

他莫昔芬对急性脊髓损伤模型大鼠的神经保护

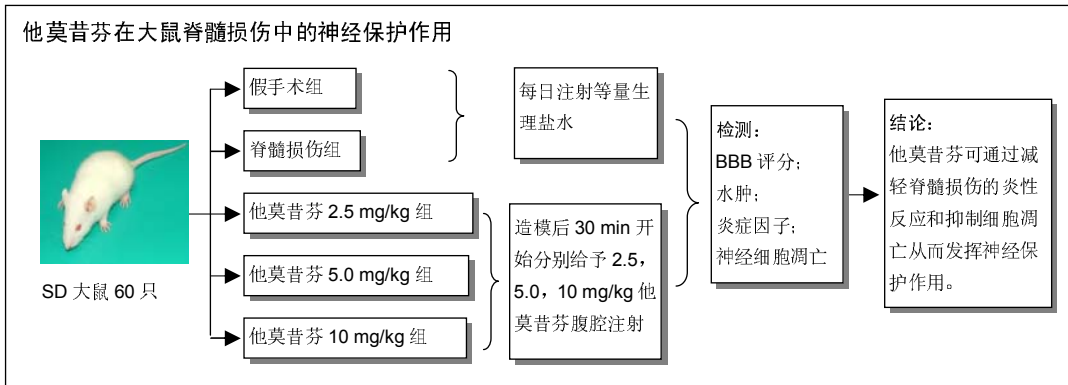
黄卫(三峡大学仁和医院, 湖北省宜昌市 443001)

引用本文: 黄卫. 他莫昔芬对急性脊髓损伤模型大鼠的神经保护[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(51):7710-7716.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.51.017

ORCID: 0000-0001-5994-3693(黄卫)

文章快速阅读:



黄卫, 男, 1977 年生, 湖北省枝江市人, 汉族, 2009 年华中科技大学同济医学院毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事脊柱外科的研究。

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2016)51-07710-07

稿件接受: 2016-11-08

文题释义:

Allen's 法建立脊髓损伤模型: 以一定力量撞击脊髓后造成脊髓水肿、缺血, 并继发一系列损伤反应致脊髓损伤的典型表现, 这种模型比较接近人类脊髓损伤的病理生理特点及变化规律。该法保持了硬脊膜完整, 可有效防止外源性成分侵入脊髓损伤区域, 并防止脊髓外露与脑脊液外漏。这种模型较接近人类脊髓损伤的病理生理特点及变化规律, 对研究脊髓损伤后神经元、神经胶质细胞的病理变化、再生规律和相互作用、探索神经保护策略等有较大帮助。

他莫昔芬: 用于治疗晚期乳腺癌和卵巢癌。临床治疗乳腺癌有效率一般在 30% 作用, 雌激素受体阳性患者疗效较好(49%), 阴性患者疗效差(7%)。绝经前和绝经后患者均可使用, 而绝经后和 60 岁以上的人较绝经前和年轻患者的效果为好。从病灶部位来看, 皮肤、淋巴结和软组织的疗效好, 骨和内脏转移的效果差。

摘要

背景: 研究表明, 他莫昔芬能通过减轻脑出血及脊髓损伤部位周围水肿情况, 从而发挥神经保护作用。

目的: 分析他莫昔芬在大鼠脊髓损伤中的神经保护作用及相关机制。

方法: SD 大鼠 60 只分为 5 组, 每组 12 只。除假手术组外, 均采用 Allen 法(70 g·cm)建立 SD 大鼠 T₁₀ 脊髓损伤模型。他莫昔芬 2.5, 5.0, 10 mg/kg 组, 造模后 30 min 开始分别给予 2.5, 5.0, 10 mg/kg 他莫昔芬腹腔注射, 注射 1 次/d, 假手术组和脊髓损伤组每日注射等量生理盐水。术后 24, 48, 72 h 进行神经功能评分(BBB 评分), 72 h 取出损伤脊髓检测损伤脊髓水肿情况; 利用 ELISA 法检测 72 h 后炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 活性, 以及凋亡蛋白 Caspase-3 活性; Western-blot 法检测核因子 κ B p65、磷酸化核因子 κ B 抑制因子 α 以及凋亡蛋白 Caspase-3 的表达量。

结果与结论: ①与脊髓损伤组相比, 他莫昔芬组大鼠后肢能够明显改善; ②72 h 后他莫昔芬可显著降低脊髓损伤的水含量, 抑制脊髓水肿; ③ELISA 结果显示他莫昔芬能显著降低脊髓损伤中炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 活性($P < 0.05$); ④Western-blot 结果显示他莫昔芬能显著抑制核因子 κ B p65、磷酸化核因子 κ B 抑制因子 α 蛋白以及凋亡蛋白 Caspase-3 的表达。⑤结果表明: 他莫昔芬可通过减轻脊髓损伤的炎症反应和抑制细胞凋亡从而发挥神经保护作用。

关键词:

组织构建; 组织工程; 他莫昔芬; 脊髓损伤; 炎症反应; 细胞凋亡

主题词:

脊髓损伤; 细胞因子类; 细胞凋亡; 组织工程

Huang Wei, Master,
Associate chief physician,
Renhe Hospital of China
Three Gorges University,
Yichang 443001, Hubei
Province, China

Neuroprotective effect of tamoxifen in a model rat with acute spinal cord injury

Huang Wei (Renhe Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443001, Hubei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Tamoxifen has been found to exert neuroprotection by reducing cerebral hemorrhage and edema surrounding the injured site of the spinal cord.

OBJECTIVE: To investigate the neuroprotective effect of tamoxifen on rat acute spinal cord injury and the underlying mechanism.

METHODS: Sixty Sprague-Dawley rats were equivalently randomized into five groups, and modeled into spinal cord injury at T₁₀ level using modified Allen's weight-drop method (70 g/cm), except those in sham operation group. At 30 minutes after modeling, all rats were given the intraperitoneal injection of 2.5, 5.0 and 10 mg/kg tamoxifen or same amount of normal saline, once daily. Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scores were recorded at 24, 48 and 72 hours after surgery. The injured spinal cord was removed at 72 hours to observe its edema. Meanwhile, the levels of interleukin-1 β , interleukin-10 and tumor necrosis factor- α , as well as Caspase-3 activity were detected by ELISA; the protein levels of nuclear factor- κ B p65, phosphorylated I- κ B α and Caspase-3 were detected by western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the model group, the hind limb function in the tamoxifen groups was significantly improved. Tamoxifen significantly decreased the water content in the rat spinal cord and inhibited spinal cord edema at 72 hours after surgery. ELISA results showed that tamoxifen significantly reduced the activity of interleukin-1 β , interleukin-10, tumor necrosis factor- α and Caspase-3 ($P < 0.05$). Western blot assay revealed that tamoxifen significantly downregulated the expression levels of nuclear factor- κ B p65, phosphorylated I- κ B α and Caspase-3. These results suggest that tamoxifen protects against spinal cord injury via suppressing inflammatory response and apoptosis-associated proteins.

Subject headings: Spinal Cord Injuries; Cytokines; Apoptosis; Tissue Engineering

Cite this article: Huang W. Neuroprotective effect of tamoxifen in a model rat with acute spinal cord injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(51):7710-7716.

0 引言 Introduction

进入信息时代以来,脊髓损伤发病率呈现逐年升高走势,常见于交通事故、坠落伤、暴力性损伤以及运动性损伤。脊髓损伤包括原发性和继发性脊髓损伤。继发性损伤导致组织出血、水肿、细胞凋亡,免疫炎症等级联反应进一步扩大,其中炎症反应在脊髓损伤中扮演了重要角色^[1]。脊髓损伤是脊柱损伤最严重的并发症,常导致损伤平面以下肢体严重功能障碍,甚至会导致下肢瘫痪。因此,如何减轻脊髓损伤后水肿及炎症反应,促进受损部位的结构重建和功能恢复是现代骨科学研究的重点和难点。目前脊髓损伤的治疗和康复已成为医学上的一大难题^[2]。

他莫昔芬是一种雌激素受体抑制剂,广泛应用于临床。其具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等广泛的药理学作用。研究表明,他莫昔芬能通过减轻脑出血及脊髓损伤部位周围水肿情况,从而发挥神经保护作用^[3-4]。而在脊髓损伤模型中,他莫昔芬能通过抑制炎症反应和神经细胞的凋亡从而有效抑制脊髓损伤的程度,促进神经功能的恢复,从而抑制脊髓损伤的进展。

炎症反应的发生和发展对脊髓损伤后的神经损伤起到至关重要的作用,炎症因子在脊髓损伤早期即可表

达,并导致相应炎症细胞的侵入,进而加重对脊髓损伤部位的损害。研究表明,他莫昔芬能通过抑制脊髓损伤中受损脊髓组织中髓过氧化物(MPO)活性的抑制从而发挥神经保护作用^[5]。但他莫昔芬在脊髓损伤模型中具体的抗炎机制,以及其治疗脊髓损伤方法仍鲜有报道。细胞凋亡亦是脊髓损伤继发性损伤对神经细胞毒性作用的一种重要的生理病理过程^[6-7],文献报道,在大鼠脊髓损伤模型中可发现大量凋亡的神经细胞,凋亡所致的轴突变性及白质纤维脱髓鞘最终引发神经细胞功能受损^[8-9]。而Caspase-3蛋白酶是Caspase家族中一种重要的凋亡蛋白,控制着凋亡的启动,被称为凋亡的“始动因子”^[10-11]。因此,Caspase-3蛋白酶活性从某种程度上可说明脊髓损伤神经细胞凋亡的情况。前期表明,他莫昔芬可通过抑制脊髓损伤中大鼠核因子kappa B抑制蛋白激酶复合体/核因子kappa B(IKK/NF- κ B)通路从而发挥其抑制细胞凋亡的作用^[5]。而他莫昔芬是否能通过抑制Caspase-3的表达发挥抗凋亡作用目前仍鲜有报道。

实验主要通过Allen法建立大鼠脊髓损伤模型,并通过对损伤脊髓水肿情况观测、Ellisa法检测损伤脊髓炎症因子肿瘤坏死因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 、白细胞介素6活性,Ellisa法和Western blot法检测凋亡

因子caspase-3的变化, 研究他莫昔芬对脊髓损伤的保护作用。课题创新性地将组织水肿以及炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素6与损伤脊髓联系起来, 深入探讨了他莫昔芬的神经保护机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 造模动物及材料 雄性SD大鼠60只, 体质量200–250 g, 由三峡大学实验动物中心提供。他莫昔芬(Sigma公司, 美国), 大鼠肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素6、Caspase-3 Elisa试剂盒(南京建成), 抗大鼠NF- κ B p65、pI- κ B α 、Caspase-3单克隆抗体, DAB显色试剂盒(Santa Cruz公司, 美国)。

1.2 脊髓损伤模型的建立与给药 参照文献[2]的方法, 大鼠麻醉后, T₉–T₁₁椎板切除, 暴露T₁₀脊髓, 采用Allen法将10 g打击锤固定在7 cm高度, 松开打击锤, 致伤量为70 g·cm, 动物出现摆尾反射, 双后肢迟缓性痉挛, 诱发脊髓损伤。假手术组只做T₉–T₁₁椎板切除, 但不制作脊髓损伤模型。

1.3 造模成功检测标准 在Allen装置撞击脊髓时, 大鼠身体抖动, 双下肢迅速回缩及弹动, 尾巴发生翘起并迅速倒下, 其打击局部脊髓表面迅速瘀血。急性脊髓损伤后, 大鼠会出现暂时性自主排尿功能丧失^[12]。

1.4 实验分组 60只大鼠随机分为5组: 假手术组、脊髓损伤组、他莫昔芬组2.5 mg/kg组、他莫昔芬组5.0 mg/kg组、他莫昔芬组10 mg/kg组, 每组12只, 他莫昔芬造模后30 min开始分别给予2.5, 5.0, 10 mg/kg他莫昔芬腹腔注射, 1次/d, 假手术组和脊髓损伤组每日注射等量生理盐水, 造模后单笼饲养, 防止感染。

1.5 后肢运动功能评分(BBB评分) 利用BBB评分法对大鼠脊髓损伤后24, 48, 72 h内后肢功能进行评估, 根据文献[13]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。评分者熟知BBB评分标准, 每只大鼠评定4次。

1.6 损伤脊髓中水含量的测定 72 h后各组大鼠经麻醉后取出损伤脊髓($n=12$), 约10 mm, 迅速称质量, 随后将取出的脊髓放入80 °C烘箱中放置72 h后再次称质量。水分含量可反映脊髓水肿情况。

损伤脊髓水含量= $[(\text{湿质量}-\text{干质量})/\text{湿质量}]\times 100\%$ 。

1.7 Elisa测定脊髓组织肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素6、Caspase-3活性 72 h后将各组脊髓组织取出($n=12$), 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, 450nm波长酶标仪进行检测, 计算肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素6、Caspase-3浓度。

1.8 Western-blot法检测NF- κ B p65、pI- κ B α 及Caspase-3蛋白表达 24 h后将各组脊髓组织取出($n=12$), 充分研磨, 3 mL/g蛋白裂解液充分裂解后, $1\times 10^4\times$ g离心40 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1:5 000孵育3 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。

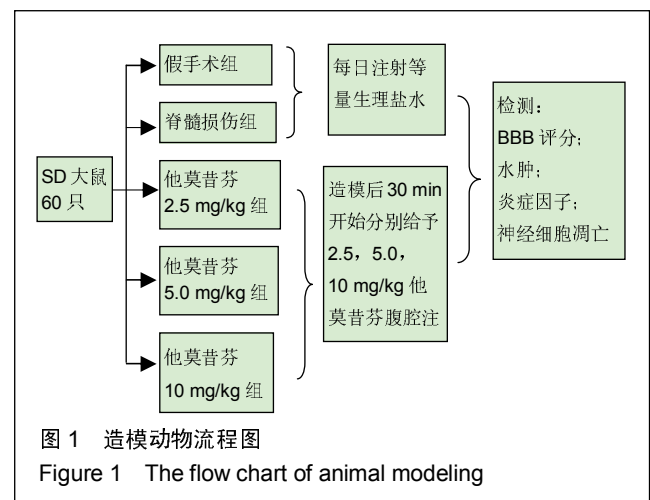
相对灰度值= $[\text{所测蛋白灰度值}/\text{内参GAPDH灰度值}]\times 100\%$ 。

1.9 主要观察指标 ①他莫昔芬对大鼠后肢运动功能的影响; ②他莫昔芬对脊髓损伤水肿的影响; ③他莫昔芬对脊髓损伤中炎症因子的影响; ④他莫昔芬对脊髓损伤中神经细胞凋亡的影响。

1.10 统计学分析 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 并用SPSS 18.0软件配对组间单因素方差分析或 t 检验进行分析。选取有效值为 $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 造模成功动物数量及过程 实验选用大鼠60只, 分为5组, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。造模动物流程图见图1。



2.2 模型更接近人类 Allen在1911年创造了垂直打击脊髓用于建立脊髓损伤模型的方法。由于此法很接近于人类脊髓损伤发生过程, 临床相关性好。模型的特点是: 模拟人类脊髓受损的过程, 临床相似度高; 可以人为调整致伤的部位和范围。硬膜具有完整性, 保证无外源性成分侵入, 防止脑脊液外漏。可以说此模型是当前与临

床脊髓损伤相关性最好的造模方式^[14]。

2.3 他莫昔芬对大鼠后肢运动功能的影响 见表1。与假手术组比较,脊髓损伤组大鼠下肢运动功能明显下降,评分降低。然而,经他莫昔芬2.5, 5.0, 10 mg/kg治疗后,下肢运动功能得到明显提升,且随着治疗时间的延长,药物浓度的加大,评分升高,呈现剂量-时间依赖关系。提示他莫昔芬可有效提高脊髓损伤大鼠下肢运动功能。

表1 各组大鼠 BBB 评分 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 1 Basso, Beattie, Bresnahan scores of rats in each group

组别	24 h	48 h	72 h
假手术组	16.41±1.36	18.58±1.41	19.37±1.67
脊髓损伤组	3.97±0.69 ^a	3.25±0.81 ^a	3.03±0.74 ^a
他莫昔芬 2.5 mg/kg 组	6.24±0.79 ^b	7.36±0.62 ^b	8.98±0.93 ^b
他莫昔芬 5 mg/kg 组	9.13±0.89 ^b	9.97±0.99 ^b	10.25±1.05 ^b
他莫昔芬 10 mg/kg 组	11.07±1.12 ^b	12.56±1.09 ^b	14.95±1.21 ^b

表注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与脊髓损伤组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.4 他莫昔芬对脊髓损伤水肿的影响 见图2,与假手术组相比,脊髓损伤后72 h后明显水肿,含水量明显增加($P < 0.05$),经过他莫昔芬2.5, 5.0, 10 mg/kg治疗后,损伤脊髓节段含水量得到抑制,与脊髓损伤组相比,差异有显著性意义($P < 0.05$),损伤脊髓水肿情况好转。提示他莫昔芬可抑制脊髓损伤的水肿情况,缓解脊髓损伤的继发性损害。

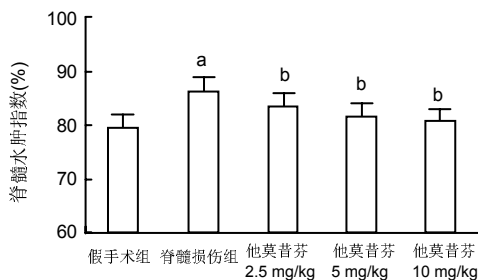


图2 他莫昔芬对脊髓损伤水肿的影响($n=12$, $\bar{x} \pm s$)

Figure 2 Effect of tamoxifen on edema following spinal cord injury

图注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与脊髓损伤组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.5 他莫昔芬对脊髓损伤中炎症因子的影响 术后72 h,损伤脊髓中炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素6活性明显提高($P < 0.05$),而经过他莫昔芬2.5, 5.0, 10 mg/kg治疗后,损伤脊髓中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素6活性得到抑制,与假手术组相比差异有显著性意义($P < 0.05$),他莫昔

芬对肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素6活性抑制作用呈剂量依赖关系,见图3A。从Western-blot法检测可知,核因子 κB p65、pI- $\kappa B\alpha$ 的蛋白表达在脊髓损伤后条带明显加深,通过灰度值软件分析,核因子 κB p65、pI- $\kappa B\alpha$ 的蛋白相对表达得到明显提高($P < 0.05$),经过他莫昔芬2.5, 5.0, 10 mg/kg治疗后,核因子 κB p65、pI- $\kappa B\alpha$ 的蛋白条带逐渐变浅,蛋白相对表达得到明显抑制($P < 0.05$),并呈剂量依赖关系,见图3B。可知他莫昔芬可明显抑制脊髓损伤中的炎症因子的表达,从而发挥神经保护作用。

2.6 他莫昔芬对脊髓损伤中神经细胞凋亡的影响 术后72 h,与假手术组相比,Caspase-3活性在脊髓损伤模型中得到明显提高($P < 0.05$),而经过他莫昔芬2.5, 5.0, 10 mg/kg可明显抑制损伤脊髓中Caspase-3蛋白酶活性($P < 0.05$),见图4A。Western-blot法检测结果显示,术后72 h,与假手术组相比,Caspase-3条带灰度加深,提示脊髓损伤后Caspase-3表达量增加,而经过他莫昔芬2.5, 5.0, 10 mg/kg治疗后Caspase-3条带灰度逐渐变浅,蛋白相对表达逐渐下降($P < 0.05$),见图4B。可知他莫昔芬可抑制脊髓损伤中凋亡蛋白的表达,抑制神经细胞凋亡从而发挥神经保护作用。

3 讨论 Discussion

他莫昔芬属非类固醇的雌激素受体调节剂的一种,主要用于治疗乳腺癌等疾病。近年来研究发现,他莫昔芬在短暂性或永久性脑缺血性卒中都起着重要的神经保护作用^[15-17]。

治疗脊髓损伤目前仍是医学上的难题,脊髓损伤病理机制主要是由损伤后水肿的发展,激发一系列分子和细胞机制,进而引发炎症反应等,最终引起细胞的凋亡和坏死^[18-20]。椎管内脊髓水肿的发生会加重神经的压迫,导致脊髓神经的缺血、缺氧,甚至引起神经细胞的变性和坏死。研究报道,他莫昔芬在对大鼠蛛网膜下腔出血后早期能有效抑制脑水肿的发生,降低颅内压,从而发挥神经保护作用^[21]。实验通过Allen法构建大鼠脊髓损伤模型,发现脊髓损伤大鼠脊髓含水量明显提高,而经腹腔注射他莫昔芬后,含水量得到抑制,水肿情况明显好转。说明他莫昔芬在脊髓损伤早期亦能通过抑制脊髓水肿发挥神经保护作用。

脊髓损伤早期损伤脊髓会伴有炎症递质的生成和释放、促进和引导炎症细胞在损伤脊髓组织中浸润和聚集、进一步分泌炎症因子及黏附因子,引发炎症反应的

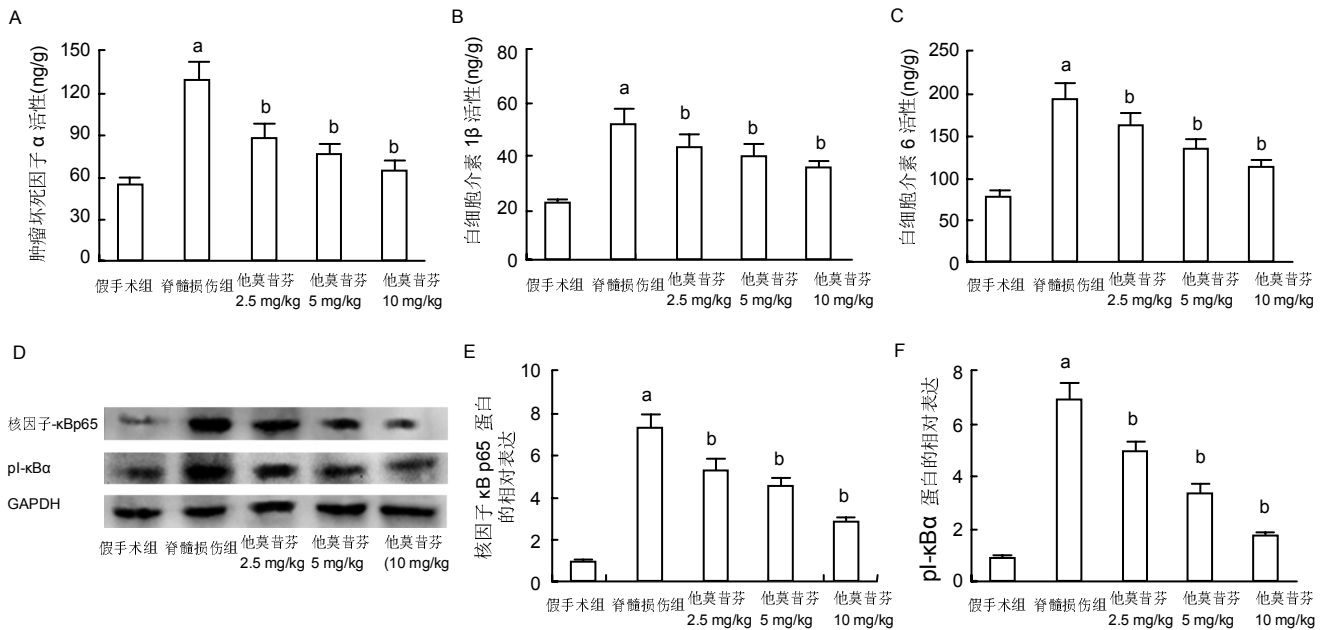


图 3 他莫昔芬对脊髓损伤后炎症因子的影响(n=12)

Figure 3 Effects of tamoxifen on the inflammatory factors following spinal cord injury

图注: 图 A, B, C 分别为肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 1β、白细胞介素 6 表达; D, E, F 为核因子 κB p65、pI-κBα 的蛋白表达。与假手术组比较, ^aP < 0.05; 与脊髓损伤组比较, ^bP < 0.05。

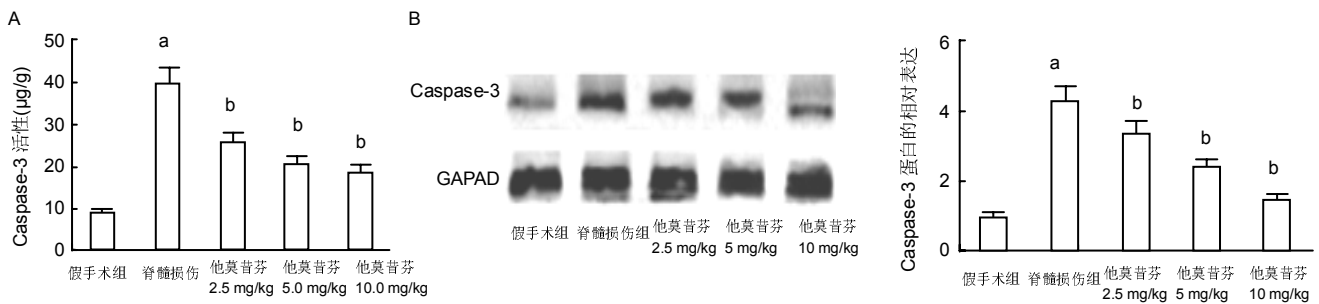


图 4 他莫昔芬对脊髓损伤后凋亡蛋白 Caspase-3 的影响(n=12)

Figure 4 Effects of tamoxifen on Caspase-3 following spinal cord injury

图注: 图 A 显示脊髓损伤组 Caspase-3 活性显著提高, 他莫昔芬 2.5, 5.0, 10 mg/kg 组治疗 Caspase-3 蛋白酶活性显著降低; B 显示脊髓损伤后 Caspase-3 表达量增加, 他莫昔芬 2.5, 5.0, 10 mg/kg 治疗后蛋白相对表达逐渐下降。^aP < 0.05; 与脊髓损伤组比较, ^bP < 0.05。

级联放大, 从而加重脊髓的继发性损伤^[22-24]。此外, 脊髓损伤损伤区域可产生大量的炎症因子, 如肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 1β、白细胞介素 6 等^[25-28]。肿瘤坏死因子 α 被称为炎症反应的“始动因子”, 可引发和促进其他炎症因子的表达, 不仅如此, 肿瘤坏死因子 α 还具有神经毒性作用, 研究报道, 中枢神经系统损伤后利用细胞因子或抗体抑制肿瘤坏死因子 α, 可促进神经功能恢复的功效^[29]。被肿瘤坏死因子 α 始动的各种炎症因子之间也存在相互协同、相互诱导的作用, 表现出“正反馈”效应^[30]。他莫昔芬作为非类固醇的雌激素受体调节剂, 可抑制炎症因子的产生和发展^[21]。实验经过 Allen 法脊髓损伤造模后发现, 与假手术组相比, 在脊髓损伤

模型炎症因子肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 1β、白细胞介素 6 得到大量表达(P < 0.05), 而他莫昔芬可明显抑制这些炎症因子的表达(P < 0.05), 并呈现剂量依赖关系。下调炎症反应进程从而发挥神经保护作用。

核因子 κB 家族是调控炎症反应的重要环节, 作为早期转录因子, 核因子 κB 可在第一时间对有害细胞的刺激做出反应, 参与炎症反应很多炎症因子受核因子 κB 的调控, 包括本实验研究的肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 1β、白细胞介素 6 等等。此外, 核因子 κB 也可以被炎症因子、生长因子或趋化因子等激活。常见的炎症因子, 如白细胞介素 1β 和肿瘤坏死因子 α 等, 都能激活转录因子核因子 κB。核因子 κB p65、pI-κBα 是

IKK/NF- κ B 通路中二种重要的蛋白质, 被炎症因子激活的核因子 κ B 可通过 IKK/NF- κ B 通路加重脊髓损伤的病理过程^[31]。现已发现多种药物通过影响 IKK/NF- κ B 通路从而发挥神经保护作用^[32-33]。实验通过研究发现, 脊髓损伤组中核因子 κ B p65、 $\text{pI-}\kappa\text{B}\alpha$ 蛋白表达较假手术组得到明显提高($P < 0.05$), 从而活化 IKK/NF- κ B 通路, 加重了对脊髓的损伤, 当加入他莫昔芬治疗后, 核因子 κ B p65、 $\text{pI-}\kappa\text{B}\alpha$ 蛋白表达得到有效抑制($P < 0.05$), 证实了文献报道^[34]。他莫昔芬可通过抑制 IKK/NF- κ B 通路, 从而发挥神经保护作用。

细胞凋亡是在脊髓损伤中对神经细胞的损害发挥关键作用^[6-7], 研究表明, 在脊髓损伤模型中可发现大量凋亡的神经细胞, 凋亡所致的轴突变性及白质纤维脱髓鞘最终引发神经细胞功能受损^[8-9]。Caspase-3 蛋白酶是 Caspase 家族中一种重要的凋亡蛋白, 控制着凋亡的启动, 被称为凋亡的“分子开关”^[10-11]。因此 Caspase-3 蛋白活性和其蛋白表达从某种程度上可反映脊髓损伤部位的细胞凋亡情况。实验通过研究发现, 与假手术组相比, 脊髓损伤后 Caspase-3 蛋白活性和其蛋白表达明显提高($P < 0.05$), 而他莫昔芬可明显抑制 Caspase-3 的蛋白活性以及下调 Caspase-3 的蛋白表达($P < 0.05$), 并呈剂量依赖关系, 从而发挥抗凋亡的作用。

综上, 他莫昔芬早期可抑制脊髓损伤早期发生的脊髓水肿情况, 并通过 IKK/NF- κ B 通路抑制炎症反应, 抑制 Caspase-3 的蛋白活性以及下调 Caspase-3 的蛋白表达, 从而发挥神经保护的作用。

作者贡献: 实验设计、实施、评估均为本文作者。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容无相关利益冲突。

伦理问题: 实验动物在戊巴妥钠麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 黄卫对于研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Hausmann ON. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2003;41(7):369-378.
- [2] Tettenborn B, Hägele-Link S. *Spinal Cord Disorders*. *Eur Neurol*. 2015;74(3-4):141-146.
- [3] Kimelberg HK, Feustel PJ, Jin Y, et al. Acute treatment with tamoxifen reduces ischemic damage following middle cerebral artery occlusion. *Neuroreport*. 2000;11(12):2675-2679.
- [4] Kimelberg HK, Jin Y, Charniga C, et al. Neuroprotective activity of tamoxifen in permanent focal ischemia. *J Neurosurg*. 2003;99(1):138-142.
- [5] 韦斌宇, 梁立. 他莫昔芬对大鼠脊髓损伤后炎症反应及细胞凋亡的影响[J]. *中国医药导报*, 2014, 11(34):23-26.
- [6] Lan WB, Lin JH, Chen XW, et al. Overexpressing neuroglobin improves functional recovery by inhibiting neuronal apoptosis after spinal cord injury. *Brain Res*. 2014;1562:100-108.
- [7] Seo JY, Kim YH, Kim JW, et al. Effects of therapeutic hypothermia on apoptosis and autophagy after spinal cord injury in rats. *Spine*. 2015;40(12):883-890.
- [8] Hagg T, Oudega M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2006;23(3-4):264-280.
- [9] Jiang S, Bendjelloul F, Ballerini P, et al. Guanosine reduces apoptosis and inflammation associated with restoration of function in rats with acute spinal cord injury. *Purinergic Signal*. 2007;3(4):411-421.
- [10] Choudhary GS, Al-Harbi S, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol*. 2015;1219:1-9.
- [11] Zhao J, Wang J, Wu J. Roles of cytochrome c, caspase-9, and caspase-3 in pentavalent vanadium-induced neuronal apoptosis. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*. 2014;32(9):664-667.
- [12] Ravikumar R, Fugaccia I, Scheff SW, et al. Nicotine attenuates morphological deficits in a contusion model of spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2005;22(2):240-251.
- [13] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. *J Neurotrauma*. 1996;13(7):343-359.

- [14] 熊春翔,宗少晖,曾高峰,等.大鼠Allen's脊髓损伤模型的建立及评价[J].广西医科大学学报,2011,28(2):215-217.
- [15] Osuka K,Feustel PJ,Mongin AA,et al.Tamoxifen inhibits nitrotyrosine formation after reversible middle cerebral artery occlusion in the rat.J Neurochem. 2001; 76(6):1842-1850.
- [16] Suuronen T,Nuutinen T, Huuskonen J,et al. Anti-inflammatory effect of selective estrogen receptor modulators (SERMs) in microglial cells.Inflamm Res. 2005;54(5):194-203.
- [17] Salgado IK,Torrado AI,Santiago JM,et al.Tamoxifen and Src kinase inhibitors as neuroprotective/neuroregenerative drugs after spinal cord injury.Neural Regen Res.2015;10(3):385-390.
- [18] Yang T,Wu L,Wang H,et al.Inflammation level after decompression surgery for a rat model of chronic severe spinal cord compression and effects on ischemia-reperfusion injury.Neurol Med Chir.2015; 55(7):578-586.
- [19] Zhang N,Fang MR,Chen HH,et al.Evaluation of spinal cord injury animal models. Neural Regen Res. 2014;9 (22): 2008-2012.
- [20] Zhang Z,Zhang YP,Shields LB,et al.Technical comments on rodent spinal cord injuries models. Neural Regen Res. 2014;9 (5): 453-455.
- [21] Sun X, Ji C, Hu T, et al. Tamoxifen as an effective neuroprotectant against early brain injury and learning deficits induced by subarachnoid hemorrhage: possible involvement of inflammatory signaling. J Neuroinflammation. 2013;10:157.
- [22] Campagnolo DI, Bartlett JA, Keller SE. Influence of neurological level on immune function following spinal cord injury: a review. J Spinal Cord Med. 2000; 23(2): 121-128.
- [23] Cao XJ, Feng SQ, Fu CF, et al. Repair, protection and regeneration of spinal cord injury. Neural Regen Res. 2015;10(12): 1953-1975.
- [24] Xie JB, Zhang X, Li QH, et al. Inhibition of inflammatory cytokines after early decompression may mediate recovery of neurological function in rats with spinal cord injury. Neural Regen Res. 2015;10(2): 219-224.
- [25] Duo Z, He XJ. Advances in mechanisms of treatment for spinal cord injury with lithium. Zhongguo Gu Shang. 2015;28(7):679-682.
- [26] Cooney SJ, Zhao Y, Byrnes KR. Characterization of the expression and inflammatory activity of NADPH oxidase after spinal cord injury. Free Radic Res. 2014; 48(8):929-939.
- [27] Khayrullina G, Bermudez S, Byrnes KR. Inhibition of NOX2 reduces locomotor impairment, inflammation, and oxidative stress after spinal cord injury. J Neuroinflammation. 2015;12(1):172.
- [28] Kesani AK, Urquhart JC, Bedard N, et al. Systemic inflammatory response syndrome in patients with spinal cord injury: does its presence at admission affect patient outcomes? Clinical article. J Neurosurg Spine. 2014;21(2):296-302.
- [29] Rathore KI, Redensek A, David S. Iron homeostasis in astrocytes and microglia is differentially regulated by TNF- α and TNF- β 1. Glia. 2012;60(5):738-750.
- [30] Jaworska A, Jamieson LE, Malek K, et al. SERS-based monitoring of the intracellular pH in endothelial cells: the influence of the extracellular environment and tumour necrosis factor- α . Analyst. 2015;140(7):2321-9.
- [31] Lu M, Wang S, Han X, et al. Butein inhibits NF- κ B activation and reduces infiltration of inflammatory cells and apoptosis after spinal cord injury in rats. Neurosci Lett. 2013;542:87-91.
- [32] Han X, Lu M, Wang S, et al. Targeting IKK/NF- κ B pathway reduces infiltration of inflammatory cells and apoptosis after spinal cord injury in rats. Neurosci Lett. 2012;511(1):28-32.
- [33] Henn IH, Bouman L, Schlehe JS, et al. Parkin mediates neuroprotection through activation of I κ B kinase/nuclear factor- κ B signaling. J Neurosci. 2007;27(8):1868-1878.
- [34] Wei HY, Ma X. Tamoxifen reduces infiltration of inflammatory cells, apoptosis and inhibits IKK/NF- κ B pathway after spinal cord injury in rats. Neurol Sci. 2014; 35(11):1763-1768.