

汉防己甲素治疗急性脊髓损伤的实验研究

安荣泽¹ 罗春山²

(1. 遵义医学院附一院骨科, 贵州 遵义 563003; 2. 贵州省人民医院)

【摘要】 目的 探讨汉防己甲素(Tetrandrine, Tet)对急性脊髓损伤(Acute spinal cord injuries, ASCI)的保护作用。方法 74 只 Wistar 大鼠随机分为 4 组,用改良 Allen's 打击法制备大鼠截瘫模型,造模前各组分别投给相应的药物,伤后 1 h、4 h 取损伤区脊髓组织进行形态学观察和生化指标测定。结果 汉防己甲素能明显降低组织钙总量和 MDA 含量,防止镁总量和 SOD 含量的下降,稳定 $\text{G Ket}\sigma\text{PGF}_{1\alpha}/\text{TXB}_2$ 的比值,减轻组织病损。结论 Tet 对 ASCI 有保护作用,其作用机制为①扩张微血管,改善微循环,逆转 ASCI 后早期缺血倾向;②抗氧化自由基,减轻组织过氧化损伤,稳定生物膜性结构;③减少 ASCI 后钙内流,从而阻断继发性损伤的链式反应。

【关键词】 脊髓损伤; 汉防己甲素;

An experimental study of Tetrandrine (Tet) for the treatment of acute spinal cord injury in rats AN Rongze, LUO Chungshan. *The Affiliated Hospital of Zunyi Medical College (Zunyi Guizhou, 563003, China)*

【Abstract】 Objective To study the protective effect and mechanism of tetrandrine on acute spinal cord injury (ASCI) in rats **Methods** Seventy-four Wistar rats both male and female were divided into four groups. The spinal cord injury models in rats were produced by 100 g. cm force resulted in paraplegia by modified Allen's technique. Tet was administered before ASCI. One hour or four hours after the traumatic injury, samples of spinal cord were taken out for biochemical assay and examination of the pathological changes. **Results** Tet decreased significantly calcium concentration and content of MDA, prevented magnesium concentration and content of SOD from decreasing, stabilized the ratio of $\text{G Ket}\sigma\text{PGF}_{1\alpha}/\text{TXB}_2$ and lessened the pathologic injuries of spinal cord. The effects were similar to that of MP. **Conclusion** The results of present study suggests that tetrandrine possesses a protective effects on contused spinal cord in rats, in which the mechanisms include the ability of dilating microvasculature, ameliorating local microcirculation of injuries spinal cord, overcoming early posttraumatic ischemia of the cord, preventing the production of relative oxygen metabolites, attenuating the injury of peroxidation, stabilizing the membranaceous structure and reducing the movement of extracellular calcium to intracellular spaces, thereby restraining a cascade of secondary injury.

【Key words】 Spinal cord injuries; Tetrandrine

急性脊髓损伤(ASCI)临床常见,致瘫率高,目前普遍认为其主要是在原发性损伤基础上发展起来的继发性损伤造成,后者是众多因素综合作用的结果。其中钙离子超载不仅是 ASCI 多个发病环节之一,而且作为 ASCI 发病机制的枢纽通过多个环节促进 ASCI 的发展。汉防己甲素(Tet)是一种较强的天然非选择性钙通道阻滞剂,同时又是钙调蛋白的拮抗剂,具有广泛的药理作用^[1]。本实验用改良 Allen's 打击法复制大鼠全瘫模型,采用甲基强的松龙(MP)作为对照,探讨 Tet 对 ASCI 的早期保护作用,并对其防治 ASCI 的机制作初步探讨。

1 材料和方法

1.1 试剂及仪器 ①纯度 95% 以上汉防己甲素粉剂(江西彭泽制药厂产品)。先用 0.01 mmol/L HCl 充分溶解,再用 0.01 mmol/L NaOH 反滴定至 pH=5.5 后用生理盐水配成浓度 10 mg/ml 的溶液,4℃ 保存备用;②浓度为 62.5 mg/ml 的甲基强的松龙溶液(法玛西亚-普强公司);③SOD、丙二醛(MDA)试剂盒(南京晶美生物公司);④PGF_{1α}、TXB₂ 放免试剂盒(北京北方生物技术研究所);⑤PCGAMBYT-CR 计数仪(美国 DPC 公司);⑥美国雅培 2000 型全自动生化分析仪;⑦贝克汉姆半自动分光光度计(美国贝克汉姆公司)。

1.2 脊髓损伤模型的制备及分组处理 健康 Wis-

tar 大鼠 74 只, 3~ 4 个月龄, 雌雄不限, 体重 220~ 270 g, 随机分为 4 组: 假手术组 ($n = 14$) 生理盐水 (NS) 组 ($n = 20$), 汉防己甲素 (Tet) 组 ($n = 20$), 甲基强的松龙 (MP) 组 ($n = 20$), 腹腔注射 2.5% 戊巴比妥钠 1 ml/Kg 麻醉, 暴露 T_{12, 13} 椎板和棘突, 除假手术组外均按改良 Allen's 打击法致伤相应部位脊髓, 致伤力为 100 g·cm, 造成完全截瘫模型。Tet 组于制模前尾静脉注射 Tet 22.5 mg/kg 体重, NS 组则静注等体积的生理盐水, MP 组 iv MP 90 mg/kg 体重。假手术组分别于伤后 1 h、4 h 各处死 7 只, 余各组于伤后 1 h、4 h 各处死 10 只大鼠, 取以打击点为中心约 2 cm 长的脊髓标本, 随机各取 3 只脊髓标本做病检。余去除软脑膜及血块后, 纵行剖成两半, 称重、编号后置于 -80 °C 低温冰箱中冷藏。一半用来进行化学检测, 另一半用于放免法检测。

1.3 检测指标 待所有样本收集齐后, 取出样本, 快速解冻, 加 NS 按 1:9 的比例充分匀浆, 低温离心后取上清液分装待测: ①全自动生化分析仪检测 Ca²⁺、Mg²⁺、总蛋白定量; ②采用 MDA、SOD 测定试剂盒, 532 nm 处比色测定脊髓组织匀浆中 MDA、SOD 含量。

1.4 参照北京北方生物生化所放射免疫法 (RIA) 处理样本, DPCGAMAY-CR 计数器测定 PG_{I2} 和 TXA₂

的稳定分解产物 6-酮前列环素 (6-Ket_o-PGF_{1a}) 及血栓素 B₂ (TXB₂) 的浓度。

1.5 组织病理学检查 随机取每组 3 只脊髓标本, 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜下观察其组织病理改变。

1.6 统计学处理 所有数据表示为均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 用单因素方差分析法统计。

2 结果

2.1 脊髓组织中 Ca²⁺、Mg²⁺、SOD、MDA 含量的变化。

2.1.1 Ca²⁺、Mg²⁺ 含量的变化 (见表 1) 对照组 Ca²⁺ 在损伤区有随时间不断升高的趋势, 而 Tet 组及 MP 组 Ca²⁺ 含量升高的程度较对照组轻 ($P < 0.05$), 且 Tet 组与 MP 组含量无明显差异性 ($P > 0.05$); 对照组 Mg²⁺ 较治疗组明显降低 ($P < 0.05$), 且有不断下降的趋势, 但 Tet 组与 MP 组则抑制了这种趋势。

2.1.2 ASCI 后对照组 MDA 含量较治疗组显著升高 ($P < 0.01$), 且随病情发展而加重, 而 SOD 含量对照组较治疗组显著降低 ($P < 0.01$), 其含量随病情发展不断降低。

2.2 脊髓组织中 PGF_{1a} 和 TXB₂ 含量的变化 (见表 1)

表 1 脊髓损伤后 Ca²⁺ Mg²⁺ MDA SOD PGF_{1a} TXB₂ 及 T/K 比值变化

组别	n	Ca ²⁺ (mmol/g)	Mg ²⁺ (mmol/g)	MDA (mmol/g)	SOD (NU/mg)	PGF _{1a} (pg/ml)	TXB ₂ (pg/ml)	T/K 比值
假手术组	11	0.022 ± 0.009	0.149 ± 0.047	2.590 ± 0.094	71.79 ± 11.49	132.15 ± 25.7	195.32 ± 26.06	4.28 ± 4.32
NS1h	7	0.035 ± 0.003 [#]	0.090 ± 0.026 [#]	4.740 ± 0.358 [#]	52.18 ± 8.67 [#]	67.78 ± 20.87 [#]	505.82 ± 20.2 [#]	25.0 ± 8.08 [#]
NS4h	7	0.043 ± 0.004 [^]	0.092 ± 0.021 [#]	5.413 ± 0.643 [^]	54.49 ± 4.76 [#]	79.72 ± 16.06 [#]	629.76 ± 52.92 [#]	23.92 ± 6.82 [#]
Tet 1h	7	0.026 ± 0.003 [*]	0.122 ± 0.018 [*]	3.901 ± 0.457 ^{**}	64.02 ± 4.46 [#]	91.02 ± 8.42 [#]	323.51 ± 99.3 ^{**}	8.71 ± 2.01 [#]
Tet 4h	7	0.033 ± 0.006 ^{**}	0.131 ± 0.015 [*]	3.896 ± 0.319 ^{**}	68.49 ± 4.76 [#]	113.04 ± 16.41 [#]	199.15 ± 42.67 ^{**}	5.0 ± 1.86 ^{**}
MP 1h	7	0.028 ± 0.003 [*]	0.123 ± 0.011 [*]	3.872 ± 0.42 [*]	60.35 ± 4.78 [#]	92.07 ± 10.79 [#]	341.50 ± 109.23 ^{**}	10.03 ± 5.13 ^{**}
MP 4h	7	0.035 ± 0.005 ^{**}	0.128 ± 0.014 [*]	4.327 ± 0.556 ^{**}	64.26 ± 4.33 ^{**}	113.83 ± 26.23 [*]	260.49 ± 96.80 ^{**}	5.42 ± 2.63 ^{**}

与对照组同时点相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 同组内不同时间相比, ^ $P < 0.05$, ^^ $P < 0.01$; 与伤前相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

2.2.1 伤后 1 h、4 h PGF_{1a} 含量三组相比较, Tet 组及 MP 组均与对照组有显著性差异 ($P < 0.05$), Tet 组及 MP 组间无显著性差异 ($P > 0.05$); ASCI 后对照组 TXB₂ 含量具有缓慢的升高趋势; 两治疗组在各时间点与对照组相比较, 均明显降低, 有非常显著性差异 ($P < 0.01$), 两治疗组间变化无明显差异性 ($P > 0.05$); T/K 比值治疗组在各时间点与对照组相比, 有非常显著性差异 ($P < 0.01$), 而治疗组间无明显差异性 ($P > 0.05$)。

2.3 组织形态学改变

对照组: 伤后 1 h 发现脊髓灰质灶性出血, 神经

细胞开始变性, 白质明显水肿, 毛细血管周围和神经细胞周围间隙明显增宽; 4 h 可见神经细胞大片坏死, 白质出血水肿严重。

汉防己甲素组: 伤后 1 h 神经细胞核固缩, 中央管破坏, 周围点状出血, 微血管扩张, 充血, 白质区间质水肿。伤后 4 h 见神经细胞固缩坏死, 白质间质水肿。各时间段 MP 组病理改变类似于 Tet 组。

3 讨论

本实验用改良 Allen's 打击法制备急性大鼠全瘫模型。结果显示 ASCI 后, 汉防己甲素明显改善了局部组织的病理变化及其生化环境, 其机制与以下

因素有关。

3.1 改善微循环 光镜下可见 Tet 组微血管扩张, 且较 MP 组更明显。这是因为: ①Tet 能阻断血管平滑肌上电势依赖性钙通道使血管平滑肌舒张。同时 Tet 能增加 PGI₂ 的合成, 抑制 TXA₂ 的合成, 稳定 TXA₂/PGI₂ 的比值, 使微循环处于开放状态; ②动静脉平滑肌细胞对 Ca²⁺ 的变化比静脉更敏感, 所以增加了损伤脊髓局部的血流灌注, 减轻了脊髓损伤微循环障碍及缺血、缺氧对能量代谢的影响, 减少了无氧代谢产物乳酸等物质的局部堆积, 改善了微环境。

3.2 稳定生物膜 本实验观察到 Tet 组明显减少了伤区脊髓组织中 MDA 含量, 增加了 SOD 含量, 反应其能减少自由基的生成, 提高对自由基的清除能力, 从而减少了自由基介导的脂质过氧化损伤, 稳定了生物膜性结构, 减轻 LDH、CPK 等细胞内物质的泄漏, 减轻对组织细胞的损伤。本实验结果示 MP 组亦降低了伤区脊髓组织中 MDA 含量, 增加了 SOD 含量, 与文献报道^[2] MP 主要是通过抗自由基的损伤起作用相符。

3.3 钙拮抗作用 ASCI 后对照组早期即见组织总钙含量明显升高, 且随病情发展而不断升高, 而 Tet 及 MP 组有效地防止了 Ca²⁺ 含量的增加。这是由于 Tet 能稳定生物膜, 清除自由基, 改善局部微循环, 抑制了钙通道的开放, 从而预防了钙超载的发生, 阻断了继发性损伤的链式反应。

本实验结果还显示, ASCI 后即可见 Mg²⁺ 总量随时间推移而不断下降的趋势, 这与 Vink 等^[3] 的研究报道相似。Mg²⁺ 是体内新陈代谢过程中多种酶系的激活剂, 作用于氧化磷酸化、钙内流、EAA、阿片肽和 AA 等生理途径, 如 Mg²⁺ 不足将对神经组织产生严重的影响。Tet 及 MP 能减少伤区 Mg²⁺ 的丢失, 推测可能与 Ca²⁺ 内流的减轻及改善能量代谢有关^[4,6], 提高脊髓对缺血的耐受阈值。

我们的实验说明 Tet 能通过多个环节发挥其治疗急性脊髓损伤的作用, 且取得了与 MP 相当甚至更好的效果, Tet 是治疗 ASCI 的一个有前途的药物, 至于最佳给药时间及剂量尚有待于进一步探讨。

参考文献

- 1 张永刚. 粉防己碱的研究进展. 国外医学·中医中药分册, 1997, 19 (4): 68.
- 2 Hal ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. J Neurosurg, 1992, 76: 13-22.
- 3 Vink R, Sabrina W, Yum, et al. Traumatic spinal cord injury in rabbits decrease intracellular free magnesium concentration as measured by 31P MRS. Brain Res, 1989, 490: 144-148.
- 4 Guha A, Tator CH, Piper I. Increase in rat spinal cord blood flow with the Calcium channel blocker, nifedipine. J Neurosurg, 1985, 63: 250-259.
- 5 Guha A, Tator CH, Piper I. Effect of Calcium channel blocker on post-traumatic spinal cord blood flow. J Neurosurg, 1987, 66: 423-430.
- 6 Guha A, Tator CH, Smith CR, et al. Improvement posttraumatic spinal cord blood flow with a combination of a Calcium channel blocker and a vasopressor. J Trauma, 1989, 29: 1440-1447.

(收稿: 2002-05-31 编辑: 李为农)

第十一届全国中西医结合骨伤科学术研讨会征文通知

中国中西医结合学会骨伤科专业委员会、《中国骨伤》杂志编辑部、甘肃省中西医结合学会骨伤科专业委员会联合举办的“第十一届全国中西医结合骨伤科学术研讨会”, 拟定于 2003 年 8 月上旬在甘肃省兰州市召开。本届大会的主题是“微创骨科”。现将有关征文事宜通知如下:

一、征文内容 (1) 微创骨科 ①微创骨科技术的发展状况; ②各种微创骨科技术的临床应用; ③微创技术使用时出现的问题讨论; ④微创器械的研制与生物力学。(2) 其他内容 ①西部大开发与中西医结合骨科的发展(对口支援与合作); ②关节及关节周围骨科疾病的中西医结合的诊治; ③骨科临床、科研和教学成果总结; ④骨科诊疗新技术; ⑤骨科护理经验总结及新技术、新方法; ⑥骨科国内外发展动态及文献综述; ⑦骨科新药和新器械的研制与应用。

二、征文要求 (1) 来稿要求未公开发表的论文(用 A4 纸打印尽可能附软盘), 4000 字以内, 另加 500~1000 字的结构式摘要(包括目的、方法、结果、结论), 组委会对来稿有删改权。(2) 来稿请详细注明省、市及工作单位, 详细通讯地址, 邮政编码, 作者姓名, 以便联系。(3) 来稿须加盖单位公章, 或附单位介绍信。来稿一律不退, 请作者自留底稿。(4) 截稿日期: 2003 年 5 月 31 日, 以邮戳为准。

会将颁发国家级 I 类继续教育学分证书及论文证书, 优秀论文将在《中国骨伤》杂志刊登。来稿请寄: 甘肃省兰州市七里河区安西路 354 号, 甘肃省中医院, 张德宏收。邮政编码: 730050; 联系人: 李盛华 电话: 0931-2338800(办)、13993122066(手机); 张德宏 电话: 0931-2335211(办)、13038772211(手机); E-mail: zdh6789@sina.com