

. 实验研究 .

孕酮对兔脊髓急性缺血再灌注损伤后细胞凋亡的影响

李 婵 李 云 靳子娟 陶柏妮 杨 鹏

【摘要】目的 探讨孕酮对兔脊髓急性缺血再灌注损伤后细胞凋亡的影响。**方法** 将 90 只日本大耳白兔随机分为假手术组 (n=30)、脊髓损伤组 (n=30) 与孕酮治疗组 (n=30), 各组又进一步分为 12 h、24 h、36 h、48 h、72 h、14 d 等 6 个亚组, 每亚组 5 只。假手术组只行腹部切开术但不阻断腹主动脉。脊髓损伤组和孕酮治疗组均制作缺血再灌注模型, 制模成功后孕酮治疗组每 24 h 注射孕酮 1 次 (将孕酮溶于玉米油, 浓度 10 mg/ml, 注射剂量为 8 ml/kg), 脊髓损伤组在相同时间点注射等量生理盐水。采用 TUNEL 染色评估细胞凋亡, 采用 BBB 评分评估运动功能。**结果** HE 染色结果显示, 假手术组脊髓形态正常; 脊髓损伤组可见脊髓结构被破坏, 正常神经元数目减少; 孕酮治疗组较脊髓损伤组正常神经元数目多。TUNEL 染色结果显示, 脊髓损伤组和孕酮治疗组各时间点凋亡细胞数均明显高于假手术组 ($P<0.05$); 孕酮治疗组各时间点凋亡细胞的数目均明显少于脊髓损伤组 ($P<0.05$)。假手术组术后 12 h BBB 评分为 17.3 分, 术后 14 d 时升高到 21.0 分; 脊髓损伤组术后 12 h BBB 评分为 0.6 分, 随后缓慢升高, 术后 14 d 时评分为 9.2 分。孕酮治疗组 BBB 评分变化与脊髓损伤组相似, 但术后 36 h 开始, 各时间点评分均明显高于相应脊髓损伤组 ($P<0.05$)。**结论** 孕酮治疗可改善脊髓急性缺血再灌注损伤兔运动功能, 可能与抑制细胞凋亡有关。

【关键词】 脊髓缺血再灌注损伤; 孕酮; 细胞凋亡; 日本大耳白兔

【文章编号】 1009-153X(2017)11-0767-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 651.2

Effect of progesterone on cells apoptosis of spinal cord after acute ischemia reperfusion injury in rabbits

LI Chan¹, LI Yun², JIN Zijuan¹, TAO Bo-ni², YANG Peng³. 1. Clinical Medical School, North China University of Sciences and Technology, Tangshan 063000, China; 2. Public Health School, North China University of Sciences and Technology, Tangshan 063000, China; 3. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital, North China University of Sciences and Technology, Tangshan 063000, China

【Abstract】 Objective To explore effect of progesterone on the cells apoptosis of spinal cord after acute ischemia reperfusion injury in rabbits. **Methods** Ninety rabbits were randomly divided into sham operation group (n=30), spinal cord injury (SCI) group (n=30) and progesterone treatment group (n=30). The cell apoptosis in the injured spinal cord and the movement function of posterior limbs were determined respectively by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling and Basso, Beattie & Bresnahan (BBB) locomotor rating scale 12, 24, 36, 48, 72 and 336 hours after the injury in all the animals. **Results** The apoptotic cells were observed in the injured spinal cord 12 hours after SCI, and the apoptosis peaked 48 hours after SCI and apoptotic cells were still observed 14 days after SCI. The number of apoptosis cells was significantly fewer in progesterone treatment group than that in SCI group 36, 48, 72 and 336 hours after SCI ($P<0.05$). The BBB locomotor rating scale scores were significantly higher in progesterone treatment group than those in SCI group 36, 48, 72 and 336 hours after SCI ($P<0.05$). **Conclusion** It is suggested that progesterone may play a neuroprotective effect by inhibiting apoptosis in the rabbits with acute ischemia-reperfusion injury.

【Key words】 Spinal cord; Ischemia-reperfusion injury; Progesterone; Apoptosis; Rabbits

脊髓缺血再灌注损伤是常见的继发性脊髓损伤之一, 常导致截瘫, 预后差, 严重影响病人生活质量^[1]。目前, 尚无有效治疗方法^[2]。缺血再灌注损伤可加速细胞凋亡, 加重损伤。研究显示, 孕酮可通过抗氧化、抗炎等作用, 影响脑血流量和新陈代谢, 保护

神经元免受谷氨酸的毒性作用, 从而发挥一定的中枢神经保护作用^[3]。本研究探讨孕酮对兔脊髓急性缺血再灌注损伤后细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 90 只健康成年雄性日本大耳白兔, 由华北理工大学动物房提供, 不限月龄, 体重 2.5~3.0 kg。

采用单纯随机抽样方法, 将兔随机分为假手术组、脊髓损伤组、孕酮治疗组 3 组, 每组 30 只; 各组又进一步分为 12 h、24 h、36 h、48 h、72 h、14 d 等 6 个亚组, 每亚组 5 只。假手术组只行腹部切开术但不阻

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2017.11.011

基金项目: 河北省医学科学研究重点课题计划 (ZD20140046); 华北理工大学大学生创新创业训练计划 (X2016093)

作者单位: 063210 河北唐山, 华北理工大学临床医学院 (李 婵、靳子娟), 公共卫生学院 (李 云, 陶柏妮); 063210 河北唐山, 华北理工大学附属医院神经外科 (杨 鹏)

通讯作者: 杨 鹏, E-mail: yangpeng.ts@163.com

断腹主动脉。脊髓损伤组和孕酮治疗组均制作缺血再灌注模型,制模成功后孕酮治疗组每24 h注射孕酮1次(将孕酮溶于玉米油,浓度10 mg/ml,注射剂量为8 ml/kg),脊髓损伤组在相同时间点注射等量生理盐水。

1.2 脊髓缺血再灌注模型制备 术前24 h禁食不禁水,用10%水合氯醛(2 ml/kg)耳缘静脉注射麻醉,碘伏消毒皮肤,沿腹白线开腹后于左肾动脉分叉下用血管夹阻断腹主动脉,造成脊髓腰段缺血。脊髓损伤组与孕酮治疗组缺血28 min后去除血管夹再灌注,用丝线缝合肌肉及皮肤,关闭腹腔。分笼继续饲养,保持室温22 ℃,通风良好。

1.3 后肢运动功能评估 采用脊髓运动分级量表(Basso, Beattie & Bresnahan locomotor rating scale, BBB)评分评价兔后肢运动功能。每只兔连续评估4 min,从兔各个关节的运动情况、跨步能力、运动协调能力和躯干平衡能力等方面进行评价。满分22分,分值越高,表明兔后肢功能越好。BBB评分过程中采用双人、双盲独立观察的方法进行。

1.4 兔脊髓标本采集 用10%水合氯醛(2 ml/kg)耳缘静脉内注射深度麻醉,取俯卧位,四肢固定于手术台上,后正中切开皮肤,剥离椎旁肌,咬除椎板,暴露硬膜囊,切断神经根,迅速取出L₃₋₅节段脊髓,切取L₃₋₄节段长约0.8 cm髓,浸入4%中性多聚甲醛溶液固定24 h,之后常规石蜡包埋,用作HE染色,余下组织用作缺口末端标记法(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL)染色。

1.5 兔脊髓细胞的病理形态观察 将石蜡块进行连续性切片制成4 μm厚组织薄片,脱蜡入水,采用HE染色30 s~5 min后,速水洗,乙醇中脱水、二甲苯中透明、封片。以损伤严重段取视野,显微镜下观察脊髓细胞的病理形态学变化,正常细胞核呈蓝色,细胞浆及其他组织呈粉红色。

1.6 凋亡细胞检测 采用TUNEL法染色检测凋亡细胞,切片常规脱蜡水化后,蛋白酶K消化15 min,室温下用0.3% H₂O₂处理10 min,蒸馏水清洗3次,处理组切片滴加TUNEL缓冲液,37 ℃标记2 h,加生物素化抗地高辛抗体37 ℃反应30 min,缓冲液清洗后加入稀释的亲合素-生物素化酶复合物,室温二氨基联苯胺显色15 min(避光),最后用苏木素复染,脱水,透明,封片。阴性对照不加TUNEL。

显微镜下观察,染色呈棕褐色的细胞为阳性细胞。每只实验动物取两张切片,每张切片取5个视野,计数每个视野中的阳性细胞数。每只实验动物

的阳性细胞数为每个视野中阳性细胞数的平均值。每组实验动物阳性细胞数为该组该时间点3只实验动物的阳性细胞数的平均值。

1.7 统计学方法 采用SPSS 20.0进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和SNK-*q*检验;*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔脊髓病理学改变 HE染色结果显示,假手术组脊髓形态正常,神经元数目较多,核仁清晰,未见神经细胞水肿及空泡形成;脊髓损伤组可见脊髓结构被破坏,中心有空腔形成,存在多处散在小出血灶,正常神经元数目减少,神经细胞发生水肿,细胞核固缩;孕酮治疗组较损伤组正常神经元数目多,出血水肿现象轻(图1)。

2.2 兔脊髓细胞凋亡情况比较 TUNEL染色结果显示,假手术组未见凋亡细胞;脊髓损伤组均可观察到凋亡细胞的存在,凋亡细胞大小形态不一,细胞胞核固缩,呈棕黄色,广泛存在于灰质与白质内;孕酮治疗组也可观察到细胞凋亡,但凋亡细胞数目均少于脊髓损伤组(图2)。

脊髓损伤组和孕酮治疗组各时间点凋亡细胞数均明显高于假手术组(*P*<0.05)。脊髓损伤组12 h即可观察到凋亡细胞的存在,随着时间延长,凋亡细胞

表1 兔脊髓凋亡阳性细胞数比较(个)

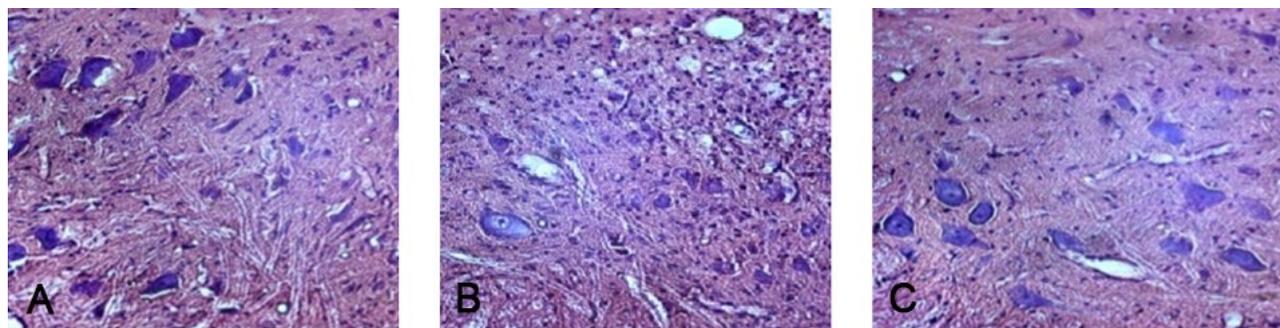
术后时间	假手术组	脊髓损伤组	孕酮治疗
12 h	4.4±0.6	44.6±5.9*	38.6±8.1 [#]
24 h	4.0±0.8	45.3±6.1*	40.3±8.4 [#]
36 h	3.9±0.6	55.8±6.4*	45.1±6.1**
48 h	3.5±0.6	76.8±7.5*	58.2±7.2**
72 h	3.6±0.7	62.1±6.3*	47.2±6.4**
14 d	3.7±0.5	45.8±4.9*	37.5±5.2**

注:与假手术组相应值比较,**P*<0.05;与脊髓损伤组相应值比较,#*P*<0.05

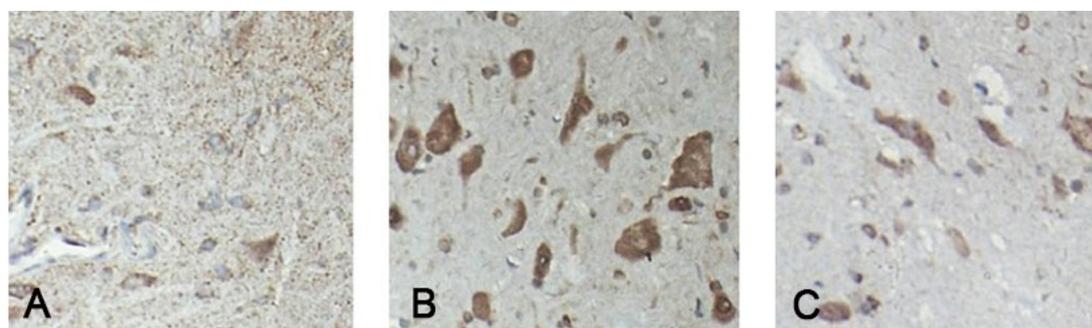
表2 兔各时间点BBB评分比较(分)

术后时间	假手术组	脊髓损伤组	孕酮治疗
12 h	17.3±1.0	0.6±0.8*	1.2±0.8*
24 h	17.9±0.5	2.0±0.7*	3.1±1.0*
36 h	19.0±0.9	2.6±0.5*	5.0±1.3**
48 h	18.2±1.2	3.1±1.3*	8.4±1.7**
72 h	19.9±1.1	5.7±1.4*	9.1±2.1**
14 d	21.0±0.0	9.2±1.1 [#]	12.3±1.2**

注:与假手术组相应值比较,**P*<0.05;与脊髓损伤组相应值比较,#*P*<0.05

图1 兔脊髓HE染色结果($\times 200$)

A. 假手术组; B. 脊髓损伤 72 h组; C. 孕酮治疗 72 h组

图2 兔脊髓TUNEL染色结果($\times 400$)

A. 假手术组; B. 脊髓损伤 72 h组; C. 孕酮治疗 72 h组

数目逐渐增多,48 h达到高峰,之后开始减少,14 d时仍可见凋亡细胞,但数量明显减少。孕酮治疗组与脊髓损伤组呈现相似变化规律,但术后36 h开始,各时间点凋亡细胞的数目均明显少于脊髓损伤组($P < 0.05$)。详见表1。

2.3 兔BBB评分比较 假手术组术后12 h BBB评分为17.3分,术后14 d时升高到21.0分。脊髓损伤组术后12 h BBB评分为0.6分,随后缓慢升高,术后14 d时评分为9.2分。孕酮治疗组 BBB评分变化与脊髓损伤组相似,但术后36 h开始,各时间点评分均明显高于相应脊髓损伤组($P < 0.05$)。见表2。

3 讨论

脊髓急性缺血再灌注损伤预后不理想。研究表明,细胞凋亡是继发性脊髓损伤的主要机制之一^[4]。如何减少脊髓损伤后细胞凋亡、促进脊髓功能恢复是目前研究的热点。有研究显示,孕酮可通过保护血脑屏障、减少水肿与炎症反应、抗细胞凋亡及促进髓鞘再生等机制,在阿尔兹海默病、颅脑损伤等疾病中发挥着显著的神经保护和促进神经元再生的功能^[5,6]。本研究结果表明孕酮治疗可改善脊髓急性缺血再灌注损伤兔运动功能,可能与抑制细胞凋亡有关。孕酮作为一种性激素,可通过促进髓鞘再生、上

调脑源性神经营养因子和微管相关蛋白-2的表达以及恢复胆碱乙酰转移酶的免疫反应等发挥一定的神经保护作用^[7]。而且,孕酮可通过下调海马区嘌呤受体蛋白表达及清除氧自由基,改善大鼠脑损伤后学习记忆能力^[8]。魏山坡等^[9]发现孕酮可通过降低环氧化物水解酶-2和白介素-6的表达,改善脑损伤后神经功能。

总之,孕酮可能通过抑制细胞凋亡,缓解脊髓急性缺血再灌注损伤引起的肢体功能障碍。

【参考文献】

- [1] 吴超,于涛,王振宇,等. 脊髓损伤后神经源性肠功能障碍的发生机制[J]. 中国临床神经外科杂志, 2017, 22(4): 282-285.
- [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, 42(5): 962-978.
- [3] Brotfain E, Gruenbaum SE, Boyko M, *et al.* Neuroprotection by estrogen and progesterone in traumatic brain injury and spinal cord injury [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2016, 14(6): 641-653.
- [4] Gökçe EC, Cemil B, Erdoğan B, *et al.* Neuroprotective effects of thymoquinone against spinal cord ischemia-

reperfusion injury by attenuation of inflammation, oxidative stress, and apoptosis [J]. *J Neurosurg Spine*, 2016, 24(6): 949-959.

[5] Liu S, Ma X, Qin Y, *et al.* Metabolic alteration of neuroactive steroids and protective effect of progesterone in Alzheimer's disease-like rats [J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(30): 2800-2810.

[6] Webster KM, Sun M, Semple BD, *et al.* Progesterone treatment reduces neuroinflammation, oxidative stress and brain damage and improves long-term outcomes in a rat model of repeated mild traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12(12): 238-243.

[7] 郭卫春,唐冰,熊敏,等. 骨髓间充质干细胞联合孕酮修复大鼠坐骨神经损伤的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(8): 1781-1783.

[8] 李新娟,何瑞芳. 孕酮对全脑缺血/再灌注损伤大鼠学习记忆及海马P2X7受体表达的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2012, 28(5): 472-475.

[9] 魏山坡,李翀瑶,司道文,等. 孕酮对大鼠脑损伤后脑水肿的影响及机制[J]. *中国老年杂志*, 2015, 35(21): 6017-6018.

(2017-02-10收稿,2017-07-19修回)

(上接第766页)

【参考文献】

[1] 中国医师协会神经外科医师分会. 中国脑积水规范化治疗专家共识(2013版)[J]. *中华神经外科杂志*, 2013, 29(6): 634-637.

[2] Higgins JP, Green SR. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* [M]. Version 5.1.0. 27-28.

[3] Singh A, Vajpeyi IN. Comparative study of lumboperitoneal shunt versus ventriculoperitoneal shunt in post meningitis communicating hydrocephalus in children [J]. *Neurol India*, 2013, 61(5): 513-516.

[4] 黄伟,刘翔,李锋培. 经皮穿刺腰大池-腹腔分流术治疗交通性脑积水的比较研究[J]. *黑龙江医学*, 2012, 36(6): 427-429.

[5] 丁海涛,孙德科. 用两种手术方法对颅脑损伤伴有脑积水患者进行治疗的疗效对比[J]. *当代医药论丛*, 2014, 12(20): 211-212.

[6] 王一芳,谭启富,许爱刚,等. 应用可调压分流管行腰大池腹腔分流治疗创伤后脑积水的临床分析[J]. *东南国防医药*, 2015, 17(5): 464-466.

[7] 黄剑,魏长新,陈苑新,等. 体外可调压微创腰大池-腹

腔分流术治疗交通性脑积水的疗效及并发症研究[J]. *现代诊断与治疗*, 2015, 26(5): 1077-1078.

[8] 吴俊波. 腰大池-腹腔分流术与侧脑室-腹腔分流术治疗交通性脑积水临床效果的对比研究[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2015, 23(3): 83-84.

[9] 叶建华,姜学高,黄毅. 腰大池-腹腔分流术与脑室-腹腔分流术后并发症的对比研究[J]. *四川医学*, 2014, 35(6): 675-675.

[10] 李克. 重型颅脑损伤合并脑积水34例治疗体会[J]. *中国医药指南*, 2012, 10(2): 159-160.

[11] 马喜. 腰大池-腹腔分流术治疗交通性脑积水的临床分析[J]. *大家健康*, 2014, 8(23): 104-105.

[12] 任光辉. 脑积水2种术式术后感染分析[J]. *中国伤残医学*, 2014, 22(9): 110-111.

[13] 郑安锡,黄晓明,袁晓东,等. 两种不同术式治疗交通性脑积水临床分析[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2014, 14(10): 906-909.

[14] Nakajima M, Miyajima M, Ogino I, *et al.* Use of external lumbar cerebrospinal fluid drainage and lumboperitoneal shunts with strata NSC valves in idiopathic normal pressure hydrocephalus: a single-center experience [J]. *World Neurosurg*, 2015, 83(3): 387-393.

(2017-05-16收稿,2017-07-04修回)