

三羟乙基芦丁对大鼠颈脊髓损伤后 神经功能恢复的影响

刘雅普^{1,2}, 苏圆圆², 刘 祺^{1,3}, 刘俊豪¹, 黄祖成¹, 黄志平¹, 侯秀伟², 吴广良², 吴晓亮¹, 朱青安¹

(1 南方医科大学南方医院脊柱外科 510515 广州市; 2 漯河医学高等专科学校第二附属医院 462300 漯河市;

3 广州医科大学附属第二医院 510260 广州市)

【摘要】目的:探讨三羟乙基芦丁对大鼠颈脊髓损伤的神经保护作用。**方法:**将成年雄性 SD 大鼠 44 只随机分为 4 组, 假手术组(Shame 组, $n=8$); 损伤组(Injury 组, $n=12$); 三羟乙基芦丁 50mg/kg 治疗组(T50 组, 1 次/日, 腹腔注射, $n=12$); 三羟乙基芦丁 100mg/kg 治疗组(T100 组, 1 次/日, 腹腔注射, $n=12$), 后三组均采用 C5 脊髓半侧挫伤大鼠模型(挫伤深度为 1.2mm)。分别于术前及术后 3d、1 周、2 周、4 周、6 周、8 周、10 周、12 周评价各组大鼠前肢运动功能评分(forelimbs locomotor scores, FLS)、梳理实验等行为学变化。12 周时各组大鼠随机选取 1 只进行硫酸钡-明胶灌注剂进行颈脊髓微血管灌注, 4℃过夜后显微镜下取颈脊髓组织, 免疫组织化学染色观测颈脊髓微血管改变, 脊髓组织连续冰冻切片铬花青 EC 染色统计各组损伤情况。**结果:**术后 3d 时, Injury 组、T50 组及 T100 组的 FLS 分别为 11.33 ± 0.71 分、 11.55 ± 0.81 分和 12.36 ± 1.15 分, 与 Shame 组(17.0 分)相比均显著下降, 随着时间的推移, FLS 均逐渐改善, T50 组和 T100 组于术后 8 周时恢复正常, Injury 组于术后 10 周时恢复正常。梳理实验结果与 FLS 相似, 至 12 周时 T100 组恢复正常(5.0 分), T50 组为 4.92 ± 0.08 分, 与 Shame 组比较无显著性差异, Injury 组为 4.17 ± 0.11 分, 与 Shame 组比较仍有显著性差异($P<0.05$)。术后 12 周时, Injury 组微血管数量明显减少, T50 组也明显减少, 但优于 Injury 组, T100 组的微血管数量减少不明显; 免疫组化染色显示, 12 周时 Injury 组、T50 组及 T100 组微血管密度分别为 23.50 ± 1.75 、 31.33 ± 1.36 和 33.00 ± 1.27 , 均较 Shame 组明显减少, T50 组、T100 组与 Injury 组比较有显著性差异($P<0.05$)。EC 染色结果发现, T50 组和 T100 组损伤侧的总面积(包括空洞面积)明显高于 Injury 组; Injury 组损伤中心的空洞面积最大, 而 T50 组和 T100 组损伤中心空洞面积显著小于 Injury 组; T50 组和 T100 组损伤侧残余灰质面积均明显多于 Injury 组。**结论:**三羟乙基芦丁通过保护颈脊髓微血管结构, 减轻脊髓结构破坏, 对大鼠颈脊髓损伤具有较好的神经保护作用。

【关键词】三羟乙基芦丁; 脊髓损伤; 行为学; 组织学; 微血管

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2020.05.08

中图分类号: R683.2, R972 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2020)-05-0437-10

Effects of trihydroxyethyl rutin on the recovery of nerve function after cervical spinal cord injury in rats/LIU Yapu, SU Yuanyuan, LIU Qi, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2020, 30(5): 437-446

【Abstract】Objectives: To investigate the neuroprotective effect of trihydroxyethyl rutin on cervical spinal cord injury in rats. **Methods:** 44 adult male SD rats were randomly divided into 4 groups, including the shame group($n=8$), injury group($n=12$), T50 group with 50mg/kg trihydroxyethyl rutin treatment(1 time/day, intraperitoneal injection, $n=12$), and T100 group with 100mg/kg trihydroxyethyl rutin treatment(1 time/day, intraperitoneal injection, $n=12$). The last three groups were all treated with C5 spinal cord hemilateral contusion rat model(contusion depth was 1.2mm). The behavioral changes such as forelimb locomotor scores(FLS) and combing experiment were evaluated at pre-operation and 3d, 1 week, 2 weeks, 4 weeks, 6 weeks, 8 weeks, 10 weeks and 12 weeks after operation. At 12 weeks, 1 rat in each group was randomly selected to inject with

基金项目:国家自然科学基金(81601904 & 81972110); 漯河市青年拔尖人才支持项目(2018QNBRC01004); 漯河医专创新创业提升项目(2019-LYZKYD004 & 2019-LYZKYB016)

第一作者简介:男(1985-), 副主任医师, 医学博士, 研究方向: 脊柱脊髓损伤

电话: (0395)6181120 E-mail: yapuliu@sina.com

通讯作者: 朱青安 E-mail: qinganzhu@gmail.com

barium-sulfate gelatin for cervical spinal cord microvascular perfusion. After 4°C overnight, cervical spinal cord tissue was collected under the microscope. Changes in cervical spinal cord microvascular were observed by immunohistochemical staining. **Results:** At 3 days after the surgery, the FLS of the injury group, the T50 group and the T100 group were 11.33 ± 0.71 , 11.55 ± 0.81 and 12.36 ± 1.15 points, respectively. At 8 weeks after the surgery, compared with the shame group(17.0 points), the FLS of the injury group, the T50 group and the T100 group returned to normal. And at 10 weeks after the surgery, the injury group returned to normal. The results of the grooming experiment were similar to those of FLS, with the T100 group returning to normal(5.0 points) at 12 weeks, the T50 group returning to normal at 4.92 ± 0.08 points, and no significant differences between the shame group and the injury group(4.17 ± 0.11 points)($P < 0.05$). At 12 weeks after surgery, the number of microvessels in the injury group was significantly reduced, and so was that in the T50 group, while it was better than that in the injury group. The number of microvessels in the T100 group was not significantly reduced. Immunohistochemical staining showed that at 12 weeks, the microvascular density of the injury group, the T50 group and the T100 group were 23.50 ± 1.75 , 31.33 ± 1.36 and 33.00 ± 1.27 , respectively, which were significantly lower than those of the shame group, and there were significant differences between the T50 group and the T100 group and the injury group($P < 0.05$). The EC staining results showed that the T50 group and T100 group had significantly higher total area of injury side(including cavity area) than the injury group. The injury group had the largest hole area, while the T50 and T100 groups had significantly smaller holes than the injury group. The residual gray matter area of T50 group and T100 group was significantly higher than that of the injury group. **Conclusions:** Trihydroxyethyl rutin provides neuroprotection in rats with cervical spinal cord injury, by protecting the microvascular structure of cervical spinal cord and alleviating the damage of spinal cord structure.

【Key words】 Trihydroxyethyl rutin; Spinal cord injury; Behavior; Histology; Microvascular

【Author's address】 Department of Spinal Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, 510515, China

三羟乙基芦丁(Trihydroxyethyl rutin)是一种黄酮类化合物,分子式为 $C_{33}H_{42}O_{19}$,是在芦丁 $C_{27}H_{30}O_{16}$ 分子结构基础上添加了三个羟乙基基团(图 1),其中 B 环为其最重要的活性基团具有各种有益的生物效应。Zhai 等^[1]2016 年对创伤性脑损伤(traumatic brain injury,TBI)后 30min 内通过腹腔注射芦丁,研究其对神经保护作用的潜在机制,通过神经功能评分、血脑屏障通透性、脑水

含量和大脑皮质神经元细胞凋亡等方法检测,结果表明,芦丁可恢复脑组织细胞色素 c、丙二醛(malondialdehyde,MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)的水平,改善神经元的存活。还有报道显示芦丁可改善脑出血、脑梗死、帕金森病等疾病患者的神经功能情况^[1-8]。

芦丁的加工化合物三羟乙基芦丁(图 1)具有更强的化学作用,三个羟乙基基团大大促进了机

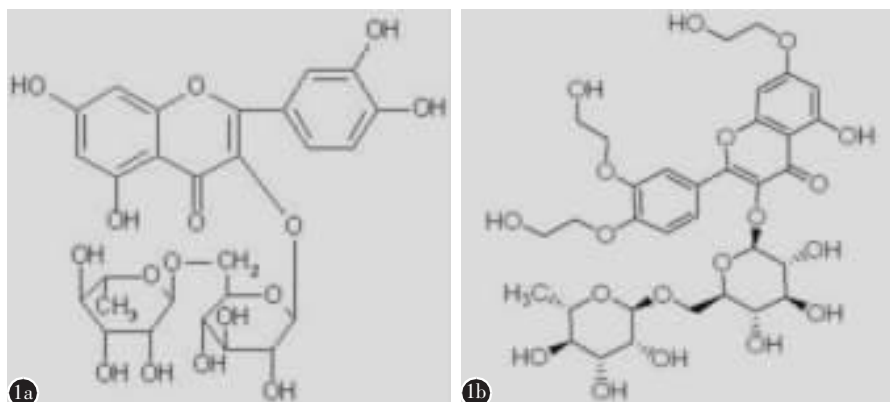


图 1 a 芦丁的分子结构 b 三羟乙基芦丁的分子结构

Figure 1 a Molecular structure of rutin b Molecular structure of trihydroxyethyl rutin

体对药物的吸收和利用效率,更好地发挥其生物学效应^[9]。三羟乙基芦丁是否对脊髓损伤的治疗有效果及其作用机制未见报道,有待进一步研究。鉴于既往文献研究,我们提出理论假设:芦丁的改进化合物——三羟乙基芦丁,可能对脊髓损伤具有神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料、仪器

成年雄性 SD 大鼠,体重为 280~320g,平均体重为 300±13g;试剂:戊巴比妥钠、异氟烷、0.9%生理盐水注射液、注射用青霉素钠、铬花青染料(Sigma,美国)、10%FeCl₃、浓硫酸、肝素钠注射液、多聚甲醛粉剂、硫酸钡、三羟乙基芦丁(哈森药业,中国)、医用明胶、蔗糖、PBS 缓冲液、兔抗 CD34 多克隆抗体(Bioworld,美国)、山羊抗兔二抗(中杉金桥,中国)、DAB 显色液(中杉金桥,中国)、苏木素伊红染液(碧云天,中国)、OCT 包埋剂,Sakura,日本;仪器:Micro-CT (Scanco,瑞士)、Instron E1000 电磁伺服材料试验机(Instron,美国)、YH-X-4A 小动物手术显微镜(亿华光学,中国)、小动物麻醉机(Matrix,美国)、立体定位仪(瑞沃德,中国)、组织冰冻切片机(Thermo,美国)、光学显微镜及成像系统(Olympus,日本)、-80℃超低温冰箱(Premium,美国)。

1.2 动物分组

本实验完成于南方医科大学南方医院脊柱脊髓损伤研究实验室。假手术组(Shame 组, $n=8$);损伤组(Injury 组, $n=12$),三羟乙基芦丁 50mg/kg 治疗组(T50 组, $n=12$),三羟乙基芦丁 100mg/kg 治疗组(T100 组, $n=12$)。

1.3 手术方法

大鼠颈脊髓半侧挫伤模型制作参考既往文献研究^[10]。操作过程:大鼠麻醉后,皮下注射 5ml 生理盐水予以提前补液,剃毛器剃除颈后部毛发,常规消毒、铺巾,以 C5 节段为中心行一长约 2~3cm 纵行手术切口,逐层分离皮肤、皮下组织、肌肉组织等,显露 C5 节段椎板骨性结构,尖嘴咬骨钳咬除 C5 左侧椎板,并显露出脊髓后中央动脉,C5 节段半椎板切除完成,注意在手术显微镜下仔细操作,在椎板切除过程中注意切勿损伤脊髓。采用关节突夹具固定 C4~C6 节段关节突后,将大鼠固定于的脊髓立体定位仪装置中,以便在造模过程中

稳定脊髓,防止动物呼吸及心跳等因素的干扰。

1.4 颈脊髓损伤模型的建立

将固定后的大鼠置于 Instron E1000 电磁伺服材料试验机(Instron 公司,美国)试验平台装置上,调整电磁探针的高度,使其降至 C5 节段左侧脊髓组织表面,使探针与脊髓后中央动脉相切后,通过侧方平移试验平台,根据千分表指示,使电磁探针跨过对侧脊髓 0.25mm^[10],打击点对位完毕,对位后予以硬膜 0.01N 的预加载力以保证接触初始情况的一致性,然后启动打击程序使打击头上升至距离脊髓表面打击点一定位置后,驱动电磁伺服试验机打击脊髓,打击参数设定为打击速度 500mm/s,打击深度为 1.2mm,打击完成后丝线依次缝合伤口。T50 治疗组和 T100 治疗组大鼠根据体重分别立即予以腹腔注射三羟乙基芦丁 50mg/kg (1 次/日) 和 100mg/kg (1 次/日),Shame 组和 Injury 组大鼠予以腹腔注射生理盐水,肌注青霉素注射液 1 万 U 抗感染,连续 3d。假手术组的动物进行了椎板切除术,同时也接受电磁探针的对位,但未实施实际挫伤打击操作。术后将大鼠置于 37℃恒温箱中至麻醉完全清醒。

1.5 动物行为学评价

分别于术前及术后 3d、1 周、2 周、4 周、6 周、8 周、10 周、12 周施行大鼠的动物行为学评价,由于颈部半挫伤会产生明显的前肢损伤,因此该模型非常适合于评估前肢的功能能力,由于后肢运动障碍不太明显,因此 Basso、Beattie 和 Bresnahan (BBB) 运动评分量表不适合在该模型中使用^[11],本研究中动物行为学评价方法包括:前肢运动功能评分(forelimbs locomotor scores,FLS)和梳理试验(grooming test)。

1.5.1 前肢运动功能评分 前肢运动功能评分主要用于观察大鼠损伤后前肢运动功能变化情况,对评价大鼠脊髓损伤肢体功能恢复情况具有较好的价值,重点是观察肩关节、肘关节、腕关节等大关节协调情况,以及足掌和爪的屈伸功能情况,具体评分方法参考既往研究^[12],评分方法量表见表 1。

1.5.2 梳理试验 前肢梳理试验评分方法参考既往报道的方法^[13,14],方法简介:在安静且光线充足的实验间中,将大鼠的头部毛发使用冷水沾湿后,置于透明的树脂材料圆筒中,圆筒直径约 30cm,高约 50cm,将两面镜子垂直放置,置于树脂圆筒

的两边,录像机置于前端,可从树脂圆筒或镜面反射图像中获取大鼠的详细运动信息,连续录制时间为 15min。实验完成后由非参与该实施的人员进行双盲评分,评分时调节视频的播放速度,评分人员在慢速播放下仔细记录各个梳理动作情况,取最高分值为前肢梳理试验的最后评分,评分标准见表 2。

1.6 颈脊髓微血管灌注

试验终末期,即大鼠颈脊髓半侧挫伤后 12

周,各试验组大鼠随机选取 1 只进行硫酸钡-明胶灌注剂进行颈脊髓微血管灌注^[15],灌注方法简介:大鼠深度麻醉后,经腹胸切口暴露心脏,经心尖穿刺置入钝性穿刺针,温肝素盐水灌注排出体内循环血液,多聚甲醛溶液灌注固定血管,恒压注射硫酸钡-明胶灌注造影剂,4℃过夜使灌注剂定型,显微镜下取材颈脊髓组织。

1.7 颈脊髓微血管三维重建

颈脊髓微血管的 micro-CT 扫描及三维重建方法^[16]:将造影剂灌注后的颈脊髓组织固定于扫描杯中,置于 micro-CT 中采用高分辨率扫描层厚 8μm (参数设定为 55kV,145μA,300ms) 进行扫描。

1.8 血管免疫组化染色

脊髓损伤后第 12 周对颈脊髓组织进行 CD34 微血管免疫组化染色^[17,18]。大鼠深度麻醉后,4℃冷肝素-生理盐水(50mg/500ml)和 4%多聚甲醛经左心室灌注。取下颈脊髓组织,用 4%多聚甲醛固定 24h,然后在含 30%蔗糖的 PBS 中低温保存。将脊髓组织置于 OCT 中,用干冰快速冷冻,组织块在-80℃下保存,切片层厚 20μm。切片先用 3%过氧化氢浸泡,阻断内源性过氧化物酶活性,然后用兔多克隆抗 CD34 孵育过夜,采用 Weidner 的微血管计数方法^[19]计算微血管密度,每组在三个随机视野中定量观察阳性染色细胞数量。

1.9 EC 染色

冰冻切片层厚 20μm,每隔 10 片(200μm)进行组织染色,将组织切片室温下复温 30min,将组织切片依次置于二甲苯 I、II、III 中将包埋剂脱除,各浸泡 10min;水化步骤依次为:100%乙醇、

表 1 前肢运动功能评分量表
Table 1 Forelimbs locomotor scores scale

评分 Score	前肢活动情况 Descriptor of forelimb movement
0分 0 score	前肢无运动 No movements of the forelimb
1分 1 score	一个或两个关节的轻微运动 Slight movements of one or two joints of the forelimb
2分 2 scores	一个关节的广泛运动或并有其它关节的轻微运动 Extensive movement of one joint and slight or no movement of another joint of the forelimb
3分 3 scores	肩、肘、腕三个关节的轻微运动 Slight movements of all three joints of the forelimb
4分 4 scores	两个关节的轻微运动和一个关节的广泛运动 Extensive movement of one joint and slight movement of two joints of the forelimb
5分 5 scores	两个关节的广泛运动和一个关节的轻微运动 Extensive movement of two joints and slight movement of one or no joints of the forelimb
6分 6 scores	三个关节的广泛运动 Extensive movement of all three joints of the forelimb
7分 7 scores	足掌面接触地面,但无负重 Dorsal or Plantar placement of the forelimb with no or partial weight support in that limb during stance
8分 8 scores	仅有足背触地行走 Dorsal stepping only
9分 9 scores	足背触地行走,偶有足掌触地行走 Dorsal stepping with occasional plantar stepping
10分 10 scores	频繁足掌触地行走,偶有足背触地行走 Frequent plantar stepping with occasional dorsal stepping
11分 11 scores	持续足掌触地行走,腕部控制差 Continuous plantar stepping with poor wrist control
12分 12 scores	持续足掌触地行走,运动时爪旋转或频繁足底步行 Continuous plantar stepping with paw position predominantly rotated
13分 13 scores	持续足掌行走,爪在触地及提起时旋转 Continuous plantar stepping with paw touching and lifting
14分 14 scores	持续足掌行走,爪在触地及提起时旋转,偶伸趾 Continuous plantar stepping with paw position predominantly rotated and occasional toe clearance
15分 15 scores	持续足掌行走,在触地及提起均与身体平行,偶伸趾 Continuous plantar stepping with paw position predominantly parallel and occasional toe clearance
16分 16 scores	持续足掌行走,在触地及提起均与身体平行,频繁伸趾 Continuous plantar stepping with paw position predominantly parallel and frequent toe clearance
17分 17 scores	持续足掌行走,在触地及提起均与身体平行,持续伸趾 Continuous plantar stepping with paw position predominantly parallel and continuous toe clearance

表 2 梳理试验评分量表
Table 2 Grooming test scale

评分 Score	前肢活动情况 Descriptor of forelimb movement
1分 1 score	前肢仅触及唇部以下的区域 The forelimb touches only the area below the lips
2分 2 scores	前肢可触及唇部至鼻部之间的区域 The forelimbs touches the area between the lips and the nose
3分 3 scores	前肢可触及鼻部至眼部之间的区域 The forelimb touches the area between the nose and the eye
4分 4 scores	前肢可触及眼部至耳部之间的区域 The forelimb touches the area between the eye and the ear
5分 5 scores	前肢可触及耳部上方的区域 The forelimb touches the area above the ear

100%乙醇、95%乙醇、90%乙醇、80%乙醇、70%乙醇各 5min, 纯水 3min; 将切片置于铬花青 EC 染液中, 室温下浸泡 10min, 去离子水冲洗片刻; 切片置于 0.5% 氢氧化铵溶液分化 10s 左右, 区分开灰白质结构, 去离子水再次冲洗片刻; 按照 50%乙醇、70%乙醇、95%乙醇、100%乙醇依次进行梯度脱水, 各 2min; 置于二甲苯透明 2 次, 各 2 分钟; 待切片风干之后, 使用中性树脂胶进行封片, 显微镜下观察; 对脊髓组织连续切片染色后置于光学显微镜下按照切片编号依次拍摄图像并以 TIFF 格式存储; 使用 Image J 软件对切片损伤空洞面积进行统计, 以空洞最大处为损伤中心部位, 并使用 Image J 软件勾勒出损伤侧面积、残存灰质面积等。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 19.0 进行统计学分析, 结果均以均值 $\pm$ 标准误($\bar{x}\pm s$)表示, 两组独立变量之间的比较采用独立样本 t 检验, 不同时间点两组独立变量之间的比较采用两因素重复测量方差分析进行统计, 处理方式与时间点分别为配对和重复测量的因素, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 颈脊髓损伤模型的生物力学结果

每只大鼠完成颈脊髓半侧挫伤后, 立即采集相应的实际生物力学数据并分析(图 2)。Injury 组的平均实际位移为 $1.210\pm 0.003\text{mm}$, 平均实际速度为 $507.700\pm 2.693\text{mm/s}$, 平均最大载荷力为

$1.000\pm 0.077\text{N}$; T50 组的平均实际位移为 $1.189\pm 0.004\text{mm}$, 平均实际速度为 $502.400\pm 2.408\text{mm/s}$, 平均最大载荷力为 $1.027\pm 0.069\text{N}$; T100 组的平均实际位移为 $1.197\pm 0.003\text{mm}$, 平均实际速度为 $504.900\pm 1.366\text{mm/s}$, 平均最大载荷力为 $0.953\pm 0.066\text{N}$; 各组间实际打击参数无显著差异。

2.2 动物行为学评价结果

损伤前各组大鼠的 FLS 评分均为满分 17 分, 损伤后各组大鼠 FLS 评分结果均显著下降, 3d 时, Injury 组、T50 组、T100 组 FLS 评分结果分别为 11.33 ± 0.71 分、 11.55 ± 0.81 分和 12.36 ± 1.15 分, 各组随着时间的推移, 前肢运动功能情况均逐渐改善, 其中 T50 组和 T100 组于术后 8 周时恢复正常, Injury 组于术后 10 周时恢复正常, T50 组和 T100 组的 FLS 总体评分显著高于 Injury 组 ($P=0.0239$ 和 $P=0.0249$) (图 3)。

梳理试验测试结果发现, 各组在损伤后 1 周伤侧前爪的梳理功能均降低, 术后 12 周 Injury 组、T50 组和 T100 组的梳理试验评分结果分别为 4.17 ± 0.11 分、 4.92 ± 0.08 分、5 分, Injury 组梳理试验总体评分结果显著低于假手术组 ($P<0.0001$), 但 T50 组和 T100 组的梳理试验总体评分结果与假手术组无明显差异, T50 组和 T100 组的梳理试验总体结果显著优于 Injury 组 (P 值均 <0.0001) (图 4)。

2.3 颈脊髓微血管三维重建结果

颈脊髓微血管三维重建结果见图 5。图中可见 Injury 组中的血管密度明显减少, 尤其是微血

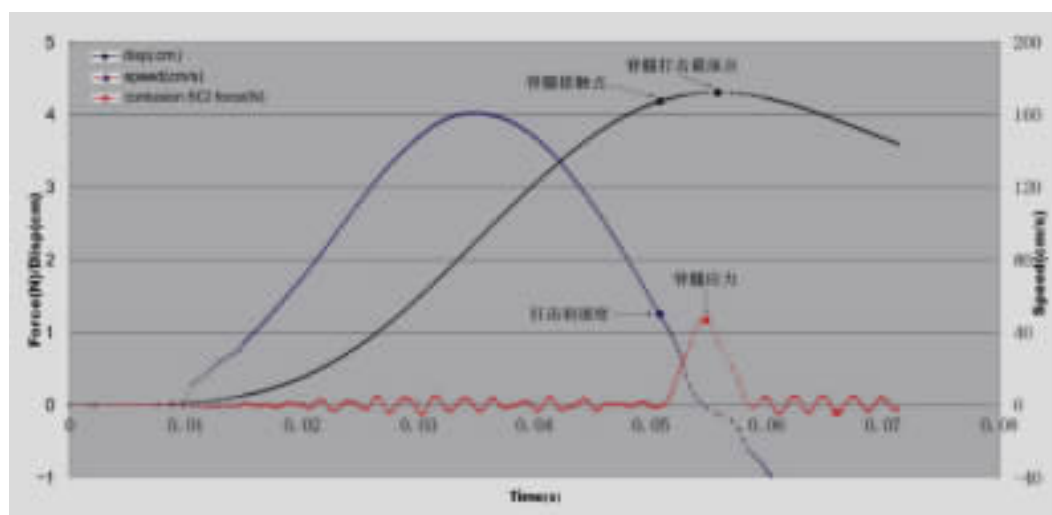


图 2 挫伤位移-速度-力学曲线图

Figure 2 Biomechanical parameters curve of displacement-velocity-mechanics

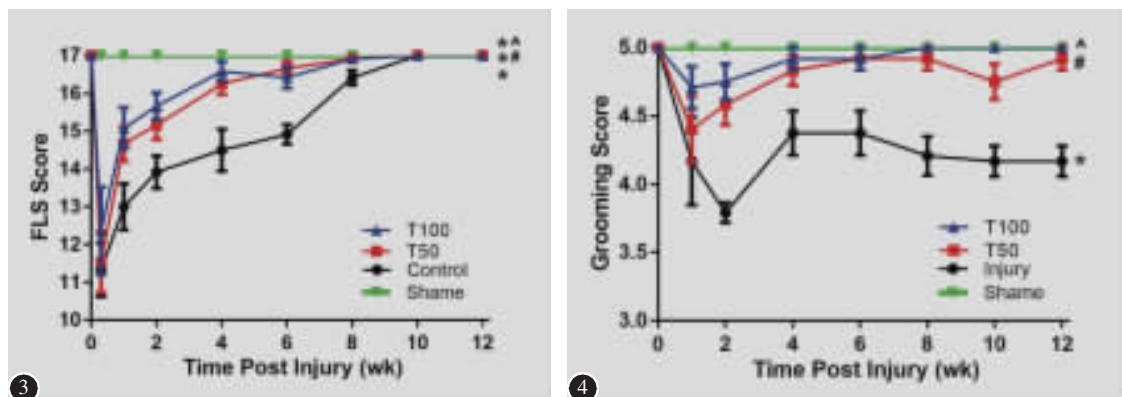


图 3 FLS 的结果 T50 组和 T100 组 FLS 评分显著高于损伤组。* 代表 $P<0.05$, 各组与假手术组对比结果; # 代表 $P<0.05$, T50 组与 Injury 组对比结果。^ 代表 $P<0.05$, T100 组与 Injury 组对比结果 **图 4** 梳理试验评分结果 损伤组评分显著低于假手术组 ($P<0.0001$), T50 组、T100 组与假手术组之间无显著性差异, T50 组、T100 组评分显著优于损伤组 ($P<0.0001$)。* 代表 $P<0.05$, 各组与假手术组对比结果; # 代表 $P<0.05$, T50 组与 Injury 组对比结果。^ 代表 $P<0.05$, T100 组与 Injury 组对比结果

Figure 3 FLS results The overall FLS score of T50 group and T100 group was significantly higher than the injury group. * represents $P<0.05$, and the comparison results between each group and the sham operation group; # represents $P<0.05$, and the comparison result between T50 group and Injury group; ^ represents $P<0.05$, and the comparison result between T100 group and injury group **Figure 4** Grooming test The overall score of injury group was significantly lower than that of sham group ($P<0.0001$), there was no significant difference between the T50 group, T100 group and the sham group, and the overall grooming test scores in T50 group and T100 group were significantly better than the injury group ($P<0.0001$). * represents $P<0.05$, and the comparison results between each group and the sham operation group; # represents $P<0.05$, and the comparison result between T50 group and Injury group; ^ represents $P<0.05$, and the comparison result between T100 group and injury group

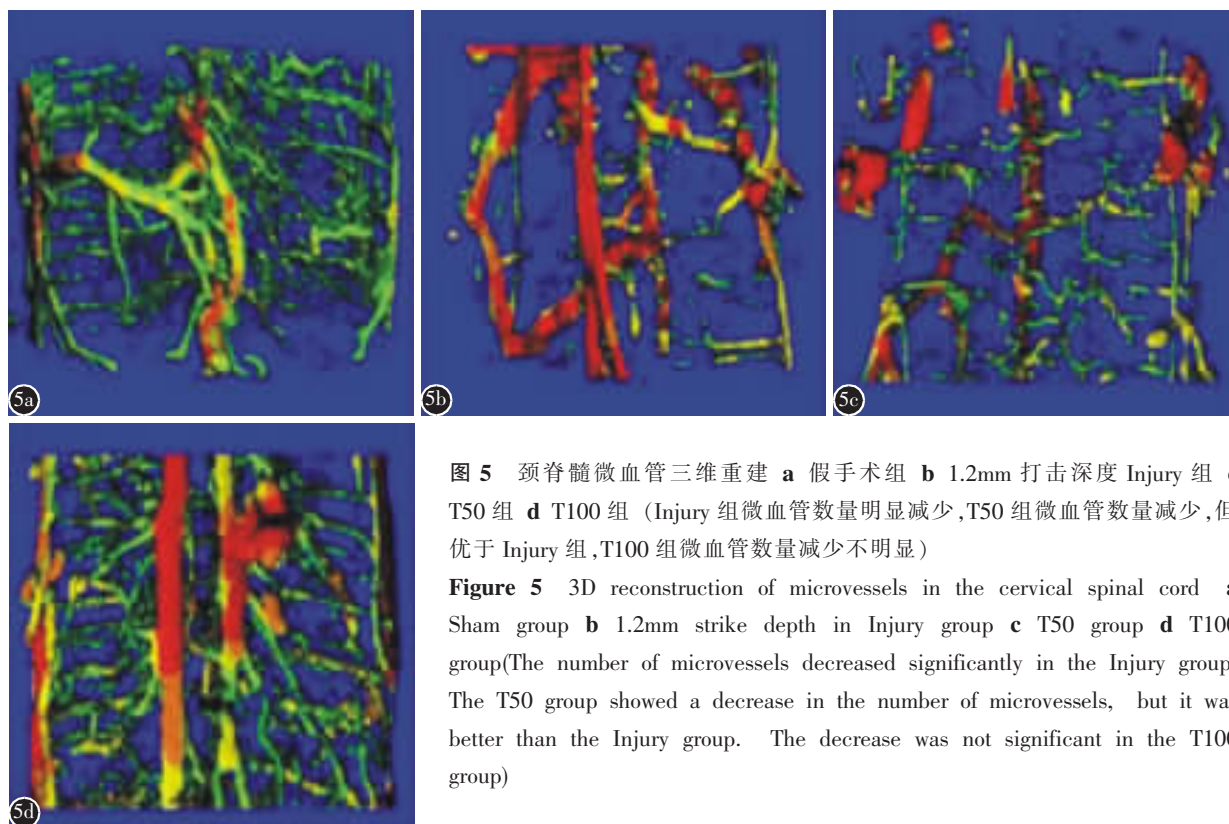


图 5 颈脊髓微血管三维重建 a 假手术组 b 1.2mm 打击深度 Injury 组 c T50 组 d T100 组 (Injury 组微血管数量明显减少, T50 组微血管数量减少, 但优于 Injury 组, T100 组微血管数量减少不明显)

Figure 5 3D reconstruction of microvessels in the cervical spinal cord a Sham group b 1.2mm strike depth in Injury group c T50 group d T100 group (The number of microvessels decreased significantly in the Injury group. The T50 group showed a decrease in the number of microvessels, but it was better than the Injury group. The decrease was not significant in the T100 group)

管的数量明显减少,T50 组的血管密度也有明显减少(但多于 Injury 组),T100 组的微血管数量减少不明显,但由于各组灌注动物数量较少,无法进行统计学量化分析,各组颈脊髓微血管变化情况未能进行对比分析,将进一步通过微血管免疫组织化学染色分析。

2.4 脊髓血管 CD34 免疫组化染色结果

通过对各组颈脊髓切片组织进行 CD34 免疫组织化学染色分析,结果发现 Injury 组、T50 组和

T100 组在损伤后 12 周时微血管密度分别为 23.50 ± 1.75 、 31.33 ± 1.36 和 33.00 ± 1.27 ,均较假手术组血管密度有明显减少,Injury 组减少程度最为明显,T50 组和 T100 组的血管密度显著高于 Injury 组($P=0.0054$ 和 $P=0.0013$)(图 6)。

2.5 EC 染色结果

各组脊髓组织连续冰冻切片 EC 染色结果显示损伤主要集中于伤侧(左侧),而健侧(右侧)结构相对完整和正常,打击后各组出现伤侧脊髓的

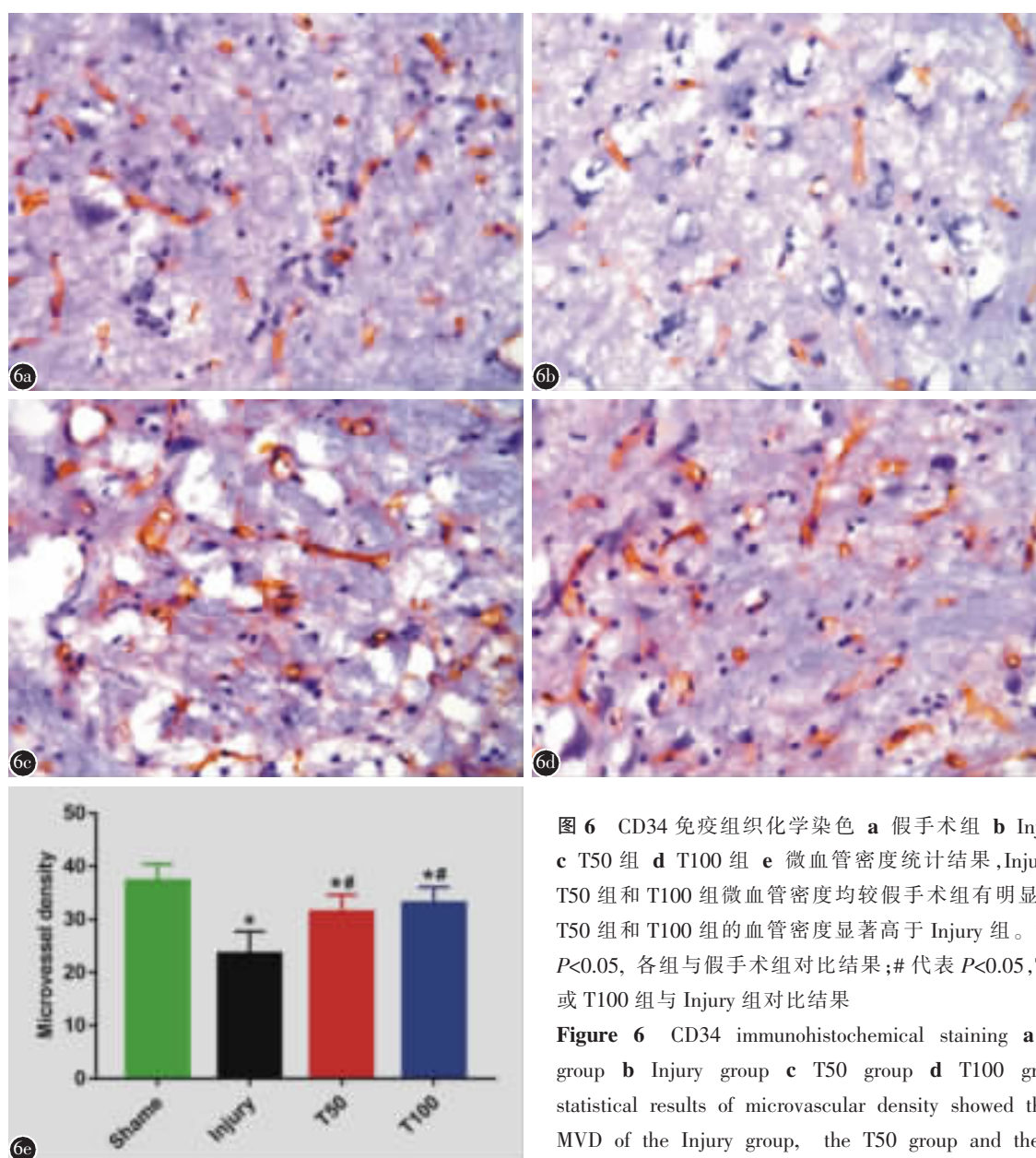


图 6 CD34 免疫组织化学染色 a 假手术组 b Injury 组 c T50 组 d T100 组 e 微血管密度统计结果,Injury 组、T50 组和 T100 组微血管密度均较假手术组有明显减少,T50 组和 T100 组的血管密度显著高于 Injury 组。* 代表 $P<0.05$, 各组与假手术组对比结果;# 代表 $P<0.05$,T50 组或 T100 组与 Injury 组对比结果

Figure 6 CD34 immunohistochemical staining a Sham group b Injury group c T50 group d T100 group e statistical results of microvascular density showed that the MVD of the Injury group, the T50 group and the T100 group were significantly lower than that of the sham

operation group, and the MVD of the T50 group and the T100 group were significantly higher than that of the Injury group. * represents $P<0.05$, and the comparison results between each group and the sham operation group; # represents $P<0.05$, and the comparison result between T50 group or T100 group and Injury group

萎缩、空洞形成、灰质面积减少;切片统计显示 T50 组和 T100 组损伤侧的总面积(包括空洞面积)明显高于 Injury 组;Injury 组损伤中心的空洞面积最大,而 T50 组和 T100 组损伤中心空洞面积显著小于 Injury 组;T50 组和 T100 组损伤侧残余灰质面积均明显多于 Injury 组(图 7)。

3 讨论

本研究通过三羟乙基芦丁以不同剂量(50、

100mg/kg)腹腔注射给药,观察了大鼠颈脊髓损伤后的行为学和组织学等指标变化,本研究发现三羟乙基芦丁可促进颈脊髓损伤大鼠的运动功能恢复,维持微血管密度,具有良好的神经保护作用,可降低脊髓损伤后的萎缩程度,减少空洞面积的大小,保留更多的脊髓灰质结构。

目前脊髓损伤的动物模型有很多种,由 Allen 设计的重物坠落冲击脊髓造成损伤的方法应用最为广泛,该方法操作简单,但是由于重物在坠落冲

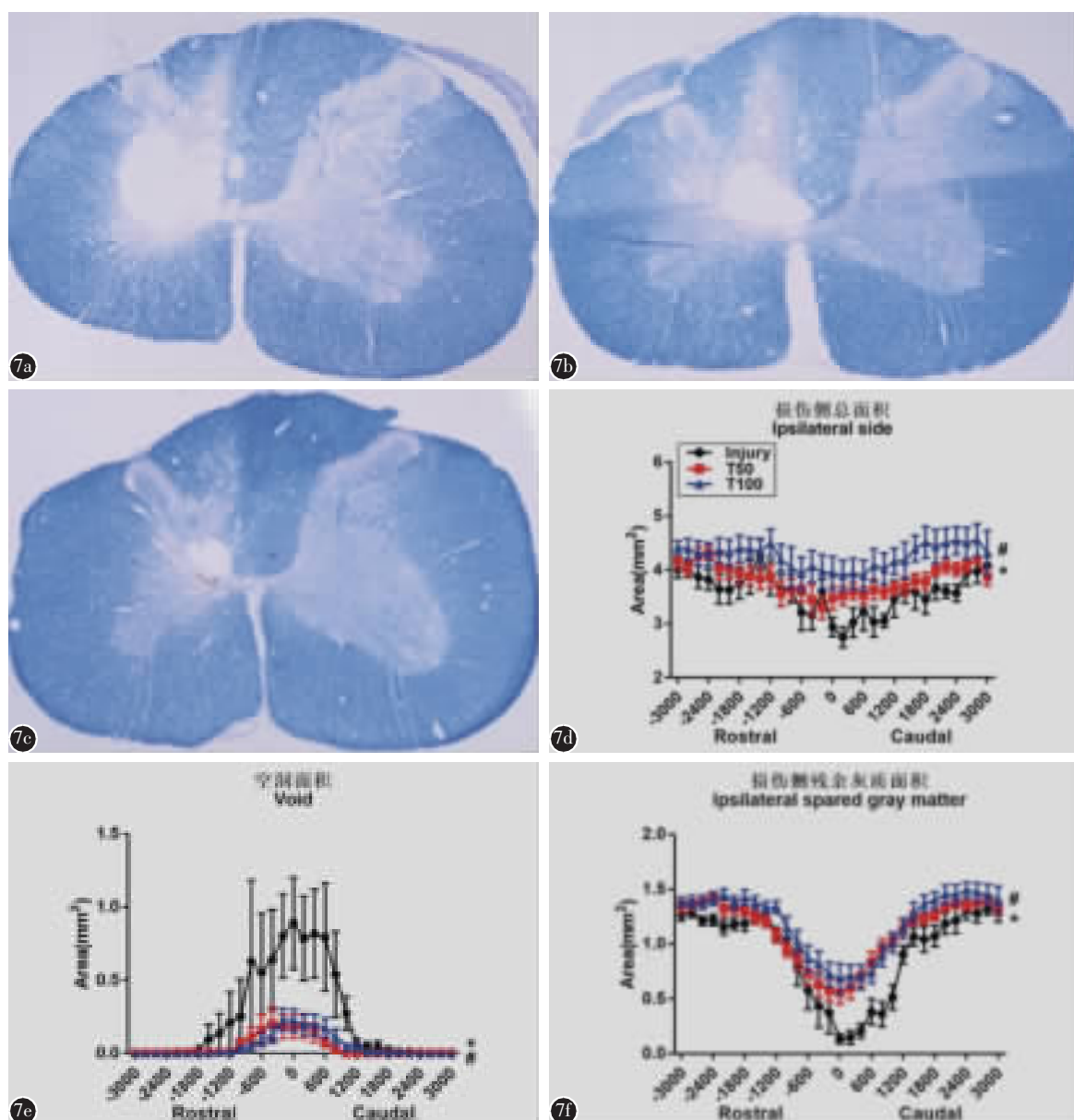


图 7 各组 EC 染色结果 a Injury 组损伤中心 b T50 组损伤中心 c T100 组损伤中心 d 伤侧脊髓面积(包括空洞面积) e 空洞面积 f 损伤侧残余灰质面积

Figure 7 EC staining results a Epicenter of Injury group b Epicenter of T50 group c Epicenter of T100 group d Area (including cavity area) of the injured side e Void area f Residual gray matter area on the injured side

击脊髓后可能由于重物弹跳等现象出现二次损伤,引起脊髓损伤程度不一致,还无法进行精准的打击参数控制和数据信息采集^[20];传统力控制系统和位移控制系统打击器是由电磁装置进行驱动,可大大提高模型损伤程度的一致性^[21],但由于打击头在打击过程中出现轻微的晃动现象,仍存在一定的变异现象。本研究中采用的 Instron E1000 电磁伺服材料试验装置利用线性马达和电磁控制技术,可对打击位移和速度进行准确的程序设定,精准采集打击位移、挫伤速度、打击力等生物力学参数,所有脊髓组织在损伤前均由打击探头给予 0.01N 的预载荷,以提高打击的一致性,Instron E1000 电磁伺服材料试验装置的应用大大提高了脊髓挫伤模型的一致性和精准性。颈脊髓半侧挫伤模型可导致脊髓损伤侧的离散性组织学损伤,损伤主要集中在损伤侧,相较于全脊髓损伤模型,模型动物对半侧损具有更好的耐受性,在导致损伤侧前肢持续性功能缺陷的同时,便于饲养、护理及对比观察^[10-22]。本研究中的大鼠颈脊髓损伤模型采用的实验参数参考既往研究^[10]报道,即 C5 节段脊髓左半侧挫伤,挫伤深度为 1.2mm,挫伤速度为 500mm/s。

芦丁(Rutin),是一种黄酮类化合物,其化学式为 C₂₇H₃₀O₁₆,具有各种有益的生物效应,包括抗氧化,抗炎,降低毛细血管通透性,减少组织出血等作用。Hao 等^[8]于 2016 年研究了芦丁对蛛网膜下腔出血(SAH)大鼠模型的作用,发现芦丁可提高蛛网膜下腔出血大鼠的神经功能评分,降低血脑屏障通透性,减少脑组织水分含量和大脑皮层神经元细胞死亡;在大鼠脑出血和缺血-再灌注损伤模型中,芦丁可减少出血量或降低脑梗死面积,减少短期记忆和运动协调的损伤^[2,5,23,24],可提高大鼠脑出血、脑缺血、脑损伤等损伤模型的行为学评分,具有良好的神经保护作用^[1,2,5,8,23,24]。三羟乙基芦丁是在芦丁分子结构基础上添加了三个羟乙基亲水基团,更加容易被机体吸收利用,显著提高了生物化学作用,关于三羟乙基芦丁对颈脊髓损伤的治疗效果未见报道,我们通过对颈脊髓损伤模型予以三羟乙基芦丁治疗干预,结果发现三羟乙基芦丁可显著提高颈脊髓损伤大鼠的行为学功能评分,治疗组大鼠的前肢运动功能评分、梳理试验评分等结果均明显改善。

完整的血管结构是维持颈脊髓正常功能的重

要基础,脊髓损伤后伴随有明显的血管结构改变,微血管损伤将导致神经功能障碍进一步加重^[25]。了解脊髓微血管事件,包括微循环丧失、血脊髓屏障(BSCB)被破坏、结构组织丢失、内皮细胞(EC)死亡和血管重塑^[26],这些变化具有广泛的影响,因为血管损伤可以增强脊髓损伤后的继发性级联损伤^[27]。鉴于颈脊髓损伤的病理过程与微血管结构破坏密切相关^[28],通过评估微血管的变化情况可间接衡量治疗策略的效果,我们采用血管灌注和三维重建可视化技术观察了三羟乙基芦丁治疗大鼠颈脊髓损伤后的微血管形态改变,但是由于动物数量过少,无法进行量化统计分析,我们进一步通过微血管 CD34 免疫组织化学染色方法,证实了三羟乙基芦丁可维持脊髓损伤后的微血管密度。

三羟乙基芦丁对脊髓损伤具有良好的神经保护作用,通过脊髓组织连续冰冻切片 EC 染色,发现在损伤中心头、尾端 1800 μ m 左右逐渐出现脊髓组织结构形态破坏,而在治疗组中损伤侧的总面积和残余灰质面积显著大于损伤组,降低了脊髓损伤后的萎缩程度,保留更多的脊髓灰质结构,而治疗组中脊髓组织空洞面积显著小于损伤组,减轻了脊髓组织破坏和空洞形成。

综上所述,三羟乙基芦丁可改善颈脊髓损伤大鼠的神经功能,维持微血管密度,减轻脊髓结构破坏,但由于本研究中三羟乙基芦丁对脊髓损伤的神经保护作用仅停留在动物实验水平,具有一定的局限性,其具体分子机制尚待进一步研究和阐明。

4 参考文献

1. Zhai X, Ding Y, Wang Q, et al. Rutin acid ameliorates neural apoptosis induced by traumatic brain injury via mitochondrial pathways in mice[J]. Neuroimmunomodulat, 2016, 23(3): 179-187.
2. Liu H, Zhong L, Zhang Y, et al. Rutin attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury in ovariectomized rats via estrogen-receptor-mediated BDNF-TrkB and NGF-TrkA signaling [J]. Biochem Cell Biol, 2018, 96(5): 672-681.
3. Abdel-Aleem GA, Khaleel EF. Rutin hydrate ameliorates cadmium chloride-induced spatial memory loss and neural apoptosis in rats by enhancing levels of acetylcholine, inhibiting JNK and ERK1/2 activation and activating mTOR signalling [J]. Arch Physiol Biochem, 2018, 124(4): 367-377.
4. Zhu L, Chen J, Tan J, et al. Flavonoids from agrimonia pi

- losa ledeb: free radical scavenging and dna oxidative damage protection activities and analysis of bioactivity-structure relationship based on molecular and electronic structures [J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 195.
5. Li W, Li DY, Zhao SM, et al. Rutin attenuates isoflurane-induced neuroapoptosis via modulating JNK and p38 MAPK pathways in the hippocampi of neonatal rats [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(5): 2056-2064.
 6. Elmazoglu Z, Ergin V, Sahin E, et al. Oleuropein and rutin protect against 6-OHDA-induced neurotoxicity in PC12 cells through modulation of mitochondrial function and unfolded protein response[J]. *Interd Toxicol*, 2017, 10(4): 129-141.
 7. Sharma S, Narang JK, Ali J, et al. Synergistic antioxidant action of vitamin E and rutin SNEDDS in ameliorating oxidative stress in a Parkinson's disease model[J]. *Nanotechnol*, 2016, 27(37): 375101.
 8. Hao G, Dong Y, Huo R, et al. Rutin inhibits neuroinflammation and provides neuroprotection in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage, possibly through suppressing the RAGE-NF- κ B inflammatory signaling pathway [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(6): 1496-1504.
 9. 余芳. 曲克芦丁在大鼠体内和体外的代谢研究[D]. 安徽医科大学, 2014.
 10. 李榕, 黄祖成, 黄志平, 等. 控制挫伤深度建立大鼠颈脊髓半侧挫伤模型[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2017, 27(10): 930-937.
 11. Walker MJ, Walker CL, Zhang YP, et al. A novel vertebral stabilization method for producing contusive spinal cord injury[J]. *J Vis Exp*, 2015, 95: e50149.
 12. Singh A, Krisa L, Frederick KL, et al. Forelimb locomotor rating scale for behavioral assessment of recovery after unilateral cervical spinal cord injury in rats [J]. *J Neurosci Methods*, 2014, 226: 124-131.
 13. Irvine KA, Ferguson AR, Mitchell KD, et al. The irvine, beatties, and bresnahan (IBB) forelimb recovery scale: an assessment of reliability and validity [J]. *Front Neurol*, 2014, 116(5): 1-19.
 14. Gensel JC, Tovar CA, Hamers FP, et al. Behavioral and histological characterization of unilateral cervical spinal cord contusion injury in rats[J]. *J Neurotraum*, 2006, 23(1): 36-54.
 15. Liu Y, Liu Q, Yang Z, et al. Comparison of three-dimensional micro-CT angiography of cervical spinal cord between two contrast agents[J]. *Contrast Media Mol I*, 2019, 2019: 5215923-5215928.
 16. Liu Y, Liu Q, Li R, et al. Three-dimensional changes in cervical spinal cord microvasculature during the chronic phase of hemicontusion spinal cord injury in rats[J]. *World Neurosurg*, 2019, 126: e385-e391.
 17. Zhao BB, Long QH, Wang CY, et al. Protective effects of liu wei di huang wan on the liver, orbitofrontal cortex nissl bodies, and neurites in MSG+PH-Induced Liver Regeneration Rat Model [J]. *Evid Compl Alt*, 2018, 2018: 9090128-9090137.
 18. Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, et al. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury[J]. *Neuropharmacology*, 2000, 39(5): 777-787.
 19. Weidner N. Angiogenesis in breast cancer[J]. *Cancer Treat Res*, 1996, 83: 265-301.
 20. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection [J]. *Exp Neurol*, 1996, 139(2): 244-256.
 21. Sjøvold SG, Mattucci SF, Choo AM, et al. Histological effects of residual compression sustained for 60 minutes at different depths in a novel rat spinal cord injury contusion model[J]. *J Neurotraum*, 2013, 30(15): 1374-1384.
 22. Lee JH, Streijger F, Tigheelaar S, et al. A contusive model of unilateral cervical spinal cord injury using the infinite horizon impactor[J]. *J Vis Exp*, 2012, 3313(65): 1-7.
 23. Jang JW, Lee JK, Hur H, et al. Rutin improves functional outcome via reducing the elevated matrix metalloproteinase-9 level in a photothrombotic focal ischemic model of rats[J]. *J Neurol Sci*, 2014, 339(1-2): 75-80.
 24. Khan MM, Ahmad A, Ishrat T, et al. Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats[J]. *Brain Res*, 2009, 1292: 123-135.
 25. Melissano G, Bertoglio L, Rinaldi E, et al. An anatomical review of spinal cord blood supply [J]. *J Cardiovasc Surg*, 2015, 56(5): 699-706.
 26. Dong X, You Y, Wu JQ. Building an RNA sequencing transcriptome of the central nervous system [J]. *Neuroscientist*, 2016, 22(6): 579-592.
 27. Figley SA, Khosravi R, Legasto JM, et al. Characterization of vascular disruption and blood-spinal cord barrier permeability following traumatic spinal cord injury [J]. *J Neurotraum*, 2014, 31(6): 541-552.
 28. Wu T, Cao Y, Ni S, et al. Morphometric analysis of rat spinal cord angioarchitecture by phase contrast radiography from 2d to 3d visualization[J]. *Spine*, 2018, 43(9): E504-E511.

(收稿日期:2019-09-22 修回日期:2019-12-28)

(英文编审 谭 啸)

(本文编辑 彭向峰)