

· 基础研究 ·

高压氧治疗大鼠脊髓损伤的疗效及其对脂质过氧化反应的影响

孙永明 王庆鹏 林凡国 王海斌

【摘要】 目的 观察高压氧(HBO)治疗大鼠脊髓损伤(SCI)的疗效,探讨其作用机制。**方法** SD大鼠30只,按改良Allen法制备大鼠SCI模型后均分为HBO组和对照组,每组15只。HBO组SCI术后2h开始HBO治疗,每次100min,连续5d,对照组术后不予HBO治疗。术前、术后1h和术后第10天、第20天分别作后肢神经运动功能的BBB分级评分和斜板试验角度的评定;采用黄嘌呤氧化法及硫代巴比妥酸法测定鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA);取鼠损伤脊髓作病理HE染色检查。**结果** HBO组术后第10天和第20天的BBB评分和爬斜板角度明显高于对照组($P < 0.05$);HBO组术后第2天和第5天的血清SOD活性明显高于对照组,MDA含量明显低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);脊髓组织囊性变性明显少于对照组。**结论** HBO治疗SCI具有一定的疗效,氧自由基是影响受损脊髓转归的机制之一。

【关键词】 高压氧; 脊髓损伤; 氧自由基

Hyperbaric oxygen and lipid peroxidation after spinal cord injury SUN Yong-ming, WANG Qing-peng, LIN Fan-guo, WANG Hai-bing. Department of Orthopaedics, The 2nd Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of hyperbaric oxygen (HBO) therapy following spinal cord injury (SCI) and its mechanisms. **Methods** Thirty Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups after inducing SCI models using a modified version of Allen's method. The HBO group received HBO treatment 2 h after the procedure and were then treated 100 min every day for 5 consecutive days. All the rats were evaluated 1 h before the operation, and 1 h, 10 d and 20 d afterward using BBB scores and inclined plane experiments. Superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels were measured. At twenty days, all the rats were sacrificed and their spinal cords were examined pathologically using HE staining. **Results** Average BBB scores and climbing ability in the HBO group were better than in the control group at the 10th and 20th day after the operation. Compared to the control group, SOD increased significantly and MDA decreased significantly in the HBO group at the 2nd and 5th day after the operation. There was less cystic degeneration of the spinal cord in the HBO group. **Conclusions** HBO demonstrated a positive effect after SCI. Oxygen free radicals might be one of the mechanisms for the better recovery.

【Key words】 Hyperbaric oxygen; Spinal cord injury; Oxygen free radicals

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)常导致截瘫,致残率高,是人们研究的热点难题之一。神经细胞膜含有丰富的脂质,自由基及其引起的脂质氧化过程对SCI的转归有重要的影响。有研究发现,高压氧(hyperbaric oxygenation, HBO)可减少体内氧自由基的生成,减轻氧自由基引起的脂质氧化过程,有利于SCI的修复^[1];但有研究的结果却相反^[2]。因此,HBO对损伤神经的作用有待阐明。本研究观察HBO治疗大鼠SCI的效果,并探讨其作用机制,为临床应用提供实验依据。

材料与方法

一、SCI模型的建立、实验分组及饲养

健康Sprague-Dawley大鼠30只,雌雄不拘,体重215~300g,鼠龄3~4个月。采用改良Allen法撞击建立SCI模型^[3],大鼠在腹腔注射3.6%水合氯醛(1ml/100g体重)全身麻醉下,由后正中暴露、固定T_{11~12}平面的脊髓(约4mm×8mm)撞击区,用自制的改良Allen装置(重10g、直径2.5mm的金属圆柱棒,从6.5cm高处,沿塑料管内腔自由垂直落下)撞击暴露的脊髓,造成急性中度损伤(致伤力为6.5g·cm)。

SCI大鼠术后BBB评分^[4]在4~6分者入选实验研究。将30只大鼠分为HBO组和对照组,每组15只。

大鼠 SCI 术后分笼饲养,每笼 5 只,给标准鼠饲料和清洁水喂养,室温保持在 25~30℃,排气扇通风,相对湿度保持在 40%~70%,术后肌注青霉素 3 d(4 万 U/次,2 次/d),尿潴留的大鼠助以人工排尿,每天 2 次。

二、HBO 治疗

采用单人医用高压氧舱(宁波产)。HBO 组大鼠在 SCI 模型建立后 2 h 开始 HBO 治疗,将大鼠先放入敞开的纸匣内,然后移入氧舱。氧舱先以纯氧洗舱 10 min,然后舱内加压至 0.3 MPa(3 ATA)。在此压力下,给大鼠吸入浓度为 80% 的氧气 60 min,最后舱内减压 30 min,将大鼠移回饲养笼。HBO 治疗每天 1 次,连续 5 d。对照组大鼠不予以 HBO 治疗。

三、肢体神经运动功能评定

采用改良斜板试验^[5]和 BBB 分级评分法,由 2 名熟悉掌握 BBB 评分和斜板试验评分标准的非本研究人员分别评定,取其平均值作为评定结果。评定在 SCI 术前、术后第 1 天、第 10 天和第 20 天进行。

1. 改良斜板试验:斜板的倾斜角度可随意调控,观察和记录大鼠在斜板上保持平衡 5 s 的斜板最大角度。

2. BBB 分级评分:根据大鼠后肢关节的运动能力分为 21 个等级,即 21 分。在负重下后肢无可见的运动评为 0 分。步行中持续脚掌站立,前后肢运动协调,向前运动时,脚趾持续抓地;爪在最初接触地面及抬脚时能与身体方向保持一致,尾巴翘起,躯干稳定评为 21 分^[4]。

四、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定和脊髓病理检查

在 SCI 术后第 2 天和第 5 天分别取实验鼠尾血 1.5 ml,置 4℃ 恒温离心 15 min,转速为 3000 转/min,采用黄嘌呤氧化法和硫代巴比妥酸法,严格按照药盒(南京建成生物工程研究所提供)说明书操作步骤测定 SOD 活性和 MDA 含量。

大鼠在 SCI 术后第 20 天处死,取损伤的脊髓作病理切片 HE 染色检查。

五、统计学分析

采用 SPSS 11.5 版统计软件,进行独立样本 *t* 检验,数据以($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、实验大鼠后肢神经运动功能

HBO 组和对照组大鼠的 BBB 分级评分由 SCI 术前的 21 分别降至术后 1 h 的(5.10 ± 0.88)分和(4.90

± 0.74)分,表示 2 组 SCI 均成功建立。术后第 10 天和第 20 天,HBO 组的 BBB 评分及爬斜板角度均明显高于对照组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 2 组大鼠后肢 BBB 评分和爬斜板角度比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	BBB 评分 (分)	斜板角度 (°)
对照组	15		
术前		21	—
术后 1 h		4.90 ± 0.74	—
术后第 10 天		7.30 ± 0.95^b	28.00 ± 1.33
术后第 20 天		7.80 ± 0.92^b	31.50 ± 0.83
HBO 组	15		
术前		21	—
术后 1 h		5.10 ± 0.88	—
术后第 10 天		8.40 ± 0.97^{ab}	38.90 ± 1.99^a
术后第 20 天		9.10 ± 0.99^{ab}	40.20 ± 0.97^a

注:与对照组同期相比,^a $P < 0.05$;与组内术后 1 h 相比,^b $P < 0.05$

二、实验大鼠血清 SOD 活性和 MDA 含量

HBO 组大鼠在术后第 2 天和第 5 天测定的血清 SOD 活性,明显高于对照组($P < 0.05$);MDA 含量 HBO 组明显低于对照组($P < 0.05$),见表 2。

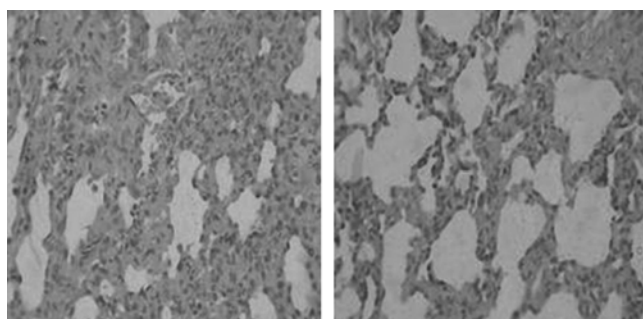
表 2 2 组大鼠术后第 2 天和第 5 天血清 SOD 活性和 MDA 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	SOD(U/ml)	MDA(nmol/ml)
对照组	15		
术后第 2 天		49.20 ± 1.69	4.64 ± 0.12
术后第 5 天		56.70 ± 2.00	4.55 ± 0.14
HBO 组	15		
术后第 2 天		66.50 ± 1.72^a	3.46 ± 0.37^a
术后第 5 天		70.90 ± 1.91^a	3.58 ± 0.14^a

注:与对照组同期比较,^a $P < 0.05$

三、脊髓组织病理改变

损伤脊髓组织的病理切片在光镜下可见囊性变性,HBO 组明显少于对照组,见图 1。



HBO 组

对照组

图 1 光镜下脊髓组织图片(HE 染色, $\times 100$)

讨 论

本研究对实验大鼠后肢神经运动功能的评定显

示,术后第 10 天和第 20 天的 BBB 评分均明显升高,显著高于术后 1 h,更为重要的是 HBO 组亦显著高于对照组。与此同时,爬斜板角度,HBO 组亦显著高于对照组,表明 HBO 组的神经运动功能恢复优于对照组。本研究对大鼠后肢神经运动功能的评定是采用定量法斜板角度和 BBB 评分双重评定,而且 2 名评定者双盲进行,方法严谨,结果明确。

MDA 是脂质过氧化反应生成的脂质氧化产物。在脊髓神经元细胞膜结构中含有丰富的脂质,脂质经过氧化反应生成醛基、酮基、羧基、羰基、氢过氧基以及新的氧自由基等会进一步加剧细胞损伤。SOD 是催化氧歧化反应的酶,能清除超氧自由基,平衡体内氧化和抗氧化过程,维持体内自由基生理平衡,从而消除自由基对组织的损害,保护细胞正常生存。因此,联合测定 SOD 活性和 MDA 含量可间接反映体内脂质过氧化反应的强弱和细胞受损伤的程度^[6]。SOD 和 MDA 测定显示,HBO 组的 SOD 显著高于对照组,而 MDA 显著低于对照组。表明 SCI 大鼠在 HBO 治疗下,SOD 活性增加,超氧阴离子自由基遭清除,氧自由基引起的脂质过氧化氧化反应降低,对神经组织的损害减轻。

综上所述 SCI 大鼠在 HBO 治疗下,后肢神经运动功能得到提高;血清 SOD 活性增强,MDA 含量降低,大鼠神经组织损害减轻,均说明 HBO 治疗 SCI 具有一定的疗效。

SCI 后引发的一系列病理生理反应而导致脊髓组织发生进行性变性、坏死,其原因可能是多方面的,SCI 后的微循环紊乱和神经生化反应;参与的因素众多,如自由基、兴奋性氨基酸、钙离子超载、单胺类物质、肽类物质、前列腺素等,其中自由基反应被认为是造成脊髓组织损伤、变性、坏死的最重要因素之一^[7]。SCI 后,脊髓组织缺血、缺氧,神经细胞线粒体氧化还原传递链发生脱偶联,产生并释放大量氧自由基^[6]。氧自由基含有不配对电子,性质极不稳定,能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸引发脂质过氧化反应。脊髓神经元细胞结构中含有丰富的脂质,在氧自由基作用下,脂质过氧化而组织遭损害;氧自由基还能通过脂质过氧化的分解产物引起细胞损伤。

SCI 大鼠在 HBO 治疗下,其后肢神经运动功能有所恢复,可能是多种因素的作用所致:①提高氧的供给,纠正了损伤组织的缺氧,组织水肿减轻;②多方面调控凋亡相关基因,抑制神经细胞凋亡,促进可逆性的损伤神经恢复^[8-10];③HBO 可促进低氧诱导因子的表达,增强机体对低氧的耐受性^[11];④HBO 可减轻缺血引起的神经营养因子表达下降,减少瘢痕组织的形成,

软化已形成的瘢痕,从而减轻对周围组织的牵拉,有利于神经轴突的再生和向远端延生,促进神经功能恢复^[12];⑤提高机体抗氧化能力等。本研究显示,HBO 治疗在改善 SCI 大鼠神经运动功能的同时,其血清 SOD 活性增高,MDA 含量降低,说明大鼠神经运动功能的提高与体内氧自由基作用受抑制密切相关,氧自由基是影响受损脊髓转归的机制之一。至于 HBO 治疗能提高大鼠神经运动功能是提高了大鼠体内某些抗氧化酶的活力而削弱自由基引起的脂质过氧化反应,抑或直接降低了自由基含量而减弱对神经组织的损伤,本研究尚难作出断定,有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Mrcic-pelcic J, Pelcic G, Petemel S, et al. Effects of the hyperbaric oxygen treatment on the Na, K-ATP and superoxide dismutase activities in the optic nerves of global cerebral ischemia-exposed rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2004, 28:667-676.
- [2] Benedetti S, Lamorgese A, Piersantelli M, et al. Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. *Clin Biochem*, 2004, 37:312-317.
- [3] 杨迎暴,朴英杰. SCI 模型的建立及其评价标准. *中华创伤杂志*, 2002,18:187-190.
- [4] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol*, 1996, 139:244-256.
- [5] Fehlings MG, Tator CH. The relationship among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts and counts of retrogradely labelled neurons after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol*, 1995, 134:220-228.
- [6] Hall ED. Inhibition of lipid peroxidation in CNS trauma. *J Neurotrauma*, 1991, 8:S31-S40.
- [7] Hall ED. Lipid antioxidants in actual central nervous system injury. *Ann Emerg Med*, 1993, 22:1022-1027.
- [8] New P. Inappropriate suggestion of benefit from hyperbaric oxygen for spinal cord injury. *Spinal Cord*, 2008, 46:824-830.
- [9] Yin D, Zhou C, Kusaka I, et al. Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in rat cerebral ischemic model. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23:855-864.
- [10] 卢培刚,冯华,王宪荣,等. 高压氧预处理对大鼠急性脊髓损伤后神经细胞凋亡的影响. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2008,13:173-175.
- [11] Sun L, Marti HH, Veltkamp R, et al. Hyperbaric oxygen reduces tissue hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 expression in focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2008, 39:1000-1006.
- [12] Yu YM, Malsuyama Y, Yanase M, et al. Effects of hyperbaric oxygen on GDNF expression and apoptosis in spinal cord injury. *Neuroreport*, 2004, 15: 2369-2373.

(修回日期:2010-04-05)

(本文编辑:松 明)