

红花注射液对脊髓损伤早期自由基影响的实验研究

隋吉生, 吴小涛, 徐小彬

(东南大学附属中大医院骨科, 江苏 南京 210009)

【摘要】 目的: 通过观察对大鼠脊髓损伤模型早期使用红花注射液后自由基的变化探讨红花注射液防止脊髓继发性损伤的作用机制。方法: 选择成年雄性 SD大鼠 48只, 分为正常对照组、损伤组、红花治疗组, 每组大鼠 16只。采用 Allen's 撞击法建立脊髓损伤模型, 其中红花治疗组分别于打击后 30 min、2 h 腹腔注射红花注射液。术后 6 h 测定脊髓组织和血液中丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)的含量, 并在光镜下观察组织形态的变化。结果: 损伤组血液标本和脊髓标本中 MDA 升高、SOD 降低, 红花组血液和脊髓标本所测定的各个指标与损伤组比较有显著性差别 ($P < 0.01$), 红花组与对照组各指标无明显差别 ($P > 0.05$)。组织学形态上, 红花治疗组脊髓损伤程度小, 神经元细胞破坏少。结论: 脊髓损伤后血液和脊髓组织中自由基含量升高, 红花注射液能有效清除自由基, 在一定程度上能防止脊髓继发性损伤。注射红花注射液后, MDA 降低, SOD 升高。

【关键词】 脊髓损伤; 自由基; 红花

Experimental study on changes of free radical of Safflower injection at early stage of spinal cord injury SUI Ji sheng, WU Xiao-tao, XU Xiao-bin. Department of Orthopaedics Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009 Jiangsu China

ABSTRACT Objective To investigate the changes of free radical in blood and spinal cord at early stage of spinal cord injury in an animal model and the changes after using Safflower injection. **Methods** Forty-eight male rats were divided into three groups: control group, injury group and Safflower injection group. Each group contained 16 rats. All spinal cord injury models were made in Allen's way. Except control group and injury group, rats in Safflower injection group were separately injected Safflower injection into cavitas abdominis after 30 min, 2 hours and 4 hours of spinal cord injury. The level of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were tested in all samples and histological examination under optical microscope were made after 6 hours. **Results** MDA increased and SOD decreased in injury group while MDA decreased but SOD increased in the Safflower injection group. The white tissue of spinal cord decreased in injury group which remained healthy in Safflower injection group. The data of two groups had significant differences ($P < 0.01$). **Conclusion** Free radicals increased after spinal cord injury but could be eliminated efficiently by injecting Safflower injection. Safflower injection can greatly prevent the further injury of spinal cord after spinal cord injury. After injecting Safflower injection, MDA decreases, SOD increases.

Key words Spinal cord injuries; Free radicals; Safflower

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007, 20(2): 94-96 www.zggssz.com

脊髓损伤 (Spinal cord injury, SCI) 发病率逐渐升高且致残率高, 是国内外医学领域备受关注的重大难题。目前研究认为引起脊髓继发性损害的因素有: 血供障碍、内源性阿片肽、自由基、EAA、NO 的大量产生及 Ca^{2+} 超载等^[1-3]。其中自由基是脊髓继发性损伤一个重要的损害因素。研究表明, 红花注射液 (Safflower injection) 具有较强的清除氧自由基^[4]、抑制白细胞和巨噬细胞浸润、钙拮抗及心肌缺血的保护等作用^[5-6]。本实验通过观察对大鼠脊髓损伤模型早期使用红花注射液后氧自由基的变化, 探讨红花注射液防止脊髓继发性损伤的机制, 为中药红花注射液在临床上治疗脊髓损伤提供

理论依据。

1 材料和方法

1.1 药品及检测试剂 红花注射液 (山西亚宝药业集团, 批号: 050612)。戊巴比妥钠 (上海化学试剂分装厂)。SOD、MDA 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

1.2 仪器 脊髓损伤打击器 (自制)。全套手术器械。PDL40B 水平离心机 (北京医疗仪器厂)。722 分光光度计 (上海医疗仪器厂)。XMT 恒温水箱 (上海跃进医疗器械厂)。XW-80A 漩涡混合器 (上海医疗器械厂)。Mettler-AE260 分析天平。光学显微镜 (奥林巴斯 PH50)。

1.3 实验动物模型制作及分组 成年雄性 SD 大鼠 48 只, 月龄 4 个月, 体质量 230~250 g。由东南大学实验动物中心提供。随机分为 3 组: 正常对照组, 缝合伤口后不做任何处理;

基金项目: 国家自然科学基金预研项目 (编号: XJ0690256)

通讯作者: 吴小涛 Tel: 025-83272225 Email: wuxiaotao@medmail.com.cn

损伤组,用 25 gcf 给予打击后不做任何处理;红花治疗组,打击后 30 min 按 4 ml/kg 剂量腹腔注射红花注射液,损伤后 2 h 和 4 h 按 2 ml/kg 剂量分别注射红花注射液;每组 16 只。采用 Allen's 坠落打击法^[7]制作脊髓损伤模型。大鼠自由饮食、饮水,腹腔注射 2% 戊巴比妥钠,按 40 mg/kg 的量进行麻醉;经腰背部脱毛后俯卧位固定动物于手术台上,常规消毒后在无菌条件以 T₁₀棘突为中心作背部正中切口,咬除 T₉ - T₁₁棘突及 T₁₀全部椎板和 T₉、T₁₁上、下各半个椎板,椎管打开至椎弓根部,暴露长 15 mm 脊髓,保留硬脊膜;除对照组动物外,其他组用 10 g 质量的物体从 2.5 cm 高处自由落下,致伤能量为 25 gcf 造成大鼠不完全性截瘫,撞击成功的标志为:撞击的脊髓组织充血水肿,大鼠尾巴痉挛摆动,双下肢身体回缩性扑动。逐层缝合伤口,术毕。所有动物均在损伤后 6 h 心脏穿刺抽血 2 ml (其中 1 ml 测 SOD, 1 ml 测 MDA), 6 h 后活体取损伤段脊髓约 1.5 cm,靠近头侧 0.5 cm 用于做病理学检查。靠近尾侧 1 cm 用生理盐水冲洗后拭干,称重,制成组织匀浆。血液和脊髓组织匀浆同样离心取血清用于生化检测。

1.4 观测指标与生化测定方法

1.4.1 MDA 测定 按照试剂盒说明方法操作,按硫代巴比妥酸(TBA)法测定,利用 722 分光光度计于波长 532 nm 测定,含量单位: nmol/mg 该方法的灵敏度高、试剂稳定、呈色稳定、不受气温等外界因素的影响。

1.4.2 SOD 测定 通过黄嘌呤氧化酶细胞色素 C 法测定,按照试剂盒说明方法操作,用可见光分光光度计测其吸光度计算 SOD 的活力。

1.5 组织病理学检查 将脊髓标本用 10% 中性甲醛固定 24 h 后取出,石蜡包埋,行 HE 染色,切取 5 μm 光镜下观察组织学形态的变化。

1.6 统计学处理 经 SPSS 11.5 统计软件处理,所有参数以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, P < 0.05 具有统计学意义。

2 结果

2.1 MDA 含量的变化 损伤组 6 h 后血液及脊髓中 MDA 含量明显升高,红花组 6 h 后血液及脊髓中 MDA 含量与对照组比较无显著性差异 (P > 0.05)。红花组 6 h 后血液及脊髓中 MDA 含量与损伤组比较有显著性差异 (P < 0.01) (见表 1)。

表 1 各组伤后 6 h 血液及脊髓组织中 MDA 含量

($\bar{x} \pm s$ n = 16)

Tab 1 Comparison of MDA contents in serum and spinal cord in each group after six hours ($\bar{x} \pm s$ n = 16)

组别	血清 (nmol/ml)	脊髓组织 (nmol/ml)
对照组	2.14 ± 0.26 [△]	21.43 ± 5.44 [△]
损伤组	2.76 ± 0.35*	37.47 ± 10.14*
红花组	2.26 ± 0.37 ^{△*}	26.48 ± 5.80 ^{△*}

注:红花组与对照组比较[△]P > 0.05;红花组与损伤组比较*P < 0.01

Note Safflower group compared with control group[△]P > 0.05 Safflower group compared with injury group*P < 0.01

2.2 SOD 含量的变化 损伤组 6 h 后血液及脊髓中 SOD 的活力明显减低,红花组 6 h 后血液中及脊髓 SOD 的含量与对照组的比较无显著性差异 (P > 0.05)。红花组 6 h 血液及脊

髓组织中 SOD 活力与损伤组比较有显著性差异 (P < 0.01) (见表 2)。

2.3 镜下组织形态学变化 对照组神经元形态正常,未见肿胀、坏死、空泡等改变。损伤组见局灶性出血、神经元肿胀、变圆、数目减少,核固缩、碎裂,尼氏小体淡染或消失。红花组均较损伤组病理改变轻。

表 2 各组伤后 6 h 血液及脊髓组织中 SOD 含量

($\bar{x} \pm s$ n = 16)

Tab 2 Comparison of SOD contents in serum and spinal cord in each group after six hours ($\bar{x} \pm s$ n = 16)

组别	血清 (亚硝酸盐单位/ml)	脊髓组织 (nmol/ml)
对照组	324.59 ± 10.14 [△]	159.55 ± 14.73 [△]
损伤组	296.72 ± 10.20*	125.38 ± 12.31*
红花组	315.63 ± 9.85 ^{△*}	146.46 ± 13.88 ^{△*}

注:红花组与对照组比较[△]P > 0.05;红花组与损伤组比较*P < 0.01

Note Safflower group compared with control group[△]P > 0.05; Safflower group compared with injury group*P < 0.01

3 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,这些膜结构的正常维持着脊髓代谢及功能正常进行。脊髓损伤后血流发生改变,脊髓缺血、缺氧和出血使神经元细胞线粒体传递链发生脱偶联,产生并释放大量的氧自由基^[8],氧自由基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。脊髓损伤后早期自由基即有明显升高,因此早期对自由基清除是保护脊髓细胞膜结构完整的关键。MDA 是脂质过氧化最终产物,测定 MDA 可直接反应自由基水平^[9],是自由基致使组织细胞损伤的重要标志。SOD 为自由基的清除剂,SOD 活性反映机体清除氧自由基的能力。所以 MDA 和 SOD 的含量均可反映体内自由基的变化。本实验通过脊髓损伤的动物模型,发现损伤后 6 h 血液和脊髓 MDA 的含量比正常的要明显增高,SOD 的含量下降,与文献报道相符。脊髓损伤后 6 h MDA 含量明显升高,说明自由基在脊髓继发性损伤中起重要的作用。脊髓损伤后 6 h SOD 活性明显降低是因为清除自由基而被消耗。

中药红花为菊科植物红花 (Carthamus tinctorius L.) 的干燥花,具有活血通经、祛瘀止痛的功效,是活血化瘀的传统中药之一。红花注射液是由红花提取而制成的中药注射剂,不良反应小,安全范围剂量大,其主要有效成分是红花黄色素、红花醌苷、红花素、新红花苷等^[10]。柴振鲁等^[11]通过研究表明红花注射液能有效降低血黏度、血细胞比容、纤维蛋白含量和血小板聚集率;能改善血液流变学特性。另外还具有较强的清除氧自由基^[4]、抑制白细胞和巨噬细胞浸润、钙拮抗及心肌缺血的保护等作用^[5,9]。虽然近年来有关红花抗氧化作用的文献较多,但在中枢神经系统,特别是脊髓组织抗氧化作用尚未见报道。本实验结果显示红花组 MDA 的含量与正常对照组的比较无显著性差异 (P > 0.05),与损伤组比较有显著性差异 (P < 0.01)。红花治疗组 SOD 的活性与正常对照组的比较无显著性差异 (P > 0.05),与损伤组比较有显著性差

异 ($P < 0.01$)。光镜下可见损伤组有局灶性出血、神经元肿胀、变圆、数目减少,核固缩、碎裂,尼氏小体淡染或消失。红花组均较损伤组病理改变轻,但也有神经细胞变性坏死,脊髓内出血,这说明红花对已损伤的神经细胞并不能逆转,但可以保护尚未受到损伤或已受损伤但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。本实验说明红花注射液在脊髓损伤后早期能有效清除自由基,有效控制膜的自由基反应,使脊髓血供保持正常,大大减少脊髓继发性损害的程度。

综上所述,我们认为红花注射液在脊髓损伤后早期能有效清除氧自由基,保护脊髓细胞膜结构完整,从而保护神经细胞免受损害,遏制了脊髓继发性损伤的发展,为中药红花注射液在临床上治疗脊髓损伤提供理论依据。本实验只是证明红花注射液在脊髓损伤早期对自由基有较好的清除作用,故临床上强调应早期用药;至于改变用药剂量和次数能否提高疗效,以及对脊髓损伤后神经功能恢复是否有效,尚待进一步研究。

参考文献

1 Mautes AE, Weinzierl MR, Donovan F, et al. Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis. *Physical Therapy*, 2000, 80: 673-687.
 2 Tator CH. Experimental and clinical studies of the pathophysiology and

management of acute spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 1996; 19 (4): 206-214
 3 Trump BE, Berzesky ZK. Calcium mediated cell injury and cell death. *Faseb*, 1995; 9(2): 219-228
 4 金鸣, 李金荣, 吴伟. 羟基红花黄色素 A 抗氧化作用的研究. *中草药*, 2004; 35(6): 665-666
 5 周群, 汪晓云, 简承艳, 等. 红花注射液对冠心病患者血小板、凝血及纤溶功能的影响. *中国综合临床*, 2002, 10(4): 88.
 6 廖辉. 红花注射液对急性血淤症大鼠血流变学的影响. *中国中医基础医学杂志*, 2002, 4(6): 279-280
 7 Kaplanoglu E, Tunçel M, Palaoglu S, et al. Comparison of the effects of melatonin and methylprednisolone in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg* 2000, 93(Spinal 1): 77-84.
 8 华鲁纯, 孟淑美, 杨俭, 等. 小肠缺血再灌注损伤时自由基清除剂及MDA变化的实验研究. *中国微循环*, 1999; 3(4): 205-206
 9 Hall ED. Inhibition of lipid peroxidation in CNS trauma. *J Neuro Trauma* 1991, 8(2): 31-40.
 10 徐东明. 红花注射液治疗稳定型心绞痛. *中国新药与临床杂志*, 2003; 22(1): 13
 11 柴振鲁, 陈筱南. 红花注射液对肺心病患者血黏度、血小板及抗凝纤溶功能的影响. *药事实践杂志*, 2003, 21(5): 262
 (收稿日期: 2006-10-20 本文编辑: 李为农)

全国中西医结合脊柱相关疾病学术研讨会 暨《中国骨伤》杂志创刊 20周年纪念会征文通知

为促进脊柱医学的发展和学科建设,更好地为脊柱医学工作者提供展示不同学术观点的交流平台,由中国中西医结合学会和《中国骨伤》杂志社主办的全国中西医结合脊柱相关疾病学术研讨会暨《中国骨伤》杂志创刊 20周年纪念会,拟于 2007年 5月在北京召开。

会议的主要议题: ①脊柱相关疾病的基础和临床研究成果的交流; ②成立中国中西医结合学会脊柱医学专业委员会; ③《中国骨伤》杂志创刊 20周年纪念活动。欢迎全国各地从事脊柱医学工作及相关专业的医务人员踊跃投稿,本次研讨会为国家级继续医学教育项目,参会者将授予 I 类学分。会议期间将聘请国内外著名专家进行专题报告及举行《中国骨伤》杂志创刊 20周年编委工作会。

征文内容: ①脊柱相关疾病的基础研究、临床研究、学术探讨、研究进展、诊疗方法等; ②脊柱医学的基础理论、临床实践、整脊手法操作技法; ③颈肩腰腿痛理论研究和临床诊疗方法探讨等; ④脊柱针法微创技术及科研成果、学术论述、脊柱疾病的临床护理等文稿; ⑤脊柱的生物力学研究以及生物信息系统的理论探讨和实验研究,与脊柱相关的脊柱解剖学和生物力学作用机制、脊柱生物力学评价方法等; ⑥脊柱外科的临床诊疗、基础研究、康复理疗、预防保健等方面的论著、综述、技术介绍和经验交流; ⑦脊柱微创手术的研究发展状况,各种微创手术在脊柱手术中的临床应用,微创器械的研制等; ⑧脊柱脊髓损伤基础与临床研究、脊柱脊髓损伤的康复及脊柱脊髓损伤并发症的预防和治疗、传统医学在脊柱脊髓损伤疾患中的应用; ⑨与脊柱医学相关的医疗器械和保健器材的研发以及一些相关药物的开发应用等。

征文要求: 凡未在国家级以上学术会议交流或未在公开刊物上发表的论文均可投送。论文全文在 3 000字以内并附 500字左右结构式摘要 1份,请用 A4纸打印,并寄软盘,欢迎通过 E-mail投稿。优秀论文将推荐在《中国骨伤》2007年增刊上发表。

投稿请寄: 北京市东直门内南小街甲 16号《中国骨伤》杂志社范少云收,请在信封上注明“会议征文”字样。邮编: 100700 E-mail: zggsz@ sina.com 电话: 010-84020925 截稿日期: 2007年 4月 30日