

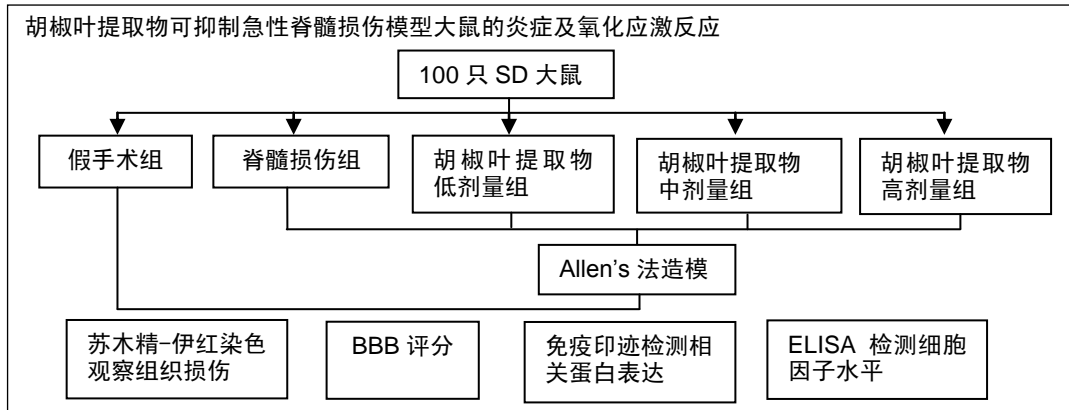
胡椒叶提取物干预可减轻急性脊髓损伤模型大鼠的氧化应激及炎症反应

成建平, 李 华, 李雄杰(海南西部中心医院骨科, 海南省儋州市 571700)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1488

ORCID: 0000-0001-7821-1519(成建平)

文章快速阅读:



成建平, 男, 1972 年生, 甘肃省秦安县人, 汉族, 副主任医师, 主要从事关节、创伤研究。

文献标识码: B

稿件接受: 2019-04-09



文题释义:

氧化应激: 是指体内氧化与抗氧化作用失衡, 倾向于氧化, 导致中性粒细胞炎性浸润, 蛋白酶分泌增加, 产生大量氧化中间产物。氧化应激是由自由基在体内产生的一种负面作用, 并被认为是导致衰老和疾病的一个重要因素。

胡椒叶提取物: 胡椒是胡椒科的一种开花藤本植物, 具有广谱抑菌性, 据报道, 胡椒叶的丙酮提取物对薯蓣炭炭菌菌丝生长的抑制率可达 83.64%; 胡椒提取物对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、酵母菌和黑曲霉均具有抑制作用; 胡椒的乙醇提取物对来自口腔中的 12 种不同属的 176 个细菌菌株也具有较强的抑制作用。

摘要

背景: 研究表明胡椒叶提取物对链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠有明显的保护作用, 作用机制与抗氧化损伤有关, 但其是否能通过抗氧化应激减轻急性脊髓损伤还未见报道。

目的: 探究胡椒叶提取物对急性脊髓损伤大鼠氧化应激、炎症反应及神经损伤的影响。

方法: 将 100 只 SD 大鼠(购自成都达硕实验动物公司)随机分为假手术组、脊髓损伤组及胡椒叶提取物低、中、高剂量组, 每组 20 只。除假手术组外, 其余组大鼠采用改良 Allen's 法复制大鼠急性脊髓损伤模型, 造模后, 胡椒叶提取物低、中、高剂量组灌胃给予 100, 200, 400 mg/(kg·d)的胡椒叶提取物, 连续给药 28 d。给药后 3, 7, 14, 28 d 后进行 BBB 评分和斜板实验; 给药后 28 d, 检测血清超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、丙二醛、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 水平, 免疫印迹检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3、脑源性神经营养因子和神经/胶质细胞抗原、I κ B α 、p-I κ B α 和 NF- κ B p65 蛋白表达, 同时进行脊髓组织苏木精-伊红染色与 TUNEL 染色。实验方案经海南大学热带农林学院实验动物伦理委员会批准(NR001803)。

结果与结论: ①与假手术组比较, 脊髓损伤组给药后不同时间点的 BBB 评分和斜板实验最大倾斜角度降低 ($P < 0.01$); 与脊髓损伤组比较, 胡椒叶提取物中、高剂量组给药后 7, 14, 28 d 的 BBB 评分和斜板实验最大倾斜角度升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); ②与假手术组比较, 脊髓损伤组脊髓组织损伤严重, 细胞凋亡率、Bax、Caspase-3、丙二醛、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 、p-I κ B α 、NF- κ B p65、脑源性神经营养因子和神经/胶质细胞抗原表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Bcl-2、I κ B α 、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与脊髓损伤组比较, 胡椒叶提取物低、中、高剂量组脊髓组织损伤减轻, 细胞凋亡率、Bax、Caspase-3、丙二醛、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 、p-I κ B α 、NF- κ B p65、脑源性神经营养因子和神经/胶质细胞抗原表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Bcl-2、I κ B α 、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); ③结果表明, 胡椒叶提取物可通过抑制急性脊髓损伤大鼠炎症反应及氧化应激减轻脊髓损伤并发挥神经保护作用, 作用机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路激活有关。

关键词:

急性脊髓损伤; 胡椒叶提取物; 炎症反应; 氧化应激; 细胞凋亡; 神经保护; 神经损伤; NF- κ B 信号通路

中图分类号: R459.9; R365; R651.2

基金资助:

海南省自然科学基金项目(818MS165), 项目负责人: 成建平

Cheng Jianping, Associate chief physician, Department of Orthopedics, West Central Hospital of Hainan, Danzhou 571700, Hainan Province, China

Extract of piper auritum can alleviate oxidative stress and inflammation of rat models of acute spinal cord injury

Cheng Jianping, Li Hua, Li Xiongjie (Department of Orthopedics, West Central Hospital of Hainan, Danzhou 571700, Hainan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Extract of piper auritum plays a protective role in streptozotocin-induced diabetic rats, and the mechanism is associated with anti-oxidative damage. However, whether it can alleviate acute spinal cord injury by anti-oxidative stress is unknown.

OBJECTIVE: To investigate the effects of extract of piper auritum on oxidative stress, inflammation and nerve injury of acute spinal cord injury rats.

METHODS: One hundred rats (provided by Chengdu Dashuo Experimental Animal Company) were randomly divided into sham group, spinal cord injury group, and low-, moderate-, and high-dose extract of piper auritum groups. Except for sham group, the rats in the other groups were used to establish acute spinal cord injury model by Allen's method. Afterwards, the rats in the extract of piper auritum groups were given 100, 200 and 400 mg/(kg·d) extract of piper auritum via gavage, respectively, for 28 consecutive days. Basso, Beattie Bresnahan scores and tilt board experiment were carried out at 3, 7, 14 and 28 days after administration. The concentrations of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, malondialdehyde, interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in serum were measured by ELISA. The protein levels of Bcl-2, Bax, Caspase-3, brain-derived neurotrophic factor, neuronal/glial cell antigen, I κ B α , p-I κ B α and NF- κ B p65 were detected by western blot assay. Spinal cord tissues underwent hematoxylin-eosin staining and TUNEL staining. The study was approved by the Laboratory Animal Ethics Committee of Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, approval No. NR001803.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with the sham group, the Basso, Beattie Bresnahan scores and the maximal title angle in tilt board experiment in the spinal cord injury group were significantly decreased at different time points after administration ($P < 0.01$). Compared with the spinal cord injury group, the Basso, Beattie Bresnahan scores and the maximal title angle in tilt board experiment in the moderate- and high-dose extract of piper auritum groups were significantly at 7, 14 and 28 days after administration ($P < 0.05$, $P < 0.01$). (2) Compared with the sham group, the spinal cord injury was more serious in the spinal cord injury group, the apoptosis rate, the levels of Bax, Caspase-3, malondialdehyde, interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor- α , p-I κ B α , NF- κ B p65, brain-derived neurotrophic factor, and neuronal/glial cell antigen were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the levels of Bcl-2, I κ B α , superoxide dismutase, and glutathione peroxidase were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the spinal cord injury group, the degree of spinal cord injury in each extract of piper auritum group was alleviated, the apoptosis rate, the levels of Bax, Caspase-3, malondialdehyde, interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor- α , p-I κ B α , NF- κ B p65, brain-derived neurotrophic factor, and neuronal/glial cell antigen were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the levels of Bcl-2, I κ B α , superoxide dismutase, and glutathione peroxidase were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). (3) These findings imply that extract of piper auritum can attenuate acute spinal cord injury by inhibiting inflammation and oxidative stress and also plays a neuroprotective role in spinal cord injury, and the mechanism may be related to inhibit the activation of NF- κ B signaling pathway.

Key words: acute spinal cord injury; extract of piper auritum; inflammation; oxidative stress; apoptosis; neuroprotection; nerve injury; NF- κ B signaling pathway

Funding: the Natural Science Foundation of Hainan Province, No. 818MS165 (to CJP)

0 引言 Introduction

急性脊髓损伤是临床神经科及骨科常见的疾病，可引起神经细胞凋亡、轴突退化及脱髓鞘等，最终导致运动和自主功能障碍^[1-2]。据报道，约13 000人中就会有一个急性脊髓损伤患者，导致约250万人出现瘫痪^[3]。目前对于急性脊髓损伤还没有治愈的方法，且长期护理的花费给患者及社会带来了极大的经济及心理负担^[4]。因此，了解急性脊髓损伤的发病机制及寻找急性脊髓损伤治疗的新药物，是降低急性脊髓损伤致残率的关键。研究表明，急性脊髓损伤包括早期的机械性损伤和继发性损伤。炎症反应和氧化应激引发的神经细胞凋亡是导致急性脊髓损伤加重的主要原因^[5-6]。抑制继发性损伤期炎症反应及氧化应激有利于急性脊髓损伤模型大鼠运动功能的恢复^[7]。胡椒是墨西哥菜肴中常用香料，但同时也具有一定的药用价值，具有抗风湿、兴奋神经、抗炎、抗菌剂抗氧化等生物学活性^[8]。研究表明，胡椒叶提取物对链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠具有明确的保护作用，作用机制与抗氧化损伤有关^[9]，但其是否能通过抗氧化应激减轻急性脊髓损伤还未见报道。此次研究通过建立大鼠急性脊髓损伤模型，探究胡椒叶提取物对急性脊髓损伤及后期

修复的影响及作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 对照观察动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2018-04-03/07-23在海南医科大学完成。

1.3 材料 胡椒叶由海南医科大学药学院提供；苏木精-伊红染色试剂盒、RIPA裂解液购自碧云天生物科技公司；BCA试剂盒购自北京索莱宝生物公司；Tunnel细胞凋亡试剂盒购自瑞士罗氏公司；超氧化物歧化酶、丙二醛和谷胱甘肽过氧化物酶试剂盒，白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素1 β 的ELISA试剂盒，均购自南京建成生物工程研究所；脑源性神经营养因子、神经/胶质细胞抗原、I κ B α 、p-I κ B α 和NF- κ B抗体购自英国Abcam公司；Bcl-2、Bax和Caspase-3抗体购自美国Santa cruz公司。

实验动物: 4周龄SPF级雄性SD大鼠100只，体质量180-220 g，购自成都达硕实验动物公司，生产许可证号：SCXK(川)2012-0001。所有大鼠均自由进食，日照时间12 h，温度24-27 °C。将100只大鼠随机分为假手术组、脊髓损伤组、胡椒叶提取物低、中、高剂量组^[9]，每组20只。

1.4 实验方法

1.4.1 药物提取 将胡椒叶洗净后室温干燥5 d, 打粉。取300 g干燥粉末, 先后加入900 mL己烷、900 mL氯仿和900 mL甲醇, 采用索氏提取法提取4 h, 提取3次。随后进行过滤, 合并滤液、浓缩, 精制后获得提取物1.1 g, 稀释成100 g/L质量浓度, 临用前分别稀释到10, 20, 40 g/L进行实验。

1.4.2 模型建立及分组干预 除假手术组外, 其余组大鼠腹腔注射10%水合氯醛进行麻醉, 以T₁₀为中心剃毛并进行常规消毒, 消毒后作手术切口, 暴露T₉-T₁₁棘突, 暴露T₁₀胸椎, 采用Allen's法造模^[10], 用10 g打击棒从2.5 cm自由落体撞击T₁₀胸髓, 撞击后移开打击棒。以致伤瞬间大鼠尾部痉挛性摆动, 双后肢及躯干出现回缩扑动视为造模成功。假手术组大鼠除了不采用打击棒进行打击外其他操作同上。造模成功10 min内, 胡椒叶提取物低、中、高剂量组分别灌胃给予100, 200, 400 mg/(kg·d)的胡椒叶提取物, 假手术组和脊髓损伤组灌胃给予等量的溶媒, 连续28 d(最终纳入统计的大鼠至少8只)。给药后3, 7, 14, 28 d对所有大鼠进行BBB评分(评分越高功能恢复越好)和斜板实验(评分越高功能恢复越好), 28 d后处死所有大鼠, 取脊髓组织进行后续实验。

1.5 主要观察指标

1.5.1 苏木精-伊红染色观察病理损伤 麻醉大鼠, 采用生理盐水行心脏灌流至流出液体颜色澄清透明, 再用40 g/L多聚甲醛灌注至大鼠全身僵硬, 随后取脊髓损伤点为中心的脊髓组织, 放入40 g/L多聚甲醛进行后固定。采用蔗糖进行梯度脱水后, 制作石蜡切片, 根据苏木精-伊红染色试剂盒说明书进行染色, 于生物显微镜下观察染色情况。

1.5.2 TUNNEL检测细胞凋亡 取石蜡切片, 采用二甲苯进行脱蜡处理后, 根据TUNNEL试剂盒说明书对脊髓组织凋亡细胞进行染色处理, 生物显微镜下观察细胞凋亡情况, 每个标本随机选取5个视野进行计数统计。

1.5.3 免疫印迹检测蛋白表达 用生理盐水对大鼠进行心脏灌注后, 取以脊髓损伤为中心的脊髓组织, 采用RIPA裂解液提取各组组织蛋白, 用BCA试剂盒进行定量分析。随后每组各取30 g蛋白, 用10%SDS-PAGE分离蛋白, 采用半干法将蛋白质转移到PVDF膜, 用5%脱脂牛奶进行封闭处理后, 加入适宜浓度的一抗(脑源性神经营养因子, 1:1 100; 神经/胶质细胞抗原, 1:1 000; IκBα 1:1 000; p-IκBα, 1:800; NF-κB p65, 1:900; Bax, 1:1 000; Bcl-2, 1:950; Caspase-3, 1:800)4 °C孵育过夜, 第2天洗去未结合一抗, 加入适宜浓度二抗(1:1 000), 室温孵育2 h后, 洗去残余二抗于暗室曝光显影。每组至少8个样本。

1.5.4 试剂盒检测血清细胞因子浓度 将大鼠麻醉后, 首先进行心脏取血, 将所获得的外周血室温静置1 h后, 3 500 r/min离心15 min, 取上层血清, 根据试剂盒说明书检测血清中炎症因子肿瘤坏死因子α、白细胞介素1β和白

组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	模拟人类脊髓脊髓损伤的病理状态, 探究胡椒叶提取物对急性损伤的作用及作用机制
研究问题借鉴已有标准动物模型造模:	根据郑利强等 ^[10] 所报道的方法造模
研究问题需要改进动物模型造模方法及意义:	与参考文献模型相同
选择动物的条件:	SPF级
模型与所研究疾病的关系:	病理机制相似
动物来源及品系:	成都达硕实验动物公司提供的SD大鼠
造模技术描述:	采用Allen's法造模, 用10 g打击棒从2.5 cm自由落体撞击T ₁₀ 胸髓, 撞击后移开打击棒
动物数量及分组方法:	将100只SD大鼠随机分为假手术组、脊髓损伤组及胡椒叶提取物低、中、高剂量组, 每组20只
造模成功评价指标:	以致伤瞬间大鼠尾部痉挛性摆动, 双后肢及躯干出现回缩扑动视为造模成功
造模后实验观察指标:	BBB评分和斜板实验, 氧化应激因子, 炎症因子, Bcl-2、Bax、Caspase-3、脑源性神经营养因子和神经/胶质细胞抗原、IκBα、p-IκBα和NF-κB p65蛋白表达, 凋亡细胞。
造模过程中动物死亡原因:	造模损伤过重
如何补充造模过程中缺失的动物:	不用补充, 因为实验时以预备足够纳入统计的大鼠的动物:
造模后动物处理:	造模成功10 min内, 胡椒叶提取物低、中、高剂量组分别每天灌胃给予100, 200, 400 mg/kg的胡椒叶提取物, 假手术组和脊髓损伤组灌胃给予等量的溶媒, 连续28 d(最终纳入统计的大鼠至少8只), 并于3, 7, 14, 28 d对所有大鼠进行BBB评分和斜板实验, 28 d后处死所有大鼠, 取脊髓组织进行后续实验
伦理委员会批准:	海南大学热带农林学院实验动物伦理委员会批准(NR001803)

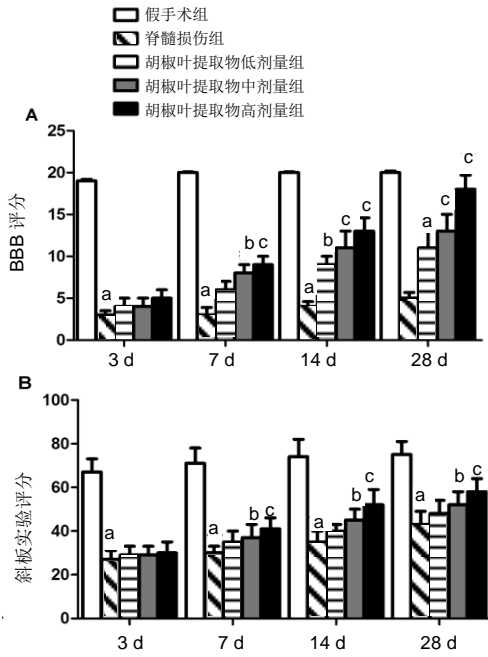
细胞介素6浓度及氧化应激相关细胞因子超氧化物歧化酶、丙二醛和谷胱甘肽过氧化物酶水平。

1.6 统计学分析 实验结果均采用SPSS 19.0进行统计学分析, 每组至少有8只大鼠纳入统计。首先对数据进行正态分布分析, 符合正态分布多组间比较采用单因素方差分析, 反之采用秩和检验, 实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 100只大鼠均进入结果分析。

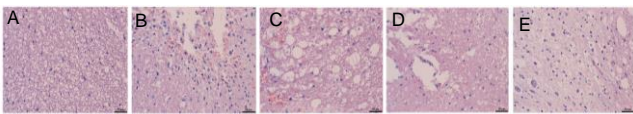
2.2 胡椒叶提取物促进急性脊髓损伤模型大鼠后肢功能恢复 与假手术组比较, 脊髓损伤组BBB评分和斜板实验评分显著降低($P=0.000\ 76, 0.002\ 8$); 给药7, 14, 28 d后, 胡椒叶提取物中、高剂量组BBB评分(7 d: $P=0.036, 0.007\ 1$; 14 d: $P=0.008\ 2, 0.001\ 9$; 28 d: $P=0.002\ 2, 0.000\ 89$)和斜板实验显著升高, 见图1, 表明胡椒叶提取物能显著促进急性脊髓损伤模型大鼠后肢功能的恢复。



图注: 图中 A 为 BBB 评分, B 为斜板实验评分; 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与脊髓损伤组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。

图 1 胡椒叶提取物对急性脊髓损伤模型大鼠后肢运动功能的影响
Figure 1 Effects of extract of piper auritum on the locomotive function of hind limbs of rat models of acute spinal cord injury

2.3 胡椒叶提取物减轻急性脊髓损伤模型大鼠脊髓损伤与假手术组比较, 脊髓损伤组大鼠脊髓组织细胞核出现明显固缩, 组织明显水肿, 炎性细胞浸润显著增多; 与脊髓损伤组比较, 胡椒叶提取物中、高剂量组大鼠脊髓组织细胞固缩及水肿情况显著减轻, 炎性细胞浸润也显著减少, 见图2, 表明胡椒叶提取物能减轻急性脊髓损伤模型大鼠脊髓损伤。

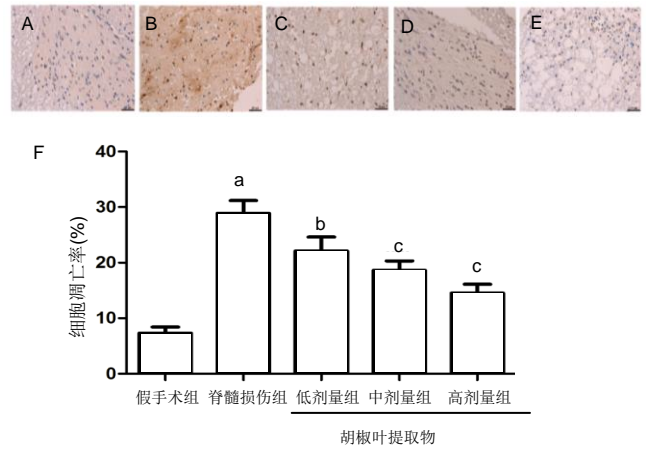


图注: 图中 A-E 分别为假手术组、脊髓损伤组及胡椒叶提取物低、中、高剂量组; 与假手术组比较, 脊髓损伤组大鼠脊髓组织细胞核出现明显固缩, 组织明显水肿, 炎性细胞浸润显著增多; 与脊髓损伤组比较, 胡椒叶提取物中、高剂量组大鼠脊髓组织细胞固缩及水肿情况显著减轻, 炎性细胞浸润也显著减少。

图 2 胡椒叶提取物对急性脊髓损伤大鼠脊髓组织损伤的影响(x100)
Figure 2 Effect of extract of piper auritum on the spinal cord injury of rat models of acute spinal cord injury (x100)

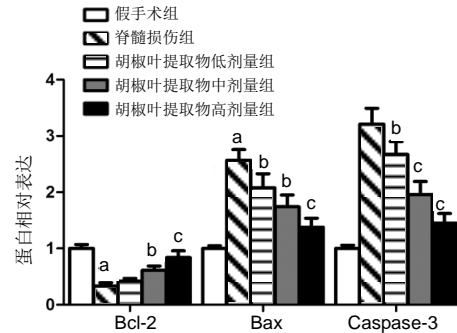
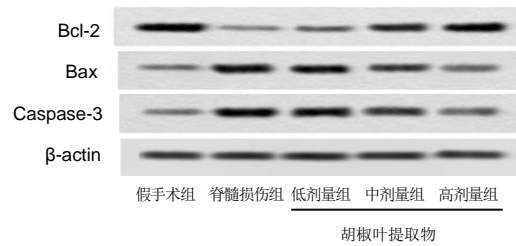
2.4 胡椒叶提取物抑制急性脊髓损伤模型大鼠脊髓组织细胞凋亡 与假手术组比较, 脊髓损伤组大鼠脊髓组织凋亡细胞明显增多($P=0.00068$), Bax、Caspase-3蛋白表达水平明显升高($P=0.0021$, 0.0017), Bcl-2蛋白表达水平明显降低($P=0.0019$); 与脊髓损伤组比较, 胡椒叶提取物低、中、高剂量组大鼠脊髓组织凋亡细胞明显减少($P=0.037$, 0.0084 , 0.0033), Bax、Caspase-3蛋白表达水平明显降

低(Bax: $P=0.04$, 0.0079 , 0.0011 ; Caspase-3: $P=0.039$, 0.0081 , 0.0015), Bcl-2蛋白表达水平明显升高($P=0.045$, 0.0089 , 0.00098), 见图3, 4。



图注: 图中 A-E 分别为假手术组、脊髓损伤组及胡椒叶提取物低、中、高剂量组脊髓组织 TUNNEL 染色情况, F 为各组细胞凋亡定量分析结果。与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与脊髓损伤组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。

图 3 胡椒叶提取物对模型大鼠脊髓组织细胞凋亡的影响
Figure 3 Effect of extract of piper auritum on the cell apoptosis in the rat spinal cord



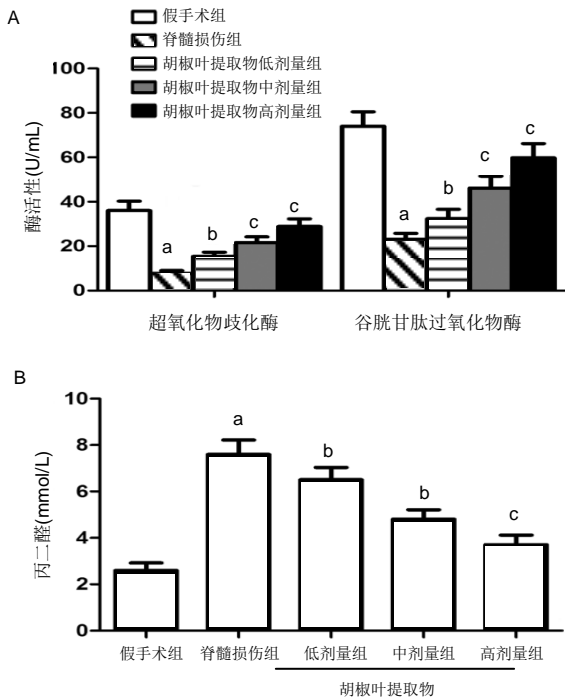
图注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与脊髓损伤组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。

图 4 胡椒叶提取物对脊髓损伤模型大鼠脊髓组织凋亡相关蛋白表达的影响

Figure 4 Effect of extract of piper auritum on the expression levels of apoptosis-related proteins in the spinal cord of rat models of spinal cord injury

2.5 胡椒叶提取物抑制急性脊髓损伤模型大鼠氧化应激 与假手术组比较, 脊髓损伤组大鼠脊髓组织超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性明显降低($P=0.00034$, 0.00041), 丙二醛浓度明显升高($P=0.0012$); 与脊髓损伤组比较, 胡椒叶提取物低、中、高剂量组大鼠脊髓组织超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性显著升高(超氧化

物歧化酶: $P=0.033, 0.006, 0$; 谷胱甘肽过氧化物酶: $P=0.037, 0.007, 0.001$, 丙二醛浓度显著降低($P=0.044, 0.008, 0.001$), 见图5。



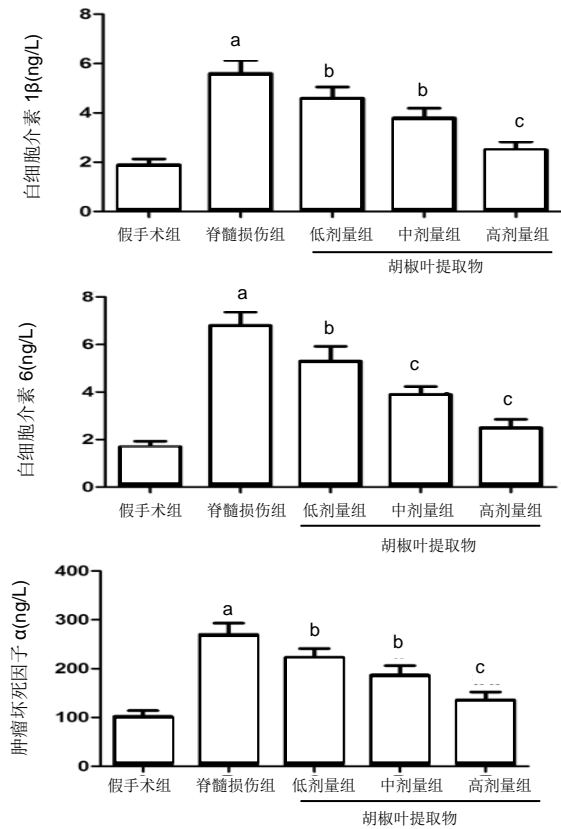
图注: 图中 A 为超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性, B 为丙二醛浓度; 与假手术组比较, $^aP < 0.01$; 与脊髓损伤组比较, $^bP < 0.05$, $^cP < 0.01$ 。

图 5 胡椒叶提取物对脊髓损伤大鼠血清氧化应激因子的影响
Figure 5 Effect of extract of piper auritum on the serum levels of oxidative stress cytokines in rat models of spinal cord injury

2.6 胡椒叶提取物减轻急性脊髓损伤模型大鼠炎症反应与假手术组比较, 脊髓损伤组大鼠血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 和白细胞介素6质量浓度明显升高($P=0.0073, 0.0005, 0.0076$); 与脊髓损伤组比较, 胡椒叶提取物低、中、高剂量组血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 和白细胞介素6质量浓度明显降低(肿瘤坏死因子 α : $P=0.042, 0.012, 0.004$; 白细胞介素 1β : $P=0.044, 0.009, 0.001$; 白细胞介素6: $P=0.047, 0.011, 0.004$), 见图6。

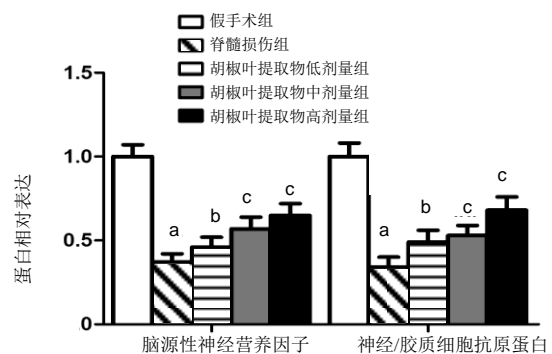
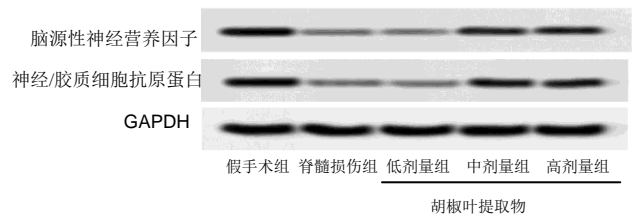
2.7 胡椒叶提取物促进急性脊髓损伤模型大鼠脊髓组织修复 与假手术组比较, 脊髓损伤组大鼠脊髓组织神经营养因子脑源性神经营养因子和神经/胶质细胞抗原蛋白水平明显降低($P=0.0016, 0.0011$); 与脊髓损伤组比较, 胡椒叶提取物低、中、高剂量组脊髓组织脑源性神经营养因子和神经/胶质细胞抗原蛋白水平显著高于脊髓损伤组(脑源性神经营养因子: $P=0.038, 0.0082, 0.0013$; 神经/胶质细胞抗原: $P=0.031, 0.009, 0.001$), 见图7。

2.8 胡椒叶提取物抑制NF- κ B信号通路激活 与假手术组比较, 脊髓损伤组I κ B α 蛋白表达水平明显降低($P=0.00087$), p-I κ B α 和NF- κ B p65蛋白表达水平明显升高($P=0.00079, 0.00072$); 与脊髓损伤组比较, 胡椒叶提取物低、中、高剂



图注: 与假手术组比较, $^aP < 0.01$; 与脊髓损伤组比较, $^bP < 0.05$, $^cP < 0.01$ 。

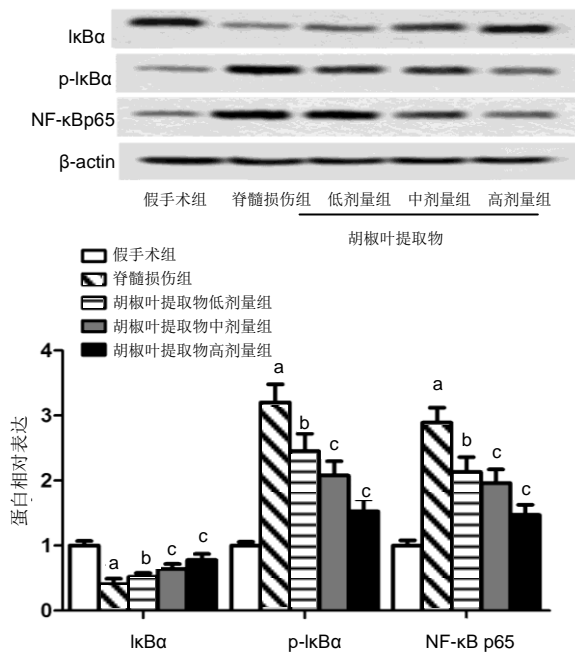
图 6 胡椒叶提取物对急性脊髓损伤模型大鼠血清炎症因子浓度的影响
Figure 6 Effect of extract of piper auritum on the serum levels of inflammatory cytokines in rat models of acute spinal cord injury



图注: 与假手术组比较, $^aP < 0.01$; 与脊髓损伤组比较, $^bP < 0.05$, $^cP < 0.01$ 。

图 7 胡椒叶提取物对脊髓损伤大鼠脊髓组织脑源性神经营养因子和神经/胶质细胞抗原蛋白水平的影响
Figure 7 Effect of extract of piper auritum on the levels of brain-derived neurotrophic factor and neuronal/glial cell antigen in spinal cord of rat models of acute spinal cord injury

量组IκBα蛋白表达水平显著升高($P=0.041, 0.009, 0.001$), p-IκBα、NF-κB p65 蛋白表达水平显著降低(p-IκBα: $P=0.044, 0.008, 0.001$; NF-κB: $P=0.036, 0.008, 0.001$), 见图8。



图注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与脊髓损伤组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。

图8 胡椒叶提取物对脊髓损伤大鼠脊髓组织 NF-κB 信号通路的影响
Figure 8 Effect of extract of piper auritum on the NF-κB signaling pathway in spinal cord of rat models of spinal cord injury

3 讨论 Discussion

研究表明脊髓原发性损伤后出现的一系列继发性损伤,是导致脊髓损伤加重的主要原因,也是导致不可逆性神经功能损伤的主要原因^[11]。继发性脊髓损伤主要包括炎症反应、氧化应激、神经细胞凋亡及星形胶质细胞瘢痕的形成^[12]。目前虽无有效治疗及防止外伤导致脊髓损伤的方法,但大量研究表明,有效减少继发性脊髓损伤能明显降低脊髓损伤的致残率^[13]。因此,及时防治继发性脊髓损伤是促进脊髓损伤患者神经功能恢复的关键。研究表明,胡椒叶提取物具有抗炎抗氧化活性。Hazekawa等^[14]研究发现白胡椒水提取物能通过抑制炎症因子分泌,抑制小鼠脾脏细胞增殖抑制炎症反应,同时也有研究发现胡椒具有明显的抗氧化活性^[15]。但胡椒叶提取物是否能减轻脊髓损伤及继发性的脊髓损伤还未见报道。此次研究采用改良Allen's法复制大鼠创伤性脊髓损伤模型,并连续给予模型大鼠不同浓度胡椒叶提取物4周,以探究胡椒叶提取物对脊髓损伤的作用。实验结果表明,脊髓损伤模型大鼠BBB评分及斜板实验评分均明显降低,表明大鼠后肢运动功能受到明显影响,模型复制成功;给予胡椒叶提取物后,大鼠后肢运动功能明显改善,表明胡椒叶提取物对脊髓损伤大鼠均有明显的保护作用,但作用病理环节及机制有待进一步探究。

脊髓组织水肿及炎性细胞浸润均是脊髓损伤后的常见病理表现,神经细胞凋亡更是导致脊髓损伤后患者运动功能受损的主要原因^[16-17]。越来越多的研究表明,脊髓损伤初期患者和动物模型均出现不同程度的神经元及胶质细胞凋亡,其中线粒体细胞凋亡途径在其中起到了重要作用^[18]。Bax和Bcl-2是线粒体凋亡途径的重要调控蛋白,Bax过表达能激活Caspase家族蛋白介导的细胞凋亡^[19]。苏木精-伊红染色结果表明,模型大鼠脊髓组织出现了明显水肿、炎性细胞浸润,细胞核出现了明显固缩,且Tunnel实验表明模型大鼠脊髓组织凋亡细胞明显增多,抗凋亡蛋白Bcl-2表达明显减少,凋亡蛋白Bax和Bcl-2表达水平显著升高。200, 400 mg/kg的胡椒叶提取物能明显减轻模型大鼠组织水肿、减少炎性细胞浸润及细胞和固缩,并能抑制细胞凋亡,并且随药物浓度剂量作用有所增强,表明胡椒叶提取物能抑制脊髓损伤后神经细胞凋亡。

研究表明,氧化应激及炎症反应是导致脊髓损伤及继发性脊髓损伤的主要原因^[20-21]。据既往研究报道,大鼠脊髓损伤后炎症因子白细胞介素1β、白细胞介素6和肿瘤坏死因子α表达明显增多,并且炎症因子的表达能进一步激活小胶质细胞,进一步放大炎症反应,诱导神经诱导凋亡^[22]。氧化应激的发生可激活线粒体细胞凋亡途径,导致神经细胞大量凋亡^[23]。Hirata等^[24]研究发现胡椒叶具有明显的抗组胺活性。此次实验结果发现,急性脊髓损伤模型大鼠血清炎症因子白细胞介素1β、白细胞介素6和肿瘤坏死因子α及脂质过氧化物丙二醛浓度明显升高,抗氧化酶超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性显著降低,但胡椒叶提取物能显著降低模型大鼠白细胞介素1β、白细胞介素6和肿瘤坏死因子α及丙二醛浓度,升高超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性,并且随剂量升高作用增强,表明胡椒叶提取物减轻模型大鼠脊髓损伤的作用与其抗氧化剂抗炎作用有关,并且可能具有量效关系。

此外,胡椒叶提取物还能抑制模型大鼠脊髓组织p-IκBα、NF-κB p65的蛋白表达,促进IκBα蛋白的表达,表明其能抑制脊髓损伤模型大鼠NF-κB信号通路的激活。NF-κB信号通路是调控炎症因子表达的重要信号通路,该通路的激活能促进炎症因子的表达,加重脊髓损伤^[25]。实验结果表明,胡椒叶提取物抑制脊髓损伤模型大鼠炎症反应与抑制NF-κB信号通路激活有关。

综上所述,胡椒叶提取物能升高脊髓损伤模型大鼠BBB评分和斜板实验评分,减轻脊髓组织病理损伤,抑制脊髓损伤模型大鼠炎症因子释放,促进抗氧化酶表达,抑制氧化产物的产生,抑制脊髓组织神经细胞凋亡及NF-κB信号通路的激活,表明胡椒叶提取物能通过抑制氧化应激、炎症反应及细胞凋亡减轻急性脊髓损伤模型大鼠脊髓组织损伤、促进模型大鼠后肢运动功能的恢复,作用机制与抑制NF-κB信号通路激活。此次研究首次探究了胡椒叶提取物对脊髓损伤的作用,但对脊髓损伤其他病理机制的作用

还有待探究, 可能为脊髓损伤的治疗提供了新的潜力药物。

作者贡献: 李华和李雄杰进行实验设计, 实验实施为成建平, 实验评估为成建平和李华, 资料收集为成建平, 成建平成文, 李华审核。

经费支持: 该文章接受了“海南省自然科学基金项目(818MS165)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经海南大学热带农林学院实验动物伦理委员会批准(NR001803)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在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。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经海南西部中心医院生物统计学专家审核。

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, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”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] Zeng HH, Huang YR, Li ZJ, et al. Effects of emodin on oxidative stress and inflammatory response in rats with acute spinal cord injury. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2018;43(9): 1886-1893.

[2] Moon YJ, Lee JY, Oh MS, et al. Inhibition of inflammation and oxidative stress by *Angelica dahuricae* radix extract decreases apoptotic cell death and improves functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci Res*. 2012;90(1): 243-256.

[3] Paterniti I, Impallizzeri D, Di Paola R, et al. Docosahexaenoic acid attenuates the early inflammatory response following spinal cord injury in mice: in-vivo and in-vitro studies. *J Neuroinflammation*. 2014; 11: 6.

[4] Dietz V, Fouad K. Restoration of sensorimotor functions after spinal cord injury. *Brain*. 2014;137: 654-667.

[5] Coll-Miró M, Francos-Quijorna I, Santos-Nogueira E, et al. Beneficial effects of IL-37 after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(5):1411-1416.

[6] Zheng H, Jia L, Liu CC, et al. TREM2 Promotes Microglial Survival by Activating Wnt/ β -Catenin Pathway. *J Neurosci*. 2017;37(7):1772-1784.

[7] Sun Y, Gong F, Yin J, et al. Therapeutic effect of apocynin through antioxidant activity and suppression of apoptosis and inflammation after spinal cord injury. *Exp Ther Med*. 2017; 13(3):952-960.

[8] Gutierrez RMP. Effect of the hexane extract of *Piper auritum* on insulin release from β -cell and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat. *Pharmacogn Mag*. 2012; 8(32):308-313.

[9] Gonzalez AM, Gutierrez RM, Cotera LB. Antidiabetic activity of *Piper auritum* leaves in streptozotocin-induced diabetic rat, beneficial effect on advanced glycation endproduct. *Chin J Integr Med*. 2014. [Epub ahead of print]

[10] 郑利强, 伍亚民, 石永江, 等. 黄芩多糖对大鼠脊髓损伤后运动功能和脊髓病理的效果[J]. *中国康复理论与实践*, 2016, 22(11): 1269-1275.

[11] Zhao H, hen S, Gao K, et al. Resveratrol protects against spinal cord injury by activating autophagy and inhibiting apoptosis mediated by the SIRT1/AMPK signaling pathway. *Neuroscience*. 2017;348:241-251.

[12] Ahuja CS, Nori S, Tetreault L, et al. Traumatic Spinal Cord Injury-Repair and Regeneration. *Neurosurgery*. 2017;80(3S): S9-S22.

[13] Sun X, Jones ZB, Chen XM, et al. Multiple organ dysfunction and systemic inflammation after spinal cord injury: a complex relationship. *J Neuroinflammation*. 2016; 13(1):260.

[14] Hazeckawa M, Hideshima Y, Ono K, et al. Anti-inflammatory effects of water extract from bell pepper (*Capsicum annuum* L. var. *grossum*) leaves in vitro. *Exp Ther Med*. 2017;14(5): 4349-4355.

[15] Agbor GA, Vinson JA, Oben JE, et al. In vitro antioxidant activity of three *Piper* species. *J Herb Pharmacother*. 2007;7(2):49-64.

[16] Parker D, McClelland TJ. Neuromodulator interactions and spinal cord injury in lamprey. *Neural Regen Res*. 2018;13(4): 643-644.

[17] Seo JY, Kim YH, Kim JW, et al. Effects of Therapeutic Hypothermia on Apoptosis and Autophagy following Spinal Cord Injury in Rats. *Spine*. 2015;40(12):883-890.

[18] Bahney J, Von CB. The Cellular Composition and Glia-Neuron Ratio in the Spinal Cord of a Human and a Non-Human Primate: Comparison with other Species and Brain Regions. *Anat Rec*. 2018;301(4): 697-710.

[19] Li H, Jia Z, Li G, et al. Neuroprotective effects of exendin-4 in rat model of spinal cord injury via inhibiting mitochondrial apoptotic pathway. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(5):4837-4843.

[20] Xia P, Gao X, Duan L, et al. Mulberrin (Mul) reduces spinal cord injury (SCI)-induced apoptosis, inflammation and oxidative stress in rats via miRNA-337 by targeting Nrf-2. *Biomed Pharmacother*. 2018; 107:1480-1487.

[21] Liu JT, Zhang S, Gu B, et al. Methotrexate combined with methylprednisolone for the recovery of motor function and differential gene expression in rats with spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 2017;12(9):1507-1518.

[22] Tanaka T, Kai S, Matsuyama T, et al. General anesthetics inhibit LPS-induced IL-1 β expression in glial cells. *PLoS One*. 2013;8(12):e82930.

[23] Zhang W, Cheng L, Hou Y, et al. Plumbagin Protects Against Spinal Cord Injury-induced Oxidative Stress and Inflammation in Wistar Rats through Nrf-2 Upregulation. *Drug Res*. 2015; 65(09):495-499.

[24] Hirata N, Naruto S, Inaba K, et al. Histamine release inhibitory activity of *Piper nigrum* leaf. *Biol Pharm Bull*. 2008;31(10): 1973-1976.

[25] Tan Y, Yu L, Zhang C, et al. miRNA-146a attenuates inflammation in an in vitro spinal cord injury model via inhibition of TLR4 signaling. *Exp Ther Med*. 2018;16(4): 3703-3709.