是绝对的无痛。这是因为IHS技术一般采用50%浓度以下笑气,它可产生镇静及轻度镇痛作用,此浓度下患者的呼吸和心血管功能不受影响,且保护性反射存在,而加大浓度镇痛作用虽然能加强,但患者的意识将逐渐丧失,自主呼吸不能维持,故应谨慎[11]。因此,在50%浓度以下,其镇痛效果是有限的,对于部分高度疼痛敏感的牙科焦虑症患者,为达到无痛SRP治疗,需辅以局部麻醉[9]。

综上所述,IHS技术应用于SRP治疗,可以最大程度达到"无痛"效果,而且操作简便、快捷、安全,符合口腔门诊治疗特点,满足绝大多牙周炎患者的需求,尤其是牙科焦虑症人群,同时也可以提高治疗质量,值得临床推广。但同时必须加强IHS技术的安全保障,如操作人员的技能强化、相关不良反应的应急处理、镇静深度的控制以及麻醉意外的急救等。

参考文献:

[1] Jacobs R, Van-Steenberghe D. The effect of electronic dental analgesia during sonic scaling[J]. J Clin Periodontol, 1994, 21(10): 728-730.
[2] Ryding H A, Murphy H J. Use of nitrous oxide and oxygen for conscious sedation to manage pain and anxiety[J]. J Can Dent Assoc, 2007, 73(8): 711.
[3] Garip H, Satilmis T, Dergin G, *et al*. Effects of midazolam/low-dose ketamine conscious intravenous sedation on pain, swelling, and trismus after surgical extraction of third molars[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2011, 69(4): 1023-1030.
[4] 韩劼, 安悦邦, 孟焕新. 电子镇痛仪减轻超声洁治术中疼痛的效果评价[J]. 中华口腔医学杂志, 2006, 41(4): 220-221.
[5] Farrell M K, Drake G J, Rucker D, *et al*. Creation of a registered nurse-administered nitrous oxide sedation program for radiology and beyond[J]. Pediatr Nurs, 2008, 34(1): 29-36.
[6] 吴美珍, 陈少娟, 谢建雅. 笑气吸入在牙种植术中的镇静效果观察[J]. 广东牙病防治, 2011, 19(4): 216-217.
[7] 董正谋, 蒋和田, 刘鲁川,等. 笑气吸入清醒镇静法在阻生牙拔除术中的临床观察[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(10): 1071-1074.
[8] 姜 秋, 杨秀玲. 笑气/氧气吸入镇静在儿童口腔科的临床应用[J]. 临床口腔医学杂志, 2011, 27(6): 350-351.
[9] Krauss B, Green S M. Procedural sedation and analgesia in children[J]. Lancet, 2006, 367(9512): 766-780.
[10] Thompson J M, Neave N, Moss M C, *et al*. Cognitive properties of sedation agents: comparison of the effects of nitrous oxide and midazolam on memory and mood[J]. Br Dent J, 1999, 187(10): 557-562.
[11] Cote C J, Wilson S. Guidelines for monitoring and management of pediatric patients during and after sedation for diagnostic and therapeutic procedures: an update[J]. Pediatrics, 2006, 118(6): 2587-2602.

(**收稿**:2011-09-23;**修回**:2011-11-25)
(编辑 栾 嘉)

文章编号:1000-5404(2012)05-0453-03

短篇论著

地塞米松诱导的危重病性肌病的细胞死亡方式

袁 静[1],梁 佳[2],赵 颂[2],包翠芬[2] (121000 辽宁 锦州,辽宁医学院:附属第一医院神经内科[1],科学实验中心[2])

[**摘要**] **目的** 探讨地塞米松诱导的危重病性肌病的细胞死亡方式。**方法** 将SD大鼠分为健康对照组和实验组;实验组又分为7、9、11 d 3个时相点(n=10)。实验组采用5 mg/kg地塞米松连续腹腔注射,每天1次,健康对照组腹腔注射等量的生理盐水。采用肌功能缺损评分判定肌功能缺损情况。利用免疫组化和Western blot检测比目鱼肌active caspase-3、PARP、pULK的表达情况。**结果** ①健康对照组无肌肉功能缺损症状;而实验组7 d时大鼠70%出现肌肉功能缺损症状,9、11 d时全部出现明显的肌肉功能缺损症状,以11 d时相点缺损程度最为严重。②各组active caspase-3、PARP均为阴性表达;健康对照组可见少量pULK阳性表达细胞,实验组pULK表达显著增强,以11 d时相点表达增强最为明显。**结论** 地塞米松诱导的危重病性肌病中无active caspase-3、PARP表达,以pULK表达为主,提示该病可能以自噬性死亡为主要死亡方式。

[**关键词**] 地塞米松;肌疾病;半胱氨酸蛋白酶-3;多腺苷二磷酸核糖聚合酶;磷酸化自噬相关蛋白1抗体;大鼠
[**中图法分类号**] R746.102; R329.28; R977.1 [**文献标志码**] A

危重病性肌病(critical illness myopathy,CIM)临床特征表现为全身性肌无力、肌肉萎缩[1-3]。多发于临床ICU病房患者,统计数据显示,CIM的出现将ICU患者的治疗费用提高3倍。因此,对CIM的研究与防治已经成为目前临床工作中亟待解决的问题。

目前关于CIM的研究主要集中在病理活检、电生理评价上,由于对潜在的发病机制还不清楚,影响了对CIM治疗措施的选择[4-5]。研究表明,CIM病理活检可见不同程度的细胞死亡。目前对于细胞死亡的分类有凋亡、胀亡、自噬等。CIM中肌细胞死亡以何种方式为主目前还不清楚,探讨肌细胞死亡方式对于CIM的防治具有重要作用。本研究拟应用大剂量地塞米松处理大鼠以模拟CIM模型,分别检测细胞凋亡、胀亡、自噬的标志性因子半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)、多腺苷二磷酸核糖聚合酶(ADP-ribose polymerase,PARP)、磷酸化自噬相关蛋白1抗体(phospho-ATG1,pULK)在肌细胞的表达水平,以探索CIM中肌细胞的死亡方式。

[**基金项目**] 辽宁省教育厅计划项目(2009A462)
[**通信作者**] 包翠芬,E-mail: mianyizuhua@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 全自动免疫组化染色仪(美国DAKO公司),Leica RM2135石蜡切片机(德国徕卡),CIAS-1000型细胞图像分析仪(北京大恒图像公司),Carl Zeiss A1显微镜(德国蔡司),Trans-blot SD半干转膜仪、PowerPac 3000电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

1.1.2 试药 地塞米松(Sigma公司)。兔抗大鼠active caspase-3(Abcam公司)、PARP(Santa Cruz公司)、pULK单克隆抗体(博奥森公司),蛋白质预染Marker(Beyond公司)。

1.1.3 动物 40只健康SD大鼠,体质量180~210 g,由辽宁医学院实验动物中心提供[合格证号:SYXK(辽)2003-0011]。

1.2 方法

1.2.1 危重病性肌病模型的制备 将健康SD大鼠分为健康对照组和实验组;实验组又被分为7、9、11 d 3个时相点(n=10)。实验组采用5 mg/kg地塞米松连续腹腔注射,每天1次,健康对照组腹腔注射等量的生理盐水。

1.2.2 危重病性肌病模型的鉴定 按照lennon等[6]的分级法将症状严重程度分为4级。对不符合实验条件的大鼠予以去除。对于去除的大鼠均按严格实验条件统一补充、分组。

1.2.3 免疫组织化学标本的制备及检测 各组大鼠分别采用4%多聚甲醛灌注固定后,暴露左肢,垂直于比目鱼肌长轴方向切取长约1 cm组织。常规石蜡包埋切片。免疫组化法(S-P)染色。采用PBS替代一抗作为阴性对照。采用CIAS图像分析系统检测每高倍速视野下阳性蛋白表达的平均灰度。

1.2.4 Western blot标本制备及检测 各组大鼠经10%水合氯醛麻醉,迅速取出大鼠右肢比目鱼肌,称量,加入RIPA裂解液,匀浆后4 ℃,12 000 r/min离心20 min,取上清。用BCA法测定蛋白含量后,上样、电泳、转膜、半干转印,5%脱脂奶粉溶液封闭后,顺序加入适当稀释倍数的一抗、二抗进行孵育,ECL发光;扫描条带,用光密度软件分析电泳条带光密度。采用β-actin作为内参。根据目的条带与内参照条带吸光度的比值表示待测蛋白含量。

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件,行单因素方差分析。

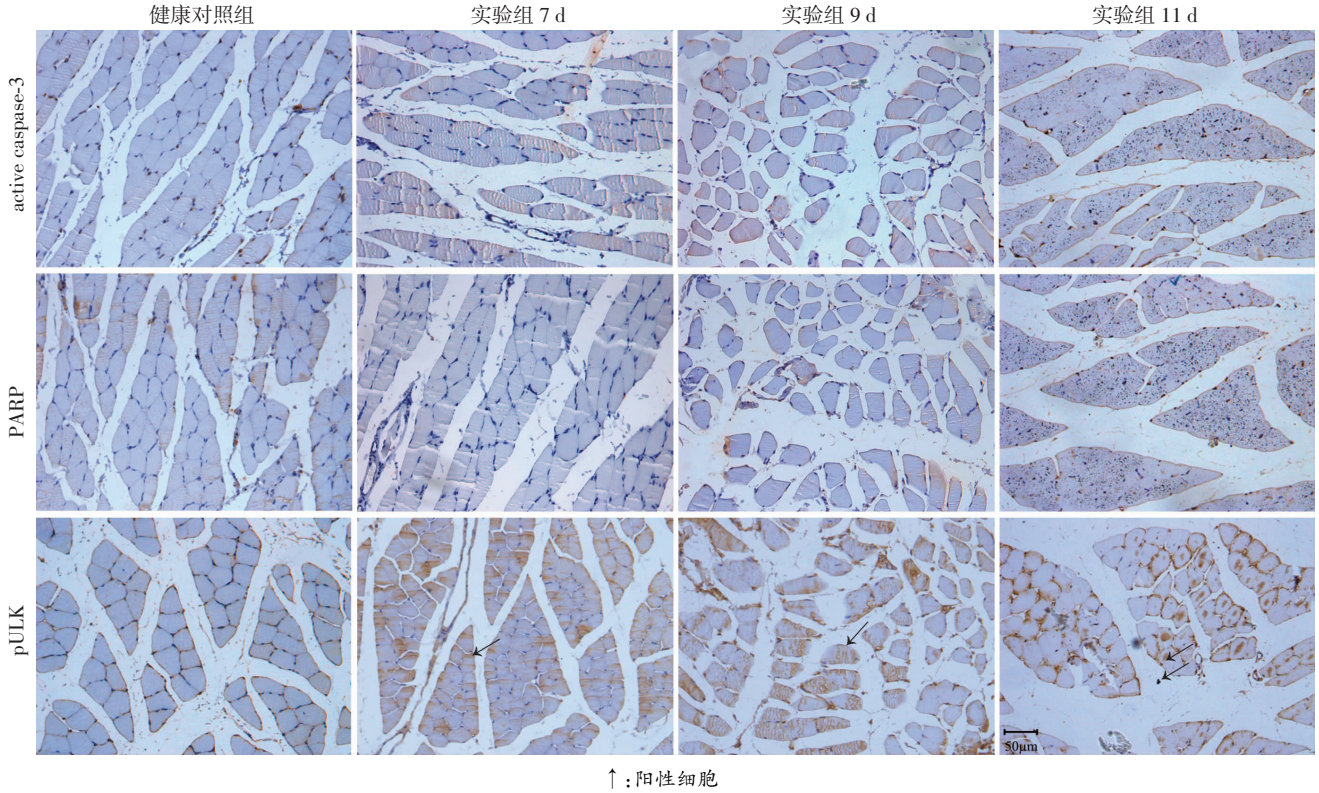
2 结果

2.1 肌病模型评分

健康对照组大鼠全部存活,无肌肉功能缺损症状;而实验组大鼠死亡8只,死亡率为27%;7 d时70%呈现肌肉功能缺损症状,9、11 d时全部呈现明显的肌肉功能缺损症状,11 d时大鼠缺损程度最为严重($P<0.05$)。见表1。

2.2 免疫组化检测

健康对照组比目鱼肌呈正常肌组织结构。实验组各时相点呈不同程度的病理改变,主要表现为肌束结构紊乱,界限不清晰,肌纤维分布松散,间隙加大,肌纤维横截面积变小,以11 d时相点病理表现最为明显,可见肌纤维碎片。各组active caspase-3、PARP均呈阴性表达,差异无统计学意义($P>0.05$)。健康对照组可见少量pULK阳性表达细胞;与健康对照组比较,实验组肌细胞细胞质内可见明显的pULK表达($P<0.05$)。见图1,表1。



↑:阳性细胞

图1 active caspase-3、PARP、pULK在各组大鼠比目鱼肌的表达(S-P ×400)

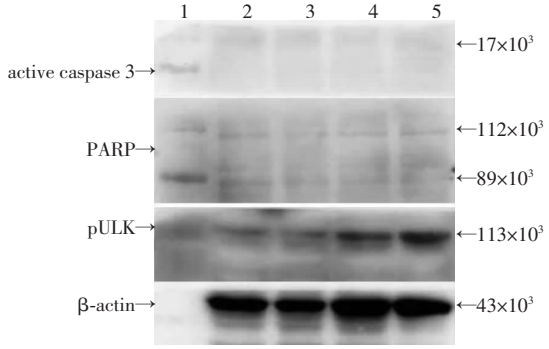
表 1 各组大鼠肌功能缺损评分及比目鱼肌 active caspase-3、PARP、pULK 表达平均灰度（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	肌功能缺损评分	active caspase-3	PARP	pULK
正常对照组	0.00 ± 0.00[bc]	26.97 ± 8.50	27.50 ± 11.18	26.47 ± 18.52[bc]
实验组				
7 d	1.30 ± 1.00[ac]	27.28 ± 9.43	24.55 ± 7.16	40.54 ± 14.33[a]
9 d	2.10 ± 0.46[ab]	24.68 ± 5.79	23.60 ± 7.33	46.89 ± 8.87[a]
11 d	2.80 ± 0.35[abc]	23.97 ± 7.20	28.07 ± 5.61	52.46 ± 9.95[ab]

a：$P<0.05$，与正常对照组比较；b：$P<0.05$，与 7 d 比较；c：$P<0.05$，与 9 d 比较

2.3 Western blot 检测

各组 active caspase-3、PARP 均呈阴性表达。健康对照组可见少量 pULK 阳性表达细胞；与健康对照组比较，实验组 pULK 表达显著增强，以 11 d 时相点表达最为明显。见图 2，表 2。



1：标准；2：健康对照组；3：实验组 7 d；4：实验组 9 d；5：实验组 11 d

图 2 Western blot 检测 active caspase-3、PARP、pULK 在各组大鼠比目鱼肌的表达

表 2 各组大鼠比目鱼肌 active caspase-3、PARP、pULK 蛋白表达（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	active caspase-3/β-actin	PARP/β-actin	pULK/β-actin
健康对照组	0.007 2 ± 0.000 4	0.007 5 ± 0.000 6	0.014 5 ± 0.002 6[c]
实验组			
7 d	0.006 7 ± 0.001 2	0.008 3 ± 0.001 1	0.043 7 ± 0.016 6[c]
9 d	0.005 4 ± 0.000 3	0.007 7 ± 0.000 7	0.173 0 ± 0.056 2[ab]
11 d	0.007 1 ± 0.000 2	0.008 3 ± 0.000 4	0.291 2 ± 0.021 4[abc]

a：$P<0.05$，与健康对照组比较；b：$P<0.05$，与 7 d 比较；c：$P<0.05$，与 9 d 比较

3 讨论

研究[7]表明，细胞死亡方式主要有 3 种：凋亡、胀亡、自噬。其中，caspase-3 被认为是引起细胞凋亡的关键蛋白酶，处于凋亡级联反应的核心位置[8]。PARP 是存在于多数真核细胞中的蛋白质翻译后修饰酶，主要功能是保持染色体结构完整、参与 DNA 复制和转录，维持基因组稳定。但当自由基等因素破坏 DNA 而使 PARP 过度活化时，在胀亡诱导因子的作用下，细胞发生胀亡[9-10]。pULK 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，很多调控细胞自噬的信号传导通路汇集在 pULK。因此 pULK 可能是调控细胞自噬的关键点[11-12]。

地塞米松作为 ICU 病房的常规用药，可竞争性拮抗乙酰胆碱受体，引起药物性去神经支配作用，从而导致 CIM[1-3]。实验中大鼠相继出现了肌无力、肌萎缩、肌肉震颤、濒死或死亡等表现，与临床 CIM 患者的症状相似。7 d 时相点大鼠体质量减轻，食欲不振，呈现明显的肌无力、肌萎缩；11 d 时，症状进一步加重。提示随地塞米松应用时间的延长，大鼠肌无力、肌萎缩症状呈进行性加重。免疫组化和 Western blot 结果显示，健康对照组和实验组比目鱼肌细胞 active caspase-3、PARP 均呈阴性表达，而 pULK 阳性表达显著增强，以 11 d 时相点表达最为明显。提示 CIM 细胞死亡方式可能不通过 caspase-3 依赖的凋亡途径以及 PARP 依赖的胀亡途径，可能通过 pULK 的调节而导致肌细胞自噬，但是关于 CIM 中 pULK 以何种机制激活下游通路以发挥调节细胞自噬的作用的分子机制还不清楚，有待于进一步研究。

参考文献：

[1] Baum P, Bercker S, Villmann T, *et al*. Critical illness myopathy and neuropathy (CRIMYN). Electroneurographic classification[J]. Nervenarzt, 2011, 82(4): 468 - 474.

[2] Stevens R D, Hart N, de-Jonghe B, *et al*. Weakness in the ICU: a call to action[J]. Crit Care, 2009, 13(6): 1002.

[3] Schefold J C, Bierbrauer J, Weber-Carstens S. Intensive care unit-acquired weakness (ICUAW) and muscle wasting in critically ill patients with severe sepsis and septic shock[J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2010, 1(2): 147 - 157.

[4] Hermans G, De-Jonghe B, Bruyninckx F, *et al*. Clinical review: Critical illness polyneuropathy and myopathy[J]. Crit Care, 2008, 12(6): 238.

[5] Friedrich O, Fink R H, Hund E. Understanding critical illness myopathy: approaching the pathomechanism[J]. J Nutr, 2005, 135(7): 1813S - 1817S.

[6] Rich M M, Pinter M J. Crucial role of sodium channel fast inactivation in muscle fibre inexcitability in a rat model of critical illness myopathy[J]. J Physiol, 2003, 547(Pt 2): 555 - 566.

[7] Kroemer G, El-Deiry W S, Golstein P, *et al*. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death[J]. Cell Death Differ, 2005, 12(Suppl 2): 1463 - 1467.

[8] Wilson M R. Apoptosis: unmasking the executioner[J]. Cell Death Differ, 1998, 5(8): 646 - 652.

[9] Andrabi S A, Dawson T M, Dawson V L. Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1147: 233 - 241.

[10] 程巧，厉红元，刘胜春，等. 沉默 Ku70 后 PARP1 参与 DNA 双链断裂修复[J]. 第三军医大学学报，2011，33(3)：286 - 289.

[11] Cheong H, Lindsten T, Wu J, *et al*. Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(27): 11121 - 11126.

[12] Lee E J, Tournier C. The requirement of uncoordinated 51-like kinase 1 (ULK1) and ULK2 in the regulation of autophagy[J]. Autophagy, 2011, 7(7): 689 - 695.

（**收稿**：2011-09-27；**修回**：2011-11-16）

（编辑 王小寒）