

## ·基础研究·

# 芝麻素通过抑制氧化应激以及抗凋亡作用 保护大鼠脊髓损伤

饶海军,唐向阳,周远辉,李谨

作者单位  
深圳市龙岗区人民  
医院骨科  
深圳 518000  
收稿日期  
2017-02-04  
通讯作者  
唐向阳  
chole123456789@  
126.com

**摘要 目的:**探索芝麻素(SES)对大鼠脊髓损伤后神经功能的影响,及其对氧化应激反应及神经凋亡的相关作用。**方法:**Allen法制备脊髓损伤动物模型,SD大鼠60只,随机分为假手术组、模型组、SES低浓度(10 mg/kg)组、SES中浓度(20 mg/kg)组、SES高浓度(40 mg/kg)组,每组12只。术后第3、7天进行下肢运动功能评分,1周后处死,干湿法测定脊髓组织含水量;Elisa法检测氧化应激因子丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、过氧化氢酶(CAT),Western blot检测凋亡蛋白Bax、Bcl-2表达;免疫组织化学染色观察Caspase-3表达。**结果:**SES能显著降低脊髓损伤大鼠下肢运动功能评分以及脊髓组织水肿,并呈剂量依赖趋势( $P$ 均 $<0.05$ );Elisa结果显示SES逆转MDA、CAT、SOD及GSH活性的表达,并呈剂量依赖趋势( $P$ 均 $<0.05$ );Western-blot结果显示SES能显著抑制Bax表达,提高Bcl-2蛋白表达,并呈剂量依赖趋势( $P$ 均 $<0.05$ );免疫组织化学染色显示,SES能显著抑制Caspase-3表达,并呈剂量依赖趋势( $P<0.05$ )。**结论:**SES可通过减轻脊髓损伤的水肿、抑制氧化应激以及抗细胞凋亡从而对脊髓损伤发挥神经保护作用。

**关键词** 芝麻素;脊髓损伤;氧化应激;神经保护

**中图分类号** R741;R741.05;R745.4 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2018.05.009

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后可引发一系列的病理生理过程,导致继发性损伤,SCI后期微循环障碍所致的神经细胞凋亡在继发性损伤中起重要作用<sup>[1]</sup>。大量研究表明,SCI后继发性损伤,如水肿、氧化应激反应和炎症反应等与SCI患者预后有关联<sup>[2]</sup>。已有研究证实,芝麻素(Sesamin, SES)是从芝麻中提取的木脂素类化合物,能通过抑制氧化应激反应及调节Bax/Bcl-2蛋白表达抑制血管紧张素II(angiotensin II, Ang II)诱导的大鼠心肌细胞凋亡,还可通过抑制氧化应激反应保护糖尿病小鼠的骨骼肌线粒体功能<sup>[3,4]</sup>。其潜在的药用价值以及抗氧化、抗炎等方面的作用也日益被人们重视。本实验拟通过建立大鼠SCI模型,探讨SES对大鼠SCI的保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康SPF级雄性SD大鼠60只,体质量200~250 g,由南方医科大学动物实验中心提供。

1.1.2 主要试剂与仪器 Allen打击器由南方医科大学动物实验中心提供,SES(购于美国Sigma公司);大鼠丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、过氧化氢酶(catalase, CAT)Elisa试剂盒(购于上海博谷公司);大鼠Bax、Bcl-2及Caspase-3一抗和DAB显色试剂盒(购于美国Santa Cruz公司);1%戊巴比妥钠(购于北京化学试剂公司);紫外分光光度计(购于美国Bausch Lomb公司);0.9%氯化钠注射液(购于北京双鹤药业);注

射用青霉素钠(购于瑞阳制药公司);Image Pro Plus 6.0软件(购于美国Media Cybernetics公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 SCI模型制备 60只大鼠适应性喂养1周后随机分为5组,假手术组、模型组、SES低浓度组、SES中浓度组、SES高浓度组,每组12只。大鼠以1%戊巴比妥麻醉后,无菌条件下行T9~T11椎板切除,暴露T10脊髓,采用Allen法将10 g打击锤固定在6 cm高度,松开打击锤,致伤量为60 g/cm,动物出现摆尾反射,双后肢迟缓性痉挛。假手术组只进行T9~T11椎板切除。SES低、中、高浓度组每日分别腹腔注射SES 10 mg/kg、20 mg/kg和40 mg/kg,每日1次,连续注射7 d。假手术组和模型组每日腹腔注射同等体积0.9%氯化钠注射液。

1.2.2 Basso Beattie Bresnahan(BBB)评分 根据文献<sup>[5]</sup>,在造模后3 d、7 d分别对各组大鼠下肢运动功能进行BBB评分:将大鼠放置在宽阔的桌面,采用双盲法观察下肢运动功能、下肢关节活动及下肢的步态和协调能力,运动时爪子的精细运动。取左右两侧肢体评分的平均值作为实验数据。大鼠后肢运动功能评分在0(完全瘫痪)和21(完全正常活动)之间。每只大鼠评定4次,取平均值为最终结果。

1.2.3 损伤脊髓组织中水含量的测定 造模7 d后锐性分离相应脊髓组织约10 mm,用滤纸吸尽表面血渍后,将取出的脊髓放入80℃烘箱中放置72 h后再次称重。损伤脊髓组织含水量=[(湿重-干重)/湿重]×100%。

1.2.4 Elisa法检测损伤脊髓组织氧化应激因子含量及活性 造模7 d后锐性分离相应脊髓组织约10 mm,充分研磨后利用标准稀释液进行稀释,按照

Elisa 试剂盒说明书进行加样操作,加终止液后混匀,酶标仪进行检测,计算MDA、CAT、SOD、GSH浓度。

1.2.5 Western-blotting 检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达 造模 7 d 后锐性分离相应脊髓组织约 10 mm,充分研磨,3 mL/g 蛋白裂解液充分裂解后,10 000g 离心 30 min。BCA 法测定总蛋白浓度。分别进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,一抗孵育过夜,二抗 1:10 000 孵育 5 h,加入显色剂显色,内参 GAPDH。凝胶成像系统成像,Image J 软件计算灰度值。相对灰度值=[目的蛋白灰度值/内参 GAPDH 灰度值]×100%。

1.2.6 组织学及免疫组织化学染色观测 造模 7 d 后锐性分离相应脊髓组织约 10 mm,10%多聚甲醛固定 48 h,石蜡包埋,从损伤脊髓组织中心部位连续切片,片厚 5 μm,行 Caspase-3 免疫组化染色,荧光倒置显微镜下观察。每张切片随机取 3 个视野,利用 Image Pro Plus 6.0 软件检测 Caspase-3 蛋白表达平均光密度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件分析数据,计量资料以(均数±标准差)表示,配对组间单因素方差分析或配对 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BBB 评分比较

造模后 3、7 d,模型组的 BBB 评分较假手术组显著降低,各 SES 治疗组大鼠的 BBB 评分提高,并呈剂量依赖趋势(F=19.637, F=36.459, P均<0.05),但均明显低于假手术组,差异有统计学意义(P均<0.05)。

表1 各组大鼠 BBB 评分比较(分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	造模后 3 d	造模后 7 d
假手术组	12	17.37±1.31	18.18±1.22
模型组	12	3.54±0.78 <sup>①</sup>	3.13±0.64 <sup>①</sup>
SES 低浓度组	12	7.23±0.92 <sup>①②</sup>	8.57±0.99 <sup>①②</sup>
SES 中浓度组	12	9.88±0.79 <sup>①②</sup>	11.04±1.11 <sup>①②</sup>
SES 高浓度组	12	12.49±1.13 <sup>①②</sup>	15.45±1.32 <sup>①②</sup>
F 值		19.637	36.459
P 值		0.016	0.004

注:与假手术组比较,①P<0.05;与模型组比较,②P<0.05

2.2 各组损伤脊髓含水量比较

模型组脊髓含水量(82.1±4.9)%,较假手术组(68.3±4.4)%明显升高,差异有统计学意义(t=11.754, P<0.05)。SES 低、中、高浓度组损伤脊髓的含水量分别为(79.2±4.7)%、(74.8±4.4)%、(70.4±4.8)%,低于模型组,并呈剂量依赖趋势(F=33.007, P均<0.05),均明显高于假手术组,差异有统计学意义(P均<0.05)。

2.3 各组脊髓组织 MDA、CAT、SOD 及 GSH 活性比较

与假手术组比较,模型组 MDA 含量明显升高,CAT、SOD、GSH 活性明显降低(t=9.752, t=12.087, t=14.236, t=9.871, P均<0.05),SES 低、中、高浓度组的氧化应激因子得到明显逆转,并呈剂量依赖趋势(F=19.852, F=16.791, F=22.754, F=39.648, P均<0.05),各 SES 治疗组 MDA 含量均明显高于假手术组,CAT、

SOD、GSH 活性明显低于假手术组,差异有统计学意义(P均<0.05),见表 2。

2.4 各组 Bax/Bcl-2 蛋白表达比较

模型组的 Bax 蛋白相对表达量高于假手术组(t=10.023, P<0.05),各 SES 治疗组的 Bax 蛋白相对表达量低于模型组,并呈剂量依赖趋势(F=36.945, P<0.05);模型组的 Bcl-2 蛋白相对表达量低于假手术组(t=16.853, P<0.05),各 SES 治疗组的 Bcl-2 蛋白相对表达量显著低于模型组,并呈剂量依赖趋势(F=25.814, P<0.05)。并且,各 SES 治疗组 Bax 蛋白相对表达量均明显高于假手术组,Bcl-2 蛋白相对表达量明显低于假手术组,差异有统计学意义(P均<0.05),见表 2、图 1。

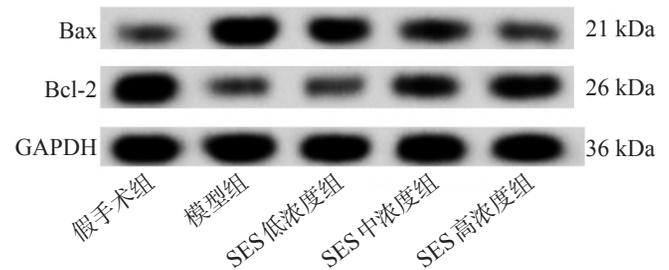


图1 各组大鼠 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达

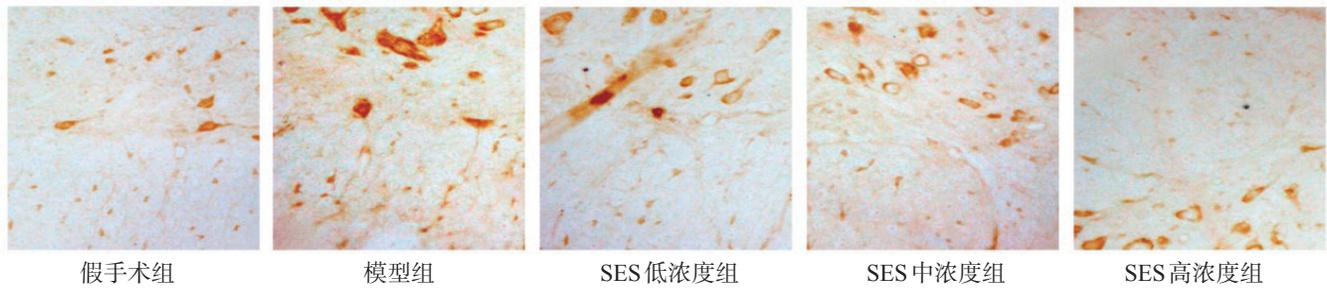
2.5 免疫组织化学染色观察

模型组可见大量的 Caspase-3 阳性细胞,分布不均,大量神经元细胞变性,并有空泡产生,各 SES 治疗组的 Caspase-3 阳性蛋白明显减弱,组织结构清晰。半定量分析显示,模型组的 Caspase-3 蛋白平均光密度高于对照组(t=17.816, P<0.05),各 SES 治疗组的 Caspase-3 蛋白平均光密度低于模型组,并呈剂量依赖趋势(F=28.461, P<0.05)。并且,各 SES 治疗组 Caspase-3 蛋白平均光密度均明显高于假手术组,差异有统计学意义(P均<0.05),见表 2、图 2。

3 讨论

SCI 后继发的水肿、炎症反应、氧化应激反应及局部缺血再灌注、Ca<sup>2+</sup>溢出、过氧化等会造成脊髓的再次伤害<sup>[6,7]</sup>,因此,寻求一种能抑制 SCI 后继发性损伤的治疗方法十分必要。SES 是一类木脂素类化合物,对大鼠肝组织氧化应激反应、炎症反应及肾性高血压具有治疗作用<sup>[3,8]</sup>。本实验通过建立大鼠 T10 节段脊髓损伤模型,利用 SES 进行干预,发现 SES 能很好改善 SCI 后大鼠的下肢运动功能,并呈现剂量依赖效应,提示 SES 对神经损伤具有一定的修复作用。

水肿和氧化应激反应是 SCI 继发性损伤进程中的重要环节,水肿程度和氧化应激反应的严重程度直接关系 SCI 的预后<sup>[9]</sup>。通过干湿度研究发现,SCI 后模型组脊髓水肿指数显著升高,而经 SES 治疗后水肿情况明显好转,并呈现剂量依赖趋势。MDA、SOD、CAT、GSH 是 SCI 后主要的氧化应激反应因子,MDA 活性可直接反映体内氧自由基水平,间接反映组织或细胞受自由基伤害程度<sup>[10]</sup>;SOD 是细胞内主要的自由基清除剂,能抑制氧自由基对机体的损害<sup>[11]</sup>;CAT 可促使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解为分子氧和



注:黄染的神经细胞为Caspase-3阳性细胞

图2 各组大鼠损伤脊髓Caspase-3观察(免疫组织化学染色,×200)

表2 各组氧化应激因子及Bax/Bcl-2蛋白表达比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	只数	MDA/ (nmol/mg prot)	CAT/ (U/mg prot)	SOD/ (U/mg prot)	GSH/ (U/mg prot)	Bax 蛋白	Bcl-2 蛋白	Caspase-3 平均光密度
假手术组	12	16.7±1.8	183.9±11.4	18.9±1.5	42.8±1.9	1.1±0.2	15.8±1.1	11.3±1.4
模型组	12	43.8±2.1 <sup>①</sup>	37.8±10.1 <sup>①</sup>	4.1±1.3 <sup>①</sup>	8.9±1.7 <sup>①</sup>	22.4±0.8 <sup>①</sup>	1.2±1.3 <sup>①</sup>	73.8±2.6 <sup>①</sup>
SES低浓度组	12	31.4±2.2 <sup>①②</sup>	79.8±9.7 <sup>①②</sup>	6.4±1.4 <sup>①②</sup>	14.8±1.9 <sup>①②</sup>	14.7±0.8 <sup>①②</sup>	6.9±0.9 <sup>①②</sup>	39.7±2.1 <sup>①②</sup>
SES中浓度组	12	22.3±1.8 <sup>①②</sup>	99.1±11.2 <sup>①②</sup>	7.5±1.6 <sup>①②</sup>	21.6±1.9 <sup>①②</sup>	11.3±0.7 <sup>①②</sup>	8.7±0.7 <sup>①②</sup>	30.2±1.7 <sup>①②</sup>
SES高浓度组	12	19.7±1.9 <sup>①②</sup>	141±12.6 <sup>①②</sup>	9.9±1.5 <sup>①②</sup>	31.4±2.1 <sup>①②</sup>	6.5±0.4 <sup>①②</sup>	11.2±1.2 <sup>①②</sup>	28.4±1.4 <sup>①②</sup>
F值		19.852	16.791	22.754	39.648	36.945	25.814	28.461
P值		0.012	0.009	0.014	0.001	<0.05	<0.05	<0.05

注:与假手术组比较,<sup>①</sup>P<0.05;与模型组比较,<sup>②</sup>P<0.05

水,防止细胞过氧化<sup>[12]</sup>;GSH可催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分解,可反映机体清除氧自由基的能力<sup>[13]</sup>。本实验显示,SCI后MDA显著升高,SOD、CAT、GSH活性明显降低,经过SES治疗后,氧化应激因子明显得到逆转,并呈现剂量依赖趋势,提示SES可有效抑制SCI后继发的氧化应激反应。

神经细胞凋亡是SCI最为严重的病理阶段,Bax、Bcl-2及Caspase-3蛋白是Bcl家族最为常见的凋亡蛋白<sup>[14]</sup>,研究显示,SCI后受损脊髓组织Bax及Caspase-3含量显著提高,Bcl-2蛋白含量受到抑制<sup>[15]</sup>。本实验发现,通过建立SCI模型后,受损脊髓组织Bax及Caspase-3含量显著提高,Bcl-2蛋白含量受到抑制,与文献报道一致<sup>[14]</sup>,而通过SES治疗后,Bax及Caspase-3表达明显减少,Bcl-2表达提高,提示SES在SCI进程中可抑制神经凋亡。

综上,SES对SCI的保护作用是通过抑制脊髓水肿、下调氧化应激反应以及抗神经凋亡发挥作用,然而其通过何种信号途径发挥保护作用仍需进一步探索,以期对SCI用药提供新的依据。

参考文献

[1] Kokoğlu Ç, Delen E, Arslantaş A, et al. Therapeutic efficacy of tadalafil and erythropoietin in experimental spinal cord injury[J]. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 2016, 22: 521-525.  
 [2] Huang M, Chen H, Jiang C, et al. Effects of botulinum toxin A injections in spinal cord injury patients with detrusor overactivity and detrusor sphincter dyssynergia[J]. *J Rehabil Med*, 2016, 48: 683-687.  
 [3] Zheng SG, Ren YN, Zhao MQ, et al. Effect of Serum Containing Sesamin on Angiotensin II-Induced Apoptosis in Rat Cardiomyocytes[J]. *Zhong Yao Cai*, 2015, 38: 1013-1017.  
 [4] Takada S, Kinugawa S, Matsushima S, et al. Sesamin prevents decline in exercise capacity and impairment of skeletal muscle mitochondrial function in mice with high-fat diet-induced diabetes[J]. *Exp Physiol*, 2015,

100: 1319-1330.  
 [5] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores:effects of experience and teamwork on reliability[J]. *J Neurotrauma*, 1996, 13: 343-359.  
 [6] Falconi A, Flick D, Ferguson J, et al. Spinal Cord Injuries in Wave-Riding Sports: The Influence of Environmental and Sport-Specific Factors[J]. *Curr Sports Med Rep*, 2016, 15: 116-120.  
 [7] Schroeder GD, Kepler CK, Vaccaro AR. The Use of Cell Transplantation in Spinal Cord Injuries[J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2016, 24: 266-275.  
 [8] Lin CH, Shen ML, Kao ST, et al. The effect of sesamin on airway fibrosis in vitro and in vivo[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 22: 141-150.  
 [9] Adriaansen JJ, Ruijs LE, van Koppenhagen CF, et al. Secondary health conditions and quality of life in persons living with spinal cord injury for at least ten years[J]. *J Rehabil Med*, 2016, 48: 853-860.  
 [10] Yuksel Y, Guven M, Kaymaz B, et al. Effects of Aloe Vera on Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury of Rats[J]. *J Invest Surg*, 2016, 29: 389-398.  
 [11] Gökce EC, Kahveci R, Gökce A, 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: 949-959.  
 [12] Jalali HK, Salamatzadeh A, Jalali AK, et al. Antagonistic Activity of Nocardia brasiliensis PTCC 1422 Against Isolated Enterobacteriaceae from Urinary Tract Infections[J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2016, 8: 41-45.  
 [13] Kalayci M, Coskun O, Cagavi F, et al. Neuroprotective effects of ebselen on experimental spinal cord injury in rats[J]. *Neurochem Res*, 2005, 3: 403-410.  
 [14] Gou WF, Shen DF, Yang XF, et al. ING5 suppresses proliferation, apoptosis, migration and invasion, and induces autophagy and differentiation of gastric cancer cells: a good marker for carcinogenesis and subsequent progression[J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 19552-19579.  
 [15] Zhang C, Ma J, Fan L, et al. Neuroprotective effects of safranal in a rat model of traumatic injury to the spinal cord by anti-apoptotic, anti-inflammatory and edema-attenuating[J]. *Tissue Cell*, 2015, 47: 291-300.

(本文编辑:王晶)