

GM-1 预防大鼠急性脊髓损伤的研究

钱 列,李家顺,贾连顺,杨建东,邵 将,曹师峰

(第二军医大学附属长征医院 200003 上海市)

【摘要】目的:探讨单唾液酸神经节苷脂(GM-1)对大鼠急性脊髓损伤的预防作用。**方法:**随机将 126 只大鼠分为 3 组,每组 42 只。A 组(正常组):行椎板切除术但不损伤脊髓;B 组(对照组):行椎板切除术,同时予脊髓损伤打击;C 组(GM-1 组):术前应用 GM-1,行椎板切除术,同时予脊髓损伤打击。脊髓损伤采用改良 Allen's 打击法。术后 24h、48h 和 72h 采用胥少汀 6 级行为学评分及 Rivlin 斜板试验进行神经功能评价;1h 和 72h 对大鼠脊髓损伤后运动诱发电位(MEP)潜伏期和波幅进行分析;8h、24h、48h 和 72h 对损伤部位脊髓通过光镜和电镜进行病理学观察。**结果:**GM-1 组与对照组相比,行为学评分障碍率及斜板障碍率较对照组低,神经功能评分提高;术后 MEP 潜伏期较对照组短,波幅下降较对照组小,MEP 得到改善;光镜、电镜下见脊髓损伤轻。**结论:**预防性应用 GM-1 可能对减轻脊髓损伤有一定的作用。

【关键词】急性脊髓损伤;预防;单唾液酸神经节苷脂(GM-1);大鼠

中图分类号:R971,R651.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2005)-10-0581-04

Experimental study of the neuroprotective effect of GM-1 on acute spinal cord injury in rat/QIAN Lie,LI Jiashun,JIA Lianshun,et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord,2005,15(10):581-584

【Abstract】 Objective:To study the preventional effect of GM-1 on spinal cord injury in rat.**Method:**126 healthy adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups:Group A (normal group),Group B (control group) and Group C (GM-1 group).Each group consisted of 42 mice.In group A (normal group): laminectomy was performed without damage to the spinal cord;in group B (control group):laminectomy was performed with damage to the spinal cord;in group C (GM-1 group):preoperational administration of GM-1 followed by laminectomy as well as damaging to the spinal cord was performed.We adopt improved Allen's method for construction of spinal cord injury model.The function of spinal cord was evaluated by Xu Shaoting's 6 graded rate and Rivlin's rate of slope at 24h,48h and 72h after SCI.The latent period and amplitude of the motor evoked potential(MEP) were studied at 1h and 72h after SCI.Normal HE and electron microscope were used to observe the pathological and ultrastructural changes of spinal cord at 8h,24h,48h and 72h after SCI.**Result:**Compared with the control group,the disabled rate of hindlimb locomotor function and slope function was lower,the neurological function increased significantly in group C,the latent period of MEP was shorter and the decrease of amplitude of MEP was less in group C.Under microscope and electron microscope,the spinal cord injury in GM-1 group was less serious.**Conclusion:**Using of GM-1 in prophylaxis can improve the neurological function of spinal cord.

【Key words】 Acute spinal cord injury;Prophylaxis;GM-1;Experimental study;Rat

【Author's address】 Department of Orthopedic Surgery,Changzheng Hospital of the Second Military Medical University,Shanghai,200003,China

随着脊柱外科的迅速发展,脊柱手术量和手术难度不断增加。由于在脊柱手术操作时不可避免地对脊髓骚扰甚至损伤,由此引起术后脊髓功能障碍加重。为此,我们观察了单唾液酸神经节苷

脂(GM-1)对急性脊髓损伤的预防作用,为临床应用药物预防此类脊髓损伤提供依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物及分组

健康成年 Sprague-Dawley(SD)大鼠 126 只,雌雄不限,体重 190~240g(上海医药工业研究所

第一作者简介:男(1970-),主治医师,医学博士,研究方向:脊柱外科
电话:(021)28306240 E-mail:qlspine@yahoo.com.cn

实验动物中心提供)。随机分为 3 组,每组均为 42 只。A 组为正常组,B 组为对照组,C 组为 GM-1 组。A 组和 B 组尾部静脉注射生理盐水注射液 0.5ml,C 组注射 GM-1 10mg/kg(用生理盐水注射液稀释至 0.5ml),注射后 2h 予以椎板切除术。

1.2 手术方法

采用双盲法。2.5%戊巴比妥钠溶液对大鼠进行腹腔注射麻醉。大鼠俯卧位固定于平板上,常规消毒。以 T8 棘突为中心取后背正中纵切口,咬除 T8、T9 的棘突及椎板。A 组仅行椎板切除但不损伤脊髓,B 组和 C 组椎板切除术后同时予脊髓损伤。脊髓损伤采用改良 Allen's 打击法:椎板切除后暴露 T8、T9 平面脊髓,在暴露的脊髓硬膜表面放置 3×5mm 的弧形垫片,用重 10g 的钢棒,从 5cm 高处垂直落下打击致脊髓损伤。鼠尾痉挛性摆动,双后肢及躯体回缩扑动,双后肢瘫痪,视为脊髓损伤成功。

1.3 评价指标

1.3.1 神经行为学观察 采用双盲法,分别在脊髓损伤后 24h、48h、72h 三个时间相对各组进行神经功能测定。

(1)根据胥少汀等^[1]对四肢动物脊髓损伤提出的后肢行为学评分法判断大鼠脊髓功能。0 级:后肢和尾部无活动;I 级:后肢和尾部微动;II 级:后肢和尾部有活动,可带动关节,甚至 1 个后肢可站立;III 级:双后肢可站立,但不能走动,尾部摇摆;IV 级:双后肢可站立、行走,跑则不稳,尾部摇摆或翘起;V 级:正常走、跑。为排除麻醉和手术本身的干扰,我们采用评分障碍率来评价动物后肢运动功能变化。动物后肢评分障碍率=[(前肢评分-后肢评分)/前肢评分]×100%。

(2)参照 Rivlin^[2]测定大鼠脊髓损伤后运动功能斜板法自行设计一斜板,斜板倾斜角度从 0°开始缓慢上升。判断标准为大鼠停留在斜板上维持至少 5s 时的最大角度,每次测试 3 遍,取其平均值。为排除麻醉和手术本身的干扰,采用障碍率来评价动物后肢运动功能变化。Rivlin 斜板障碍率=[(麻醉前度数-脊髓损伤后度数)/麻醉前度数]×100%。

1.3.2 运动诱发电位 (motor evoked potentials MEP) 的检测 采用双盲法。参照文献^[3]的方法,在术后第 1、72h 对各组大鼠进行测试,观察损伤后 MEP 的变化。

1.3.3 病理标本制作与观察 采用双盲法。分别于术后 8、24、48、72h 取材。

(1)将大鼠损伤段脊髓取出,4%多聚甲醛 PBS 固定液固定 24h,固定后脊髓脱水、浸蜡、修剪、石蜡包埋,连续切片,伊红染色。光镜下观察。

(2)将大鼠开胸暴露心脏,经左心室-主动脉插管,灌注氯化钠注射液 200ml,然后灌注 2%戊二醛 PBS 固定液 200ml,灌注固定 2h。再经过漂洗、后固定、脱水、置换、浸透、包埋、切片,枸橼酸铅电子染色。透射电镜下观察。

1.4 统计学处理

数据用均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 软件包进行数据统计,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 大鼠后肢功能行为学评分

见表 1。GM-1 组后肢功能行为学评分较正常组下降,但较对照组下降幅度明显小。随着时间变化,评分障碍率有不同下降。

2.2 斜板试验

见表 2。GM-1 组斜板角度较正常组明显下降,但较对照组下降幅度明显小。随着时间的变化,障碍率逐渐下降。

2.3 MEP 检测

各组手术前后 MEP 潜伏期及波幅变化见表 3、4。

2.4 病理学观察结果

肉眼及光镜下,正常组脊髓灰白质交界清楚,前角灰质及近中央管可见微小血管,神经元丰富,胞体大,核仁明显。对照组损伤部位脊髓在光镜下见脊髓局灶性出血,神经元核浓聚,染色增强,并逐渐出现神经元固缩、坏死、溶解,细胞体积变小,有大量小胶质细胞浸润,白质中髓鞘肿胀、水肿,有炎细胞浸润(图 1,后插页 I)。GM-1 组损伤部位脊髓肿胀、出血较对照组轻,灰、白质界限清晰。光镜下见脊髓损伤轻,髓鞘肿胀明显,神经元细胞基本正常(图 2,后插页 I)。

表 1 三组大鼠脊髓损伤后后肢功能评分障碍率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

伤后时间	n	A 组	B 组	C 组
24h	6	3.33±8.17	76.67±15.06 ^①	43.33±15.06 ^{①②}
48h	6	0.00	66.67±16.33 ^①	30.00±10.95 ^{①②}
72h	6	0.00	56.67±15.06 ^①	16.67±15.06 ^{①②}

注:①与 A 组同时点比较 $P < 0.05$,②与 B 组同时点比较 $P < 0.01$

表 2 三组大鼠脊髓损伤后斜板障碍率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

伤后时间	n	A组	B组	C组
24h	6	1.57±11.25	62.65±3.73 ^①	41.47±12.77 ^{①②}
48h	6	8.67±9.13	48.17±8.95 ^①	28.10±10.98 ^{①②}
72h	6	3.17±9.67	46.26±9.11 ^①	18.89±17.79 ^{②③}

注:①与 A 组同时点比较 $P < 0.01$, ②与 B 组同时点比较 $P < 0.01$, ③与 A 组同时时间点比较 $P > 0.01$

表 3 各组大鼠手术前后 MEP 潜伏期 ($\bar{x} \pm s, ms$)

检测时间	n	A组	B组	C组
术前	6	6.64±0.57	6.77±0.73 ^①	6.43±0.50 ^①
术后 1h	6	6.83±0.61	9.13±1.23 ^②	7.22±0.79 ^{①③}
术后 72h	6	6.75±0.82	8.11±0.85 ^②	6.80±0.59 ^{①③}

注:与 A 组同时点比较① $P > 0.05$, ② $P < 0.05$, ③与 B 组同时点比较 $P < 0.05$

表 4 各组大鼠手术前后 MEP 波幅 ($\bar{x} \pm s, mV$)

检测时间	n	A组	B组	C组
术前	6	6.87±2.71	6.50±2.80 ^①	7.12±3.00 ^①
术后 1h	6	6.68±2.18	1.63±1.03 ^②	5.13±2.14 ^{①③}
术后 72h	6	7.01±2.69	2.28±1.19 ^②	5.85±2.48 ^{①③}

注:与 A 组同时点比较① $P > 0.05$, ② $P < 0.05$, ③与 B 组同时点比较 $P < 0.05$

电镜下正常组脊髓神经元胞浆内有大量线粒体,形态清晰,嵴存在,游离核糖体及粗面内质网较多,核大,清楚。对照组神经元细胞减少,残留神经元内细胞器结构模糊、不清晰,线粒体嵴消失或呈空泡状、粗面内质网扩张、染色质边集及核碎裂,部分神经元细胞胞浆、细胞器减少,胞膜破裂。髓鞘板层结构紊乱、断裂分层,轴浆外溢,甚至出现空泡(图 3,后插页 I)。GM-1 组病变较对照组明显轻,电镜下观察为基本正常表现。神经细胞胞浆稍减少,细胞器轻度肿胀(图 4,后插页 I)。

3 讨论

脊髓损伤是致残的一个重要因素。近年来随着脊柱外科的发展,脊柱手术过程中引起的医源性脊髓损伤逐渐成为一种常见的脊髓损伤类型。虽然经过手术器械的改进和手术技巧的提高,此类脊髓损伤发生率已经有所下降,但是由于手术总量的增加,此类脊髓损伤的发病总数仍在逐年增加。

急性脊髓损伤包括原发性损伤和继发性损伤,其中继发性损伤被认为是引起脊髓功能丧失的主要原因,目前认为微循环障碍和氧自由基的

作用是继发性损伤的重要因素。近年来,应用药物治疗脊髓损伤取得了一定的效果。但是,脊髓一旦发生损伤、坏死,恢复的可能性较小。研究证实,脊髓继发性损伤在伤后数分钟内就开始产生,因此,要取得更好的效果,必须更早使用药物,甚至在继发性损伤出现前即开始应用。

神经节苷脂是含唾液酸的糖神经鞘脂,存在于哺乳动物细胞膜上,在中枢神经系统组织内含量尤为丰富,尤其是突触^[4]。神经节苷脂是神经细胞膜的组成部分,对损伤后的神经恢复起非常重要的作用。目前用于促进神经细胞生长和抗损伤作用的神经节苷脂主要是 GM-1。GM-1 有清除氧自由基以及改善微循环等多种抑制脊髓损伤机制的作用。GM-1 作为脊髓损伤治疗药物,已经得到许多学者的认可,并在临床上广泛应用。Geisler 等^[5]首先应用 GM-1 治疗急性脊髓损伤患者,并报告 GM-1 治疗后应用 Frankel 法评定平均提高 2~3 级。刘晓光等^[6]也有相似的报告,认为 GM-1 对急性脊髓损伤的神经功能恢复有较好的疗效,且不良反应小。本实验中应用 GM-1 对急性脊髓损伤进行预防,实验中利用药物代谢动力学原理,根据药物血浓度峰值时间来确定术前用药时间,使建立脊髓损伤动物模型时,药物血浓度已达到最大,发挥其最大的药物作用。术后发现预防性应用 GM-1 组大鼠神经行为学指标及运动诱发电位指标明显优于对照组;其病理变化明显好于对照组。说明术前应用 GM-1 对脊髓损伤进行预防可使脊髓损伤程度较轻,脊髓功能状况得到改善,脊髓损伤后动物肢体功能的丧失减少,并在某些功能上更早恢复正常。

目前,过氧化作用被认为是脊髓损伤中最基本也是最重要的作用。Demopoulos 等^[7]提出损伤脊髓的基本神经退变机制在于氧自由基介导的脂质过氧化物的形成。GM-1 具有增强抗氧化酶的活性,降低脂质过氧化反应、清除自由基对细胞膜损害的作用,应用 GM-1 能抑制脊髓组织脂质过氧化,同时保护超氧化歧化酶的活性,阻断自由基所介导的一系列病理损害,并增加细胞膜的稳定性,提高了神经元及其轴突对继发性损伤的耐受力,从而保护了神经元。同时,GM-1 能减轻水肿,增加脊髓血流,改善脊髓组织微循环灌注。继而减轻神经细胞缺血、缺氧,在一定程度上抑制继发性病理损害。另外,GM-1 具有保护细胞膜、维持细

胞内外离子平衡、防止细胞内钙积聚,使损伤部位脊髓细胞内外离子维持良好的状态;还具有调节神经纤维间突触信息传导,改善神经传导速度;促进神经细胞轴突生长。

本实验还发现,应用 GM-1 后随着时间的变化,评分障碍率在不断下降,但始终未达到正常水平。在不同时相点,其评分障碍率比正常组明显高($P<0.05$)。说明预防应用 GM-1 不能完全阻止脊髓损伤的发生和发展。因此,在应用药物预防后,仍需要避免其它因素造成脊髓损伤。

综上所述,GM-1 对脊髓神经功能具有一定的保护作用,在脊柱手术前应用可能对术中脊髓意外损伤有一定的保护作用。

4 参考文献

1. 胥少汀,郭世级.脊髓损伤基础与临床[M].第二版.北京:人民卫生出版社,2002.202.
2. Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor

function after experimental spinal cord injury in the rat[J].J Neurosurg, 1977, 47(4):577-581.

3. Levy WJ, McCaffrey M, Hagichi S. Motor evoked potential as a predictor of recovery in chronic spinal cord injury [J]. Neurosurg, 1987, 20(1):138-142.
4. Constantini S, Young W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats[J]. J Neurosurg, 1994, 80(1):97-111.
5. Geisler FH, Dorsey FC, Coleman WP. GM-1 ganglioside in human spinal cord injury [J]. J of Neurotrauma, 1992, 9 (Supple 2):517-530.
6. 刘晓光, 刘忠军, 党耕町, 等. 单唾液酸神经节苷脂(GM-1)治疗急性脊髓损伤的对比研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2002, 12(5): 344-347.
7. Demopoulos HB, Tomasula J. Molecular Aspects of Membrane Structure Incerebral Edema, Steroids and Brain Edema [M]. Berlin/Heidelberg/New York: Springer Ver Lag, 1972.29-39.

(收稿日期:2005-03-09 修回日期:2005-04-18)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

欢迎订阅 2006 年《中国脊柱脊髓杂志》

《中国脊柱脊髓杂志》是目前我国唯一以脊柱脊髓为内容的国家级核心期刊,由卫生部主管。它注重学术论文的科学性、先进性、实用性、指导性,及时反映国内外脊柱脊髓领域的科研动态、发展方向、技术水平。本刊编委会集中了国内本领域权威专家,并拥有国内一流的作者队伍和不断扩大的读者群。自创刊以来竭诚为广大脊柱外科、骨科、神经科、康复科、肿瘤科、泌尿科、放射科、基础研究、生物医学工程等学科的读者、作者服务,在本专业领域影响日益增加,深得广大读者的重视和好评。

本刊被国内科技期刊统计的权威机构——中国科技信息中心收录为“中国科技论文统计源期刊”,在被作为统计源期刊的二百多种医学期刊中影响因子排名前列,并已分别入编 Chinainfo(中国信息)网络资源系统及以中国学术期刊光盘版为基础的中国期刊网,上网即可查询。

本刊热忱欢迎国内外医药厂商在本刊作与本领域有关的新药、特效药(中、西)、新器械、新内置物、新设备、新康复器材等方面的产品介绍。本刊愿为厂家、商家与用户或读者作忠实媒介,为厂家、商家提供广告园地。广告可以是整面的彩色图文广告,也可以是简短的文字简介;可登全年(12期),也可登一期或几期。广告经营许可证:京朝工商广字 0171 号。

本刊为大 16 开本,2006 年正文增加至 80 页/期,并附彩色插页,全册采用铜板纸印刷。发行日期为每月 10 日。每期定价 13.5 元,全年 162 元。全国各地邮局均可订阅,邮发代号 82-457。国外读者订阅请与中国国际图书贸易总公司中文报刊科联系(100044,北京市车公庄西路 35 号),国外代号:BM6688。

编辑部地址:北京市朝阳区樱花园东街中日友好医院内。邮编:100029。电话/传真:(010)64284923, 64206649。E-mail 地址:cspine@263.net.cn。

欢迎订阅,欢迎投稿,欢迎刊登广告!