

· 基础研究 ·

鹿茸多肽对脊髓损伤保护作用的实验研究

李振华¹, 冷向阳², 高忠礼¹

(1. 吉林大学中日联谊医院骨科, 吉林 长春 130033; 2. 长春中医药大学第一附属医院)

【摘要】 目的:观察鹿茸多肽应用于脊髓损伤大鼠的治疗效果。**方法:**75 只雄性 Wister 大鼠随机分为正常对照组、空白手术组、15、10、5 mg 治疗组, 每组 15 只。通过脊髓损伤动物模型, 各治疗组分别注射 15、10、5 mg 鹿茸多肽, 正常对照组皮下注射生理盐水, 空白手术组造模后不予处理, 给药 7 d。观察其对脊髓损伤动物的动能测定及脊髓病理变化的影响。**结果:**15、10、5 mg 不同剂量鹿茸多肽给药 7 d 后, 大鼠运动功能有所恢复, 明显高于手术组, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 并且治疗剂量增加, 疗效增强。病理组织切片观察显示不同剂量的鹿茸多肽治疗后, 组织水肿减轻, 炎性细胞浸润减轻; 尤以 15 mg 治疗组恢复最明显。**结论:**鹿茸多肽具有促进脊髓损伤大鼠运动功能恢复的作用, 且呈剂量依赖性。

【关键词】 鹿茸多肽; 脊髓损伤; 细胞保护

Protective effect of velvet antler polypeptide (VAP) on rats with the spinal cord injury LI Zhen-hua*, LENG Xiang-yang, GAO Zhong-li. *Department of Orthopaedics, China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, Jilin, China

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effect of antler polypeptide on the rats with spinal cord injury (SCI). **Methods:** The model rats were treated with different doses of antler polypeptide, and its effect on motor function, ethology and pathological changes of spinal cord of the rats observed. **Results:** Seven days after treatment with different doses of antler polypeptide, rat's motor activity was recovered in some extent. Significant difference ($P < 0.001$) was found between the antler polypeptide treatment group and operation group. The effect could be enhanced by increase of the doses. We observed the effect on the pathological change of spinal cord in rat, and found the tissue edema and inflammatory infiltration were relieved after treatment with different doses of antler polypeptide, especially in the dose of 15 mg antler polypeptide. **Conclusion:** Antler polypeptide can promote the motor function recovery in SCI rats, and its action is dose-dependent.

Key words Antler polypeptide; Spinal cord injuries; Cytoprotection

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(4): 285-286 www.zggszz.com

神经损伤的修复是骨科研究的热点问题。鹿茸多肽是鹿茸的粗提取物, 相关文献报道鹿茸多肽能促进神经再生及功能的恢复^[1-3], 提示鹿茸多肽具有研发成为治疗脊髓损伤新药的前景。本文通过脊髓损伤动物模型, 给不同剂量的鹿茸多肽, 观察其对脊髓损伤动物的行为学、动能测定及脊髓病理变化的影响, 为进一步鹿茸多肽药用研究提供科学的实验依据。

1 材料与方

1.1 药物 鹿茸多肽, 由长春中医药大学新药研究中心从梅花鹿茸 (*Cervus nippon temminck*) 中提取的多肽类生物活性物质, 为白色冻干粉, 易溶于水, 用时以生理盐水配置成所需浓度。

1.2 实验动物与分组 选用 75 只雄性 Wistar 大鼠, 体质量 (250±20) g, 由吉林大学基础医学院动物实验中心提供, 合格证号: 吉 11098。应用随机数字表随机分为正常对照组、空白手术组、15、10、5 mg 治疗组, 每组 15 只。给药方法: 各治疗

组动物造模损伤处皮下分别注射 15、10、5 mg 鹿茸多肽, 每日 1 次, 连续用药 7 d。正常对照组皮下注射生理盐水, 空白手术组造模后不予处理。

1.3 造模方法

1.3.1 脊髓损伤模型打击装置——打击架的制作 用 4 块木板做一个“井”字架, 在两平行的木板中央各钻 1 孔, 孔内放 1 透明硬塑料管, 管的内径以 10 g 砝码自由通过为宜, 固定此管使其与水平垂直。做长 4 cm 方体木制打击垫, 一端为脊髓接触面, 大小 3 mm×4 mm, 并使成弧形凹面, 与脊髓暴露面相吻合。另一端为砝码接触面, 面积稍大, 以便和砝码接触。用细线系住砝码柄部, 用手持线以调整砝码在塑料管内的高度。

1.3.2 动物模型的制作 大鼠用 10% 水合氯醛腹腔麻醉, 俯卧固定, 行 T₁₂ 椎板切除术。切口以 T₁₂ 为中心, 长约 3 cm, 切开皮肤和肌肉, 显露 T₁₁-T₁₃ 棘突和椎板, 咬除 T₁₂ 棘突和椎板, 以脊髓为中心显露大小为 3 mm×4 mm 的打击区。一手持打击垫, 使脊髓接触面垂直紧贴脊髓硬脊膜, 另一手把打击架置于其上方, 然后手持砝码线调整砝码与砝码接触面的高度为 5 cm, 松开砝码线进行打击, 每只鼠连续打击 6 次。打击后

可见大鼠双后肢抽动、甩尾,随后完全松弛。术毕不缝合竖脊肌及其筋膜,以便术后给药时保证药物与脊髓损伤处充分接触。术后肌注青霉素 20 万 U/kg 体重,每日 1 次,连续 4 d。分别在损伤前和损伤后 1、7、15 d 观察大鼠双后肢的运动功能。通过打击架打击试验,大鼠损伤后表现为双后肢软瘫,肌张力降低,按改良 Tarlov 评分标准^[4],评分在 0~1 分,判定成功建立大鼠脊髓损伤模型。

1.4 观察指标

1.4.1 运动功能的测定 分别在损伤前和损伤后 1、7、15 d 观察大鼠双后肢的运动功能。按改良 Tarlov 评分标准^[4]:0 分,完全瘫痪,针刺时下肢无反应;1 分,完全瘫痪,针刺时下肢有反应,但肢体不能活动;2 分,肢体可活动,但不能站立或站立不稳(<5 s);3 分,可站立,但无法行走;4 分,可行走数步,但不稳定;5 分,能缓慢行走,但不灵活,存在一定缺陷;6 分,正常行走。本法为主观评分,为减少结果误差,在实验中采用双盲法,即双人独立观察记录,最后取其均值。

1.4.2 脊髓病理变化观察 每组于术后 1、7、15 d 将大鼠处死,取脊髓损伤部位,固定,组织 HE 染色。镜下(10×)观察损伤脊髓组织水肿,炎性细胞浸润,神经细胞形态恢复和结构排列情况。

1.5 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 10.0 统计软件进行计量资料的方差分析。

2 结果

2.1 运动功能测定结果 大鼠脊髓损伤后运动功能 Tarlov 评分见表 1。

表 1 大鼠脊髓损伤后运动功能 Tarlov 评分($\bar{x} \pm s$, 分)

Tab.1 Tarlov scoring of SCI rats($\bar{x} \pm s$, score)

组别	Tarlov 评分		
	1 d	7 d	15 d
正常对照组	6.000±0.000	6.000±0.000	6.000±0.000
空白手术组	0.500±0.548*	1.000±0.894**	1.170±0.753**
15 mg 鹿茸多肽组	0.500±0.548*	4.670±0.516**	5.000±0.632***
10 mg 鹿茸多肽组	0.330±0.516*	4.000±0.894**	4.500±1.049***
5 mg 鹿茸多肽组	0.430±0.535*	3.570±0.976**	3.710±0.756**

注:与正常对照组比较,* $P < 0.001$;与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与空白手术组比较,# $P < 0.001$

Note:Compared with control group,* $P < 0.001$;Compared with normal control group,** $P < 0.01$;Compared with blank operation group,# $P < 0.001$

表 1 可见,损伤后给药 1 d 时,空白手术组、15、10、5 mg 治疗组运动评分低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.001$)。给药 7 d 时,大鼠运动功能有所恢复,相应运动评分明显高于空白手术组($P < 0.001$),尤以 15 mg 组效果好,大鼠运动功能恢复较好,但与正常对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.001$)。虽然各治疗组间差异无统计学意义,但随治疗剂量的增加,疗效也增强。继续观察至第 15 天,各治疗组大鼠运动功能评分高于空白手术组,低于正常对照组,但运动功能恢复比

第 7 天好。

2.2 脊髓病理变化观察结果 正常对照组大鼠脊髓灰、白质组织结构完整,神经细胞在灰质中分布均匀、形态正常,尼氏体清晰及细胞膜完整,白质内神经纤维排列整齐,细胞间基质均匀。由损伤组脊髓组织切片发现损伤区主要位于脊髓灰质。在脊髓损伤 1 d 可见,损伤区中央灰质出现大片出血、细胞肿胀、尼氏体消失,细胞空泡变性、部分细胞细胞核固缩,并有大量单核或多核炎性细胞浸润;脊髓损伤第 1 天损伤区组织出现大片坏死灶,有大量嗜伊红色素颗粒,炎性反应加剧;7 d 脊髓损伤及周围区炎性细胞浸润减轻,有些损伤脊髓组织出现囊腔样变化。经不同剂量的鹿茸多肽治疗后,组织水肿减轻,炎性细胞浸润减轻;尤以 15 mg 治疗组恢复最明显,其组织水肿消失,空泡变性减轻,神经细胞形态恢复,结构排列完整。

3 讨论

通过鹿茸多肽对脊髓损伤动物模型治疗作用的实验研究,我们发现经 15、10、5 mg 不同剂量鹿茸多肽治疗 7 d,大鼠运动功能有所恢复,明显强于手术组,尤以 15 mg 鹿茸多肽效果好,但与正常对照组间仍存在差异。虽然各治疗组间无显著差异,但随治疗剂量的增加,疗效增强。继续观察至第 15 天,治疗组脊髓损伤大鼠的行为评分恢复接近正常水平,高于手术组,低于对照组,但运动功能恢复比第 7 天好。结果提示:鹿茸多肽具有促进脊髓损伤大鼠运动功能恢复的作用,且呈剂量依赖性。

近年来国内外研究人员一直致力研究脊髓损伤后各种继发性神经损害防治药物,但研究进展非常缓慢。到目前为止,研究中已经发现 200 余种神经保护药物在临床随机双盲多中心的前瞻性对照研究中,效果并不理想。甲基强的松龙是近年来主要用以延缓脊髓损伤后发生继发性改变的药物,被广泛应用于脊髓损伤,但必须强调损伤后 8 h 内给药才能改善神经功能^[5]。因机体对甲基强的松龙的摄取随时间而衰减,延迟应用会降低神经功能的恢复,可致损伤局部血流量降低,有发生继发性损伤的可能,临床上改善神经功能不满意,因此有必要进一步探索有效的脊髓损伤修复治疗药物,以满足临床上日益增多的脊髓损伤患者的需求。

参考文献

- Suttie JM,Gluckman PD,Butler JH,et al. Insulin-like growth factor I (IGF-1)antler-stimulating hormone. *Endocrinology*,1985,116(2): 846-848.
- 李立军,路来金,陈雷,等. 鹿茸多肽促进大鼠坐骨神经再生的实验研究. *辽宁中医杂志*,2004,31(4):343-344.
- 陈东,孟晓婷,刘佳梅,等. 鹿茸多肽对胎大鼠脑神经干细胞体外诱导分化的实验研究. *解剖学报*,2004,35(3):240-243.
- Cheng H,Cao Yi-hai,Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats:partial restoration of hind limb function. *Science*,1996,273(7): 510-513.
- 张国福,王和鸣. 补阳还五汤对骨髓间质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤的影响. *中国骨伤*,2006,19(8):452-454.

(收稿日期:2008-01-25 本文编辑:王玉蔓)