

文章编号:1671-2897(2010)09-422-05

人参皂甙 Rd 对兔脊髓缺血性损伤保护作用 的量效关系研究

马丽 陈宇 桑韩飞 熊利泽* (第四军医大学西京医院麻醉科,陕西 西安 710032)

摘要 目的 探讨人参皂甙 Rd 对脊髓缺血性损伤保护作用的剂量效应关系。方法 40 只雄性新西兰大白兔,随机分为 5 组($n=8$),采用肾下主动脉阻断法造成脊髓缺血(20 min)。对照组:即单纯缺血再灌注组;保护组:即 Rd-5 组、Rd-10 组、Rd-20 组和 Rd-40 组,分别在缺血前 1 h 从耳缘静脉注射人参皂甙 Rd 5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg;术后观察神经功能变化并记录再灌注 4 h、8 h、12 h、24 h 和 48 h 神经功能学评分,再灌注 48 h 处死动物后取脊髓(L_5-7)标本行病理学观察。结果 所有动物均存活,再灌注后 48 h, Rd-5 组神经功能学评分和脊髓前角正常运动神经元计数与对照组相比均无显著性差异($P>0.05$); Rd-10 组神经功能学评分与对照组相比无显著性差异($P>0.05$),但脊髓前角正常运动神经元计数明显高于对照组($P<0.05$); Rd-20 组、Rd-40 组神经功能学评分和脊髓前角正常运动神经元计数均明显高于对照组($P<0.01$),但这两组之间无显著性差异($P>0.05$)。且每组兔神经功能学评分与其对应脊髓前角正常神经元计数之间有显著相关性($r=0.769$, $P<0.01$)。结论 人参皂甙 Rd 对脊髓缺血性损伤有保护作用,且呈一定的剂量效应关系。

关键词 人参皂甙 Rd; 脊髓缺血; 剂量效应关系; 药物

中国图书资料分类号 R 739.41 文献标识码 A

The dose-response relationship between ginsenoside Rd injection and spinal cord ischemic injury in rabbit

MA Li, CHEN Yu, SANG Hanfei, XIONG Lize

Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract **Objective** To investigate the dose-response relationship between ginsenoside Rd injection and ischemic injury of spinal cord in rabbits. **Methods** Forty male New Zealand white rabbits were randomly divided into 5 groups ($n=8$). Spinal cord ischemia was induced for 20 min by infrarenal aortic occlusion under anesthetization with pentobarbital sodium. Control group received no pharmacologic intervention. Group Rd-5, Rd-10, Rd-20 and Rd-40 received intravenous infusion of 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg and 40 mg/kg ginsenoside Rd within 1 h before aortic occlusion, respectively. Neurological function was scored at 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, and 48 h after reperfusion. Tissue (L_5-7) for histopathologic examination was prepared by hematoxylin-eosin staining at 48 h after reperfusion. **Results** All animals survived in the experiment. Forth-eight hours after reperfusion, there was no statistic difference in neurological function score and the number of normal neurons of anterior spinal cord in group Rd-5 compared with control group ($P>0.05$); there was statistic difference in normal neurons of anterior spinal cord in group Rd-10 but no difference in neurological function score compared with control group ($P>0.05$); there was significant statistic difference in neurological function score and the number of normal neurons of anterior spinal cord in group Rd-20 and Rd-40 compared with control group ($P<0.01$), but no statistic difference was found between group Rd-20 and Rd-40 ($P>0.05$). There was significant correlation between neurological function score and the number of normal neurons of anterior spinal cord in each group ($r=0.769$, $P<0.01$). **Conclusion** Ginsenoside Rd injection can effectively reduce neurological injury induced by spinal cord ischemia and reperfusion in a dose-response manner within a certain dosage range.

Key words Ginsenoside Rd; Spinal cord ischemia; Dose-response relation; Drug

作者简介:马丽,硕士研究生,电话:18601392817, E-mail: maria831215@yahoo.com.cn

*通讯作者:熊利泽,教授、主任医师,电话:(029) 84775337, E-mail: mazuike@fmmu.edu.cn

胸部或腹部水平的主动脉瘤或其它病变的外科治疗,需阻断主动脉血流以确保主动脉病变切除和人造血管置换术的安全与顺利实施,但伴随而来的脊髓缺血性损伤是此类手术最重要而又严重的并发症之一^[1]。我们的研究发现,人参皂甙 Rd 对脊髓缺血性损伤具有保护作用,但其剂量效应关系尚不清楚。本文采用左肾下主动脉阻断所致兔脊髓缺血模型,观察人参皂甙 Rd 对脊髓缺血性损伤保护作用的量效关系。

材料与方法

一、药品与试剂

人参皂甙 Rd 注射液规格为每支 1 ml (10 mg/支),批号 080917,广东泰禾生物药业有限公司提供。用人参皂甙 Rd 注射液专用稀释液(丙二醇)稀释到 5 mg/ml。丙二醇稀释液规格为每支 9 ml,批号 080917,广东泰禾生物药业有限公司提供。

二、实验动物分组

40 只雄性新西兰大白兔,体质量 2.0 ~ 2.5 kg (由第四军医大学实验动物中心提供)。随机将动物分为 5 组($n=8$),对照组:即单纯缺血再灌注组;保护组:Rd-5 组、Rd-10 组、Rd-20 组和 Rd-40 组,分别在缺血前 1 h 从耳缘静脉注射人参皂甙 Rd 5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg,每组灌注容积均按 4 ml/kg 配制。

三、兔脊髓缺血再灌注损伤动物模型

动物术前禁食过夜,自由饮水。乙醚麻醉诱导后,静脉注入 2% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 维持麻醉,经左侧耳缘静脉置一静脉留置针(22G),用于术中注药、输液。取右耳动脉置一动脉留置针(22G),用于监测术中近端动脉压及采集血样。取一侧股动脉置一动脉留置针(20G),用于监测术中远端动脉压。动物仰卧位,取腹正中切口,暴露腹主动脉。经耳缘静脉给予 150 U/kg 肝素后,在左肾动脉起点下 0.5 ~ 1.0 cm 处用动脉夹阻断腹主动脉,造成兔脊髓缺血。阻断腹主动脉后,远端动脉压立刻下降,股动脉搏动消失。缺血后移去动脉夹开放腹主动脉,恢复血流,关闭腹腔。术毕,肌注庆大霉素 4 万 U,动物被放回饲养笼,观察 48 h。术中持续监测近端动脉压、远端动脉压及心率(Space Lab,美国)。用烤灯维持

动物直肠温度 37.5 ~ 38.5 °C (509 监护仪,美国)。分别于缺血前 10 min、缺血后 10 min 和再灌注 10 min 经兔耳动脉采血监测血气(AVL -2,瑞士)和血糖(One Touch II,美国)。

四、神经功能学评分(Neurological function score)

再灌注 4、8、12、24 和 48 h 由一不了解分组情况的观察者对兔后肢运动神经功能评分。兔后肢运动神经功能评分参照 Tarlov 标准,分为五级:0 分,后肢完全瘫痪;1 分,可以觉察的后肢关节运动;2 分,后肢可以自由运动但无法站立;3 分,可以站立但无法行走;4 分,后肢运动功能完全恢复,可以正常行走。

五、病理学观察

神经功能评分完毕后,用 2% 戊巴比妥钠深麻醉动物后,以 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液经心脏灌注固定脊髓组织,截取腰段脊髓组织(L₅₋₇),石蜡包埋后切片(6 μm),行 HE 染色。于光镜下观察脊髓前角正常运动神经元并计数。

六、统计学方法

所有生理参数采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。神经功能学评分(48 h 神经功能评分)及前角正常运动神经元数各组间比较采用非参数秩和检验(Kruskal Wallis test),并将二者行相关性分析。以 $P < 0.05$ 为显著性差异。

结 果

一、生理学指标

缓慢静脉注射人参皂甙 Rd 不影响心率和平均动脉压,动脉氧分压、二氧化碳分压、pH 值和血糖均在正常范围,各参数在各时间点组间无明显差异($P > 0.05$)。

二、神经功能学评分

所有实验动物术后均存活到再灌注 48 h。各组再灌注后各时间点神经功能学评分见图 1A。再灌注 48h 神经功能学评分 Rd-5 组、Rd-10 组与对照组相比,有增高趋势,但无显著性差异($P > 0.05$),而 Rd-20 组、Rd-40 组明显高于对照组($P < 0.01$),但与 Rd-5 组和 Rd-10 组间没有显著性差异($P > 0.05$),Rd-5 组和 Rd-10 组间与 Rd-20 组和 Rd-40 组间均无显著性差异($P > 0.05$)(图 1B)。

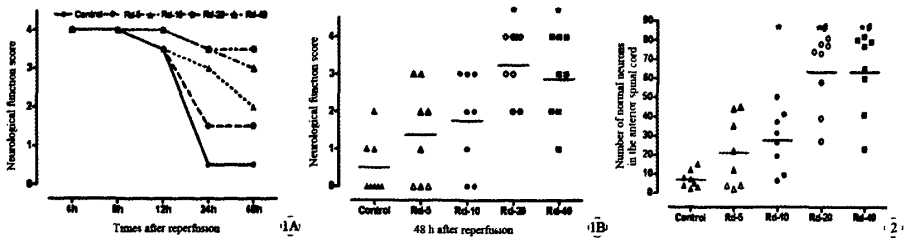


图1 再灌注后各组神经功能学评分

Fig 1 Neurological function score in each group after reperfusion

A: Neurological function scores in different time in each group after reperfusion; B: Neurological function scores at 48 h after reperfusion in each group.

* $P < 0.05$, vs control group; Bar = median.

Each symbol represents data for one rabbit (bar = median).

图2 再灌注后 48 h 各组动物脊髓前角正常运动神经元计数

Fig 2 The number of normal neurons in the anterior spinal cord at 48 h after reperfusion in each group

* $P < 0.01$, vs control group; * $P < 0.05$, vs Rd-5 group.

Each symbol represents data for one rabbit (bar = median).

三、病理组织学改变

脊髓前角正常运动神经元计数除 Rd-5 组与对照组相比有增高趋势但无显著性差异外 ($P > 0.05$), Rd-10 组、Rd-20 组和 Rd-40 组均明显高于对照组 ($P < 0.01$), 且 Rd-20 组和 Rd-40 组与 Rd-5 组相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 但与 Rd-10 组间相比没有显著性差异 ($P > 0.05$), Rd-20 组和 Rd-40 组间没有显著性差异 ($P > 0.05$) (图 2)。光镜下可见对照组 Tarlov 评分 0 的脊髓病理组织学改变 (图 3A), 脊髓前角正

常运动神经元细胞稀少, 细胞核固缩, 甚至整个神经细胞固缩或神经组织周围有空泡形成。图 3B 为人参皂甙 Rd-40 组后肢运动功能正常, Tarlov 评分为 4 的脊髓病理组织学改变, 可见前角正常运动神经元细胞较多, 胞体呈多角形, 核仁清晰, 胞浆中大量尼氏体清晰可见, 偶见少量神经细胞核固缩深染或细胞周围有空泡形成。图 3C 为人参皂甙 Rd-10 组 Tarlov 评分为 2 的脊髓病理组织学改变, 可同时见到正常运动神经元和少量空泡形成。

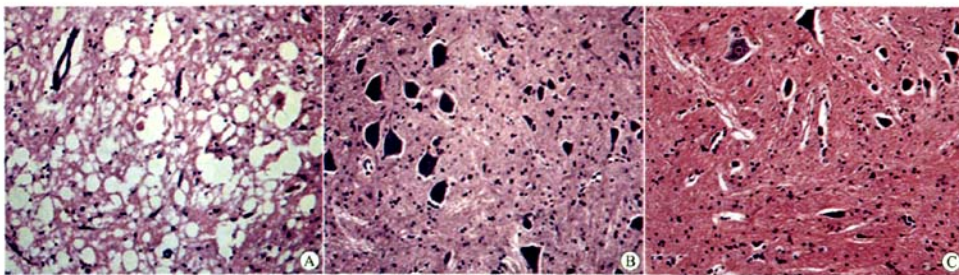


图3 再灌注后 48 h 脊髓病理组织学改变 (HE, $\times 200$)

Fig 3 Histopathologic change of spinal tissues at 48 h after reperfusion (HE, $\times 200$)

A: Representative photomicrographs of lumbar spinal cord sections (L_5) in the ventral horn of gray matter (laminae 7, 8, and 9) at 48 h after reperfusion in each group. Sections of control group showed extensive vacuolation of gray matter and eosinophilic structure; B: Sections of group Rd-40 (Tarlov 4) presented numerous viable cells with the fine granular cytoplasm and Nissl substance; C: Sections of group Rd-10 (Tarlov 2) showed only few normal neuron, most of which was damaged.

Bar = 100 μm .

四、神经功能评分和病理组织改变相关性

分析 48 h 神经功能评分及对应脊髓前角正常神经元细胞计数,两者之间有显著相关性($r=0.769$, $P<0.01$)。

讨 论

脊髓缺血性损伤的主要机制为:脊髓供血减少导致神经元细胞缺血、缺氧,三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)储备耗竭,引起细胞膜 ATP 酶依赖性泵功能衰竭,使谷氨酸等兴奋性氨基酸释放增多,谷氨酸与脊髓 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate,NMDA)受体结合,神经细胞膜上的 Ca^{2+} 通道异常开放, Ca^{2+} 大量内流,导致 Ca^{2+} 清除障碍,使细胞内 Ca^{2+} 超载,过量的 Ca^{2+} 可激活细胞膜上的磷脂酶 A_2 、蛋白激酶、一氧化氮合酶等产生脂质过氧化,启动自由基生成致神经元损伤,从而导致脊髓神经元继发性损害。同时, Ca^{2+} 内流引发核酸内切酶激活,后者可启动细胞凋亡,从而进一步加重组织损伤^[2,3]。

人参是大补元气,调神益智的传统中药。人参皂甙(ginsenosides, Gs)是人参的主要活性成分,目前已从人参植物中分离提取到 40 多种 Gs 单体,人参皂甙 Rd 是最近发现的其中一种单体(图 4)。其脂溶性高,能够透过血脑屏障。有研究显示人参皂甙 Rd 在人的血浆半衰期长达 19.29 h,半衰期较长可以减少给药频率,因此应用于临床具有独特的优势,目前此药已进入三期临床试验阶段。近年来研究显示 Gs 在中枢神经系统中具有神经营养和神经保护作用,能够增强学习记忆、抗衰老。研究证实,Gs 通过抗氧化应激作用、抗凋亡作用、抗兴奋性毒性损伤、抗细胞毒性、抗炎性及与神经营养因子的相互作用发挥神经保护作用。已有文献报道^[4,5],人参皂甙 Rd 在生物体内发挥多种药理学作用:它可以阻断 Ca^{2+} 内流;加强神经干细胞向星形胶质细胞的分化;可以显著减少纹状体中 3-硝基丙酸诱导的神经元功能障碍和死亡。在肾损伤模型和老龄大鼠模型中,人参皂甙 Rd 发挥了抗氧化应激的作用;在中枢神经系统中,人参皂甙 Rd 可以减少培养的星形胶质细胞中氧自由基的形成,也可以减少大鼠皮层神经元中谷氨酸引起的细胞凋亡;在培养的 PC12 细胞和海马神经元中,人参皂甙 Rd 都发挥了抗氧化应激作用。因此,我们认为人参皂甙 Rd 可以保护神经元的缺血性损伤^[6-9]。我们的研究已发现人参皂甙 Rd 对脊髓缺血性损伤具有保护作用,但是否存在剂量效应关系尚不清楚。

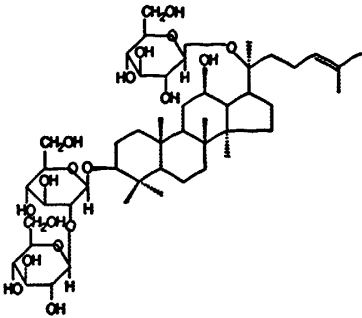


图 4 人参皂甙-Rd 化学结构
Fig 4 The chemical structure of ginsenoside Rd
The molecular formula for ginsenoside Rd is $C_{48}H_{82}O_{18} \cdot 3H_2O$ and the molecular weight is 1001 D.

本文利用兔肾下主动脉阻闭模型,选择人参皂甙 Rd 5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg 和 40 mg/kg 的剂量进行观察,结果发现再灌注后 48 h,Rd-5 组神经功能学评分和脊髓前角正常运动神经元计数与对照组相比,均无显著性差异($P>0.05$);Rd-10 组神经功能学评分与对照组相比无显著性差异($P>0.05$),但脊髓前角正常运动神经元计数明显高于对照组($P<0.05$);Rd-20 组、Rd-40 组神经功能学评分和脊髓前角正常运动神经元计数均明显高于对照组($P<0.01$),但这二组之间无显著性差异($P>0.05$)。且每组兔神经功能学评分与其对应脊髓前角正常神经元计数之间有显著相关性($r=0.769$, $P<0.01$)。因而证实人参皂甙 Rd 对脊髓缺血性损伤具有保护作用,且呈现一定的剂量效应关系。人参皂甙 Rd 的这种作用特点在脑缺血-再灌注模型中也有体现。观察发现人参皂甙 Rd 预先给药对大鼠短暂局灶性脑缺血再灌注损伤有保护作用,且在 5 ~ 40 mg/kg 范围内,存在剂量依赖性的保护作用^[10]。人参皂甙 Rd 动物实验大鼠推荐剂量为:2 ~ 50 mg/kg,根据以上研究结果并结合兔血容量的特点,本实验选择了 5、10、20、40 mg/kg 四个剂量组进行实验,得出上述实验结果,扩大实验剂量是否会有不同结果尚待进一步研究。虽然我们发现人参皂甙 Rd 在 5 ~ 40 mg/kg 范围内呈一定的剂量效应关系,但发现人参皂甙 Rd 20 mg/kg 和 40 mg/kg 组间的保护作用无明显差异,提示并非人参皂甙 Rd 的剂量越大,保护作用越强。因此,我们认为在临床应用时,应找到最佳剂量,一次性给药,尤其缺血前应用,对维持主动脉瘤、脊髓肿瘤及血管畸形等手术围术期血流动力学稳定,尤其是减轻

脊髓缺血性损伤,降低截瘫发生率具有重要的作用。

参 考 文 献

- 1 Spincemaille GH, Klomp HM, Steyerberg EW, et al. Pain and quality of life in patients with critical limb ischemia: results of a randomized controlled multicentre study on the effect of spinal cord stimulation. ES-ES study group [J]. *Eur J Pain*, 2000, 4(2): 173 - 184.
- 2 Nakamichi T, Kawada D. Glutamate neurotoxicity during spinal cord ischemia-development of a delayed-onset paraplegia model [J]. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi*, 1997, 45(10): 1667 - 1673.
- 3 Lombardi V, Valko L, Stolc S, et al. Free radicals in rabbit spinal ischemia: electron spin resonance spectroscopy and correlation with SOD activity [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 1998, 18(4): 399 - 412.
- 4 徐丽. 人参皂甙神经保护作用机制的研究进展 [J]. *牡丹江医学院学报*, 2007, 28(4): 81 - 83.
- 5 Rausch WD, Liu S, Gille G, et al. Neuroprotective effects of ginsenosides [J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2006, 66(4): 369 - 375.
- 6 Yokozawa T, Liu ZW, Dong E, et al. A study of ginsenoside-Rd in a renal ischemia-reperfusion model [J]. *Nephron*, 1998, 78(2): 201 - 206.
- 7 Yokozawa T, Owada S. Effect of ginsenoside-Rd in cephaloridine-induced renal disorder [J]. *Nephron*, 1999, 81(2): 200 - 207.
- 8 Yokozawa T, Satoh A, Cho EJ. Ginsenoside-Rd attenuates oxidative damage related to aging in senescence-accelerated mice [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2004, 56(1): 107 - 113.
- 9 Ye R, Han J, Kong X, et al. Protective effects of ginsenoside Rd on PC12 cells against hydrogen peroxide [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(10): 1923 - 1927.
- 10 鲁瑶, 彭娜, 路志红, 等. 人参皂甙-Rd 预先给药对大鼠脑的保护作用 [J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2009, 8(6): 496 - 499.

(收稿日期:2009-12-29;修回日期:2010-02-20)

本刊关于文中表格的使用规定

实验测量和计算数据是科技论文的核心内容,作为数据表述主要形式之一的表格,因具有鲜明的定量表达量化信息的功能而被广泛采用。三线表以其形式简洁、功能分明、阅读方便而在科技论文中被推荐使用。

本刊文中所有表格均采用三线表。即顶线、底线和栏目线。其中顶线和底线为粗线,栏目线为细线。必要时,可加若干辅助线。文中三线表应包括:表序、表题、项目栏、表体、表注或/和说明。对于本刊来稿的论著类文章,表题、项目栏、表注或/和说明均需要用中英文表述。文中表格按照出现的先后用阿拉伯数字连续编码,如“表1”、“表2”。表题应准确得体,简短精炼。中英文表题表述应一致。三线表栏目中的单位都相同,应将单位提出去,置于表格顶线的右端。

《中华神经外科疾病研究杂志》编辑部