

· 论 著 ·

# 普鲁泊福对大鼠急性脊髓损伤的治疗作用

夏建华<sup>1,2</sup>, 石学银<sup>1\*</sup>, 曹 莉<sup>3</sup>, 刘 刚<sup>1</sup>, 张 琪<sup>3</sup>, 王亚华<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学长征医院麻醉科, 上海 200003; 2 解放军第 411 医院麻醉科, 上海 200081; 3 第二军医大学基础医学部神经生物学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** 目的: 研究普鲁泊福对大鼠急性脊髓损伤的治疗作用及其机制。方法: SD 大鼠 60 只, 随机分为假手术组、损伤组和普鲁泊福组 ( $n=20$ )。采用改良的 Allen's 打击法致伤大鼠脊髓, 假手术组仅做椎板切除术。普鲁泊福组在脊髓损伤后 30 min 以 60 mg/(kg·h) 的速度持续输注 1% 的普鲁泊福 1 h, 其余两组以相同的方法给予 0.9% 的生理盐水。应用斜板试验和 BBB (Basso, Beattie and Bresnahan) 评分法进行后肢运动功能评价, 分别采用黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸法测定血浆超氧化物歧化酶 (SOD) 活力和丙二醛 (MDA) 含量变化, 同时观察组织形态学变化。结果: 普鲁泊福组行为学评分明显高于损伤组 ( $P < 0.05$ ); 与假手术组相比, 损伤组血浆 MDA 含量升高, SOD 活力降低, 而与损伤组相比, 普鲁泊福组血浆 MDA 含量降低, SOD 活力升高; 损伤组脊髓病理变化较重, 可见大量神经元坏死, 普鲁泊福组神经元坏死较轻。结论: 普鲁泊福对大鼠急性脊髓损伤有较好的治疗作用, 其机制与抗氧化作用有关。

**[关键词]** 普鲁泊福; 脊髓损伤; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

**[中图分类号]** R 651.205 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X (2004) 11-1212-04

## Neuroprotective effect of propofol on acute spinal cord injury in rats

XIA Jian-Hua<sup>1,2</sup>, SHI Xue-Yin<sup>1\*</sup>, CAO Li<sup>3</sup>, LIU Gang<sup>1</sup>, ZHANG Qi<sup>3</sup>, WANG Ya-Hua<sup>1</sup> (1. Department of Anesthesiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2 Department of Anesthesiology, No. 411 Hospital of PLA, Shanghai 200081; 3 Department of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the neuroprotective effect and its mechanism of propofol on acute spinal cord injury in rats. **Methods:** Sixty Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups: sham operation group, injury group and propofol treatment group. In propofol group, 1% propofol was infused at a rate of 60 mg/(kg·h) for an hour, while 0.9% saline was used in other groups. Rat models of spinal cord contusion were made by a modified Allen's method. The inclined plane and BBB (Basso, Beattie and Bresnahan) scales were used to assess hind limb neurological function. Superoxide dismutase (SOD) activity and malonaldehyde (MDA) level in the plasma were measured by thiobarbituric acid (TBA) and xanthine oxidase methods respectively. Pathological changes were observed at the same time. **Results:** Behavioral score of propofol group was significantly higher than that of injury group. Compared with sham operation group, MDA level in injury group was increased and SOD activity was reduced. Compared with the injury group, MDA level in the propofol group was much lower and SOD activity increased remarkably. In injury group, a large number of neuronal death could be seen and pathological changes in propofol group were better than those in injury group. **Conclusion:** Propofol has neuroprotective effect on acute spinal cord injury, which is possibly related to its antioxidation function.

**[KEY WORDS]** propofol; spinal cord injury; superoxide dismutase; malonaldehyde

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(11): 1212-1215]

\* 脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 后自由基反应被公认为是引起脊髓组织继发性损伤的主要因素之一<sup>[1]</sup>。因为脊髓组织膜结构含有大量的脂质, 损伤后缺血缺氧及水肿会引起氧自由基产生增加且清除功能下降, 致使自由基在局部堆积。自由基可攻击脂质含量极为丰富的神经细胞膜, 引起脂质过氧化反应, 使脊髓组织进一步受损<sup>[2]</sup>。普鲁泊福的抗氧化作用已逐渐为人们所认识。本实验旨在观察普鲁泊福对大鼠急性脊髓损伤的作用并探讨其机制。

## 1 材料和方法

1.1 脊髓损伤模型的建立 雌性 SD 大鼠, 体质量 (250 ± 20) g, 购自第二军医大学实验动物中心。按照 W rathall 等<sup>[3]</sup>的改良 Allen's 撞击法建立脊髓损

\* [基金项目] 上海市卫生局科技发展基金 (024097)。

[作者简介] 夏建华 (1971-), 男 (汉族), 硕士, 主治医师

E-mail: jianhuaxia2000@yahoo.com.cn

\* Corresponding author. E-mail: shixueyin2000@yahoo.com.cn

伤模型。动物经 20% 乌拉坦 (1.0 g/kg) 腹腔内注射麻醉后, 以 T<sub>8</sub> 棘突 (约在大鼠肩胛骨下缘) 为中心作背部正中切口, 暴露待损伤脊髓 (T<sub>9</sub>、T<sub>10</sub>), 长约 1 cm, 采用自制的改良 Allen's 装置致伤脊髓, 复制动物模型, 致伤能量为 40 g/cm<sup>2</sup> (10 g 砝码从 4 cm 高度自由落下), 打击面积为 2 mm × 3 mm, 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, 双下肢呈迟缓性瘫痪。止血后缝合切口。

1.2 实验动物分组和术后护理 60 只大鼠随机分为 3 组: 假手术组, 仅做椎板切除术; 损伤组, 脊髓损伤 30 min 后给予 0.9% 生理盐水 6 ml/(kg · h), 采用微量输液泵经尾静脉连续输注 1 h; 普鲁泊福组, 脊髓损伤 30 min 后给予 1% 普鲁泊福 60 mg/(kg · h), 采用微泵经尾静脉连续输注 1 h。每组动物 20 只, 分别于 6、24 和 48 h 各取 5 只动物灌注取脊髓, 进行形态学观察, 并同时取血测超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA), 每组余下 5 只动物分别于术前及术后 1、3、5、7、14、21、28、35、42 d 进行运动神经功能评分。术后每日肌注舒氨新 0.1 mg/kg 2 次, 以防呼吸道感染、尿路感染, 次日手工挤压膀胱帮助排尿, 并保持大鼠身体干燥, 直到建立自主排尿反射。自由摄食、饮水。

1.3 取材和制片 动物在各时间点麻醉后开胸, 经右心室取血 3 ml, 留作测定 SOD 和 MDA 用; 然后经左心室插管直达升主动脉, 快速灌注生理盐水冲洗, 剪开右心耳放血, 待流出液体清亮后 (约需生理盐水 200 ml), 再以 4% 多聚甲醛与 0.1 mol/L PB 混合液 (pH 7.4) 灌注 30 min。完整取出脊髓组织, 切下损伤段, 长约 5 mm。石蜡包埋后, 连续切片, 片厚 10 μm, H-E 染色进行形态学观察。

1.4 行为学评定 按 Rivlin 等和 Basso 等<sup>[4,5]</sup>建立的方法对大鼠行斜板 (IP) 实验和 BBB 联合评分。IP 实验是将大鼠头朝左横放在改良的 Rivlin 斜板上, 从水平位置起逐渐增大角度, 以动物能够在板上停留 5 s 而不跌落的最大角度作为评分标准, 重复 3 次取其平均值作为最终结果。BBB 评分法是将动物置于高 7 cm、直径 90 cm 的平坦不滑的塑胶圆模板上观察后肢各关节的活动状况, 并对其进行功能评分, 观察者为熟悉评分标准但非本组的实验人员。评价前所有动物应检查膀胱是否充盈, 以免因膀胱充盈而影响活动。

1.5 SOD 和 MDA 的测定 每只大鼠经右心室取血 3 ml 后, 立即 2 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 存于 -20 °C 冰箱, 1 周内分析完毕。测定仪器为可见光分光光度计 (721 型, 上海医用仪器厂)。SOD 和 MDA 测定试剂盒购自南京建成生物研究所, MDA 按硫代巴比妥酸法测定, SOD 采用黄嘌呤氧化酶法测定, 操作方法按试剂盒说明进行。

1.6 统计学处理 所得数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 Nosa 软件进行统计学检验, 组间比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 各组脊髓 H-E 染色比较 假手术组各时间点脊髓 H-E 染色未见异常。损伤组脊髓损伤 6 h 后白质后索内有大片出血灶, 灰质中有散在出血灶, 灰质结构被破坏, 大量神经元死亡, 部分神经元核固缩。24 h 时出血范围扩大, 灰质中大量神经细胞坏死, 核固缩, 中心液化坏死, 白质中可见大量空泡。48 h 时灰质结构破坏严重, 损伤中心形成一坏死空腔, 可见到坏死细胞的碎片组织, 边缘区域可见增生的胶质细胞群, 白质区仅有部分正常结构。普鲁泊福组脊髓的病理改变过程与损伤组一致, 但各时间点的损伤程度均轻于损伤组 (图 1)。

2.2 行为学评分结果 IP 实验主要观察大鼠后肢静态肌张力, 正常大鼠 IP 实验评分平均分在 75 左右, BBB 评分为 21 分。假手术组大鼠在手术后 1~3 d 内行为功能轻度减低, 无统计学意义, 随即恢复正常。脊髓损伤后的大鼠短时间内双下肢功能完全丧失, 肌力降为零, 动物俯卧位行走, 尿潴留, 呈现出脊髓休克的表现。脊髓损伤后 1~3 d 是功能下降最大的时期, 损伤组和普鲁泊福组两项评分均无显著差异, 仅能见到动物后肢 1~2 个关节活动。5 d 左右大鼠的后肢肌力逐渐开始恢复, 7~21 d 各组动物行为功能恢复幅度加大, 且组间差距加大, 普鲁泊福组显著高于损伤组 ( $P < 0.05$ )。28~42 d 为功能恢复后期, 即胶质瘢痕形成期时, 功能恢复速度减慢, 普鲁泊福组行为学评分值仍高于损伤组 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

2.3 MDA 和 SOD 检测结果 与假手术组相比, 损伤组在 6、24 和 48 h 的 MDA 值均升高, 且随时间的变化, MDA 值呈渐升趋势 ( $P < 0.01$ )。而普鲁泊福组各时间点的 MDA 值均低于损伤组 ( $P < 0.05$ )。SOD 值则呈现相反的变化。见表 2。

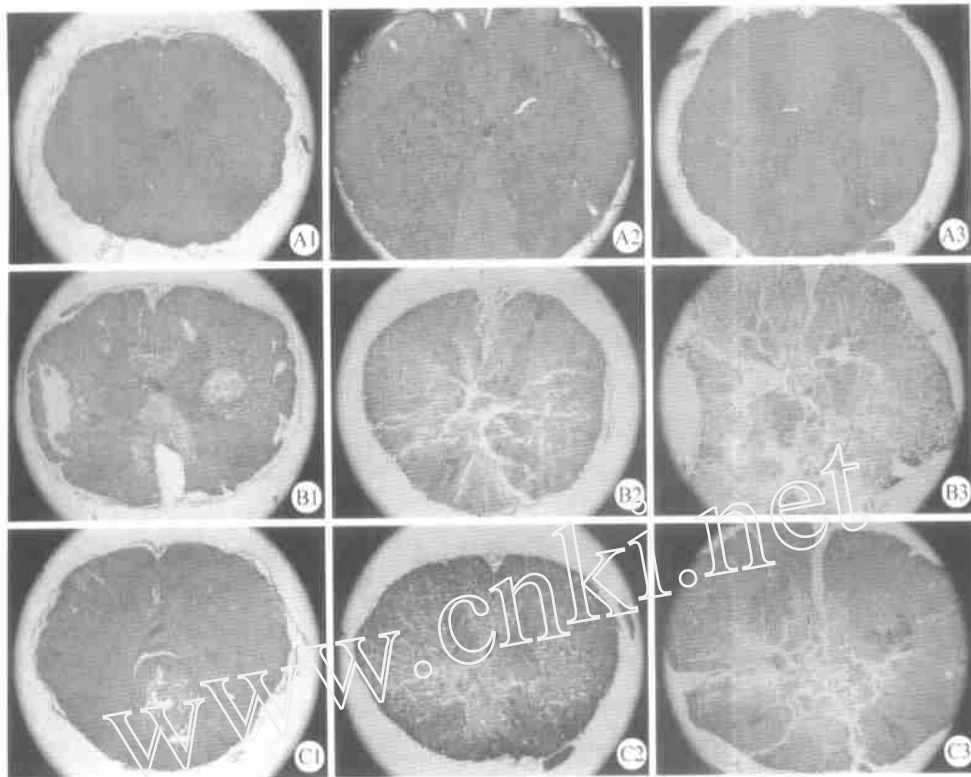


图 1 大鼠脊髓损伤后脊髓组织病理切片

Fig 1 Spinal cord biopsies of rats(H-E , ×20)

A 1-A 3: 6, 24, 48 h after operation in sham operation group;

B 1-B 3: 6, 24, 48 h after injury in injury group; C 1-C 3: 6, 24, 48 h after injury in propofol group

表 1 普鲁泊福对脊髓损伤大鼠行为学评分的影响

Tab 1 Effect of propofol on behavioral score after SCI

(n= 5,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	Time after SCI(t/d)								
	1	3	5	7	14	21	28	35	42
Sham operation									
IP score	70 ± 3	72 ± 3	74 ± 3	75 ± 3	76 ± 3	75 ± 4	75 ± 3	76 ± 4	75 ± 3
BBB score	20 ± 2	21 ± 2	21 ± 2	21 ± 1	21 ± 1	21 ± 1	21 ± 1	21 ± 1	21 ± 1
Injury									
IP score	35 ± 3	33 ± 3	36 ± 2	40 ± 3	43 ± 2	49 ± 2	51 ± 3	52 ± 3	53 ± 2
BBB score	2 ± 1	3 ± 1	5 ± 2	6 ± 2	10 ± 2	12 ± 2	14 ± 2	14 ± 2	15 ± 2
Propofol									
IP score	36 ± 2	35 ± 3	40 ± 2	46 ± 3	55 ± 2*	59 ± 2*	60 ± 3*	61 ± 3*	62 ± 3*
BBB score	2 ± 1	5 ± 1	6 ± 1	9 ± 2	14 ± 1	15 ± 2	16 ± 2	16 ± 2	17 ± 2

\* P < 0.05 vs injury group

表 2 普鲁泊福对脊髓损伤大鼠血浆MDA、SOD 的影响

Tab 2 Effects of propofol on MDA and SOD after SCI in rats

(n= 5,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	MDA (CB/μmol · L <sup>-1</sup> )			SOD (CB/μU · L <sup>-1</sup> )		
	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
Sham operation	5.29 ± 0.58	5.68 ± 0.84	5.99 ± 1.01	382.26 ± 11.15	375.36 ± 9.32	373.17 ± 13.20
Injury	8.41 ± 0.39**	8.62 ± 1.12**	9.06 ± 1.76**	295.56 ± 7.01**	281.32 ± 13.56**	265.82 ± 6.58**
Propofol	6.23 ± 0.91	6.61 ± 0.98	7.58 ± 1.41	340.62 ± 15.02	328.51 ± 8.33	315.05 ± 9.35

\*\* P < 0.01 vs sham operation group; P < 0.05 vs injury group

### 3 讨论

继发性损伤是指脊髓在外伤引起的原发性损伤之后由于各种因素引起的脊髓再损伤, 其产生的脊髓损害远远超过了原发性损伤, 因此及时有效地针对继发性损伤进行治疗, 可使病变局限, 促进神经功能恢复。脊髓损伤急性期产生的自由基被认为是引起继发性损伤的重要因素。脊髓损伤后血流发生改变, 脊髓组织缺血缺氧、出血, 使神经细胞线粒体传递链发生脱耦联, 产生并释放大量的氧自由基。氧自由基含有不配对电子, 性质极不稳定, 极易攻击生物膜上饱和脂肪酸的丙烯双链, 形成链锁式的铁依赖性脂质过氧化反应, 破坏膜结构的完整性与通透性, 导致细胞变性坏死及出血水肿加重等。MDA 是此反应的产物之一, MDA 的测定可反映脂质过氧化水平。SOD 能清除超氧阴离子自由基, 保护细胞免受损伤。Hall 等<sup>[1]</sup>发现脊髓损伤 5 min 后 MDA 含量即有明显增加, 30 min 时可增加近 70%。在本实验中, 与假手术组相比, 损伤组 6、24 和 48 h 的 MDA 值均显著升高, 且随时间的变化 MDA 值逐渐升高, 这说明脊髓损伤后脂质过氧化作用逐渐增强。与假手术组相比, 损伤组在 6、24 和 48 h 的 SOD 值均显著降低, 且随时间的变化 SOD 值呈渐降趋势, 这说明脊髓损伤后机体对氧自由基的清除能力减弱。从脊髓 H-E 染色可以看出, 损伤组伤后 6、24 和 48 h 脊髓灰白质结构破坏和神经元坏死逐渐加重, 而损伤组伤后 3 d 内的行为学评分亦呈下降趋势。MDA、SOD 的变化规律与形态学和行为学评分结果是一致的, 这提示了由自由基引起的脂质过氧化反应是脊髓损伤早期的重要病理生理基础。因此, 脊髓损伤早期治疗的一个重要环节就是抑制和清除自由基。Erten 等<sup>[6]</sup>发现褪黑素可以通过抑制自由基的产生减轻脊髓损伤。

普鲁泊福作为一种麻醉镇静药已广泛应用于临床, 其抗氧化作用逐渐被人们所认识<sup>[7]</sup>。它含有酚羟基, 能与氧自由基结合生成稳定的酚氧自由基, 使氧自由基失活而表现出抗氧化作用, 并能通过清除体内氧自由基, 使脂质过氧化反应减弱, MDA 减少, 细胞膜受损减轻, 组织缺氧改善, 这已得到很多研究的证实。秦晓辉等<sup>[8]</sup>发现普鲁泊福可以通过清除羟

基自由基减轻神经元缺氧损伤。本实验的发现进一步证实了普鲁泊福的抗氧化作用。普鲁泊福组各时间点的 MDA 值均显著低于损伤组, SOD 活力显著高于损伤组, 这说明脊髓损伤 30 min 后给予普鲁泊福 60 mg/(kg·h) 可显著减轻脊髓损伤后的脂质过氧化反应, 从而发挥脊髓保护作用。形态学和行为学评分结果更直观地证实了普鲁泊福的脊髓保护作用。

随着现代交通和工矿事业的发展, 脊髓损伤的发病呈逐年增加趋势, 此类患者通常需要实施外科手术, 手术必然涉及麻醉用药。因此, 研究临床常用麻醉药对脊髓损伤的作用, 对于减轻继发性损伤, 改善预后, 具有重要意义。本研究发现普鲁泊福对大鼠急性脊髓损伤具有保护作用, 其机制与其抗氧化作用有关。

### [参考文献]

- [1] Hall ED, Braughter JM. Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration[J]. *CNS Trauma*, 1999, 3(4): 281-289.
  - [2] Demopoulos HB. The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders[J]. *Acta Physiol Scand*, 2000, 49(3): 91-97.
  - [3] Wrathall JR, Pettegrew RK, Harvey F. Spinal cord contusion in the rat: production of graded, reproducible, injury groups[J]. *Exp Neurol*, 1985, 88(1): 108-122.
  - [4] Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in rat[J]. *J Neurosurg*, 1997, 47(5): 577-582.
  - [5] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection[J]. *Exp Neurol*, 1996, 139(2): 244-256.
  - [6] Erten SF, Kocak A, Ozdemir I, et al. Protective effect of melatonin on experimental spinal cord ischemia[J]. *Spinal Cord*, 2003, 41(10): 533-538.
  - [7] Murphy PG, Myers DS, Davies MJ, et al. The antioxidant potential of propofol[J]. *Br J Anaesth*, 1992, 68(6): 613-617.
  - [8] 秦晓辉, 米卫东, 张宏, 等. 异丙酚对神经元缺氧损伤的保护及其作用机制[J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(9): 1024-1027.
- Qin XH, Mi WD, Zhang H, et al. Protective effects and mechanisms of propofol on anoxia injury in cultured rat hippocampal neurons[J]. *Zhongguo Yaolixue Tongbao (Chin Pharmacol Bull)*, 2003, 19(9): 1024-1027.

[收稿日期] 2004-03-23

[修回日期] 2004-08-05

[本文编辑] 李丹阳