

网络出版时间: 2018-4-23 09:59 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180420.1408.016.html>

辛伐他汀促进大鼠脊髓损伤的修复

杨超, 申才良, 宋旆文, 牛杨, 夏翔

摘要 目的 探讨辛伐他汀对大鼠脊髓损伤(SCI)模型修复的影响。方法 取健康雌性SD大鼠60只,随机均分为假手术组、SCI组、辛伐他汀组。在SCI建模后的第14天采用Western blot法检测各组大鼠受损脊髓脑源性神经生长因子(BDNF)的表达水平。在SCI模型建成后的第49天进行脊髓组织学检测,评估各组大鼠脊髓的空泡和空洞情况。采用BBB评分标准评价各组大鼠处理后不同时间点的后肢运动功能。结果 与SCI组相比,辛伐他汀组BDNF表达明显上调($P < 0.05$)。与SCI组相比,辛伐他汀组的脊髓空洞和空泡面积明显减少($P < 0.05$); BBB评分显示相对于SCI组,辛伐他汀组的大鼠后肢运动功能改善更加明显($P < 0.05$)。结论 辛伐他汀可通过上调SCI部位组织的BDNF表达来改善损伤部位微环境,促进损伤部位神经元的存活和再生,从而显著加速SCI后大鼠后肢功能的恢复。这表明辛伐他汀治疗可能是促进SCI修复的理想方法,其可能与促进局部BDNF分泌有关。

关键词 脊髓损伤; 辛伐他汀; 大鼠

中图分类号 R 681.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)04-0571-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.04.016

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)可引起持续的细胞损伤,局部炎症和脱髓鞘,并且神经通路受损可导致截瘫或四肢麻痹。此外,在这种损伤之后,SCI部位的微环境被破坏,导致损伤的神经组织的修复受到限制。因此,有必要找到合理的治疗方法来改善SCI处的微环境。他汀类药物是3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶A还原酶抑制剂,临床使用他汀类药物主要是为了降低体循环中的胆固醇水平,从而通过其降脂作用来稳定动脉粥样硬化斑块。有研究^[1]表明,他汀类药物也具有改善内皮功能,增加一氧化氮的生物利用度和抗氧化、抗炎的作用。实验表明,通过他汀类药物使局部组织中脑源性生长

因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)表达增加,而BDNF在调节SCI部位微环境中起重要作用^[2]。因此,本研究假设他汀类药物可以通过BDNF的过度表达改善神经功能的恢复。该研究通过检测损伤处BDNF、脊髓空洞、脊髓空泡等指标来探讨辛伐他汀对大鼠SCI后脊髓修复的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 安徽医科大学实验动物中心提供60只成年健康雌性清洁级SD大鼠, (250 ± 10) g。所有动物饲养在安徽医科大学实验动物室内,每只笼子内放置3只大鼠,给予充足的食物和水,并且饲养室常年维持在室温。

1.2 SCI模型制备及各组处理方式 60只SD大鼠随机均分为3组:假手术组、SCI组、辛伐他汀组。运用改良的Allen法建造大鼠SCI模型。大鼠建模前进行称重,腹腔注射10%水合氯醛(0.3 ml/100 g)使其麻醉,并在T9-T10水平进行椎板切除术,小心完全暴露脊髓。将打击器固定好,把直径为15 mm的薄片置于待打击的脊髓处,将重10 g的砝码以5 cm的高度坠落打击脊髓暴露部位,造成50 g/cm的冲击伤,建模中可见大鼠脊髓硬膜下出现血肿。给予大鼠肌肉、筋膜、表皮逐层缝合,之后予大鼠大腿内侧每日肌注适量阿莫西林预防感染。其中假手术组建模时只暴露脊髓不给予大鼠脊髓打击,而SCI组和辛伐他汀组中给予脊髓打击建造大鼠的SCI模型。辛伐他汀组中大鼠在SCI前一周开始灌胃给予辛伐他汀(20 mg/kg)直到术后第49天。灌胃所用的辛伐他汀溶解在羧甲基纤维素钠(CMC-Na)中。当实验大鼠给予辛伐他汀时,SCI组中的大鼠给予相同体积的CMC-Na。3组大鼠分开饲养,给予充分的水及食物,每8 h予以大鼠人工辅助排尿1次,直到大鼠排尿功能正常。所有动物均安置在安徽医科大学动物饲养室,饲养室维持室温。

1.3 Western blot法检测SCI处BDNF蛋白的表达 术后第14天,每组随机选取4只大鼠,腹腔注射10%水合氯醛麻醉。再将250 ml生理盐水溶液灌注至心脏中后,使用病变区域周围的1 cm脊髓组

2017-12-11 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1508085MH152)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院骨科,合肥 230022

作者简介:杨超,男,硕士研究生;

申才良,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: shencailiang1616@163.com

织进行蛋白质提取。将待检测样本称重并用液氮和研钵破碎,然后每克组织加入 3 ml RIPA 缓冲液。将样品在冰上孵育 30 min,然后在 4 °C、14 000 r/min 离心 12 min。将上清液立即吸入预冷塑料管中。将加样缓冲液(样品:加样缓冲液=4:1)加入到样品中,混合,然后在 100 °C 煮沸 5 min。将样品在室温下以 12 000 r/min 离心 2 min,收集上清液进行检测。所需抗体如下:兔多克隆抗 BDNF(稀释 1:200,南京建成生物工程研究所)和兔多克隆抗 β-肌动蛋白(稀释 1:1 000,南京建成生物工程研究所);二级辣根过氧化物酶缀合的兔抗-山羊抗兔抗体(1:4 000,南京建成生物工程研究所)。将化学发光底物附于 PVDF 膜上,室温放置 5 min。调整曝光时间直到可视化最佳免疫反应带。增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)转至 X 光胶片。在凝胶光密度分析软件进行分析,测定目标蛋白和标准对照的吸光度,计算其相对灰度值。

1.4 大鼠 SCI 段组织检测及行为学评价 大鼠分别在建模后的第 8 周取 SCI 段组织标本。对 3 组大鼠 SCI 节段进行脱水石蜡包埋,以损伤区中心每隔 140 μm 做横切片行 HE 染色。以此方法每只大鼠只取 5 个切片,每组取 4 只大鼠,测量脊髓空洞(40×)及空泡(200×,随机选取每个切片中一个视野)的面积百分比。用 Image J 1.38 版本的影像分析软件测量空洞及空泡的区域面积。对所有实验大鼠均进行 BBB 评分,分别在建模后的第 1、3、7、14、21、28、35、42、49、56 天按照 BBB 评分标准评估。

1.5 统计学处理 使用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间差异采用单因素方差分析,随后进行 Bonferroni 的事后检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 辛伐他汀对大鼠 SCI 组织中 BDNF 表达的影响 术后第 14 天,与 SCI 组相比,辛伐他汀组 BDNF

蛋白表达增加,差异有统计学意义($F = 647.4, P < 0.05$),见图 1。

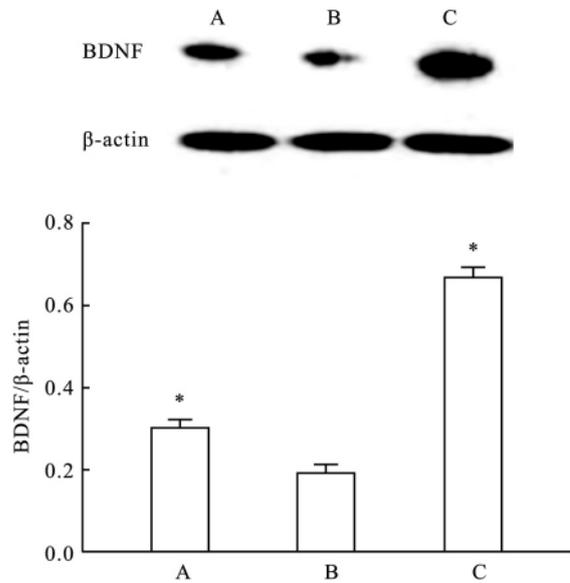


图1 Western blot 检测 BDNF 的表达
A: 假手术组; B: SCI 组; C: 辛伐他汀组; 与 SCI 组比较: * $P < 0.05$

2.2 辛伐他汀对大鼠 SCI 脊髓空洞及空泡的影响

2.2.1 脊髓空洞结果 术后第 8 周,与 SCI 组相比,辛伐他汀组空洞面积百分比明显降低,差异有统计学意义($F = 16008, P < 0.05$),见图 2。

2.2.2 脊髓空泡结果 术后第 8 周与 SCI 组相比,辛伐他汀组空泡面积百分比明显降低,差异有统计学意义($F = 20210, P < 0.05$),见图 3。

2.3 辛伐他汀对 SCI 大鼠后肢运动功能的影响 在 SCI 后的第 1 天,除假手术组外,大鼠后肢均未发现运动。假手术组大鼠从始至终运动得分为 21 分。SCI 后 7 d,各组大鼠运动功能得到持续改善。辛伐他汀组的 BBB 评分在第 14 天显著高于 SCI 组($P < 0.05$),并持续至第 56 天($P < 0.05$)。BBB 评分高于或低于平均值两个标准偏差的大鼠被排除在统计过程之外。本实验从 SCI 组中排除 1 只大鼠。

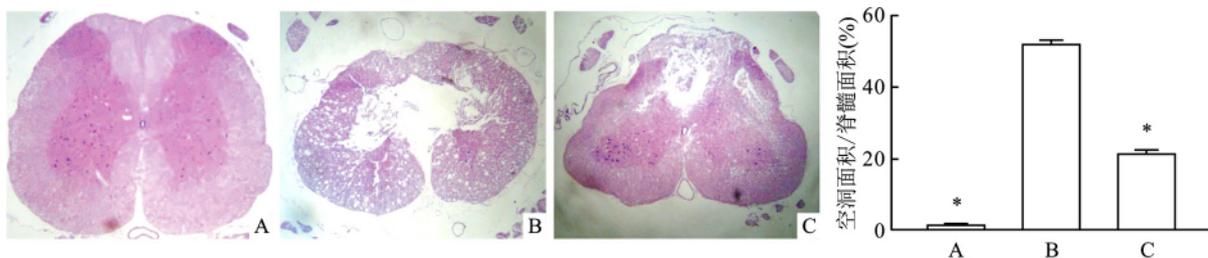


图2 建模后第 8 周脊髓空洞情况 HE × 40
A: 假手术组; B: SCI 组; C: 辛伐他汀组; 与 SCI 组比较: * $P < 0.05$

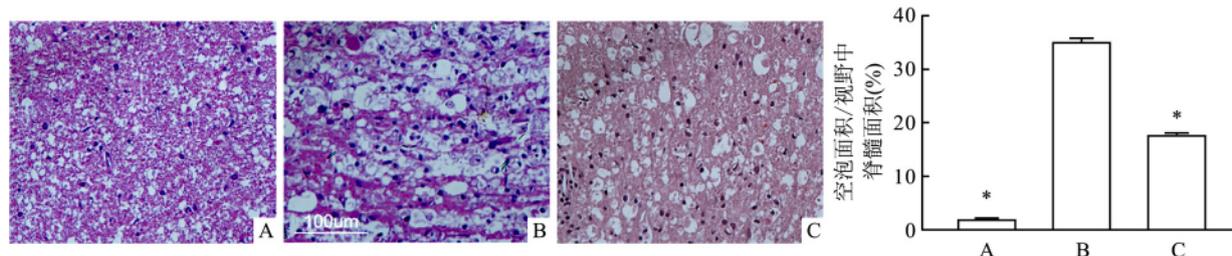


图3 建模后第8周脊髓空泡情况 ×200

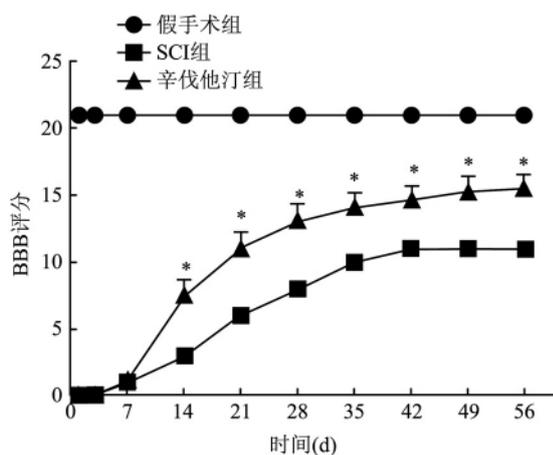
A: 假手术组; B: SCI组; C: 辛伐他汀组; 与SCI组比较: * $P < 0.05$ 

图4 术后各组大鼠 BBB 评分

与SCI组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

许多实验已经证明 SCI 的神经功能恢复障碍不是神经元本身导致而是由于其损伤部位的微环境不利于神经元再生。因此, 创建有利的神经营养微环境有助于 SCI 后损伤的神经元和轴突的再生。据报道, 在创伤性脑损伤后他汀类药物可以改善微环境并促进神经元和轴突的再生^[3]。因此, 在 SCI 后他汀类药物治疗似乎有助于脱髓鞘的轴突再髓鞘化及损伤神经元再生。BDNF 是神经营养因子的主要来源, 在神经元的再生和生存中起着重要作用^[4]。以往研究^[5]表明, 用阿托伐他汀治疗可以提高 BDNF 的表达改善中风后的神经恢复。本研究显示辛伐他汀可显著提高 SCI 后 BDNF 的表达, 并且辛伐他汀组的脊髓空洞和空泡严重程度较 SCI 组显著改善, 这也可能与他汀类药物改善微环境促进神经元与轴突再生有关。

研究^[6]表明, 他汀类药物可以防止缺血引起的损伤, 并促进大鼠后肢缺血后的血管生成。大量实

验表明, 不同浓度的他汀类药物对血管发生有影响^[7]。Yang et al^[8] 提出低剂量辛伐他汀可以增强骨髓细胞对猪急性心肌梗死的治疗。此外, Sata et al^[9] 指出, 高剂量他汀类药物还可增强缺血部位的体内血管生成。长期随访表明在一些使用他汀类药物的脑梗死患者在停药后将大大增加患者的死亡率和梗死体积^[10]。据报道, 在短暂性脑缺血的各种动物模型中使用他汀类药物进行预防性治疗, 在第 3 天和第 5 天的恢复期间减少海马中的缺血后将延迟神经元死亡^[11]。一项关于大鼠脑缺血 21 d 的研究显示, 用阿托伐他汀治疗的大鼠可降低脑梗死体积^[12]。此外, 在大鼠急性脊髓缺血性损伤模型中显示他汀可明显减少损伤处脊髓空泡比例^[13]。本研究也证实他汀类药物可明显减少损伤处脊髓空泡的比例, 这可能与增加血管生成, 促进局部营养供应相关, 有待后续研究。

早期的 SCI 微环境不支持体内神经干细胞的生存^[14]。另外有研究^[15] 表明大鼠短暂性脑缺血神经元损伤后他汀类药物可以减少过敏反应和炎症反应, 并在损伤后第 5 天开始具有神经保护作用。在此研究基础上, 本研究在 SCI 建模前 1 周予以辛伐他汀组大鼠口服辛伐他汀, 并一直维持到建模后的第 56 天。因此在建模前予以辛伐他汀的时间点不同可能导致的实验结果不同。进一步研究可以确定治疗的最佳时间点。横纹肌溶解是高剂量他汀类药物的副作用, 横纹肌溶解时大鼠尿液可产生异常, 本研究没有对大鼠尿液进行检测。Westwood et al^[16] 报道在接受 43 d 60 mg / (kg · d) 辛伐他汀的大鼠在组织学上未观察到肌酸激酶和肌肉坏死。

最近又有研究^[17] 表明辛伐他汀可以通过减少氧化应激来保护缺血的 SCI 免于细胞死亡和细胞毒性。另外他汀还可以诱导自噬, 在 SCI 后提高 BDNF 和胶质细胞源性神经营养因子的表达来达到神经保护作用^[18]。在临床调查中他汀类药物具有扭

转高脂血症对神经功能不良影响的功能^[19]。与以往的相关研究结论类似,本研究显示大鼠 SCI 后使用辛伐他汀可以增加其损伤部位的营养因子,减少脊髓空洞及空泡进而促进大鼠下肢运动功能的恢复。

综上所述,辛伐他汀可通过上调 SCI 部位组织的 BDNF 表达来改善损伤部位微环境,促进损伤部位神经元的存活和再生,从而显著加速 SCI 后大鼠后肢功能的恢复。

参考文献

- [1] Kalinowski L, Dobrucki LW, Brovkovich V, et al. Increased nitric oxide bioavailability in endothelial cells contributes to the pleiotropic effect of cerivastatin[J]. *Circulation*, 2002, 105(8): 933-8.
- [2] Han X, Yang N, Xu Y, et al. Simvastatin treatment improves functional recovery after experimental spinal cord injury by upregulating the expression of BDNF and GDNF [J]. *Neurosci Lett*, 2011, 487(3): 255-9.
- [3] Lu D Y, Qu C S, Goussev A, et al. Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region, and improve spatial learning in rat after traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma* 2007, 24(7): 1132-46.
- [4] Tolwani R J, Cosgaya J M, Varma S et al. BDNF overexpression produces a long-term increase in myelin formation in the peripheral nervous system[J]. *J Neurosci Res*, 2004, 7(5): 662-9.
- [5] Chen J, Zhang C, Jiang H, et al. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(2): 281-90.
- [6] Matsumura M, Fukuda N, Kobayashi N, et al. Effects of atorvastatin on angiogenesis in hindlimb ischemia and endothelial progenitor cell formation in rats[J]. *J Atheroscler Thromb* 2009, 16(4): 319-26.
- [7] Weis M, Heeschen C, Glassford A J, et al. Statins have biphasic effects on angiogenesis[J]. *Circulation*, 2002, 105(6): 739-45.
- [8] Yang Y J, Qian H Y, Huang J, et al. Combined therapy with simvastatin and bone marrow-derived mesenchymal stem cells increases benefits in infarcted swine hearts [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(12): 2076-82.
- [9] Sata M, Nishimatsu H, Osuga J, et al. Statins augment collateral growth in response to ischemia but they do not promote cancer and atherosclerosis[J]. *Hypertension*, 2004, 43(6): 1214-20.
- [10] Blanco M, Kawaguchi M, Castellanos M, et al. Statin treatment withdrawal in ischemic stroke[J]. *Neurology*, 2007, 69(9): 904-10.
- [11] Kurosaki R, Muramatsu Y, Kato H, et al. Protective effect of pitavastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor, on ischemia-induced neuronal damage [J]. *Neurol Res*, 2004; 26(6): 684-91
- [12] Yrj nheikki J, Koistinaho J, Kettunen M, et al. Long-term protective effect of atorvastatin in permanent focal cerebral ischemia[J]. *Brain Res* 2005, 1052(2): 174-9.
- [13] Saito T, Tsuchida M, Umehara S, et al. Reduction of spinal cord ischemia/reperfusion injury with simvastatin in rats [J]. *Anesth Analg*. 2011, 113(3): 565-71.
- [14] Li Y, Zhang W M, Wang T H. Optimal location and time for neural stem cell transplantation into transected rat spinal cord [J]. *Cell Mol Neurobiol*. 2011, 31(3): 407-14.
- [15] Berger C, Xia F, Maurer M H, et al. Neuroprotection by pravastatin in acute ischemic stroke in rats[J]. *Brain Res Rev*, 2008, 58(1): 48-56.
- [16] Westwood F R, Bigley A, Randall K, et al. Statin-induced muscle necrosis in the rat: distribution development, and fibre selectivity[J]. *Toxicol Pathol*, 2005, 33(2): 246-57.
- [17] Sohn H M, Hwang J Y, Ryu J H et al. Simvastatin protects ischemic spinal cord injury from cell death and cytotoxicity through decreasing oxidative stress: *in vitro* primary cultured rat spinal cord model under oxygen and glucose deprivation-reoxygenation conditions[J]. *J Orthop Surg Res*, 2017, 12(1): 36.
- [18] Gao K, Wang G, Wang Y et al. Neuroprotective effect of simvastatin *via* inducing the autophagy on spinal cord injury in the rat model[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015(2): 260161.
- [19] Chung W F, Liu S W, Chang P Y, et al. Hyperlipidemia and statins affect neurological outcome in lumbar spine injury[J]. *Int J Environ Res Public Health* 2015, 12(1): 402-13.

Simvastatin promotes repair of spinal cord injury in rats

Yang Chao, Shen Cailiang, Song Peiwen et al

(Dept of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the effect of simvastatin on improving spinal cord injury (SCI) in the rat model. **Methods** In this study, 60 healthy female SD rats were randomly divided into three groups: sham, SCI, simvastatin. The expression levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the injured spinal cord of each group of rats were measured on day 14 after SCI by Western blot. Spinal cord histology was performed on the 49th day after spinal cord injury to evaluate the vacuoles and voids of the spinal cord in each group. The hindlimb motor function of each group of rats was evaluated at different time points after post-treatment by BBB test. **Results** The results

网络出版时间: 2018-4-23 09:59 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180420.1545.018.html>

塞来昔布对颅脑创伤后 Fas 表达及认知功能的影响

张金玲¹ 张涛² 国建飞² 郑丽¹ 杨群福² 崔福生² 张宇新³

摘要 目的 研究塞来昔布对大鼠颅脑创伤后 Fas 表达及认知功能的影响,探讨其对颅脑创伤后神经的保护作用及其机制。方法 96 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、假手术组、模型组和药物组,参照 Marmarou 方法构建大鼠闭合型脑创伤模型,采用实时荧光定量 PCR 和免疫组织化学法分别检测 Fas、Caspase-8 的 mRNA 和蛋白表达, TUNEL 法检测神经细胞凋亡情况, Y 型迷宫实验检测大鼠认知功能。结果 模型组较对照组、假手术组 Fas、Caspase-8 的 mRNA 和蛋白表达均显著增高 ($P < 0.05$); 药物组较模型组 Fas、Caspase-8 的 mRNA 和蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$),但仍高于对照组和假手术组 ($P < 0.05$)。模型组较对照组、假手术组凋亡细胞显著增多 ($P < 0.05$); 药物组较模型组凋亡细胞数显著减少 ($P < 0.05$),但仍高于对照组和假手术组 ($P < 0.05$)。模型组较对照组、假手术组大鼠记忆成绩次数明显减少 ($P < 0.05$),药物组较模型组大鼠记忆成绩次数明显增加 ($P < 0.05$),但仍低于对照组与假手术组 ($P < 0.05$)。结论 塞来昔布通过下调颅脑创伤后 Fas 介导的凋亡程序,以发挥对大鼠颅脑创伤后神经元的保护作用,并改善大鼠的认知功能。

关键词 塞来昔布; 创伤性脑损伤; Fas; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-8; 认知功能

2017-12-14 接收

基金项目: 河北省自然科学基金项目(编号: C2004000689); 河北省博士基金项目(编号: 05547008D-4); 河北省科学技术与社会发展计划项目(编号: 04276135)

作者单位: ¹ 邢台医学高等专科学校药理学教研室, 邢台 054031

² 河北医科大学附属邢台市人民医院神经外科, 邢台 054031

³ 华北理工大学基础医学院, 唐山 063000

作者简介: 张金玲, 女, 硕士, 讲师, 责任作者, E-mail: cgf19890619@163.com

中图分类号 R 651.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)04-0575-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.04.017

颅脑损伤是一种常见病、多发病,其后遗症一直是危害人类健康的主要因素之一,其中颅脑创伤后认知功能障碍对患者的生活质量产生重要的影响,且认知功能障碍是颅脑损伤后最持久、最严重的并发症之一^[1]。近年来,大量研究^[2]显示颅脑损伤后出现神经细胞凋亡,从而出现认知及学习记忆功能障碍。目前,国内外研究对颅脑创伤后神经细胞凋亡以及认知功能障碍的确切机制尚无完全揭示。因此,该研究利用 Marmarou 方法构建闭合性颅脑损伤模型,采用实时定量荧光 PCR、免疫组织化学、原位末端标记技术法(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL)及 Y 型迷宫实验对大鼠颅脑创伤后 Fas 表达、神经细胞凋亡和认知功能障碍的相关机制进行探讨,以及应用塞来昔布药物的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 塞来昔布购自美国辉瑞制药有限公司;兔抗人 Fas 多克隆抗体、兔抗人半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-8(cysteine aspartic acid protease-8, Caspase-8)多克隆抗体均购自福州迈新生物技术有限公司;PCR 试剂盒、细胞和组织裂解液均购自美国 Invitrogen 公司;PV-6001/6002 二步法免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;

showed that BDNF expression was significantly up-regulated in the simvastatin group compared to the SCI group ($P < 0.05$). Compared with the SCI group, the cavities and vacuole area of the syringes in the simvastatin group were significantly lower ($P < 0.05$). The BBB score showed that the improvement of hindlimb motor function of simvastatin group was more obvious than that of the SCI group ($P < 0.05$). **Conclusion** Simvastatin can improve the survival and regeneration of neurons in the injured site by up-regulating the expression of BDNF in the spinal cord injury site, which can accelerate the recovery of hind limb function in SCI rats. These results clearly suggest that simvastatin therapy may be an ideal treatment for SCI and may be associated with the promotion of local neurotrophic factor secretion.

Key words spinal cord injury; statins; rat