

· 基础研究 ·

臭氧氧化预处理减轻大鼠脊髓缺血再灌注损伤

王 斌,白 伟,郭甲瑞

焦作市第二人民医院骨科,焦作 454001

【摘要】目的 探讨臭氧氧化预处理对大鼠脊髓缺血再灌注损伤的作用及可能机制。方法 将36只健康成年雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组和臭氧预处理组,每组12只。模型组和臭氧预处理组采用夹闭右肾动脉上腹主动脉的方法构建大鼠脊髓缺血再灌注损伤模型,臭氧预处理大鼠于建模前7 d开始以1 mg/(kg·d)腹腔注射臭氧(50 mg/L)-氧气混合气体至建模。分别于恢复灌注后6、12、24和48 h时,对各组大鼠后肢神经运动功能进行评分。末次评分后取脊髓标本,行HE染色观察组织病理学变化,行2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色检测缺血面积,用试剂盒检测丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平。结果 与假手术组相比,模型组和臭氧预处理组大鼠恢复灌注后6、12、24、48 h神经运动功能评分均降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,臭氧预处理组大鼠恢复灌注后6、12、24、48 h神经运动功能评分升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与假手术组相比,模型组和臭氧预处理组大鼠脊髓组织缺血面积增大,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,臭氧预处理组大鼠脊髓缺血面积减小,差异有统计学意义($P<0.05$)。与假手术组相比,模型组和臭氧预处理组大鼠脊髓组织中MDA水平升高,而SOD和GSH-Px水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,臭氧预处理组大鼠脊髓组织中MDA水平降低,而SOD和GSH-Px水平升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 臭氧预处理可有效减轻大鼠脊髓缺血再灌注损伤,其机制可能与抑制脊髓组织氧化应激反应有关。

【关键词】脊髓;再灌注损伤;基因表达;臭氧;氧化性应激;大鼠

【中图分类号】R 744.1 【文献标志码】A 【文章编号】1672-2957(2019)01-0056-04

【DOI】10.3969/j.issn.1672-2957.2019.01.012

Ozone oxidative preconditioning reducing spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats

WANG Bin, BAI Wei, GUO Jia-rui

Department of Orthopaedics, Second People's Hospital of Jiaozuo, Jiaozuo 454001, Henan, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of ozone oxidative preconditioning on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats and its mechanisms. Methods Thirty-six healthy adult male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group and ozone preconditioning group, with 12 rats in each group. Rat spinal cord ischemia-reperfusion injury model was constructed in the model group and ozone preconditioning group, and the rats in the ozone preconditioning group were intraperitoneally injected with 1 mg/(kg·d) ozone-oxygen mixed gas (ozone 50 mg/L) from 7 d before modeling. At 6, 12, 24 and 48 h after reperfusion, the neurological function of hind limbs in each group was scored, respectively. After the last scoring for neurological function, the histopathological changes of the spinal cord were observed through HE staining in each group, and the ischemic area was measured through 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. The levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were detected using available kit. Results Compared with the sham operation group, the neurological function scores at 6, 12, 24, 48 h in the model and ozone preconditioning groups decreased with statistically significant differences ($P<0.05$); compared with the model group, the neurological function scores at 6, 12, 24, 48 h in the ozone preconditioning group increased with statistically significant differences ($P<0.05$). The ischemic areas of spinal cord in the model and ozone preconditioning groups were higher than the sham operation group with statistically significant differences ($P<0.05$), and the ischemic area in the ozone preconditioning group was lower than the model group with statistically significant difference ($P<0.05$). Compared with the sham operation group, the levels of MDA in the spinal cord tissues in the model and ozone preconditioning groups increased, while the levels of SOD and GSH-Px decreased, with statistically significant differences ($P<0.05$); compared with the model group, the level of MDA in the spinal cord tissue decreased in the ozone preconditioning, while the levels of SOD and GSH-Px increased, with statistically significant differences ($P<0.05$). Conclusion Ozone preconditioning could effectively reduce the spinal cord

ischemia-reperfusion injury in rats. The mechanism might be related to inhibition of oxidative stress in spinal cord tissue.

【Key Words】 Spinal cord; Reperfusion injury; Gene expression; Ozone; Oxidative stress; Rats

J Spinal Surg, 2019, 17(1): 56-59

脊髓缺血再灌注损伤是脊柱损伤、胸主动脉或腹主动脉外科治疗及脊柱外科治疗中的常见并发症, 可导致脊髓受损, 引起受损平面以下运动及感觉功能障碍, 造成截瘫, 严重者甚至导致死亡^[1]。脊髓缺血再灌注损伤涉及较多机制, 其中, 炎症反应、氧化应激、氧自由基增多、细胞凋亡等在此过程中发挥重要作用^[2]。目前, 临床上尚无特效的治疗手段, 依然是研究的热点和难点。臭氧作为氧的同素异形体, 在抑制活性氧类增加、减少氧化应激损伤中发挥重要作用^[3]。有研究发现臭氧氧化可有效减轻缺血再灌注损伤, 保护脏器功能^[4]。本研究拟通过构建大鼠脊髓缺血再灌注损伤模型, 探讨臭氧氧化预处理对脊髓缺血再灌注损伤的影响及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

SPF级健康成年雄性SD大鼠36只, 购自河南省实验动物中心[合格证号: SCXK(豫)2010-0002], 体质量200~250 g, 饲养于标准环境中, 自由饮水、进食。大鼠适应性饲养1周后, 利用随机数字表法将其分为假手术组、模型组和臭氧预处理组, 每组12只。HE染色试剂盒购自武汉博士德生物工程公司, 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色液购自上海远慕生物科技有限公司, 丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒购自焦作市应用免疫生物工程研究所。

1.2 模型建立

臭氧预处理组大鼠于建模前7 d开始以1 mg/(kg·d)给予臭氧(50 mg/L)-氧气混合气体腹腔注射, 连续注射至建模。模型组和臭氧预处理组参照文献^[5]的方法构建大鼠脊髓缺血再灌注损伤模型。大鼠禁食8 h后, 腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉, 仰卧位固定。消毒后, 取腹中线切口, 进腹腔后分离肠管, 打开后腹膜, 充分分离和暴露右肾动脉上腹主动脉并用动脉夹夹闭, 以夹闭部位远端腹主动脉搏动消失作为成功标志。60 min后松开动脉夹, 恢复灌流, 关闭腹腔, 缝合切口。假手术组大鼠暴露右肾动脉上腹主动脉而不阻断, 其余步骤同其他2

组。在动脉夹夹闭右肾动脉上腹主动脉时, 模型组1只大鼠用力过大而导致死亡, 补充1只以保证样本量不变; 其余2组均未出现大鼠死亡。

1.3 神经运动功能评分

分别于恢复灌流后6、12、24和48 h时, 参照Basso、Beattie、Bresnahan(BBB)运动能量表^[6]对各组大鼠后肢神经运动功能进行评分。该方法将后肢运动根据关节活动、负重程度, 前后肢协调性, 前后爪及尾部活动情况分别给予1~20分, 分为22个等级, 全瘫为0分, 正常为21分。由2名经过培训的医师单独完成评分, 取其均值。

1.4 脊髓组织病理学观察及缺血面积检测

于末次神经运动功能评分后, 各组随机取6只大鼠麻醉处死, 取腰骶段脊髓组织, 分成2部分, 一部分用于组织病理学观察, 另一部分于-20℃冰箱冻存用于缺血面积检测。组织病理学观察: 脊髓组织用4%多聚甲醛固定后石蜡包埋, 横向切片, 厚度约4 μm, HE染色后, 用光学显微镜观察。缺血面积检测: 取冻存组织横向切片, 厚度约2 mm, 于37℃下置于TTC染色液中孵育40 min后取出, 用4%多聚甲醛固定, 拍照, 利用Image-pro Plus图像分析软件对缺血区域及脊髓横断面进行测量, 计算缺血面积百分比(缺血区域面积/脊髓横断面面积×100%)。

1.5 脊髓组织中MDA、SOD和GSH-Px水平检测

于末次神经运动功能评分后, 取各组剩余的6只大鼠麻醉处死, 取腰骶段脊髓组织, 保存于-80℃冰箱备检。取约50 μg脊髓组织, 按质量体积比1:9加入生理盐水, 研磨制备成匀浆, 按照试剂盒说明检测组织中MDA、SOD和GSH-Px水平。

1.6 统计学处理

采用SPSS 17.0软件对数据进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD-*t*检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经运动功能评分

与假手术组相比, 模型组和臭氧预处理组大鼠恢复灌流后6、12、24、48 h时神经运动功能评分

均降低,差异均有统计学意义($P<0.05$,表1);与模型组相比,臭氧预处理组大鼠恢复灌流后6、12、24、48 h时神经运动功能评分均升高,差异均有统计学意义($P<0.05$,表1)。

表1 不同时间点各组大鼠神经运动功能评分比较
Tab. 1 Comparison of neurological function scores at different time points in different groups

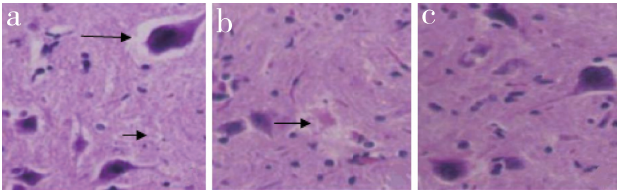
$n=12, \bar{x} \pm s$

组别 Group	6 h	12 h	24 h	48 h
假手术 Sham operation	20.6 ± 0.7	20.3 ± 0.5	20.4 ± 0.6	20.2 ± 0.4
模型 Model	11.5 ± 0.8*	9.1 ± 0.6*	9.3 ± 0.7*	13.1 ± 0.5*
臭氧预处理 Ozone preconditioning	14.9 ± 0.5*△	15.3 ± 0.7*△	15.5 ± 0.6*△	16.2 ± 0.9*△

注: *与假手术组相比, $P<0.05$; △与模型组相比, $P<0.05$
Note: * $P<0.05$, compared with sham operation group; △ $P<0.05$, compared with model group

2.2 脊髓组织病理学观察

恢复灌流后48 h,光学显微镜下可见假手术组大鼠脊髓组织中神经细胞胞核清晰、胞质丰富、胞体大,间质中空泡较少(图1a);模型组大鼠脊髓组织中神经细胞减少,出现水肿、坏死,炎症细胞浸润,间质增多,可见少量空泡(图1b);臭氧预处理组大鼠脊髓组织损伤程度较模型组减轻(图1c)。



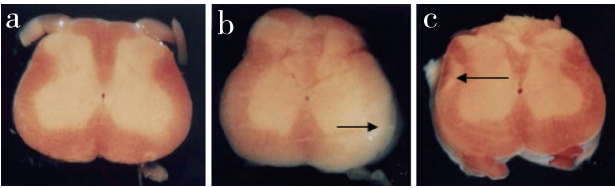
a: 假手术组,可见正常神经细胞(长箭头)和间质空泡(短箭头)
b: 模型组,可见炎症细胞浸润(箭头) c: 臭氧预处理组
a: Sham operation group, showing normal neuron (long arrow) and interstitial vacuole (short arrow) b: Model group, showing inflammatory cell infiltration (arrow) c: Ozone preconditioning group

图1 各组大鼠脊髓组织病理学观察(HE染色, ×400)
Fig. 1 Pathological observation of spinal cord in different groups(HE staining, ×400)

2.3 脊髓组织缺血面积

恢复灌流48 h后,假手术组大鼠脊髓呈红色,模型组大鼠脊髓大部分出现白色,臭氧预处理组大鼠脊髓出现部分红色、部分白色(图2)。假手术组、模型组和臭氧预处理组大鼠脊髓缺血面积百分比分别为(1.3 ± 0.3)%、(65.8 ± 3.6)%和(32.1 ± 2.7)%,

其中模型组和臭氧预处理组大鼠脊髓组织缺血面积均较假手术组增大,但臭氧预处理组大鼠脊髓缺血面积较模型组减小,差异均有统计学意义($P<0.05$)。



箭头示缺血组织 a: 假手术组 b: 模型组 c: 臭氧预处理组
Arrows indicate ischemic tissues a: Sham operation group b: Model group c: Ozone preconditioning group

图2 各组大鼠脊髓组织缺血面积(TTC染色)
Fig. 2 Ischemic area of spinal cord tissue in different groups(TTC staining)

2.4 脊髓组织中MDA、SOD和GSH-Px水平

与假手术组相比,模型组和臭氧预处理组大鼠脊髓组织中MDA水平均升高,而SOD和GSH-Px水平均降低,差异均有统计学意义($P<0.05$,表2);与模型组相比,臭氧预处理组大鼠脊髓组织中MDA水平降低,而SOD和GSH-Px水平均升高,差异均有统计学意义($P<0.05$,表2)。

表2 各组大鼠脊髓组织中MDA、SOD和GSH-Px水平
Tab. 2 Expression of MDA, SOD and GSH-Px in spinal cord tissue of different groups

$n=6, \bar{x} \pm s$

组别 Group	MDA/ (mmol·mg ⁻¹)	SOD/ (U·mg ⁻¹)	GSH-Px/ (U·mg ⁻¹)
假手术 Sham operation	2.26 ± 0.83	16.45 ± 2.63	0.88 ± 0.11
模型 Model	6.35 ± 1.77*	6.06 ± 1.99*	0.33 ± 0.03*
臭氧预处理 Ozone preconditioning	4.12 ± 0.57*△	9.81 ± 2.82*△	0.49 ± 0.10*△

注: *与假手术组相比, $P<0.05$; △与模型组相比, $P<0.05$
Note: * $P<0.05$, compared with sham operation group; △ $P<0.05$, compared with model group

3 讨 论

近年来,随着阻断腹主动脉外科手术及脊髓压迫性疾病减压手术的增多,脊髓缺血再灌注损伤发生率不断升高,由此导致的运动感觉障碍甚至截瘫严重威胁患者生命健康^[7]。目前,脊髓缺血再灌注损伤尚无特效的治疗手段,关键在于早期预防及阻断继发性损伤^[8]。本研究参照文献^[5]的方法构建大鼠脊髓缺血再灌注损伤模型,结果显示,模型组

大鼠出现了后肢运动功能障碍, 6、12、24、48 h时神经运动功能评分降低; 脊髓组织病理学检查显示脊髓组织中神经细胞减少, 出现水肿、坏死, 炎症细胞浸润, 间质增多, 可见少量空泡; 同时, TTC染色显示脊髓组织出现缺血坏死灶。这些结果均提示大鼠脊髓缺血再灌注损伤模型建立成功。

氧化应激反应是脊髓缺血再灌注损伤重要的病理基础, 该过程中产生的氧自由基是导致脊髓损伤的重要因素^[9]。MDA作为脂质过氧化物的终末产物, 是机体氧化应激反应的主要标志物^[10]; SOD作为抗氧化物质在防御氧自由基损伤中发挥重要作用, GSH-Px则可催化过氧化氢还原为无害的水和氧气, 二者均可视为反映机体抗氧化能力的指标^[11]。本研究结果显示, 与假手术组相比, 模型组和臭氧预处理组大鼠脊髓组织中MDA水平均升高, 而SOD和GSH-Px水平均降低, 说明大鼠脊髓缺血再灌注损伤后脊髓组织中发生了氧化应激反应, 这与Fan等^[12]的研究结论相同。

臭氧是近年来研究的热点, 其不仅可用于消毒领域, 而且在抗炎、抑制免疫、消除氧自由基等方面亦具有很好的效果^[13]。有研究发现臭氧氧化预处理可有效减轻大鼠肝脏缺血再灌注损伤^[14]。本研究将臭氧氧化预处理应用于大鼠脊髓缺血再灌注损伤模型, 结果显示, 臭氧预处理组大鼠神经运动功能评分较模型组升高, 脊髓组织损伤较模型组减轻, 且缺血面积较模型组明显减小, 提示臭氧氧化预处理可有效减轻大鼠脊髓缺血再灌注损伤, 保护脊髓组织。本研究结果还显示, 与模型组相比, 臭氧预处理组大鼠脊髓组织中MDA水平降低, 而SOD和GSH-Px水平升高, 说明臭氧预处理可能通过抑制脊髓缺血再灌注损伤大鼠脊髓组织氧化应激水平而保护脊髓组织。

综上所述, 臭氧预处理可有效减轻大鼠脊髓缺血再灌注损伤, 其机制可能与抑制脊髓组织氧化应激反应有关。本研究为早期预防及阻断继发性脊髓缺血再灌注损伤提供了实验依据。

参考文献

- [1] 孙延卿, 陈雄生. 脊髓缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 脊柱外科杂志, 2010, 8(5): 311-315.
- [2] 邢晓辉, 李力仙, 郭天林, 等. 脊髓缺血再灌注损伤的防治概况[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(5): 962-964, 978.
- [3] Tiwari S. Ethylenediurea as a potential tool in evaluating ozone phytotoxicity: a review study on physiological, biochemical and morphological responses of plants[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2017, 24(16): 14019-14039.
- [4] 陶希, 黄靓, 蔡华安, 等. 臭氧氧化与缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 中国康复理论与实践, 2016, 22(12): 1420-1424.
- [5] 胡嘉瑞, 吕国华, 李晶, 等. 阿托伐他汀预处理对脊髓缺血再灌注损伤大鼠损伤脊髓microRNA表达的影响[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2014, 24(9): 802-808.
- [6] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1-21.
- [7] Wynn MM, Acher CW. A modern theory of spinal cord ischemia/injury in thoracoabdominal aortic surgery and its implications for prevention of paralysis[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2014, 28(4): 1088-1099.
- [8] 余奇劲, 解立杰, 胡霁. 脊髓缺血再灌注损伤与血脊髓屏障关系的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(12): 2066-2068.
- [9] Sohn HM, Hwang JY, Ryu JH, 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: 36.
- [10] Su G, Zhao J, Luo G, et al. Effects of oil quality and antioxidant supplementation on sow performance, milk composition and oxidative status in serum and placenta[J]. Lipids Health Dis, 2017, 16: 107.
- [11] Wang S, Irving G, Jiang L, et al. Oxidative stress mediated hippocampal neuron apoptosis participated in carbon disulfide-induced rats cognitive dysfunction[J]. Neurochem Res, 2017, 42(2): 583-594.
- [12] Fan J, Zhang Z, Chao X, et al. Ischemic preconditioning enhances autophagy but suppresses autophagic cell death in rat spinal neurons following ischemia-reperfusion[J]. Brain Res, 2014, 1562: 76-86.
- [13] 唐军伟, 吕林, 王静, 等. 医用三氧国内临床应用现状[J]. 浙江中西医结合杂志, 2017, 27(1): 79-81.
- [14] 李粮辉, 陈文华, 李丽珍, 等. 臭氧氧化预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中华肝胆外科杂志, 2017, 23(3): 191-195.

(收稿日期: 2017-07-20)

(本文编辑: 于倩)