

基础研究

大剂量甲基强的松龙对大鼠急性脊髓损伤
预防保护作用的研究

杨建东,李家顺,贾连顺,钱 列,曹师峰,邵 将,陈宣维

(第二军医大学附属长征医院骨科 200003 上海市)

【摘要】目的:探讨大剂量甲基强的松龙对急性脊髓损伤大鼠神经功能的预防保护作用。方法:采用 Allen's 重物打击模型,大鼠随机分为对照组、脊髓损伤组、预防使用大剂量甲基强的松龙组。在脊髓损伤后 24h 和 72h 对大鼠进行神经功能评分(Tarlov 评分),对损伤部位脊髓病理形态学、超微结构及神经细胞凋亡观察。结果:与脊髓损伤组相比,预防使用大剂量甲基强的松龙组大鼠损伤脊髓的病理形态及超微结构改善;Tarlov 评分明显提高;神经细胞凋亡明显减少。结论:预先使用大剂量甲基强的松龙对大鼠急性脊髓损伤有预防性保护作用。

【关键词】 甲基强的松龙;脊髓损伤;Tarlov 评分;凋亡

中图分类号:R683.2,R977.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2005)-01-0046-03

The preventive effect of high-dose methylprednisolone on acute spinal cord injury in rats/YANG Jiandong, LI Jiashun, JIA Lianshun, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15(1):46-48

【Abstract】 Objective: To study the preventive effect of high-dose methylprednisolone on acute spinal cord injury in rats. Method: The rats were randomly divided into three groups: Control groups, acute spinal cord injury groups (SCI), and administration of methylprednisolone prophylaxis groups (MP). Allen's weight drop model of acute spinal cord injury was carried out. Tarlov's motor scales, pathological and ultrastructural changes of spinal cord and apoptosis of spinal cord at 24h and 72h after SCI were sequentially studied. Result: The pathological and ultrastructural changes of spinal cord were significantly improved in the MP group than the SCI group. Tarlov's motor scales increased significantly at 72h after SCI in the MP group. The number of cells apoptosis in spinal cord decreased significantly in the MP group than in the SCI group. Conclusion: There is a neuroprotective effect of high-dose methylprednisolone for acute spinal cord injury in rat.

【Key words】 Methylprednisolone; Spinal cord injury; Tarlov's motor scale; Apoptosis

【Author address】 Department of Orthopaedic Surgery, Shanghai Changzheng Hospital, Shanghai, 200003,

China

大量研究表明^[1-3],甲基强的松龙(MP)对急性脊髓损伤(ASCI)有治疗作用,其主要机理是抗脂质过氧化。由于ASCI后15min脂质过氧化物已显著增加,1h即达最大^[4]。所以,理论上MP必须早期使用甚或在脊髓损伤之前预防性使用,才能最大限度发挥MP的作用。以往有关MP预防性使用的研究不多。本研究旨在探讨大剂量MP对急性脊髓损伤的预防保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

健康成年SD大鼠50只,雌雄不限,体重250±20g,由上海医药工业研究所实验动物中心提

供。随机分成3组:对照组(C组)10只;脊髓损伤组(SCI组)20只;甲基强的松龙预防使用组(MP组)20只。再按观察时间点(伤后24h和72h)将每组动物平分为两小组。

1.2 动物模型制作

采用Allen's重物打击脊髓损伤模型。1%戊巴比妥钠40mg/kg腹腔麻醉,C组仅进行椎板切除,术前30min由尾静脉推注生理盐水1ml。SCI组和MP组行椎板切除后进行重物打击,按无菌原则在显微镜下暴露T8~T9脊髓,在暴露的硬膜表面放置一3mm×2mm的弧形垫片,将圆柱状金属棒沿细玻璃导管垂直、自由落下,制成脊髓损伤模型。重物重量10g,高度5cm,致伤能量50g·cm。SCI组打击前30min由尾静脉推注生理盐水1ml;MP组打击前30min由尾静脉推注甲基强的松龙(甲基强的松龙琥珀酸钠,法玛西亚-普强公司产

第一作者简介:男(1969-),主治医师,医学博士,研究方向:脊柱伤病

电话:(0514)-7937504 E-mail: yangjiandong69@sohu.com

品)30mg/kg。

1.3 神经功能评价

采用 Tarlov 评分。由非本实验人员进行盲法评分。分别在造模后 24h、72h 进行。

1.4 组织学检查

分别在造模后 24h(24h 组)、72h(72h 组)将大鼠过量麻醉后,打开胸腔,左心室插管,右心耳放血,用生理盐水灌注至无血流出,再用 4%多聚甲醛 100ml 灌注、固定。然后取损伤段脊髓及其上下部分,长约 2cm,常规甲醛固定、石蜡包埋,切片层厚 4 μ m。常规 HE 染色。

1.5 电镜标本制备

用 4℃的 2%戊二醛溶液进行灌注。大鼠脊髓标本取出后,立即用锐利的薄刀片将其切成 1mm³大小,取脊髓损伤段立即放入 4℃的 2%戊二醛 PBS 溶液中进行固定并放置在 4℃冰箱中保存。

1.6 细胞凋亡检测

采用 TUNEL 法,TUNEL 试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品。按试剂盒说明书进行。切片采用 Smart Scape 2002 生物显微图像分析系统测量凋亡细胞阳性颗粒数。

1.7 统计学处理

用 SAS 6.12 统计分析软件处理数据,多样本均数行 SNK 检验,两样本均数行 *t* 检验。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 $\alpha=0.05$ 进行双侧检验。

2 结果

2.1 Tarlov 评分

见表 1。造模后 24h,SCI 组与 MP 组的 Tarlov 评分均低于 C 组,差异有显著性意义,但 SCI 组与 MP 组之间无统计学差异;72h 时三组之间统计学差异有显著意义,SCI 组 Tarlov 评分最低,C 组最高,MP 组介于两者之间。表明与 SCI 组相比,MP 组 Tarlov 评分提高,但仍低于对照组。

2.2 脊髓大体及光镜检查

大体:对照组脊髓光滑,无出血点;造模后 24h SCI 组脊髓组织有明显的出血点,范围较大;72h 较 24h 出血范围更大。而同一时间点 MP 组脊髓组织出血范围较 SCI 组明显减小。光镜:对照组显示白质和灰质中无出血,无水肿、组织坏死、空泡等改变(图 1,后插页 II);造模后 24h,SCI 组可见局灶性出血,组织水肿明显,神经元数目明显减少,多数神经元均出现胞浆空泡及核固缩、浓

染现象,整个胞体及胞膜皱缩,白质出现轴突水肿、空泡变性(图 2,后插页 II)。72h 较 24h 明显,并因神经元坏死而在灰质内形成空洞(图 3,后插页 II)。而同一时间点 MP 组脊髓组织肿胀较轻,出血较少,胞浆空泡化及核固缩现象减少;白质轴突水肿、空泡变性较轻。72h 与 24h 光镜表现相似(图 4,后插页 II)。

2.3 电镜检查

损伤后 24h,SCI 组损伤区脊髓可见神经元胞核染色质边集,胞核增大,部分胞核呈凋亡状改变。线粒体轻度至重度水肿,部分细胞内线粒体明显减少、消失。髓鞘板层结构增厚、扭曲、松散、破裂及出现不规则排列。轴索与髓鞘之间由于水肿出现空隙,轴索肿胀,部分轴浆溢出(图 5,后插页 II);72h 脊髓损伤加重,可见较多水肿和坏死区。MP 组 24h 时损伤区脊髓水肿较轻、坏死区较少,细胞器水肿轻,髓鞘板层结构增厚、松散较 SCI 组好,轴索水肿轻(图 6,后插页 II);72h 时电镜表现与 24h 相似。

2.4 细胞凋亡检测

TUNEL 染色后,棕黄色为阳性染色,神经元和神经胶质细胞均有凋亡现象。三组大鼠在术后 24h、72h 测得脊髓损伤区的阳性颗粒数见表 2。在 24h 和 72h,三组之间统计学差异均有显著意义。C 组凋亡细胞组阳性颗粒数最少,SCI 组凋亡细胞阳性颗粒数最多,MP 组介于两者之间。表明 ASCI 后,凋亡细胞明显增多,而预防使用大剂量 MP 可使凋亡细胞数减少,但仍然高于正常对照组。72h 与 24h 相比,SCI 组和 MP 组凋亡细胞之间均无显著差异,说明在实验时间内,预防使用大剂量 MP 后,随着时间延长脊髓凋亡细胞数无明显变化。

表 1 三组大鼠造模后 24h、72h 的 Tarlov 评分 (分)

伤后时间	C组	SCI组	MP组
24h	5	1.4 $\pm$ 0.97 ^①	1.6 $\pm$ 0.97 ^①
72h	5	1.3 $\pm$ 0.95 ^①	2.4 $\pm$ 0.84 ^{①②}

注:①与对照组比较 $P<0.05$;②与 SCI 组比较 $P<0.05$

表 2 三组大鼠造模后 24h、72h 损伤区脊髓凋亡细胞阳性颗粒数(TUNEL 染色)

伤后时间	C组	SCI组	MP组
24h	5.4 $\pm$ 1.67	28.5 $\pm$ 6.45 ^①	20.2 $\pm$ 4.70 ^{①②}
72h	5.6 $\pm$ 2.19	26.2 $\pm$ 6.01 ^①	18.6 $\pm$ 4.62 ^{①②}

注:①与 C 组比较 $P<0.05$;②与 SCI 组比较 $P<0.05$

3 讨论

由于脊髓损伤后 8h 内应用大剂量甲基强的松龙才有治疗作用,因此有学者认为,在预计有脊髓损伤之前,预防性使用大剂量 MP 有保护脊髓神经功能的作用^[5,6]。

神经功能评价是研究脊髓损伤中 SCI 程度、观察恢复情况和评价药物疗效的最基本的指标。本研究结果表明,预防性使用大剂量 MP 后 24h, MP 组 ASCI 大鼠 Tarlov 评分与 SCI 组相比无明显改变,但在 72h 明显提高($P<0.05$)。说明预防性使用大剂量 MP 可以改善 ASCI 大鼠的神经功能。这与实验中损伤脊髓的病理形态及超微结构的改变是一致的。

有学者^[7]认为 MP 起作用的原因是由于在某种程度上增强了脊髓的血流量。脊髓血流量的增加意味着保护了下行性白质神经纤维束,因为下行性白质神经纤维束本身遭受的原始损伤就比中央灰质轻,脊髓血运的改善又可防止下行性白质神经纤维束进一步损害。这一点很重要,因为神经纤维的少许恢复,在临床上可能就有很重要的功能意义。

脊髓损伤后局部因为微循环障碍而发生水肿,同时大量花生四烯酸及其产物前列腺素、白三烯、血栓素等的释放对局部组织造成继发性损伤,产生严重的炎症反应。而 MP 作为一种糖皮质激素,其进入体内后可和糖皮质激素受体结合,促使调脂蛋白的释放,抑制磷脂酶 A2 的活性,减少花生四烯酸及其产物的生成和释放,从而减轻组织损伤。Saunders 经研究发现^[8],大剂量 MP 可降低 SCI 后花生四烯酸的释放及其产物的生成。进一步的研究发现^[9],大剂量 MP 能抑制脊髓损伤区中性粒细胞和巨噬细胞的聚集,而这些细胞被认为是脊髓损伤后继发性组织损害的重要原因。

细胞凋亡是细胞死亡的一种形式,与坏死有着本质的不同。神经元的凋亡可导致神经细胞的丢失,对脊髓功能的影响更为直接^[10]。张强等^[11]发现脊髓损伤后 24h 神经元凋亡逐渐增多,3d 达最大值。而应用大剂量 MP 后,神经元凋亡高峰在损伤后 1d,且凋亡指数显著低于未治疗组,显示 MP 可阻止或减轻脊髓损伤后脊髓细胞凋亡。李家谋等^[12]也认为,MP 对 ASCI 的细胞凋亡具有抑制作用。本研究结果显示,ASCI 后,神经元和胶质细胞发生了凋亡,SCI 组与对照组相比,统计学差异有

显著意义。而预防使用大剂量 MP 后,凋亡细胞显著减少。表明预防使用大剂量 MP 可减少神经细胞凋亡的发生,从而改善脊髓损伤后的神经功能。这可能是大剂量 MP 具有预防神经保护作用的原因之一。

4 参考文献

1. Hall ED, Braughler JM, McCall JM. Antioxidant effects in brain and spinal cord injury [J]. J Neurotrauma, 1992, 9 (Suppl 1): S165-S172.
2. Koc RK, Akdemir H, Karakucuk EI, et al. Effect of methylprednisolone, tirilazad mesylate and vitamin E on lipid peroxidation after experimental spinal cord injury [J]. Spinal Cord, 1999, 37(1): 29-32.
3. Bracken MB and Holford TR. Neurological and functional status 1 year after acute spinal cord injury: estimates of functional recovery in National Acute Spinal Cord Injury Study II from results modeled in National Acute Spinal Cord Injury Study III [J]. J Neurosurg, 2002, 96(3 Suppl): 259-266.
4. Sekhon LH and Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury [J]. Spine, 2001, 26 (Suppl 24): S2-12.
5. Naso WB, Perot PL, Jr., Cox RD. The neuroprotective effect of high-dose methylprednisolone in rat spinal cord hemisection [J]. Neurosci Lett, 1995, 189(3): 176-178.
6. 宋跃明, 杨志明, 雷骥, 等. 甲基强的松龙预防牵张性脊髓损伤的实验研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 1998, 12(5): 261-265.
7. Young W. Methylprednisolone Treatment of acute spinal cord injury: an introduction [J]. J Neurotrauma, 1991, 8 (Suppl 1): S43-S46.
8. Saunders RD, Dugan LL, Demediuk P, et al. Effects of methylprednisolone and the combination of alpha-tocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation in traumatized spinal cord tissue [J]. J Neurochem, 1987, 49(1): 24-31.
9. Hsu CY, Dimitrijevic MR. Methylprednisolone in spinal cord injury: the possible mechanism of action [J]. J Neurotrauma, 1990, 7(3): 115-119.
10. Li M, Ona VO, Chen M, et al. Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and 3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury [J]. Neuroscience, 2000, 99(2): 333-342.
11. 张强, 廖维宏, 吴亚民, 等. 大剂量甲基强的松龙对大鼠脊髓损伤后脊髓细胞凋亡的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2000, 15(4): 218-220.
12. 李家谋, 蔡钦林. 大鼠脊髓损伤中的细胞凋亡及甲基强的松龙的干预作用 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2001, 11(6): 343-346.

(收稿日期: 2004-04-20 修回日期: 2004-08-31)

(英文编审 王忠植)

(本文编辑 卢庆霞)