

游离铁在实验性脊髓损伤后的动态变化及意义

刘锦波 唐天驹 肖德生 陆任元 沈铁成

【摘要】 目的 观测实验性脊髓损伤后游离铁的动态变化及意义。方法 SD 大鼠随机分组, Allen's 法中度量(50 g·cm)损伤脊髓。采用博莱酶素法测定脊髓损伤后不同时间点伤段脊髓游离铁的含量,同时测定相应时间点 MDA 的变化。结果 脊髓损伤后 30 min, 游离铁的含量即明显升高, 与对照组和正常组相比, 差异有显著性($P < 0.05$); 随后逐步降低; 伤后 6 h 恢复到正常水平。MDA 在伤后 30 min 也明显升高, 与对照组和正常组相比, 差异有显著性($P < 0.05$); 伤后 3 h 时最高, 12 h 恢复到正常。结论 脊髓损伤后游离铁浓度迅速升高, 触发脂质过氧化反应。

【关键词】 脊髓损伤; 游离铁; 脂质过氧化

The dynamic changes of free iron after experimental spinal cord injury in rats LIU Jinbo, TANG Tiansi, XIAO Desheng, LU Renyuan, SHEN Tiecheng. Department of Orthopedics, The Affiliated Hospital of Zhengjiang Medical College, Zhenjiang 212001, China

【Abstract】 Objective To observe the dynamic changes of free iron after experimental spinal cord injury (SCI) in rats. **Methods** One hundred and two SD rats were randomly divided into different groups. SCI models of the rats was prepared by Allen's weight drop method(50g·cm). The levels of free iron of involved spinal cord segments at different time were measured by the method of bleomycin assay. The malondialdehyde(MDA) levels were also measured as well. **Results** At 30 minutes after SCI the level of free iron markedly increased, the differences were statistically significant between the SCI rats and the normal as well as the control rats who received laminectomy but leaving the spinal cord intact ($P < 0.05$), then it progressively decreased and returned to the control levels at 6 hours after the injury. The level of MDA was significantly increased at 30 minutes, reached its peak at 3 hours, and returned to normal level at 12 hours after SCI. **Conclusion** After SCI, the levels of free iron increase quickly and certainly will induce lipid peroxidation

【Key words】 Spinal cord injury; Free iron; Lipid peroxidation

铁是一种涉及神经递质合成和脂质合成的重要的微量元素, 游离铁诱导的脂质过氧化反应在中枢神经系统损伤和退变方面起重要的作用^[1]。为此我们测量了大鼠实验性脊髓损伤后游离铁的动态变化并探讨其意义。

材料与方法

一、试验动物与分组

健康封闭群 SD 大鼠 102 只, 体重(2280 ± 3)g, 随机分成 3 组。即: ①正常组, 不做任何手术; ②对照组, 行椎板切除不损伤脊髓, 又分为 1/2 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h 组 6 个小组; ③损伤组, 椎板切除加脊髓损伤, 又分为 1/2 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h 组 6 个小组。正常组 6 只, 对照组和损伤组的每一小组各 8 只。

二、大鼠损伤模型制备

用 2% 戊巴比妥钠按每公斤体重 40 mg 腹腔内麻醉, 俯卧位固定, 以 T₁₂ 为中心取背正中切口, 咬除 T₁₂

椎板, 暴露 T₁₂ 脊髓。按照 Allen 法复制 5 g × 10 cm 脊髓损伤模型, 并取各相应时相点伤段脊髓以冰盐水中切式匀浆机(ZS83-1 型)在冰浴下制备 1:10 的脊髓匀浆, 备测。

三、游离铁的测定

采用 Evans 和 Halliwell 法^[2]。①试剂: DNA(1 型)、硫酸博莱酶素、Chelex100(购自 SIGMA 公司)、抗坏血酸、MgCl₂(购自上海振新试剂厂)、原子吸收铁标准溶液(购自上海剂量测试技术研究院)。②试剂准备: 所在溶液用双蒸去离子水制备, 所在容器用塑料制品。DNA 按 1 mg/ml 用水溶解, 4℃ 过夜; 硫酸博莱酶素按 15 U/10 ml 用水溶解; 抗坏血酸按 0.7 g/10 ml 用水溶解, 现用现配。抗坏血酸溶液按 0.4 g/10 ml 加入 Chelex100, 其它溶液按 0.3 g/10 ml 加入 Chelex100, 充分混匀后过夜。2 000 g 离心 5 min, 去除 Chelex100, 留取上清液。抗坏血酸溶液再稀释 50 倍备用。③测定程序: 将 DNA(1 mg/ml)0.5 ml, 硫酸博莱酶素(1.5 U/ml)0.05 ml, MgCl₂(50 mM)0.1 ml 混和, 加入 0.05 ml 样品或标准品, 再加 0.1 ml 抗坏血酸

溶液(0.75 mM)。反应液在 37℃ 恒温振荡器孵化 1 h, 加入 0.1 M 的 EDTA 0.1 ml 终止反应, 再加 0.5 ml 的 TBA(1%, w/v, 50 mM 的 NaOH 配制)和 0.5 ml 25% 的 HCL, 80℃ 水浴 20 min 显色, 2 500 g 离心 20 min, 室温下波长 532 nm 比色上清液。空白对照以水替换标本, 样本对照不加硫酸博莱酶素。

四、丙二醛(MDA)的测定^[3]

10% 组织匀浆 3 000 rpm 离心 8 min, 取 0.2 ml 加入 20% 三氯醋酸(TCA), 室温静置 20 min, 加 2 ml 0.1 N 的 HCL 和 1.0 ml 0.67% 的 TBA, 混匀。95℃ 水浴 1 h, 4 ml 正丁醇混匀, 3 000 rpm 离心 10 min, 波长 532 nm 比色。

五、蛋白的测定

按 Lowry 法测定。

六、统计学分析

采用 SPSS 统计软件进行单因子方差分析。

结 果

一、脊髓损伤后游离铁的变化

标准铁溶液用原子吸收铁标准, 浓度为 0, 5, 10, 15, 20 μmol , 得到回归方程: $S = 0.0218C - 0.0312$, $R^2 = 0.9591$, 按回归方程求出样品的游离铁浓度(表 1)。由表 1 可知, 大鼠损伤节段脊髓游离铁的浓度在损伤后 1/2 h 即明显升高, 随后逐步回调。到 6 h 即恢复正常。

二、脊髓损伤后 MDA 的变化(表 2)

表 2 显示, 大鼠伤段脊髓 MDA 在损伤后 1/2 h 明显升高, 伤后 3 h 最高, 随后回调, 至 12 h 恢复正常。

表 1 大鼠伤段脊髓游离铁的变化($\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白, $\bar{x} \pm s$)

分组	动物数	取材时间					
		1/2 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
正常组	6	2.57 $\pm$ 0.33	—	—	—	—	—
对照组	48	2.75 $\pm$ 0.45	2.70 $\pm$ 0.24	2.83 $\pm$ 0.36	2.62 $\pm$ 0.25	2.79 $\pm$ 0.35	2.71 $\pm$ 0.37
损伤组	48	4.98 $\pm$ 0.86 *	3.77 $\pm$ 0.29 *	3.32 $\pm$ 0.68 *	2.69 $\pm$ 0.49	2.85 $\pm$ 0.69	2.65 $\pm$ 0.36

注: 与正常组和对照组相比, * $P < 0.05$

表 2 大鼠伤段脊髓 MDA 的变化($\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白, $\bar{x} \pm s$)

分组	动物数	取材时间					
		1/2 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
正常组	6	1.11 $\pm$ 0.29	—	—	—	—	—
对照组	48	2.43 $\pm$ 0.41	2.40 $\pm$ 0.42	2.44 $\pm$ 0.39	2.51 $\pm$ 0.48	2.48 $\pm$ 0.50	2.31 $\pm$ 0.42
损伤组	48	3.22 $\pm$ 0.42 *	3.09 $\pm$ 0.52 *	4.33 $\pm$ 0.76 *	3.98 $\pm$ 0.86 *	2.42 $\pm$ 0.39	2.57 $\pm$ 0.53

注: 与正常组和对照组相比, * $P < 0.05$

讨 论

一、游离铁的概念

中枢神经系统有较多铁, 在生理情况下细胞内铁大部分与铁蛋白紧密结合, 被铁蛋白分隔, 少量与低分子量分子如 ATP、GTP、枸橼酸等结合, 以低分子量形式存在, 即“低分子量铁”(low molecular weight iron), 又称“游离铁”(free iron)、“不稳定铁”(labile iron)、“螯合铁”(chelate iron)、“疏松结合铁”(loose-bound iron)或“细胞内的过渡铁库”(intracellular transit iron pool)。游离铁激发自由基的形成, 诱导广泛的脂质过氧化, 导致继发性细胞损伤, 是许多疾病形成的原因^[1,4]。

二、博莱酶素法测定游离铁的原理

博莱酶素是由轮枝链霉菌所产生的一种糖多肽抗生素。在 Fe^{2+} 存在时, 博莱酶素结合 DNA 的鸟嘌呤并降解 DNA, 形成丙二醛(MDA), 与硫代巴比妥酸(TBA)反应, 生成粉红色的硫代巴比妥酸反应物

(TBARS)。由于其它过渡金属离子结合博莱酶素不能降解 DNA, DNA 降解完全依赖 Fe^{2+} 的存在, 因此降解率可用来测定 Fe^{2+} 浓度。这种方法可用来测定生物体液内的游离铁, 病理情况下人的关节滑液、脑脊液和大鼠的胸腔渗出液中已检测到微摩尔浓度的游离铁^[5,8]。

三、脊髓损伤后游离铁的变化及意义

损伤后脊髓组织总铁浓度升高^[7], 但游离铁的变化未见报道。本实验发现, 损伤后 1/2 h 游离铁即有明显升高, 然后逐步降低, 到 6 h 才恢复到正常。脊髓损伤后, 局部组织缺血缺氧, 当 $\text{pH} < 6$ 时铁从转铁蛋白特异位点脱落, 大量的游离铁从铁蛋白释放; H_2O_2 和脂氢过氧化物(LOOH)也促进血红蛋白释放铁, 在 $\text{pH} < 6$ 时更明显释放 Fe^{2+} 的来源之一是血红蛋白, 血红蛋白可明显抑制脑匀浆和脑脊液 ATP 酶活性和启动脂质过氧化, 而螯合游离铁的去铁敏可有效抑制这两个效应^[11]。以上几方面导致损伤后脊髓组织游离铁浓度迅速升高。游离铁的毒性作用有^[10]: (1) 催化巯基化

合物的自氧化作用,促使 $O_2^- \cdot$ 和 H_2O_2 的生成;(2)参与 Fenton 反应 $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH \cdot + OH \cdot$, 形成高毒性的羟自由基;(3)与 $O_2^- \cdot$ 作用生成高活性的高铁酰(perferryl)和铁酰(ferryl)自由基复合物;(4)催化脂氢过氧化物均裂产生 $ROO \cdot$ 和 $RO \cdot$, 引发新的脂质过氧化的链式反应,分解代谢产生毒性醛。由于脊髓组织含有丰富的不饱和脂肪酸,易发生脂质过氧化,这样损失后游离铁升高便触发脊髓组织广泛的脂质过氧化,组织出血,红细胞溶解,血红蛋白本身能氧化产生 $O_2 \cdot$ 和催化 LOOH 反应,促进脂质过氧化,造成细胞坏死,功能丧失。本实验测定的 MDA 与游离铁几乎是同步升高,只是 MDA 升高时间维持稍长,说明游离铁是导致脊髓脂质过氧化的原因之一。

参 考 文 献

- 1 Hall ED, Braugher JM. Free radicals in CNS injury, in molecular and cellular approaches to the treatment of neurological disease. New York: Raven Press, 1993. 81-105.
- 2 Evans PJ, Halliwell B. Measurement of iron and copper in biological system;bleomycin and copper-phenanthroline assays. Methods Enzymol, 1994, 233:82-92.
- 3 Casini AF, Ferrari M, Pompella A, et al. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene-intoxicated mice. Am J

- Pathol, 1986,123:520-531.
- 4 Kozlov AV, Yegorov Dyu, Vladibirov YA, et al. Intracellular free iron in liver tissue and liver homogenate: studies with electron paramagnetic resonance on the formation of paramagnetic complexes with desferal and nitric oxide. Free Radic Biol Med, 1992,13:9-16.
- 5 Gutteridge JM, Rowley DA, Halliwell B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. Detection of 'free' iron in biological systems by using bleomycin-dependent degradation of DNA. Biochem J, 1981,199:263-265.
- 6 Gutteridge JM, Hou YY. Iron complexes and their reactivity in the bleomycin assay for redox-promoting loosely-bound iron. Free Radic Res Commun, 1986,2:143-151.
- 7 Scuotto A, Borriello R, Paggio G, et al. Valuation of some biological parameters in acute spinal cord trauma; experimental study in rabbits. J Neurosurg Sci, 1984, 28:145-147.
- 8 Gutteridge JM. Iron and oxygen radicals in brain. Ann Neurol, 1992, 32:S16-21.
- 9 孙存普, 张建中, 段绍瑾, 主编. 自由基生物学导论. 合肥: 中国科技大学出版社, 1999. 50.
- 10 陈媛, 周政, 主编. 自由基医学. 北京: 人民军医出版社, 1991. 78.
- 11 Van Bergen P, Rauhala P, Spooner CM, et al. Hemoglobin and iron-evoked oxidative stress in the brain; protection by bile pigments, manganese and S-nitrosoglutathione. Free Radic Res, 1999, 31:631-640.

(收稿日期:2001-09-05)

(本文编辑:郭正成)

《中华物理医学与康复杂志》 诚邀广告业务

竭诚欢迎各医药及医疗器械厂商在本刊刊登产品广告。想提高您的产品的知名度?想树立良好的企业形象?想拓展您的业务范围?那就请您选择《中华物理医学与康复杂志》作为您的代言人;让我们来助您一臂之力!

竭诚欢迎本刊广大读者、作者代为联系广告业务。凡为本刊成功联系广告业务者,均将获得丰厚回报;免费赠阅本刊一年;还有更多更多……

联 系 人: 熊芝兰, 郭铁成

联系地址: 武汉市解放大道 1095 号同济医院

《中华物理医学与康复杂志》编辑部

邮政编码: 430030

联系电话: 027-83662874

图文传真: 027-83662264

E-MAIL: cjpmmr@tjh.tjmu.edu.cn 或 cjpmmr@sina.com 或 cjpmmr@hotmail.com

《中华物理医学与康复杂志》编辑部