

淫羊藿苷在大鼠脊髓损伤中的神经保护作用

任宪盛¹, 丁巍², 杨小玉¹

(1. 吉林大学第二医院骨科, 吉林 长春 130041; 2. 吉林大学第二医院外科, 吉林 长春 130041)

【摘要】 目的: 研究淫羊藿苷在大鼠脊髓损伤中的神经保护作用。方法: 108 只 SPF 级雄性 3 月龄 SD 大鼠按随机数字表法分为实验组、对照组及假手术组 3 组, 每组 36 只。对照组和实验组采用改良 Allen 法制作脊髓损伤模型, 假手术组仅切开椎板不损伤脊髓。术后即刻实验组给予淫羊藿苷 (100 mg/kg) 灌胃, 对照组和假手术组给予等量生理盐水灌胃, 每日 2 次。术后 1、2、3 d 采用 BBB 评分法评定大鼠运动功能; 术后 72 h 采用分光光度法检测髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 的活性, 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法检测肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 、白介素 (interleukin, IL)-1 β 的含量, 免疫组化染色检测 MPO、TNF- α 、IL-1 β 的表达; 采用硫代巴比妥酸法检测丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量, 黄嘌呤氧化酶法检测超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性; 采用 TUNEL 法检测细胞凋亡并计算细胞凋亡指数 (apoptosis index, AI); 光镜观察脊髓损伤后组织病理学的改变并行组织病理学评分。结果: 术后各时间点对照组和实验组大鼠 BBB 评分均显著低于假手术组 ($P < 0.05$); 术后 2、3 d 实验组大鼠 BBB 评分均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。术后 72 h, 对照组和实验组 MPO 活性和 TNF- α 、IL-1 β 的含量显著高于假手术组 ($P < 0.05$); 实验组显著低于对照组 ($P < 0.05$)。对照组和实验组 MPO、TNF- α 、IL-1 β 的表达显著高于假手术组 ($P < 0.05$); 实验组显著低于对照组 ($P < 0.05$)。对照组和实验组 MDA 含量显著高于假手术组, 实验组显著低于对照组 ($P < 0.05$); 对照组和实验组 SOD 活性显著低于假手术组, 实验组显著高于对照组 ($P < 0.05$)。对照组和实验组脊髓组织中 AI 显著高于假手术组, 实验组显著低于对照组 ($P < 0.05$)。对照组和实验组脊髓组织病理学评分均显著高于假手术组, 实验组均显著低于对照组 ($P < 0.05$)。结论: 淫羊藿苷能够抑制脊髓损伤后的炎症、脂质过氧化和细胞凋亡, 减轻脊髓组织病理学损伤, 改善脊髓损伤大鼠的运动功能, 有效保护脊髓组织, 具有明显的神经保护作用。

【关键词】 淫羊藿苷; 脊髓损伤; 神经保护; 大鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2018.11.014

Neuroprotective effect of icariin on spinal cord injury in rats REN Xian-sheng*, DING Wei, and YANG Xiao-yu. *Department of Orthopaedics, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, Jilin, China

ABSTRACT **Objective:** To study the neuroprotective effect of icariin on spinal cord injury in rats. **Methods:** A total 108 SPF male 3-month-old SD rats were divided into experimental group, control group and sham operation group according to the random number table. There were 36 rats in each group. In the control group and the experimental group, the modified Allen's method was used to make the spinal cord injury model. In the sham operation group, only the lamina was cut without damaging the spinal cord. Immediately after operation, the experimental group was given intragastric administration of icariin (100 mg/kg), the control group and sham operation group were given an equal amount of normal saline by gavage, twice a day. BBB score was used to assess the motor function of rats on 1, 2, 3 days after operation. At 72 h after operation, the activity of myeloperoxidase (MPO) was measured by spectrophotometry. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) levels was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). MPO, TNF- α , IL-1 β expression were detected by immunohistochemical staining. Malondialdehyde (MDA) content was detected by thiobarbituric acid method. Superoxide dismutase (SOD) activity was measured by xanthine oxidase method. TUNEL staining was used to detect the apoptosis and apoptosis index (AI) was calculated. The histopathological changes of the spinal cord were observed under a light microscope and the histopathological score was performed using Sirin score method. **Results:** BBB score in the control group and the experimental group was significantly lower than that in the sham operation group at each postoperative time point ($P < 0.05$). BBB score in the experimental group was significantly higher than that in the control group at 2 and 3 days after operation ($P < 0.05$). At 72 h after operation, the MPO activity and the levels of TNF- α , IL-1 β in the control group and experimental group were significantly higher than in the sham operation group ($P < 0.05$), and the experimental group was obviously higher than control group ($P < 0.05$). The ex-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 31572217)

Fund program: National Natural Science Foundation of China (No. 31572217)

通讯作者: 任宪盛 E-mail: antren@163.com

Corresponding author: REN Xian-Sheng E-mail: antren@163.com

pressions of MPO, TNF- α , IL-1 β in the control group and experimental group were significantly higher than in the sham operation group ($P < 0.05$), and the experimental group was significantly lower than of the control group ($P < 0.05$). MDA content in the control group and the experimental group was significantly higher than that in the sham operation group, and the experimental group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). SOD activity in the control group and the experimental group was significantly lower than that in the sham operation group, and the experimental group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). The AI in the control group and the experimental group was significantly higher than that in the sham operation group, and the experimental group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). The histopathological score in the control group and the experimental group was significantly higher than that in the sham operation group, and the experimental group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Icarin can inhibit inflammation, lipid peroxidation and apoptosis after spinal cord injury, reduce histopathological damage of spinal cord, improve the motor function, effectively protect spinal cord tissue, and has an obvious neuroprotective effect.

KEYWORDS Icarin; Spinal cord injury; Neuroprotection; Rats

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2018, 31(11): 1054-1060 www.zggszz.com

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是临床上常见的一种致残率较高的中枢系统损伤,常常给社会、家庭及个人带来沉重的负担,目前仍没有有效的治疗方法^[1]。脊髓损伤包括原发性损伤和继发性损伤^[2]。原发性损伤是不可逆不可控的,继发性损伤是可控的,因此如何有效地控制继发性损伤成为脊髓损伤治疗的焦点^[3-5]。炎症、脂质过氧化和细胞凋亡是继发性脊髓损伤中的重要组成部分,在继发性脊髓损伤的发生发展中起关键作用^[6]。淫羊藿苷(icaritin, ICA),为小檗科植物淫羊藿中的主要活性成分,具有抗炎、抗氧化、抗凋亡、抗肿瘤等多种药理学作用^[7-9]。近期研究表明,淫羊藿苷能减轻脑损伤后的炎症、脂质过氧化、细胞凋亡,发挥神经保护作用^[10]。但淫羊藿苷对脊髓损伤后的炎症、脂质过氧化、细胞凋亡是否有影响尚不清楚。为此,本研究旨在观察淫羊藿苷对大鼠脊髓损伤后炎症、脂质过氧化、细胞凋亡的影响,同时观察损伤脊髓组织超微结构改变及脊髓损伤大鼠的运动功能改变,探讨其在大鼠脊髓损伤中的神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级雄性 3 月龄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 108 只,体质量 260~300 g,由吉林大学动物实验中心提供,实验动物许可证号 SCXK-(吉) 2012-0003。按随机数字表法分为实验组、对照组及假手术组 3 组,每组 36 只。本实验所涉及的实验动物方案均按照吉林大学动物实验基本原则进行,并得到了吉林大学实验动物管理委员会的许可。

1.2 主要试剂和仪器

淫羊藿苷(货号 SI8010,规格 20 mg, CAS: 489-32-7),购于北京索莱宝科技有限公司,临用前溶于生理盐水中。过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)检测试剂盒,丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒和过氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检

测试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。Mouse anti MPO、Mouse anti TNF- α 、Mouse anti IL-1 β 单克隆抗体、SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司。石蜡自动包埋机(Leica EG1150C)和轮转式切片机(Leica RM2235)购于德国徕卡公司,光学显微镜(Olympus CX-21)购于日本奥林巴斯公司。

1.3 动物模型制备

采用改良 Allen 方法制作脊髓重物打击损伤模型^[11]。将大鼠以 1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后,俯卧并固定于鼠板手术台上,颈背部备毛、消毒铺巾后,以 T₁₀ 棘突为中心取背部后正中约 5 cm 长纵切口,依次切开皮肤、皮下组织,剥离椎旁肌肉,显露棘突及椎板。咬除 T₁₀ 棘突及全椎板至椎弓根部,部分咬除 T₉ 和 T₁₁ 椎板扩大椎管。假手术组直接缝合切口。实验组和对照组暴露约 20 mm 长脊髓,用自制的改良 Allen 打击装置以致伤能量 5 g × 10 cm (5 g 重物从 10 cm 高度自由落下)造成大鼠脊髓损伤。

造模成功标准:损伤处脊髓外观出血、水肿,大鼠尾巴痉挛性摆动、双下肢及躯体回缩扑动后,双下肢瘫。脊髓损伤造模成功后,逐层缝合切口。

1.4 给药方法

术后即刻实验组给予淫羊藿苷(100 mg/kg^[12])灌胃,对照组和假手术组给予等量生理盐水灌胃,每日 2 次。12:12 h 的白天/夜间光照周期,自由进食粉状饲料及饮用自来水,室温 25~27 °C。精心饲养,不限饮水及进食,每日 3 次人工膀胱排尿,直至形成反射性膀胱。

1.5 脊髓组织取材及标本制作

术后 72 h 每组随机抽取 12 只大鼠,麻醉后处

死,取损伤段脊髓,以损伤点为中心切取脊髓组织 10 mm,称质量后制备脊髓组织匀浆,待行 MPO、TNF- α 、IL-1 β 的测定及 MDA 含量和 SOD 活性测定。术后 72 h 每组随机抽取 18 只大鼠,麻醉后剖胸、心脏插管、灌流固定,以损伤点为中心切取脊髓组织 10 mm,修剪后石蜡包埋连续切片,片厚 5 μ m,待行免疫组织化学染色、细胞凋亡检测、苏木素和伊红染色。

1.6 观察项目与方法

1.6.1 运动功能评价 每组各取 6 只大鼠于术后 1、2、3 d 进行 BBB 运动评分^[13]。由熟悉该评分标准的 2 名实验人员进行双盲法评分。

1.6.2 MPO、TNF- α 、IL-1 β 的测定 采用分光光度法,根据 MPO 检测试剂盒说明方法测定 MPO 活性(U/g)。采用 ELISA 法,分别根据 TNF- α 、IL-1 β 试剂盒说明方法测定 TNF- α 、IL-1 β 含量(pg/mg)。

1.6.3 MPO、TNF- α 、IL-1 β 表达的免疫组织化学染色 采用免疫组织化学染色 SP 法,根据 SP 试剂盒说明方法操作,以 PBS 作为阴性对照,细胞核或胞浆染成褐色或黑色为阳性细胞。光学显微镜下观察并计数每张切片高表达区域 3 个高倍镜视野中的阳性细胞数,计算平均数及标准差,阳性细胞数的数值反映 MPO、TNF- α 、IL-1 β 的表达水平。数值的大小与表达的强度呈正相关。

1.6.4 MDA 含量和 SOD 活性测定 采用硫代巴比妥酸法,根据 MDA 检测试剂盒说明方法测定 MDA 含量(nmol/mg);采用黄嘌呤氧化酶法,根据 SOD 检测试剂盒说明方法测定 SOD 活性(U/mg)。

1.6.5 细胞凋亡检测 严格按照细胞凋亡检测试剂盒说明书操作,光镜下观察。凋亡细胞在原位末端标记后呈棕黄色,每张切片随机取 1 个高倍视野,按以下公式计算凋亡指数 (apoptosis index, AI):(凋亡细胞数/镜下细胞总数) \times 100%。以上观察由 2 名病理学专业人员根据双盲原则统计。

1.6.6 组织病理学观察及评分 采用苏木素和伊红进行染色,用光学显微镜进行观察并拍照。采用 Sirin 等^[14]先前描述的组织病理学评分法,在 400 倍放大率下,对光镜标本中脊髓损伤区的病理变化和神经元的受损情况进行评分。数值的大小与脊髓损伤的严重程度成正比。由熟悉该评分标准的 2 位实验人员进行双盲法评分。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。计量资料数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多个样本比较,数据符合正态分布且方差齐用单因素方差分析,各组间两两比较采用 LSD-*t* 法检验;不符合正态分布或方差

不齐时用非参数的秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

本实验过程中,108 只 SD 大鼠全部存活,实验组、对照组和假手术组各 36 只,均纳入结果分析中。

2.1 运动功能评价

术后各时间点对照组和实验组大鼠 BBB 评分均显著低于假手术组,差异有统计学意义($P<0.05$);术后 2~3 d 实验组大鼠 BBB 评分均显著高于对照组,差异亦有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠术后各时间点 BBB 评分比较($\bar{x}\pm s$,分)

Tab.1 BBB score of rats in each group at each time point after operation($\bar{x}\pm s$, score)

组别	鼠数(只)	术后 1 d	术后 2 d	术后 3 d
假手术组	6	18.8 \pm 0.4	21.0 \pm 0.0	21.0 \pm 0.0
对照组	6	0*	1.1 \pm 0.2*	1.5 \pm 0.4*
实验组	6	0*	2.2 \pm 0.6**	3.6 \pm 0.8**
F 值	-	13 254.000	5 629.950	2 577.825
P 值	-	0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与对照组比较,** $P<0.05$

Note:Compared with sham operation group,* $P<0.05$; compared with control group,** $P<0.05$

2.2 MPO 的活性、TNF- α 、IL-1 β 的含量变化

对照组和实验组脊髓组织中 MPO 的活性显著高于假手术组 ($P<0.05$);实验组脊髓组织中 MPO 的活性显著低于对照组 ($P<0.05$),对照组和实验组脊髓组织中 TNF- α 、IL-1 β 的含量显著高于假手术组 ($P<0.05$);实验组脊髓组织中 TNF- α 、IL-1 β 的含量显著低于对照组 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠术后 72 h MPO 的活性、TNF- α 、IL-1 β 的含量($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 The activity of MPO, and the content of TNF- α and IL-1 β of rats in each group at 72 h after operation($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数(只)	MPO(U/g)	TNF- α (pg/mg)	IL-1 β (pg/mg)
假手术组	6	145.4 \pm 4.8	110.4 \pm 3.2	3.2 \pm 0.4
对照组	6	445.5 \pm 8.4*	380.4 \pm 8.2*	9.5 \pm 0.4*
实验组	6	210.8 \pm 5.6**	204.6 \pm 4.6**	4.8 \pm 0.8**
F 值	-	3 587.258	3 426.985	201.063
P 值	-	0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与对照组比较,** $P<0.05$

Note:Compared with sham operation group,* $P<0.05$; compared with control group,** $P<0.05$

2.3 MPO、TNF-α、IL-1β 表达的免疫组化结果

假手术组脊髓组织中 MPO、TNF-α、IL-1β 染色结果为阴性表达。对照组脊髓组织 MPO、TNF-α、IL-1β 染色结果为强阳性表达。实验组脊髓组织 MPO、TNF-α、IL-1β 染色结果为弱阳性表达。见图 1。对照组和实验组脊髓组织中 MPO、TNF-α、IL-1β 的表达显著高于假手术组 ($P<0.05$)；实验组脊髓组织中 MPO、TNF-α、IL-1β 的表达显著低于对照组 ($P<0.05$)。见表 3。

2.4 MDA 含量和 SOD 活性测定

术后 72 h,假手术组、对照组、实验组脊髓组织中 MDA 含量分别为 (2.82±0.24)、(10.12±0.64)、(6.21±0.36) nmol/mg,对照组和实验组 MDA 含量显著高于假手术组,实验组 MDA 含量显著低于对照组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。假手术组、对照组、实验组脊髓组织中 SOD 活性分别为 (35.63 ±

表 3 各组大鼠术后 72 h MPO、TNF-α、IL-1β 阳性细胞数比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Comparison of MPO, TNF-α and IL-1β positive cells in rats in each group at 72 h after operation ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数(只)	MPO	TNF-α	IL-1β
假手术组	6	0	0	0
对照组	6	9.2±0.6*	7.1±0.4*	5.5±0.5*
实验组	6	4.2±0.4**	3.2±0.3**	2.6±0.4**
F 值	-	734.308	910.320	332.341
P 值	-	0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较, * $P<0.05$;与对照组比较, ** $P<0.05$

Note: Compared with sham operation group, * $P<0.05$; compared with control group, ** $P<0.05$

1.76)、(17.83±1.21)、(31.56±1.46) U/mg, 对照组和实验组 SOD 活性显著低于假手术组, 实验组 SOD

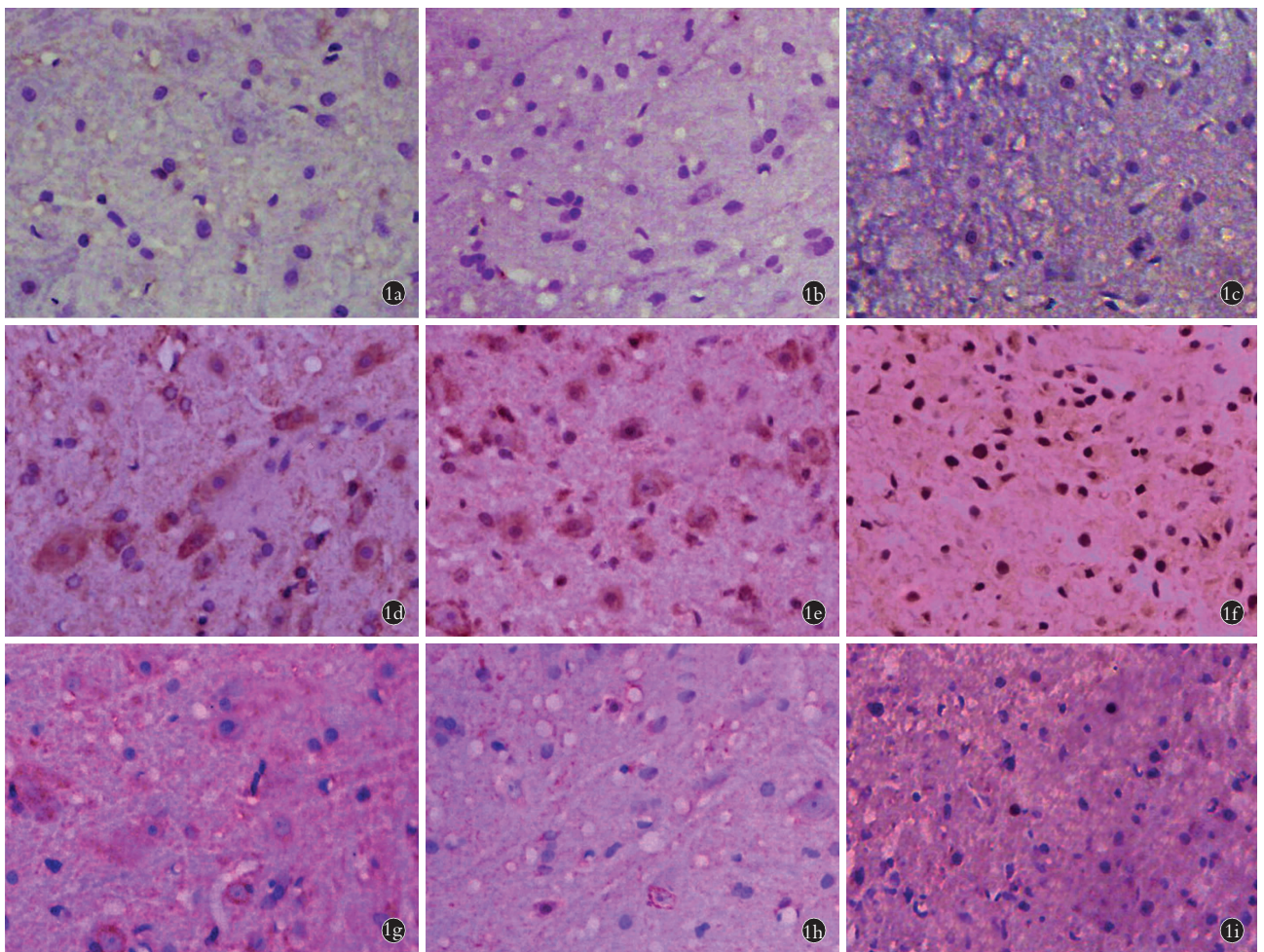


图 1 各组大鼠 MPO、TNF-α、IL-1β 的表达免疫组化染色(400×) 1a,1b,1c. 假手术组大鼠 MPO、TNF-α、IL-1β 的表达 1d,1e,1f. 对照组大鼠 MPO、TNF-α、IL-1β 的表达 1g,1h,1i. 实验组大鼠 MPO、TNF-α、IL-1β 的表达

Fig.1 Immunohistochemistry staining of MPO, TNF-α and IL-1β expression of rats in each group(400×) 1a,1b,1c. MPO, TNF-α and IL-1β expression in sham operation group 1d,1e,1f. MPO, TNF-α and IL-1β expression in control group 1g,1h,1i. MPO, TNF-α and IL-1β expression in experimental group

活性显著高于对照组，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.5 细胞凋亡检测

术后 72 h,假手术组均未见 TUNEL 标记阳性细胞;对照组可见较多 TUNEL 标记阳性细胞,累及灰质和白质,大小不一,分布不均匀;实验组可见较少 TUNEL 标记阳性细胞,见图 2。假手术组、对照组、实验组脊髓组织中 AI 分别为 0、(35.2±2.4)%、(18.8±1.4)%,对照组和实验组 AI 显著高于假手术组,实验组 AI 显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

2.6 组织病理学的改变及评分

术后 72 h 光镜下观察示,假手术组脊髓组织无出血、水肿,表现为正常的脊髓灰质和白质,神经细胞均呈现正常的组织结构(3a)。对照组脊髓组织明显出血、水肿;神经细胞受损,炎性细胞浸润,毛细血管周围水肿(图 3b)。实验组脊髓组织内部分区域可见出血和水肿,但较对照组程度明显轻;神经细胞胞结构基本正常,部分毛细血管周围水肿(图 3c)。

3 讨论

3.1 脊髓损伤诱发炎症反应、脂质过氧化和细胞凋亡

脊髓损伤分为原发性损伤和继发性损伤^[2]。原发性损伤是指脊髓受到暴力破坏后,神经细胞破碎、

轴索断裂,细胞质膜破裂,内容酶释放致细胞直接死亡。继发性损伤是在原发性损伤基础上发生的多种因素参与的序列性组织自毁性破坏过程。炎症反应、氧自由基损伤及脂质过氧化、细胞凋亡是继发性脊髓损伤的重要组成部分,并在继发性脊髓损伤的发生和发展中发挥重要作用^[15-16]。Xu 等^[17]、Yang 等^[18]、Zhou 等^[19]和李长明等^[20]研究发现,大鼠脊髓损伤后,MPO 活性增加,NF- κ B p65 水平升高,TNF- α 、IL-1 β 等促炎性细胞因子水平显著升高,MDA 水平升高,Caspase-3、Caspase-9、Bax、Bad 等凋亡相关蛋白水平及细胞凋亡指数显著升高,证实了脊髓损伤引发了炎症反应、脂质过氧化和细胞凋亡。与上述研究类似,本研究结果显示,对照组和实验组 MPO 活性和 TNF- α 、IL-1 β 的含量显著高于假手术组 ($P < 0.05$);对照组和实验组 MPO、TNF- α 、IL-1 β 的表达显著高于假手术组 ($P < 0.05$);表明脊髓损伤后促进了中性粒细胞浸润和促炎性细胞因子的表达,诱发了明显的炎症反应。同时,本研究发现对照组和实验组脊髓组织中 MDA 的含量显著高于假手术组 ($P < 0.05$),SOD 的活性显著低于假手术组 ($P < 0.05$),表明脊髓损伤降低了机体抗氧化酶的抗氧化能力,诱发氧自由基过度生成和严重的脂质过氧化。对照组

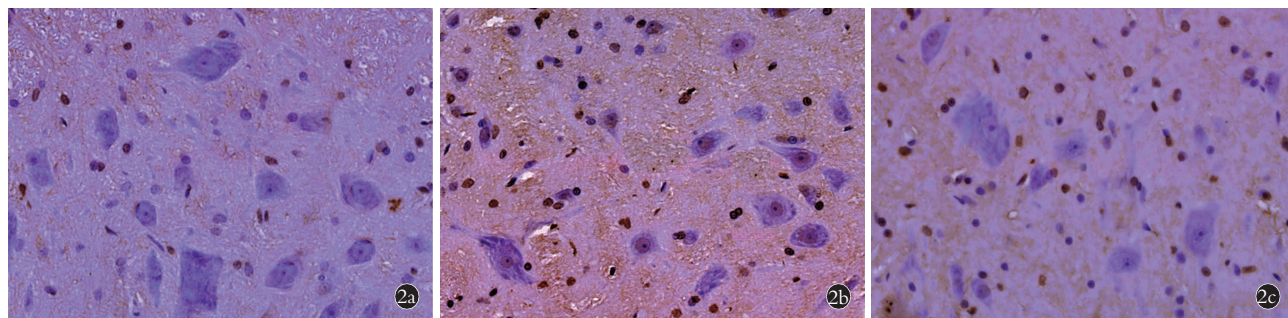


图 2 各组大鼠术后 72 h TUNEL 染色观察(光镜 400×) 2a. 假手术组 2b. 对照组 2c. 实验组
Fig.2 The apoptosis of rats in each group at 72 h after operation by TUNEL staining (light microscopy 400×) 2a. Sham operation group 2b. Control group 2c. Experimental group

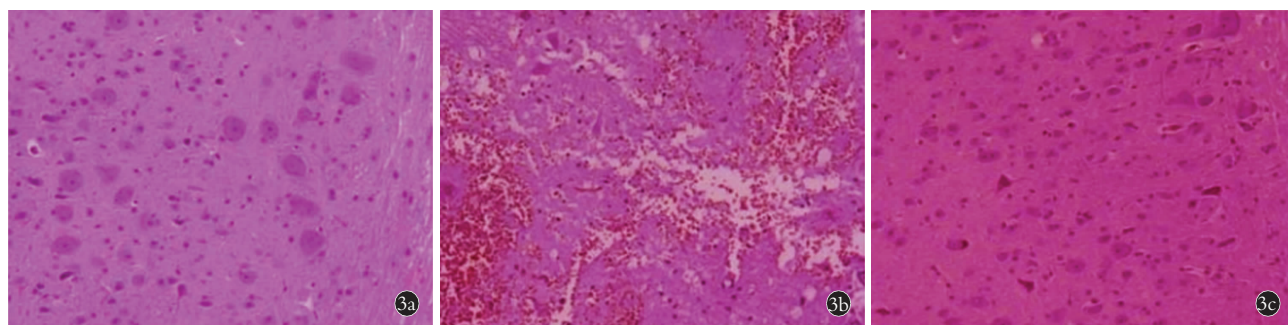


图 3 各组大鼠术后 72 h 光镜观察(400×) 3a. 假手术组 3b. 对照组 3c. 实验组
Fig.3 Light microscope observations of rats in each group at 72 h after operation (400×) 3a. Sham operation group 3b. Control group 3c. Experimental group

和实验组 AI 显著高于假手术组 ($P < 0.05$); 表明脊髓损伤诱发并加剧细胞凋亡。对照组和实验组组织病理学评分和大鼠 BBB 评分显著高于假手术组 ($P < 0.05$), 表明脊髓损伤导致脊髓的组织病理学损伤, 以及大鼠的运动功能障碍。

3.2 淫羊藿苷抑制脊髓损伤诱发的炎症反应、脂质过氧化、细胞凋亡

淫羊藿苷, 是一种黄酮苷类化合物, 是小檗科植物淫羊藿、箭叶淫羊藿、巫山淫羊藿等的干燥茎叶提取物, 是祖国传统中药淫羊藿中的主要活性成分。现代药理学研究表明, 淫羊藿苷具有抗炎、抗氧化、抗凋亡、抗肿瘤、抗衰老、促进骨代谢、抗骨质疏松、增强免疫功能、改善心脑血管功能等多种药理学作用^[21]。近期研究证实淫羊藿苷能够有效抑制脑损伤后的炎症、脂质过氧化、细胞凋亡, 改善神经功能, 发挥神经保护作用^[10]。Xiong 等^[22]和 Zeng 等^[23]研究证实, 淫羊藿苷能够抑制 TAK1/IKK/NF- κ B 和 JNK/P38 MAPK 信号通路, 抑制 I- κ B 的降解和 NF- κ B 的活化, 抑制 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等促炎性细胞因子的 mRNA 表达, 降低白细胞介素-1(IL-1) 和转化生长因子- β (TGF- β 1) 蛋白表达水平, 抑制炎症反应, 改善神经功能, 减少梗死体积, 发挥神经保护作用。Luo 等^[24]和 He 等^[25]在铝诱导的大鼠学习记忆障碍模型和快速老化模型小鼠 SAMP8 中发现, 淫羊藿苷能够提高 SOD 活性和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px) 的活性, 降低 MDA 含量, 提高机体的抗氧化能力, 抑制氧化损伤和脂质过氧化, 改善空间学习、记忆能力、认知障碍, 发挥神经保护作用。Zhang 等^[26]和 Liu 等^[27]在皮质酮诱导的原代培养的大鼠下丘脑和海马神经元的细胞凋亡模型中发现, 淫羊藿苷能够激活 PI3-K/Akt 信号通路, 抑制 p38MAPK 磷酸化, 改善线粒体膜电位, 抑制 Caspase-3 活化, 提高 SOD 活性, 降低活性氧 ROS 水平, 增加细胞活力, 减少 TUNEL 阳性细胞数量, 抑制皮质酮诱导的神经细胞凋亡, 发挥神经保护作用。本研究发现, 实验组 MPO 活性和 TNF- α 、IL-1 β 的含量显著低于对照组 ($P < 0.05$); 实验组 MPO、TNF- α 、IL-1 β 的表达显著低于对照组 ($P < 0.05$); 表明淫羊藿苷抑制了脊髓损伤诱发的中性粒细胞浸润和促炎性细胞因子的表达, 明显抑制了炎症反应。实验组脊髓组织中 SOD 的活性显著高于对照组 ($P < 0.05$), MDA 的含量显著低于对照组 ($P < 0.05$), 表明淫羊藿苷增强了机体的抗氧化酶活性, 抑制了脊髓损伤诱发的自由基过度生成和脂质过氧化。实验组脊髓组织 AI 均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 表明淫羊藿苷抑制了脊髓损伤诱发的细胞凋亡。实验组脊髓组织病理学评分、大鼠

BBB 评分显著低于对照组 ($P < 0.05$)。表明淫羊藿苷能够减轻脊髓组织病理学损伤, 改善脊髓损伤大鼠的运动功能, 有效保护脊髓组织, 具有明显的神经保护作用。

综上所述, 本研究结果揭示了淫羊藿苷能够抑制脊髓损伤后的炎症反应、脂质过氧化和细胞凋亡, 减轻脊髓组织的病理学损伤, 促进脊髓损伤后的运动功能的恢复, 有效地保护脊髓组织, 具有良好的神经保护作用。本实验为淫羊藿苷临床治疗脊髓损伤提供了理论基础, 但其对脊髓损伤的神经保护作用仍需进一步的探讨。

参考文献

- [1] Xun C, Mamat M, Guo H, et al. Tocotrienol alleviates inflammation and oxidative stress in a rat model of spinal cord injury via suppression of transforming growth factor- β [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(1):431-438.
- [2] Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, et al. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury[J]. *Spine J*, 2004, 4(4):451-464.
- [3] Lim PA, Tow AM. Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature[J]. *Ann Acad Med Singapore*, 2007, 36(1):49-57.
- [4] Tederko P, Krasuski M, Kiwerski J, et al. Strategies for neuroprotection following spinal cord injury[J]. *Orthop Traumatol Rehabil*, 2009, 11(2):103-110.
- [5] Hilton BJ, Moulson AJ, Tetzlaff W. Neuroprotection and secondary damage following spinal cord injury: concepts and methods[J]. *Neurosci Lett*, 2017, 652:3-10.
- [6] Liu C, Shi Z, Fan L, et al. Resveratrol improves neuron protection and functional recovery in rat model of spinal cord injury[J]. *Brain Res*, 2011, 1374:100-109.
- [7] Sun X, Deng X, Cai W, et al. Icarin inhibits LPS-induced cell inflammatory response by promoting GR α nuclear translocation and upregulating GR α expression[J]. *Life Sci*, 2018, 195:33-43.
- [8] Song YH, Cai H, Zhao ZM, et al. Icarin attenuated oxidative stress induced-cardiac apoptosis by mitochondria protection and ERK activation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83:1089-1094.
- [9] Tan HL, Chan KG, Pusparajah P, et al. Anti-cancer properties of the naturally occurring aphrodisiacs: icariin and its derivatives[J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7:191.
- [10] 宋宜祥, 黎巍威, 王学美. 淫羊藿苷神经保护作用机制研究进展[J]. *环球中医药*, 2014, (4):300-304.
SONG YX, LI WW, WANG XM. Advances in neuroprotective effects mechanisms of Icarin[J]. *Huan Qiu Zhong Yi Yao*, 2014, (4):300-304. Chinese.
- [11] Jiang JL, Guo XD, Zhang SQ, et al. Repetitive magnetic stimulation affects the microenvironment of nerve regeneration and evoked potentials after spinal cord injury[J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11(5):816-822.
- [12] Chen M, Hao J, Yang Q, et al. Effects of icariin on reproductive functions in male rats[J]. *Molecules*, 2014, 19(7):9502-9514.
- [13] Tian DS, Jing JH, Qian J, et al. Effect of oscillating electrical field stimulation on motor function recovery and myelin regeneration

- after spinal cord injury in rats[J]. J Phys Ther Sci, 2016, 28(5): 1465-1471.
- [14] Sirin BH, Ortac R, Cerrahoglu M, et al. Ischaemic preconditioning reduces spinal cord injury in transient ischaemia[J]. Acta Cardiol, 2002, 57(4): 279-285.
- [15] Hou QX, Yu L, Tian SQ, et al. Neuroprotective effects of atomoxetine against traumatic spinal cord injury in rats[J]. Iran J Basic Med Sci, 2016, 19(3): 272-280.
- [16] Liu C, Shi Z, Fan L, et al. Resveratrol improves neuron protection and functional recovery in rat model of spinal cord injury[J]. Brain Res, 2011, 1374: 100-109.
- [17] Xu J, E XQ, Liu HY, et al. Angelica Sinensis attenuates inflammatory reaction in experimental rat models having spinal cord injury[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(6): 6779-6785.
- [18] Yang W, Yang Y, Yang JY, et al. Treatment with bone marrow mesenchymal stem cells combined with plumbagin alleviates spinal cord injury by affecting oxidative stress, inflammation, apoptosis and the activation of the Nrf2 pathway[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(4): 1075-1082.
- [19] Zhou Z, Chen S, Zhao H, et al. Probenecid inhibits neural cell apoptosis via inhibition of mTOR signaling pathway after spinal cord injury[J]. Neuroscience, 2016, 329: 193-200.
- [20] 李长明, 谢尚举, 王拓, 等. 电针对大鼠急性脊髓损伤后神经细胞凋亡及相关功能的影响[J]. 中国骨伤, 2015, 28(8): 733-738.
LI CM, XIE SJ, WANG T, et al. Effects of electro-acupuncture on neuronal apoptosis and associative function in rats with spinal cord injury[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(8): 733-738. Chinese with abstract in English.
- [21] 刘松, 刘超明, 赖丽娟, 等. 淫羊藿素的药理作用研究进展[J]. 赣南医学院学报, 2017, 37(4): 631-635.
LIU S, LIU CM, LAI LJ, et al. Research progress in pharmacological effects of icaritin[J]. Gan Nan Yi Xue Yuan Xue Bao, 2017, 37(4): 631-635. Chinese.
- [22] Xiong D, Deng Y, Huang B, et al. Icaritin attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury through inhibition of inflammatory response mediated by NF- κ B, PPAR α and PPAR γ in rats[J]. Int Immunopharmacol, 2016, 30: 157-162.
- [23] Zeng KW, Hong F, Liu GX, et al. Icaritin attenuates lipopolysaccharide-induced microglial activation and resultant death of neurons by inhibiting TAK1/IKK/NF- κ B and JNK/P38 MAPK pathways[J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10(6): 668-678.
- [24] Luo Y, Nie J, Gong QH, et al. Protective effects of icaritin against learning and memory deficits induced by aluminium in rats[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007, 34(8): 792-795.
- [25] He XL, Zhou WQ, Bi MG, et al. Neuroprotective effects of icaritin on memory impairment and neurochemical deficits in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice[J]. Brain Res, 2010, 1334: 73-83.
- [26] Zhang H, Liu B, Wu J, et al. Icaritin inhibits corticosterone-induced apoptosis in hypothalamic neurons via the PI3-K/Akt signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2012, 6(5): 967-972.
- [27] Liu B, Zhang H, Xu C, et al. Neuroprotective effects of icaritin on corticosterone-induced apoptosis in primary cultured rat hippocampal neurons[J]. Brain Res, 2011, 1375: 59-67.

(收稿日期: 2018-05-08 本文编辑: 王宏)

·读者·作者·编者·

本刊关于一稿两投和一稿两用等现象的处理声明

文稿的一稿两投、一稿两用、抄袭、假署名、弄虚作假等现象属于科技领域的不正之风, 本刊历来对此加以谴责和制止。为防止类似现象的发生, 本刊一直严把投稿时的审核关, 要求每篇文章必须经作者单位主管学术的机构审核, 附单位推荐信(并注明资料属实、无一稿两投等事项)。希望引起广大作者的重视。为维护本刊的声誉和广大读者的利益, 凡核实属于一稿两投和一稿两用等现象者, 本刊将择期在杂志上提出批评, 刊出其作者姓名和单位, 并对该文的第一作者所撰写的一切文稿 2 年内拒绝在本刊发表, 同时通知相关杂志。欢迎广大读者监督。

《中国骨伤》杂志社