

硫化氢预处理对兔脊髓缺血再灌注神经损伤的保护作用及其机制研究

严旭¹, 魏延云¹, 吴志强¹, 曹东^{2*}

1. 解放军第四五五医院 骨科, 上海 200052

2. 上海第六人民医院 骨科, 上海 200233

摘要: 目的 观察硫化氢(H₂S)预处理对兔脊髓缺血再灌注损伤的保护效应。方法 将雄性新西兰大白兔随机分为假手术组、缺血再灌注组和H₂S预处理组, 观察H₂S对模型神经行为学的影响, 以及对神经细胞凋亡和超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)的影响。结果 H₂S预处理提高神经功能的评分, 降低神经细胞的凋亡, 增强SOD和CAT活性($P < 0.05$)。结论 H₂S对脊髓缺血再灌注损伤有较好的保护作用, 其作用机制可能与抗自由基生成有关。

关键词: 硫化氢(H₂S); 脊髓缺血再灌注损伤; 抗自由基

中图分类号: R964; R971 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)05-0673-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.05.004

Protection of hydrogen sulfide on spinal cord ischemia and reperfusion injury in rabbits and its mechanism

YAN Xu¹, WEI Yan-yun¹, WU Zhi-qiang¹, CAO Dong²

1. Department of Orthopedics, PLA 455th Hospital, Shanghai 200052, China

2. Department of Orthopedics, Shanghai 6th People's Hospital, Shanghai 200233, China

Abstract: Objective To research the protection of hydrogen sulfide (H₂S) on spinal cord ischemia and reperfusion injury in rats.

Methods Male New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups: Sham group, spinal cord ischemia reperfusion injury group, and hydrogen sulfide treatment group. The effect of H₂S on model rabbits was investigated for the neurological behavior, neuron apoptosis, superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT). **Results** H₂S pretreatment improved neurological function score, reduced neuronal apoptosis and enhanced the activity of SOD and CAT ($P < 0.05$). **Conclusion** H₂S produces a protective effect on spinal cord ischemia-reperfusion injury and the mechanism may be related with the generation of anti-free radicals.

Key words: hydrogen sulfide; spinal cord ischemia and reperfusion injury; anti-free radical

脊髓缺血再灌注损伤是脊柱外科、主动脉手术常见并发症。据报道, 并发于脊髓缺血再灌注损伤的术后早期或迟发性瘫痪率高达 21%^[1]; 在高危患者中, 神经损害的发病率更是高达 40%^[2], 这给社会和家庭带来沉重的精神和经济负担。目前临床上尚无特效药物, 损伤早期多应用糖皮质激素(地塞米松、甲基强的松龙等)以减轻炎症反应。近年来有报道一些新药有助于脊椎缺血再灌注损伤后神经功能恢复, 如尼莫地平、强力霉素等, 但疗效均不明确, 临床上没有普遍应用^[3]。硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是一种有臭鸡蛋气味的无色气体, 一

直被认为是导致环境污染的有毒气体。但近年来, 越来越多的证据显示内源性H₂S具有重要的信号传递作用, 在人体内多个系统中都发挥重要的调节作用, 具有多种生物学效应^[4]。本实验旨在探究H₂S预处理对兔脊髓缺血再灌注损伤的保护效应, 为临床上寻找一种有效和容易推广的预防缺血再灌注损伤药物提供数据。

1 材料与仪器

1.1 动物

新西兰大白兔, 雄性, 体质量 1.8~2.3 kg, 由上海市解放军第四五五医院提供, 动物合格证号

收稿日期: 2013-09-05

基金项目: 全军医药卫生科研基金课题(11MA024)

作者简介: 严旭(1977—), 男, 江苏省沭阳县人, 医学硕士, 主治医师, 研究方向为脊柱外科。Tel: 13386277060 E-mail: yanxu479@sohu.com

*通信作者 曹东, 男, 上海第六人民医院骨科博士。Tel: 13386277060 E-mail: zhaoqian0610@163.com

CXK (沪) 2007-0005。

1.2 试剂和仪器

超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 检测试剂盒均由宝生物公司提供; NaHS 从美国 Sigma 公司购买, 批号 095K1534; 全自动酶标仪 (Bio-rad 公司); 原位凋亡细胞 TUNEL (末端转移酶介导的切口末端标记法) 检测试剂盒 (Roche 公司)。

2 方法

2.1 模型的建立

手术方法采用 Zivin 主动脉夹闭法并加以改良^[5]。于左肾动脉下 0.5~1 cm 处以无创动脉夹夹闭主动脉, 缺血 40 min 后松开动脉夹, 造成脊髓缺血再灌注损伤模型。假手术组只开腹, 不夹闭主动脉。待兔完全清醒后, 送回动物房饲养、观察相关指标。

2.2 动物分组

动物随机分为假手术、缺血再灌注和 H₂S 预处理 3 组, 每组 6 只。假手术组仅进行开腹手术而不夹闭主动脉; 缺血再灌注组不进行 H₂S 预处理直接在左肾动脉下 0.5~1 cm 处夹闭主动脉造成脊髓缺血再灌注损伤, ip 适量生理盐水; H₂S 预处理组采

用 H₂S 预处理后进行夹闭主动脉造成脊髓缺血再灌注损伤。H₂S 预处理组动物在造模前 ip 给予不同剂量的 NaHS (10、20、40 μmol/kg)。H₂S 预处理后次日进行脊髓缺血再灌注模型建立。

2.3 效应指标检测

分别在术后 6、12、24、48 h 观察动物的体质量的变化、生存情况; 参照 Tarlov 评分标准对动物的神经功能进行评分^[6]。HE 染色, 同时通过计数完整神经元观察脊髓不同区域对 H₂S 预处理不同程度的反应。TUNEL 染色, 观察细微凋亡情况。超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性测定按照试剂盒说明操作。

2.4 统计学分析

所得数据用 SPSS 13.0 软件分析, 多样本比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 H₂S 预处理对功能评分的影响

使用不同浓度的 H₂S 预处理脊髓缺血再灌注动物模型, 然后对动物后肢运动功能进行 Tarlov 评分, 结果显示 H₂S 预处理组动物的神经功能评分明显高于缺血再灌注组, 并且随着浓度变大, 评分明显升高。见表 1。

表 1 H₂S 预处理对 Tarlov 评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 1 Effect of H₂S pretreatment on Tarlov scores ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(μmol·kg ⁻¹)	Tarlov 评分变化			
		6 h	12 h	24 h	48 h
假手术	—	4.5±1.27	4.8±1.15	4.2±0.9	4.9±1.12
缺血再灌注	—	1.7±0.22 [#]	1.4±0.17 [#]	0.8±0.20 [#]	0.6±0.14 [#]
H ₂ S 预处理	10	2.5±0.17 [*]	2.6±0.87 [*]	2.8±0.78 [*]	3.0±1.20 [*]
	20	3.0±1.31 [*]	3.2±0.87 [*]	3.5±1.08 [*]	3.8±1.24 ^{**}
	40	3.5±1.28 [*]	3.7±0.56 [*]	3.8±1.24 [*]	4.0±0.30 ^{**}

与假手术组比较: [#] $P<0.05$; 与缺血再灌注组相比: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

[#] $P<0.05$ vs Sham group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs ischemia reperfusion group

3.2 H₂S 预处理对神经细胞的影响

HE 染色显示缺血再灌注损伤可以导致正常神经纤维结构破坏, 神经细胞坏死, 中性粒细胞浸润, 而 H₂S 预处理组的病理改变明显减少。TUNEL 染色可见 H₂S 预处理后, 脊髓中 TUNEL 阳性细胞数量减少, 提示神经细胞凋亡减少。见图 1。

3.3 H₂S 预处理对抗氧化酶活性的影响

对 H₂S 预处理神经保护作用的机制进行了初步

研究。结果显示, H₂S 预处理组的 SOD 和 CAT 活性均明显高于缺血再灌注组 ($P<0.05$)。见表 2。

4 讨论

脊髓缺血再灌注损伤带来各种并发症, 给社会和家庭带来沉重的精神和经济负担。大量证据显示, 活性氧的生成及其后与氧自由基有关的氧化应激和细胞损伤是缺血再灌注后出现组织损伤的始动因素^[7]。因此如何有效清除氧自由基, 减轻氧化应激

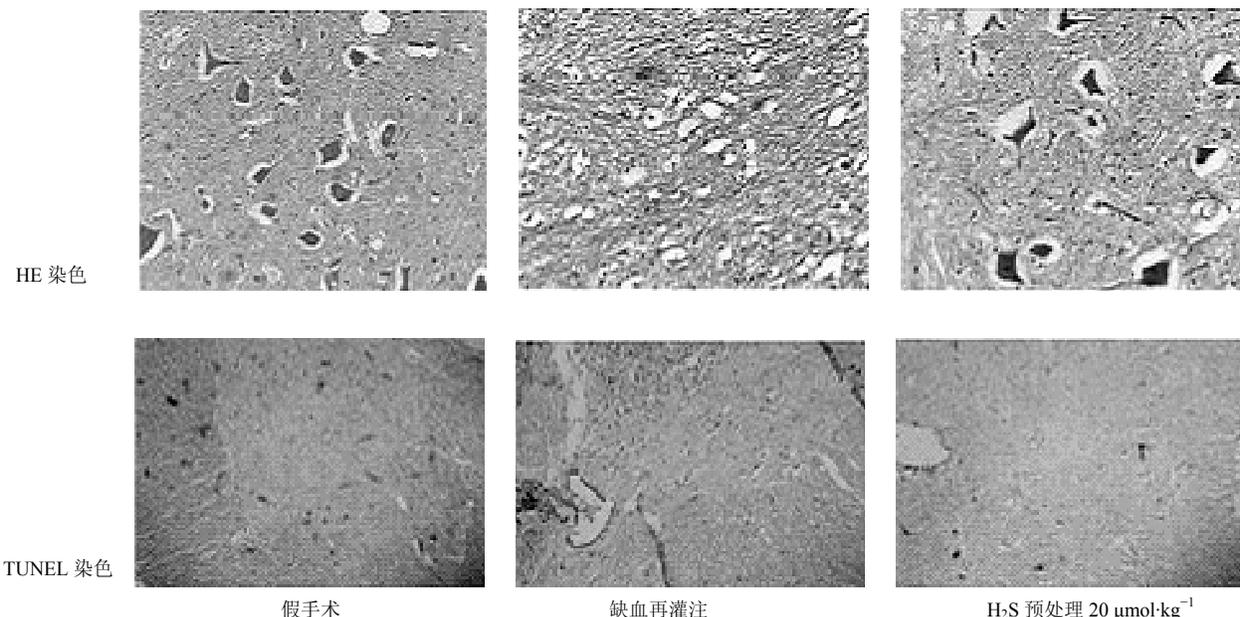


图1 H₂S 预处理对神经细胞的影响

Fig. 1 Protective effect of H₂S pretreatment on nerve cells

表2 H₂S 预处理对抗氧化酶 SOD 和 CAT 活性的影响

Table 2 Effect of H₂S pretreatment on activity of SOD and CAT

组别	剂量/(μmol·kg ⁻¹)	SOD 活性/(U·mg ⁻¹)	CAT 活性/(U·mg ⁻¹)
假手术	—	120 ± 14	12 ± 1.22
缺血再灌注	—	95 ± 22 [#]	8 ± 1.47 [#]
H ₂ S 预处理	10	140 ± 17 [*]	18 ± 1.71 [*]
	20	158 ± 31 [*]	20 ± 2.24 [*]
	40	171 ± 28 [*]	24 ± 3.02 ^{**}

与假手术组比较: [#]P<0.05; 与缺血再灌注组相比: ^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01

[#]P<0.05 vs Sham group; ^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01 vs ischemia reperfusion group

成为了治疗脊髓缺血再灌注损伤的关键环节。在正常生理条件下, 细胞内产生的少量氧自由基可由细胞内的抗氧化酶防御系统清除。但是在缺血再灌注损伤过程中, 许多内源性抗氧化酶的活性都受到抑制, 甚至彻底消失, 这是导致氧自由基在细胞内聚集, 出现氧化应激的一个主要原因^[8]。同时也提示: 提高细胞内抗氧化酶的活性可能减轻组织缺血再灌注损伤。Kimura^[9]发现内源性 H₂S 能刺激神经细胞, 增加细胞内腺苷酸水平, 通过提高受体介导的兴奋性突触后电位来诱导海马的长时程增强; Zhao 等^[10]在体内和体外研究中发现, H₂S 可能通过作用于血管平滑肌 K 通道, 实现对血管的扩张作用。Teague^[11]观察到 H₂S 可以使离体的天竺鼠回肠对电刺激、乙酰胆碱引起的收缩反应明显减弱等。

除了上述作用, 近期研究还发现, H₂S 具有抗

氧化功能, 可以在多种类型的细胞中减轻氧化应激损伤, 改善多种器官(心脏、肝脏、肾脏、皮肤等)的缺血再灌注损伤^[12-15]。不过, 目前对 H₂S 减轻氧化应激的作用机制还有争议, 其机制可能与内源性抗氧化酶系统的活性增强, 降低脂质过氧化, 直接的氧自由基清除作用以及抑制细胞凋亡有关^[16]。

本研究结果表明, H₂S 预处理对兔脊髓缺血再灌注损伤模型有显著的神经保护作用。对 H₂S 预处理产生神经保护作用的机制进行了初步探讨, 发现内源性抗氧化酶, 如 SOD、CAT 等的活性升高以及细胞凋亡被抑制。H₂S 预处理可能影响到核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor-E2 related factor 2, Nrf2) 调节的信号传导通路, 这是我们下一步深入研究的方向。

参考文献

- [1] Bicknell C, Riga C, Wolfe J. Prevention of paraplegia during thoracoabdominal aortic aneurysm repair [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2009, 37(6): 654-660.
- [2] Chevalier Z, Kennedy P, Sherlock O. Spinal cord injury, coping and psychological adjustment: a literature review [J]. *Spinal Cord*, 2009, 47(11): 778-782.
- [3] Kwon B K, Tetzlaff W, Grauer J N, *et al.* Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury [J]. *Spine J*, 2004, 4(4): 451-464.
- [4] Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? [J]. *FASEB J*, 2002, 16(13):1792-1798.
- [5] Zivin J A, DeGirolami U. Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model [J]. *Stroke*, 1980, 11(4): 200-202.
- [6] Chiesa R, Melissano G, Marrocco-Trischitta M M, *et al.* Spinal cord ischemia after elective stent-graft repair of the thoracic aorta [J]. *J Vasc Surg*, 2005, 42(1): 11-17.
- [7] Adibhatla R M, Hatcher J F. Phospholipase A(2), reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies [J]. *BMB Rep*, 2008, 41(8): 560-567.
- [8] Zweier J L, Talukder M A. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 70(2): 181-190.
- [9] Kimura H. Hydrogen sulfide as a neuromodulator [J]. *Mol Neurobiol*, 2002, 26(1): 13-19.
- [10] Zhao W, Zhang J, Lu Y, *et al.* The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener [J]. *EMBO J*, 2001, 20(21): 6008-6016.
- [11] Teague B, Asiedu S, Moore P K. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide *in vitro*: evidence for a physiological role to control intestinal contractility [J]. *Br J Pharmacol*, 2002, 137(2): 139-145.
- [12] Hosgood S A, Nicholson M L. Hydrogen sulphide ameliorates ischaemia-reperfusion injury in an experimental model of non-heart-beating donor kidney transplantation [J]. *Br J Surg*, 2010, 97(2):202-209.
- [13] Kang K, Zhao M, Jiang H, *et al.* Role of hydrogen sulfide in hepatic ischemia-reperfusion-induced injury in rats [J]. *Liver Transpl*, 2009, 15(10): 1306-1314.
- [14] Calvert JW, Jha S, Gundewar S, *et al.* Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling [J]. *Circ Res*, 2009, 105(4): 365-374.
- [15] Henderson P W, Singh S P, Belkin D, *et al.* Hydrogen sulfide protects against ischemia-reperfusion injury in an *in vitro* model of cutaneous tissue transplantation [J]. *J Surg Res*, 2010, 159(1): 451-455.
- [16] Nakao A, Sugimoto R, Billiar T R, *et al.* Therapeutic antioxidant medical gas [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2009, 44(1): 1-13.