。

2.4 脊髓组织 IL-6 和 NF-κB 的含量

缺血前脊髓 IL-6 和 NF-κB 的含量最低,为(2.44±0.71)pg/ml 及(9.57±2.09)pg/ml,缺血后即见上升,至再灌注后 48h 仍有上升趋势($P<0.05$)。药物组各亚组值虽都较 Sham 组升高,但与单纯缺血再灌注组相比,各时间节点值下降($P<0.05$)。见表 3。

3 讨论

氧化应激是 SCII 的一个重要机制。氧化应激中的活性氧(reactive oxygen species, ROS)包括一氧化氮及超氧阴离子,这两种自由基互相反应组成了强有力的氧化剂。其他重要的氧化剂包括过氧化

表1 不同组别及各时间节点血清/脊髓SOD及MDA值

 $(\bar{x} \pm s, \text{nmol/ml})$

组别	动物数	血清SOD	血清MDA	脊髓SOD	脊髓MDA
假手术组	12	84.15±3.37	4.59±0.27	170.07±6.63	1.21±0.09
缺血组	12	69.94±3.85 ^①	7.64±1.13 ^①	155.71±8.16 ^①	2.38±0.44 ^①
缺血再灌注组					
6h	12	63.68±5.15 ^①	10.00±2.15 ^①	114.08±6.04 ^①	4.02±0.97 ^①
12h	12	44.78±4.41 ^①	15.69±2.40 ^①	99.52±7.54 ^①	5.89±1.16 ^①
24h	12	71.65±5.71 ^①	9.89±1.37 ^①	129.38±7.56 ^①	3.81±1.01 ^①
48h	12	71.45±5.91 ^①	10.04±1.53 ^①	130.39±8.30 ^①	3.83±0.85 ^①
药物组					
6h	12	71.11±2.91 ^{①②}	8.07±1.54 ^{①②}	123.60±5.65 ^{①②}	2.89±0.84 ^{①②}
12h	12	56.24±3.28 ^{①②}	13.33±3.59 ^{①②}	108.79±6.79 ^{①②}	4.59±1.09 ^{①②}
24h	12	77.62±5.98 ^{①②}	7.89±1.70 ^{①②}	138.23±8.09 ^{①②}	2.94±0.95 ^{①②}
48h	12	77.98±7.43 ^{①②}	8.11±1.54 ^{①②}	138.90±7.93 ^{①②}	2.72±0.76 ^{①②}

与Sham组比较:① $P<0.05$;组间对应时间节点比较:② $P<0.05$ 表2 不同组别及各时间节点脊髓组织COX值 $(\bar{x} \pm s, \text{U/mg})$

组别	动物数	脊髓组织COX
假手术组	12	1.99±0.05
缺血组	12	1.60±0.12 ^①
缺血再灌注组		
6h	12	1.39±0.19 ^①
12h	12	1.12±0.20 ^①
24h	12	1.46±0.18 ^①
48h	12	1.47±0.13 ^①
药物组		
6h	12	1.55±0.11 ^{①②}
12h	12	1.29±0.09 ^{①②}
24h	12	1.66±0.17 ^{①②}
48h	12	1.69±0.13 ^{①②}

与Sham组比较:① $P<0.05$;组间对应时间节点比较:② $P<0.05$ 表3 不同组别及各时间节点脊髓组织IL-6和NF- κ B的含量 $(\bar{x} \pm s, \text{pg/ml})$

组别	动物数	IL-6	NF- κ B
假手术组	12	2.44±0.71	9.57±2.09
缺血组	12	12.86±2.08 ^①	24.55±3.67 ^①
缺血再灌注组			
6h	12	15.22±2.08 ^①	39.51±4.82 ^①
12h	12	16.73±2.88 ^①	52.17±6.29 ^①
24h	12	21.76±3.73 ^①	63.90±6.48 ^①
48h	12	31.13±3.11 ^①	73.64±4.83 ^①
药物组			
6h	12	11.70±2.67 ^{①②}	32.85±4.02 ^{①②}
12h	12	13.42±3.58 ^{①②}	45.98±5.24 ^{①②}
24h	12	17.51±4.02 ^{①②}	56.78±5.83 ^{①②}
48h	12	25.87±3.30 ^{①②}	66.37±4.69 ^{①②}

与Sham组比较:① $P<0.05$;组间对应时间节点比较:② $P<0.05$

氢及羟基自由基。这些自由基通过对细胞膜磷脂中的不饱和脂肪酸的过氧化作用,可以引起膜的损害。同时,它们还能引起基本细胞器的损害,并通过坏死及凋亡模式引起细胞死亡^[9-11]。许多ROS在生理条件下的生成处于低水平,可以被内源性抗氧化系统,包括SOD、谷胱甘肽过氧化酶、过氧化氢酶以及抗氧化维生素如 α 维生素E及抗坏血酸所清除。但是,氧化应激,尤其是当ROS的生成超过了SOD等清除ROS的能力,导致接下来的细胞损伤时,即可对神经组织造成严重伤害^[12]。

SOD分布于各种生物组织细胞内,在诸多缺血再灌注损伤试验中,SOD活力作为氧化应激损害程度的直观指标,得到学者们的广泛使用^[13]。SOD常用的检测方法有细胞色素C还原法、黄嘌呤氧化酶法等。细胞色素C还原法(McCord法)原理是黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶体系中产生的 O_2 使一定量的氧化型细胞色素C还原为还原型细胞色素C,后者在

550nm波长处可被测得。在SOD存在时,由于一部分 O_2 被SOD催化而歧化, O_2 还原细胞色素C的反应受到抑制,由此测得样品中SOD活性。本法虽是经典方法,但其灵敏度较低。黄嘌呤氧化酶法原理是黄嘌呤氧化酶催化底物黄嘌呤或次黄嘌呤发生氧化反应生成 O_2 , O_2 可与化学发光剂反应产生激发。SOD能清除 O_2 从而抑制化学发光^[14]。本法可应用于SOD的微量测定,灵敏度高,简便易行。丙二醛,即MDA,是无色针状晶体,熔点72—74℃,纯的丙二醛在中性条件下稳定,但在酸性条件下不稳定。MDA可以由乙醛和甲酸乙酯在碱作用下缩合而得。生物体内脂质过氧化反应的终产物为MDA,可在体外影响线粒体呼吸链复合物及线粒体内关键酶活性,且具有潜在的致癌性。MDA是氧化应激脂质过氧化反应的产物,也是缺血再灌注损伤氧化应激程度的一个重要指标,在实验中得以广泛应用。MDA检测方法是硫代巴比妥酸法,其原理是MDA

可以与硫代巴比妥酸成色,在520nm波长处进行比色测定,可检测丙二醛相对含量的变化,以了解生物膜脂质过氧化的情况^[15]。硫代巴比妥酸法是一种非常简便的方法,因此得到广泛的应用。

从本实验结果可以看出,单纯的大鼠脊髓缺血可以使血清及脊髓组织的SOD活性降低,开始再灌注后继续下降,至再灌注后12h下降至最低值,为 $(99.52 \pm 7.54) \text{U/mg prot}$,此后缓慢上升,到再灌注后48h仍未恢复到缺血前水平($P < 0.05$)。而血清及脊髓组织MDA的变化趋势与SOD刚好相反,说明大鼠脊髓缺血即会引起氧化应激,随着再灌注的开始,氧化应激的程度持续加重,而内源性抗氧化系统在再灌注早期明显显示出清除能力的不足,随着时间延长,其清除能力也得到了进一步恢复。但这种恢复并不足以使大鼠回到缺血之前的正常状态,说明其恢复能力有限。药物组各亚组值虽都较Sham组降低,但与单纯缺血再灌注组相比,各时间节点值均上升($P < 0.05$),证实了人参皂苷Rg1可以提高大鼠SOD活性,通过对SOD活性的改善,可以对抗自由基的脂质过氧化作用,减少MDA生成。

炎症作为缺血再灌注损伤的另一个重要机制,许多学者进行了深入的研究^[16]。与脊髓缺血再灌注损伤相关的炎症反应发生在血管内皮界面,在组织损害的发生机制中具有重要地位。主要的炎症介质包括细胞因子、粘附分子、趋化因子等。在神经组织缺血中,由于血流的快速消失,传递基本营养物质到神经元的微血管实际上被阻断了,因此神经功能出现减退。在血流被阻断后,炎症反应参与了组织损伤^[17-18]。

IL-6是T细胞以及成纤维细胞合成的一种细胞因子,已被证实在神经系统炎症介导过程中起到了非常重要的作用^[19-20]。在脊髓损伤过程中,急性炎症反应包括了中性粒细胞及巨噬细胞的募集及小胶质细胞的激活,同样也包括了促炎症因子如IL-1 β 、IL-6快速爆发式上调。NF- κ B是一个二聚体转录因子,同样与炎症调节有关。NF- κ B异源二聚体是由亚基p65及p50组成。通常其位于胞浆,与其内源性抑制蛋白抑制物 κ B(I κ B)结合。上游分子I κ B激酶(I κ B kinase, IKK),可使I κ B的32及36位的丝氨酸残基磷酸化,解放NF- κ B,允许其移位入核,并且结

合在 κ B位点,即下游基因启动子的特殊结合域,从而激活下游基因的转录。许多参与炎症的基因包含有功能性的 κ B位点,如TNF α 、ICAM-1、环氧化酶-2,可诱导的一氧化氮合成酶,及IL-6。在实验性的中风后已经发现,IKK与NF- κ B的活性与轻度的低温的抗炎作用的相关性非常好^[21-23]。

从实验结果可以看出,缺血前脊髓IL-6和NF- κ B的含量最低,分别为 $(2.44 \pm 0.71) \text{pg/ml}$ 及 $(9.57 \pm 2.09) \text{pg/ml}$,缺血后即见上升,至再灌注后48h仍有上升趋势($P < 0.05$)。这说明在大鼠脊髓缺血开始,IL-6及NF- κ B就开始活化,至再灌注后活性继续升高。至始至终,作为炎症介质,二者均参与了损伤过程,这与之前的研究结果是一致的。而药物组各亚组值虽都较Sham组升高,但与单纯缺血再灌注组相比,各时间节点值均下降($P < 0.05$),说明对于大鼠脊髓缺血再灌注损伤,人参皂苷Rg1可以通过抑制IL-6及NF- κ B的活性发挥保护性作用。

脊髓缺血再灌注损伤的一个重要途径就是线粒体途径。线粒体途径属于内源性途径,在缺血再灌注损伤的刺激下,线粒体通透性升高,使得Cyt C、procaspase-9及Apaf-1释放。在ATP或dATP存在时,Apaf-1与Cyt C形成多聚复合体。procaspase-9募集Apaf-1及Cyt C复合体,并自我裂解,这个全酶被称作apoptosome,启动了下游凋亡级联^[24]。Cyt C是生物氧化过程中的电子传递体。在酶的存在下,对组织的氧化还原有迅速的酶促作用。COX位于真核生物的细胞线粒体上,通过氧化磷酸化为细胞提供能量,作为线粒体外膜功能的生物标记,研究者可以通过COX活性的变化来衡量线粒体外膜的完整性^[25-26]。它可将电子由Cyt C传递给O₂,使之还原成水。COX还具有质子泵功能,将H⁺由线粒体膜内侧泵至外侧,形成质子电化学梯度,用于合成ATP。线粒体COX活性下降可能作用于凋亡途径上游,引发质子泵出,线粒体跨膜膜电位崩溃,Cyt C漏入胞浆,启动上述凋亡级联导致细胞凋亡^[27]。另外,COX活性下降可引起氧自由基产生增加、钙超载以及兴奋性氨基酸水平增高都可能与凋亡的启动有关。

从结果可以看出,Sham组脊髓组织COX活性最高,为 $(1.99 \pm 0.05) \text{U/mg}$,缺血后即见下降,至再灌

注后6h下降至最低值,为 (1.12 ± 0.20) U/mg,此后缓慢上升,到再灌注后48h仍未恢复到缺血前水平($P < 0.05$)。这说明大鼠脊髓缺血后COX的活性即开始遭到破坏,再灌注则使这种情况继续加重,线粒体外膜完整性进一步遭到破坏,使得Cyt C自线粒体移至胞浆,引起神经元凋亡的发生。药物组各亚组COX值虽都较Sham组降低,但与单纯缺血再灌注组相比,各时间节点值均上升($P < 0.05$)。说明人参皂苷Rg1对于COX的活性有促进作用,即对线粒体外膜的完整性有保护作用,通过该保护作用,可以阻止Cyt C移位进入胞浆,打断凋亡的线粒体通路,达到保护神经元细胞的目的。

综上所述,人参皂苷Rg1可以通过抑制氧化应激、线粒体损伤及炎症反应来抑制大鼠脊髓缺血再灌注造成的损伤。

参考文献

- [1] Bao N, Fang B, Lv H, et al. Upregulation of miR-199a-5p protects spinal cord against ischemia/reperfusion-induced injury via downregulation of ECE1 in rat[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018,38(6):1293—1303.
- [2] 夏炳江, 肖鲁伟. 脊髓慢性压迫减压后缺血再灌注损伤研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2017(04):998—1001.
- [3] Schroeder GD, Kwon BK, Eck JC, et al. Survey of cervical spine research society members on the use of high-dose steroids for acute spinal cord injuries[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2014,39(12):971—977.
- [4] Chen LW, Wang YQ, Wei LC, et al. Chinese herbs and herbal extracts for neuroprotection of dopaminergic neurons and potential therapeutic treatment of Parkinson's disease[J]. *Cns & Neurological Disorders Drug Targets*, 2007,6(4):273.
- [5] Xie CL, Li JH, Wang WW, et al. Neuroprotective effect of ginsenoside-Rg1 on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by downregulating protease-activated receptor-1 expression[J]. *Life Sci*, 2015,121:145—151.
- [6] Zu G, Guo J, Che N, et al. Protective effects of ginsenoside Rg1 on intestinal ischemia/reperfusion injury-induced oxidative stress and apoptosis via activation of the Wnt/beta-catenin pathway[J]. *Sci Rep*, 2016,6:38480.
- [7] Tao T, Chen F, Bo L, et al. Ginsenoside Rg1 protects mouse liver against ischemia-reperfusion injury through anti-inflammatory and anti-apoptosis properties[J]. *J Surg Res*, 2014,191(1):231—238.
- [8] Li L, Pan CS, Yan L, et al. Ginsenoside Rg1 ameliorates rat myocardial ischemia-reperfusion injury by modulating energy metabolism pathways[J]. *Front Physiol*, 2018,9:78.
- [9] Sahin MA, Onan B, Guler A, et al. Cilostazol, a type III phosphodiesterase inhibitor, reduces ischemia/reperfusion-induced spinal cord injury[J]. *Heart Surg Forum*, 2011,14(3):E171—E177.
- [10] Wakabayashi T, Spodnik JH. Structural changes of mitochondria during free radical-induced apoptosis[J]. *Folia Morphol (Warsz)*, 2000,59(2):61—75.
- [11] Wilcox CS. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress[J]. *Pharmacol Ther*, 2010,126(2):119—145.
- [12] Ryu JH, Park JW, Hwang JY, et al. The attenuation of neurological injury from the use of simvastatin after spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *BMC Anesthesiol*, 2018,18(1):31.
- [13] 吕少君, 翁浩, 刘海健, 等. 不同剂量右美托咪定对兔脊髓缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国老年学杂志*, 2016(9):2069—2071.
- [14] 翁凡凡, 张晓林. 黄嘌呤氧化酶法优化大鼠血清SOD测定条件的探讨[J]. *佛山科学技术学院学报(自然科学版)*, 2011(03):65—67.
- [15] 杨李, 唐瑛, 左娟, 等. 硫代巴比妥酸法测定血清脂质过氧化物方法的改进[J]. *华南国防医学杂志*, 2004(01):30—32.
- [16] Esposito E, Cuzzocrea S. Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2010,8(3):228—242.
- [17] de Mos M, Laferriere A, Millicamps M, et al. Role of NFkappaB in an animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I) [J]. *J Pain*, 2009,10(11):1161—1169.
- [18] Liao B, Newmark H, Zhou R. Neuroprotective effects of ginseng total saponin and ginsenosides Rb1 and Rg1 on spinal cord neurons in vitro[J]. *Exp Neurol*, 2002,173(2):224—234.
- [19] John GR, Lee SC, Brosnan CF. Cytokines: powerful regulators of glial cell activation[J]. *Neuroscientist*, 2003,9(1):10—22.
- [20] Javed H, Azimullah S, Abul K S, et al. Neuroprotective effect of nerolidol against neuroinflammation and oxidative stress induced by rotenone[J]. *BMC Neurosci*, 2016,17(1):58.
- [21] Liu B, Yin G, Ding L, et al. [Research on the influence of diammonium glycyrrhizinate on the expression of NF-kappaB and neuron apoptosis after spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats][J]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2008,22(12):1466—1469.
- [22] Lin Z, Zhu D, Yan Y, et al. Herbal formula FBD extracts prevented brain injury and inflammation induced by cerebral ischemia-reperfusion[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008,118(1):140—147.
- [23] Wang D, Yuan X, Liu T, et al. Neuroprotective activity of lavender oil on transient focal cerebral ischemia in mice [J]. *Molecules*, 2012,17(8):9803—9817.
- [24] Karunadasa H, Huang Q, Ueland BG, et al. Ba2LnSbO6 and Sr2LnSbO6 (Ln = Dy, Ho, Gd) double perovskites: lanthanides in the geometrically frustrating fcc lattice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003,100(14):8097—8102.
- [25] 许明, 张泓, 刘继生, 等. 电针对完全性脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠脊髓组织中Caspase-9、细胞色素C及凋亡蛋白酶激活因子-1表达的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2017(06):628—633.
- [26] 王刚, 吴小涛, 茅祖斌, 等. 米诺环素对大鼠脊髓损伤后线粒体细胞色素C的释放及神经细胞凋亡的影响[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2006(07):523—526.
- [27] Nagendraprabhu P, Sudhandiran G. Astaxanthin inhibits tumor invasion by decreasing extracellular matrix production and induces apoptosis in experimental rat colon carcinogenesis by modulating the expressions of ERK-2, NFkB and COX-2[J]. *Invest New Drugs*, 2011,29(2):207—224.