

脉络宁注射液对面肌痉挛兔面神经内降钙素基因相关肽表达的影响

王孝文¹ 胡海涛¹ 窦万臣² 许杰华¹ 杨养贤³

摘要 目的 探讨脉络宁注射液对面神经损伤的保护机制。**方法** 采用兔颞浅动脉压迫,已人为脱髓鞘变的周围面神经主干,通过电生理技术检测面肌痉挛特有的异常肌反应,建立兔面肌痉挛动物模型。用脉络宁注射液自耳缘静脉推注持续 2 周给药,采用免疫组化等方法,观察脉络宁注射液对面神经内降钙素基因相关肽(CGRP)表达的变化。**结果** 脉络宁组动物面神经内 CGRP 的表达明显高于模型组($P < 0.01$),假手术组动物面神经内未见 CGRP 免疫反应阳性纤维。模型组动物面神经纤维溃变明显,髓鞘松解分离,轴突肿胀有空泡或全部消失;脉络宁组动物面神经病变较轻。**结论** 脉络宁注射液对面肌痉挛脱髓鞘面神经有明显的保护作用,与其能促进面神经内 CGRP 的表达密切相关。

关键词 脉络宁注射液;面神经;降钙素基因相关肽;面肌痉挛

Effect of Mailuoning Injection on Calcitonin Gene-related Peptide Expression in Facial Nerve of Rabbits with Facial Spasm WANG Xiao-wen, HU Hai-tao, DOU Wan-chen, et al *Department of Human Anatomy, Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an (710061)*

Abstract Objective To investigate the mechanism of Mailuoning injection (MLN) in protecting facial nerve from injury. **Methods** The New Zealand white rabbit model with facial spasm was established by compressing superficial temporal artery to make artificial demyelinated lesion of the main peripheral facial nerve trunk. The successful establishment was confirmed by using electrophysiological technique to determine abnormal muscle response (AMR) which is a characteristic for facial spasm. MLN was injected continuously through ear marginal vein for 2 weeks. The change of CGRP expression in facial nerve was detected by immunohistochemical technique. **Results** As compared with the model group, CGRP expression in facial nerve was significantly increased in the MLN group ($P < 0.01$), and CGRP immunoreactive positive fibers were not seen in the sham-operation group. In the model group, the facial nerve fibers degenerated obviously, myelin sheath loosened and dissociated, the turgent axons with vacuole or even completely disappeared. But the facial nerve lesion was lessened in the MLN group. **Conclusion** MLN has a significant protective effect on facial nerve demyelination in rabbits with facial spasm, which is closely related with its effect in improving CGRP expression in the facial nerve.

Key words Mailuoning injection; facial nerve; calcitonin gene-related peptide; facial spasm

脉络宁治疗周围神经微循环障碍和缺血缺氧病变可取得满意疗效^[1,2],但迄今为止未见其用于治疗面肌痉挛的相关文献报道。为进一步探索面肌痉挛的发病机制和有效的治疗手段,本研究用新西兰大白兔建立了面肌痉挛动物模型,观察了脉络宁注射液对面神经

内降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)表达的影响和脱髓鞘面神经的保护作用,旨在为面肌痉挛的治疗提供实验依据。

材料与方法

1 动物及分组 健康成年新西兰大白兔 36 只,雌雄不限,体重 2.0~2.5 kg(西安交通大学医学院实验动物中心提供,合格证号:陕医动字 08-018)。随机分为 3 组:假手术组 6 只,模型组和脉络宁组各 15 只。

2 面肌痉挛动物模型的建立 参照李善泉等^[3]

作者单位:1. 西安交通大学医学院解剖学教研室(西安 710061); 2. 中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院神经外科;3. 西安交通大学第一医院中医科

通讯作者:王孝文,在读博士, Tel: 13891951859, E-mail: wangxiaowen 2003@126.com

的方法,将 3 组动物用 1% 戊巴比妥钠水溶液腹腔注射麻醉(3.0 ml/kg),在 SXQ-II 手术显微镜下分离模型组和脉络宁组兔茎乳孔处的面神经主干,长约 0.5~1.0 cm,将数根 1~2 mm 长的铬制肠线轻置于面神经周围,14~21 天后再手术分离同侧颞浅动脉,动脉下置小块涤纶片使其与面神经接触,术毕视面神经随动脉搏动而即刻缝合皮肤;假手术组动物只切开组织分离面神经主干和颞浅动脉,但不使二者接触,然后缝合皮肤。术后第 6 周对 3 组动物行电生理检测,模型组和脉络宁组各有 13 只动物诱发出异常肌反应,表明面肌痉挛动物模型成功,其余动物未见异常肌反应。然后对脉络宁组动物自耳缘静脉推注脉络宁注射液(主要成分为玄参、牛膝等,每支 10 mg/10 ml,南京金陵制药厂生产,批号 200105252)2 ml/kg,每天 1 次;假手术组和模型组均推注等量的生理盐水,持续 2 周。

3 CGRP 免疫反应水平检测

3.1 CGRP 免疫组化染色 取 3 组动物面神经,石蜡包埋,纵向连续切片(厚 5 μm),用抗 CGRP 抗体免疫组化试剂盒(博士德公司产品)ABC 法免疫组化染色:先于 60℃ 烤箱过夜,再经二甲苯脱蜡、系列酒精脱水,然后依次甲醇、3% 过氧化氢室温封闭 15 min,复合消化液 37℃ × 10 min,正常山羊血清封闭 37℃ × 50 min,抗 CGRP 抗体(即用型)4℃ 过夜,生物素结合的羊抗兔 IgG 37℃ × 1 h,链卵白素结合的 HRP 37℃ × 40 min,DAB 显色;用正常山羊血清代替一抗作空白对照。

3.2 图像分析 采用 CMIAS 图像分析系统(北京航空航天大学)在 20 倍镜下于每张切片各随机选取 4 个视野,分别测量其阳性反应物相对面积比(阳性反应物面积总和占视场面积的百分比)和平均目标灰度值(所测阳性反应物面积的平均灰度),免疫反应的强弱与灰度值成反比关系。取各视野的平均值作为该标本的观测值。

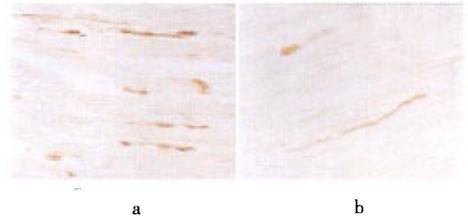
4 面神经纤维的光、电镜观察 取面神经标本分别置于 4% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛中 4℃ 过夜。行光镜观察的标本采用常规石蜡包埋,面神经纤维纵向连续切片(厚 5 μm),HE 染色,Olympus 显微镜下观察;行电镜观察的标本按常规步骤制作标本和超薄切片,醋酸双氧钨及柠檬酸铅双染色,透射电镜观察。

5 统计学处理 用 SPSS 10.0 统计软件进行数据处理,组间比较用 *t* 检验。

结 果

1 CGRP 免疫组化染色 脉络宁组(图 1a)和模

型组(图 1b)面神经纤维均见有棕黄色的 CGRP 免疫反应阳性物质,由于轴突异常肿胀变粗、断裂集聚而呈现圆形、卵圆形、弯曲及不规则样变等形态。假手术组面神经未见 CGRP 阳性反应物。



注:a 为 脉络宁组 b 为模型组

图 1 两组面神经内 CGRP 免疫反应阳性表达 (×400)

2 图像分析 见表 1。脉络宁组动物面神经内 CGRP 阳性反应物平均灰度值明显低于模型组 ($P < 0.01$),相对面积比明显高于模型组 ($P < 0.01$)。

表 1 两组动物面神经内 CGRP 阳性表达平均灰度值和相对面积比比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	平均灰度	相对面积比 (%)
脉络宁	13	106.32 ± 11.46*	13.36 ± 3.26*
模 型	13	139.26 ± 6.72	8.68 ± 5.96

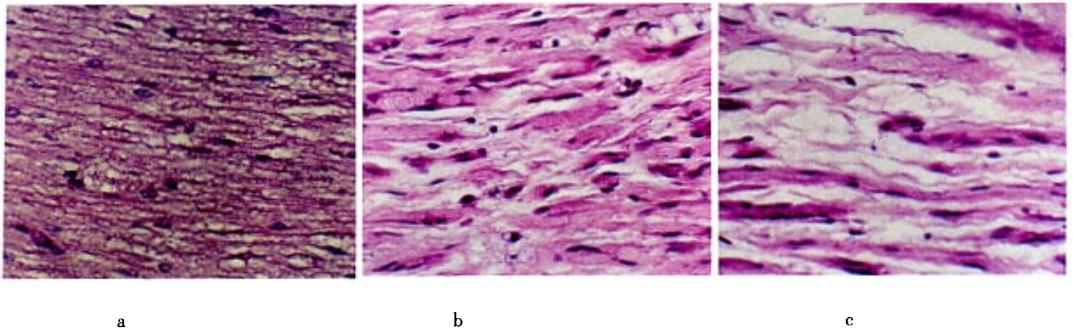
注:与模型组比较,* $P < 0.01$

3 面神经光镜观察结果 假手术组面神经纤维髓鞘连续完整,可见完整明显的郎飞氏结,扁平的 Schwann 细胞核嵌于髓鞘外(见图 2a)。脉络宁组面神经纤维可见轴突肿胀,髓鞘松散,病变较轻(见图 2b)。模型组面神经纤维溃变明显,连续性中断,轴突肿胀或消失,髓鞘疏松或脱失,可见髓鞘和轴突同时脱失后的空白区(见图 2c)。

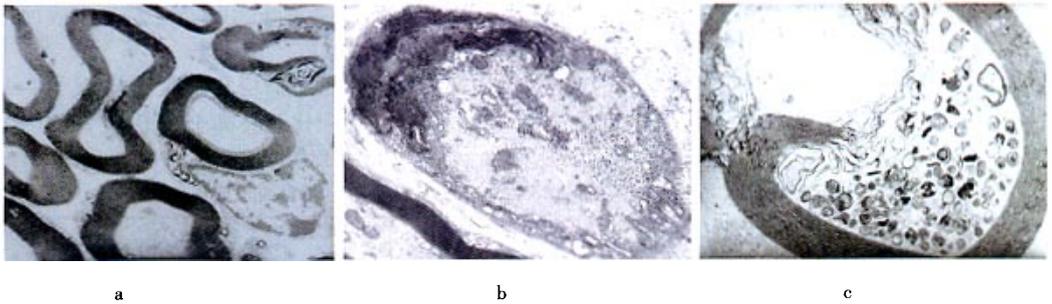
4 面神经电镜观察结果 假手术组动物面神经纤维轴突髓鞘完整,轴突居中,向外依次为髓鞘、薄层 Schwann 细胞质层,可见 Schwann 细胞(见图 3a)。脉络宁组动物面神经纤维轴突肿胀,可见髓鞘松解脱失变薄,但轴突基本完整(见图 3b)。模型组动物面神经纤维髓鞘松解脱失和轴突异常肿大,并可见髓鞘松解断裂向肿胀的轴突内突起,轴突内形成泡状结构及不规则形透明空泡区(见图 3c)。

讨 论

面肌痉挛是半侧面肌不自主抽搐样收缩,其病变面神经均以髓鞘分解和轴突扭曲变性为该病的主要组织学改变^[4]。杨海贤等^[5]发现面神经内微血管严重损害,一是自由基介导的血管慢性缺氧损伤,二是血管内皮细胞变性导致微血管结构的严重损害。本研究观察到受压迫的面神经发生明显的脱髓鞘变化,由此表明桥小脑角区面神经受微血管压迫,面神经及其外膜、束



注:a 为假手术组;b 为络络宁组;c 为模型组
图 2 3 组动物面神经纤维光镜观察结果 (×400)



注:a 为假手术组;b 为络络宁组;c 为模型组
图 3 3 组动物面神经纤维电镜观察结果 (×5 000)

膜和内膜血管均受损伤,从而引起血流动力学的一系列变化导致面神经的微循环障碍,引起神经组织缺血缺氧和微血管内皮细胞的破坏,继之破坏血-神经屏障,导致神经内膜水肿。此过程在面神经内部周而复始形成恶性循环,最终造成面神经纤维的脱髓鞘病变。

CGRP 由 37 个氨基酸组成,广泛分布于周围和中枢神经系统,在神经再生中具有神经营养功能。但 CGRP 在神经系统中的分布极不均衡,只有神经细胞受到损伤等因素的影响时,其表达才显著升高^[6]。许多实验发现,大鼠海马脑片缺氧损伤后,CGRP 可降低高阈值 Ca^{2+} 内流,降低细胞内 Ca^{2+} 浓度,抑制 c-fos 的表达,降低缺氧海马神经元的死亡率,并且对缺氧的培养海马神经元有保护和功能的恢复作用^[7],对培养的血管内皮细胞缺氧再给氧具有抗脂质过氧化作用^[8]; CGRP 可舒张脑微血管,显著改善缺血脑组织血流量,参与缺血后神经元修复及保护等^[9]。本研究发现,面神经受压后,神经纤维发生明显的 Waller 氏样改变,轴突局部有空泡,甚至全部消失,髓鞘板层分离、松解及脱失;同时面神经内 CGRP 的表达升高,可以改善神经纤维的缺血缺氧状况,促进损伤面神经纤维的再生和修复,发挥其对神经纤维的营养功能。

络络宁注射液是在著名医方“四妙勇安汤”的基础上研究成的中药复方注射剂,由牛膝、玄参、麦冬、石斛等中药组成,具有滋补肝肾、养阴清热、活血化瘀的功

效。药理研究证明,具有扩张血管、增加血流、清除自由基、提高组织和器官抗缺血缺氧能力及改善微循环的功能^[1]。本实验发现络络宁组和模型组面神经内 CGRP 表达均升高,但络络宁组显著高于模型组;同时光、电镜观察显示络络宁组面神经纤维损伤程度较模型组减轻。表明应用络络宁后,一方面络络宁可发挥活血化瘀、增加血流量、改善微循环、促进血管内皮细胞的增殖,同时减轻了因面神经损伤而引起的面神经核团的病变,增强了面神经核团合成及其向面神经运输 CGRP 的功能;另一方面,CGRP 表达升高以后,又发挥了其营养神经的作用,由此表明络络宁对面神经脱髓鞘损伤具有明显的保护作用,与其可增强损伤面神经内 CGRP 的表达有密切的关系。因此,本研究的结果可为进一步明确面肌痉挛的发病机制及应用络络宁和 CGRP 治疗面肌痉挛提供可靠的实验依据。

参 考 文 献

- 刘筱嵩,吴伟康.中药防治脑缺血再灌注损伤的研究.中国中西医结合杂志 2001;21(10):794—796.
Liu XA, Wu WK. Researches on prevention and treatment of reperfusion injury in cerebral ischemia by Chinese herbal medicine. Chin J Intergr Tradit West Med 2001;21(10):794—796.
- 于 锋,金亦涛,綦春玉,等.络络宁注射液药理研究进展.中国新药杂志 2002;11(2):920—924.
Yu F, Jin YT, Qi CY, et al. Progress of pharmacology research

- on Mailuoning injection. Chin J New Drugs 2002;11(2):920—924.
- 3 李善泉,海舰,万杰青,等.面肌痉挛动物模型的建立及其机制探讨.中国临床神经科学杂志 1999;7(3):151—153.
Li SQ, Hai J, Wan JQ, et al. The animal model of hemifacial spasm and its pathogenesis. Chin J Clin Neurosci 1999;7(3):151—153.
- 4 Kemp LW, Reich SG. Hemifacial spasm. Curr Treat Options Neurol 2004;6(3):175—179.
- 5 杨海贤,白景文,沈伟,等.半面痉挛患者面神经损伤的超微结构观察.天津医科大学学报 2002;8(3):299—301.
Yang HX, Bai JW, Shen W, et al. Study on ultrastructural injuries of facial nerves in patients with hemifacial spasm. J Tianjin med Univ 2002;8(3):299—301.
- 6 Batten TF, Maqbool A, Mcwilliam PN. CGRP in brain stem motoneurons. Dependent on target innervated? Ann N Y Acad Sci 1992;657:458—460.
- 7 王福庄,丁爱石.海马培养细胞的缺氧损伤及降钙素基因相关肽的保护作用.中国应用生理学杂志 1994;10(4):317—321.
Wang FZ, Ding AS. Anoxic injury of cultured hippocampal neurons and protective effect of calcitonin gene-related peptide. Chin J Appl Physiol 1994;14(3):317—321.
- 8 任雨笙,吴宗贵,俞世强,等.降钙素基因相关肽对培养的内皮细胞缺氧再给氧的影响.中国病理生理杂志 2001;17(2):101—103.
Ren YS, Wu ZG, Yu SQ, et al. Effects of calcitonin gene-related peptide on cultured human umbilical vein endothelial cells following anoxia and reoxygenation. Chin J Pathophysiol 2001;17(2):101—103.
- 9 Holland JP, Sydeserff SG, Taylor WA, et al. Calcitonin gene-related peptide reduces brain injury in rat model of focal cerebral ischemia. Stroke 1994;25(10):2055—2058.
(收稿:2005-04-13 修回:2005-07-13)

临床学家当耐得住寂寞 ——从诺奖授予临床学家谈起

中国科学院院士 陈可冀

2005 年诺贝尔生理学或医学奖授予澳大利亚临床病理学家罗宾·沃伦 (Robin Warren) 和消化科临床医生巴里·马歇尔 (Barry Marshall) 分享,这一重大决定不仅表彰了这两位医生在发现幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 导致胃炎、胃和十二指肠溃疡发病中的重要作用的成就,也激励了临床学家们在防治各类危害人民健康的疾病中,应加强临床医学与基础医学的紧密合作,为救助各种病痛,创新性地作出富有成效的新贡献。

Hp 是一端有鞭毛的螺旋状微需氧菌,格兰氏染色阴性,由粪→口途径或口→口途径传播。Hp 在发达国家人群中感染率约 30%,在我国及发展中国家约高达 50% 以上。感染后在胃黏膜呈点片状分布,主要定植于胃窦部及胃体部黏膜;Hp 可穿透黏液层,定居于黏膜上皮表面,并可分泌多种毒素;因 Hp 富含尿素酶,可不受胃酸侵袭或破坏,日久便可招致慢性萎缩性胃炎、胃及十二指肠溃疡。现已确认, Hp 感染是胃和十二指肠溃疡发病的先决条件,这一病因学理念的变革,促发了胃和十二指肠溃疡治疗学上的一场革命,也就是说不论胃和十二指肠溃疡是初发还是复发,都要应用抗 Hp 感染的抗菌药物治疗,使其复发率从过往的 80% 左右下降到 2% 左右,并发症发生率也显著减少,很多患者得以根治。当然,由于 Hp 栖息生存环境的特殊性,单一药物治疗常难根除,所以现时国内外都采用综合疗法,并探索其最佳综合方案(我国还进行中西医结合治疗),同时监控耐药性及不良反应;Hp 疫苗的制成或许可提供更满意的防治成效。从现有情况看,抗 Hp 感染还存在 10%—20% 或更多的失败率,以及 2% 以上的复发率,所以防治任务任重道远!

Hp 发现至今已事隔 20 余年,沃伦和马歇尔也已是多年的候选人,晚至今年方被授奖,这给临床学家一个很重要启示,即一切临床学家都应该以事业为重,耐得住寂寞;我们还应该看到,临床各学科常见的疾病病因、诊断、治疗、预防等许多不被看重的未知,还未被引起关注;更未引起卫生和科技部门决策者的应有的重视,应该从政策和立项上给临床医学研究以应有的垂注,并鼓励临床医生去创新,为人类造福!

(收稿:2005-10-08)