

• 基础研究 •

醒髓汤对实验性大鼠脊髓损伤组织中降钙素基因相关肽的影响

张晓艳¹, 周鹏¹, 姬军凤²

(1. 温州医学院, 浙江 温州 325035; 2. 陕西中医学院)

【摘要】 目的: 研究醒髓汤对大鼠急性脊髓损伤治疗作用及对神经组织中降钙素基因相关肽(CGRP)的影响。方法: 48只大鼠随机分为3组, 空白对照组20只, 模型组8只, 醒髓汤组20只。用改良Allen's法造脊髓损伤模型。空白对照组仅咬除棘突, 剥离椎板, 正常饲养; 模型组造模后灌生理盐水; 醒髓汤组灌中药醒髓汤。于手术后2、6、24 h用斜板试验评价大鼠的神经功能, 并取脊髓匀浆, 测量脊髓中CGRP的含量。结果: 模型组CGRP在造模成功后逐渐上升, 6 h达到顶峰, 24 h恢复至正常水平。醒髓汤组与模型组伤后2 h无明显差别, CGRP均升高, 6 h后达到顶峰, 两组与空白对照组相比有显著性差异($P < 0.01$)。而醒髓汤组在6 h后匀浆组织中CGRP含量高于模型组($P < 0.05$)。醒髓汤组与模型组于伤后6 h在神经功能恢复方面无显著性差异。但在24 h后醒髓汤组与模型组Tavor评分有显著性差异($P < 0.05$)。结论: 醒髓汤对大鼠脊髓损伤有较好的治疗作用, 并可增加脊髓中CGRP的含量。

【关键词】 醒髓汤; 脊髓损伤; 斜板试验; 降钙素基因相关肽; 大鼠

Effect of *Xingsui* decoction(醒髓汤) on calcitonin gene related peptide(CGRP) of spinal cord injury in rats ZHANG Xiaoyan^{*}, ZHOU Peng, JI Junfeng^{*} Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective To study the therapeutic effect of *Xingsui* decoction on spinal cord injury (SCI) and the effect on the level of CGRP of spinal cord in rats. **Methods** Forty-eight SD rats were randomly divided into 3 groups: 20 rats in the blank group, 8 in the model group and 20 in *Xingsui* decoction group. The rats model was made by Allen's weight drop method. Rats in blank control group were only cut off spinal process and decoherenced vertebral plate, and were fed normally. After models were made successfully, rats in model group were fed with saline and rats in *Xingsui* decoction group were fed with *Xingsui* decoction. The nerve function was measured on the inclined plane test and the content of CGRP in spinal cord was determined at 2, 6, 24 hours after injury by the Allen's method. **Results** In model group, the content of CGRP in spinal cord increased significantly after injury and reached the zenith at 6 hours and recovered the normal level at 24 hours. *Xingsui* decoction group had no significant difference as compared with model group at 2 hours and CGRP increased and reached the zenith at 6 hours. There were significant difference on CGRP between these two groups and the blank control group. The content of CGRP in *Xingsui* decoction group at 6 hours after injury was higher than that of model group. There were no significant difference on recovery of nerve function between *Xingsui* decoction group and model group at 6 hours after injury. But at 24 hours after injury there were significant difference on Tavor scoring between these two groups. **Conclusion:** *Xingsui* decoction has good therapeutic effect on spinal cord injury, and increase the content of CGRP in spinal cord.

Key words *Xingsui* decoction; Spinal cord injuries; Inclined plane technique; Calcitonin gene related peptide (CGRP); Rats

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007, 20(5): 304-306 www.zggszz.com

脊髓损伤(SCI)是目前医学科学工作者面临的一个世界性难题, 如何解决脊髓受伤后带来的功能障碍是急需解决的问题。实验证明脊髓损伤后继发性改变是导致损伤加重的主要因素, 因此防治或减轻继发性损伤是治疗的关键。近年来中医药治疗脊髓损伤取得了可喜成果, 有报道用川芎注射液、三七注射液治疗脊髓损伤疗效较好^[1-2]。根据临床经验拟定

醒髓汤, 观察其对大鼠脊髓损伤的治疗作用并同时测量受伤脊髓中降钙素基因相关肽(CGRP)含量变化, 以推测脊髓中血流量的变化, 现报告如下。

1 材料与与方法

1.1 药品与试剂

1.1.1 醒髓汤 由大黄、泽泻、三七、川芎、黄芪、马钱子等组成。将上述各味中药置于砂锅内加相当于复方药材体积5倍的纯净水浸泡1 h, 然后煮沸30 min, 滤出药液, 再加入5倍

纯净水,继续煮沸 15 min 过滤,合并两次滤液,水浴浓缩,制成每毫升药液含原药材为 0.625 g

1.1.2 试剂 ①注射用青霉素钠 80×10⁴ U/支,华北制药厂生产,批号:2000302786。②生理盐水:500 ml/瓶,西安制药厂生产。③10%水合氯醛:陕西省中医学院附属医院制药厂生产。④降钙素基因相关肽放免药盒:解放军总医院科技开发中心放免所提供。

1.2 实验器材 导向管:长 25 cm,内径 1.0 cm 的玻璃导管 1支;脊髓固定器:0.5 cm×0.8 cm 长方形凹状塑料薄片 1个;击打器:2 g 砝码 1只,直径约 0.5 cm;斜板:10 cm×20 cm 长方形厚约 1.5 mm 塑料板 1块;骨科常规手术器材,由陕西中医学院骨伤实验室提供;高速 DL-8R 低温冷冻离心机,由陕西省中医学院放免中心提供。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制备 SD 大鼠 48只,体质量(200±50) g,采用改良 Allen's 法,制备脊髓损伤动物模型。方法为:给予大鼠 10% 水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射麻醉,取俯卧位固定于手术台上,剪除大鼠背毛,常规消毒铺巾后取 L₁为中心,后正中纵行切开长约 2~3 cm 切口,剥离双侧椎旁肌,小心咬除 T₁₂-L₂ 棘突椎板,自动拉钩牵开椎旁肌,暴露硬脊膜,明胶海绵压迫止血,在 L₁放置长方形凹状塑料垫片,其凹面附于硬脊膜上。放置自制的 Allen's 撞击器,令直径 1 cm 导向管垂直正对垫片,使 1个 2 g 砝码自 25 cm 高处顺导向管自行下落撞击垫片,可听到局部钝性撞击声,迅速移开击打器,同时见大鼠身体颤动,双下肢抽动,摆尾,说明造模成功。术后逐层缝合伤口,并给予大鼠青霉素钠 80×10⁴ U/只,预防感染。

1.3.2 分组 将 48只大鼠随机分为 3组。模型组:8只大鼠造模成功后即开始灌生理盐水,2 ml/次,3次/d。空白组:20只大鼠仅咬除棘突,剥离椎板,保持相同条件,正常饲养,不做其他处理。醒髓汤组:20只大鼠造模成功后即开始灌中药浸膏 0.625 g/ml 2 ml/次,3次/d。

1.4 观察指标与方法

1.4.1 斜板试验功能测定 造模成功前及术后 2、6、24 h 对每只实验动物进行功能测定。将大鼠置于一块有条纹橡胶覆盖的斜板上,大鼠纵轴与斜板轴线垂直。斜板角度由 0°缓慢上升到大鼠不能保持原有位置 5 s 时读取斜板度数。每只大鼠测 3次,取均值。评价前所有动物应排除膀胱充盈,以免影响活动。

1.4.2 降钙素基因相关肽含量测定 大鼠禁食 12 h 后造模,于术后 2、6、24 h 在斜板试验测完后分别固定、取材、匀浆,加入缓冲液(PBS)的试管内,充分混合后,置于高速低温冷冻离心机内,离心后取上清液,按放免试剂盒说明书操作。在 FJ2101 双道液体闪烁计数器上进行放免测定。

1.5 统计学处理 数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析进行检验。

2 结果

2.1 斜板试验结果 从表 1 可以看出 SCI 后,造模动物斜板试验角度明显下降 31.5°左右,说明造模成功。模型组、醒髓汤组在术后 2、6 h 斜板角度下降无明显差异(P>0.05)。术后 24 h 醒髓汤组斜板角度明显上升,与模型组比较有显著性差异(P<0.01)。但模型组与醒髓汤组在术后 6 h 比较却无统计学意义(P>0.05)。

表 1:斜板试验测定结果($\bar{x} \pm s$ 度)

Tab 1 Result of the inclined plane test ($\bar{x} \pm s$ degree)

组别	鼠数	术前	术后 2 h	术后 6 h	术后 24 h
空白组	8	65.10±1.22	64.47±2.49	64.52±2.79	63.79±3.39
模型组	20	64.26±2.92	29.83±2.32	31.34±1.92	34.19±2.11
醒髓汤组	20	63.52±1.95	32.60±1.48	33.02±2.23	41.56±1.89*

注:与模型组比较,*P<0.01

Note as compared with the model group *P<0.01

2.2 CGRP 含量测定结果 从表 2 看出 SCI 后,模型组、醒髓汤组 CGRP 均升高,术后 6 h 达到顶峰,24 h 后恢复至术前水平。在术后 6 h 醒髓汤组与模型组 CGRP 均明显升高,与空白组相比差异有显著性意义(P<0.01),醒髓汤组与模型

组 CGRP 比较有统计学意义(P<0.05)。术后 24 h CGRP 恢复到空白组水平,组间差异无显著性意义。总之,本试验结果表明,大鼠脊髓损伤后,继发性脊髓损伤过程中,醒髓汤对受伤脊髓中 CGRP 含量有明显提高作用。

3 讨论

醒髓汤以活血化瘀、行气活血、通络止痛为主。旨在改善 SCI 后局部缺血、缺氧状态,从而减轻或阻断 SCI 后继发性病理改变发生过程,促进神经功能恢复。其中主要药物药理研究显示:三七所含三七素有明显止血作用,三七总皂甙具有改善微循环,增加血流量,扩张痉挛血管,阻断内流,抑制血小板聚积及抗脂质过氧化等作用^[1-2]。泽泻中含有泽泻醇,泽泻醇有明显利尿作用,能明显消除脊髓水肿^[3]。川芎嗪明显对血小板聚集有抑制作用,能防止血管痉挛造成的局部血栓。川芎还能抑制平滑肌 Ca²⁺ 内流,有改善微循环、增加冠脉血量、镇静等作用^[4-5]。马钱子所含土的宁能提高中枢神经系统的兴奋性,提高延髓血管运动中枢,还能使脊髓反射兴奋,

表 2 降钙素基因相关肽含量测定结果($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

Tab 2 Result of content of calcitonin gene related peptide ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	鼠数	术后 2 h	术后 6 h	术后 24 h
空白组	8	29.440±9.274	67.956±36.116	32.375±20.359
模型组	20	30.570±5.121	45.134±17.386	24.873±7.600
醒髓汤组	20	30.185±15.639	117.10±20.585 [△]	59.036±41.137
F 值			5.631	

注:与模型组比较,*P<0.05;与空白组比较,[△]P<0.01

Note as compared with the model group *P<0.05 as compared with blank group, [△]P<0.01

促进骨髓造血^[6]。黄芪能明显改善全血比黏度,全血还原黏度,还能消除微循环障碍。同时,黄芪亦有利尿消肿作用^[7]。

一般认为 SCI后脊髓血流量改变是脊髓坏死和神经功能丧失的重要原因^[8],SCI后的高凝状态也进一步加重缺血程度^[9]。缺血是继发性脊髓损伤的重要原因之一。脊髓局部缺血除与血管直接损伤有关外,还与血管活性物质释放引起血管痉挛有关^[10]。Ca²⁺对于维持正常细胞功能至关重要,SCI后缺血状态使细胞外Ca²⁺内流超载可激活蛋白溶酶和脂质溶酶,引起细胞损伤或坏死。有学者认为血流量降低并不一定比血管内皮损伤更重要。血管内皮细胞结构和功能的完整对维持机体正常生理和新陈代谢等方面均有重要意义。有实验发现,缺氧可引起血管内皮细胞膜流动的升高^[10]。膜流动性明显升高或降低都将影响细胞正常的活动。CGRP广泛分布于中枢和外周神经及血管系统中,是目前已知的最强舒血管物质之一,它能降低外周阻力,改善微循环障碍,调节血管内皮细胞功能状态,促进周围神经再生。内皮细胞缺氧时细胞内Ca²⁺含量与缺氧前相比明显上升,而Mg²⁺含量明显下降,Ca²⁺在细胞生理活动、病理损伤过程中起着重要作用,Mg²⁺与细胞代谢、离子转运等密切相关。缺氧时可引起血管内皮细胞结构和功能的改变,细胞膜流动性增加,膜通透性增高,同时伴有细胞内Mg²⁺丢失,从而引起血管内皮细胞功能及结构损害。CGRP对血管内皮细胞缺氧损伤具有保护作用,还可作为一种局部因子刺激血管内皮细胞的增殖。可降低细胞膜流动性及膜的通透性,减少细胞内Mg²⁺丢失,显示CGRP具有细胞膜稳定作用^[11]。CGRP具有强大的扩张血管、调节血管内皮细胞的功能状态等作用,对血管内皮细胞缺氧损伤还具有直接保护作用,这种直接保护作用除与CGRP

对细胞的膜稳定作用外,可能还有其他机制的参与,还需进一步研究。

参考文献

- 1 李志强,袁尚荣,陈泽斌.三七总皂甙对大鼠脊髓损伤后一氧化氮合酶表达的影响.中国脊柱脊髓杂志,2001,11(4):248-249.
- 2 邵宝妹,蔡美英.三七总皂甙对组织器官缺血性损伤保护作用的研究进展.中药材,2001,24(7):532-534
- 3 张桥,吴启南.中药泽泻现代研究展望.基层中药杂志,2002,16(5):52-53
- 4 王强,熊利泽,陈绍洋,等.川芎嗪对兔脊髓缺血损伤剂量的治疗作用.第四军医大学学报,2001,22(12):1098-1103
- 5 王强,熊利泽,陈绍洋,等.川芎嗪对兔脊髓缺血再灌注损伤的保护和治疗作用.中华麻醉学杂志,2001,21(3):163-166
- 6 赵拉柱,韩旭华.黄芪临床新用及药理作用.山西中医学院学报,2002,3(4):41
- 7 黄喜茹,曹冬.马钱子研究进展.上海中医药杂志,2005,39(1):62-64.
- 8 吕猛,应洪亮,杨有庚.继发性脊髓损伤激励的研究进展.中国脊柱脊髓杂志,2000,10(5):309-311
- 9 许建强,张清俊.脊髓损伤后的高凝状态.中国脊柱脊髓杂志,2002,12(6):422-423
- 10 Faden AI, Jacobs TP, Feuerstein G, et al Dopamine partially mediates the cardiovascular effects of norepinephrine after spinal injury. Brain Res 1981, 213: 415-421.
- 11 Ren Y, Suresh TG, Wang H, B. et al Membrane fluidity changes in myocardial cells following reperfusion and simulated reperfusion and effects of calcium channel blockers. Med Sci Res 1993, 21(17):627-628.

(收稿日期:2006-10-20 本文编辑:李为农)

中国中医科学院望京医院进修招生通知

中国中医科学院望京医院(中国中医科学院骨伤科研究所)为国家中医药管理局批准的“全国中医骨伤专科医疗中心”、“全国重点骨伤学科”单位。全院共有床位500余张,其中骨伤科床位近300张。骨伤科高级专业技术职称人员40余名,博士生导师8名,硕士生导师15名,具有雄厚的骨伤科临床、教学与科研能力,是全国中医骨伤科医师培训基地。开设创伤、脊柱、骨关节、关节镜及推拿等专科,在颈椎病、腰椎间盘突出症、骨关节炎、创伤骨折、外翻等专病方面的治疗独具特色,部分专病的治疗在国内居领先水平,在国际上享有盛誉。每周三安排知名专家授课,为中、西医骨科医师培训提供充裕的理论学习与临床实践的机会。风湿免疫科为国家中医药管理局风湿病重点专病建设单位,具有较深厚的风湿病研究基础及先进的研究设施,治疗风湿类疾病有独特疗效。我院每年3-9月招收两期进修生(要求具有执业医师资格),每期半年或1年(进修费3600元/年)。欢迎全国各地中、西医医师来我院进修学习。

地址:北京市朝阳区花家地街中国中医科学院望京医院医务处 邮编:100102

电话:(010)64721263 网址:www.wjhospital.com.cn 联系人:苏霞。

乘车路线:404、416、420、701、707、710、952、运通101、107、201路等到望京医院(花家地街)下车。

北京站:乘420路公共汽车可直达;乘403至丽都饭店换404路望京医院(花家地街)下车。

北京西客站:823路公共汽车至东直门换404路至望京医院。