

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)03-0240-04

麻黄碱促进脑缺血大鼠运动功能康复的细胞及分子机制

赵晓科¹, 肖农¹, 周江堡¹, 张晓萍² (重庆医科大学附属儿童医院:¹神经内科,²儿科研究所, 重庆 400014)

Effect of ephedrine on motor recovery after brain ischemia in rats and its cellular and molecular mechanisms

ZHAO Xiao-Ke¹, XIAO Nong¹, ZHOU Jiang-Bao¹, ZHANG Xiao-Ping²

¹Department of Neurology, ²Institute of Rediatrics, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China

【Abstract】 AIM: To investigate the effect of ephedrine on motor recovery after middle cerebral artery occlusion (MCAO), and explore the molecular and cellular mechanisms of ephedrine in accelerating rehabilitation in rats. **METHODS:** Sixty male SD rats were randomly divided into sham-operated group, natural recovery group and ephedrine treatment group. The unilateral MCAO models were induced by using bread occlusion method. Electron microscope was used to observe the tissue damages and newly born synapses around ischemic area at week 1, 2, 3 and 4 after operation. The expression levels of growth-associated protein 43 (GAP-43) and synaptophysin around ischemic area were examined by RT-PCR techniques. **RESULTS:** The ephedrine treatment group was lighter in degree of injury and more in the number of newly born synapses as compared with the natural recovery group. Both GAP-43 and synaptophysin proteins were demonstrated statistically significantly increased in RT-PCR product as determined by optical density measurements in ephedrine treatment group as compared with natural recovery group ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** The mechanisms of behavioral recovery with ephedrine treatment are associated with the enhanced synaptogenesis and the increased expression of molecules involved in neuronal remodeling around ischemic area.

【Keywords】 cerebral ischemia; functional recovery; somatomedins; synaptophysin, ephedra; ephedrine

【摘要】 目的: 研究麻黄碱加速大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型运动功能康复的细胞和分子机制。方法: 雄性

收稿日期 2006-04-30; 接受日期 2006-08-27

基金项目 重庆市卫生局中医药科研项目(2003-B-38)

通讯作者: 肖农. Tel (023) 63622984 Email xiaonongwl@sina.com

作者简介: 赵晓科. 硕士生(导师肖农). Tel (023) 63622634

Email happytoky@163.com

SD大鼠60只,随机分为假手术组、自然康复组和治疗组。应用线栓法建立单侧MCAO模型。术后1, 2, 3, 4 wk电镜检测缺血周围区组织损伤及新生突触形成情况, RT-PCR检测缺血周围区生长相关蛋白(GAP-43), 突触素(SYP)表达的变化。结果: 治疗组神经损伤程度轻, 新生突触较自然康复组多; RT-PCR显示治疗组GAP-43和SYP的表达水平高于自然康复组($P < 0.01$)。结论: 增加缺血周围区新生突触形成, 在基因水平上促进GAP-43及SYP的表达增高是麻黄碱促进神经康复的机制之一。

【关键词】 脑缺血; 功能恢复; 生长调节素类; 突触素; 麻黄; 麻黄碱

【中图分类号】 R493.2

【文献标识码】 A

0 引言

祖国传统医学认为, 麻黄具有活血通络的功效。大量中医药报道显示, 麻黄与其他中药配伍用于治疗脑缺血所致的中风后遗症, 可明显改善其神经功能缺损症状^[1-2]。在我们的前期研究中, 发现麻黄中的主要药用成分麻黄碱可加速脑缺血后动物的运动功能恢复速度^[3]。本研究试图通过对缺血周围区超微结构的观察及皮层生长相关蛋白(growth-associated protein 43, GAP-43)及突触素(synaptophysin, SYP)mRNA表达的检测, 了解其细胞及分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级雄性SD大鼠60只, 体质量220~250 g。重庆医科大学试验动物中心提供。随机分为两大组: 电镜组(48只)及PCR组(12只), 各大组再等分为①假手术组, ②自然康复组, ③麻黄碱治疗组。电镜组均分为4个时点组, 即术后1, 2, 3和4 wk。各时点组均4只。

1.2 方法

1.2.1 中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型的制备 大鼠麻醉后, 仰卧位固定于手术台上, 行颈前正中纵行切口, 分离暴露右侧颈总动脉(CCA), 颈外动脉(ECA), 颈内动脉(ICA), 剥离迷走神经, 结扎CCA近端和ECA根部。在CCA距分叉部约2 mm处剪开一小口, 将制备好的栓线插入CCA并伸入到ICA内, 推进深度约为18~20 mm, 微遇阻力时停止。栓线经过CCA分叉处, ICA进入颅底

至较细的大脑前动脉(ACA),以阻断来源于同侧颈内动脉、大脑前动脉及大脑后动脉的血流供应,完成对右侧MCA的阻塞。缺血2h后取出栓线实现再灌注。假手术组不插入栓线,其余步骤和手术组相同。

1.2.2 施加处理因素 术后麻黄碱治疗组每3日给予一次3 mg/kg麻黄碱腹腔注射,其余两组注射同体积的生理盐水。

1.2.3 电镜观察超微结构 分别在各时点,水合氯醛麻醉动物,打开胸腔暴露心脏,经左心室插管至主动脉起始处,剪开右心耳,进行灌注固定。首先用生理盐水200~300 mL快速冲洗,至流出清亮液体,再用25 mL/L的戊二醛进行原位灌注固定,迅速断头取脑,在缺血周围区取下数块大小为1 mm×1 mm×1 mm的标本,放入电镜固定液中后固定2~4 h,取出放入4℃ PBS(0.01 mmol/L pH 7.25~7.35)溶液,反复冲洗12 h以上,10 mL/L锇酸固定2 h,丙酮脱水,国产环氧树脂618(环#618)包埋,解剖显微镜下修整,制成超薄切片,30 g/L柠檬酸+1 mL/L乙酸铀双重电子染色,透射电镜下观察、照相。

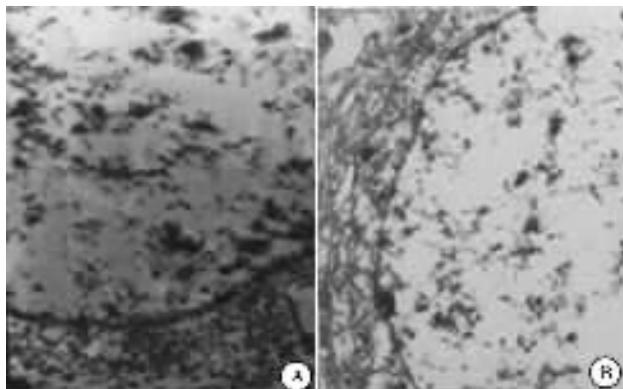
1.2.4 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测GAP-43 SYP基因表达 (1)引物合成:GAP-43上游引物5'-AGGGAGATGGCTCTGCTACT-3',下游引物5'-TCTTTACCCTCATCTGTCG-3',406 bp;SYP上游引物5'-GTGTTCCGCTTTCATGTGGCTAG-3',下游引物:5' ATCTGATTGGAGAAGGAGGTGG 3',494 bp,均由上海生物工程公司合成。(2)RT-PCR基本步骤:①总RNA的提取:将术后1 wk大鼠在深度麻醉下快速断头,取缺血侧半球靠中线三分之一的脑组织100 mg,加入1 mL Tripure匀浆提取RNA,产物-70℃保存备用。②cDNA的制备:严格按照逆转录试剂盒说明书进行操作。③PCR扩增:总循环数29,变性温度94℃,退火温度59.5℃。④电泳及条带分析:将各管扩增产物各取10 μL与指示剂混匀,120 mV电泳,溴乙锭中染色15 min。凝胶图象分析系统扫描扩增产物电泳条带的密度。产物相对量=产物电泳条带密度/ β -action产物电泳条带密度。

统计学处理:采用SPSS 11.5软件进行统计分析。数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素多均数间差异作F检验,均值间两两比较作SNK-q检验,方差不齐时采用Tamhane's检验。

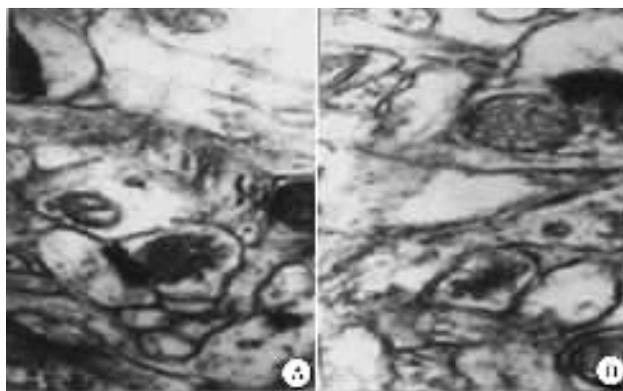
2 结果

2.1 电镜超微结构观察 假手术组:神经元和胶质细胞外形规则、核大、核膜结构完整,异染色质少,胞质内可见多种细胞器,其形态正常,线粒体膜完整,内

部形态正常,内皮细胞形态及内皮细胞间紧密连接正常。自然康复组:大量胶质细胞和神经元受损,细胞内外严重水肿,核膜结构破坏,核内异染色质增多、聚集,线粒体肿胀,嵴断裂、溶解、消失,细胞器肿胀、消失,胞质空泡化,细胞突起消失,内皮细胞肿胀,细胞间紧密连接破坏,新生突触数量较少(图1A,2A)。麻黄碱治疗组:神经元受损程度较轻,神经细胞轻度肿胀,核膜结构尚存,核内异染色质较少,线粒体轻微肿胀,嵴可见,细胞器形态基本正常,内皮细胞间紧密连接未见破坏,突触数量增加,可见新生突触形成(图1B,2B)。



A:自然康复组 TEM×8000;B:麻黄碱治疗组 TEM×6000.
图1 术后1 wk神经元水肿



A:自然康复组 TEM×25 000;B:麻黄碱治疗组 TEM×30 000.
图2 术后4 wk出现新生突触

2.2 调控基因1 wk时表达变化 假手术组GAP-43表达较少,自然康复组表达较假手术组明显为高($P < 0.01$),麻黄碱治疗组的表达较自然康复组高($P < 0.01$),SYP的变化和GAP-43相同,各组间两两比较差异均有统计学意义(表1,图3A)。

3 讨论

麻黄(Ephedra)是我国宝贵的中药药材,为麻黄

科植物草麻黄、中麻黄或木贼麻黄的干燥草质茎。早在《神农本草经》中就有麻黄治脑梗塞后遗症的记载，《宣明方》中亦有不少以麻黄治脑梗塞的临床验证，《千金》中指出麻黄能“破癥坚积聚”，有名的小续命汤即以麻黄为主药。目前仍有不少中医名家善用麻黄组方治疗脑梗塞后遗症，且取得较好疗效^[1-2]，在我们的前期研究中，我们确知麻黄的主要药用成分麻黄碱具有促进神经康复的作用。本研究在细胞水平及分子水平探讨了麻黄碱的作用机制。

表1 GAP-43 及 SYP mRNA 表达的相对量 ($n=4 \bar{x} \pm s$)

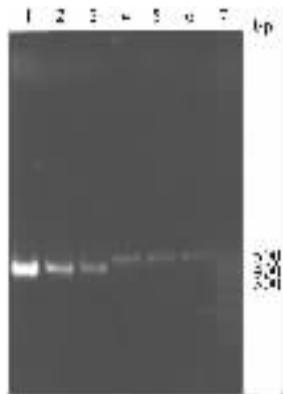
组别	GAP-43	SYP
假手术	0.26 ± 0.03	0.43 ± 0.04
自然康复	0.93 ± 0.08 ^b	1.76 ± 0.06 ^b
治疗	1.39 ± 0.07 ^{bd}	2.16 ± 0.11 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 假手术；^d $P < 0.01$ vs 自然康复。



1 麻黄碱治疗组 GAP-43/SYP；2 自然康复组 GAP-43/SYP；3 假手术组 GAP-43/SYP；4, 5, 6 β -action 600 bp；7：marker。

图3 术后1 wk 各试验组 Gap-43 mRNA 的表达



1 麻黄碱治疗组 GAP-43/SYP；2 自然康复组 GAP-43/SYP；3 假手术组 GAP-43/SYP；4, 5, 6 β -action 600 bp；7：marker。

图4 术后1 wk 各试验组 SYP mRNA 的表达

运动功能的恢复，必然伴随脑内解剖结构的调整^[4]。再灌注7 d 电镜观察，自然康复组细胞水肿严

重，细胞器损伤重，而治疗组神经元、神经胶质受损程度轻，仅表现为细胞轻度水肿，细胞器基本正常，这提示麻黄碱治疗可能有减轻缺血损害，促进神经修复的作用。28 d 时自然康复组突触数量仍较低，治疗组突触数量则显著增多，有超过假手术组的趋势；且治疗后新生突触数量明显增多。从而在细胞水平上，我们检测到麻黄碱的正性神经可塑作用。

GAP-43 是二十世纪 80 年代初发现的与神经发育、轴突再生、突触重建密切相关的一种快速转运磷酸蛋白，其表达产物主要位于轴突生长锥质膜面^[5]。成熟脑中，GAP-43 仅在一些突触形成和功能改建活跃的部位有高水平表达，如边缘系统、皮质联合区、海马、嗅球等。损伤时，GAP-43 的表达显著增强，其表达强度与轴突芽生、突触重建的状态相一致，从而 GAP-43 的表达成为脑缺血损伤后常用的神经生长及再生的量化指标^[6]。我们用药 3 次后对 3 组 GAP-43 mRNA 的表达进行检测。结果显示缺血损伤后，自然康复组及治疗组 GAP-43 mRNA 表达均增高，且麻黄碱治疗组 GAP-43 mRNA 的表达高于自然康复组，显示麻黄碱在基因层面上亦对 GAP-43 的表达起上调作用。

SYP 是一种位于突触囊泡膜上的钙结合蛋白，是蛋白酪氨酸激酶的底物，在钙依赖性神经递质释放过程中起重要作用。SYP 在神经元胞体合成后主要被转运至轴突终末，特异性分布于突触前囊泡膜上。由于突触终末囊泡重吸收循环机制的存在，在正常状态下突触素的量在突触处保持相对恒定，因而可被作为突触分布和密度的定量指标^[7]。通过测定其积分光密度值，可以在光镜水平对其进行间接定量。突触数量的增加，提示新生突触的形成^[8]。在 7 d 时 SYP mRNA 的表达，治疗组和自然康复组比较有统计学意义，说明麻黄碱在基因水平上可以上调 SYP 的表达。

轴突的芽生和伸长，以及随后出现的新生突触，为脑缺血后功能缺损的恢复提供了结构基础^[9,10]。该研究证实麻黄碱对脑的结构再塑的促进作用与此有关。

【参考文献】

- [1] 许士骞. 巧用麻黄治顽疾[J]. 上海中医药杂志, 2001, 35(7): 8-9.
- [2] 李锦成. 麻黄运用之我见[J]. 四川中医, 2003, 21(3): 22-23.
- [3] 赵晓科, 肖农, 周江堡, 等. 麻黄碱对脑缺血大鼠运动功能恢复的影响及分子机制研究[J]. 中国康复医学杂志, 2005, 22(3): 172-174.
- [4] 黄如训, 张艳, 方燕南, 等. 大鼠脑梗死后运动功能可塑性物质

基础及发生机制[J]. 中华医学杂志 2000 80(10) 769-772.

- [5] Bulsara KR, Iskandar BJ, Villavicencio AT, et al. A new millennium for spinal cord regeneration: Growth-associated genes[J]. Spine, 2002, 27(17) 1946-1949.
- [6] Carmichael ST, Archibeque I, Luke L, et al. Growth-associated gene expression after stroke: Evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex[J]. Exp Neurol, 2005, 193(2) 291-311.
- [7] Shen LH, Li Y, Chen J, et al. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke[J]. Neuroscience, 2006, 137(2) 393-399.
- [8] Marin R, Williams A, Hale S, et al. The effect of voluntary exercise

exposure on histological and neurobehavioral outcomes after ischemic brain injury in the rat[J]. Physiol Behav, 2003, 80(2-3):167-175.

- [9] Sawaki L, Werhahn KJ, Barco R, et al. Effect of an alpha(1)-adrenergic blocker on plasticity elicited by motor training[J]. Exp Brain Res, 2003, 148(4) 504-508.
- [10] Almaguer-Melian W, Rojas-Reyes Y, Alvare A, et al. Long-term potentiation in the dentate gyrus in freely moving rats is reinforced by intraventricular application of norepinephrine, but not oxotremorine[J]. Neurobiol Learn Mem, 2005 83(1) 72-78.

编辑 王小仲

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)03-0243-01

米索前列醇在延期妊娠引产中的临床观察

吕晓晖 (南宁市红十字会医院妇产科, 广西南宁 530012)

【关键词】米索前列醇 催产素 延期妊娠 引产

【中图分类号】R713.9 【文献标识码】B

0 引言 引产为人工干预发动子宫收缩使宫口扩张及宫颈管消失而引发分娩以结束妊娠的过程。过期妊娠对胎儿和新生儿的影响较大,其围生期发病率和死亡率均明显增高。妊娠达41 wk以上者可进行引产,以预防过期妊娠^[1]。我院通过对60例住院产妇分别给予米索前列醇及催产素引产,观察引产效果。

1 对象和方法 选择在我院住院的孕周 ≥ 41 wk、头先露无引产禁忌产妇60例,年龄22~34(平均26.8)岁。随机分为2组。米索前列醇引产组(30例)给予25 μg 米索前列醇阴道后穹窿给药,视宫缩及胎儿情况间隔4~6 h重复给药,每日总量不超过100 μg 。催产素引产组(30例)给予2.5 IU催产素溶于50 g/L葡萄糖注射液500 mL中以每毫升15滴计算,自8~12滴/min始,根据宫缩及胎儿情况调整滴速,一般每隔15~20 min调节1次,直至出现有效宫缩。调整滴速时每次滴增6滴,最大滴速不超过40滴/min^[2]。有效宫缩即每10 min内出现3次宫缩,每次宫缩持续30~60 s,宫腔压力达50~60 mmHg。两种方式引产过程均严密观察产程及胎心监护。

统计学处理:计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果 两组的引产促宫颈成熟比较差异有显著性(用药后 $t = 4.270$, $t_{0.01, 58} = 2.660$, $t > t_{0.05, 58}$, $P < 0.01$)。两组分娩方式比较差异也有显著性($\chi^2 = 4.81$, $\chi^2_{0.05, 1} = 3.84$, $\chi^2 > \chi^2_{0.05, 1}$, $P < 0.05$) (表1)。米索前列醇引产组能缩短引产时间,两组引产时间比较差异有显著性($t = 5.845$, $t_{0.01, 46} = 2.678$, $t > t_{0.01, 46}$, $P < 0.01$)。而新生儿Apgar's评分及产后出血量差异无统计学意义(表2)。

表1 两组引产促宫颈成熟及分娩方式的临床结果

($n = 30$, $\bar{x} \pm s$)

组别	Bishop 宫颈评分		阴道分娩 $n(\%)$	剖宫产 $n(\%)$
	用药前	用药后增加		
米索前列醇	3.5 \pm 1.5	2.2 \pm 1.1 ^b	27(90)	3(10)
催产素	3.5 \pm 1.5	1.2 \pm 0.6 ^b	20(67)	10(33)

^b $P < 0.01$ vs 用药前。

表2 两组引产阴道分娩者情况

($\bar{x} \pm s$)

组别	n	用药至临产 时间(h)	新生儿 Apgar's 评分			产后2 h 出血量(mL)
			<3	3~7	≥ 8	
米索前列醇	27	11 \pm 9	0	1	26	150 \pm 45
催产素	20	26 \pm 8	0	1	19	145 \pm 50
			$\chi^2 = 0.0001035$			$t = 0.36$

3 讨论 米索前列醇能使宫颈结缔组织释放多种胶原溶解酶,降低胶原纤维,促进宫颈迅速软化,缩短宫口扩张时间,同时能增加子宫平滑肌对内源性及外源性催产素的敏感性,刺激内源性前列腺素E₂的释放,兴奋子宫和诱发宫缩。而且米索前列醇采用小剂量阴道后穹窿放药,对胎儿心血管及胎盘循环无明显不良影响,新生儿窒息发生率无增加,相反由于产力得到很好发挥缩短产程,降低剖宫产率^[3]。催产素能很快刺激宫缩,但对宫颈的扩张没有直接作用故促宫颈成熟作用弱,由于剂量依赖的副作用,长时间反复宫缩抑制,胎儿宫内缺氧增加,剖宫产率增加。同时由于静脉用药产妇的活动常常受限,需专人看守。我们认为米索前列醇引产能促宫颈成熟又能在短时间内发动规律宫缩,两者达到同步化,大大缩短了第1产程^[4],且给药方法简单方便,产妇乐于接受,有利于计划分娩。值得注意的是米索前列醇引产易致宫缩过强、过频,易发生急产,故用药过程中要严格掌握用药剂量及时机,加强监护严密观察产程。必要时静滴硫酸镁或肌注度冷丁以抑制过强宫缩。

【参考文献】

- [1] 乐杰. 妇产科学[M]. 6版. 北京:人民卫生出版社, 2004: 94.
- [2] 王泽华, 沈怡. 晚期妊娠引产的循证评价[J]. 实用妇产科杂志 2004 20 4-5.
- [3] 赵翠兰. 米索前列醇用于晚期妊娠引产的临床观察及护理[J]. 齐鲁护理杂志 2002 8(7) 485.
- [4] 翁梨驹. 前列腺素与引产[J]. 中国实用妇科与产科杂志 2002, 18(5) 264-267.

收稿日期 2006-10-30; 接受日期 2006-12-14

作者简介:吕晓晖. 主治医师. Tel (0771) 2801733 Email fanfanzui@126.com

编辑 王睿