

右-苯丙胺对脑缺血大鼠神经丝蛋白和微管相关蛋白表达的影响*

李红梅¹ 肖 农¹ 张晓萍¹

摘要 目的:研究右-苯丙胺对大鼠大脑中动脉闭塞 MCAO 后神经丝蛋白(NF)、微管相关蛋白(MAP 2)表达的影响,并在分子水平上探讨其加速神经康复的机制。**方法:**应用 Koizumi 线栓法建立单侧 MCAO 模型,用免疫组织化学方法及 RT-PCR 检测缺血周围区 MAP2、NF 表达的变化。**结果:**在 MCAO 1 周末 MAP2、NF 的表达明显低于假手术组,以后逐渐增高,在第 6 周末其表达高于假手术组,模型+右-苯丙胺组在各时间点其表达均明显高于模型组。**结论:**右-苯丙胺可促进脑缺血后动物的 MAP2、NF 的表达,提高神经可塑性,可能为其加速神经康复的分子机制之一。

关键词 脑缺血;微管相关蛋白;神经丝蛋白;右-苯丙胺

中图分类号:R493,R741 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-10-0883-04

Effects of D-amphetamine on expression of NF and MAP2 after cerebral ischemia in rats/LI Hongmei,XI-AO Nong,ZHANG Xiaoping,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2006,21(10):883—886

Abstract Objective:To study the effects of D-amphetamine on the expression of microtubule-associated protein2 (MAP2) and neurofilament protein (NF) after middle cerebral artery occlusion (MCAO),and explore the molecular mechanism of D-amphetamine in accelerating rehabilitation in rats with acute cerebral infarction.**Method:**The unilateral MCAO models were induced by using Koizumi's method. The changes in the expression of MAP2,NF around ischemia area was observed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemical techniques.**Result:**Compared with the sham-operated group,the expression of MAP2 and NF evidently decreased at 1 week,then increased gradually. Both the expression of MAP2 and NF proteins demonstrated statistically significant increased in D-amphetamine treatment group compared with natural recovery group all time points. Same results appeared in RT-PCR product.**Conclusion:**D-amphetamine effectively promotes the expression of MAP2 and NF around ischemia area, which indicates that neural plasticity is molecular mechanism of D-amphetamine in accelerating rehabilitation in rats with acute cerebral infarction.

Author's address Affiliated Hospital of Children of Chongqing University of Medical Science, Chongqing,400014

Key words cerebral ischemia;D-amphetamine; neurofilament protein; microtubule-associated protein2

成年后中枢神经系统仍具有高度可塑性,主要是神经元结构和功能的适应性变化,这些变化对损伤后复原是十分重要的。脑缺血后缺血边缘区域的神经元及其树突、轴突发生一系列适应性变化,以促进损伤后康复。本实验动态观察右-苯丙胺对脑缺血大鼠神经丝蛋白(neurofilament protein,NF)及微管相关蛋白(microtubule-associated protein2,MAP2)在蛋白及基因水平表达的影响,探讨脑梗死后功能可塑性的物质基础及机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及处理

60 只清洁级雄性 SD 大鼠,体重 220g—250g。重庆医科大学试验动物中心提供。随机分为 3 组:①假手术组(6 只);②模型组(27 只);③右-苯丙胺模型+右-苯丙胺组(27 只)。各组均分为 3 个时间点,即:术后 1 周,术后 3 周,术后 6 周。各时间点取假手术组 2 只,模型组和右-苯丙胺模型+右-苯丙胺组

各 9 只。术后右-苯丙胺模型+右-苯丙胺组每 3d 给予一次 2mg/kg 右-苯丙胺腹腔注射^[1],若时间点是术后 1 周即给药时间是 1 周,时间点是 3 周即给药时间是 3 周,时间点是 6 周的即给药时间是 6 周,即取的时间点不同给药时间也不同。其余两组注射同体积的生理盐水。

1.2 大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion,MCAO)模型的制备

参考 Koizumi^[2]方法。大鼠麻醉后,仰卧位固定于手术台上,行颈前正中纵向切口,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 2mm 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—20mm,微

* 基金项目:重庆市科委自然科学基金面上项目[渝科技字(2002)-18 文]

1 重庆医科大学儿童医院神经内科,400014

作者简介:李红梅,女,硕士研究生

收稿日期:2005-11-24

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。

1.3 免疫组化检测 MAP2 及 NF(SP 法)

各时间点麻醉动物, 40%多聚甲醛灌注固定后取脑, 收集前凶前 1mm 至前凶后 1mm 脑标本, 经脱水、透明、浸蜡、包埋后, 连续冠状切片 (片厚约 10 μ m), 隔 3 取 1 进行免疫组化染色。MAP2 及 NF 为武汉博士德生物工程有限公司产品, SP 试剂盒和 DAB 试剂盒均购于北京中山试剂公司。切片脱蜡致水, 3% H_2O_2 室温下孵育 10min, PBS 充分漂洗, 枸橼酸缓冲液微波修复, 保持 95 $^{\circ}C$ —98 $^{\circ}C$ 15min, 自然冷却至室温后 PBS 充分漂洗, 加入正常山羊封闭血清, 室内温孵育 10min, 甩干后加入 MAP2(1:150)或 NF (1:100), 37 $^{\circ}C$ 孵育 2h, PBS 充分漂洗后加入生物素标记的二抗工作液, 37 $^{\circ}C$ 孵育 30min, PBS 充分漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素工作液, 37 $^{\circ}C$ 孵育 30min, PBS 漂洗后 DAB 室温下显色, NF 显色约 8min, MAP-2 约 5min, 自来水冲洗以中止反应。脱水、透明, 封片。

1.4 RT-PCR

引物由上海生工生物工程公司设计与合成, 序列如下:

基因	引物序列	基因长度
NF	上游: 5' CAGCCTACTATACCGCCACG 3'	228 bp
	下游: 5' CCTCTTCACCCCTACCCACC	
MAP-2	上游: 5' AGTTGGCTCACTTGACAATG	351 bp
	下游: 5' AGAATGAATATGACACCTGCT	

取缺血周围脑组织 100mg, 放入匀浆器, 加入 1ml TRIzol, 提取总 RNA, 并对 RNA 进行定量, 要求 D_{260}/D_{280} 达 1.95 以上。将各标本提取的总 RNA 分别加入 DEPC 水稀释为 0.6 μ g/ μ l, 将 RNA 5 μ l、DEPC 水 4 μ l 及 OligoT1 μ l 混匀 70 $^{\circ}C$ 孵育 10min 后加入以下反转录体系中: DEPC 水 2.5 μ l、5 $\times$ Buffer 4 μ l、4 $\times$ dNTP 2 μ l、Rnasin 0.5 μ l、M-MLV 1 μ l 总体积 10 μ l, 37 $^{\circ}C$ 孵育 1h。将反转录产物 4 μ l 加入以下反应体系: DEPC 水 15 μ l、10 $\times$ Buffer 2.5 μ l、4 $\times$ dNTP 0.5 μ l、上游引物 0.5 μ l、下游引物 0.5 μ l、Taq 酶 1.5 μ l 放入 PCR 仪进行扩增。然后取 PCR 产物 10 μ l 在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙啶染色, 最后在紫外透射反射仪上观察结果及拍照。

1.5 图像分析

应用积分光密度值反映 NF 及 MAP2 免疫反应产物的面积及强度。每张切片在梗死周围区随机选

取 6 个 400 倍视野拍照, 应用 GD-8 型病理影像分析系统测定每视野各阳性区光密度值, 并求出各阳性区光密度的积分和 ($\sum \int OD$), 得到积分光密度值。每例标本的被检各区测 3 张切片, 取其均值。所得结果用表示, 依设计类型采用 F 、 q 及 t 检验, 检验水平 $\alpha=0.05$ 。

1.6 统计学分析

用 SPSS 软件包进行方差分析、 t 检验及秩和检验, 用两组及多组比较的方法分析实验组、对照组以及不同时间组间差异。

2 结果

2.1 NF 免疫组化染色结果

见表 1。NF 免疫反应阳性产物为棕褐色, 遍布胞质内呈细丝网状, 并延伸至突起内, 围绕在神经元周围, 衬托出神经元胞体的轮廓。棕褐色随天数增加逐渐加深。

假手术组: 大鼠大脑皮质免疫产物在两半球对称分布, $\sum \int OD$ 值在不同的时间点之间比较, 无显著性差异 ($P>0.05$)。模型组: 在梗死中心区未见 NF 表达, 梗死周围区 NF 的免疫活性 1 周后降低, 并随再灌注时间的延长呈逐渐递增的趋势, 6 周末高于假手术组有显著性差异 ($P<0.05$)。模型+右-苯丙胺组: NF 的表达变化趋势同模型组, 但表达水平在各个时间点均高于模型组, 两者之间差异有显著性 ($P<0.05$) (见表 1)。

表 1 各实验组脑梗死周围区域 NF $\sum \int OD$ 值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	术后时间		
		1 周	3 周	6 周
假手术组	6	62765 $\pm$ 4525	62065 $\pm$ 3619	61550 $\pm$ 4511
模型组	15	12529 $\pm$ 1653 ^①	30342 $\pm$ 1195 ^①	69908 $\pm$ 3518 ^①
模型+右-苯丙胺组 (2mg/kg)	15	21318 $\pm$ 3900 ^{①②}	37941 $\pm$ 3863 ^{①②}	77318 $\pm$ 4797 ^{①②}

①与相同时间点假手术组比较 $P<0.05$; ②与相同时间点模型组比较 $P<0.05$

2.2 MAP2 免疫组化染色结果

见表 2。MAP2 的阳性反应主要位于神经细胞胞体和树突, 呈褐色颗粒, 神经毡的阳性染色形成网络, 而轴突纤维及非神经细胞无染色, 大神经元比小神经元反应更明显。在尾壳核, 许多无染色的轴突束穿透神经细胞体区域, 可见短树突和神经毡阳性染色, 呈“蜂窝状”特征。

假手术组: 大鼠大脑皮质免疫产物在两半球对称分布, $\sum \int OD$ 值在不同的时间点之间比较, 无显著性差异 ($P>0.05$)。模型组: 在梗死中心区未见

MAP2 表达, 梗死周围区 MAP2 的免疫活性 1 周后降低, 并随再灌注时间的延长呈逐渐递增的趋势, 6 周末高于假手术组有显著性差异 ($P<0.05$)。模型+右-苯丙胺组: MAP-2 的表达变化趋势同模型组, 但表达水平在各个时间点均高于模型组, 两者之间差异有显著性 ($P<0.05$) (见表 2)。

2.3 RT-PCR 检测结果

2.3.1 NF mRNA 表达水平的变化: 见表 3, 模型组及模型+右-苯丙胺组梗死周围区 NF mRNA 的表达 1 周后降低, 低于假手术组, 差别均有显著性意义 (均 $P<0.05$), 随再灌注时间的延长呈逐渐递增的趋势, 6 周末模型+右-苯丙胺组高于假手术组有显著性差异 ($P<0.05$), 模型+右-苯丙胺组的表达水平在各个时间点均高于模型组, 两者之间差异有显著 ($P<0.05$) (见表 3)。

2.3.2 MAP2 mRNA 表达水平的变化: 见表 4, 模型组及模型+右-苯丙胺组梗死周围区 MAP2 mRNA 的表达 1 周后降低, 低于假手术组, 差别均有显著性意义 (均 $P<0.05$), 随再灌注时间的延长呈逐渐递增的趋势, 6 周末接近假手术组的表达, 三组比较无显著性差异 ($P>0.05$), 模型+右-苯丙胺组的表达水平在前 2 个时间点均高于模型组, 两者之间差异有显著性 ($P<0.05$) (见表 4)。

表 2 各实验组脑梗死周围区域 MAP2 Σ OD 值 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	术后时间		
		1 周	3 周	6 周
假手术组	6	67553 $\pm$ 5056	68241 $\pm$ 5029	67454 $\pm$ 5856
模型组	15	17934 $\pm$ 5193 ^①	34822 $\pm$ 5277 ^①	69745 $\pm$ 5131 ^①
模型+右-苯丙胺组 (2mg/kg)	15	20107 $\pm$ 5380 ^{①②}	38259 $\pm$ 5244 ^{①②}	74863 $\pm$ 4738 ^{①②}

①与相同时间点假手术组比较 $P<0.05$; ②与相同时间点模型组比较 $P<0.05$

表 3 各实验组不同时间点脑梗死周围区域

NF mRNA 表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	术后时间		
		1 周	3 周	6 周
假手术组	6	0.665 $\pm$ 0.113	0.675 $\pm$ 0.156	0.654 $\pm$ 0.072
模型组	12	0.163 $\pm$ 0.076 ^①	0.348 $\pm$ 0.094 ^①	0.650 $\pm$ 0.116
模型+右-苯丙胺组 (2mg/kg)	12	0.265 $\pm$ 0.082 ^{①②}	0.467 $\pm$ 0.106 ^{①②}	0.771 $\pm$ 0.223 ^{①②}

①与相同时间点假手术组比较 $P<0.05$; ②与相同时间点模型组比较 $P<0.05$

表 4 各实验组不同时间点脑梗死周围区域

MAP2 mRNA 表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	术后时间		
		1 周	3 周	6 周
假手术组	6	0.723 $\pm$ 0.080	0.721 $\pm$ 0.081	0.745 $\pm$ 0.091
模型组	12	0.236 $\pm$ 0.052 ^①	0.375 $\pm$ 0.115 ^①	0.726 $\pm$ 0.130
模型+右-苯丙胺组 (2mg/kg)	12	0.330 $\pm$ 0.125 ^{①②}	0.543 $\pm$ 0.106 ^{①②}	0.803 $\pm$ 0.104

①与相同时间点假手术组比较 $P<0.05$; ②与相同时间点模型组比较 $P<0.05$

3 讨论

NF 是神经元细胞骨架蛋白的主要组份, 也是神

经胞体和神经轴突细胞骨骼框架结构的重要组成部分, 对维持神经元细胞独特的形态特征、维持神经系统正常活动必需的轴浆运输现象具有至关重要的作用^[3]。故而把 NF 作为神经骨架蛋白的指标, 以提示神经元细胞生长的状态^[4]。轴突损伤后的结构重建是神经再生的前提, 它与神经元细胞骨架蛋白基因表达和轴浆转运的变化密切相关。

MAP2 是一种热稳定的磷蛋白, 属于结构性微管相关蛋白家族, 主要在中枢神经系统神经元胞体和树突表达。MAP2 是神经元树突静态结构蛋白, 与细胞内肌动蛋白、神经丝和线粒体共同维持神经结构^[5]。在神经元生长、分化和可塑性方面起作用, 对生长因子、神经递质、合成活动和神经毒性起关键作用。因此, MAP2 被认为是神经生长和修复相关蛋白, 是研究神经再塑的分子标志物^[6]。MAP2 减少或丧失可以损伤神经元。MAP2 对脑缺血最敏感, 常作为缺血诱导神经元损伤的早期标记物。MAP2 与微管连接促进微管的稳定, 可能参与神经元发育、结构稳定、突起形成和突触可塑性调节。MAP2 参与了神经元和非神经元细胞突起生长和神经元极性的形成。

脑缺血后缺血核心区受损神经元 NF 及 MAP2 表达丧失, 而相对完整的神经元和缺血半影区 NF 及 MAP2 表达选择性升高, 与缺血后的神经元恢复相对应。在缺血后 1 周梗死周边区 NF 及 MAP2 的基因和蛋白表达均明显降低, 随再灌注时间的延长呈逐渐递增的趋势, 6 周末接近假手术组的表达。右-苯丙胺是一种能提高脑内去甲肾上腺素、多巴胺和 5-羟色胺水平的单胺激动剂。自 20 世纪 80 年代以来, 一些动物实验表明, 右-苯丙胺可能在脑卒中后运动功能的康复方面起一定的作用, 从而将其在神经可塑性方面的作用视为新的研究重点^[7]。本研究表明右-苯丙胺促进脑缺血后半影区 NF 及 MAP2 的基因和蛋白表达, 是右-苯丙胺对脑缺血损伤的保护作用的可能机制之一。

参考文献

- [1] Stroemer RP, Thomas A, Kent, Claire E, et al. Enhanced neocortical ceural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery with D-Amphetamine therapy after neocortical infarction in rats [J]. Stroke, 1998, 29: 2381—2395.
- [2] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema: A new experimental model of cerebral embolism in rat which recirculation can be introduced in the ischemic area [J]. Jpn J Stroke, 1986, 8: 1—4.
- [3] 刘传玉, 梅元武. 脑缺血与脑的可塑性 [J]. 国外医学·神经病学神经外科学分册, 2004, 31: 522—525.
- [4] Uchida A, Brown A. Arrival, reversal, and departure of neurofilament at the tips of growing axons [J]. Mol Biol Cell, 2004, 15: 4215—4225.
- [5] 刘正清, 马志健, 刘裕民. 微管相关蛋白 2 与神经元可塑性调节

[J].中国现代医学杂志,2003,13:51—54.

[6] Dehmelt L, Halpain S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins[J]. Genome Biol, 2005, 6:204.

[7] Adkins DL, Jones TA. D-amphetamine enhances skilled reaching after ischemic cortical lesions in rats [J]. Neurosci Lett, 2005, 3, 380:214—218.

·短篇论著·

A型肉毒毒素大腿内收肌注射对改善功能性目标的影响

聂梅¹ 查天文²

1 资料与方法

1.1 一般资料

2004年9月—2005年9月我科治疗11例ADL功能完全丧失的痉挛患者,病源来自神经内科、神经外科、儿科、我科住院患者,11例患者均经头颅CT或MRI检查确诊为脑出血3例、脑梗死或并脑萎缩3例、脑外伤3例、脊髓损伤1例、小儿脑炎1例。其中,伴腹股沟湿疹2例,阴囊湿疹1例,腹股沟皮肤破溃1例,8例患者双下肢呈剪刀状。其中男性8例,女性3例,病程最短3个月,最长8年,平均5.5年。年龄最小11岁,最大82岁,平均年龄46.5岁。

1.2 方法

采用A型肉毒毒素(botulinum toxin type A, BTX-A)(国药准字S10970037,兰州)冻干结晶,每支100U,用0.9%生理盐水1ml稀释成10U/0.1ml,用1ml皮试注射器,7号注射针头注射。痉挛肌定位,采用“反向牵拉指压法”^[1]:患者卧位,助手使患者屈髋、屈膝,双足着床,使髋外展至最大范围,牵拉大腿内收肌,诱发痉挛或肌张力增高,治疗者触摸按压痉挛肌肌腹,按每1—3cm² 1个点原则,用记号笔定点。根据肌肉的大小来选择剂量和位点。每侧6—8点,成人注射10—20U/点,儿童5—10U/点,成人总量不超过300U,儿童不超过150U。注射后第2d即进行大腿内收肌牵拉,每天2次,每次30min。

1.3 肌张力评估

采用髋内收肌群肌张力分级评定表(adductor tone rating)^[2]:0级:肌张力不增加;1级:肌张力增加,在一人帮助下髋关节很容易外展到45°;2级:在一个人帮助下,髋关节稍许用力可以外展到45°;3级:在一人帮助下,髋关节中度用力可以外展到45°;4级:需要2人帮助才能将髋关节外展到45°。观察11例患者治疗前及治疗后1周、1个月、3个月大腿内收肌群肌张力改变情况。

1.4 统计学分析

对等级分组资料进行秩和检验(Kruskal-Wallis.H)。

2 结果与讨论

11例患者经BTX-A治疗后,痉挛分级有明显改变,见表1。经按等级分组资料的秩和检验, $H=29.18, P<0.01$ 。说明治疗后痉挛于1周时已有明显改善,1个月、3个月时示疗效仍在持续。由于痉挛的缓解,髋关节外展的改善,便于大腿内侧及外阴的清洁护理,1个月时3例肌腹沟湿疹,1例阴囊湿疹,1例皮肤溃烂的患者均已痊愈,8例剪刀状下肢患者下肢可随

表1 治疗前及治疗后不同时间肌张力分级情况(例)

肌张力分级	治疗前	治疗后1周	治疗后2周	治疗后3个月
0级	0	0	1	0
1级	0	2	6	6
2级	0	6	4	5
3级	4	3	0	0
4级	7	0	0	0

意摆放。

痉挛是上运动神经元损伤后,中枢神经系统调节运动的能力下降,脊髓中枢兴奋性过度释放,而出现的以速度依赖性肌张力增高、肌肉过度活跃为特征的综合征^[3]。是否治疗痉挛应取决于治疗的适应证,以及所希望的预期效果。本文所治疗病例均为上运动神经元损伤后导致严重肢体痉挛,患者完全丧失了ADL能力,基本上无自主活动,此时治疗目标要达到恢复ADL能力是不切实际的。那么,方便对患者的照顾和护理,便成了我们要达到的功能性目标。

BTX-A是一种神经毒素,作用于周围运动神经末梢,神经肌肉接头即突触处,抑制突触前膜对乙酰胆碱的释放,引起肌肉松弛麻痹^[4],从而缓解和消除肌肉痉挛。国内外已有报道,BTX-A治疗上运动神经元损伤所致痉挛疗效显著^[5]。不良反应少,最常见的是注射部位疼痛和乏力,但多为过性,无需特殊处理^[6]。本文的11例患者通过BTX-A注射痉挛的大腿内收肌群后,肌张力显著改善,髋关节外展范围改善,对患者的照顾和护理更为易行,如摆放体位(包括床上及轮椅)、穿裤子、放置便盆、大腿内侧及外阴的清洁,保持了皮肤的干燥、清洁,发生湿疹和皮肤溃烂的机会减少。因此,治疗目标的确定是很重要的,可以有效指导治疗。

参考文献

- [1] 窦祖林主编.痉挛——评价与治疗[M].北京:人民卫生出版社,2004.254,42.
- [2] 励建安,王彤主编.康复医学[M].第1版.北京:科学出版社,2002.187.
- [3] Simpson LL. The origin, structure, and pharmacological activity of botulinum toxin[J]. Pharmacol Rev, 1981, 33:155.
- [4] 孟玲,林庚庭,王荫椿. A型肉毒毒素临床应用中的副作用[J].中国新药与临床杂志,2001,20(6):462.
- [5] 杨晓颜,许光旭,毛雅君.肉毒毒素A对肌肉痉挛患者功能康复的作用[J].中国康复医学杂志,2005,20(9):675—679.

1 云南省思茅市人民医院康复科,665000

2 云南省思茅市中医院外骨科

作者简介:聂梅,女,副主任医师

收稿日期:2005-12-28