维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)04-0359-03

盐酸丁咯地尔预处理对大鼠坐骨神经损害后背根神经元 Bcl-2、Bax 表达的影响

章莉萍[1],苏建华[2],陈玉芳[3],唐金荣[4],肖 杭[5],包德诚[2]

(1.金坛市人民医院儿科,江苏 金坛 213200;2.金坛市人民医院神经内科,江苏 金坛 213200;
3.常州市第四人民医院病理科,江苏 常州 213001;4.南京医科大学附属第一医院神经内科,江苏 南京 210029;
5.南京医科大学应用神经毒理研究所,江苏 南京 210029)

【摘 要】目的:探讨盐酸丁咯地尔对周围神经损害后神经元保护机制。方法:采用 SD 大鼠,随机分为正常组、模型组、预处理组(盐酸丁咯地尔组),预处理 14 天后制作坐骨神经损害动物模型,分别在模型制备后 6h、12h、24h、48h、72h、96h、7 天各组提取 L1~5 背根神经节作免疫组化计数 Bcl-2、Bax 阳性细胞表达数,并加以组间比较。结果:(1)预处理组于模型制备后 12h Bcl-2 即有明显表达,24~48h 达高峰,持续 7 天时与模型组比较仍有显著性差异($P<0.05$);(2)预处理组 Bax 蛋白表达与同期模型组均有不同程度降低,7 天时表达到最低值,与模型组比较有显著性差异($P<0.05$)。结论:盐酸丁咯地尔的神经元保护作用与其上调 bcl-2 蛋白、抑制 Bax 蛋白的表达有关。

【关键词】盐酸丁咯地尔;预处理;神经元;Bcl-2;Bax;大鼠
【中国图书分类法分类号】R971 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-05-24

The effect of preconditioning with buflomedil hydrochloride on expression of Bcl-2 and Bax on neuron cells of DRG after the sciatic nerve lesion model in rats

ZHANG Liping, et al

(*Department of Pediatrics, the People's Hospital of Jintan*)

【Abstract】*Objective*: To explore protective mechanism of buflomedil Hydrochloride on the neuron of damaged Sciatic nerve in rats. *Methods*: SD rats were divided into normal, model, buflomedil hydrochloride group in random. Preconditioned for 14 days, the sciatic nerve lesion models were performed, the Bcl-2 and Bax positive cells were counted by immmunohistochemistry at the end of 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 7days respectively. *Results*: (1) At the end of 12h after the model perfomed, The expressions of Bcl-2 in buflomedil hydrochloride group increased obvionsly than the normal and model groups, peaked at 24~48h, and at the end of 7days, the expressions of Bcl-2 in buflomedil hydrochloride group increased obviously compared with model group. (2)The expressions of Bax in buflomedil hydrochloride groug were lower than the normal and model groups in the same periods, and that was the lowest at the end of 7 days, It was different significantly than that of model group ($P<0.05$). *Conclusion*: Buflomedil hydrochloride might upregulated the expressions of Bcl-2 and downregulated the expressions of Bax in neuron damaged sciatic nerve, which might be contributed to their protective effects.

【Key words】Buflomedil hydrochloride; Preconditioning; Neuron; Bcl-2; Bax; Rats

周围神经损伤后可引起相应节段神经元的死亡,严重地影响了周围神经的再生及其功能的恢复,盐酸丁咯地尔对周围神经损害后神经元有确切的保护作用[1],但保护作用机制尚不明确,本实验以盐酸丁咯地尔预处理后观察动物模型背根神经元 Bcl-2、Bax 的表达,以探讨盐酸丁咯地尔对周围神经损害后神经元保护机制。

作者介绍:章莉萍(1961-),女,副主任医师,
主要研究方向:儿童神经内科。

基金项目:江苏省常州市卫生局资助项目(编号:2004182)。

1 材料与方法

1.1 材料与分组

盐酸丁咯地尔由南京金陵药业有限公司提供(批号:021104);免疫组化试剂盒(即用型非生物素 pv-6001/6002

维普资讯 http://www.cqvip.com

试剂盒)、DAB 显色试剂盒、国产分析纯由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。常规神经分离设备一套、SD 大鼠 84 只，SPF 级，体质重 180~220g，平均质重 198.2g(由无锡市江南实验动物有限公司提供)。禁食 12h，按体重随机分为正常组、模型组、预处理组(盐酸丁咯地尔组)，每组 28 只，雌雄各半。

1.2 方法

1.2.1 预处理

各组分别给药：正常组不给药；预处理组按人与动物体表面积折算的等效计量比值表计算法予盐酸丁咯地尔 40mg/(kg.d)，腹腔注射，共 14 天；模型组按 0.8ml/(kg.d)腹腔注射生理盐水，共 14 天，常规饲养。

1.2.2 大鼠周围神经损害动物模型的建立

参照 Patro IK 等[2]制作周围神经损害动物模型：大鼠用 3%戊巴比妥 10ml/kg 麻醉，仰卧固定于鼠板上，于右后肢腹股沟处切开皮肤 1cm，钝性分离肌肉组织，显露坐骨神经，正常组坐骨神经显露后即关闭切口，其余两组大鼠用压力计以 0.5kg/1000g 的压力挤压坐骨神经，持续 30s，关闭切口。常规注射抗生素预防感染。

1.2.3 背根神经节的分离

分别于模型制备后 6h、12h、24h、48h、72h、96h、7 天各组处死实验大鼠 4 只，参照文献[3]方法，处死大鼠立即切开背部皮肤，沿脊柱两侧剪断与之相连的肋骨，取出胸腰段脊柱，由脊柱正中剖开的椎管内侧小心分离 L1~5 背根神经节，置于 10%甲醛溶液中，作 Bcl-2、Bax 免疫组织化学染色检查。

1.2.4 神经节 Bcl-2、Bax 免疫组织化学染色

分离的 L1~5 背根神经节采用二步法免疫组化方法染色，步骤参考试剂使用说明。显微镜(×400 倍)观察胞质呈褐黄色颗粒为阳性细胞。

1.2.5 图像分析

各组各时间点随机抽取 2 个样本作 Bcl-2、Bax 免疫组化染色观察阳性表达细胞数(每张切片任取 5 个视野计数相应的免疫组化染色阳性表达细胞数，取其平均值)并加以比较。

1.2.6 统计方法

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SAS6.12 统计软件包进行方差分析，$P<0.05$ 认为在统计学上有显著性差异。

2 结 果

2.1 盐酸丁咯地尔预处理对大鼠周围神经损害模型背根神经元 Bcl-2 表达的影响

正常组背根神经元细胞 Bcl-2 有少量表达；模型组于模型制备后 24h Bcl-2 表达即有明显增加，与正常组比较有显著性差异 ($P<0.05$)，48h Bcl-2 表达到高峰，与正常组比较有显著差异($P<0.01$)，7 天时降至正常组水平($P>0.05$)；而预处理组于模型制备后 12h Bcl-2 即有明显表达，与模型组比较有显著性差异($P<0.05$)，与正常组比较也有显著性差异($P<0.05$)，24~48h Bcl-2 表达达到高峰，7 天时表达仍较模型组有显著性差异($P<0.05$)；说明 Bcl-2 参与盐酸丁咯地尔对周围神经损害后神经元的修复保护作用。见表 1。

表 1 盐酸丁咯地尔预处理对大鼠周围神经损害模型背根神经元 Bcl-2 表达的影响($\bar{x}\pm s$)($n=28$)

组别	6h	12h	24h	48h	72h	96h	7d
正常组	2.7±13.441	27.0±10.306	30.2±10.152	27.7±11.470	29.7±7.364	20.0±11.264	22.8±7.955
模型组	32.0±14.228	28.3±9.322	36.2±8.377*	46.0±9.533**	37.8±8.625*	30.9±9.194*	24.1±12.982
预处理组	34.7±10.263	40.8±14.718#*	62.2±7.885**##	61.4±14.653**##	48.1±9.314**#	40.3±9.274**#	36.6±15.086*#

与正常组比较 *$P<0.05$，**$P<0.01$；与模型组比较 #$P<0.05$；##$P<0.01$

2.2 盐酸丁咯地尔预处理对大鼠周围神经损害模型背根神经元 Bax 表达的影响

正常组背根神经元细胞 Bax 有极少量表达；模型组于模型制备后 12h Bax 即有表达，24h 表达达高峰，持续至 96h，与正常组比较均有显著差异 ($P<0.01$)，7 天时模型组 Bax 仍有极高表达，与正常组比较有显著性差异($P<0.05$)；而预处理组于模型制备后 12h 仅见少量 Bax 表达，与模型组比较有显著性差异 ($P<0.05$)，24~48h 较同期模型组 Bax 表达明显减低($P<0.01$)，7 天时预处理组 Bax 表达较模型组减低，比较有显著性差异 ($P<0.05$)，说明盐酸丁咯地尔可通过抑制 Bax 表达来起到对周围神经损害后神经元的保护作用。见表 2。

表 2 盐酸丁咯地尔预处理对大鼠周围神经损害模型背根神经元 Bax 表达的影响($\bar{x}\pm s$)($n=28$)

组别	6h	12h	24h	48h	72h	96h	7d
正常组	13.9±7.062	15.8±8.664	13.0±5.312	13.2±5.202	14.9±5.626	15.8±5.159	12.8±5.138
模型组	14.8±4.104	25.6±8.500*	40.0±8.205**	28.3±5.618**	24.1±5.279**	21.0±3.333**	18.4±3.893*
预处理组	14.3±5.355	17.9±3.446#	21.2±7.997**##	20.2±5.349**##	18.9±3.348**##	16.2±4.709#	13.8±4.732#

与正常组比较 *$P<0.05$，**$P<0.01$；与模型组比较 #$P<0.05$，##$P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

目前,对于神经元保护作用的研究多集中于各种神经营养因子如神经生长因子(NGF)、睫状神经营养因子(CNTF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-3、4、5(NF-3、NF4/5)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)[4~7]以及 caspases 抑制剂、钙通道阻滞剂、单胺氧化酶抑制剂等,但研究结果各异[8~9]。盐酸丁咯地尔是一种血管活性药物,能阻滞血管平滑肌肾上腺素能受体兼钙离子拮抗作用,盐酸丁咯地尔对周围神经损害后神经元有确切的保护作用[1],但保护机制尚不明确,本实验以盐酸丁咯地尔预处理后,建立周围神经损害动物模型,探讨其神经元保护作用机制。

Bcl-2 (B Cell Lymphoma/leukemia-2) 基因是 1984 年从滤泡性淋巴瘤细胞中分离出来的原癌基因,由 239 个氨基酸残基组成。Bcl-2 家族成员包括抑制细胞凋亡的 Bcl -1、Bcl -2、Bcl-XL、Bcl-X 和促进凋亡的 Bax、Bcl-xs、Bad、Bik 等,两类分子的比例决定细胞是否凋亡。Bcl-2 的表达可抑制神经细胞凋亡[10],抑制谷氨酸神经毒性、抑制神经元钙超载及自由基堆积[11~13]等。Bax 是 Bcl-2 家族成员之一,有对抗 Bcl-2、促进凋亡的功能。有资料表明, 去除 Bax 基因的大鼠坐骨神经损伤其神经元存活率显著提高[14]。本实验以盐酸丁咯地尔预处理 14 天(达最高稳态血药浓度)后,建立周围神经损害动物模型,探讨其神经元保护作用机制,我们发现:模型组于模型制备后 24h Bcl-2 明显表达,48h 达高峰,持续至 96h,7 天时降至正常组水平($P>0.05$);而丁咯地尔预处理组 12h 即有明显表达,24~48h 达高峰,持续至 7 天时与模型组比较仍有显著性差异 ($P<0.05$); Bax 模型组于模型制备后 24h 表达到高峰,持续至 7 天与正常组比较仍有显著性差异 ($P<0.05$);而丁咯地尔预处理组 Bax 表达于模型制备后 12h 始与同期模型组均有不同程度降低,7 天时表达到最低值,与模型组比较有显著性差异($P<0.05$)。说明:盐酸丁咯地尔可上调周围神经损害后神经元 Bcl-2 的表达,抑制 Bax 表达。盐酸丁咯地尔的神经元保护作用与其上调 Bcl-2 蛋白、抑制 Bax 蛋白的表达有关。

(通讯作者:苏建华,电话:0519-2385225,E-mail:sjh2385225@163.com)

参 考 文 献

[1] 苏建华,徐厚明,唐金荣,等.盐酸丁咯地尔对周围神经损害的保护作用[J].中国新药杂志,2004;13(12):1322-1324.

[2] Patro IK,Hattopadhyay M,Patrio N.Flunarizine enhances functional recovery following sciatic nerve crush lesion in rats[J].Neurosci lett,1999;26(3):97-100.

[3] 谭振军,魏劲波,李之望,等.催产素对大鼠背根神经节分离细胞 GABA 激活电流的调制作用[J].生理学报,2000;52(5):381-384.

[4] Ratan RR,Murphy TH,Baraban JM.Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons[J].Neurochem,1994;62:376-379.

[5] Tong JX,Rich KM. Diphenylpiperazines enhance regeneration after facial nerve injury[J].Neurocytol,1997;26:339-347.

[6] Oliveira AL,Risling M,Deckner M,et al.Neonatal sciatic nerve transection induces TUNEL labelin of neurons in the rat spinal cord and DRG[J].Neuroreport,1997;8:2837-2840.

[7] 罗永湘,方 煌,庞清江,等.神经生长因子对周围神经运动纤维再生的影响[J].中华手外科杂志,1997;13:3-5.

[8] Vejsada R, Sagot Y, Kato AC. Quantitative comparison of the transient rescue effects of neurotrophic factors on axotomized motoneurons in vivo[J].Neurosci,1995;7:108-115.

[9] Eriksson NP,Lindsay RM,Aldskogius H.BDNF and NT-3 rescue sensory but not motoneurones following axotomy in the neonate[J].Neuroreport,1994;5:1445-1448.

[10] Farlie PG, Dringen R,Rees SM,et al.Bcl-2 transgene expression can protect neurons against developmental and induced cell Death[J].Proc Natl Acaol Sci USA,1995;92:4397-4401.

[11] Cheung NS, Beart PM,Pascoe CJ,et al.Human bcl-2 protects against AMPA receportor-mediated apoptosis[J].Neurochem,2000;74:1613-1620.

[12] Murphy AN,Bredesen DE,Cortopassi G,et al.Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria[J].Proc Natl Acad Sci USA,1996;93:9893-9898.

[13] Satoh T,Sakai N,Enokido Y,et al.Free radical-independent protection by nerve growth factor and bcl-2 of PCL 2 cells from hydrogen peroxide-triggered apoptosis[J].Biochem Tokyo,1996;120:540-546.

[14] Bar PO,Knudson M, Korsmeyer SJ,et al.Motor neuron degeneration is attenuated in bax-deficient neurons in vitro[J].Neurosci Res,1999;55:542-556.