

· 基础研究 ·

维生素 E 联合单唾液酸神经节苷脂对脊髓损伤大鼠运动功能恢复的影响*

杨拯^{1,2} 何秋兰³ 唐伟³ 谢光科³ 李巧惠³ 丁红霞³
李向莲³ 包旭² 陈建敏¹ 田芸^{4,5} 张晓¹

摘要

目的:观察维生素 E(Vit E)联合单唾液酸神经节苷脂(GM1)对脊髓损伤(SCI)大鼠运动功能恢复的影响。

方法:健康成年 SD 大鼠 48 只,采用 Allen 法(10g×12.5mm)在 T9 造成急性脊髓损伤动物模型。动物随机分为 4 组:对照组(A 组)、VitE 治疗组(B 组)、GM1 治疗组(C 组)和 VitE+1/2GM1 治疗组(D 组),每组 12 只。伤后第 1 天、第 7 天和第 14 天分别用 BBB 评分和斜板试验观察大鼠运动功能的恢复情况。

结果:大鼠 SCI 后 B、C、D 组 BBB 评分和斜板试验优于对照组,第 1 天、第 7 天 BBB 评分和斜板试验 D 组明显优于 B、C 组($P<0.05$)。

结论:大鼠脊髓损伤后早期使用 VitE 联合 GM1 对其运动功能的恢复有促进作用,效果优于 VitE 或 GM1 单独用药。

关键词 单唾液酸神经节苷脂;维生素 E;脊髓损伤;运动功能

中图分类号:R493, R651.2 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2010)-06-0536-04

Effects of vitamin E combined with monosialoganglioside on the recovery of motor function after spinal cord injury in rats/YANG Zheng, HE Qiulan, TANG Wei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(6): 536—539

Abstract

Objective: To investigate the effects of vitamin E(VitE) combined with monosialoganglioside(GM1) on the recovery of motor function after spinal cord injury(SCI) in rats.

Method: Forty-eight healthy adult rats were randomly divided into A(control), B(VitE), C(GM1) and D(VitE+1/2GM1) groups. Each group had 12 rats. SCI model was made by Allen's mode(10g×12.5mm) on spinal cord T9 extradurally. At the 1st d, 7th d and 14th d after SCI, the recovery of motor function after SCI in rats were assessed with Basso-Beattie-Bresnahan(BBB) scale and tilt board test.

Result: After SCI, BBB scores and tilt board test in group B, C and D were better than those in group A; and those in group D were better than those in group B and C. There were significant differences at day 1 and 7 after SCI in group D and B, C ($P<0.05$).

Conclusion: Early application of VitE combined with GM1 can promote the recovery of motor function after SCI in rats, and is superior to VitE or GM1 alone.

Author's address Department of Experimental Technology of Chengdu Medical College, Chengdu, 610081

Key words monosialoganglioside; vitamin E; spinal cord injury; motor function

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.06.010

* 基金项目:四川省科技厅课题基金(2008SZ0053);成都医学院实验室开放实验基金(KF200936);成都医学院创新性实验项目基金(CX200907)

1 成都医学院基础医学院实验技术教研室,成都,610081; 2 四川大学华西药学院药理学与生物制药系; 3 成都医学院 2006 级临床医学本科班; 4 成都医学院附属医院; 5 通讯作者

作者简介:杨拯,男,在读硕士,助理实验师; 收稿日期:2009-12-06

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是严重危害人类健康的脊柱脊髓疾患,常导致损伤平面以下感觉、运动功能不可逆丧失,给患者造成极大伤害,给家庭和社会造成极大负担,其治疗至今仍是医学界的难题之一。研究认为^[1],治疗脊髓损伤的关键在于保护受损神经,促进神经再生,恢复运动功能进而从根本上解决脊髓损伤造成的伤残和功能障碍。近年来,有康复医学研究者报道^[2],当患者发生脊髓损伤后,改善和促进SCI患者运动功能的恢复是康复治疗的首要目标。维生素E(vitamin E, Vit E)作为一种脂溶性抗氧化剂,可有效地清除自由基,从而阻滞脂质过氧化物形成。单唾液酸神经节苷脂(Monosialoganglioside, GM1)作为一种安全的神经保护剂,具有阻断神经细胞凋亡、减少自由基产生、拮抗脂质过氧化反应、降低兴奋性氨基酸毒性和调节神经生长因子等作用。这些资料提示 Vit E 与 GM1 可能有联合治疗作用。本实验建立大鼠急性 SCI 模型,通过行为学检查,观察 Vit E 联合 GM1 对大鼠脊髓损伤后运动功能恢复的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及药品

清洁级健康成年 SD 大鼠 60 只,雌雄不拘,体重(180±20)g,由四川大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(川)-10-2006;单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液:齐鲁制药有限公司产品,批号:8070411EN;维生素 E:厦门星鲨制药有限公司(原厦门鱼肝油厂)产品,批号:10883013;注射用青霉素钠:悦康药业集团北京凯悦制药有限公司,批号:0906011;戊巴比妥钠(德国进口分装):北京化学试剂公司,批号:061222;氯化钠注射液:四川科伦药业股份有限公司,批号:C080319C1;自制数字式脊髓损伤动物模型制备仪。

1.2 模型制备

提前购买大鼠,先在动物饲养室中适应 1 周,1 周后观察均无异常表现、精神食欲良好者方可纳入实验。术前 12h 禁食、水^[3]。术前按常规进行行为测试,确认其运动功能无异常后,用 1.5%戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔注射麻醉,然后将大鼠俯卧固定于手术台上,背部去毛,碘伏常规消毒。无菌条件下,沿正

中线切开大鼠背部皮肤,显露椎板及棘突,根据大鼠解剖图谱,明确 T9 后咬除棘突及其椎板,暴露脊髓,用自制数字式脊髓损伤动物模型制备仪打击器制成脊髓损伤模型(Allen 法),打击强度为 10g×12.5mm,打击后以大鼠身体抖动、摆尾,及手术后后肢抽动表明模型制备成功。造模成功后,用医用明胶海绵堵塞椎骨孔,逐层缝合切口。由于过程中有一定出血而使大鼠血容量减少,术后立即腹腔注射氯化钠注射液(0.9%)9ml/kg 补液。腹腔注射注射用青霉素钠,待动物清醒后放回饲养笼中饲养。术后大鼠自由进食、饮水,定时清洁笼具,保持适宜室温,每日挤压膀胱排尿 2 次,直至膀胱功能恢复。术后连续 3d 每日腹腔注射 1ml(8 万 U)注射用青霉素钠。

1.3 动物分组及给药

从造模成功的实验动物中随机挑选 48 只大鼠,按照随机数字表法随机分为 4 组:对照组(A组)、Vit E 治疗组(B组)、GM1 治疗组(C组)、VitE+1/2 GM1 治疗组(D组),每组 12 只。4 组动物均于术后 30min, 24h 和 48h 给药,其中 B 组腹腔注射 Vit E 100mg/kg, C 组腹腔注射 GM1 10mg/kg, D 组腹腔注射 VitE 100mg/kg 和 GM1 5mg/kg, A 组腹腔注射等量的氯化钠注射液(0.9%)。

1.4 观察指标及检测方法

四组动物均于术后第 1 天、第 7 天和第 14 天进行行为学检查。①(Basso-Beattie-Bresnahan, BBB)评分:按照 Basso DM 等^[4]报道的 BBB 评分方法,将动物置于宽大活动场地,采用双人双盲法观察其后肢运动情况,联合考察大鼠后肢的运动,躯干的位置及稳定性、步态、协调性、爪的置放、足趾间隙及尾的位置。左右两侧肢体取平均值,作为每只大鼠每次功能的得分。②斜板试验:采用 Rivlin 法^[5],将大鼠放置于自制斜板上,上面垫一橡胶垫,将大鼠身体纵轴与斜板纵轴平行放置,大鼠头朝斜板抬高侧,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。

1.5 统计学分析

所有实验数据均为计量资料,用均数±标准差表示,采用 SPSS17.0 版软件进行统计学分析,组间两两比较采用 SNK 法(*q* 检验),*P*<0.05 作为差异有显

著性意义的标准。

2 结果

除对照组大鼠死亡 1 只和 GM1 组大鼠死亡 2 只外,其余动物均存活。损伤后第 1 天、第 7 天和第 14 天斜板试验 B、C 和 D 组明显高于 A 组 ($P<0.05$); 损伤后第 1 天和第 7 天的斜板试验,D 组明显高于 B 和 C 组 ($P<0.05$); 损伤后第 14 天斜板试验 B、C 和 D 组差异无显著性意义。各组动物损伤后第 1 天 BBB 评分、斜板试验均明显降低,损伤后第 7 天和第 14 天均有不同程度恢复。损伤后第 1 天和第 7 天,D 组 BBB 评分明显高于其他 3 组 ($P<0.05$),A、B、C 组间差异无显著性意义。4 组大鼠的运动功能均得到了不同程度的恢复,且 D 组大鼠的运动功能恢复明显好于其他 3 组。见表 1—2。

表 1 脊髓损伤大鼠 BBB 评分结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	第 1 天	第 7 天	第 14 天
对照组	2.95±2.45	8.79±2.48	15.17±3.82
Vit E 治疗组	4.29±1.86	12.13±2.90	17.75±4.57
GM1 治疗组	5.45±1.72	13.67±4.67 ^①	20.00±1.41
VitE+1/2GM1 治疗组	8.29±4.83 ^{①②}	17.25±4.56 ^{①②}	20.00±1.15

与对照组同时点比较^① $P<0.05$;与 Vit E 治疗组、GM1 治疗组同时时间点比较^② $P<0.05$

表 2 脊髓损伤大鼠斜板试验结果 ($\bar{x}\pm s, ^\circ$)

组别	第 1 天	第 7 天	第 14 天
对照组	26.36±3.23	32.86±2.67	38.33±2.89
Vit E 治疗组	29.58±4.50 ^①	34.38±3.20	43.75±2.50 ^①
GM1 治疗组	30.50±2.84 ^①	37.50±4.18 ^①	45.00±0.00 ^①
VitE+1/2GM1 治疗组	35.00±3.69 ^{①②}	42.50±3.78 ^{①②}	45.00±0.00 ^①

与对照组同时点比较^① $P<0.05$;与 VitE 治疗组、GM1 治疗组同时时间点比较^② $P<0.05$

3 讨论

Vit E 作为一种脂溶性抗氧化剂,几乎全部存在于生物膜上,是体内的天然抗氧化剂。研究证实,Vit E 可作为自由基吸收剂来保护膜免受自由基的伤害,它不但能清除羟基自由基和超氧负离子自由基等自由基,也能阻断脂质过氧化作用。关浩等^⑩实验发现,Vit E 可以减轻脊髓水肿,改善局部组织破坏,外源性 Vit E 作为药物应用具有同样抗氧化作用,能清除氧自由基、阻滞不饱和脂肪酸的过氧化反应、减少过氧化脂质的生成,为临床治疗 SCI 提供了一条新途径。

GM1 又称单唾液酸四己糖神经节苷脂,是正常细胞膜的组成成分,在哺乳类动物中枢神经系统中含量较为丰富,尤其是在突触^⑦。动物实验研究^⑧证实 SCI 后外源性 GM1 可减少自由基的生成,拮抗脂质过氧化反应,降低兴奋性氨基酸毒性,对于 SCI 后的功能恢复以及防止神经元坏死起到保护作用。另外 GM1 发挥神经保护作用的可能机制还有:防止 Ca^{2+} 失衡,减轻组织水肿、阻断神经细胞凋亡、调节神经生长因子和防止乳酸性酸中毒等^{⑨—⑪}。

本实验结果显示,伤后第 1 天、第 7 天 BBB 评分及斜板试验 D 组明显高于 B 和 C 组 ($P<0.05$),而伤后第 14 天 BBB 评分及斜板试验 B、C、D 组差异无显著性意义,表明早期使用 Vit E 联合 GM1 对 SCI 有治疗作用。其可能原因有:①本次实验给药时间为伤后连续 3d,早期血药浓度较高,而后期血药浓度逐渐下降,以致后期药物作用较小甚至没有作用,可能造成伤后第 14 天 BBB 评分及斜板试验 B、C、D 组差异无显著性意义。②SCI 后破裂、出血,数分钟后发生水肿,此过程 1—6h 最明显^⑫,并且 SCI 后 5—30min 自由基即有明显升高。Vit E 的主要作用为减轻脊髓水肿、清除氧自由基等。由此推测 Vit E 联合 GM1 在 SCI 早期主要通过减轻组织水肿、清除氧自由基等发挥治疗作用。但其具体机制仍需更深入的研究。

国内外临床研究提示,大剂量、长疗程的治疗方案是应用 GM1 治疗 SCI 的正确方案。但由于 SCI 具有高发生率、高致残率、高耗费和低病死率等特点^⑬,而 GM1 的价格又较为昂贵,由此无疑给 SCI 患者乃至社会带来了沉重的经济负担,因而在一定程度上限制了 GM1 的临床应用。本实验结果表明,大鼠 SCI 后早期单独使用 Vit E 对其运动功能恢复有一定促进作用,联合使用 Vit E 和 GM1 具有更好的促进作用,效果优于 Vit E 及 GM1 单用。另外,本实验中联合组的 GM1 用量为 GM1 组剂量的一半,其实际应用价值在于 Vit E 价格便宜,不良反应少,其与 GM1 联合在一定程度上减少了 GM1 用量,降低了治疗费用,从而促使 GM1 在临床上得到广泛应用。至于 Vit E 与 GM1 以何种剂量搭配效果最佳尚不清楚,有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 黄洁萍,翁金森,王锋,等.骨髓间充质干细胞移植对急性脊髓损伤大鼠神经功能恢复及 Nogo-A 表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志,2009,24(7):582—586.
- [2] 王瑾,王红星,王彤.运动对脊髓损伤功能改善作用机制的研究进展[J].中国康复医学杂志,2008,23(8):753—755.
- [3] 赵晔,丁文元,张为,等.促红细胞生成素对大鼠急性脊髓损伤后后肢功能及 NF-KB 表达的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(10):904—907.
- [4] Basso DM,Beattie MS,Bresnahan JC,et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability.Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study [J]. J Neurotrauma,1996,13(7):343—359.
- [5] 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.
- [6] 关浩.维生素 E 对继发性脊髓损伤保护作用的实验研究[J].中国实用医药,2007,2(31):54—56.
- [7] Zitman FM, Todorov B, Verschuuren JJ, et al. Neuromuscular synaptic transmission in aged ganglioside-deficient mice[J].Neurobiol Aging,2009,[Epub ahead of print].
- [8] 蒋四清,李光辉,李锋,等.外源性神经节苷脂对大鼠脊髓损伤的保护作用[J].中国矫形外科杂志,2004,12(17):1323—1325.
- [9] Gorria M,Huc L,Sergent O,et al. Protective effect of monosialoganglioside GM1 against chemically induced apoptosis through targeting of mitochondrial function and iron transport[J].Biochem Pharmacol,2006,72(10):1343—1353.
- [10] 王坚,黄象望.脊髓损伤的药物治疗进展 [J]. 医学临床研究,2008,25(11):2087—2090.
- [11] 钱苏林,陈安民.脊髓损伤药物治疗新进展[J].中国骨伤,2008,21(2):164—166.
- [12] Kinoshita H. Pathology of spinal cord injuries due to fracture-dislocations of the thoracic and lumbar spine[J].Paraplegia,1996,34(1):1—7.
- [13] 杨拯,袁章,陈建敏,等.骨髓间充质干细胞联合细胞因子及其他细胞对脊髓损伤康复研究进展[J].中国康复医学杂志,2009,24(7):665—667.

国家康复辅具研究中心附属康复医院诚聘英才

国家康复辅具研究中心附属康复医院为民政部直属事业单位——国家康复辅具研究中心的重要内设机构。我院以中西医结合康复、“大专科、小综合”为特色,设置床位 500 张。下设康复医学、运动医学、矫形、内外妇儿、急诊、麻醉、检验、影像、中医、口腔、药剂等科室。医院的建设目标定位于国内领先、国际知名,向高、精、尖引领方向发展的大型现代化康复医院。我院依托国家康复辅具研究中心的科研优势,广泛开展临床应用,形成了以改良的中医古老导引术为核心的中西医结合康复新方法——神经训导康复治疗体系,开展全方位康复治疗业务(包括偏瘫、脑瘫、截瘫、截肢、面瘫、骨关节肌肉损伤、肩颈腰腿痛、认知、言语、视力和括约肌失禁等),弘扬祖国医学魅力,提高康复治疗效果。

我院现以一流的软硬件条件,以海纳百川的气势,面向全国诚聘英才、医技、财会、管理等各方面专业人才。

招聘条件: 1. 遵纪守法,身体健康,爱岗敬业。2. 学科带头人:有三级甲等医院从事本专业工作 5 年以上科主任任职经历,硕士以上学历,副高以上职称,50 周岁以下,在业内有一定知名度和学术地位及留学经历者优先。3. 护士长要求本科以上学历,有三级甲等医院从事本专业工作 3 年以上护士长任职经历,40 周岁以下,副主任护师以上职称。4. 医生需硕士以上学历,年龄 40 周岁以下,精通专业理论和业务,经验丰富。护士需大专以上学历。5. 在国家核心期刊发表学术论文 3 篇以上,有省部级及以上科研成果者优先。6. 医院管理岗位需本科以上学历,有三甲医院管理岗位工作 3 年以上任职经历,有医药教育背景者优先。

待遇: 工资待遇按国家事业单位标准发放。符合民政部人才引进条件且被录用者,可办理本人及配偶调动手续,酌情给予一次性安置费。不办理调动手续者薪酬从优。

联系方式: 符合条件者,请将本人身份证、毕业证、医师资格证、执业证书、职称证书等相关资料的复印件,以及个人简历和近期免冠照片一张,寄送至:北京经济技术开发区荣华中路 1 号国家康复辅具研究中心附属康复医院;邮编:100176。

联系人: 孟令娆;电话:010-67879529;电子邮箱:guokangzhaopin@163.com。

国家康复辅具研究中心附属康复医院