

· 基础研究 ·

高压氧对鼠损伤脊髓内神经生长相关蛋白表达的影响

王钢 刘世清

【摘要】目的 研究高压氧(HBO)治疗对脊髓损伤(SCI)组织中神经生长相关蛋白(GAP-43)表达水平的影响。**方法** 用 Allen 氏 WD 法制作鼠脊髓损伤模型。55 只成年 Wistar 鼠随机分为正常组、SCI 对照组和 HBO 治疗组。治疗组于术后每天 HBO 治疗 1 次,对照组无特殊治疗。各组分别于术后 1 d、4 d、7 d、10 d、14 d 各随机取鼠 5 只,取损伤脊髓组织,Western blot 法检测 GAP-43 表达水平。**结果** GAP-43 在正常成年鼠脊髓中少量表达,SCI 后表达增加且 HBO 治疗组较对照组表达更为显著。术后 1 周时 SCI 对照组 GAP-43 表达达到高峰,2 周时降至接近初始水平,但 HBO 治疗组 GAP-43 表达仍维持高水平。**结论** HBO 可增强损伤脊髓组织 GAP-43 表达。

【关键词】 高压氧; 脊髓损伤; 神经生长相关蛋白

Effect of hyperbaric oxygen on the expression of GAP-43 in the spinal cord of rats underwent spinal cord injury WANG Gang, LIU Shi-qing. Ren Min Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of hyperbaric oxygen (HBO) on expression of GAP-43 in the rats' spinal cord following spinal cord injury (SCI). **Methods** Fifty-five Wistar rats were randomly divided into three groups: a normal group, a control group and a HBO-treatment group. The rats in the control and HBO-treatment group underwent SCI by 10g × 5cm impact at the T10 level. The rats in the HBO-treatment group were treated by HBO. Western blot was used to observe the change of expression of GAP-43. **Results** There was weak expression of GAP-43 in the normal spinal cord. The GAP-43 expression increased significantly following SCI. The level of GAP-43 expression in the HBO-treatment group was significantly high than that in the control group. **Conclusion** HBO can increase the level of GAP-43 expression.

【Key words】 Hyperbaric oxygen; Spinal cord injury; GAP-43

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)在临床上较为常见,其致瘫率较高,且严重影响人们的生活质量。高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)是治疗 SCI 的重要方法之一,其疗效已得到临床和动物实验的证实,但其机制尚未完全明确。本研究旨在探讨鼠 SCI 后, HBO 对其损伤脊髓组织中神经生长相关蛋白(growth associated protein-43, GAP-43)表达水平的影响,试图为高压氧对脊髓损伤保护作用的分子机制提供实验依据。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验对象及分组:健康成年 Wistar 鼠 55 只,雌、雄不限,体重 250 ~ 300 g,随机分为:正常组 5 只,咬除椎板显露 T₁₀ 脊髓后,缝合并无菌包扎,不做脊髓损伤造模处理,作为测量 GAP-43 的正常对照;SCI 对照组 25 只,脊髓损伤后不做特殊治疗;HBO 治疗组 25 只,脊髓损伤后进行 HBO 治疗。

2. 主要试剂与仪器:主要试剂有兔抗鼠 GAP-43

单克隆抗体(德国 Merck 公司)和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(武汉博士德生物工程公司);仪器有恒温超速离心机(德国 Heraeus, Biofuge 28RS)、电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)和全自动凝胶成像处理系统(美国 Image Master VDS, Pharmacia Co.)。

二、实验方法

1. 建立动物模型:0.3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg 体重)腹腔麻醉,无菌条件下,以 T₁₀ 节段脊髓为中心,显露直径约 8 mm 的圆形区作为脊髓损伤区,用 Allen 氏 WD 法,选用 10 g × 5 cm 致伤力损伤脊髓,见大鼠出现摆尾反射,双下肢及躯体回缩扑动后,双下肢瘫痪,表明撞击成功,然后逐层缝合,无菌包扎。

2. 高压氧治疗:用纯氧洗舱 10 min,使舱内氧浓度 > 95%,20 min 内缓慢加压至 0.25 MPa 后停留 60 min,这期间用纯氧通风 10 min,停留结束后以 20 min 匀速减压至常压,结束治疗。治疗组术后每天 HBO 治疗 1 次,共治疗 14 d。

3. Western Blot 法测 GAP-43 蛋白表达水平:取损伤脊髓组织 0.5 g,加入 2 ml 匀浆缓冲液[10 mmol · L⁻¹ HEPES(pH6.8),50 mmol · L⁻¹ NaF,1 mmol · L⁻¹

EGTA, 1 mmol · L⁻¹ EDTA] 和 2 μL 1mol · L⁻¹ PMSF, 在冰浴中 2 000 r/min 匀浆 10 次, 冰浴放置 30 min 后, 4℃ 10 000 r/min 离心 30 min, Bradford 法测定蛋白浓度, 取蛋白 40 μg, 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (V = 25 mA), 转膜 (V = 30 mA) 2 h, 5% 脱脂奶粉封闭, 兔抗鼠 GAP-43 特异抗体 (德国 Merck 公司) 室温孵育 1 h, PBST 洗 3 次, 每次 5 min, 然后用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (武汉博士德生物工程公司) 室温孵育 2 h, PBST 洗 3 次, 每次 5 min, 加入二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 液显色, ImageMaster VDS 全自动凝胶成像系统处理, 用 Beta 4.0.2 of Scion Image 分析软件测量条带光密度值 (OD 值), 以 β-actin 为内参照, 求得比值, 进行半定量分析。

三、统计学分析

应用 SPSS 10.0 统计软件, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

GAP-43 蛋白在正常成年鼠脊髓中少量表达, SCI 后表达增加, 且 HBO 治疗组较对照组表达更为显著。术后 1 周时, SCI 对照组 GAP-43 蛋白表达达到高峰, 2 周时降至接近初始水平, 但 HBO 治疗组 GAP-43 蛋白表达仍维持高水平 (图 1, 2)。

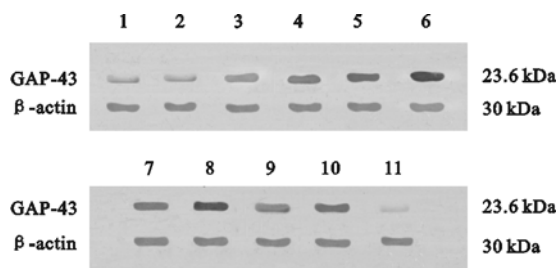


图 1 Western blot 检测 GAP-43 表达结果

注: 1, 3, 5, 7, 9 分别为对照组 SCI 后 1 d, 4 d, 7 d, 10 d, 14 d 的 GAP-43 表达; 2, 4, 6, 8, 10 分别为 HBO 治疗组 SCI 后 1 d, 4 d, 7 d, 10 d, 14 d 的 GAP-43 表达; 11 为正常组的 GAP-43 表达

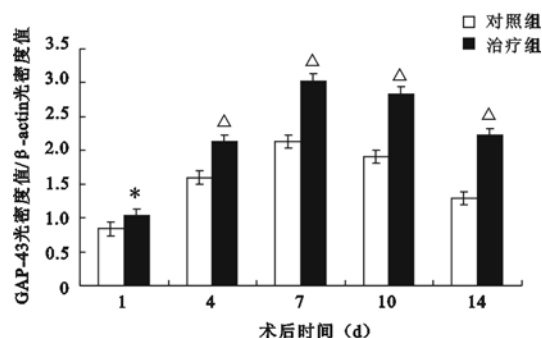


图 2 对照组与治疗组 GAP-43 光密度值/β-actin 光密度值

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$; 正常组 OD 值 = 0.521 ± 0.01

讨 论

GAP-43 是神经组织特异性磷酸蛋白, 分布于神经元、再生的雪旺细胞和神经胶质细胞, 被认为是神经元轴突生长发育和可塑性的分子标记物^[1,2]。GAP-43 可促进神经元的生长发育及突触的重构, 而神经损伤后生长修复时, 轴突内 GAP-43 的含量可增加 20 ~ 100 倍^[3,4]。神经元生长过程中 GAP-43 可能是靠改变生长锥中 G 蛋白的活性, 影响轴突的生长: 生长锥是轴突生长和延伸的引导, 生长锥中的 G 蛋白与其受体反应产生抑制信号, 导致生长锥停止生长, 而 GAP-43 与 G 蛋白结合后解除抑制信号允许轴突继续生长^[5]。GAP-43 高表达被认为是神经生长修复的典型特征, 与脊髓神经元生长修复密切相关。GAP-43 表达的调控机制尚不清楚, 推测 GAP-43 表达与转录后的调节密切相关。在成熟正常的神经元中, 可能是由于靶器官产生的某种抑制信号通过逆行轴浆转运至胞体, 从而抑制 GAP-43 表达。在神经损伤后, 损伤局部吸收而逆行转运至胞体的某种正反馈信号或本身由胞体产生的某种正反馈信号刺激其表达 GAP-43^[6,7]。

SCI 后脊髓损伤组织中的 GAP-43 表达增加, 表明 GAP-43 参与了脊髓损伤后的生长修复过程, 然而这一再生过程很短暂。有研究表明, 脊髓损伤后神经纤维的延伸不超过 1 mm, 无法达到脊髓功能恢复的解剖学要求^[8,9]。这与本试验结果一致 (GAP-43 术后 1 周时表达达到高峰, 2 周时便很快降至接近初始水平)。中枢神经系统这种极其有限的再生能力是 SCI 后脊髓功能恢复十分有限的重要机制之一。SCI 鼠经 HBO 治疗后 GAP-43 表达较对照组更为显著, 且 2 周后仍维持较高水平。HBO 可能是通过维护神经细胞的能量代谢^[10], 抑制神经元凋亡^[11], 增强感觉运动神经元功能^[12], 调高碱性成纤维生长因子及其 mRNA 表达水平, 增强 GAP-43 表达, 从而延长受损脊髓神经生长修复过程, 促进脊髓神经生长修复^[11-13], 对脊髓损伤起保护作用。

参 考 文 献

- 1 Wang XY, Zhang JT. Effects of ginsenoside Rg1 on synaptic plasticity of freely moving rats and its mechanism of action. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22 : 657-662.
- 2 Hassiotis M, Ashwell KW, Marotte LR, et al. GAP-43 Immunoreactivity in the brain of the developing and adult wallaby (*Macropus eugenii*). *Anat Embryol*, 2002, 26 : 97-118.
- 3 Tolner EA, van Vliet EA, Holtmaat AJ, et al. GAP-43 mRNA and protein expression in the hippocampal and parahippocampal region during the course of epileptogenesis in rats. *Eur J Neurosci*, 2003, 17 : 2369-2380.
- 4 Carrasco J, Penkowa M, Giralt M, et al. Role of metallothionein-III fol-

- lowing central nervous system damage. *Neurobiol Dis*, 2003, 13: 22-36.
- 5 McIlvain VA, Robertson DR, Maimone MM, et al. Abnormal thalamo-cortical pathfinding and terminal arbors lead to enlarged barrels in neonatal GAP-43 heterozygous mice. *J Comp Neurol*, 2003, 21: 252-264.
 - 6 Chen B, Wang JF, Sun X, et al. Regulation of GAP-43 expression by chronic desipramine treatment in rat cultured hippocampal cells. *Biol Psychiatry*, 2003, 15: 530-537.
 - 7 Omar Faison M, Perozzi EF, Caran N, et al. Axonal localization of delta Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in developing P19 neurons. *Int J Dev Neurosci*, 2002, 20: 585-592.
 - 8 贾军,孙正义,陈长瑞. GAP-43 对脊髓再生的作用. 国外医学骨科分册, 2003, 24: 188-189.
 - 9 Uno T, Shogaki K, Bamba H, et al. Growth associated protein-43 mRNA expression in nucleus ambiguus motoneurons after recurrent laryngeal nerve injury in the rat. *Acta Otolaryngol*, 2003, 123: 292-296.
 - 10 Miljkovic-Lolic M, Silbergleit R, Fiskum G, et al. Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen treatment in experimental focal cerebral ischemia are associated with reduced brain leukocyte myeloperoxidase activity. *Brain Res*, 2003, 2: 90-94.
 - 11 Calvert JW, Yin W, Patel M, et al. Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia-ischemia in a neonatal rat model. *Brain Res*, 2002, 27: 1-8.
 - 12 Yin D, Zhou C, Kusaka I, et al. Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23: 855-864.
 - 13 Bajrovic FF, Sketelj J, Jug M, et al. The effect of hyperbaric oxygen treatment on early regeneration of sensory axons after nerve crush in the rat. *J Peripher Nerv Syst*, 2002, 7: 141-148.

(修回日期: 2004-07-04)

(本文编辑: 阮仕衡)

· 短篇论著 ·

中频电与红外线治疗腰肌劳损 180 例疗效分析

沈鲁宁

腰肌劳损是常见多发病,为观察不同物理因子的治疗效果,我们分别采用中频电与红外线对此类患者进行治疗,现将对比观察结果报道如下。

一、对象与方法

将 180 例均经外科确诊为腰肌劳损的门诊患者随机分为治疗组与对照组。治疗组 90 例中,男 72 例,女 18 例;年龄 20~67 岁,平均 33.5 岁;病程 3 周~5 年,平均 1.5 年。对照组 90 例中,男 69 例,女 21 例;年龄 21~65 岁,平均 34.5 岁;病程 3 周~4 年,平均 1.3 年。用 χ^2 检验比较 2 组基本情况,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。患者发病前多有明确的外伤及劳损史,临床表现有不同程度的腰部钝痛,范围明显而局限,检查有明显压痛点,重压有肌肉痉挛表现,严重者腰部僵直伴脊柱活动受限,X 线片显示腰椎无器质性病变。治疗组进行中频电治疗,采用深圳产 PSC-928B 型运动创伤治疗机,电源 220 V,频率 50 Hz,连续平滑可调电流 9~80 mA。将 2 组 4 个直径为 3 cm 的圆型电极涂以导电膏,以腰部痛区为中心交叉放置,紧贴皮肤后用砂袋固定。治疗处方 P_1 键选方波, P_2 键选三角波,电流强度 15~25 mA,以患者耐受为度。对照组进行红外线治疗,采用重庆产 CQ 型特定电磁波治疗器,功率 250 W,照射强度 32 mW/cm²,预热 5 min 后以病患区为中心垂直照射,距离 30~40 cm,以局部温热舒适感为宜。以上治疗均为每天 1 次,每次 20 min,10 d 为 1 个疗程,2 组连续观察 2 个疗程后评定疗效。

按照以下疗效标准进行评定。痊愈:主要症状和体征消失或基本消失,腰部活动度正常;显效:主要症状和体征大部分消失,腰部活动度基本恢复;有效:主要症状和体征部分改善,腰部

活动度部分恢复;无效:治疗前、后主要症状和体征无明显变化。

二、结果

治疗组痊愈 52 例,显效 28 例,有效 8 例,无效 2 例,显效率为 88.9%,总有效率为 97.8%;对照组痊愈 28 例,显效 27 例,有效 20 例,无效 15 例,显效率为 61.1%,总有效率为 83.3%。治疗效果经 χ^2 检验,2 组间显效率($\chi^2 = 19.23, P<0.01$)和总有效率($\chi^2 = 10.98, P<0.01$)比较,差异均有统计学意义,治疗组疗效明显优于对照组。

三、讨论

腰肌劳损是由肌肉、韧带或关节积累性慢性损伤所致,如长期弯腰工作、躯干负重活动等造成腰部肌肉呈持续紧张状态,使小血管受压,供血不足,代谢产物积累刺激局部而形成损伤性炎症,以致引起疼痛,导致粘连、肥厚、挛缩或变性等。本研究中,中频电所产生的 2 种电流直接作用于人体病变组织及其周围,形成一个较强旋转矢量场,适宜的震颤刺激深部组织,使 5-羟色胺、缓激肽、组胺、P 物质等致痛化学介质得以消除,改善神经纤维间水肿,缓解血管痉挛,加速损伤组织的修复^[1]。而红外线辐射的热作用使皮肤温度上升,小动脉和毛细血管扩张,有利于渗出吸收并有消炎、消肿作用。2 种治疗比较,在改善周围血液循环方面,前者不如后者;而止痛和解除肌肉痉挛方面,前者比后者效果更好。多数患者经中频电治疗后症状很快消失或缓解,中频电疗确是治疗腰肌劳损比较有效的一种方法。

参 考 文 献

- 1 南登崑,主编. 实用物理治疗手册. 北京:人民军医出版社,2001. 365.

(修回日期: 2004-04-29)

(本文编辑: 熊芝兰)