

· 基础研究 ·

高压氧对缺血再灌注损伤小鼠脑区甘丙肽含量的影响

卢晓欣 彭慧平 汤永建 房卫红 洪新如

【摘要】 目的 观察小鼠缺血再灌注损伤后各脑区甘丙肽(Gal)含量的变化以及高压氧(HBO)治疗对其含量的影响。**方法** 昆明小鼠 24 只,随机分为缺血再灌注 + 高压氧(HBO)组(A 组)、缺血再灌注组(B 组)、假手术组(C 组)和正常对照组(D 组),每组 6 只。A、B 组动物采用阻断双侧颈总动脉血流 30 min 后恢复血流的方法建立脑缺血再灌注模型。采用放射免疫分析法测定各组动物脑区 Gal 免疫活性物质(ir-Gal)含量的变化。**结果** 小鼠缺血再灌注损伤后各脑区 Gal 含量均有不同程度的变化,皮质 ir-Gal 含量明显升高,海马 ir-Gal 含量却明显下降,与 C 组和 D 组比较差异均有统计学意义;纹状体 ir-Gal 含量与 D 组接近($P > 0.05$)。HBO 处理后,海马 ir-Gal 含量明显提高并接近正常水平,皮质与纹状体 Gal 含量在 HBO 处理后也明显高于 B 组和 C 组,差异均有统计学意义。**结论** Gal 参与了缺血再灌注损伤的病理生理过程,不同脑区的 Gal 在缺血再灌注损伤中的重要性及作用可能有所不同。HBO 处理后各脑区 Gal 含量明显提高,可能是减少缺血再灌注损伤的作用机制之一。

【关键词】 甘丙肽; 缺血再灌注; 高压氧

The effects of hyperbaric oxygen therapy on the concentrations of galanin in brain areas of mice with ischaemic reperfusion injury LU Xiao-xin*, PENG Hui-ping, TANG Yong-jian, FANG Wei-hong, HONG Xin-ru.

* Department of Hyperbaric Oxygen Therapy, Fuzhou General Hospital, Fuzhou 350025, China

Corresponding author: LU Xiao-xin, Email: Luxinczt@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of hyperbaric oxygen therapy (HBO) on the concentrations of galanin of brain areas in mice with cerebral ischemic reperfusion injury (CIRI). **Methods** Twenty-four Kunming mice were randomly and evenly divided into an ischemic reperfusion + HBO group (group A), an ischemic reperfusion group (group B), a sham operation group (group C) and a normal group (group D). CIRI models were established by using the common carotid arteries occlusion for 30 min and post-ischemic reperfusion. HBO treatment was employed after the establishment of the models once a day for 10 d, then the quantification of galanin immunoreactivity (ir-Gal) was measured with radioimmunoassay. **Results** Compared with those in groups C or D, the concentrations of ir-Gal were significantly elevated in cortex but lowered in hippocampus in group A. Whereas there was no significant difference in striatum in group A with comparison to that of group D. After HBO treatment, the descent of ir-Gal in hippocampus was attenuated, and ir-Gal levels were significantly increased in cortex and striatum with comparison to those in groups B and C ($P > 0.05$). **Conclusion** Galanin plays an important role in the CIRI pathophysiological process with different effects in different brain areas. The increase of ir-Gal after HBO treatment might be a potential mechanism of HBO in alleviating CIRI.

【Key words】 Galanin; Ischemic reperfusion; Hyperbaric oxygen therapy

甘丙肽(galanin, Gal)是 1983 年发现、由 29 个氨基酸残基组成的多肽,广泛分布于外周组织和中枢神经系统各个脑区,具有多种神经生物学功能。近年来研究发现, Gal 的抑制作用是机体重要的损伤保护机制之一^[1],但有关 Gal 与脑缺血再灌注损伤关系的研究报道很少。本研究以小鼠全脑性缺血再灌注为模型,观察小鼠缺血再灌注损伤后各脑区 Gal 含量的变

化以及高压氧(hyperbaric oxygen therapy, HBO)治疗对其变化的影响。

材料与方法

一、实验动物与分组

成年健康昆明小鼠 24 只(SPF 级,由福州总医院实验动物中心提供),雌雄不限,体重为 (24 ± 2) g。将小鼠按抽签法随机分成缺血再灌注 + HBO 组(A 组)、缺血再灌注组(B 组)、假手术组(C 组)和正常对照组(D 组),每组 6 只。

作者单位:350025 福州,南京军区福州总医院高压氧科(卢晓欣、彭慧平、汤永建、房卫红),全军优生优育研究所(洪新如)

通讯作者:卢晓欣,Email: Luxinczt@163.com

二、模型制备

参照岑德意等^[2]的方法进行改良。A、B 两组小鼠经 0.5% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg 体重) 腹腔注射麻醉后分离双侧颈总动脉, 无创微动脉夹夹闭血管, 30 min 后撤夹恢复血流。C 组切开颈部皮肤、分离双侧颈总动脉但不阻断血流, 缝合切口后作为假手术组。D 组不作任何处理。

三、高压氧治疗

A 组小鼠在模型完成后 3 h 开始 HBO 处理。将动物置于 40 cm × 40 cm × 20 cm 自制木箱内。木箱两侧各有一个直径为 2.0 cm 的圆孔, 一孔 (箱下方) 为进气孔与输氧管连接, 另一孔 (箱上方) 为出气孔与排气管相接。给氧 5 min 后测排气孔处氧浓度为 99.0%。按 6 L/min 速率通入医用纯氧 (氧纯度 99.5%), 采用空气加压舱, 舱内温度为 (24 ± 2) °C。程序自动操舱, 升压速率 4 kPa/min, 压力升至 200 kPa (2 ATA) 后稳压 35 min, 再以 4 kPa/min 速率减压出舱。全程持续吸氧, 总时间为 85 min, 每日 1 次, 共 10 次。处理过程未发生小鼠惊厥或死亡。B、C、D 组不作 HBO 处理。

四、动物处置与标本收集

A 组小鼠在第 10 次 HBO 处理结束后, 与 B、C、D 组同时间断头处死, 迅速取出全脑, 置沸生理盐水中 5 min 以灭活肽酶。吸干附着液体, 分离皮质、海马和纹状体, 称重后移入含 0.1 N 乙酸 1 ml 的匀浆管充分匀浆, 室温下静置 2 h, 加入 0.1 N 氢氧化钠溶液 1 ml, 离心 (3 000 r × 10 min), 取上清置于 -80 °C 环境中待测。

五、Gal 测定

Gal 免疫活性物质 (ir-Gal) 含量的检测采用放射免疫测定法。测定药盒由第二军医大学神经生物学教研室提供 (最小检出量 6 pg, IC₅₀ 为 345 pg)。平衡饱和和加样, 总放射性活度约 8 000 cpm、反应终体积为 500 μl。二抗分离结合和游离组份, 根据同批次标准曲线, 程序化计算每样本管 ir-Gal 的含量, 再分别换算为单位重量脑区 ir-Gal 的含量 (pg/mg 组织)。

六、统计学分析

数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用非配对资料 *t* 检验统计分析。

结 果

一、缺血再灌注损伤后脑区 Gal 含量的变化

C 组和 D 组之间各脑区 ir-Gal 含量实验数据接近, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。B 组缺血再灌注损伤后 ir-Gal 含量在皮质较 C 组明显升高 ($P < 0.01$); 海马 ir-Gal 含量则明显低于 C 组 ($P < 0.01$);

纹状体与 C 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

二、HBO 对脑区 Gal 含量的影响

HBO 处理后, A 组皮质 ir-Gal 含量明显高于 B 组和 C 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。海马 ir-Gal 含量 A 组明显高于 B 组 ($P < 0.01$), 与 C 组数值接近, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。A 组 HBO 处理后纹状体 ir-Gal 含量明显高于 B 组和 C 组 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组各脑区 ir-Gal 含量变化 (pg/mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	皮质	海马	纹状体
A 组	6	40.07 ± 5.37	32.18 ± 15.89	46.27 ± 26.68
B 组	6	26.98 ± 6.89 ^{ab}	9.44 ± 1.55 ^{ab}	18.36 ± 8.79 ^a
C 组	6	8.15 ± 2.37 ^a	33.37 ± 19.04	18.00 ± 14.84 ^a
D 组	6	6.19 ± 3.77	37.39 ± 26.61	17.96 ± 32.50

注: 与 A 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 C 组比较, ^b $P < 0.01$

讨 论

Gal 是 1983 年由 Tatemoto 等^[3]首次从猪小肠中提取到的一种生物活性多肽。人类 Gal 为含 30 个氨基酸的非酰胺化肽, 其他物种的 Gal 由 29 个氨基酸组成^[4]。从分子结构看, Gal 可能是新的一类神经肽家族成员, 也有人将它归入脑肠肽。Gal 广泛分布于中枢神经系统, 常与其它神经递质 (乙酰胆碱、去甲肾上腺素、5-羟色胺等) 共存。Gal 又称促生长激素神经肽, 参与下丘脑神经内分泌调节、认知、摄食、镇痛等, 特别是在抗神经损伤中发挥重要作用。有研究发现, 缺氧再灌注后 1 周, 外周星状神经节 Gal 表达显著升高, 促使轴突损伤后神经末端再生^[5]。沙土鼠前脑短暂缺血-再灌注后, 海马齿状回 Gal 阳性纤维密度升高, 其阳性神经元数在伤后 12 h 达到最高, 随后开始下降, 4 d 后阳性神经元便不能测到, 提示其升高伴随着损伤的病理过程而变化^[6]。本研究表明, 小鼠缺血再灌注损伤后各脑区 Gal 含量有不同程度的变化, 皮质 ir-Gal 含量明显升高而海马 ir-Gal 含量明显下降, 纹状体 ir-Gal 含量与对照组接近, 提示部分脑区 Gal 参与缺血再灌注损伤的病理生理过程, 不同脑区 Gal 在缺血再灌注损伤中的作用可能有所不同。

HBO 治疗缺血再灌注损伤, 具有改善脑组织缺氧、保护脑细胞和促进脑组织修复的作用, 已经为大量的动物实验和临床研究所证实。纠正脑内内源性神经肽的异常是其作用机制之一^[7,8]。研究发现, Gal 可以保护海马神经元的低氧性损伤, Gal 通过抑制海马 CA₁ 区锥体细胞的兴奋性突触后电位, 抑制兴奋性氨基酸的释放, 保护脑细胞功能^[3]。神经损伤后 Gal 发挥营养、修复神经的作用机制, 可能是通过与其特异性 II

型受体结合实现的,此外,Gal 还能通过调节神经祖细胞的分化增殖修复神经组织^[9]。本实验观察到 HBO 处理后,海马 ir-Gal 含量明显提高并接近正常水平,提示 HBO 可能通过促进内源性 Gal 的生成,提高脑内 Gal 水平,起到保护海马神经元的作用,而皮质与纹状体 Gal 含量在 HBO 治疗后也明显高于缺血再灌注组和假手术组,可能也有类似的作用。总之,本研究表明,HBO 治疗缺血再灌注损伤的作用机制之一,可能是通过改变脑内 Gal 含量,利用 Gal 发挥对中枢神经组织的保护功能。

参 考 文 献

- [1] 史明仪,王正山,周华珠,等. Gal 在三叉神经主核引起的超极化反应和外向性电流. 中国病理生理杂志, 2001, 17: 414-414, 466.
- [2] 岑德意,周兰兰,明亮,等. 清醒小鼠反复脑缺血再灌注法致学习记忆障碍模型的建立. 中国药理学通报, 2000, 16: 220-223.
- [3] Tatemoto K, Rokaeus A, Jorwall H, et al. Galanin a novel biologically active peptide from porcine intestine. FEBS Lett, 1983, 164: 124-128.
- [4] Brewer A, Echevarria DJ, Langel U, et al. Assessment of new functional roles for galanin in the CNS. Neuropeptides, 2005, 39: 323-326.
- [5] Habecker BA, Gritman KR, Willison BD, et al. Myocardial infarction stimulates galanin expression in cardiac sympathetic neurons. Neuropeptides, 2005, 39: 89-95.
- [6] Lee HY, Hwang IK, Kim DH, et al. Ischemia-related changes in galanin expression in the dentate hilar region after transient forebrain ischemia in gerbils. Exp Anim, 2005, 54: 21-27.
- [7] 卢晓欣,洪新如,汤永建,等. 高压氧治疗对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后神经肽 Y1-36 和降钙素基因相关肽含量的影响. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2002, 9: 82-85.
- [8] 胡电,古航,洪新如,等. 高压氧对窒息新生儿血中孤啡肽含量的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26: 200-202.
- [9] Shen PJ, Yuan CG, Ma J, et al. Galanin in neuro(glio)genesis: expression of galanin and receptors by progenitor cells in vivo and in vitro and effects of galanin on neurosphere proliferation. Neuropeptides, 2005, 39: 201-205.

(修回日期:2006-11-27)

(本文编辑:松 明)

· 短篇论著 ·

中西药病灶注入法配合综合康复治疗治疗成人股骨头缺血性坏死

张跃萍 王和平

近年来,成年人股骨头缺血性坏死(femoral head ischemic necrosis, FHIN)发病率呈逐渐增高的趋势,该病致残率较高,治疗问题尚未完全得到解决。改善股骨头血液循环、促进其修复、预防肢体病残以及推迟人工假体置换时间是 FHIN 治疗的关键。我院骨科及康复理疗科自 1993 年 2 月至 2004 年 3 月,开展了中西药病灶注入法配合综合康复治疗治疗成人 FHIN 患者 34 例(共 50 髋),疗效较好,现报道如下。

一、对象与方法

(一)研究对象

34 例 FHIN 患者,其中男 22 例,女 12 例;年龄 19~37 岁;单侧发病者 18 例,双侧发病者 16 例,共 50 髋;病变位于左侧 22 髋,右侧 28 髋;按 Ficat 分期标准^[1],Ⅱ期 16 髋,Ⅲ期 34 髋;激素性 FHIN 28 髋,外伤性 FHIN 12 髋,酒精性 FHIN 6 髋,其它 4 髋。

(二)治疗方法

1. 中西药病灶注入法:硬膜外麻醉生效后,可用适当手法松解粘连关节,作髋关节外侧切口,如滑膜肥厚可部分切除,注意保护关节囊。在股骨颈开一约 3.0 cm×2.0 cm×2.0 cm 的骨槽,经骨槽用空心钻向股骨头坏死区放射状钻数孔并穿透关

节软骨,使股骨头与关节腔及转子区相通,血液、关节滑液及注入的药物均可经孔交通循环。在股骨头坏死区埋入一根硬膜外麻醉管,用腰穿针将麻醉管潜行斜向引出皮外,在麻醉管外端安置开启接头并妥善固定,严密缝合骨关节囊。术后经麻醉管向病灶内注入复方丹参注射液 4ml,氢溴酸山莨菪碱注射剂(654-2)10~20 mg,每日 1 次,共治疗 4 周。

2. 静力锻炼:术后 3 d 行患肢静力锻炼,锻炼方法为患者仰卧,保持关节不动,行患肢股四头肌收缩和放松训练,每日 2~3 次,并配合超短波治疗与被动运动训练。

3. 超短波治疗:应用上海产 CDB-1 型超短波电疗机,频率为 40.68 MHz,波长为 7.3 m,最大输出功率为 200 W。采用 22 cm×15 cm 大小的板状电容电极 2 个,于患处上、下对置,间隙 3~5 cm,温热量。每日治疗 1 次,每次 20 min,10 d 为 1 个疗程,共 2 个疗程。

4. 被动运动训练:应用 JK-D 型下肢关节康复器,频率为 50 Hz,功耗≤50 W,髋关节活动度为 15~120°,角度变化速度范围为 0~4°/s,机架调节长度为:小腿 320~570 mm,大腿 270~400 mm。将患者下肢置于该机器上,系好安全带,调节操作面板,分别设置好起始角度及终止角度,注意起始角度应小于终止角度,速度以患者能承受为限。每日治疗 1~2 次,每次 20~30 min,10 d 为 1 个疗程,共 2 个疗程。

5. 主动运动锻炼:4 周后应根据患者的具体情况进行适当的

作者单位:730000 兰州,甘肃省人民医院康复理疗科(张跃萍),骨科(王和平)

通讯作者:张跃萍,Email:wenyao0611@163.com