

中药脊髓康治疗大鼠脊髓损伤的实验研究^{*}

★ 周建中¹ 马勇^{2**} 殷韶健¹ 孙士杰¹ (1. 南京中医药大学 2006 级硕士研究生 南京 210029; 2. 南京中医药大学第一临床医学院骨伤科研究所 南京 210029)

摘要:目的:观察脊髓康对脊髓损伤大鼠的治疗作用及其作用是否有剂量依赖性,并与强的松进行对照。方法:SD 大鼠 72 只随机分为 6 组($n=12$)。造模后脊髓康高、中、低剂量组予脊髓康 25、12.5、6.25 g 生药/kg 体重;强的松组予强的松 0.06g/kg 体重。正常组及模型组予等量蒸馏水。测定血液及损伤脊髓中 IL-10、INF- α 、NO、NOS、SOD、MDA 含量;全血粘度;损伤脊髓病理学检查。结果:血液中 TNF- α 含量升高,脊髓康各剂量组相对模型组降低。血液中 IL-10 水平下降,强的松组和脊髓康各剂量组相对模型组有显著差异。强的松组相对模型组全血粘度无差异。脊髓康高、中剂量组低于模型组。血液 SOD 活力下降,MDA、NO 和 NOS 含量升高。脊髓康高、中剂量组 SOD 活力高于模型组,MDA 及 NO 含量低于模型组。脊髓康各剂量组 NOS 含量低于模型组。强的松组相对模型组 MDA 含量下降,SOD 活性无明显变化。脊髓损伤部位 SOD 活力下降,MDA、NO 和 NOS 含量升高。脊髓康高剂量组 SOD 活力高于模型组。脊髓康高、中剂量组 MDA、NOS 含量低于模型组。脊髓康各剂量组 NO 含量低于模型组。强的松组相对模型组 MDA 含量下降,SOD 活性无明显变化。病理结果:脊髓康高剂量组脊髓病变程度较轻。中剂量组较高剂量组稍差。低剂量组白质区水肿。强的松组与高、中剂量组相似。结论:脊髓康能抑制 NOS 表达、降低 NO 含量;能降低 MDA 含量、提高 SOD 活性;能改善血液流变学指标;能降低 TNF- α 水平;能提高 IL-10 水平;能防止脊髓损伤的继发性改变,促进脊髓组织恢复,促进神经组织再生,高剂量较中剂量疗效更显著。

关键词:脊髓损伤;脊髓康;中药;实验研究

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

Experiment study of Jisuikang on treatment of rat after spinal cord injury

ZHOU Jian-zhong¹, MA Yong², YIN Shao-jian¹, SUN Shi-jie¹

1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029

2. Research Institute of Orthopedics, First Clinical Medical College, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029

Abstract: Objective: To observe the effect of Jisuikang on treatment of rats after empirical spinal cord injury, and understand whether has dose-dependent effect or not, and perform positive control with prednisone. Methods: Seventy-two SD rats were separated randomly into six groups ($n=12$). The rats in the Jisuikang high-dose group, middle-dose group and low-dose group were given Jisuikang 25, 12.5, 6.25 g/kg for 14 days. The rats in the prednisone group were given 0.06 g/kg prednisone for 7 days. The rats in normal and model group were given distilled water of the same volume. After one hour of last administration, collecting the blood in rats' fossa orbitalis of every group, testing the content of IL-10, TNF- α and NO, SOD, NOS, MDA in the blood; testing whole blood viscosity; testing the content of NO, SOD, NOS, MDA in the injured spinal cord tissue. Spinal cord histopathologic examination was done after determination. Results: After modeled, the content of TNF- α in the blood of rats was raised compared with normal group, and this in Jisuikang high-dose group ($P<0.01$), middle-dose group ($P<0.05$) and low-dose group ($P<0.01$) was decreased compared with model group. After modeled the content of IL-10 in the blood of rats was obviously decreased compared with normal group, and this in Jisuikang high-dose group, middle-dose group, low-dose group and prednisone group was significant difference as compared with model group ($P<0.01$). After modeled, the rats' whole blood viscosity was significant difference as compared with normal group. And this in prednisone group

* 基金项目:江苏省中医药局资助项目(HD5072)

** 通讯作者:马勇(1963-),男,江苏省扬中市人,博士,副教授,副主任医师,硕士生导师。E-mail:zhongyi-my@263.net

had no difference as compared with model group. But this in Jisuikang high-dose group and middle-dose group was lower than this in model group. After modeled, the content of SOD in the blood was obviously decreased but MDA, NO and NOS raised. The content of SOD in Jisuikang high-dose group and middle-dose group was higher than this in model group, but the MDA content in the two groups was lower than this in model group. The content of NOS in Jisuikang high-dose group, middle-dose group and low-dose group was lower than this in model group. The content of NO in Jisuikang high-dose group and middle-dose group was lower than this in model group. Compared with model group, the MDA content in prednisone group was lower, but the SOD content had no change. After modeled, the content of SOD in the injured spinal cord tissue was obviously decreased but MDA, NO and NOS raised. The content of SOD in Jisuikang high-dose group was higher than model group. The content of MDA and NOS in Jisuikang high-dose group and middle-dose group were both lower than these in model group. The content of NO in Jisuikang high-dose group, middle-dose group and low-dose group was lower than this in model group. Compared with model group, the MDA content in the injured spinal cord tissue in prednisone group was lower, but the SOD content had no change. Results of pathological examination: The pathological change of spinal cord tissue in Jisuikang every group was lighter, especially in Jisuikang high-dose group. The pathological change in prednisone group was similar as this in Jisuikang high-dose group and middle-dose group. Conclusion: Jisuikang can inhibit NOS expressing and degrade the content of NO. Jisuikang can degrade the content of MDA and raise the content of SOD. Jisuikang can improve the index of hemorheology. Jisuikang can degrade the content of $\text{TNF-}\alpha$. Jisuikang can raise the content of IL-10. Jisuikang can prevent secundum change of spinal cord injury, promote recovery of spinal cord tissue and regeneration of nerve tissue. The therapeutic effect of Jisuikang high-dose group was more significant than Jisuikang middle-dose group.

Key words: spinal cord injury; Jisuikang; traditional Chinese medicine; treatment

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是临床常见的严重创伤, 多是外伤致脊髓或马尾神经发生不同程度的损伤, 造成其受损平面以下的运动、感觉、反射及括约肌功能的障碍。临床上脊髓损伤很少为横断, 而是在对原发损伤的反应中发展起来的一系列进行性病理改变导致的不可逆的继发性结构改变。中医药对脊髓损伤的治疗及术后恢复有一定的效果, 本实验采用一系列较为客观的监测指标来评价中药脊髓康对实验性脊髓损伤的疗效, 为临床用药奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 选用清洁级成年 SD 大鼠 72 只, 体重 200 ~ 250g, 雌雄不限, 由上海斯莱克实验动物责任有限公司提供, 生产许可证: SCXK (沪) 2003-0003; 南京中医药大学实验动物中心, 实验动物使用许可证: SCXK (苏) 2002-0123。分笼饲养, 喂饲全价饲料 (江苏协同医药生物工程公司, 南京市畜牧家禽科学研究所特种动物饲料厂提供), 自由饮水, 室温 $(24 \pm 5)^\circ\text{C}$ 。72 只大鼠随机分为 6 组 ($n = 12$): 正常组、模型组、脊髓康高剂量组、脊髓康中剂量组、脊髓康低剂量组、强的松片组。

1.2 药品与试剂 脊髓康颗粒浸膏粉: 由黄芪、当归尾、赤芍、地龙、川芎、桃仁、红花等组成, 每克浸膏粉相当于 6.47g 生药, 人日用量为 130 g (生药)/60 kg 体重, 由南京中医药大学第一临床医学院实验中心制备提供, 批号: 20070301。强的松片 (批号: 20060512): 三九黄石制药厂。白细胞介素-10 (IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 放免试剂盒 (批号:

20070512): 北京原子能研究所。丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (批号: 20060101): 南京建成生物工程研究所。一氧化氮合酶 (NOS)、一氧化氮 (NO) 试剂盒 (批号: 20070301): 南京建成生物工程研究所。

1.3 方法 造模: 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 然后将大鼠俯卧固定于手术台上。除正常组外所有动物均在无菌条件下进行背中段正中切口暴露 T10 脊椎部位, 仔细分离筋膜肌肉, 打开下椎板, 显露白色脊髓, 以眼科镊轻夹脊髓, 大鼠双后肢张力立即消失, 表明已造成脊髓损伤模型。给药: 正常组及模型组, 均给予等容量蒸馏水; 脊髓康高剂量组、脊髓康中剂量组、脊髓康低剂量组, 分别给予脊髓康颗粒 25、12.5、6.25 g/kg 体重; 强的松片组, 给予强的松片 0.06 g/kg 体重。脊髓康各组大鼠均灌胃给药, 于造模当天大鼠清醒并确认瘫痪后开始给药, 连续给药 14 d。强的松组灌胃给药, 于造模当天大鼠清醒并确认瘫痪后开始给药, 连续给药 7 d。给药体积均为 15 ml/kg 体重。

对损伤大鼠血液 IL-10、TNF- α 含量的影响: 大鼠最后一次给药后 1 h, 眼眶取血, 分离血清, 以放免法测定 IL-10、TNF- α 含量, 具体方法按试剂盒进行。

对损伤大鼠血液 NO、NOS、SOD、MDA 含量的影响: 大鼠最后一次给药后 1h, 眼眶取血, 分离血清, 以比色法测定 NO、SOD、NOS、MDA 含量, 具体方法按试剂盒进行。

对损伤大鼠血液流变学的影响: 大鼠最后次给药后 1h, 眼眶取血, 全自动血液粘度计测定全血粘

度和血浆粘度。

对脊髓受损部位 NO、NOS、SOD、MDA 含量的影响: 最后一次给药后, 大鼠处死, 分离造模部位脊髓, 以造模点为中心, 剪取 0.5cm 脊髓。把所取脊髓从正中一分为二, 一部分以 10% 甲醛溶液固定, 备用病理组学检查。另一部分称重, 加 10 倍量生理盐水, 高速分散器打成组织交浆, 2 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 以比色法检测 NO、NOS、SOD、MDA 含量。

病理组织学检查: 光镜观察, 用 10% 甲醛固定, 系列乙醇脱水, 石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜下观察。

1.4 主要观察指标 大鼠血液 IL-10、TNF- α 含量。大鼠血液 NO、NOS、SOD、MDA 含量。大鼠血液流变学。脊髓受损部位 NO、NOS、SOD、MDA 含量。大鼠脊髓病理检查结果。

1.5 统计学分析 检测结果均采用统计软件 SPSS 12.0 进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述。所有的统计检验均采用双侧检验, 值小于或等于将被认为所检验的差别有统计意义。计量资料采用 t 检验, 计数资料采用秩和检验。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 正常组有 12 只, 模型组有 7 只, 强的松片和脊髓康高剂量组均有 10 只, 脊髓康中剂量组有 9 只、脊髓康低剂量组有 8 只大鼠进入结果分析。

2.2 各组大鼠病理检查结果 模型组大鼠脊髓均出现组织破碎, 组织有较多片状出血及出血坏死后形成的囊腔。神经细胞肿胀较明显, 有的神经细胞无法辨认, 灰白质界限不清, 中央管部分消失或偏位, 脊髓边缘粘连。脊髓康高剂量组大鼠脊髓组织出血、坏死程度较轻, 形成囊腔少, 神经细胞肿胀不明显, 神经细胞丰富, 白质区水肿, 脊髓皮质区边缘不清。中剂量组情况较高剂量组稍差。低剂量组白质区水肿。强的松片组与高剂量组以及中剂量组相似, 边缘粘连不明显。

2.3 脊髓康对大鼠血液流变学的影响 见表 1。

表 1 脊髓康对大鼠血液流变学的影响

分组	动物数 (只)	剂量 /g·kg ⁻¹	全血粘度 (低切)	全血粘度 (中切)	全血粘度 (高切)
正常组	12		13.23 ± 2.83	5.83 ± 1.41	4.24 ± 1.06
模型组	7		20.16 ± 3.04▲	10.26 ± 0.40▲	6.53 ± 0.09▲
强的松	10	0.06	19.59 ± 3.72	9.53 ± 0.96	6.47 ± 0.78
脊髓康高剂量组	10	25	14.27 ± 2.47**	5.88 ± 0.93**	4.76 ± 0.83**
脊髓康中剂量组	9	12.5	16.61 ± 2.31**	6.67 ± 0.81**	5.67 ± 1.01*
脊髓康低剂量组	8	6.25	18.42 ± 2.82	9.31 ± 1.04	6.35 ± 1.17

注: 与正常对照组比较, ▲▲ $P < 0.01$; 与模型组比较, ** $P < 0.01$ 。

2.4 脊髓康对大鼠血液 NO、NOS、MDA 和 SOD 的

影响 见表 2。

表 2 脊髓康对大鼠血液 NO、NOS、MDA 和 SOD 含量的影响

分组	动物数 (只)	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD /U·mL ⁻¹	MDA /mmol·L ⁻¹	NO /U·mL ⁻¹	NOS /U·mL ⁻¹
正常组	12		125.52 ± 16.96	5.04 ± 1.20	112.11 ± 12.12	56.33 ± 9.25
模型组	7		87.61 ± 14.75▲	7.26 ± 2.01▲	195.36 ± 11.08▲	89.07 ± 11.25▲
强的松	10	0.06	93.24 ± 11.15	5.04 ± 0.93*	188.65 ± 18.25	85.65 ± 9.66
高剂量	10	25	150.33 ± 23.19**	4.95 ± 0.57*	133.69 ± 9.58**	60.38 ± 8.23**
中剂量	9	12.5	127.48 ± 9.10**	4.82 ± 0.89*	162.36 ± 14.04*	66.36 ± 9.00**
低剂量	8	6.25	107.48 ± 10.21	7.26 ± 2.01	179.36 ± 32.22	79.58 ± 7.25*

注: 与正常对照组比较, ▲▲ $P < 0.01$; 与模型组比较, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

2.5 脊髓康对大鼠脊髓损伤部位 NO、NOS、MDA 和 SOD 的影响 见表 3。

表 3 脊髓康对大鼠

脊髓损伤部位 NO、NOS、MDA 和 SOD 影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	动物数 (只)	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD /U·mL ⁻¹	MDA /mmol·L ⁻¹	NO /U·mL ⁻¹	NOS /U·mL ⁻¹
正常组	12		155.52 ± 11.23	4.04 ± 1.21	52.12 ± 14.25	36.15 ± 7.51
模型组	7		98.61 ± 13.24▲	9.26 ± 2.04▲	89.25 ± 11.07▲	54.25 ± 6.55▲
强的松	10	0.06	100.21 ± 12.38	5.01 ± 0.87*	85.65 ± 9.36	56.35 ± 7.41
高剂量	10	25	149.3 ± 20.25**	5.92 ± 0.77*	68.51 ± 10.87*	41.25 ± 8.52*
中剂量	9	12.5	127.48 ± 10.14	6.82 ± 0.67*	66.58 ± 8.56**	44.02 ± 6.54*
低剂量	8	6.25	127.48 ± 10.01	7.26 ± 2.04	70.25 ± 15.36*	52.25 ± 6.27

注: 与正常组相比, ▲▲ $P < 0.01$; 与模型组相比, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

2.6 脊髓康对大鼠血液 IL-10、TNF- α 含量的影响 见表 4。

表 4 脊髓康对大鼠血液

IL-10、TNF- α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	动物数 (只)	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-10 /μg·L ⁻¹	TNF- α /pmol·L ⁻¹
正常组	12		0.527 ± 0.051	1.02 ± 0.18
模型组	7		0.182 ± 0.029▲	2.96 ± 0.71▲
强的松	10	0.06	0.355 ± 0.021**	1.44 ± 0.54**
脊髓康高剂量组	10	25	0.325 ± 0.047**	1.36 ± 0.38**
脊髓康中剂量组	9	12.5	0.314 ± 0.055**	2.05 ± 0.42*
脊髓康低剂量组	8	6.25	0.304 ± 0.034**	1.38 ± 0.22**

注: 与正常组相比 ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与模型组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

中医认为脊髓损伤的病机为督脉受损, 从而导致了督脉和其它经络、脏腑、气血之间的功能紊乱, 出现了一系列症状。督脉为阳脉之海, 诸阳之会, 有统摄元阳、振奋督率全身阳经之功能, 而且督脉与任冲阳维脉皆有联系, 可调节全身之气血, 在全身经络系统中处于中心地位, 与现代医学所描述的脊髓作为中枢神经的功能相似^[1]。

脊髓康由补阳还五汤、小承气汤等经典方剂化裁而来, 由黄芪、当归尾、赤芍、地龙、川芎、桃仁、红花等组成, 功能补气、活血、通络。现代药理已证实补阳还五汤能改善脊髓微循环和缺血缺氧状态, 阻止脊髓继发性损伤, 且能支持、保护和营养神经元细胞, 激动神经纤维的修复、再生过程^[2]。脊髓康方中当归养血和营, 如此则阳生阴长, 气旺血生; 川芎行气活血止痛; 丹参、赤芍均能活血化瘀通络, 赤芍

尚能清热凉血,防治脊髓损伤后体温升高;水蛭、蜈蚣、地鳖虫均能破瘀散结,其中蜈蚣尚有通络止痛、地鳖虫尚有续筋接骨之功效;黄芪补脾胃之气,以资气血生化之源,增强机体免疫力;仙灵脾、肉苁蓉补益肾阳,培本固元;大黄、厚朴、枳实乃小承气汤,能泻热通便,行气散瘀;泽兰、泽泻、车前子合用利尿通淋,有效解决脊髓损伤后便秘结、尿潴留、尿路感染等并发症。诸药合用共奏活血化瘀,理气止痛,通络复髓,利尿通便之效^[3]。

本实验结果表明:脊髓康能抑制 NOS 的表达、降低 NO 的含量,从实验中也发现损伤后脊髓和血液的样本均见 NO/NOS 升高,说明 NO/NOS 的升高与脊髓继发损伤有关,参与了脊髓损伤的过程。脊髓康高、中剂量组血清中和脊髓损伤部位 NO 含量比模型组明显降低,说明脊髓康对脊髓损伤所致 NO 升高有降低作用。脊髓康中含有丹参,研究表明丹参对其他疾病所引起的 NO 异常升高有明显的减低作用,能减轻 NO 的毒理作用^[4]。脊髓康高、中剂量组血液和脊髓损伤部位的 NOS 的含量较模型组下降明显,说明脊髓康能抑制 NOS 的表达,对脊髓损伤有保护作用。脊髓康能降低 MDA 含量、提高 SOD 活性,提示脊髓康一方面可直接抑制 SCI 后脂质过氧化进程,减弱自由基对脊髓组织造成的继发性变性坏死。另一方面,脊髓康可逐渐增强内源性抗氧化剂的活力,加强对自由基的清除作用。所以脊髓康具有抗脂质过氧化及提高 SOD 活性作用,能够保护线粒体膜,改善腺苷酸代谢,使组织的能量代谢维持正常,从而达到减弱自由基对脊髓组织的继发性损伤程度。同时,又是自由基清除剂,主要通过清除超氧阴离子的清除作用来阻止生物膜的脂质过氧化,从而起到保护生物膜的作用。脊髓康能改善血液流变学指标,脊髓康由补阳还五汤、血府逐瘀汤、小承气汤等加减化裁而来,现代药理研究证实补

阳还五汤能改善脊髓微循环和缺血缺氧状态,阻止脊髓继发性损伤,且能支持、保护和营养神经元细胞,激动神经纤维的修复、再生过程^[5]。实验发现脊髓康高、中剂量组全血比粘度均低于模型组,表明脊髓康对 SCI 起保护作用,能够改善脊髓损伤局部的微循环障碍。强的松是 SCI 后临床上常规用药,在理论上其主要作用是稳定细胞膜,减轻水肿,抑制炎症反应,但疗效并不肯定。本实验显示强的松治疗后血液流变学指标无明显改善。脊髓康能降低 TNF- α 水平,减少继发性损伤,对脊髓损伤起保护作用。脊髓康能提高 IL-10 水平,对 SCI 起保护作用,有助于脊髓损伤后的功能恢复,对神经元起到保护作用。本实验病理检查结果表明:脊髓康高剂量组大鼠脊髓组织出血、坏死程度较轻,形成囊腔少,神经细胞肿胀不明显,神经细胞丰富,白质区水肿,脊髓皮质区边缘不清。中剂量组情况较高剂量组稍差。低剂量组白质区水肿。强的松片组与高剂量组以及中剂量组相似,边缘粘连不明显。提示高剂量以及中剂量的脊髓康颗粒能防止脊髓损伤的继发性改变,促进脊髓组织的恢复,促进神经组织的再生。其中高剂量较之中剂量疗效更显著。

参考文献

- [1] 马勇,吴健,袁冬平,等. 中药脊髓康抗脊髓损伤作用实验[J]. 中国临床康复,2005,9(45):62-63.
- [2] 刘文革. bFGF 对大鼠脊髓损伤后神经细胞凋亡的影响[J]. 中国矫形外科杂志,2003,11(6):144.
- [3] 马勇,吴毛,王建伟. 脊髓康治疗脊髓损伤后排尿障碍 19 例[J]. 江苏中医药,2004,25(4):32.
- [4] 黄迪南. 复方丹参注射液对巨噬细胞 NO 合成的影响[J]. 中国老年杂志,1999,19(1):41-42.
- [5] 杨运东,冯秋珍,魏玉玲,等. 加味补阳还五汤治疗大鼠脊髓损伤的实验研究[J]. 中医正骨,1998,10(6):4.

(收稿日期:2008-10-16)

新专栏征稿

《江西中医学院学报》(双月刊)已全面改版,以下重点栏目面向全国征稿:

● **理论研究** 对中医重大理论问题进行专题论述。讨论专题有:中医水理论研究、火理论研究、体质学说研究、梦理论研究、病证理论研究。

● **中医文化研究** 主要反映中医与古代哲学、古代社会政治经济、人文地理等文化形态的研究成果以及五运六气研究、生命学说研究的最新动态。

● **道教医学研究** 包括道教医药文献研究、道教医药人物研究、道教医药史研究、道教医学理论研究、道教医学方药研究、道教医学养生研究等,要求观点正确,不违背国家宗教政策。

欢迎广大作者踊跃投稿。