论著

文章编号:1000-5404(2010)08-0814-05

维生素C与小剂量激素联用对急性脊髓缺血再灌注损伤的保护作用

刘志恒,禹晓东,王海强,王 哲,罗卓荆 (710032 西安,第四军医大学全军骨科研究所)

[摘要] 目的 探讨小剂量甲基强的松龙(methylprednisolone,MP)与维生素C(vitamin C,Vc)联用对兔急性脊髓缺血再灌注损伤模型的保护作用。**方法** 成年新西兰白兔144只,平均分为6组:阴性对照组(A组)、缺血再灌注组(B组)、小剂量MP组(C组)、Vc组(D组)、大剂量MP组(E组)、MP+Vc组(F组),每组24只。夹闭腹主动脉25 min后,移除动脉夹,造成缺血再灌注模型,随即给予相应的处理。于再灌注30 min、6、12、24、48 h每组各取4只动物,检测丙二醛(malondialdehyde,MDA)、过氧化氢酶(catalase,CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、谷胱甘肽过氧物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)表达水平;每组取4只动物于麻醉清醒即刻,再灌注24、48 h按Tarlov评分系统行后肢运动功能评分,并于48 h评分完毕后取材行HE染色及TUNEL凋亡染色。**结果** A、E、F组MDA、CAT、SOD、GSH-Px于再灌注30 min、6、12、24 h表达水平明显低于B、C、D组($P<0.05$),且A、E、F 3组间无明显差异($P>0.05$);再灌注48 h Tarlov评分结果提示E(3.25±0.43)、F(3.50±0.50)组明显优于B(2.00±0.71)、C(2.50±0.50)、D(2.50±0.50)组;HE染色及TUNEL凋亡染色观察E组(29.68±4.57)%与F组(30.50±4.40)%损伤程度及细胞凋亡指数相当,均明显低于其他组。**结论** 小剂量MP与Vc联合应用对急性脊髓缺血再灌注有明显的保护作用,且效果与大剂量MP相当,避免大剂量激素应用发生并发症的风险。

[关键词] 脊髓损伤;缺血再灌注损伤;甲基强的松龙;维生素C

[中图法分类号] R744.105;R977.1;R977.23 **[文献标志码]** A

Protective effect of methylprednisolone combined with ascorbic acid on acute spinal cord I/R injury in rabbits

Liu Zhiheng, Yu Xiaodong, Wang Haiqiang, Wang Zhe, Luo Zhuojing (Institute of Orthopaedics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710032, China)

[Abstract] Objective To investigate the protection of combined application of low dose methylprednisolone (MP) and ascorbic acid in ischemia-reperfusion (I/R) injury of spinal cord model. **Methods** Spinal cord ischemia model was induced by clamping the infrarenal aortic for 25 min. A total of 144 New Zealand white rabbits were randomized as follows: group A (negative control group), group B (I/R group), group C (low-dose MP treatment group, 5.4 mg/kg, i.v.), group D (Vc treatment group, 200 mg/kg, i.v.), group E (high-dose MP treatment group, 30 mg/kg, i.v.), and group F (MP+Vc treatment group, MP 5.4 mg/kg + Vc 200 mg/kg, i.v.). Then the animals of every group were reperfused for 0 and 30 min, and 6, 12, 24 and 48 h respectively ($n=4$ for each time point). Neurological function was assessed at 24 and 48-hour reperfusion was evaluated with Tarlov scoring system. The contents of MDA, SOD, CAT and GDH-Px in the spinal cord were detected at different time point. H&E and TUNEL staining were used to observe the spinal cord section in 48 h after reperfusion for pathological changes and cell apoptosis. **Results** MDA, SOD, CAT and GDH-Px levels in group A, E and F at different time were significantly decreased. but there was no significant difference among them. Tarlov scores of group E and F showed a significant increase compared with those of group C and D. H&E and TUNEL staining indicated that group E and F had similar injury degree during I/R compared with group B, C and D. **Conclusion** The co-application of low dose MP and ascorbic acid exerts similar therapeutic effect on spinal cord ischemia-reperfusion injury compared with large dose MP.

[Key words] spinal cord injury; ischemia-reperfusion; methylprednisolone; ascorbic acid

Corresponding author: Luo Zhuojing, Tel: 86-29-84775285, E-mail: zjluo@fmmu.edu.cn

脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)分为原发性损伤和继发性损伤。原发性损伤发生在损伤即刻,以原始致伤因素导致细胞直接死亡为主,损伤程度不可控;而继发性损伤则在损伤后持续存在,48 h内最为严重,以细胞及分子水平的反应性调控诱导细胞凋亡为主,损伤程度具有部分可控性[1-3]。SCI后损伤局部出现广泛的脂质过氧化反应并产生大量氧自由基,是

[通信作者] 罗卓荆,电话:(029)84775285,E-mail:zjluo@fmmu.edu.cn

继发性损伤中导致神经元凋亡的主要原因[4,5]。研究证实,继发性损伤过程中,受伤脊髓局部由缺血再灌注(ischemia/reperfusion,I/R)引发的脂质过氧化反应的强度,可作为脊髓继发性损伤程度最重要的评价指标之一[6-8]。

甲基强的松龙(methylprednisolone,MP)已广泛应用于SCI的治疗,其作用包括多方面多层次的机制[9]。维生素C(vitamin C,Vc)作为经典的抗氧化药,近年在SCI的治疗中日益受到重视。本实验应用兔脊髓急性I/R损伤模型,观察甲基强的松龙与维生素C联用对I/R后脂质过氧化反应的影响,探讨其对SCI后继发性损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

成年新西兰白兔144只(由第四军医大学实验动物中心提供),雌雄不限,体质量2.5~3.5 kg。编号平均分为6组:阴性对照组(A组)、缺血再灌注组(B组)、小剂量MP组(C组)、Vc组(D组)、大剂量MP组(E组)、MP+Vc组(F组),每组24只。

1.2 模型制作

1.2.1 麻醉与监测 氯氨酮20 mg/kg、咪唑安定0.4 mg/kg、阿托品0.06 mg/kg肌注行基础麻醉后,监测心电图、氧饱和度,于左耳缘静脉穿刺建立静脉通道。咪唑安定诱导,明视下气管插管,定压模式控制呼吸。于耳中央动脉穿刺监测平均动脉压。咪唑安定、芬太尼、维库溴铵维持麻醉。输液基础速度为10 ml/(kg·h),以生理盐水及平衡盐为主,根据具体情况适当调整输液速度,维持容量稳定。

1.2.2 手术操作[10] 左腹股沟区备皮,常规消毒铺巾。于股动脉搏动最强点上方行长4 cm的纵行切口,切开皮肤及皮下组织,暴露并游离1 cm的股动脉,将远端结扎,近端暂时阻断,以眼科剪纵行剪开一小口,置入长25 cm的导管,直至腹主动脉分出左肾动脉远端1.5 cm处,固定导管,尾端接传感器测压。

腹正中切口,自剑突下3 cm至耻骨联合上6 cm,逐层切开腹壁各层入腹,将肠管轻柔推向右侧,并予生理盐水浸润的温纱垫覆盖,暴露并游离左肾动脉及其下约1.5 cm长的腹主动脉,静脉给予1 mg/kg肝素5 min后,于左肾动脉开口下1.0 cm处钳夹阻断腹主动脉25 min,夹闭位置约位于L_3椎体水平处。夹闭结束后移除动脉夹,肉眼可见血管充盈。检查腹腔无渗血,予甲硝唑10 ml及庆大霉素8万U冲洗腹腔,逐层关腹。

1.2.3 给药方案 B组在动脉夹移除后,立即给予20 ml生理盐水静滴;C组在动脉夹移除后,立即按照MP(美国辉瑞公司)5.4 mg/kg,加入20 ml生理盐水静滴;D组在动脉夹移除后,立即按照Vc 200 mg/kg,加入20 ml生理盐水静滴;E组在动脉夹移除后,立即按照MP 30 mg/kg加入20 ml生理盐水静滴;F组在动脉夹移除后,立即按照MP 5.4 mg/kg+Vc 200 mg/kg,加入20 ml生理盐水静滴。A组仅暴露腹主动脉并静脉给予肝素液,并不夹闭动脉,暴露25 min后立即给予20 ml生理盐水静滴。上述给药均在15 min内静滴完毕。

动物苏醒后继续饲养,自由进食,同时于麻醉清醒即刻、再灌注24、48 h按Tarlov评分系统行后肢运动功能评分。

1.3 标本取材和准备

以松开动脉夹时间为再灌注0 h。分别于再灌注30 min、6、12、24、48 h,每组各取4只动物,耳缘静脉内注入空气10 ml处死,立即用生理盐水经左心尖灌注,迅速取下L_4~S_1节段脊髓,等分成4份,匀浆后检测丙二醛(malondialdehyde,MDA)、过氧化氢酶(catalase,CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、谷胱甘肽过氧物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)表达水平。

再灌注48 h后肢运动功能评分后,剩余动物耳缘静脉内注入空气10 ml处死,并立即用生理盐水经左心尖灌注,迅速取下L_4~S_1节段脊髓,行HE及TUNEL凋亡染色。

1.4 观察指标与方法

1.4.1 后肢神经功能评分 改良Tarlov评分标准[11]分级如下:0分,后肢无活动,不能负重;1分,后肢可见活动但不能负重;2分,后肢活动频繁或有力,不能负重;3分,后肢可支持体质量,能走1~2步;4分,可行走,仅有轻度障碍;5分,行走正常。

1.4.2 MDA、SOD、CAT及GSH-Px的检测 MDA(STA-332)试剂盒购自美国Cell Biolabs公司,SOD(#K335-100)试剂盒购自美国Biovision公司,CAT(STA-341)试剂盒购自美国Cell Biolabs公司,GSH-Px(GMS70044)试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司。将取出的脊髓组织匀浆,按说明书处理后,采用硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid,TBA)法测定MDA含量;黄嘌呤氧化酶法测定SOD含量;采用Luck(1963)所描述的方法测定CAT活性;并根据Lawrence和Burk(1976)的方法测定GSH-Px的活性。

1.4.3 HE染色 于再灌注48 h时处死动物,取腰段脊髓组织浸泡在4%多聚甲醛中固定14 d,随后石蜡包埋切片,行HE染色后光学显微镜下观察。

1.4.4 TUNEL凋亡染色 TUNEL试剂盒购自武汉博士德公司。取出的脊髓组织浸泡在4%多聚甲醛中固定14 d,石蜡包埋切片,按说明书操作,封片后荧光显微镜下观察,测定凋亡指数(apoptosis index,AI)。阳性判定标准:细胞显示绿色荧光为凋亡细胞。每张TUNEL染色切片随机选择5个200倍视野,分别数细胞总数和阳性细胞数,采用阳性细胞数占细胞总数的百分比作为细胞凋亡指数。

1.5 统计学处理

结果以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 12.0统计软件进行多样本间方差分析。

2 结果

2.1 后肢神经功能评分

再灌注后24、48 h后肢神经功能评分显示:与A组相比,其余各组神经功能评分均明显降低;E、F组神经功能评分明显高于B、C、D组($P<0.05$),且E、F组间比较无明显差异($P>0.05$)。见表1。

2.2 MDA、SOD、CAT及GSH-Px表达水平

与B组相比,A、C、D、E、F组MDA、SOD、CAT及GSH-Px表达水平在再灌注后30 min、6、12、24 h均明显降低,且A、E、F 3组间无明显统计学差异($P>0.05$);A、E、F组较C、D组相比,有统计学差异($P<0.05$)。而在再灌注48 h时,各组MDA、SOD、CAT及GSH-Px表达水平无明显统计学差异($P>0.05$)。见表2。

表1 各组后肢神经功能 Tarlov 评分结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	苏醒后	24 h	48 h
缺血再灌注组(B)	2.50 ±0.50	1.50 ±0.50[a]	2.00 ±0.71[a]
小剂量 MP 组(C)	2.50 ±0.50	2.00 ±0.71[a]	2.50 ±0.50[a]
Vc 组(D)	2.75 ±0.43	1.50 ±0.50[a]	2.50 ±0.50[a]
大剂量 MP 组(E)	2.75 ±0.43	3.25 ±0.43[ab]	3.25 ±0.43[ab]
MP + Vc 组(F)	2.50 ±0.50	3.00 ±0.00[ab]	3.50 ±0.50[ab]

阴性对照组(A)Tarlov 评分各时相点均为 5 分 a:$P<0.05$,与阴性对照组比较;b:$P<0.05$,分别与缺血再灌注组、小剂量 MP 组、Vc 组比较

2.3 HE 染色

A 组 HE 染色切片可见正常脊髓组织。B 组可见散在出血灶,脊髓组织疏松,空隙内有红细胞渗出,可见空泡样变,脱髓鞘样改变,神经元细胞核及胞体皱缩、破裂,小血栓形成。C、D 组损伤程度介于 B 组与 E、F 组之间。E、F 组虽均有少量出血灶及空泡样变,部分神经元细胞核及胞体皱缩、破裂,但程度较 B 组明显减轻(图 1)。

2.4 TUNEL 凋亡染色

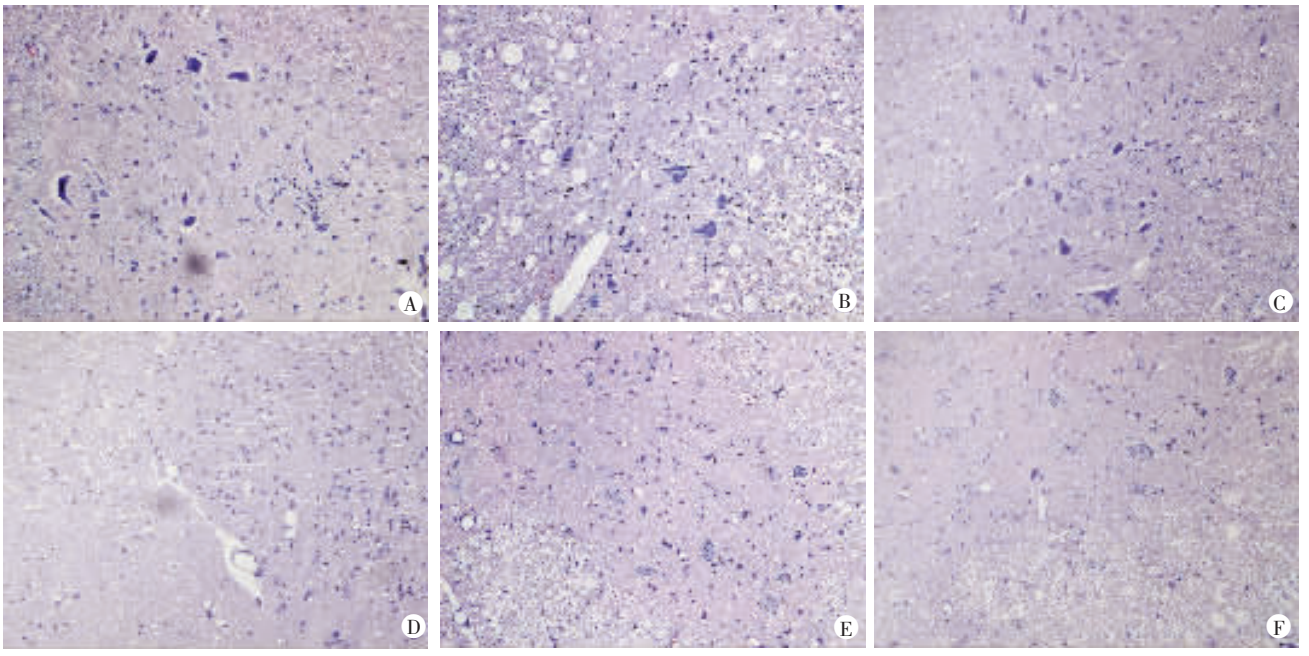
A 组 TUNEL 凋亡染色后可见绝大多为正常细胞,有极少量 TUNEL 阳性细胞。其余各组均可检测到 TUNEL 阳性细胞,广泛分布于灰质和白质内,但 C(41.33 ±5.14)%、D(39.82 ±4.62)%、E(29.68 ±4.57)%、F(30.50 ±4.40)% 组凋亡指数明显低于 B 组(47.79 ±4.95)%;且 E、F 组与 C、D 组相比,凋亡指数也明显降低($P<0.05$),而 E、F 组间无统计学差异($P>0.05$)。见图 2。

表2 各组不同时间点 MDA、SOD、CAT 及 GSH-Px 检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MDA (nmol/g)					SOD (μmol/mg)				
	30 min	6 h	12 h	24 h	48 h	30 min	6 h	12 h	24 h	48 h
阴性对照组(A)	169.52 ±19.26[ab]	172.43 ±13.58[ab]	170.93 ±11.15[ab]	174.58 ±9.36[ab]	175.70 ±10.15	11.84 ±2.54[ab]	10.22 ±1.45[ab]	11.70 ±1.37[ab]	11.19 ±1.68[a]	12.06 ±1.77
缺血再灌注组(B)	331.61 ±17.39	617.29 ±31.19	549.88 ±33.83	368.79 ±20.53	174.08 ±7.64	19.62 ±2.65	24.86 ±4.73	19.09 ±4.52	17.95 ±3.47	11.74 ±2.38
小剂量 MP 组(C)	236.27 ±23.74[a]	325.82 ±21.08[a]	288.57 ±28.60[a]	227.31 ±25.58[a]	180.45 ±9.59	14.27 ±2.89[a]	15.93 ±3.65[a]	13.76 ±2.46[a]	11.74 ±2.67[a]	11.52 ±2.03
Vc 组(D)	219.31 ±18.52[a]	310.73 ±23.48[a]	246.20 ±21.28[a]	195.02 ±17.79[a]	178.35 ±8.76	14.40 ±3.55[a]	15.25 ±4.63[a]	13.62 ±3.84[a]	12.48 ±2.51[a]	11.07 ±2.83
大剂量 MP 组(E)	177.39 ±24.65[ab]	190.57 ±22.44[ab]	182.60 ±15.37[ab]	180.43 ±16.46[ab]	176.32 ±7.92	12.11 ±3.72[ab]	13.98 ±4.57[ab]	10.21 ±2.44[ab]	11.62 ±2.53[ab]	10.96 ±3.14
MP + Vc 组(F)	175.37 ±14.73[ab]	192.63 ±13.01[ab]	187.66 ±13.19[ab]	169.48 ±25.32[ab]	172.85 ±9.52	11.96 ±3.55[ab]	12.56 ±5.32[ab]	12.15 ±3.74[ab]	10.24 ±3.36[ab]	11.33 ±2.97[ab]

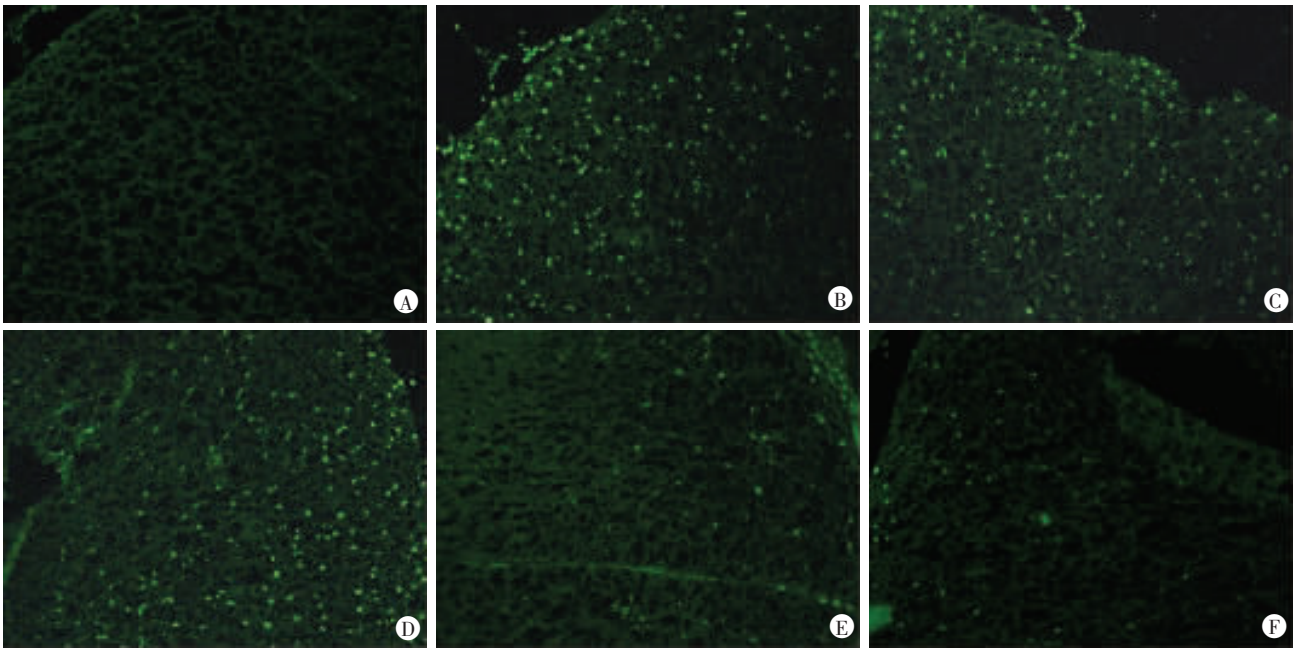
组别	CAT (μmol/mg)					GSH-Px (μmol/mg)				
	30 min	6 h	12 h	24 h	48 h	30 min	6 h	12 h	24 h	48 h
阴性对照组(A)	80.84 ±7.54[ab]	81.03 ±5.17[ab]	86.32 ±5.2[ab]	83.49 ±4.69[ab]	82.65 ±5.11	1.47 ±0.21[ab]	1.39 ±0.18[ab]	1.32 ±0.10[ab]	1.35 ±0.33[ab]	1.33 ±0.45
缺血再灌注组(B)	111.27 ±13.07	120.60 ±17.46	109.58 ±15.38	115.70 ±20.01	80.03 ±11.23	2.90 ±0.53	3.34 ±1.07	3.32 ±0.94	2.05 ±0.90	1.37 ±0.71
小剂量 MP 组(C)	103.56 ±7.37[a]	110.74 ±11.20[a]	96.32 ±10.45[a]	90.40 ±9.63[a]	82.81 ±6.79	2.37 ±0.28[a]	2.66 ±0.41[a]	2.19 ±0.35[a]	1.76 ±0.24[a]	1.43 ±0.36
Vc 组(D)	100.45 ±9.64[a]	112.77 ±8.39[a]	94.26 ±6.57[a]	87.91 ±8.33[a]	81.63 ±10.66	2.14 ±0.21[a]	2.35 ±0.16[a]	1.97 ±0.32[a]	1.63 ±0.20[a]	1.38 ±0.23
大剂量 MP 组(E)	86.94 ±4.92[ab]	90.15 ±10.23[ab]	81.81 ±7.76[ab]	82.05 ±11.18[ab]	83.39 ±7.55	1.57 ±0.43[ab]	1.89 ±0.53[ab]	1.22 ±0.66[ab]	1.44 ±0.09[ab]	1.40 ±0.79
MP + Vc 组(F)	79.60 ±13.15[ab]	94.94 ±11.35[ab]	88.72 ±9.97[ab]	85.62 ±11.78[ab]	81.71 ±10.03	1.44 ±0.19[ab]	2.07 ±0.88[ab]	1.16 ±0.40[ab]	1.51 ±0.29[ab]	1.35 ±0.62

a:$P<0.05$,与缺血再灌注组比较; b:$P<0.05$,分别与小剂量 MP 组、Vc 组比较



A:阴性对照组;B:缺血再灌注组;C:小剂量 MP 组;D:Vc 组;E:大剂量 MP 组;F:MP + Vc 组

图1 各组脊髓病理组织学观察 (HE ×100)



A:阴性对照组;B:缺血再灌注组;C:小剂量MP组;D:Vc组;E:大剂量MP组;F:MP+Vc组

图2 各组脊髓凋亡观察 (TUNEL ×100)

3 讨论

SCI一直是困扰医学界的一大难题,临床常见到SCI在解剖上并非完全横断,伤情并不严重,减压后症状有所缓解,但在伤后2~48 h内发展为"二次瘫痪"[12]。研究表明,SCI后动物双后肢出现二次瘫痪与脊髓组织延迟性低灌流密切相关[13],因而提出了脊髓存在着I/R损伤。脊髓损伤病理学研究发现,单纯缺血30 min脊髓组织就已有明显的病理改变,说明缺血缺氧本身就可造成脊髓原发性损伤;而在恢复血供的条件下再灌注,其病理改变会更加严重,证实了脊髓I/R损伤的存在[14]。脊髓I/R损伤后,毛细血管间隙增宽,神经元、神经胶质细胞水肿,血-脊髓屏障开放即微血管内皮通透性增高,导致神经元及神经胶质细胞大量凋亡。本实验各组后肢运动功能评分证实了脊髓再灌注可造成脊髓损伤的加重。

MP作为推荐治疗SCI的药物,通过抑制脂质过氧化、钙内流和抗炎作用来达到对神经系统的保护作用[15]。但是大剂量MP的使用会导致患者感染的风险增加,临床研究证实,采用大剂量MP冲击治疗的患者,患呼吸系统疾病和消化系统疾病的概率大大增加,患败血症的风险增加[16-18]。其他的回顾性研究还发现,MP使用后,患者患感染性疾病、一过性血糖增高及肌病的风险增加[19],而且对患者的护理要求增高,加重患者的经济负担。维生素C是一种重要的抗氧化剂,它能够清除氧自由基,在抗氧化反应中起着重要的作用[20]。以往的研究发现,给脊髓损伤动物注入维生素C可以减轻脊髓组织的炎性反应[21];大剂量应用维生素C对脊髓损伤有保护作用,但其效果不如大剂量应用激素[22]。

本实验中,我们在E组应用北美脊柱学会推荐的冲击用MP剂量(30 mg/kg);Vc用量参考廖经武等[22]研究的剂量。通过动物后肢神经功能评分发现,B组(缺血再灌注组)、E组(大剂量MP组)、F组(MP+Vc组)动物神经功能较A组(阴性对照组)均有不同程度下降;E、F 2组神经功能评分要明显高于B、C、D组。这说明无论大剂量MP或是小剂量MP+Vc均对I/R损伤有一定的保护作用;而E、F组与C、D组相比评分要高,说明E、F组较单纯使用Vc或小剂量MP效果要好;同时,E、F 2组间相比,其对神经功能的保护作用无明显差异。

脊髓组织中脂类丰富,含有大量不饱和脂肪酸,对氧化攻击敏感。自由基极易使多聚不饱和脂肪酸产生脂质过氧化反应。Basu等[23]发现,无论是氧自由基还是环氧化酶介导的氧化作用,在缺血时即刻发生。Peasley等[24]研究表明,氧自由基和脂质过氧化在SCI引起的细胞破坏和功能减退中起重要作用。MDA为脂质过氧化终产物,在体外可影响线粒体呼吸链复合物及线粒体内关键酶活性,MDA水平的升高可反应脊髓I/R损伤的程度,主要是由损伤后膜的崩解引起[25]。SOD可催化自由基歧化为过氧化氢与氧气,能抵御自由基对细胞的破坏,保持细胞膜的完整性;CAT可以清除代谢过程中产生的H_2O_2,在脊髓组织中,其活性甚至明显高于SOD活性[26];GSH-Px被认为是脑组织中清除过氧化物的最主要的酶,可减少反应中羟基的产生[27]。因此,我们在本实验中采取测定组织局

部MDA表达水平以判断局部脂质过氧化反应程度，而测定SOD、CAT、GSH-Px表达水平则可反映氧自由基清除能力的高低。

本研究结果显示，再灌注后30 min后，B组MDA的表达水平即明显上调。至再灌注后6 h达到最高峰，此后逐渐下降，至再灌注后48 h基本恢复正常水平。这说明SCI后的脂质过氧化反应主要发生于再灌注后48 h内。而SOD、CAT、GSH-Px等抗氧化酶的表达水平同时上调，应为CNS启动的自身防御机制。E、F 2组MDA表达水平在各时间点与缺血再灌注组相比均明显降低，与阴性对照组相比无明显差异，较C、D组也明显降低，且E、F 2组间比较亦无明显区别。说明无论单独使用大剂量MP或应用小剂量MP + Vc均可以有效抑制脂质过氧化反应，且2组效果相当。

HE染色及TUNEL凋亡染色同样在组织病理学上证明了联合使用小剂量MP + Vc可以达到与大剂量MP使用后相同的保护效果，且比单纯应用小剂量MP或Vc效果要好。

综上所述，联合使用小剂量MP + Vc可以达到与大剂量MP相近的保护效果，并可避免大剂量MP使用后发生一系列并发症的高风险，且Vc价格低廉，不会增加患者的经济负担，这为SCI的临床治疗提供了更安全经济的选择。

参考文献：

[1] Bracken M B, Holford T R. Effects of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2[J]. J Neurosurg, 1993, 79(4): 500 - 507.

[2] Nockels R, Young W. Pharmacologic strategies in the treatment of experimental spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 1992, 9(Suppl 1): S211 - S217.

[3] 姜树东，王彦辉，李想，等. 甲基强的松龙对大鼠脊髓损伤后神经细胞凋亡的影响及其机理[J]. 中国脊柱脊髓杂志 2006, 16(增刊): 53 - 57.

[4] Fujimoto T, Nakamura T, Ikeda T, *et al*. Potent protective effects of melatonin on experimental spinal cord injury[J]. Spine, 2000, 25(7): 769 - 775.

[5] Johnson S H, Kraimer J M, Graeber G M. Effects of flunarizine on neurological recovery and spinal cord blood flow in experimental spinal cord ischemia in rabbits[J]. Stroke, 1993, 24(10): 1547 - 1553.

[6] Peker S, Abacioglu U, Sun I, *et al*. Prophylactic effects of magnesium and vitamin E in rat spinal cord radiation damage: evaluation based on lipid peroxidation levels[J]. Life Sci, 2004, 75(12): 1523 - 1530.

[7] Katircioglu S F, Kucukaksu D S, Kuplulu S, *et al*. Effects of prostacyclin on spinal cord ischemia: an experimental study[J]. Surgery, 1993, 114(1): 36 - 39.

[8] Hosseinzadeh H, Parvardeh S, Asl M N, *et al*. Effect of thymoquinone and Nigella sativa seeds oil on lipid peroxidation level during global cerebral ischemia-reperfusion injury in rat hippocampus[J]. Phytomedicine, 2007, 14(9): 621 - 627.

[9] Fehlings M G, Baptiste D C. Current status of clinical trials for acute spinal cord injury[J]. Injury, 2005, 36 Suppl 2: S113 - S122.

[10] Erten S F, Kocak A, Ozdemir I, *et al*. Protective effect of melatonin on experimental spinal cord ischemia[J]. Spinal Cord, 2003, 41(10): 533 - 538.

[11] Cheng H, Cao Y, Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function[J]. Science, 1996, 273(5274): 510 - 513.

[12] Stevens S L, Caputo J L, Fuller D K, *et al*. Physical activity and quality of life in adults with spinal cord injury[J]. J Spinal Cord Med, 2008, 31(4): 373 - 378.

[13] Lang-Lazdunski L, Heurteaux C, Mignon A, *et al*. Ischemic spinal cord injury induced by aortic cross-clamping: prevention by riluzole[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2000, 18(2): 174 - 181.

[14] 陈钢，梁群，陈安民，等. 二甲胺四环素对大鼠脊髓损伤后caspase-3、p53表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 17(9): 1768 - 1771.

[15] Christie S D, Comeau B, Myers T, *et al*. Duration of lipid peroxidation after acute spinal cord injury in rats and the effect of methylprednisolone[J]. Neurosurg Focus, 2008, 25(5): E5.

[16] Pointillart V, Petitjean M E, Wiart L, *et al*. Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase[J]. Spinal Cord, 2000, 38(2): 71 - 76.

[17] Tsutsumi A, Ueta T, Shiba K, *et al*. Effects of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study of high-dose methylprednisolone therapy on acute cervical spinal cord injury-results in spinal injuries center[J]. Spine, 2006, 31(26): 2992 - 2997.

[18] Suberviola B, Gonzalez-Castro A, Llorca J, *et al*. Early complications of high-dose methylprednisolone in acute spinal cord injury patients[J]. Injury, 2008, 39(7): 748 - 752.

[19] Tator C H. Review of treatment trials in human spinal cord injury: issues, difficulties, and recommendations[J]. Neurosurgery, 2006, 59(5): 957 - 987.

[20] Clemens J A. Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants[J]. Free Radic Biol Med, 2000, 28(10): 1526 - 1531.

[21] Cristante A F, Barros-Filho T E, Oliveira R P, *et al*. Antioxidative therapy in contusion spinal cord injury[J]. Spinal Cord, 2009, 47(6): 458 - 463.

[22] 廖经武，宋跃明. 大剂量维生素C治疗大鼠急性脊髓损伤初步研究[J]. 四川大学学报：医学版, 2004, 35(6): 854 - 857.

[23] Basu S, Hellberg A, Ulus A T, *et al*. Biomarkers of free radical injury during spinal cord ischemia[J]. FEBS Lett, 2001, 508 (1): 36 - 38.

[24] Peasley M A, Shi R. Ischemic insult exacerbates acrolein-induced conduction loss and axonal membrane disruption in guinea pig spinal cord white matter[J]. J Neurol Sci, 2003, 216 (1): 23 - 32.

[25] 刘碧波，刘淼，张端端，等. 脊髓缺血再灌注损伤延迟性瘫痪自由基和超氧化物歧化酶动态变化[J]. 陕西医学杂志, 2007, 36(3): 265 - 268.

[26] Vaziri N D, Lee Y S, Lin C Y, *et al*. NAD(P)H oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and nitric oxide synthase expression in subacute spinal cord injury [J]. Brain Res, 2004, 995(1): 76 - 83.

[27] Reiter R J, Tan D X, Manchester L C. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence[J]. Cell Biochem Biophys, 2001, 34(2): 237 - 256.

（**收稿**：2009-10-25；**修回**：2009-12-24）

（编辑　汪勤俭）