

• 实验研究 •

髓复康对脊髓半横断大鼠背根节 CGRP 表达的影响*

韩凤岳 唐军民** 刘卫东 唐岩** 张平 苏衍萍** 常超英 曲鹏** 刘恩
中国中医研究院骨伤科研究所(北京 100700)

【摘要】 目的 研究中药髓复康对脊髓损伤后,背根节(DRG)神经元降钙素基因相关肽(CGRP)表达的影响。探讨髓复康效应的机理。方法 造成下胸髓半横断损伤的 Wistar 大鼠模型,用免疫细胞化学法和定量图像分析法检查 CGRP 表达的变化。结果 ①脊髓半横断引起同侧首、尾侧各 3 个 DRG 内,CGRP 表达的明显和持续性下调;②损伤后给服髓复康冲剂,可以明显减轻,但不能完全阻止,脊髓损伤诱发的 CGRP 表达下调;③损伤后给服中药补阳还五汤(或用大剂量的氢化考地松)治疗,不能减轻脊髓损伤诱发的 CGRP 表达下调;④脊髓损伤后服用髓复康的大鼠,其脊髓损伤区有明显的修复再生。结论 结果不仅表明 CGRP 表达的变化与脊髓组织的损伤和再生有一定的关联;而且也表明,髓复康通过对 CGRP-mRNA 表达的调制,影响神经元 DNA 的合成,可能是它促进脊髓损伤组织的修复再生的机理之一。此假设还需进一步确认。

【关键词】 中药 脊髓再生 背根神经节 CGRP 表达

Effect of Chinese Herb(Suifukang) on CGRP Expression in Located Dorsal Root Ganglia in Rats with Spinal Cord Hemitranssection Han Fengyue, Tang Junmin, Liu Weidong, et al. Institute of Orthopaedics and Traumatology, China Academy of TCM (Beijing 100700)

【Abstract】Objective To study effect of Suifukang on calcitonin gene related peptide (CGRP) expression in dorsal root ganglia(DRG) after spinal cord injury and to inquire into mechanism of Suifukang effect. **Methods** To make model of right hemitranssection at the lower thoracic spinal cord of Wistar rats and to evaluate changes of CGRP expression with immunocytochemistry and quantitative image analysis. **Results** ①Spinal cord hemitranssection caused a significant downregulation of CGRP expression in ipsilateral 3 DRGs rostral and caudal to the injury level respectively. The downregulation of CGRP expression was consistent and irreversible during one month after spinal cord injury. ②The down-regulation of CGRP expression was evidently relieved but not blocked completely with administration of Suifukang. ③The downregulation of CGRP expression induced by spinal cord injury could not be relieved with administration of Buyanghuanwutang, or hydrocortisone in a large dose. ④The injured spinal tissue was repaired and regenerated in rats with administration of Suifukang. **Conclusion** The results not only suggest that there is relationship among injury, regeneration and CGRP expression in spinal cord, but also indicate that it may be one of mechanisms for promoting repair and regeneration of spinal cord injury that Suifukang modulates CGRP-mRNA expression to regulate synthesis of DNA in neurons. However, the suggestions need to be further confirmed.

【Key words】 Chinese herb Spinal cord regeneration Dorsal root ganglia CGRP expression

中药髓复康(前称脊髓 II 号)以前的研究表明,具 机理,需要用近代神经科学的方法和理论逐步阐明。有促进损伤脊髓组织修复再生的作用^[1,2]。其作用的 我们发现,大鼠脊髓半横断损伤,可以诱发区域性背根

* 国家中医药管理局 1998 年立项课题
** 北京医科大学组织胚胎学系(北京 100081)

神经节(DRG)内,降钙素基因相关肽(CGRP)表达的明显下调。并且提出,DRG内CGRP表达的变化,可以作为评定脊髓损伤及其修复再生的一个指标。本文的目的在于运用免疫细胞化学法和定量图像分析法检测,在脊髓半横断损伤后,服用髓复康对于DRG内CGRP表达的影响,和检验损伤脊髓组织的修复再生,是否与DRG内CGRP的表达有关联。

材料与方法

本实验共用 80 只 Wistar 大白鼠,雌雄兼有,开始实验时的体重在 110~ 140g 之间。75 只大鼠在戊巴比妥钠麻醉下,按无菌手术的要求进行下胸髓右侧半横断手术^[1]。术后随机分为 4 组,即空白对照组(BCG)、补阳还五汤组(BYG)、激素对照组(HCG)和髓复康组(SFK);每组各分术后 1、3、15、30 天等 4 个亚组(激素对照组无 30 天亚组),每亚组 5 只大鼠;另设正常对照组(NCG)5 只。在脊髓损伤手术后 1、3、15、30 天,分别处死各组动物,取出脊髓损伤节段头、尾侧各 3 个 DRG,立即放入 Bouin 氏液内固定。把同组每一亚组大鼠的 DRG,各包埋在一个石蜡块内,制备成 6 μ m 厚的石蜡切片。在一张载玻片上,裱有同组各亚组大鼠 DRG 的切片,每组各取 6 张同样的载玻片。4 张载玻片按 ABC 法进行免疫细胞化学染色^[3],以检测 DRG 神经元 CGRP 表达的情况;1 张载玻片按 ABC 法进行 CGRP 阴性对照染色;另一张载玻片进行 HE 染色。用 Leica Q500MC 型图像分析仪,对前 4 张载玻片逐张进行图像分析。在每一亚组动物的一张切片内,随机提取 5 个视野,主要进行 CGRP 标记细胞计数和定 CGRP 样免疫阳性反应物的光密度等二项分析。把每组 20 个视野测得的平均值再输入计算机,用 OXSTAT 软件进行统计

学处理。

结果

1. 实验动物行为的变化 损毁手术清醒后,实验大鼠右侧下肢呈现瘫痪,个别大鼠可以呈现截瘫。粗略观察,各组大鼠运动恢复的时间和程度,略有差别,参见表 1。

表 1 各组大鼠运动恢复时间的比较(单位:天)

组别	损伤即刻	开始恢复	达良时间
SFK	右后肢瘫	2 6	6 4
BYG	右后肢瘫	3 8	9 8
HCG	右后肢瘫	5 0	10 6
BCG	右后肢瘫	5 2	11 8

2. 在 CGRP 阴性对照样本,未见 CGRP 免疫阳性反应物。正常大鼠 DRG 神经元 CGRP 的表达非常活跃(图 1);而空白对照组大鼠 DRG 内 CGRP 表达明显下调(图 2)。

3. 在激素对照组和补阳还五汤对照组,大鼠 DRG 内 CGRP 表达也明显下调(图 3),与空白对照组所见基本相同(见表 2,3)。

4. 在脊髓损伤后服用髓复康的大鼠,DRG 内 CGRP 表达的情况(图 4),介于正常大鼠与其他三个对照组之间。就大鼠 DRG 内 CGRP 神经元的数量而言,髓复康组的明显多于其他三个对照组的,具有显著的统计学差异;但是,没有达到正常大鼠的水平,与正常大鼠相比也有显著性差异。髓复康组 CGRP 阳性反应物的光密度,已经达到或接近正常大鼠的水平,也明显地强于其他三个对照组,组间有显著性差异(见表 2,3)。

表 2 各组大鼠 CGRP 神经元数量比较($\bar{x} \pm s$, 单位:个)

组别	损伤 1 天	损伤 3 天	损伤 15 天	损伤 30 天	P 值*
SFK	22.35 \pm 2.04	26.05 \pm 1.98	23.50 \pm 1.52	21.85 \pm 1.31	
BYG	11.00 \pm 2.13	11.45 \pm 1.05	8.35 \pm 2.66	6.40 \pm 1.52	< 0.01
HCG	10.95 \pm 3.53	13.40 \pm 1.22	10.15 \pm 2.04	—	< 0.01
BCG	11.60 \pm 2.82	8.50 \pm 3.52	7.50 \pm 2.31	6.70 \pm 1.89	< 0.01
NCG		39.75 \pm 2.25			< 0.01

注 * SFK 组与其它组分别比较, t 检验的 P 值(表 3 同此)

表 3 各组大鼠 CGRP 阳性颗粒光密度平均值比较表($\bar{x} \pm s$)

组别	损伤 1 天	损伤 3 天	损伤 15 天	损伤 30 天	P 值
SFK	0.0729 \pm 0.006	0.0723 \pm 0.008	0.0610 \pm 0.010	0.0616 \pm 0.014	
BYHW	0.0179 \pm 0.006	0.0088 \pm 0.004	0.0094 \pm 0.004	0.0070 \pm 0.002	< 0.01
HCG	0.0050 \pm 0.002	0.0130 \pm 0.002	0.0112 \pm 0.004	—	< 0.01
BCG	0.0054 \pm 0.002	0.0082 \pm 0.004	0.0088 \pm 0.004	0.124 \pm 0.004	< 0.01
NCG		0.0691 \pm 0.002			> 0.05

5. 脊髓损伤区光镜所见 通过对脊髓损伤区水平切片的观察和比较,可以看出髓复康组大鼠脊髓损伤组织有明显的修复再生;空白对照组大鼠脊髓损伤区,未见可确认的神经组织再生;激素对照组和补阳还五汤对照组大鼠,脊髓损伤组织呈现一定程度的修复再生,但是不很理想。

讨论

1. 关于中药促进损伤脊髓修复再生效应的探讨

文献中报道的促进实验动物脊髓再生的方法很多,例如:①利用组织移植的手段促进损伤脊髓组织的修复再生。所用的移植物包括胚胎脑、脊髓组织、游离的周围神经、巨噬细胞、嗅束的鞘细胞^[4]、Schwann 氏细胞、星形胶质细胞、大网膜等等,都取得一些结果,但是在临床应用方面还有许多需要解决的问题;②利用神经生长因子、层粘蛋白等神经趋向(营养)物质促进脊髓损伤组织的修复再生^[5]。这是当前神经学研究的一个热点,其依据的基础理论是:在发育过程中,神经趋向物质是维持和促进中枢神经系统(CNS)生长、发育和分化的生物活性物。在发育后时期,由于神经趋向物质的缺乏,导致 CNS 丧失了修复再生能力。如果补充或激发损伤的 CNS 重新分泌某些神经趋向物质,就有可能激发 CNS 有效的再生。存在的问题是,在脊髓修复再生的实验中,其结果并不十分肯定,距临床应用还有相当大的距离;③利用一些药物促进脊髓损伤组织的修复再生。类固醇激素和生物活性肽类是研究的热点,但是临床效果并不太理想;④利用中医药促进损伤脊髓组织修复再生。一些实验和临床研究表明,某些中药在治疗脊髓损伤方面有一定的效果^[6,7],但是还需要下大力气深入研究。在过去的十几年,我们从病理组织学、电生理学和神经纤维束追踪术等方面,对髓复康进行了反复的实验研究。结果表明,髓复康促进大鼠脊髓修复再生的效应是比较确实的。概言之,髓复康的效应是:①可以明显地减小脊髓损伤波及的范围^[1,2];②可以促进损伤脊髓神经元的修复再生^[1,2];③可以促进路径脊髓损伤区的上、下行传导束的再生和轴浆传输功能的恢复^[3];④促进由脊髓损伤区中介的感觉诱发电位和运动诱发电位的恢复。本实验进一步表明,髓复康可以减轻脊髓损伤诱发的,背根节内 CGRP 表达的下调。

2. 关于髓复康促进脊髓修复再生机理的探讨 该方是根据中医活血化瘀、补气和补肾等治则组方的。根据近代中药药理研究的记载,组成髓复康的一些中药,具有明显的改善微循环、增加组织血流灌注量、提高组织细胞对缺血、缺氧的耐受性和加速清除自由基

等多方面的作用。另外,根据我们的经验,在脊髓损伤后 3 小时以内开始给药,效果较好;如果延迟给药(如手术损伤后 8~10 小时开始给药),其效果则明显下降或消失。这些驱使我们对其作用机理提出如下的解释:①髓复康可以迅速解除脊髓损伤区出现的循环障碍,有效地保护损伤周围区的脊髓组织,避免了循环障碍导致的继发性脊髓损伤,使脊髓损伤波及的范围明显缩小,为损伤的脊髓开拓一片良好的修复再生基地。

我们和文献资料^[8,9]都表明,脊髓损伤可以影响 CGRP 的表达,这表明脊髓损伤通过 CGRP mRNA 影响神经元 DNA 的合成。试称其为“脊髓损伤-CGRP mRNA-DNA 链”。我们的实验表明,髓复康可以介入“脊髓损伤-CGRP mRNA-DNA 链”。我们对髓复康促进脊髓修复再生效应的机理提出如下推测:②它可以通过对“脊髓损伤-CGRP mRNA-DNA 链”调制,激发脊髓组织的修复再生能力。诚然,中药复方的疗效机理是一个比较复杂的问题,要用实验说明一个复方的机理绝非一朝一夕的事情。所以,这里关于机理的讨论,只是初步的,今后需要进行深入的研究。

3. 关于脊髓损伤后背根节内 CGRP 表达变化意义的探讨 CGRP 是背根节神经元的一种公认的神经递质,许多情况可以诱发背根节 CGRP 表达的变化。背根节的 CGRP 神经元主要是中小型的,与伤害性刺激的传导和调整有密切关系(Gibson et al, 1984, 引自^[10]),伤害性刺激传入增多时,诸如背根节的炎症、交感神经切除、关节炎和皮炎等病变,可以导致背根节 CGRP 表达的上调,切断背根节神经元的中枢突、周围突,或周围神经的损伤,则导致 CGRP 表达下调;而且一些研究表明,神经损伤后及时给予适宜的治疗措施,诸如进行神经外膜缝合或投给 NGF 等,可以提高背根节 CGRP 的免疫反应性,进而可以提高背根节和脊髓后角区 CGRP 的表达程度。这些实验说明当 DRG 神经元突起损伤时,其核周体内 CGRP 表达下调。因为当脊髓损伤时,进入脊髓的背根传入纤维也会被损伤,所以应该说:脊髓损伤诱发背根节内 CGRP 表达下调是在意料中的。因此,它可以作为脊髓损伤的一个重要的指征。在我们的实验条件下,实验大鼠脊髓原发损伤的程度和范围是相同的,但是经过一个月不同的处置后,各组大鼠脊髓损伤的情况和 DRG 内 CGRP 表达的情况都出现明显的差异,而且脊髓损伤范围的大小和严重程度,与其诱发的 DRG 内 CGRP 下调的程度之间,存在一定程度的平行关系。由于服用髓复康对保存的脊髓组织有明显的保护作用,使脊髓损伤范围缩小,使损伤的脊髓组织和进入脊髓的背根节纤维在一定的范围内修复再

生,从而使脊髓损伤对背根节的打击减轻,所以 DRG 内 CGRP 表达下调的程度明显减轻。这进一步表明,在脊髓损伤的情况下,DRG 内 CGRP 下调的程度可以从一个侧面反映出,脊髓损伤的程度及其修复再生的情况。

(本文图 1~4 见插图页)

参考文献

1. 韩凤岳,徐迎红,沈叶,等. 中药治疗大鼠脊髓损伤的实验研究. 中国骨伤, 1995, 8(6): 5
2. 刘卫东,韩凤岳,景向红. 脊髓 II 号对大鼠脊髓轴浆运输的影响. 中国骨伤, 1997, 10(3): 15
3. 石善溶. 免疫组织化学技术. 成都: 四川科学技术出版社, 1986. 9~19
4. Ramon Cueto A, Plant GW, Avila J, et al. Long distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. J Neurosci, 1998, 18(10): 3803

5. Christensen MD, Hulsebosch CE. Spinal cord injury and anti-NGF treatment results in changes in CGRP density and distribution in the dorsal horn in the rat. Exp. Neurol, 1997, 147(2): 463
6. 胡侦明, 劳汉昌, 张宝华. 三七总皂甙治疗早期脊髓损伤的实验研究. 中华骨科杂志, 1996, 16(6): 384
7. 邹季, 龚梅芳, 魏玉玲, 等. 中医药治疗急性脊髓损伤的实验研究. 中医正骨, 1991, 3(3): 13
8. Krenz NR, Weaver LC. CGRP expression increases in the ventral horn rostral to spinal cord transection. Neuroreport, 1996, 7(18): 2859
9. Melinek R, Holets VR, Puckett WR, et al. Calcitonin gene related peptide (CGRP)-like immunoreactivity in motoneurons of the human spinal cord following injury. J Neurotrauma, 1994, 11(1): 63
10. Breiner LH, MacIntyre I, Zaidi M. Peptides from the calcitonin gene: molecular genetics, structure and function. Biochem J, 1988, (25): 377

(收稿: 1998-12-30; 修回: 1999-03-10)

中药加颈椎牵引治疗颈性眩晕

熊作炎

贵州省黔南州医院(558000)

我们采用中药与颈椎牵引,治疗 100 例颈性眩晕患者,效果满意,现报道如下。

临床资料 本组 100 例中男 43 例,女 57 例;年龄 30~80 岁;病程 3 月~15 年。所有病例均有眩晕,颈痛,颈椎旁肌肉痉挛,压痛,以 C₁、C₂ 棘突旁压痛最明显,无放射痛;45 例伴有耳鸣;33 例伴有眼花;28 例伴有恶心;22 例伴有手麻;65 例伴有头痛。所有患者均摄颈椎正侧位片,43 例加摄颈椎双斜位片,其中 83 例显示颈椎有不同程度骨质增生,颈椎生理曲度变直 74 例,钩椎关节增生 59 例。

治疗方法 (1) 坐位颈椎牵引:牵引重量从 2~3kg 开始,渐增至 5~7kg,每日 2 次,每次 1 小时。(2) 中药治疗:丹参、赤芍、川芎、葛根、桃仁、红花、归尾各等量。煮沸,酒精沉淀后装瓶备用。每次口服 30ml,每日 3 次。以上治疗,10 天为 1 疗程。

治疗结果 本组随访 0.5~1 年,平均 9 个月。显效 20 例:眩晕、颈痛、耳鸣、眼花、恶心、手麻消失;有效 67 例:上症状减轻;无效 13 例:治疗 3 疗程症状无改

善。1 疗程 15 例,2 疗程 72 例,3 疗程 13 例。

讨论 颈性眩晕主要表现为颈部扭转或后伸时出现眩晕,耳鸣,恶心,肢体麻木等脑部缺血现象,原因是椎动脉受阻或受压所致。牵引治疗可以减轻椎间压力,拉紧黄韧带,使椎管容量增大,解除椎间盘等对椎动脉及神经根的刺激或压迫,并使血管恢复正常弧度,从而使椎动、静脉血流增加,改善了脑部血供。中药丹参具有扩张周围血管,扩张冠状血管,改善血液流变性作用;川芎具有扩张小动脉,并能通过血脑屏障,有利于中枢神经系统及脑血管病变恢复,对去甲基肾上腺素引起的血管收缩有明显抑制作用,使血管管径扩张;赤芍有镇痛作用;葛根除扩张血管外,尚能引经上行,使诸药更好发挥作用;桃仁、红花、归尾具有降低血液粘度、扩张血管及镇痛作用。通过诸多扩血管药共同作用,加上牵引,在药物及物理的双重作用下,则收到了较好的治疗效果。

(收稿: 1996-05-15)