

芫花根醇提颗粒联合甲基泼尼松龙对脊髓损伤大鼠 BDNF、NMDA 表达及行为学的影响

许争光¹ 杨 峻¹ 吕志平¹ 王廷华² 李晓松¹ 刘江华¹ 赵 楠³ 习阳彦斌²

摘要 **目的** 研究芫花根醇提颗粒(金腰带)联合甲基泼尼松龙对脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)大鼠行为学、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)表达及 N-甲基-D-门冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)水平的影响。**方法** SD 成年雄性大鼠,随机分为假手术组、脊髓挫伤组(模型组)、金腰带组[灌胃金腰带 50 mg/(kg·d),共 5 天]、甲基泼尼松龙组(脊髓挫伤术后 8 h 内肌肉注射 50 mg/kg 甲基泼尼松龙,此后甲基泼尼松龙剂量每天减少 10 mg/kg,共 5 天)及联合组(金腰带和甲基泼尼松龙联合干预)。各组大鼠均在术后(0、3、7、28 天)进行后肢行为学评价[神经行为学(Basso Beattie and Bresnahan, BBB)评分]。术后 13 天,每组取 8 只大鼠,麻醉后取损伤脊髓 T₈₋₁₀ 液氮中保存,采用 [³H]MK-801 放射性配基分析法测定 NMDA 受体亲和力(Kd)和最大结合数量(Bmax);取术后 28 天大鼠损伤脊髓,采用免疫组织化学法检测 BDNF 表达。**结果** 与假手术组比较,模型组腹角和背角 BDNF 阳性神经元数量升高, Bmax(470 ± 34)升高, Kd 降低, 术后 3 ~ 28 天 BBB 评分降低, 差异有统计学意义(P < 0.05)。与模型组比较,各给药组 BDNF 阳性神经元数量及 Kd 升高, 术后 3 ~ 28 天 BBB 评分升高(P < 0.05), Bmax[甲基泼尼松龙组:660 ± 15, 金腰带组:646 ± 25, 联合组:510 ± 21]降低(P < 0.05)。与甲基泼尼松龙组比较,金腰带组及联合组 BDNF 阳性神经元数量及 Kd 升高(P < 0.05), 术后 7 ~ 28 天 BBB 评分升高(P < 0.05), Bmax 降低(P < 0.05)。与金腰带组比较,联合组 BDNF 阳性神经元数量及 Kd 升高(P < 0.05), Bmax 降低(P < 0.05)。**结论** 金腰带能有效改善 SCI 大鼠后肢运动功能,增加脊髓组织中 BDNF 的表达,通过影响脊髓 NMDA 受体减轻脊髓继发性损伤,对 SCI 有一定的治疗与保护作用,效果优于甲基泼尼松龙且与其有协同作用。

关键词 芫花根醇提颗粒;甲基泼尼松龙;脊髓挫伤;神经行为学评分;脑源性神经营养因子;N-甲基-D-门冬氨酸

Effect of *Herba Lycopodii* Alcohol Extracted Granule Combined Methylprednisolone on Expression Levels of BDNF and NMDA and Behavior of Traumatic Spinal Cord Injury Rats XU Zheng-guang¹, YANG Jun¹, LV Zhi-ping¹, WANG Ting-hua², LI Xiao-song¹, LIU Jiang-hua¹, ZHAO Nan³, XIYANG Yan-bin² 1 Yuxi Municipal Hospital of Chinese Medicine, Yunnan (653100); 2 Institute of Neuroscience, Kunming Medical College, Kunming (650031); 3 Department of Neurosurgery, First People's Hospital of Kunming City, Kunming (650031)

ABSTRACT **Objective** To study different effects of *Herba Lycopodii* (HL) Alcohol Extracted Granule combined methylprednisolone on behavioral changes, brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression levels, and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor levels in rats with spinal cord injury (SCI). **Methods** Male adult SD rats were randomly divided into five groups, i.e., the sham-operation group, the model group, the HL treatment group, the methylprednisolone treatment group, the HL + methylprednisolone treatment group. Rats in the HL treatment group were intragastrically administered with HL at the daily dose of 50 mg/kg for 5 successive days. Rats in the methylprednisolone treatment group were intramuscu-

基金项目:玉溪市科技合作专项计划项目

作者单位:1.云南省玉溪市中医医院(云南 653100);2.昆明医学院神经科学研究所(昆明 650031);3.云南省昆明市第一人民医院神经外科(昆明 650031)

通讯作者:许争光, Tel:13608774807, E-mail: xuzhengguang@yeah.net

DOI: 10. 7661/CJIM. 2015. 08. 1004

larly injected with 50 mg/kg methylprednisolone within 8 h after spinal cord contusion, and then the dose of methylprednisolone was reduced for 10 mg/kg for 5 successive days. Rats in the HL + methylprednisolone treatment group received the two methods used for the aforesaid two groups. Basso Beattie and Bresnahan (BBB) score (for hindlimb motor functions) were assessed at day 0, 3, 7, and 28 after operation. At day 13 after SCI, injured spinal T_{8-10} was taken from 8 rats of each group and stored in liquid nitrogen. The N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor affinity (Kd) and the maximal binding capacity (Bmax) were determined using [3 H]MK-801 radioactive ligand assay. Rats' injured spinal cords were taken for immunohistochemical assay at day 28 after SCI. Expression levels of BDNF in the ventral and dorsal horn of the spinal cord were observed. Results Compared with the sham-operation group, the number of BDNF positive neurons in the ventral and dorsal horn of the spinal cord increased in the model group, Bmax increased (470 ± 34), Kd decreased, and BBB scores decreased at day 3–28 (all $P < 0.05$). Compared with the SCI model group, the number of BDNF positive neurons and Kd increased, BBB scores at day 3–28 increased ($P < 0.05$) in each medicated group. Bmax was (660 ± 15) in the methylprednisolone treatment group, (646 ± 25) in the HL treatment group, and (510 ± 21) in the HL + methylprednisolone treatment group ($P < 0.05$). Compared with the methylprednisolone treatment group, the number of BDNF positive neurons and Kd increased, BBB scores at day 7–28 increased, and Bmax decreased in the HL treatment group and the HL + methylprednisolone treatment group (all $P < 0.05$). Compared with the HL treatment group, the number of BDNF positive neurons and Kd increased, and Bmax decreased (all $P < 0.05$). Conclusions HL could effectively improve motor functions of hindlimbs, increase expression levels of BDNF in the spinal cord, and lessen secondary injury by affecting spinal levels of NMDA receptors. It showed certain therapeutic and protective roles in treating SCI. Its effect was better than that of methylprednisolone with synergism.

KEYWORDS *Herba Lycopodii* Alcohol Extracted Granule; methylprednisolone; spinal cord contusion; neuroethological score; brain derived neurotrophic factor; N-methyl-D-aspartate

随着建筑和交通运输等现代工业的蓬勃发展,高空作业和交通意外发生率提高,导致脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的发生率也飞速提高。SCI 病死率、重残率都非常高,成为家庭和社区的沉重负担^[1]。甲基泼尼松龙是美国 FDA 批准唯一的治疗急性 SCI 用药;芫花根醇提颗粒(金腰带)是由玉溪市中医医院从湖南民间验方加工提炼而成(专利号:201110206281.2),临床应用中草药金腰带治疗急性 SCI 也取得较好效果^[2]。脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)在神经元发育和神经损伤修复中具有重要作用,是一个十分重要的因子^[3-5];内源性兴奋性氨基酸的释放对损伤的中枢神经系统有毒性作用,N-甲基-D-天门冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)作为一种兴奋性氨基酸,其在神经损伤修复中能诱导神经元凋亡^[6],分布在脊髓的 NMDA 受体,在中枢神经系统毒性损害中可能起主要作用^[7-10]。本实验旨在研究中草药金腰带和甲基泼尼松龙对 SCI 大鼠行为学、BDNF 表达及 NMDA 受体水平的影响差异,为金腰带用于 SCI 治疗提供理论依据。

材料与方法

1 动物 清洁级 SD 成年雄性大鼠 80 只,体重 180~220 g,由昆明医学院动物中心提供(屏障环境饲养 8 周),合格证号:SCXK(滇)0023930。

2 药物 甲基泼尼松龙(40 mg/瓶,比利时辉瑞制药有限公司,批号:A09026)。金腰带(由玉溪市中医医院按传统要求结合现代工艺加工制备成的芫花根醇提颗粒,1 g 相当于原生药 3 g。临用前用 1~2 mL 羧甲基纤维素钠与金腰带置于玻璃研钵中研磨至无明显颗粒或块状固体,然后继续加羧甲基纤维素钠至足量再研磨混匀,得到金腰带的混悬剂,浓度为 1%)。

3 试剂及仪器 BDNF 多克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司),二抗 Streptavidin-HRP 复合物(美国 Sigma 公司),恒冷冰冻切片机(型号:RM2235,德国 Leica 公司),5 mmol/L Tris-HCl、 $[^3\text{H}]$ MK-801、3,3-二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)均购自北京中杉公司。免疫组化试剂盒(Anti-Rabbit/Mouse Poly-HRP IHC Detection

Kit, 美国 Chemi-Con 公司), 光学显微镜(型号: DMI 6000 B, 德国 Leica 公司), XK96-A 快速混匀器(姜堰市新康医疗器械有限公司)。

4 SCI 模型制备及分组 采用清洁级成年雄性大鼠 80 只, 随机分为假手术组、模型组、甲基泼尼松龙组、金腰带组、联合组, 每组 16 只。假手术组仅咬除椎板暴露脊髓硬膜, 不造成脊髓顿挫伤; 其余组 1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)经腹腔注射麻醉大鼠, 固定于自制的手术台上, 无菌条件下进行背中段正中切口, 分离椎旁肌, 咬除 T_{8-10} 棘突椎板, 暴露脊髓硬膜, 使用 Allen's 脊髓打击器, 采用 10 g 重锤自距硬膜 25 mm 的高度垂直落下, 造成大鼠脊髓顿挫伤。撞击成功标准为: 撞击脊髓组织水肿、出血, 硬脊膜完整呈紫红色, 紧张, 膨隆, 大鼠尾巴出现痉挛性摆动, 双下肢躯体回缩样扑动, 呈迟缓性瘫痪^[11]。各组大鼠分笼饲养, 饲喂全价颗粒饲料(粗蛋白质、粗脂肪、粗纤维、钙和磷含量分别为 19.4%、4.9%、4.1%、1.21% 和 0.77%), 自由饮水, 室温(24 ± 5) $^{\circ}\text{C}$, 每日行人工膀胱排尿 3 次。术后 5 天, 各组均肌肉注射青霉素预防感染(上海公谊药业有限公司, 批号: 130604) 16 万 IU/(kg $\cdot$ d)。本实验造模成功率为 93.8%。

5 干预方法 金腰带组灌胃金腰带 50 mg/(kg $\cdot$ d), 相当于临床人用药剂量 2 倍, 共 5 天; 甲基泼尼松龙组造模后 8 h 内肌肉注射甲基泼尼松龙 50 mg/kg(相当于临床人用药剂量 2 倍), 此后每天甲基泼尼松龙肌肉注射量减少 10 mg/kg, 共 5 天; 联合组联合金腰带和甲基泼尼松龙, 用法用量同前。假手术组及模型组常规饲养, 肌肉注射青霉素 16 万 IU/(kg $\cdot$ d) 5 天。

6 检测指标及方法

6.1 神经行为学(Basso Beattie and Bresnahan, BBB)评分 术后(1、3、7、10、28 天)早 8:00 - 9:00 每组选取 8 只大鼠, 采用 BBB 评分^[12]对大鼠后肢运动行为进行评价。联合考察大鼠后肢的运动、躯干位置及稳定性、步态、协调性、爪的置放、足趾间隙及尾的位置。大鼠在足够宽阔的空间自由走动 4 min, 其后肢的运动可以近距离地进行观察。为避免评分主观偏见, 采用 3 个评分组进行 BBB 评分, 且各组大鼠的存活时间均符合双侧后肢功能要求。3 个评分组获得的 BBB 评分均值为最终结果。

6.2 NMDA 受体及 BDNF 检测 术后 13 天, 每组取 8 只大鼠麻醉后利用切开椎体取脊髓法^[13]切取损伤节段脊髓 T_{8-10} , 液氮中保存, 采用 [^3H] MK-

801 放射性配基分析法测定 NMDA 受体亲和力(Kd)和最大结合数量(Bmax); 术后 4 周, 大鼠完成行为学评价后, 用 3.6% 的水合氯醛麻醉(1 mL/100 g), 4% 多聚甲醛心内灌注固定后, 取脊髓置于含 20% 蔗糖的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中。标本沉底后, 将其取出置于冰冻切片机上行冠状切片, 片厚 20 μm 。用于免疫组化染色。

6.2.1 NMDA 受体 Bmax 及 Kd 检测 大鼠突触后膜液的制备^[14]: 将脊髓组织加入预冷的 0.32 mol/L 蔗糖溶液匀浆, 10 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清液 20 000 $\times g$ 离心 20 min, 将沉淀加入 5 mmol/L Tris-HCL (pH 7.5, 4 $^{\circ}\text{C}$) 后 480 000 $\times g$ 离心 20 min。弃上清, 所得沉淀即为突触后膜。蛋白浓度测定应用 Lowry 方法。分别取各实验组 250 μL 膜蛋白, 与终浓度为 5、10、15、20、25、30、35、40 nmol/L [^3H] MK-801 混合, 并加入 5 mmol/L Tris-HCL (pH 7.5, 4 $^{\circ}\text{C}$) 使其总体积为 500 μL , 此为总结合管。非特异性结合管加入 10 nmol/L [^3H] MK-801, 特异结合 = 总结合 - 非特异结合。抽滤、加样后震荡 10 min, 23 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 120 min, 加入预冷的 Tris-HCL 2 mL 终止反应后, 立即用玻璃纤维滤膜负压抽滤, 将膜片在 60 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中烤干, 再移入闪烁杯, 加闪烁液 5 mL, 放置过夜, 测其放射性。采用液体闪烁计数器进行测量, 采用 Scatchard 分析求得 NMDA 受体 Bmax 及 Kd。

6.2.2 BDNF 检测 术后 4 周, 将剩余动物(每组 8 只)麻醉、开胸, 经心灌注等渗盐水, 再灌注多聚甲醛, 取伤段脊髓 8 mm。在多聚甲醛固定后, 移入蔗糖, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 冰冻切片(20 μm), 隔 5 取 1, 贴片。丙酮固定、甲醇加 H_2O_2 浸泡、水洗。按下列程序进行免疫组化 ABC 法染色: 切片在 0.1 mol/L PBS 中漂洗 3 次(每次 5 min), 自由漂片与 3% H_2O_2 孵育 30 min, 并浸入 5% 含 0.3% Triton X-100 的正常羊血清中 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。转入各自的含 2% 正常羊血清和 0.3% Triton X-100 的 I 抗(兔多克隆 NT-3 抗血清, 稀释倍数为 1:1 000 和 小鼠多克隆 BDNF 抗血清, 稀释倍数为 1:1 000)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 48 h。0.1 mol/L PBS 再次漂洗 5 min $\times$ 3 次, 切片与试剂盒的试剂 I 和 II 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 每种抗体反应 30 min。0.1 mol/L PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次。免疫反应的产物直视下放入含 0.05% DAB、0.1% 硫酸镍和 0.01% H_2O_2 的染色液中反应 10 min。棕色反应显色。水洗、脱水、透明、封片。经以上处理的脊髓切片标本用光学显微镜观察, 用配套的显微照相系统摄片。

阳性染色结果判定:光镜下观察染色结果,并按照 McCarthy KD 等^[15]的方法对免疫组化染色结果进行判定:按细胞着色的程度分为 0、1、2、3 级,分别对应无着色、轻度着色、明显着色和深度着色。其中达到 1 级为阳性(若用灰度表示,一般染色深度至少比对照大 5 倍)。

细胞计数:每例动物取 5 张切片,每张切片取 5 个视野,100 倍计数 BDNF 阳性神经元数量。

7 统计学方法 应用 SPSS 18.0 软件包进行统计学分析。各组动物经造模和相应处理后,行单盲实验检测。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验和单因素方差分析进行统计学处理。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠干预期间一般状态 假手术组大鼠

术后 1 天进食、活动稍减少,毛色正常;术后 3 天即恢复正常。与假手术组比较,模型组大鼠的进食、四肢活动从术后 1 天明显减少,无自主排便,3 天后毛色枯萎;随后特别是 7 天后进食逐步增加、活动量增多,毛色逐渐光亮;甲基泼尼松龙组、金腰带组、联合组恢复更快更好,金腰带组第 2 天即有排便,甲基泼尼松龙组最早在第 3 天排便,而模型组最早在 5 天后排便。死亡率:假手术组、甲基泼尼松龙组、联合组无死亡,SCI 模型组 25%,金腰带组 6.5%。

2 各组腹角和背角 BDNF 比较(图 1、2,表 1) 与假手术组比较,模型组腹角和背角 BDNF 阳性神经元数量升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,各给药组 BDNF 阳性神经元数量升高($P < 0.05$)。与甲基泼尼松龙组比较,金腰带组及联合组 BDNF 阳性神经元数量升高($P < 0.05$),联合组优于金腰带组($P < 0.05$)。

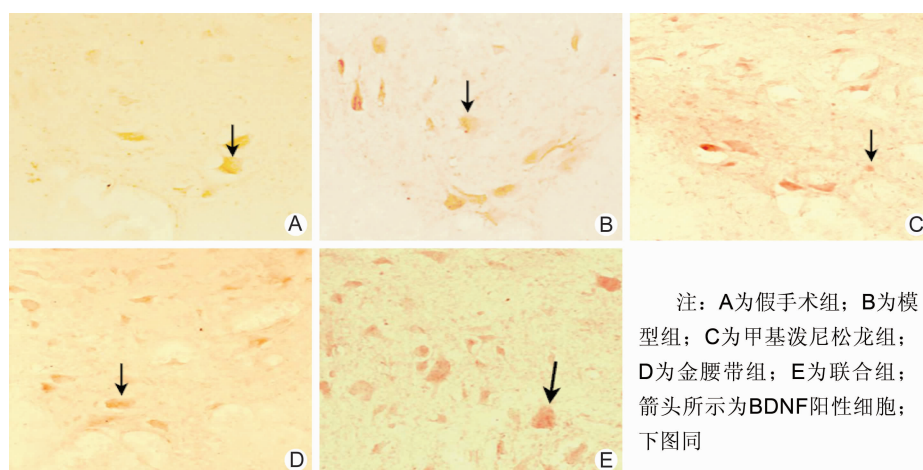


图 1 脊髓腹角 BDNF 免疫组化染色(ABC 法, ×200)

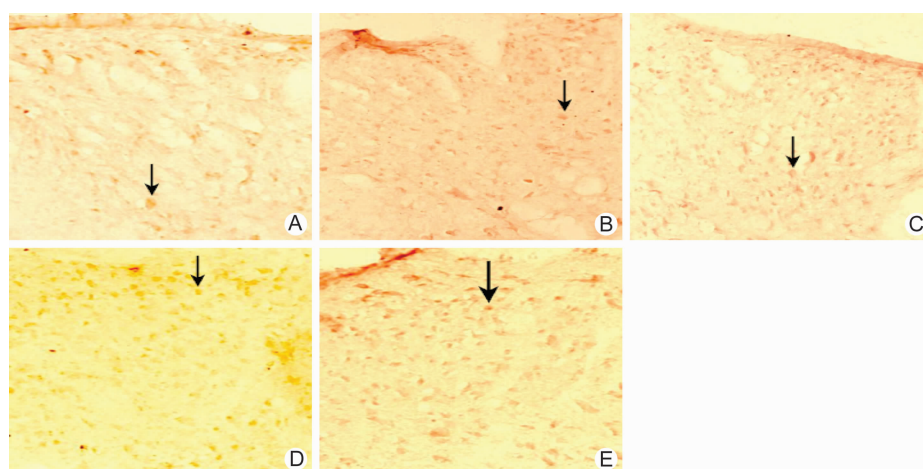


图 2 脊髓背角 BDNF 免疫组化染色(ABC 法, ×200)

表 1 各组干预后腹角和背角 BDNF 阳性
神经元数量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	腹角(个/HP)	背角(个/HP)
假手术	8	7.9±0.3*	2.9±1.0*
模型	8	9.5±0.5	17.2±0.5
甲基泼尼松龙	8	12.0±0.4*	20.2±1.6*
金腰带	8	14.8±0.3*△	26.6±0.9*△
联合	8	15.6±1.7*△▲	29.3±2.7*△▲

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与甲基泼尼松龙组比较,△ $P < 0.05$;与金腰带组比较,▲ $P < 0.05$

3 各组 NMDA 受体 Bmax 及 Kd 比较 (表 2)
与假手术组比较,模型组 NMDA 受体 Bmax 升高,Kd 降低($P < 0.05$)。与模型组比较,3 个给药组 Bmax 降低,Kd 升高 ($P < 0.05$)。与甲基泼尼松龙组比较,金腰带组和联合组 Bmax 降低,Kd 升高($P < 0.05$)。与金腰带组比较,联合组 Bmax 降低,Kd 升高($P < 0.05$)。

表 2 各组 NMDA 受体 Bmax 及 Kd 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bmax	Kd
假手术	8	470±34*	4.0±0.4*
模型	8	730±29	2.0±0.5
甲基泼尼松龙	8	660±15*	3.0±0.4*
金腰带	8	646±25*△	4.0±1.0*△
联合	8	510±21*△▲	4.9±1.0*△▲

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与甲基泼尼松龙组比较,△ $P < 0.05$;与金腰带组比较,▲ $P < 0.05$

4 各组大鼠各时间点后肢运动功能 BBB 评分比较 (表 3)
假手术组大鼠 BBB 评分显示,术后 1 天大鼠的运动功能有所减弱,但术后 3 天即恢复正常。与假手术组同期比较,模型组大鼠术后 3~28 天 BBB 评分减少($P < 0.05$)。与模型组比较,各给药组术后 3~28 天 BBB 评分升高($P < 0.05$)。与甲基泼尼松龙组同期比较,金腰带组和联合组术后 7~28 天 BBB 评分升高($P < 0.05$)。

讨 论

急性 SCI 的病理基础是脊髓神经炎性水肿,炎性

物质激活 NMDA 受体,产生严重的神经毒性,引起神经元损伤或死亡^[16]。金腰带的核心成分为芫花根皮。芫花根逐水泄湿,解毒疗疮,散结消肿,活血止痛。用于水肿、瘰癧、乳痈、痔瘕、疥疮等^[17]。芫花根含二萜类成分:芫花酯甲(yuanhuacin),芫花酯乙(yuanhuadin),芫花瑞香宁(genkwadaphnin)即 12-苯甲酸氧基瑞香毒素(12-benzoxydaphnetoxin);双黄酮类成分:瑞香黄烷素 B(daphnodorin B),芫花醇(genkwanol) A、B、C;香豆精类成分:西瑞香素(daphnoretin),伞形花内酯(umbelliferone);甙类成分:瑞香甙(daphin),丁香甙(syringin),芫根(yuankanin),还含 β-谷甾醇(β-sitosterol)^[18]。芫花根的碳酸溶解部分对动物子宫(小鼠离体子宫或孕兔羊膜内注射)有明显的兴奋作用。麻醉猫静脉注射,除引起短暂的血压下降外,亦出现子宫收缩。中毒剂量可延长凝血时间,并出现血尿。芫花酯乙素能扩张冠状血管,但效力较凯林(Khellin)为弱^[19]。芫花酯甲为主要的二萜类成分,具有利尿作用,能改善微循环、稳定生物膜、钙离子拮抗、控制炎症水肿,避免脊髓因周围组织水肿造成二次损伤。该成分具有强烈的刺激性,对皮肤、黏膜系统有较大的毒害作用^[20],是金腰带在临床的主要毒副作用(腹泻)的物质基础。芫花酯甲的作用可减少伤害性刺激通过外周神经纤维传递至脊髓后角,抑制兴奋性氨基酸(主要为谷氨酸和天冬氨酸)释放,从而下调 NMDA 表达,保护损伤脊髓,促进神经功能恢复,是阻隔 NMDA 受体通路、抑制神经元凋亡最可能的物质基础。一方面芫花根醇提物弱极性组分中含苯甲酸酯衍生物、甾族化合物和齐墩果烷衍生物等抗炎活性物质,芫花根醇提物弱极性组分能明显提高小鼠网状内皮系统异物吞噬活性,对大鼠足肿胀抑制作用显著,是抑制急性炎症的有效组分^[21],它们阻隔 NMDA 受体通路、抑制神经元凋亡,为 BDNF 的激活扫除了障碍;另一方面芫花酯乙素等物质能扩张冠状血管、改善循环为 BDNF 的激活创造了条件,增强这些因子的表达方式来为损伤神经元提

表 3 各组大鼠各时间点后肢运动功能 BBB 评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	BBB 评分				
		术后 1 天	术后 3 天	术后 7 天	术后 10 天	术后 28 天
假手术	8	19.0±1.1	21.0±0.1*	20.8±0.45*	21.0±0.0*	21.0±0.0*
模型	8	0.6±0.4	0.7±0.5	3.3±0.4	4.8±0.7	8.2±0.2
甲基泼尼松龙	8	0.7±0.4	1.7±0.6*	5.0±0.3*	6.9±1.1*	12.1±0.4*
金腰带	8	0.7±0.5	1.5±0.5*	4.0±0.6*△	6.7±0.9*△	12.4±0.6*△
联合	8	0.8±0.4	2.1±0.5*	6.3±1.3*△	8.8±2.1*△	14.2±2.5*△

注:与模型组同期比较,* $P < 0.05$;与甲基泼尼松龙组同期比较,△ $P < 0.05$

供营养支持,以有利于损伤后的突触重建和功能恢复。

脊髓钝挫伤在临床较为常见。挫伤可致脊髓局部神经元受损,胶质细胞激活。特别是因外力和炎症导致的脊髓继发损伤可进一步加重对神经元和轴索的损害,进而导致感觉运动和传导功能障碍。大鼠脊髓顿挫伤模型是研究 SCI 机制和药物作用的有用模型。

本实验发现,BDNF 免疫阳性反应物主要分布于脊髓神经元,提示在成年大鼠脊髓,BDNF 的生理作用主要与神经元有关。由于脊髓前角脊髓运动神经元是控制肢体骨骼肌运动行为的主要执行者,与动物行为学关系密切。因此,BDNF 在前角脊髓运动神经元表达,提示 BDNF 可能参与运动功能调节。本实验结果支持 BDNF 可能在成年大鼠脊髓神经元功能维持发挥重要作用。在本实验中,脊髓挫伤导致了脊髓 BDNF 阳性细胞数量增加,提示 SCI 促进了内源性 BDNF 的合成,可能有利于保护受损神经元从而发挥功能营救作用。

本实验结果发现,28 天后,SCI 组脊髓 BDNF 阳性神经元数量明显多于假手术组,表明 SCI 促使一些正常脊髓内原来未表达 BDNF 的细胞表达了 BDNF,说明 SCI 能刺激脊髓神经元 BDNF 表达增加。提示 BDNF 是 SCI 损伤修复过程中的一个重要分子。BDNF 在 SCI 中的具体作用和其相关的分子机制尚需进一步研究。

与 SCI 组比较,甲基泼尼松龙组的运动功能改进和 BDNF 阳性神经元数量进一步增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明甲基泼尼松龙能增加损伤脊髓 BDNF 表达、改善运动功能。本实验中,金腰带组的运动功能和 BDNF 阳性神经元数量与 SCI 组比较,也明显改善,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明金腰带治疗有效增加损伤脊髓 BDNF 表达、改善运动功能,从而为金腰带用于 SCI 治疗提供了重要的实验支持。比较金腰带和甲基泼尼松龙对运动功能改进和 BDNF 表达的影响发现:金腰带组的运动功能改进和 BDNF 的神经元数量明显多于甲基泼尼松龙组,差异有统计学意义($P < 0.05$),显示金腰带的效果优于甲基泼尼松龙组。说明金腰带是治疗 SCI 的有效药物。本实验中,甲基泼尼松龙和金腰带的联合应用显示出对运动功能改进和 BDNF 表达的最强促进作用,说明两者联合治疗 SCI 是可行而高效的策略($P < 0.05$)。

内源性兴奋性氨基酸的释放对损伤的中枢神经系统有毒性作用,分布在脊髓的 NMDA 受体,在中枢神经系统毒性损害中可能起主要作用。NMDA 受体可提高脊髓背角神经元的兴奋性,参与脊髓水平伤害性

信息传递,在伤害性感受及痛觉过敏形成中起着重要的作用。NMDA 受体在中枢敏感化中的重要作用体现在两个方面:一是 NMDA 受体的激活常发生于反复刺激 C 纤维所致的上发条(wind-up)现象;二是鞘内应用竞争性或非竞争性 NMDA 受体拮抗剂可抑制中枢敏感化。累积的生物学、电生理学及行为学资料指出 NMDA 受体可介导持续数小时到数天的长时程突触可塑性变化^[8],证明 NMDA 受体在中枢敏感化及慢性痛的形成中扮演重要角色。当持续性伤害性刺激通过外周神经纤维传递至脊髓后角时,可引起兴奋性氨基酸(主要为谷氨酸和天冬氨酸)释放,激活 NMDA 受体,引起钙离子内流,进而激活蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)^[9],引起痛觉过敏。

本实验发现,大鼠术后 13 天,^[3H]MK-801 放射性配基测定 NMDA 受体 Kd 在模型组明显减少,Bmax 升高联合组恢复最好,甲基泼尼松龙组和金腰带组也有部分恢复。说明 SCI 后,NMDA 受体被激活,金腰带、甲基泼尼松龙能有效下调脊髓 NMDA 受体,减轻继发性 SCI,对 SCI 有一定的治疗与保护作用,且两者有协同作用。

综上,BDNF 和 NMDA 受体在神经元损伤修复中可能发挥重要调节作用。本实验发现甲基泼尼松龙组和金腰带均能增加 SCI 动物 BDNF 表达,下调 NMDA 受体水平,对行为功能有一定改善作用;实验结果显示金腰带的效果优于甲基泼尼松龙组,且两者联合效果最佳。为金腰带治疗 SCI 提供了理论依据。笔者认为临床治疗 SCI 可首选金腰带,但要 will 金腰带形成制剂推广到临床还要做大量基础研究才能获得普遍认可。本研究不足之处在于样本量过小,观察指标较单一,如睫状神经营养因子、神经生长因子、神经营养因子等可纳入进一步观察指标,金腰带的毒性反应及机制有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Ackery A, Tator C, Krassiou A. A global perspective on spinal cord injury epidemiology[J]. J Neurotrauma, 2004, 21(10): 1355 - 1370.
- [2] 许争光, 杨峻, 李晓松, 等. 金腰带治疗急性脊髓损伤临床观察[J]. 中国医疗前沿, 2011, 6(18): 54.
- [3] Novikova LN, Novikov LN, Kellerth JO. Survival effects of BDNF and NT-3 on axotomized rubrospinal neurons depend on the temporal pattern of neurotrophin administration[J]. Eur J Neurosci, 2000, 12(2): 776 - 780.
- [4] Giehi KM, Tetzlaff W. BDNF and NT-3, but not

- NGF, prevent axotomy-induced death of rat cortical spinal neurons *in vivo* [J]. *Eur J Neurosci*, 1996, 8(6): 1167–1175.
- [5] Liebl DJ, Huang W, Young W, et al. Regulation of Trk receptors following contusion of the rat spinal cord [J]. *Exp Neurol*, 2001, 167(1): 15–26.
- [6] 李旻, 马璟. N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂神经毒性研究进展 [J]. *世界临床药物*, 2008, 29(12): 750–753, 757.
- [7] 潘静, 陈生弟. NMDA 受体与神经退行性疾病的关系 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2009, 29(1): 98–101.
- [8] Nagy GG, Watanabe M, Fukaya M, et al. Synaptic distribution of the NR1, NR2A and NR2B subunits of the N-methyl-D-aspartate receptor in the rat lumbar spinal cord revealed with an antigen-unmasking technique [J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 20(12): 3301–3312.
- [9] Ma QP, Hargreaves RJ. Localization of N-methyl-D-aspartate NR2B subunit in primary sensory neurons that give rise to small-caliber sciatic nerve fibers in rats [J]. *Neuroscience*, 2000, 101(3): 699–707.
- [10] 付艳, 江剑平, 余望. NMDA 受体 NR2B 亚基作为镇痛靶点的研究进展 [J]. *青海师范大学学报(自然科学版)*, 2008, 20(2): 66–71.
- [11] 李一帆, 陈东, 张大威, 等. 急性大鼠脊髓损伤 Allen's 法模型的改良及电生理评价 [J]. *中国实验诊断学*, 2010, 14(8): 1170.
- [12] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. *J Neurotrauma*, 1995, 12(1): 1–21.
- [13] 史欣良. 切开椎体取脊髓法 [J]. *中国临床解剖学杂志*, 2003, 18(3): 73.
- [14] 张强, 邹德威, 海涌, 等. 转基因细胞移植对损伤脊髓天门冬氨酸受体的影响 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2005, 13(14): 1097–1098.
- [15] McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue [J]. *Cell Biol*, 1980, 85(3): 890–902.
- [16] Caudle RM, Perez FM, King C, et al. N-methyl-D-aspartate receptor subunit expression and phosphorylation following excitotoxic spinal cord injury in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2003, 349(1): 37–40.
- [17] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 1172–1173.
- [18] 应百川, 王成瑞, 周炳南, 等. 芫花根有效成分的研究 [J]. *化学学报*, 1975, 35(1): 103–107.
- [19] 张保献, 原思通, 张静修, 等. 芫花的现代研究概况 [J]. *中国中医药信息杂志*, 1995, 2(10): 21–24.
- [20] 江纪武, 肖庆祥. 植物药有效成分手册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 495–496.
- [21] 郑维发, 石枫, 王莉, 等. 芫花根醇提物弱极性组分化学成分及抗炎活性研究 [J]. *解放军药理学学报*, 2004, 20(1): 18–21.

(收稿: 2013-09-03 修回: 2014-11-17)

中医药条例落实初获成效

6月23日, 国家卫生计生委通报2014年8月—12月与国家中医药管理局联合组织开展的《中医药条例》落实情况监督检查工作。通报称, 该项工作取得一定成效, 中医药逐步纳入法制轨道。

《中医药条例》实施以来, 从中央到地方各级政府, 都将中医药事业发展纳入当地国民经济和社会发展规划及区域卫生发展规划, 逐步增加对中医药的投入。《中医药条例》的实施促进了中医药参与深化医药卫生体制改革, 不仅在50余个医改配套文件中包含中医药内容, 在涉及中医药重大项目、重点领域、关键问题等方面, 也依法制定单独政策, 充分体现对中医药权益的保障。

目前, 已有25个省(区、市)公布中医药(民族医药)地方性法规, 有效推动《中医药条例》贯彻落实。31个省(区、市)发布35个扶持促进中医药、民族医药发展的意见或决定, 形成推动《中医药条例》贯彻落实的合力, 全国有87%的中医医疗机构纳入医疗保险定点机构, 医疗服务价格项目中已有337项中医诊疗项目纳入收费项目, 并不同程度地提高中医药报销比例。

通报也指出了该项工作存在的一些问题。如《中医药条例》未能充分体现中医药特点和发展规律, 中医药服务体系标准规范有待完善, 中医药监管体制机制有待健全, 绝大多数中医药管理部门没有专门从事监督工作的人员, 卫生计生综合监督执法队伍人员少、任务重, 中医药监督执法力量不足等。

(转载自《中国中医药报》2015年6月26日第1版)