

· 实验研究 ·

脊髓损伤后自由基变化及丹参对自由基影响的实验研究

许翔¹ 江曙²

(1. 安徽省立医院, 安徽 合肥 230001; 2. 安徽医科大学附属医院, 安徽 合肥 230002)

【摘要】 目的 了解实验性脊髓损伤后血液和脊髓组织中自由基的变化及丹参对自由基的清除作用。方法 选用家兔 35 只, 分为正常组、损伤组、生理盐水对照组、丹参治疗组 A 和 B 等 5 组, 后 4 组按 Allen 氏法致伤造成脊髓损伤模型, 后 3 组术后分别立即静脉注射生理盐水, 不同浓度丹参注射液。2 小时后取血液和脊髓组织测丙二醛 (MDA) 和超氧化物歧化酶 (SOD), 并观察脊髓病理变化。结果 脊髓损伤后血液和脊髓组织中 MDA 升高, SOD 下降, 使用丹参后可使 MDA 降低, SOD 升高。结论 脊髓损伤后血液和脊髓组织中自由基含量升高, 丹参能够有效清除自由基, 两个丹参治疗组之间的抗自由基作用无显著性差异。

【关键词】 实验性脊髓损伤 自由基 丹参

Experimental Study on Free Radical Change after Spinal Cord Injury and the Effect of Salvia Miltiorrhiza on Free Radical Xu Xiang, Jiang Shu. Anhui Provincial Hospital (Hefei 230001)

【Abstract】 **Objective** To study the changes of free radical in blood and spinal cord after spinal cord injury (SCI) and the elimination of free radical with Salvia Miltiorrhiza. **Methods** Thirty-five rabbits were divided into five groups: normal group without SCI and treatment, injured group applied SCI only, normal saline group injected normal saline immediately after SCI, Salvia Miltiorrhiza A and B groups injected Salvia Miltiorrhiza in low and high dosage, respectively, immediately after SCI. Two hours later, samples of blood and spinal cord were taken out to assay the contents of MDA and SOD and to examine the pathological changes of spinal cord. **Results** After SCI, MDA was increased and SOD was decreased in both blood and spinal cord. After injecting Salvia Miltiorrhiza, MDA was decreased and SOD was increased in both blood and spinal cord. **Conclusion** Free radicals in blood and spinal cord were increased after SCI, and free radicals can be eliminated efficiently with Salvia Miltiorrhiza. There was no significant difference in elimination of free radicals between two Salvia Miltiorrhiza treatment groups.

【Key words】 Experimental spinal cord injury Free radical Salvia Miltiorrhiza

脊髓损伤后引起的出血、缺血和缺氧可导致一系列进行性、继发性改变, 结果使病变向纵横方向发展, 范围逐渐扩大, 使神经传导功能受损, 甚至永久丧失^①。目前脊髓继发性损害的发病机理尚未完全阐明, 其中自由基与脂质过氧化损伤学说在脊髓损伤发病机理研究中尤受重视。本实验旨在了解脊髓打击伤后外周血液及脊髓组织中自由基的变化及早期应用丹参对自由基水平的影响。

材料和方法

1. 实验动物及损伤模型 选用成年家兔 35 只, 雌雄不限, 体重 2.5 ~ 3.5kg。所有动物均静脉注射 3% 戊

巴比妥钠麻醉, 俯卧位固定于手术台上, 脱毛后常规碘酒、酒精消毒术野, 以 T₁₂为中心取后正中切口, 暴露 T₁₁ ~ T₁₃ 椎板和棘突, 先切除 T₁₂ 棘突及椎板, 暴露硬脊膜, 其余椎板棘突留待取材时切除。除正常组外, 其它 4 组均按 Allen 氏法致伤, 致伤力 200gcf, 造成全瘫模型。

2. 分组 所有动物随机分为 5 组, 每组 7 只, 分别为正常组、损伤组、生理盐水对照组、丹参治疗组 A 和丹参治疗组 B。正常组动物仅暴露硬脊膜, 损伤组暴露硬脊膜后给予 200gcf 打击; 生理盐水组于打击后立即静脉推注生理盐水 50ml; 丹参组 A 和 B 分别于打击后按 1ml/kg 和 3ml/kg 剂量静脉注射丹参注射液, 总液

量用生理盐水加至 50ml。所有动物均在 2 小时后抽取静脉血 3ml (其中 1ml 加肝素抗凝以备测 SOD, 2ml 取血浆测 MDA), 活体取脊髓标本, 长约 3.5cm, 4 生理盐水洗净残血, 留取病理标本后称取脊髓组织 5g, 4 生理盐水中按 1:10 (W/V) 制成组织匀浆, 以备测 MDA 和 SOD。

3. 生化测定方法 (1) 丙二醛 (MDA) 测定: 按硫代巴比妥酸 (TBA) 法^[3]测定, 721 型分光光度计比色, 计算 MDA 含量。其测定原理为: 过氧化脂质在酸性条件下分解成 MDA, MDA 与 TBA 结合成红色色素, 其吸收峰为 535nm^[3]。(2) 超氧化物歧化酶 (SOD) 测定: 以无水乙醇、氯仿抽提, 抽提液按焦性没食子酸-NBT 法^[4]测定, 721 型分光光度计比色, 计算 SOD 含量。其测定原理是: 利用氮蓝四唑 (NBT) 被 $\cdot O_2^-$ 还原成红色甲, 其吸收峰为 540nm, 再用 SOD 抑制还原反应^[5]。

4. 组织病理学检查 每组随机取 5 例, 将脊髓标本制成石蜡切片, 采用 HE 染色, 10×10 低倍视野观察脊髓出血、水肿等, 10×40 高倍视野观察神经细胞变性、坏死等, 并进行半定量, 其标准为:

出血: +++ 大片出血; ++ 中度弥漫性出血; + 点灶状出血。

神经细胞变性坏死: +++ 神经细胞完全消失或仅有个别神经细胞; ++ 大部分神经细胞消失或残存少量神经细胞; + 神经细胞变性或部分神经细胞消失。

水肿: + 有水肿; - 无水肿。

5. 统计方法 采用两均数比较的 t 检验, 分别对正常组与损伤组, 损伤组与生理盐水组、损伤组与丹参组、丹参组 A 和 B 之间进行比较。

结果

1. 丙二醛 (MDA) 含量变化 在血液和脊髓组织中, 损伤组与生理盐水组 MDA 含量高于正常组 ($P < 0.01$); 损伤组与生理盐水组之间无显著性差异 ($P > 0.05$); 两个丹参治疗组均低于损伤组 ($P < 0.01$); 丹参治疗组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。(见表 1)

2. 超氧化物歧化酶 (SOD) 含量变化 在血液和脊髓组织中, 损伤组与生理盐水组 SOD 含量均低于正常组 ($P < 0.01$); 损伤组与生理盐水组之间无显著性差异 ($P > 0.05$); 两个丹参治疗组均高于损伤组 ($P < 0.01$, 其中脊髓组织中丹参组 AP 值小于 0.05); 丹参治疗组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。(见表 2)

表1 血及脊髓组织中 MDA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	血浆 (nmol/ml)	脊髓组织 (nmol/g 湿重)
正常组	5.26 ± 0.18	77.86 ± 2.10
损伤组	6.74 ± 0.32	99.54 ± 6.36
生理盐水组	6.57 ± 0.35	96.49 ± 2.53
丹参组 A	4.11 ± 0.49	84.40 ± 4.31
丹参组 B	3.95 ± 0.25	82.09 ± 3.02

表2 血及脊髓组织中 SOD 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	全血 (ug/ml)	脊髓组织 (nmol/g 湿重)
正常组	34.03 ± 5.48	353.51 ± 26.72
损伤组	21.68 ± 3.39	241.53 ± 25.12
生理盐水组	21.45 ± 3.48	238.91 ± 27.68
丹参组 A	29.98 ± 6.22	297.71 ± 32.65
丹参组 B	30.25 ± 6.48	320.58 ± 39.90

3. 组织病理学变化 除正常组外, 其它 4 组共 20 只家兔均有明显的灰白质出血、水肿, 伴有大片的神经细胞变性坏死, 各组之间无明显差别。(见表 3)

表3 各组的脊髓组织病理学变化

组别	灰 质		白 质	
	出血	神经元变性坏死	出血	水肿
正常组	- ~ +	- ~ +	- ~ +	-
损伤组	++ ~ +++	++ ~ +++	++ ~ +++	+
生理盐水组	++ ~ +++	++ ~ +++	++ ~ +++	+
丹参组 A	++ ~ +++	++ ~ +++	++ ~ +++	+
丹参组 B	++ ~ +++	++ ~ +++	++ ~ +++	+

讨论

脊髓组织中的神经细胞及髓鞘中的亚细胞结构中都具有生物膜结构, 这些结构的正常维持着脊髓代谢及功能正常进行。生物膜中的不饱和脂肪酸对自由基及脂质过氧化产物具有极强的敏感性, 很容易造成膜的损伤, 结果引起脊髓的继发性改变, 导致神经细胞变性坏死及出血水肿加重等。脊髓损伤后 5~30min 自由基即有明显升高^[6]。本组损伤后 2 小时测定, MDA 明显升高, 且病理切片上可见神经细胞大片坏死、变性, 同时伴有严重的灰白质出血, 从而提示脊髓损伤早期病理基础是由于自由基引起的脂质过氧化反应所导致的膜结构与功能的改变。因此, 脊髓损伤早期治疗的关键是抑制和清除自由基。

MDA 为过氧化脂质的代谢产物, 而 SOD 为自由基清除剂, 在清除自由基的同时本身被消耗, 因此, 它们的含量均可反映体内自由基的变化情况。本组实验表明, 血液中的 MDA 和 SOD 含量与脊髓组织中的含量呈平行变化, 脊髓损伤后外周血液和脊髓组织中 MDA 分别上升 28.14% 和 27.85%, SOD 分别下降

36.29% 和 31.68%，变化幅度大致相等，提示脊髓损伤后局部立即产生大量 MDA，它在引起脊髓继发性损伤和 SOD 下降的同时，又大量向血液中弥散，结果导致外周血液中 MDA 升高，SOD 下降。另外，从各组测量值的标准差来看，MDA 的数值较稳定，而 SOD 则变化较大，这可能与 SOD 为酶类物质，易受体内各种因素影响有关。可以认为：血液中的 MDA 和 SOD 变化基本上可以正确反映脊髓组织中的 MDA 和 SOD 变化，而 MDA 则更为稳定可靠，SOD 稳定性相对较差。

丹参注射液为中药提取制剂，其有效成分主要为水溶性的丹参素^[7]，副作用小，安全范围剂量大，但有效作用时间较短，宜静脉滴注或静脉推注给药^[8]。其主要药理作用为：(1) 改善微循环，降低血液粘滞度，丹参可使 TXA₂ 显著下降，PGI₂ 上升，结果使血小板聚集受到抑制，局部血管扩张，因而阻止脊髓的继发性缺血缺氧^[9]；(2) 提高机体的耐缺氧能力；(3) 影响血液动力学，参与对血液分配的调节^[10]；(4) 近年来研究表明，丹参具有抗脂质过氧化及提高 SOD 活性作用^[11]，能够保护线粒体膜，改善腺苷酸代谢，使组织的能量代谢维持正常，从而达到保护组织不受自由基的继发性损伤作用^[12]。同时，丹参又是自由基清除剂，主要通过超氧阴离子 ($\cdot O_2^-$) 的清除作用来阻止生物膜的脂质过氧化，从而起到保护生物膜的作用^[13]。丹参对羟自由基 ($\cdot OH$) 也有清除作用^[14]。本组实验中，丹参治疗组与损伤组相比较，光镜下无明显组织学改善，均为大片神经细胞变性坏死，脊髓内大量出血，这说明丹参并不能逆转已损伤的神经细胞，其主要作用是保护尚未受到损伤或已受损伤但尚未死亡的神经细胞免受进一步的继发性损伤。从而保护残存脊髓的功能，因此，临床上宜早期用药。从出血情况看，本组实验并无使用丹参后加重出血的表现，这与梁声琼等^[15]报导的丹参制剂早期使用可加重脊髓出血不符，可能因为脊髓损伤后的大量出血是机械性损伤和脂质过氧化引起，与丹参的使用无关。从 MDA 和 SOD 含量变化看，两个丹参治疗组与损伤组相比，经 t 检验 P 值小于 0.01 或 0.05，说明两组中丹参均有明显降低血液及脊髓组织中 MDA、升高 SOD 的作用，这与丹参能够清除自由基，抑制脂质过氧化反应的药理作用相符。两个丹参治疗组之间，其抑制 MDA、升高 SOD 的水平经 t 检验无显著性差异 ($P > 0.05$)，说明在本实验剂量范围内，丹参的抗脂质过氧化作用并不随着剂量的增加而增强，因此提示无需大剂量给药即可达到抗脂质过氧化的效果，这为临床合理用药提供了一定依据。至于给予更大剂量丹参或增加给药次数能否增强其抗脂质过氧化能力，尚待进一

步研究。

结论：(1) 实验性脊髓损伤后血液及脊髓组织中 MDA 升高，SOD 活力下降，且二者在血液和脊髓组织中的变化是一致的。(2) 丹参具有清除自由基、抑制脂质过氧化作用，对防止脊髓损伤后的继发性损伤具有重要意义。(3) 在本实验剂量范围内，丹参的抗脂质过氧化作用并不随剂量的增加而增强，因此无需大剂量给药，为临床合理用药提供了一定依据。

参考文献

- 1) Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma- I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. Lab Invest, 1978, 39 (3): 254
- 2) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem, 1979, 95 (2): 351
- 3) 陈本懋. 自由基与过氧化脂质与医学的关系. 河南医科大学学报, 1978, 22 (3): 319
- 4) Minami M, Yoshikawa H. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. Clin Chim Acta, 1979, 92 (3): 337
- 5) 陈淑英, 朱汉民, 谢辉, 等. 人红细胞内超氧化物歧化酶比色测定法. 中华老年医学杂志, 1986, 5 (2): 117
- 6) Hall ED, Branghler JM. Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration. Cent Nerv Syst Trauma, 1986, 3 (4): 281
- 7) 杨春欣, 张冰天. 丹参水溶性有效成分——丹参素的提取分离和注射剂的试制. 药学通报, 1981, 16 (11): 646
- 8) 惠惠铭. 丹参制剂的临床运用及其活血化瘀原理的研究. 中华医学杂志, 1978, 58 (3): 180
- 9) 杨光, 余金甫, 熊桂仙, 等. 复方丹参液治疗失血性低血压兔时软脑膜微血管径及 PGE₂/TXA₂ 平衡的变化. 中华神经外科杂志, 1990, 6 (3): 176
- 10) 郑国辉, 沛泽宽. 丹参化学成分的研究概况. 中国药学杂志, 1989, 24 (1): 6
- 11) 涂淑珍, 欧阳静萍, 凌宏. 丹参对家兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用. 湖北医学院学报, 1990, 11 (2): 115
- 12) 马丽英, 王孝铭, 张国义. 丹参制剂对缺血性心肌腺苷酸代谢的影响. 哈尔滨医科大学学报, 1986, 20 (3): 102
- 13) 张力, 王孝铭, 梁殿权. 丹参对缺血性再灌注大鼠心肌线粒体膜的保护作用. 哈尔滨医科大学学报, 1989, 23 (4): 256
- 14) 杨卫东, 朱鸿良, 赵保路. 丹参的自由基清除作用. 中国药理学通报, 1990, 6 (2): 118
- 15) 梁声琼, 周祥庭, 聂正明. 丹参对家兔实验性脊髓损伤的作用. 河南医学院学报, 1984, 19 (4): 16

(收稿: 1998-04-01; 修回: 1998-09-19)