

## · 基础研究 ·

## 伊达拉奉对大鼠脊髓损伤后的神经保护作用

任宪盛<sup>1</sup> 杨有庚<sup>1,2</sup> 焦静雪<sup>3</sup> 徐莘香<sup>4</sup>

**摘要** 目的:探讨伊达拉奉对大鼠脊髓损伤后的神经保护作用。方法:雄性 SD 大鼠 30 只,随机均分为对照组和实验组。采用改良 Allen 法建立脊髓损伤模型,通过硫巴比妥酸试验检测伤后 2h 内脊髓组织匀浆中丙二醛的含量,采用斜板试验和 BBB 评分评价伤后 6 周内大鼠的运动功能恢复情况。随后观察损伤后的组织学改变,计算伤段脊髓残存组织面积。结果:伤后 2h 治疗组脊髓组织匀浆中丙二醛的含量较对照组明显减少,二者之间存在显著性差异;损伤后 6 周治疗组的斜板试验的临界角和 BBB 评分及脊髓残存组织的面积均较对照组大,二者之间差异存在显著性意义。结论:伊达拉奉能抑制创伤后脊髓的脂质过氧化,从而保护脊髓损伤大鼠的脊髓组织,促进神经功能恢复。

**关键词** 伊达拉奉;脊髓损伤;神经保护

**中图分类号**:R49,R651.2 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-1242(2006)-08-0686-03

The neuroprotection effect of edaravone on spinal cord injury in rats/REN Xiansheng, YANG Yougeng, JIAO Jingxue, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006,21(8):686—688

**Abstract Objective:**To investigate the effect of edaravone on neuroprotection after spinal cord injury in rats. **Method:**Thirty male Sprague-Dewley rats were randomly assigned to two groups: Control group and experiment group. A standardized model of spinal cord injury was established by the modified Allen's crush method. The malonyldialdehyde production of spinal cord homogenate was measured by using the thiobarbituric acid test at 2h after injury. Function status was assessed weekly using inclined plane test and the Basso-Beattie-Bresnahan(BBB) locomotor rating scores for 6 weeks. After which the animals were killed for histologic studies, the spared spinal cord area was calculated. **Result:** After 2 hours, the malonyldialdehyde production of spinal cord homogenate was less in the experiment group than in the control group. There was significant difference between the two groups. Six weeks after injury, edaravone-treated rats showed significantly higher angle of incline plane test and BBB motor score and larger spared spinal cord area than the control rats. There was significant difference between the two groups. **Conclusion:**Edaravone can inhibit posttraumatic lipid peroxide formation, preserve more spinal cord tissue, so that it can enhance nerve functional recovery.

**Author's address** Dept. of Orthopaedics, the Second Hospital of Jilin University, Changchun, 130041

**Key words** edaravone; spinal cord injury; neuroprotection

伊达拉奉是一种新型的自由基清除剂,能抑制自由基的形成和铁依赖性的脂质过氧化,而自由基引起的细胞膜脂质过氧化导致细胞损伤,可解释脑缺血后的神经细胞死亡。在日本,伊达拉奉对脑缺血模型的神经保护作用已被急性脑梗死的治疗所证实<sup>[1-2]</sup>。脊髓损伤包括原发性损伤和继发性损伤,而继发性损伤被证实由自由基介导的脂质过氧化所触发,神经细胞膜内的大量多不饱和脂肪酸易受到自由基介导的脂质过氧化的损害。在健康的神经组织中,这些自由基可以持续的被内源性的抗氧化剂所中和,而不引起细胞损害,但是,在脊髓损伤后,自由基的合成可超过内源性抗氧化剂的中和能力,因而引发神经组织损害。基于这个前提,我们探讨自由基清除剂——伊达拉奉在治疗大鼠急性脊髓损伤中的治疗作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型制作及实验分组

月龄 3 个月雄性 Sprague-Dawley 大鼠 30 只,体重 250—300g(吉林大学实验动物中心)。以 1.5% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉 30mg/kg,背部剪毛,常规消毒后铺无菌小孔巾,以 T10 为中心依次切开皮肤、皮下,长度 2cm 左右。钝性骨膜下分离两侧椎旁肌以显露 T9—T11 椎板和棘突,以小咬骨钳咬除 T10 棘突、椎板和 T9、T11 的部分椎板,保留硬脊膜,显露脊髓之后采用改良的 Allen 打击法<sup>[3]</sup>制模,10g 重锤从 2.5cm 高度自由落下致伤脊髓(致伤能量 25gcm),损伤部位为 T10 水平的脊髓。撞击成功标准为:撞击的脊髓组织水肿、出血,大鼠尾巴出现痉挛性摆动,双

1 吉林大学第二医院骨科,吉林省长春市,130041

2 通讯作者:杨有庚(吉林大学第二医院骨科,吉林省长春市,130041)

3 吉林大学第二医院手术室

4 吉林大学第一附属医院骨科

作者简介:任宪盛,男,博士,主治医师

收稿日期:2005-10-19

后肢躯体回缩样扑动, 双后肢呈弛缓性瘫痪。

脊髓损伤造模成功后, 将动物随机分为 2 组: 实验组( $n=15$ ); 损伤后分别于 5min、24h、48h 静脉内注射伊达拉奉注射液 (江苏先声药业有限公司) 5mg/kg; 对照组( $n=15$ ): 损伤脊髓后注射等量生理盐水。

两组术后预防性应用青霉素肌肉注射, 室温控制在 20—28℃, 术后每天人工挤压协助排尿 2—3 次, 直至形成自律性膀胱。

## 1.2 脊髓组织中丙二醛的测定

实验组和对照组中各取 5 只大鼠, 于损伤后 2h 麻醉后处死, 制备脊髓组织匀浆, 丙二醛(malonyl-dialdehyde, MDA)测定: 按硫代巴比妥酸法测定, 按照试剂盒说明方法操作, 721 型分光光度计比色, 计算 MDA 含量。该方法的灵敏度高; 呈色稳定、不受气温等外界因素的影响。

## 1.3 运动功能的评价

两组大鼠分别在损伤后 1 天和损伤后 6 周内的每周进行斜板试验与 BBB (Basso-Beattie-Bresnahan) 运动评分。

斜板试验是将大鼠身体纵轴与斜板纵轴相互垂直, 测试斜板每升高 5°, 大鼠停稳 5s 的最大角度值。

BBB 运动评分是将动物放入一固定场地, 观察动物的臀、膝、踝关节、行走步态、躯干运动及其协调情况, 根据 BBB 运动评分法标准, 观察期为 5min, 动物要保持在中心活动范围内。由熟悉该评分标准的实验人员进行盲法评分。

## 1.4 组织学检查及脊髓残存组织面积

脊髓损伤后 6 周, 麻醉后处死大鼠, 心脏灌注冰盐水及 4% 多聚甲醛缓冲液, 取损伤段脊髓约 8mm, 4% 多聚甲醛缓冲液固定过夜, 脱水, 石蜡包埋, 横切面 8μm 厚度连续切片, Luxol 固蓝染色后甲酚紫复染, 取各组中每只动物伤区横切片 10 片, 在 Soft-imaging Analysis(Pro) 自动图像分析系统上进行显微图像分析, 计算各组损伤区平均组织面积。再以正常胸脊髓横切面为基数, 计算出残余区域面积百分比。

## 1.5 统计学分析

所有数值以均数±标准差表示, 采用 SPSS10.0

统计程序包, 行配对  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 脊髓组织中丙二醛含量的测定

对照组的脊髓组织匀浆中的丙二醛的含量为  $1.11 \pm 0.12 \text{ nmol/mg}$ , 而实验组的脊髓组织中的丙二醛含量为  $0.55 \pm 0.05 \text{ nmol/mg}$ , 较对照组减少了 50% 以上, 两者之间差异存在显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 可见, 伊达拉奉治疗后明显减轻了脊髓组织中的脂质过氧化, 从而发挥神经保护作用。

### 2.2 运动功能的评价

**2.2.1 斜板试验:** 两组动物伤后 6 周内各时间点倾斜平面临界角度值见表 1。在伤后 1 周时, 实验组和对照组大鼠倾斜平面临界角度值均有所上升, 但二者之间差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。从第 3 周起, 对照组大鼠的临界角度回升缓慢, 而实验组大鼠的临界角度回升加快; 自第 4 周开始, 实验组大鼠的临界角度与对照组相比差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.2.2 脊髓损伤后大鼠 BBB 评分:** 见表 2。在伤后 1 周时, 实验组大鼠 BBB 评分和对照组均有所上升, 但两者之间差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 从第 3 周起, 对照组大鼠的 BBB 评分回升缓慢, 基本处于平台期, 而实验组大鼠的 BBB 评分回升加快; 自第 4 周开始, 实验组大鼠的 BBB 评分与对照组相比差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。提示伊达拉奉治疗后明显促进了 SCI 大鼠伤后后肢运动功能的恢复。

### 2.3 组织学检查及脊髓残存组织面积

**2.3.1 组织学检查:** 对照组脊髓灰、白质界限不清, 可见大片坏死、囊腔及空洞形成, 周围有大量炎性细胞浸润; 实验组脊髓灰、白质界限清楚, 可见部分囊变和胶质细胞浸润, 大部分神经组织正常, 少数神经细胞及轴突退变 (见图 1, 见前置彩色插页 7)。

**2.3.2 脊髓残存组织面积:** 脊髓残存组织面积变化能反映脊髓结构的恢复程度, 提示大鼠运动功能恢复的情况。脊髓损伤后 6 周对照组和实验组的伤区脊髓残存组织面积百分率分别为  $22.63\% \pm 2.80\%$  及  $44.62\% \pm 5.22\%$ , 差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。

表 1 两组动物斜板试验的比较

( $\bar{x} \pm s, n=10$ ) (°)

| 组别  | 1 周        | 2 周        | 3 周        | 4 周                     | 5 周                     | 6 周                     |
|-----|------------|------------|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照组 | 26.02±1.88 | 28.04±1.92 | 32.06±2.10 | 34.25±2.20              | 37.02±2.26              | 40.22±2.18              |
| 实验组 | 28.14±2.02 | 32.02±2.10 | 36.02±2.08 | 41.12±2.21 <sup>①</sup> | 46.62±2.30 <sup>①</sup> | 52.12±2.42 <sup>①</sup> |

①与对照组比较  $P < 0.05$

表 2 两组动物 BBB 评分比较

( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别  | 1d | 1 周     | 2 周     | 3 周      | 4 周                   | 5 周                   | 6 周                   |
|-----|----|---------|---------|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 对照组 | 0  | 2.8±0.4 | 6.4±0.6 | 8.0±0.4  | 8.2±0.6               | 8.5±0.8               | 8.6±1.0               |
| 实验组 | 0  | 4.2±0.6 | 8.6±0.8 | 10.8±0.4 | 11.6±0.8 <sup>①</sup> | 12.8±0.6 <sup>①</sup> | 13.4±0.8 <sup>①</sup> |

①与对照组比较  $P < 0.05$

### 3 讨论

脊髓损伤分为原发性损伤和继发性损伤, 其中继发性损伤是指原发性损伤后, 脊髓组织缺血、变性、坏死等变化。而脊髓损伤急性期产生的自由基是引起继发性坏死的主要原因。自由基对细胞膜双磷脂结构进行过氧化作用, 生成多种脂质过氧化物, 损伤细胞膜, 并引起溶酶体及线粒体的破裂。据报道, 中枢神经系统的脂质过氧化在损伤后 1min 便开始, 进行性增加到第二小时, 持续到损伤后的 24h 或 48h<sup>[3]</sup>。脂质过氧化和自由基在脊髓损伤中的作用已经得到大量的实验和临床研究的支持。这些自由基产生和脂质过氧化是急性脊髓损伤后神经紊乱的临床治疗的药理途径的靶点, 在急性脊髓损伤后尽早的使用大剂量甲基强的松龙已经证实有效, 并用于临床。其神经保护作用归因于其抑制了氧自由基诱导的脂质过氧化<sup>[4]</sup>。伊达拉奉作为一种新型的自由基清除剂, 与过氧自由基反应生成 2-氧-3-苯腙-丁酸 [2-oxo-3-(phenylhydrazono)-butanoic acid, OPB], 从而清除自由基, 发挥神经保护作用<sup>[5]</sup>。大量文献已经报道了伊达拉奉在中枢系统损伤中能够有效地清除氧自由基, 抑制脂质过氧化, 减少神经细胞死亡, 从而促进神经功能恢复或改善<sup>[6-9]</sup>。Nakamura 等<sup>[10]</sup>在大鼠实验性脑损伤中, 使用伊达拉奉治疗后大鼠氧自由基水平明显降低, 损伤脑组织的含水量明显减少, 运动功能明显改善, 表明伊达拉奉能有效抑制大鼠脑的脂质过氧化, 减轻脑水肿, 从而发挥神经保护作用。Amemiya 等<sup>[11]</sup>相继报道了在大鼠脑缺血性损伤模型中使用伊达拉奉治疗后, 抑制大鼠脑的脂质过氧化, 减小了脑皮质的梗死区域, 同时减少了神经元的凋亡, 促进神经功能的改善。近年来在兔脊髓损伤模型中, 学者们进行了进一步的探讨。Takahashi 等<sup>[12-13]</sup>先后报道了在兔子脊髓缺血性损伤模型中, 伊达拉奉既可通过清除自由基, 减轻神经元氧化性 DNA 损伤, 促进神经细胞的 DNA 修复, 挽救损伤的运动神经元, 促进神经功能恢复; 又可通过增加内皮细胞一氧化氮合酶和 Cu/Zn 超氧化物歧化酶水平, 减少神经细胞的一氧化氮合酶水平, 有效的清除自由基, 挽救更多的运动神经元, 促进运动功能的恢复。随后, Hashizume 等<sup>[14]</sup>在兔子脊髓缺血再灌注损伤的模型中, 系统性注射伊达拉奉后, 明显减轻了脊髓缺血性神经元损伤, 使存活神经元明显增加, 促进了神经功能恢复。他们认为伊达拉奉能够通过清除自由基分子, 从而延迟脊髓缺血再灌注损伤后神经细胞死亡, 发挥神经保护作用, 改善神经功能, 促进脊髓损伤后的康复。

本实验结果显示, 在大鼠脊髓损伤模型中, 伊达拉奉治疗后脊髓组织中丙二醛的含量明显减少, 脊髓残存组织面积增加, 斜板试验的临界角和 BBB 评分均明显改善。这些结果揭示了伊达拉奉能有效抑制大鼠脊髓损伤后的脂质过氧化, 减轻氧自由基对神经细胞的损伤, 增加脊髓组织对缺血的抗损伤能力, 促进运动功能的恢复, 具有良好的神经保护作用。本实验中伊达拉奉抑制脂质过氧化的程度达到 50%, 比 30mg/kg 甲基强的松龙治疗脊髓损伤减弱的程度还要大(34.7%)<sup>[15]</sup>, 为伊达拉奉临床治疗脊髓损伤提供了理论基础, 但其对脊髓损伤的神经保护作用仍需进一步的探讨。

### 参考文献

- [1] Tanahashi N, Fukuuchi Y. Treatment of acute ischemic stroke: recent progress[J]. Intern Med, 2002, 41:337—344.
- [2] Group E AIS. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone(MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters[J]. Cerebrovasc Dis, 2003, 15:222—229.
- [3] Vagnozzi R, Marmarou A, Tavazzi B, et al. Changes of cerebral energy metabolism and lipid peroxidation in rats leading to mitochondrial dysfunction after diffuse brain injury [J]. J Neurotrauma, 1999, 16:903—913.
- [4] Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone[J]. J Neurosurg, 1992, 76:13—22.
- [5] Yamamoto Y, Kuwahara T, Watanabe K, et al. Antioxidant activity of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one[J]. Redox Rep, 1996, 2: 333—338.
- [6] Kawai H, Nakai H, Suga M, et al. Effects of a novel free radical scavenger, MCI-186, on ischemic brain damage in the rat distal middle cerebral artery occlusion model [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1997, 281(2):921—927.
- [7] Yamamoto T, Yuki S, Watanabe T, et al. Delayed neuronal death prevented by inhibition of increased hydroxyl radical formation in a transient cerebral ischemia [J]. Brain Res, 1997, 762 (1-2):240—242.
- [8] Tanaka M. Pharmacological and clinical profile of the free radical scavenger edaravone as a neuroprotective agent[J]. Nippon Yakurigaku Zasshi, 2002, 119(5):301—308.
- [9] Yasuoka N, Nakajima W, Ishida A. Neuroprotection of edaravone on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2004, 151(1-2):129—139.
- [10] Nakamura H, Uzura M, Uchida K, et al. Effects of edaravone on experimental brain injury in view of free radical reaction [J]. Acta Neurochir Suppl, 2003, 86:309—311.
- [11] Amemiya S, Kamiya T, Nito C, et al. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of edaravone following transient focal ischemia in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2005, 516(2):125—130.
- [12] Takahashi G, Sakurai M, Abe K, et al. MCI-186 prevents spinal cord damage and affects enzyme levels of nitric oxide synthase and Cu/Zn superoxide dismutase after transient ischemia in rabbits [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 126: 1461—1466.
- [13] Takahashi G, Sakurai M, Abe K, et al. MCI-186 reduces oxidative cellular damage and increases DNA repair function in the rabbit spinal cord after transient ischemia [J]. Ann Thorac Surg, 2004, 78(2):602—607.
- [14] Hashizume K, Ueda T, Shimizu H, et al. Effect of the free radical scavenger MCI-186 on spinal cord reperfusion after transient ischemia in the rabbit [J]. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg, 2005, 53(8):426—433.
- [15] Hall ED, Braughler JM. Acute effects of intravenous glucocorticoid pretreatment on the in vitro peroxidation of cat spinal cord tissue[J]. Exp Neurol, 1981, 73:321—324.