

表没食子儿茶素没食子酸酯对脊髓损伤大鼠 炎症因子释放及神经营养因子表达的影响

邓凤君, 杨迎暴, 徐江平*, 周丹, 李茹冰
(南方医科大学药学院药理学系, 广州 510515)

[摘要] 目的: 研究表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallit, EGCG)对脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)大鼠炎症因子的释放及神经营养因子表达的影响。方法: 建立大鼠脊髓半切 SCI 模型。SCI 大鼠给予 EGCG 治疗 24 h 后取血清和受损伤脊髓局部组织。ELISA 法测定血清白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)含量; Western blot 法测定脊髓组织 neurotrophin-3(NT-3)、brain-derived neurotrophic factor(BDNF)蛋白表达。结果: 与模型组比较, EGCG 能显著降低 SCI 大鼠血清炎症因子 IL-6、IL-8 的浓度, 促进脊髓组织内源性 NT-3、BDNF 表达。结论: EGCG 可抑制炎症因子释放, 增加内源性神经营养因子表达。

[关键词] 脊髓损伤; 表没食子儿茶素没食子酸酯; 白介素-6; 白介素-8; 神经营养因子-3; 脑源性神经营养因子

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0195-04

Effect of Epigallocatechin-3-gallit (EGCG) on the Release of Inflammatory Cytokines and Expression of Neurotrophic Factors in Spinal Cord-injured Rats

DENG Fun-jun, YANG Ying-bao, XU Jiang-ping*, ZHOU Dan, LI Ru-bing
(Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] Objective: To investigate the protective effects of Epigallocatechin-3-gallate(EGCG) on the release of inflammatory cytokines and expression of neurotrophic factors in spinal cord-injured(SCI) rats. **Method:** SCI model was reproduced by hemisection, and EGCG was administered for 24 h after hemisection 5 min after SCI. The concentrations of serum IL-6 and IL-8 were measured by ELISA assay, and the expression of neurotrophin-3(NT-3) and brain-derived neurotrophic factor(BDNF) protein in injured spinal cord tissues were determined by western blot. **Result:** EGCG significantly reduced the levels of serum IL-6 and IL-8, and increased expression of NT-3 and BDNF at the injured spinal cord in SCI rats. **Conclusion:** EGCG may protect against spinal cord from injury by inhibiting release of inflammatory cytokines and enhancing the expression of endogenous neurotrophic factors in SCI rats.

[Key words] spinal cord injury(SCI); epigallocatechin-3-gallate(EGCG); IL-6; IL-8; NT-3; BDNF

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)包括原发性损伤和继发性损伤,原发性损伤是不可逆的;继发性损伤包括氧自由基损伤、脂质过氧化与免疫炎症反

应等,其具有可逆性并可被调控,从而决定SCI具有可逆转机会^[1]。

研究表明,抗氧化剂褪黑激素、白藜芦醇等可通过中和自由基、激活抗氧化酶而在SCI后修复受损脊髓组织,保护神经细胞,促进功能恢复^[2-3]。表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是重要的天然抗氧化剂,能透过血脑屏障,减少氧自由基所致神经细胞损伤,保护神经细胞,具有潜在治疗神经损伤疾病的

[收稿日期] 2010-01-14(005)

[通讯作者] * 徐江平, Tel: (020) 61648236, E-mail: jpx@fimmu.com

[第一作者] 邓凤君, 讲师, 研究方向为神经药理学, Tel: (020) 61648235, E-mail: 329746828@qq.com

价值^[4]。但是, EGCG 对 SCI 的影响尚鲜见报道, 本文拟研究 EGCG 对 SCI 大鼠炎症因子及神经生长因子的影响, 以探讨其对脊髓损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器 EGCG(纯度 95%, 杭州禾田生物技术有限公司, HPLC 法测定); 甲基强的松龙(MPSS, 比利时法玛西亚普强公司)。IL-6 与 IL-8 Elisa 试剂盒(ADL 公司, San Diego, USA); 兔抗 BDNT、NT-3 及 β -Actin 多克隆抗体(Santa Cruz, USA), 山羊抗兔 IgG(H+L)/HRP(Jackson, USA)。电泳仪(G42, Biometra, Germany), 蛋白质快速半干转移系统(Fastblot B31, Biometra, Germany); 标准电源箱(P25, Biometra, Germany)。

1.2 动物 SD 大鼠, 雌性, SPF 级 2 月龄, 体重 180 ~ 220 g, 由南方医科大学实验动物中心提供(合格证号 0047066, 许可证号 SCXK 粤 2006-0015)。每日定量供给混合饲料和充足水, 在安静、通风、清洁环境下分笼饲养, 饲养环境温度 22 ~ 25 ℃, 相对湿度 40% ~ 70%。饲养 1 周, 待动物适应环境后造模给药处理。

1.3 脊髓半切模型建立 大鼠以水合氯醛(300 mg·kg⁻¹, ip) 麻醉, 俯卧位固定。选 T₁₀ 节段(T₈ 椎板)作损伤节段, 以 T_{9,11} 节段骨性标志为中心, 沿棘突做纵行切口约 4 cm, 切开皮肤及浅筋膜并皮下游离。显微撑开器撑开两侧椎旁肌, 暴露术野, 止血钳固定 T₈ 椎板, 自制咬骨器(小号持针器磨薄尖)咬除右侧椎板至右侧关节突内侧面, 再切除棘突, 暴露脊髓。用显微剪沿后正中中线纵向打开硬脊膜, 此时可见清亮脑脊髓液流出, 并向右侧剪开至关节突内侧面。脊髓半切分 3 步: 第 1 步, 定位中线——轻柔分离后正中沟, 避免损伤粗大的脊髓后中正静脉; 第二步, 脊髓横旋切, 尖形手术刀片背位于后中正沟, 刀锋向右向脊髓内垂直刺入 0.5 cm, 随即与脊髓垂直方向向右侧横行切断脊髓, 横切到外侧顺着椎管外侧的弧度做旋转式切; 第三步, 确认半切——再用刀片自中线向外侧做一次横旋切, 以确认半切完整。切断脊髓后, 可见大鼠右后肢痉挛性抽搐数次后软瘫。明胶海绵填塞断端间隙, 剪取背部小块筋膜封闭脊髓创口。逐层缝合肌肉、筋膜、皮肤, sc 5 mL 生理盐水预防术后脱水致水、电解质及酸碱失衡紊乱^[5-6]。

1.4 动物分组 大鼠分为 6 组, 每组 8 只。假手术

组, 采用与模型组步骤完全一致的手术过程, 即切开背部皮肤、肌肉层, 暴露脊髓, 但不进行半切; 其余各组为模型组、阳性药组(甲基强的松龙 100 mg·kg⁻¹)、EGCG 低、中、高剂量组(分别为 25, 50, 100 mg·kg⁻¹)。

1.5 给药与取材 动物 SCI 术后 5 min, 假手术组和模型组给予生理盐水(10 mL·kg⁻¹, ip), 其余各组 ip 给予以生理盐水配制的药物。给药 24 h 后取材。摘右眼球取血 5 mL 后暴露心脏, 心脏灌流从左心室注入右心耳流出, 37 ℃ 生理盐水 250 mL 快速从左心室注入冲洗, 待右心耳流出的液体变得清亮, 肝和肺变白时, 以缝合口为中心, 剪下 4 cm 脊柱, 再以咬骨钳咬开椎管, 完整无损伤暴露和游离脊髓节段, 用冰冷的生理盐水洗净脊髓表面, 滤纸吸干水分, 放于液氮待做 NT-3 和 BDNF 蛋白含量测定。血液室温(22 ℃ 左右)静置 2 h, 4 ℃ 冰箱过夜(18 ~ 22) h, 2 000 r·min⁻¹ 20 min 离心取上清, 储存 -20 ℃ 待做血清 IL-6 和 IL-8 含量测定。

1.6 ELISA 法测定 SCI 大鼠血清 IL-6 和 IL-8 含量 按 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

1.7 Western blot 测定 SCI 大鼠脊髓组织 NT-3 和 BDNF 蛋白含量 大鼠脊髓组织 100 mg 加 0.5 mL RIPA 裂解液(每 mL 裂解液加入 5 μ L PMSF) 4 ℃ 裂解 1 h。4 ℃ 12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清。加入上样缓冲液, 100 ℃ 加热 5 min 使蛋白变性。每孔上样 8 μ L 总蛋白, 15% SDS-聚丙烯酰胺电泳 2 h(浓缩胶电压 80 V, 分离胶 120 V)。电泳结束后用半干转移系统将蛋白转移到 PVDF 膜上(80 mA, 30 min)。膜在室温下用含 50 g·L⁻¹ 牛血清白蛋白(BSA)的 TBST 缓冲液封闭 2 h, 然后分别加入一抗: NT-3 或 BDNT(1 1 000)、 β -actin(1 1 000), 4 ℃ 过夜。再分别加入相应二抗(1 4 000), 室温孵育 1 h。ECL 发光试剂盒显影, 以 β -actin 为内参, 用 Image-Pro 软件分析条带吸光值(www.scioncorp.com)。

1.8 统计学方法 实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示。应用 SPSS 13.0 软件, 采用单因素方差分析, 各组之间多重比较采用 LSD 或 Dunnett's 多重比较法。P < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 EGCG 对 SCI 大鼠血清中炎症因子 IL-6、IL-8 的影响 EGCG 3 个剂量组血清 IL-6、IL-8 含量均剂量依赖性减少, 其中 50, 100 mg·kg⁻¹ 两组与模型组

相比有统计学意义 ($P < 0.01$, 见图 1 ~ 图 2)。

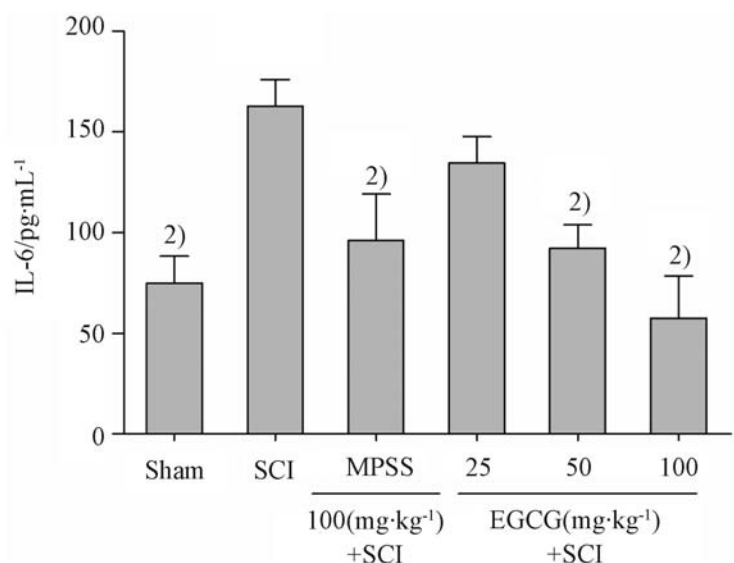


图 1 EGCG 对 SCI 大鼠血清中 IL-6 含量的影响 (柳±s, n=8)

与模型组比较: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

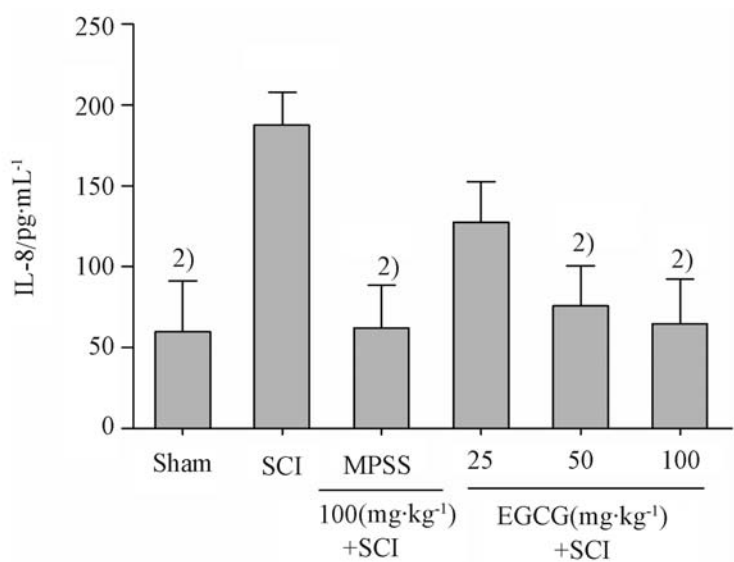


图 2 EGCG 对 SCI 大鼠血清中 IL-8 含量的影响 (柳±s, n=8)

2.2 EGCG 对 SCI 大鼠脊髓组织中 NT-3、BDNF 蛋白含量影响 造模后模型组大鼠脊髓组织中 NT-3、BDNF 蛋白含量明显低于假手术组 ($P < 0.01$), EGCG 大、中剂量及 MPSS 组可不同程度提高大鼠脊髓组织中 NT-3、BDNF 蛋白含量 ($P < 0.05$), 但 EGCG 小剂量组与模型组之间差异无统计学意义, 见图 3 ~ 4。

3 讨论

SCI 实验模型主要包括挫伤型、缺血型和切割型等。本实验采用雌性 SD 大鼠制作切割型实验模型, 基于雌性大鼠尿道短, 尿道感染、水肿发生概率低, 不容易形成尿道阻塞, 有利于脊髓损伤术后护理, 从而提高了术后动物生存率。

在过去几年中, 药物干预成为治疗脊髓损伤的重要手段。本研究欲探讨另一个重要的天然抗氧化剂 EGCG 对脊髓损伤的作用。EGCG 属于黄烷醇类, 是一种天然抗氧化剂, 以绿茶中含量最高, 长期应用安全。它作用于与自由基有关的酶, 能高效清除氧自由基; 能够抑制 IL-1 分泌, 抑制炎症中产生

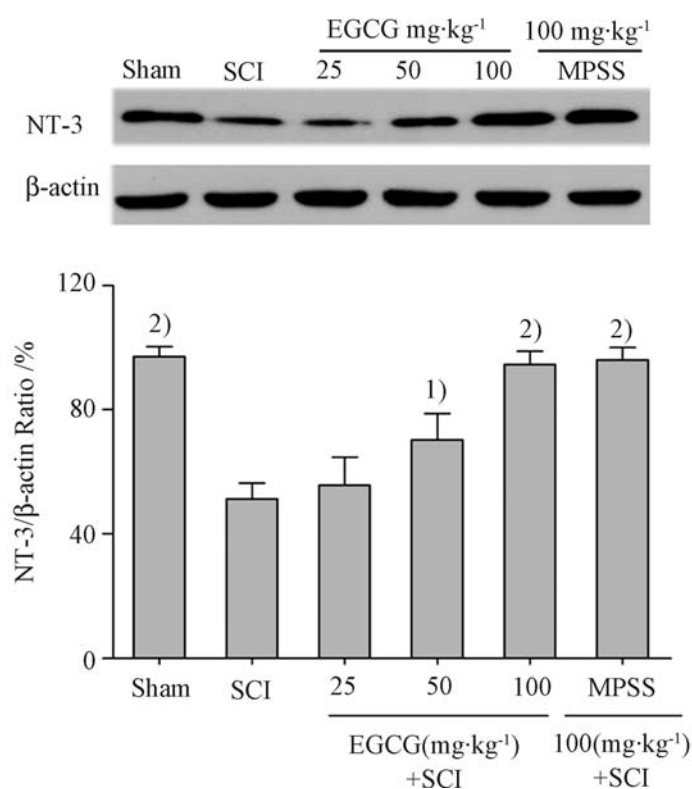


图 3 EGCG 对 SCI 大鼠脊髓组织中 NT-3 蛋白水平的影响 (柳±s, n=8)

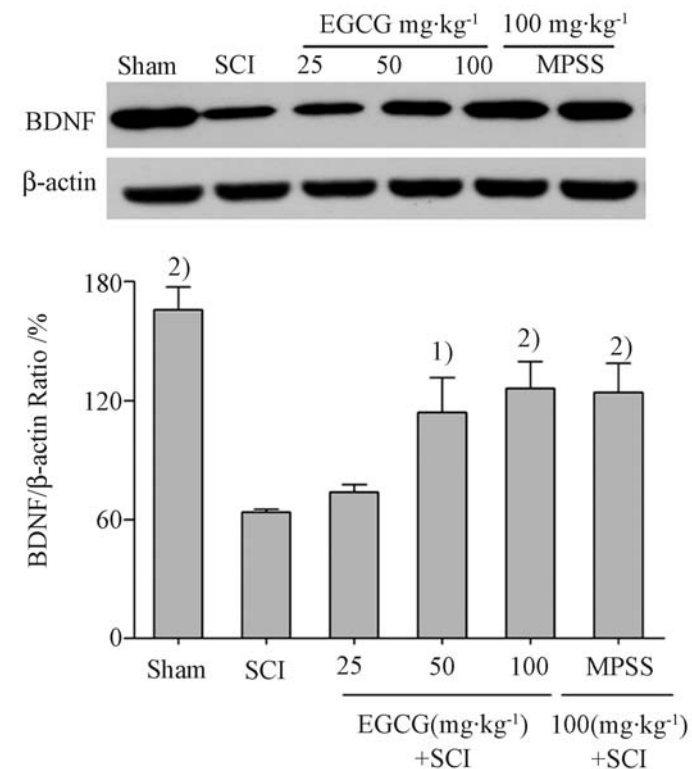


图 4 EGCG 对 SCI 大鼠脊髓组织中 BDNF 蛋白水平的影响 (柳±s, n=8)

一氧化氮合成酶、TNF- α , 发挥抗炎作用。

中枢神经系统炎症反应的基本标志是小胶质细胞的激活和白细胞的浸润。激活的小胶质细胞和浸润的白细胞可释放 IL-6、IL-8 等前炎症因子。IL-6 与 IL-8 能趋化和刺激多形核细胞, 特别是中性粒细胞和 T 淋巴细胞, 从而介导炎症反应^[7]。急性脊髓损伤早期, IL-6 与 IL-8 水平明显增高, 是急性时相的一种表现, 使脊髓在原发性挤压、挫伤的情况下进一步导致局部缺血而参与脊髓继发性损伤^[8]。本研究发现 EGCG 能剂量依赖性地减少 SCI 大鼠血清中 IL-6 与 IL-8 水平, 提示 EGCG 可能通过抑制炎症因子释放, 拮抗受损脊髓炎症反应, 从而保护受损脊髓

的进一步损伤。

近年来发现,神经营养因子 NT-3、BDNF 可减轻受损脊髓的炎症反应^[9]。NT-3 能减少神经组织 IL-6 的分泌,保护损伤的神经细胞^[10],而 BDNF 是脊髓伤害性感受反应的内源性调质,参与炎症痛觉过敏的产生,与炎症痛有关的行为依赖于背根神经节 BDNF 的释放^[11]。在受损的中枢神经系统中,神经营养因子更重要的作用是减少神经细胞的凋亡并促进轴突大量再生。NT-3 被认为是唯一明确的在脊髓损伤后促皮质脊髓束(CST)生长的神经营养因子,不仅对感觉神经元、运动神经元、交感神经元和多巴胺能神经元发育分化具有维持和促进作用,而且还能促进突起生长^[12]。BDNF 是神经营养素家族中最具活性的一种,它对多种神经元轴索及髓鞘的再生均有促进作用,能诱导神经突起定向生长,决定感觉和交感神经纤维生长方向,还具有运动神经营养活性,能保护脊髓运动神经元在 SCI 后免于死亡^[13]。本实验中,SCI 大鼠经 EGCG 治疗后,脊髓组织内源性 NT-3、BDNF 蛋白表达皆增加,显示 EGCG 能促进神经营养因子表达,进一步加强抗炎、保护受损神经细胞的作用。

综上所述,本实验结果提示 EGCG 对 SCI 大鼠具有抑制炎症因子分泌,促进神经营养因子表达的作用,对 SCI 的继发性损伤可能具有一定的保护作用。本实验为 EGCG 开发提供了思路,也为 SCI 防治提供了新的思路和方法。尚需进一步的研究的是 EGCG 抑制脊髓损伤的作用机制及其他药效学观察。

[参考文献]

[1] Jan M S, Klaus B, Christian-Andreas M, *et al.* Experimental strategies to promote spinal cord regeneration—an integrative perspective [J]. *Prog Neurobiol*, 2006, 78: 91.
[2] 杨迎暴,朴英杰. 白藜芦醇对脊髓损伤损伤后继发性脊髓水肿、乳酸脱氢酶及 ATP 酶活性的影响[J]. 中

国药理学通报, 2002, 18 (5) : 539.

[3] Samantaray S, Sribnick E A, Arabinda D, *et al.* Melatonin attenuates calpain upregulation, axonal damage and neuronal death in spinal cord injury in rats [J]. *J Pineal Res*, 2008, 44: 348.
[4] Lee S, Suh S, Kim S. Protective effects of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate against hippocampal neuronal damage after transient global ischemia in gerbils [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 287: 191.
[5] 闫慧博,金大地,鲁凯伍,等. 稳定性大鼠脊髓全横断模型的建立[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(6) : 1091.
[6] 曹中伟,刘树辉,马云胜,等. 大鼠脊髓半切损伤模型的制备[J]. 锦州医学院学报, 2005, 26(4) : 43.
[7] 孙杰,赵鸿亮,王俊霞,等. 肺心通对慢性肺源性心脏病模型大鼠白介素 8、肿瘤坏死因子 水平的的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(9) : 37.
[8] 曹苏,陈瑾,沈施仁. 脊髓急性损伤早期患者血清 NO、NOS、IL-8 和 IL-6 的变化[J]. 江苏医药, 2008, 34 (2) : 123.
[9] Lu P, Jones L, Tuszynski M H. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2005, 191 (2) : 34.
[10] 陈敬国,蒋犁,方慧云. 神经生长因子对新生大鼠缺氧缺血脑皮质 IL-6 影响的实验研究[J]. 广东药学院学报, 2006, 22(2) : 174.
[11] 向勇,刘菊英,秦成名,等. 星状神经节阻滞对脑源性神经营养因子和白介素-8 的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27(4) : 205.
[12] Taylor A, Shelly E. Effect of controlled delivery of neurotrophin-3 from fibrin on spinal cord injury in a long term model Sara[J]. *J Control Release* 2006, 116: 204.
[13] Taylor S J, Rosenzweig E S, McDonald J W, *et al.* Delivery of neurotrophin-3 from fibrin enhances neuronal fiber sprouting after spinal cord injury[J]. *J Control Release*, 2006, 113 (3) : 226.