

• 实验研究 •

鹿丹通督片对兔脊髓压迫模型神经递质的影响

沈霖 谢晶 高兰 李同生

(同济医科大学附属协和医院中西医结合骨伤科研究室, 湖北 武汉 430032)

【摘要】 目的 探讨鹿丹通督片对兔脊髓压迫模型脊髓乙酰胆碱酯酶(AChE)及P物质(SP)的影响。方法 16只家兔被复制成脊髓压迫模型,随机分为治疗组和对照组各8只。治疗组给服鹿丹通督片,对照组不用药,另选2只未造模、不用药家兔为正常组。脊髓AChE采用组织化学方法,SP采用免疫组织化学方法进行定性、定位观察,并应用扫描显微分光光度仪进行定量分析。结果 脊髓AChE酶活性及SP免疫活性在造模后第7天,治疗组和对照组均比正常组减弱,治疗组活性明显高于对照组;扫描显微分光光度仪测定其OD值,两组间差异极其显著(均为 $P < 0.001$)。结论 鹿丹通督片对兔脊髓压迫模型的脊髓组织中的神经递质AChE和SP具有保护作用。

【关键词】 椎管狭窄 乙酰胆碱酯酶 神经传递物质

Effect of Ludan Tongdu Tablet on Neurotransmitters of Experimental Spinal Cord Compression Model of Rabbits SHEN Lin, XIE Jing, GAO Lan, et al. Xiehe Hospital, Tongji Medical University (Wuhan 430022)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Ludan Tongdu(LDTD) tablet on neurotransmitters of experimental spinal cord compression(SCC)in rabbits. **Methods** Spine cord compression models were made in 16 rabbits which were then divided into 2 groups randomly. The test- group was treated with LDTD tablet and the control- group without any drugs. 2 other rabbits served as normal group i.e. without surgery and without administration of drugs. The acetylcholinesterase(AChE) and substance P(SP) in spinal cord were individually demonstrated with histochemical and immunohistochemical techniques. The quantitative analysis were carried out by computer scanning microspectrophotometer. **Results** 7 days after experiment, SCC AChE activity and SP immune activity in test- group and control- group were all lower than those in normal group, but those in test- group were higher than in control- group($P < 0.001$). The OD of the two groups taken by computer scanning microspectrophotometer showed significantly difference ($P < 0.001$). **Conclusion** This study indicates that LDTD tablet could protect AChE and SP in the spinal cord of SCC.

【Key Words】 Spinal stenosis Acetylcholinesterase Nerve transmitter substances

通督活血汤^[1]是名老中医李同生教授治疗腰椎管狭窄症的有效经验方。为了探讨其疗效机理,我们进行了鹿丹通督片对兔实验性脊髓压迫模型脊髓神经递质的影响的研究,现将实验结果报告如下。

1 材料与方

1.1 药物 鹿丹通督片药物浸膏由湖北省中医药研究院提供(批号:980731,生药:浸膏[3.276:1],丹参酮IIA含量0.065%),按比例用蒸馏水配制成每ml含生药量2g的混悬液备用。

1.2 主要试剂 兔抗SP(RASP)(中国中医研究院);羊抗兔IgG(GAR)(上海医科大学病理室);过氧化物酶抗过氧化物酶复合物(PAP)(上海医科大学病理室);3,3'-二氨基苯胺(DAB)(上海化学试剂厂);Tris(上海化学试剂采购站);碘化

乙酰硫代胆碱(Fluka Chemical, German);四异丙基焦磷酸胺(Sigma);小牛血清白蛋白(上海化学研究所);Triton X-100(E·Merk进口分装)。其它均为市售分析纯。

1.3 动物模型及分组 健康大耳白兔16只,购自同济医科大学动物实验中心(动物合格证,普通一级动物),体重1.8~2.0Kg。同性别,体重及年龄相近配对分成治疗组8只,对照组8只。另选2只未造模、不用药家兔为正常组。动物模型参照文献中兔实验性脊髓压迫模型的制作方法^[2,3]进行。将家兔俯卧固定于实验台上,以3%戊巴比妥钠30mg/kg体重静脉麻醉,背部剃毛,选定L₅~L₆处为切口,常规消毒,切开皮肤及皮下组织,分离出L₅~L₆棘突及椎板并咬除,造成0.5cm×0.5cm方形骨窗,暴露脊髓,剪开硬脊膜小口约1.2mm,插入硬脊膜内导管至L₁₋₂处,此时兔双下肢猛烈收

缩。缝线固定导管,依层缝合切口,无菌敷料遮盖。麻醉清醒后,模兔均处于截瘫状态。于术后 6 小时拔除导管。鹿丹通督片治疗组,于造模后 1 小时开始按 10g/kg 剂量灌服通督药液,1 次/天。对照组,造模后不用药物,仅灌服生理盐水 5ml/天。

1.4 检测方法 于术后第 7 天,动物以 3% 戊巴比妥钠耳缘静脉麻醉,开胸暴露心脏,左心室穿刺,经升主动脉灌注温生理盐水 500ml 快速冲洗血液后,以 4℃ 的 4% 多聚甲醛液 2500ml 灌注。灌流后快速取脊髓标本,固定于 4% 多聚甲醛液中 24 小时,再转入 30% 蔗糖溶液置于 4℃ 冰箱内 12 小时,待组织块下沉后 AO 恒冷箱切片,厚度为 20μm 待作乙酰胆碱脂酶(AChE)染色,厚度为 30μm 待作 P 物质(SP)免疫细胞化学反应。

1.4.1 AChE 组织化学染色 参照 E1-Badawi 及 Schenk 法进行^[4]。即:切片入 0.01mol/L PBS 漂洗 5min × 2 次;入 AChE 孵育液 37℃, 1.5h;0.01mol/L PBS 漂洗 10min × 2 次;脱水、透明及封片。

1.4.2 SP 免疫酶组织化学染色 按 Vacca 报道的 Sterrberger PAP 技术改良法进行^[4]。即:切片入 0.01mol/L PBS 漂洗切片 10min × 2 次(以下各步处理后均经此步,文字从简);再入甲醇-H₂O₂液 0.5h;入 0.25% Triton X-100 37℃,30min;入 3% 小牛血清白蛋白 37℃,30min;入 RbASP(1:7000)37℃,2h 后转入 4℃ 冰箱中 60 小时;入 GAR(1:200)37℃,30 min;入 PAP 复合物(1:400)37℃,30 min;切片在 0.05% DAB-0.01% H₂O₂-Tris-HCl 缓冲液中显色 3~4min;0.01 mol/L PBS 漂洗 10 min × 2 次;常规脱水,透明,封片。

1.4.3 AChE 及 SP 的扫描显微镜分光光度计定量分析 仪器采用奥地利 UNIVAR 扫描显微镜分光光度计。测量参数:物镜放大倍数 25 × ;波长:420nm;光栅:连续干涉滤片。测量方法:应用扫描显微镜吸收光度术,随机测量 8 只对照组及 8 只治疗组脊髓 AChE 组织化学染色切片,每只随机测量 3 个切片中前角的酶活性强度,取任意单位;随机测量 5 只对照组与 5 只治疗组脊髓 SP 免疫细胞化学染色切片,每只随机测量 5 个切片中脊髓后角的免疫活性强度,取任意单位。

1.5 统计学处理 实验数据均采用 SAS(6.12 版)统计软件进行两样本均数显著性 t 检验。

2 结果

2.1 AChE 组织化学研究结果 光镜下见正常组 AChE 阳性反应部位主要分布于脊髓前角,而在后柱 AChE 活性散在性分布在神经网织内。术后 7 天,对照组 AChE 活性在脊髓前角、后角均较正常组明显减弱,阳性部位反应颜色较浅,并可见酶扩散及酶消失;治疗组 AChE 活性亦弱于正常组,但高于对照组,阳性部位较对照组增多,反应范围较宽,颜色较深,以前角明显(图 1、2)。扫描显微镜分光光度计定量分析结果显示治疗组脊髓 AChE 活性非常显著地高于对照组(P < 0.001)。见表 1。

2.2 神经递质 SP 免疫组织化学研究结果 在光镜下可见正常组 SP 免疫活性分布于脊髓灰质后角,呈点状,散在分布,呈棕褐色。术后 7 天,对照组脊髓后角 SP 免疫活性明显

低于正常组,分布疏散,颗粒减少,变细,颜色变浅;治疗组脊髓灰质后角 SP 免疫活性低于正常组,但高于对照组,颗粒较对照组粗,颗粒分布密度增大(图 3、4)。扫描显微镜分光光度计定量分析显示治疗组脊髓 SP 活性非常显著地高于对照组(P < 0.001)。见表 1。

表 1 对照组和治疗组脊髓 AChE 及 SP 活性定量结果(OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	AChE(n= 8)	SP(n= 5)
治疗组	164528 ± 86469*	46203 ± 9274*
对照组	53954 ± 13036	13978 ± 3418

注 治疗组与对照组比较* P < 0.001

3 讨论

本实验从对照组术后 7 天取材标本 AChE 反应出现以下特点:(1)酶扩散:在残存的神经元胞体及轴突中 AChE 失去正常颗粒样定位而成为均质状;死亡的神经元中 AChE 扩散至灰质中而使背景着色加深,胞体着色变浅或消失。(2)酶活性减低:与正常脊髓相比 AChE 着色变浅。(3)酶活性消失:部分标本显示前角神经元轮廓消失,成为空洞,且背景 AChE 亦减弱或消失。推测发生这种改变的机制为神经元因缺血缺氧导致细胞生物学效应停顿,从而使 AChE 合成减少,活性减低。应用鹿丹通督片治疗后,尽管损伤区脊髓 AChE 活性亦发生类似的改变,但与对照组相比前角运动神经元仍保持良好形态,且 AChE 活性高于对照组 4 倍以上(P < 0.001),说明该药显著保护了前角运动神经元的功能。

正常家兔 P 物质 PAP 免疫组织化学显色主要分布于脊髓后角,呈链珠样。本实验观察到对照组术后 7 天脊髓后角 P 物质出现扩散及活性降低,并可见链珠样结构模糊或消失。由于 SP 主要存在于一级传入神经纤维轴浆及终末^[5],因此脊髓 P 物质改变实际上取决于传入神经纤维及轴突的变化。从观察结果分析,受压后脊髓水肿及继发性损害可能造成传入神经纤维及轴突破坏。P 物质活性降低和消失表明传入纤维及终末的损害,该损害的结果导致痛觉或伤害性刺激传入途径的中断,引起肢体感觉障碍和低级反射弧及中枢传导途径的中断。在治疗组,动物脊髓后角 SP 活性亦有一定程度降低,但与对照组免脊髓相比,P 物质链珠样结构较为完整,较少扩散,且扫描显微镜分光光度计定量分析结果显示活性高于对照组 4 倍左右(P < 0.001),说明鹿丹通督片对脊髓传入神经终末有保护作用。

(本文图 1~ 4 见插页 2)

参考文献

[1] 李同生. 中医治疗腰椎管狭窄症. 湖北中医杂志, 1983, 7(5): 30-32.

[2] 时光达, 陈宝兴. 实验骨伤科学. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 229-230.

[3] Nystrom B. Methodological analysis of experimental spinal cord compression model in the rat Acta Neurol Scand, 1988, 78: 460-464.

[4] 艾民康. 神经递质及有关酶类的组织化学. 北京: 人民卫生出版社, 1989. 106-133.

[5] 韩济生. 中枢神经递质概论. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1990. 69-71.

(收稿: 1999 10 20 再修回: 2000 04 20 编辑: 房世源)

鹿丹通督片对兔脊髓压迫模型神经递质的影响

(正文见 79 页)

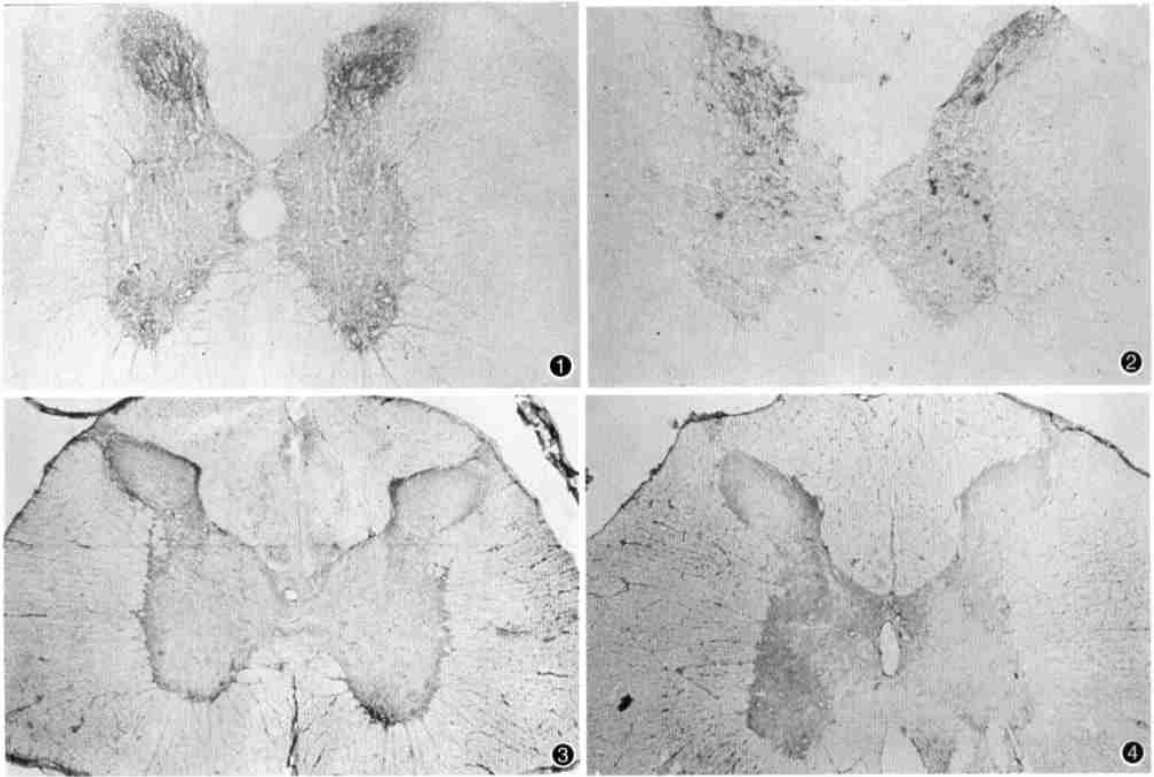


图1 治疗组脊髓组织中 AChE 分布情况。EL-Badawi 及 Schenk 改良法染色 $\times 40$ 图2 对照组脊髓组织中 AChE 分布情况。EL-Badawi 及 Schenk 改良法染色 $\times 40$ 图3 治疗组脊髓组织中 SP 分布情况。免疫组化 Sternberger PAP 技术改良法 $\times 40$ 图4 对照组脊髓组织中 SP 分布情况。免疫组化 Sternberger PAP 技术改良法 $\times 40$

黑虎丹治疗兔骨关节炎的实验研究

(正文见 85 页)

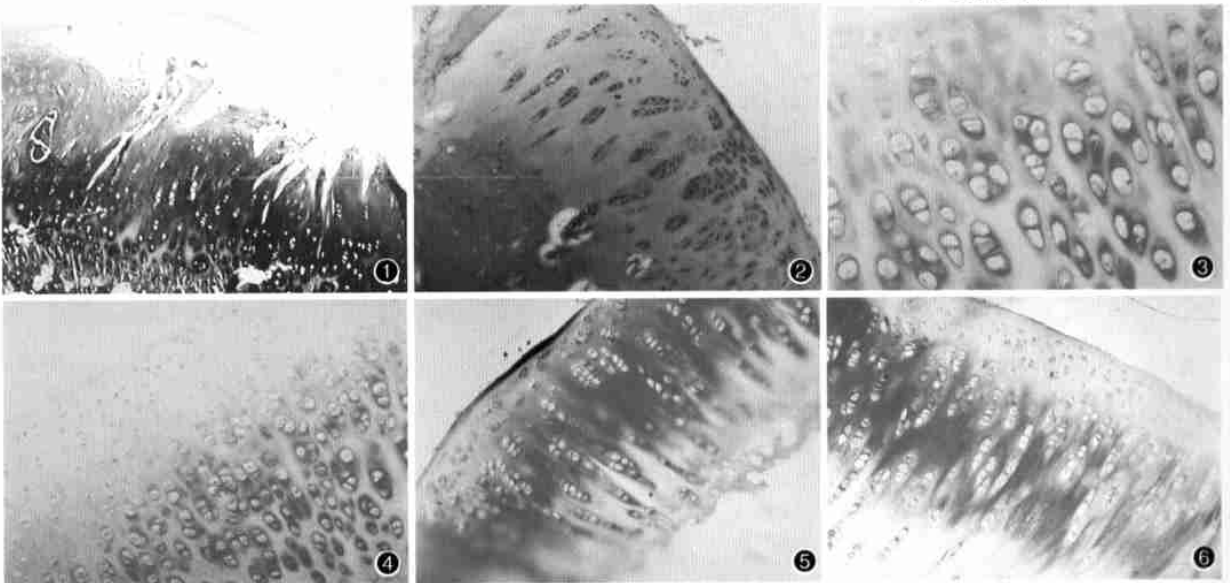


图1 16周时对照组形态学观察,软骨出现裂隙,深达软骨放射层。甲苯胺蓝 $\times 300$ 图2 16周时用药组形态学观察,可见大量增生呈巢状的软骨细胞。HE $\times 300$ 图3 16周时对照组免疫组化染色,见阳性染色物质位于细胞核中。DAB 显色,甲基绿复染 $\times 600$ 图4 16周时用药组免疫组化染色,见 PCAN 阳性细胞主要分布于软骨表层。DAB 显色,甲基绿复染 $\times 600$ 图5 20周时对照组末端原位标记,见凋亡细胞主要分布于软骨表层。DAB 显色,甲基绿复染 $\times 300$ 图6 20周时用药组末端原位标记,见凋亡细胞主要分布于软骨表层。DAB 显色,甲基绿复染 $\times 300$