

脊髓损伤后脊髓自由基和超氧化物歧化酶的动态变化

郑望苟¹, 潘卫红², 郭卫春¹

(1. 武汉大学人民医院骨科, 湖北 武汉 430060; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院)

摘要 目的: 研究脊髓损伤后脊髓内自由基丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)的活性变化, 以探讨自由基在脊髓继发性损伤中的作用机制。方法: 42 只健康家兔采用改良式 Allen 氏法造成脊髓损伤模型, 测定其损伤后 12 h、48 h、3 d、7 d、14 d 及 21 d 脊髓组织内自由基含量和超氧化物歧化酶的活性。结果: 脊髓损伤后, MDA 在 24 h 内显著升高, 7 d 达最高峰, 升幅达 90%, 并随之逐渐下降; 伤后 SOD 活性显著下降, 3 d 时达最低, 降幅达 54%, 随后并逐渐回升。结论: 自由基和超氧化物歧化酶参与了脊髓继发性损伤的病理过程。

关键词 脊髓损伤; 自由基; 超氧化物歧化酶; 动物, 实验

Dynamical changes of free radical and superoxide dismutase after the experimental spinal cord injury in rats

ZHENG Wang-gou, PAN Wei-hong, GUO Wei-chun. Department of Orthopaedics, People's Hospital of Wuhan University (Hubei Wuhan, 430060, China)

Abstract Objective: To observe the active change of malonyldialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) contents in a series of intervals after acute spinal cord injury (SCI), and to study the free radical variation in secondary pathological damage of the spinal cord. **Methods:** The SCI model in rabbits were made with modified Allen's method. The amount of MDA and SOD of spinal cord tissue were determined in the 12 h, 48 h, 3 d, 7 d, 14 d and 21 d after injury. **Results:** The concentration of MDA significantly increased in the 24 h after SCI, reached the peak at the 7 d and then dropped down gradually. The activity of SOD significantly descended after SCI, was the lowest at 3 d and then return slightly. **Conclusion:** This study suggested that free radical plays an important role in the secondary pathological damage of SCI.

Key words Spinal injuries; Free radical; Superoxide dismutase; Animals, laboratory

急性脊髓损伤后常继发多种神经生化改变, 这些改变在加重脊髓继发性损伤中起重要作用。近来自由基在参与脊髓继发性损伤方面越来越受到人们的重视^[1]。本研究是观察脊髓损伤后脊髓内丙二醛(malonyldialdehyde, MDA)含量及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性的变化规律及其相互关系, 以探讨脊髓继发性损伤的病理机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 健康家兔 42 只, 雌雄不限, 体重 2~2.5 kg, 随机等分为伤前、伤后 12 h、48 h、3 d、7 d、14 d 及 21 d, 共 7 组, 每组 6 只。

1.2 模型制作 3%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉, 无菌操作, 沿脊突背正中切口, 切除 L₁₋₃部分

椎板, 保留硬脊膜, 显露该处脊髓背侧 3 mm × 5 mm 大小, 各组采用 Allen 降落打击法, 重量 12.0 g, 高度 12.0 cm 垂直向下, 制成家兔脊髓损伤动物模型。通过预备实验后确认该打击力量可致兔脊髓中、重度挫伤。缝合伤口, 送动物室饲养。

1.3 脊髓组织内活性氧自由基及其酶检测 分别于伤前、伤后 12 h、48 h、3 d、7 d、14 d 及 21 d 各时段通过颈动脉放血处死动物, 处死后取 L₁ 硬膜内受损脊髓组织, 用冰生理盐水洗去残血, 置于 -70℃ 低温冰箱保存。测量时, 切取伤段脊髓组织, 生理盐水冲洗、拭干。MDA 测定采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法^[2], 利用 721 发光光度计于波长 532 nm 测定, 含量单位: μmol/g。SOD 测定采用黄嘌呤氧化酶法, 操作步骤即原理按说明书要求进行, 试剂购自南京聚力生物工程公司, 含量单位: nu/mg 蛋白。

1.4 数据统计 采用 SPOSS/PC + OV3.10 软件包,所有参数用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各组间采用成组设计的 *t* 检验比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 脊髓组织 MDA 含量及 SOD 活性变化 见表 1。

表 1 脊髓损伤后脊髓组织中 MDA 含量及 SOD 活性 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Content of MDA and activity of SOD in spinal cord tissue after SCI ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MDA(μmol/g)	SOD(nu/mg)
伤前	6	21.34 ±4.35	83.51 ±3.55
伤后 12 h	6	37.18 ±7.9	64.24 ±4.01
48 h	6	38.11 ±9.03	51.03 ±1.55
3 d	6	39.04 ±4.39	38.03 ±6.14
7 d	6	40.38 ±5.07	43.11 ±0.97
14 d	6	30.79 ±3.94	48.13 ±8.17
21 d	6	25.33 ±2.14	57.45 ±3.94

伤前 MDA 为 (21.34 ±4.35) μmol/g; SOD 为 (83.51 ±3.55) nu/mg。伤后 12 h 脊髓组织 MDA 含量立即升高,7 d 时升至最高峰,升幅达 90%,随后逐渐下降,伤后 21 d 恢复并接近伤前水平 ($t = 2.49$, $P > 0.05$)。伤后 12 h 脊髓组织中 SOD 活性迅速下降,3 d 时降至最低点,降幅达 54%,以后逐渐回升,伤后 21 d 时仍显著低于伤前组 ($t = 4.89$, $P < 0.05$)。

2.2 MDA 与 SOD 之间的关系 结果表明在脊髓损伤后 7 d 内 MDA 含量与 SOD 活性间的相关系数 $r = -0.727$,即两者之间呈负相关 ($P < 0.05$),故随 MDA 含量增加,SOD 活性相应的减少。至伤后 21 d 时,随组织中 MDA 含量的回落,SOD 活性逐渐地恢复。

3 讨论

脊髓组织膜结构含有丰富的脂质,近年已证实,其损伤后可产生并释放大量的氧自由基^[1],后者作用于细胞膜上的多不饱和脂肪酸的不稳定弱键,生成过氧化脂质,使膜通透性改变,溶酶体崩解,而致细胞坏死。MDA 是脂质过氧化最终产物,测定 MDA 可直接反应自由基水平^[2],其含量高低可反映出自由基在体内的代谢变化,是自由基致使组织细

胞损伤的重要标志。本实验条件下,脊髓损伤后脊髓内 MDA 在 24 h 内迅速增加,伤后 7 d 增幅为 90%,随后逐渐下降,伤后 2 个月时接近正常水平。从而表现出自由基在脊髓损伤中的重要性。

超氧化物歧化酶是自由基的重要清除酶之一,它通过催化 O₂⁻ 歧化反应,发挥抗氧自由基的作用,增强 H₂O₂ 浓度的调节功能,保护组织细胞。脊髓组织中自由基增多后,SOD 活性则显消耗性减少。本实验结果显示,脊髓损伤后脊髓内 SOD 活性逐渐下降,伤后第 3 天降幅为 54%,以后逐渐回升,尽管 21 d 时 MDA 接近伤前水平,但 SOD 仍未接近伤前水平,表明 SOD 参与了继发性损伤的病理过程但其活性恢复较 MDA 含量恢复迟钝。近年来,有学者应用自由基清除剂,即蛛网膜下腔注射 SOD,发现可减轻或阻止继发性损伤,有促进脊髓功能恢复的作用^[3,4]。

Kinoshita^[5]通过病理学观察分析研究了脊髓损伤早期,即损伤急性期的组织学改变,指出脊髓损伤后破裂、出血,数分钟后发生水肿,此过程 1~6 h 最明显。损伤段出血主要发生在灰质中,血液灌流迅速减少,缺血代谢产物蓄积,脱髓鞘一系列持续或继发性的生化改变,3 d 胶质组织增多,5~7 d 胶质纤维产生。本研究所发现脂质过氧化反应在 7 d 内显著,于是自由基损害加速,伤后 3 d 时 SOD 减少显著,显然抑制脂质过氧化的机制受阻,细胞膜受到破坏。故作者认为脊髓损伤后组织脂质过氧化作用与病理变化有密切关系。

参考文献

- Hall ED. Inhibition of lipid peroxidation in CNS trauma. J Neurotrauma, 1991, 8:31-40.
- Kontos HA, Wei EP. Superoxide production in experimental brain injury. J Neurosurg, 1989, 64:803-804.
- Iwasa K, Ikata T, Fukuzawa K. Protective effect of vitamin E on spinal cord injury by compression and concurrent lipid peroxidation. Free Radic Biol Med, 1989, 6:599-606.
- 傅勤,杜世新,傅永慧,等. 神经因子和超氧化物歧化酶对急性脊髓损伤早期作用的实验研究. 中国医科大学学报, 2001, 30(3):192-194.
- Kinoshita H. Pathology of spinal cord injuries due to fracture-dislocation of the thoracic and lumbar spine. Paraplegia, 1996, 34:1-7.

(收稿日期:2003-07-16 本文编辑:连智华)