

- cally evident osteoarthritis is associated with higher bone mineral density and increased bone loss with age[J]. The Rotterdam Study, 1996, 39:81 - 86
- 11 Nielsen DM, Ehm MG, Weir BS. Detecting marker disease association by testing for hardy - weinberg disequilibrium at a marker locus[J]. Am J Hum Genet, 1998, 63(5):15312 - 15401
- 12 张利, 王磊, 谢志超, 等. 大骨节病的短串联重复序列和单核苷酸多态性研究进展[J]. 中国地方病防治杂志, 2012, 27(3):192 - 194
- 13 Lombard Z, Dalton DL. Association of HLA - DR, - DQ, and vitamin D receptor alleles and haplotypes with tuberculosis in the Venda of South Africa[J]. Hum Immunol, 2006, 8:643 - 654
- 14 Granchi D, Stea S. Association of two gene polymorphisms with osteoarthritis secondary to hip dysplasia[J]. Clin Orthop Relat Res, 2002, 403:108 - 117
- 15 Sionek A, Czubak J, Kornacka M, et al. Evaluation of risk factors in developmental dysplasia of the hip in children from multiple pregnancies; results of hip ultrasonography using Grafs method[J]. Ortop Traumatol Rehabil, 2008, 10(2):1115 - 1130
- (收稿日期:2012 - 09 - 03)
- (修回日期:2012 - 09 - 29)

多巴胺、硝酸甘油诱导的血管舒缩异常大鼠神经肽表达和中脑 c - fos 免疫反应性

章正祥 曹克刚 范吉平 高永红

摘 要 目的 探讨多巴胺、硝酸甘油诱导的血管舒缩异常大鼠血神经肽和中脑导水管周围灰质 c - fos 的表达。**方法** 大鼠随机分为溶媒组、多巴胺组、模型组,造模后 4h 取血放射免疫测降钙基因相关肽(CGRP)、内皮素(ET)、P 物质(SP)、 β - 内啡肽(β - EP),取脑、切片免疫组织化学观察中脑导水管周围灰质(PAG) c - fos 蛋白表达。**结果** 偏头痛模型组 ET、SP 含量较溶媒组明显升高, β - EP 含量较溶媒组明显降低,模型组和多巴胺组 c - fos 阳性细胞面积明显大于溶媒组。**结论** 多巴胺、硝酸甘油诱发的血管舒缩模型在一定程度上模拟了偏头痛的发病机制。

关键词 多巴胺 硝酸甘油 血管舒缩 神经肽 C - fos

Neuropeptide Expression and Midbrain C - fos Immunoreactivity of Abnormal Vasomotor Rat Induced by Dopamine, Nitroglycerin.

Zhang Zhengxiang, Cao Kegang, Fan Jiping, Gao Yonghong. Department of Neurology, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine First Affiliated Hospital, Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective To explore expression of blood neuropeptide and c - fos of midbrain periaqueductal gray matter of abnormal vasomotor rat induced by dopamine, nitroglycerin. **Methods** Rats were divided into 3 groups: solvent group, dopamine group, model group. 4 hours after model establishment, rat blood was taken to measure calcitonin gene - related peptide (CGRP), endothelin (ET), P substance (SP), β - endorphin (β - EP) with radio - immunity, while the brain was taken to observe periaqueductal gray (PAG) c - fos protein expression with immunohistochemistry sections. **Results** ET and SP content in model group were higher than those in solvent group. β - EP content was significantly lower than solvent group. Total area of c - fos positive cells in model group and DA group were significantly increased than solvent group. **Conclusion** Vasomotor model induced by dopamine, nitroglycerin simulated some migraine pathogenesis to a certain extent.

Key words Dopamine; Nitroglycerin; Vasomotor; Neuropeptide; C - fos

1938 年, Wolff 提出血管学说, 认为偏头痛是原

发性脑血管性疾病, 血管舒缩机制开始成为偏头痛发病的主要学说之一。其与皮质扩散抑制(CSD)学说(解释偏头痛先兆发病机制)、三叉神经血管学说(TVS)(解释偏头痛头痛发病机制)密切相关, 贯穿于整个偏头痛发病的始终。前期研究表明皮下注射多巴胺(DA), 间隔 45min 再次注射硝酸甘油(GTN)可建立具有时相性特点的血管舒缩异常大鼠模型^[1]。多巴胺占有脑内儿茶酚胺类神经递质含量

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30600828)

作者单位: 310006 杭州, 浙江中医药大学附属第一医院、浙江省中医院神经内科(章正祥); 100700 北京中医药大学东直门医院神经内科(曹克刚); 100700 北京, 中国中医科学院(范吉平); 100700 北京中医药大学中医内科学教育部重点实验室、国家中医药管理局脑病重点研究室(高永红)

通讯作者: 曹克刚, 电子信箱: kgdoctor@sina.com

的 80%, 参与中枢的痛觉调制^[2,3]。GTN 生物学效应通过一氧化氮(NO)体现, 一氧化氮合酶(NOS)抑制剂^[4]可终止偏头痛患者的自发性急性偏头痛发作, 但并不引起动脉收缩, 提示 NO 可能通过中枢发挥作用。c-fos 是细胞外刺激神经元应答的主要标志物之一, 本实验旨在探讨 DA、GTN 对神经肽和中脑导水管周围灰质(PAG) c-fos 表达的影响。

材料与方法

1. 材料: (1) 实验动物: SPF 级 SD 雄性大鼠 30 只, 体重 314.40 ± 22.31 g, 北京维通利华动物实验技术公司提供, 许可证号为 SCXK(京)2007-0001。分笼饲养于东直门教育部重点实验室(普通级)。无菌棒状饲料喂养, 自由饮水。实验前适应性喂养 3 天。(2) 主要药品和试剂盒: 盐酸多巴胺注射液(批号为 071201, 广州白云山明兴制药有限公司), 实验用多巴胺剂量根据预试验结果为 20mg/kg。硝酸甘油注射液(批号 20071127, 北京益民药业有限公司), 实验用硝酸甘油为 10mg/kg^[4]。0.9% 氯化钠注射液(批号: 0810142W, 北京双鹤药业股份有限公司), 实验用等体积生理盐水剂量为 0.2ml/100g。碘^[125I]降钙素基因相关肽(CGRP)放射免疫分析药盒, 碘^[125I]β-内皮素放(β-ET)放射免疫分析药盒, 碘^[125I]P 物质(SP)放射免疫分析药盒, 碘^[125I]β-内啡肽(β-EP)放射免疫分析药盒, 均由中国人民解放军总医院科技开发中心放免所提供。兔抗大鼠 c-fos(sc-52)抗体(SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC., 批号 Lot 20090408), 天津市灏洋生物制品科技有限责任公司分装; SP 法试剂盒(批号: 20090106), 封闭用正常羊血清, 均由天津市灏洋生物制品科技有限责任公司分装提供。DAB 显色试剂盒(批号: lot 507816)由武汉博士德公司提供。(3) 主要仪器与设备: LD5-2A 型低速离心机, 北京医用离心机厂生产; LGR10-4.2 型低温高速离心机, 北京医用离心机厂生产。Sn-695B 型免疫计数器, 上海核所日环光电仪器有限公司生产。723A 可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司生产。DR-HW-2 型电热恒温水浴箱, 北京市医疗设备总厂。CliniBio 128C 酶标仪、KIM 软件, 悦泰医药科(国际)有限公司。恒温冷冻切片机(Leica CM 1900), 德国 Leica 公司。BIUE PARD GHP-9080 隔水恒温培养箱, 上海一恒科技有限公司。显微照相系统: 日本 Olympus 公司产品(BX60 型)。数码成像系统: 美国 DIAGNOSTIC 公司产品(SPOT)。计算机图像分析系统: 美国 Universal Imaging Corporation 产品(MetMorph)。

2. 实验方法: (1) 总体准备: 实验方案经北京中医药大学中医内科学教育部重点实验室批准, 并在该实验室进行。每只鼠笼饲养 4~5 只大鼠, 光照周期 12h, 食物和水充分给予。实验前适应性喂养 3 天。(2) 动物分组及给药: 将 SD 大鼠随机分为溶媒组、多巴胺(dopamine, DA)、模型组 3 组, 每组 10 只。①溶媒组: 先皮下注射等体积 0.9% 生理盐水(0.2ml/100g), 间隔 45min 后皮下注射等体积 0.9% NS(0.2ml/

100g); ②多巴胺组: 皮下注射多巴胺(DA)(20mg/kg), 间隔 45min 后皮下注射等体积 0.9% NS(0.2ml/100g); ③模型组: 皮下注射 DA(20mg/kg), 间隔 45min 后皮下注射硝酸甘油(10mg/kg)。(3) 实验过程: 各组实验交叉进行, 保证组间均衡。实验设计为单独 1 人, 造模和取材为单独 1 人。3 组第 1 次给药后观察 45min, 然后第 2 次给药后继续观察 240min, 戊巴比妥腹腔注射麻醉, 腹主动脉取血, 灌流、固定、取脑。(4) 取材、取血: 各组给予 GTN 后 4h 1% 戊巴比妥钠(麻醉剂量为 0.5ml/100g)腹腔注射麻醉, 将大鼠仰卧固定在手术台上, 取腹主动脉血 2ml, 注入含有 7.5% EDTA 二钠 30μl 和抑肽酶 40μl 的冰冷离心试管中, 轻轻摇匀, 低温离心机, 4℃, 3000r/min, 离心 5min, 分离出 1ml 抗凝血浆(供 CGRP、ET、SP、β-EP 检测用)。取血后, 大鼠开胸, 夹闭胸主动脉, 剪开右心耳, 左心室穿刺, 灌流针进入升主动脉, 首先迅速灌注 4℃生理盐水 200~300ml, 至右心耳流出澄清液体, 然后灌注 4℃ 0.1mol/L 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液(pH 值 7.2~7.4) 200~300ml, 先快后慢灌注, 至上肢、颈部僵直, 即固定完成。大概持续 30~60min。灌注后取大鼠脑组织, 4℃避光条件下在 0.1mol/L 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液中再固定 12h, 然后移入 0.1mol/L 4℃25% 蔗糖-PBS 液中至组织块下沉(48h), 然后保留一半该溶液(0.1mol/L 4℃25% 蔗糖-PBS 液), 再加上同等容量的 0.1mol/L 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液脱糖 24h。(5) 观察指标与检测: 1) CGRP、ET、SP、β-EP 放射免疫分析法: 由中国人民解放军总医院科技开发中心放免所检测。2) c-fos 蛋白表达: 参照大鼠脑立体定位图谱^[5], 取大鼠中脑导水管周围灰质, 恒温冷冻切片机-20℃连续冠状切片, 片厚 20μm, 每隔 3 张取 1 张, 每个标本各取 10 张, -20℃保存。冷冻切片免疫组化 SP 法检测中脑导水管周围灰质 c-fos 蛋白表达水平^[5]。阴性对照: 用 PBS 代替 c-fos 抗体, 其他步骤与 SP 步法程序相同。显微镜下切片背景为淡黄无色, 阳性细胞呈黄棕色, 多为圆形或卵形, 有聚集成线状、条块状者, 零星散在者。用显微照相系统和数码成像系统拍摄每张切片 5 个视野 40 倍图片, 用图像分析软件分析每张切片上每个视野阳性细胞的总面积, 取均值。

3. 统计学方法: 采用 SPSS 12.0 统计软件和 GraphPad Prism5.01 进行分析。正态计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较(≥ 3)采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 SNK 法; 方差不齐($P > 0.05$ 为方差齐)采用 Games-Howell 检验。偏态计量资料或方差不齐资料取对数进行数据转换。偏态计量资料两组比较采用 Mann-Whitney test。免疫组化多组比较采用 Kruskal-Wallis test 检验, 非参多重比较采用 dunns' 检验。计数资料用频数来表示, 双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

因取血失败或血液不足, 放免检测时各组样本分别为: 溶媒组 8 个样本、多巴胺组 9 个样本、模型组 8 个样本。

1. 大鼠体重件比较:各组大鼠体重组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),表明各组大鼠体重均衡。

2. 大鼠血浆神经肽的表达:对大鼠血浆 CGRP、ET、SP、 β -EP 等神经肽进行检测,发现各组第 2 次给药(GTN 或 NS)后 4h,模型组 ET 含量较溶媒组和 DA 组升高,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。模

型组 SP 含量较溶媒组明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。模型组 β -EP 含量较溶媒组明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。模型组 CGRP 含量较溶媒组有升高的趋势,但差异没有统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

表 1 DA、GTN 诱导的血管舒缩异常大鼠血浆神经肽的表达($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	n	CGRP	ET	SP	β -EP
溶媒组	8	46.62 $\pm$ 18.98	123.43 $\pm$ 5.8	154.05 $\pm$ 24.42	164.81 $\pm$ 70.77
多巴胺组	9	55.23 $\pm$ 27.34	123.94 $\pm$ 9.83	185.89 $\pm$ 45.41	145.09 $\pm$ 131.02
模型组	8	63.43 $\pm$ 31.47	136.82 $\pm$ 9.19 ^{*#}	225.29 $\pm$ 62.36 [*]	58.11 $\pm$ 48.20 [*]

与溶媒组比较,^{*} $P < 0.05$;与多巴胺组比较,[#] $P < 0.05$

3. 大鼠中脑导水管周围灰质 c-fos 阳性细胞面积比较:模型组和多巴胺组 c-fos 阳性细胞面积明显大于溶媒组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明模型组与多巴胺组均有 c-fos 蛋白表达(图 1、图 2)。

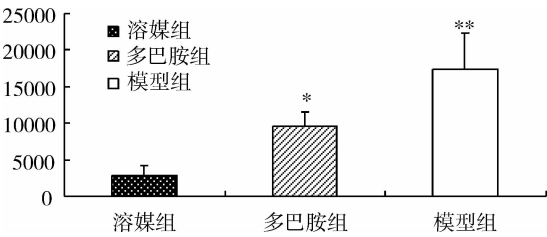


图 1 大鼠中脑导水管周围灰质 c-fos 阳性细胞表达
与溶媒组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

讨 论

前期研究表明先后应用 DA、GTN 皮下注射模拟血管的舒缩状态可建立血管舒缩模型^[1]。目前笔者只是从动物整体器官水平运用颈总动脉血流速度变化指数对该模型进行评价,相关研究表明 DA、GTN 可能通过一定的中枢神经结构发挥其血管舒缩及其以外的作用^[3,4]。本实验发现模型组 ET、SP 含量较溶媒组均升高,而 β -EP 含量却明显降低,提示 DA、GTN 诱导的血管舒缩异常模型除了血流速度发生改变外,ET、SP、 β -EP 等相关血管活性物质也发生改变。临床研究发现偏头痛在发作期 ET、SP 表达增加^[6]。ET 是迄今已知最强的血管收缩剂,在药物(DA、GTN)刺激下分泌可能增加,调节血管通透性,激活炎性细胞,引起炎症反应,参与疼痛发生。SP 使三叉神经周围末梢血管扩张,促进血浆蛋白外渗(PPE)的形成和偏头痛“头痛”的发作。

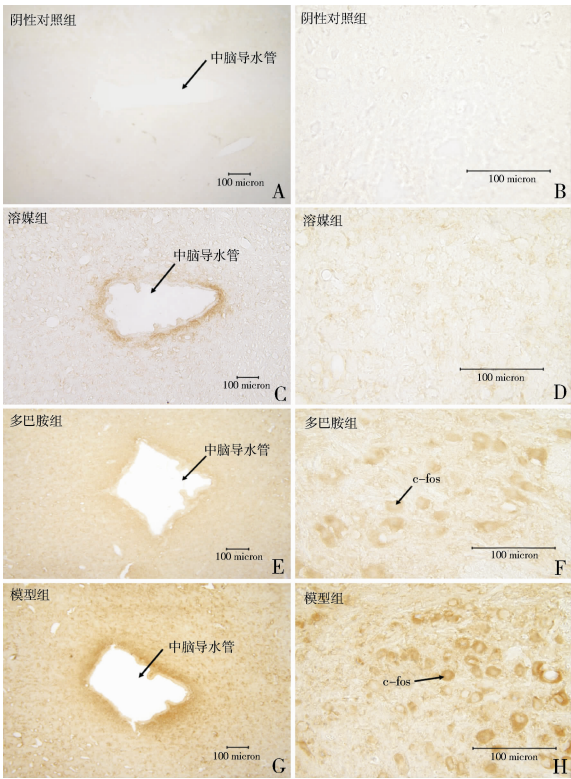


图 2 大鼠中脑导水管周围 c-fos 蛋白表达阳性细胞

A. 阴性对照 PAG($\times 10$);B. 阴性对照 PAG($\times 40$);C. 溶媒组 PAG($\times 10$);D. 溶媒组 PAG($\times 40$);E. 多巴胺组 PAG($\times 10$);F. 多巴胺组 PAG($\times 40$);G. 模型组 PAG($\times 10$);H. 模型组 PAG($\times 40$)
溶媒组 PAG c-fos 蛋白阳性细胞表达较少,模型组、DA 组 PAG c-fos 蛋白阳性细胞表达增多

β -EP 是内源性镇痛系统的主要递质之一,可抑制初级感觉神经至脊髓和三叉丘系的痛觉传递^[7]。偏头痛患者 β -EP 水平的降低与头痛症的恶化相平行^[8]。蓝斑是去甲肾上腺素能神经元胞体集中区域。正常情况下 β -EP 能神经抑制脑干的蓝斑活性,当其

分泌减少时会减弱对蓝斑的抑制作用,导致蓝斑的激活引起颅内血管收缩,随刺激加大颅内外血管均扩张,同时造成去甲肾上腺素能活性增强,儿茶酚胺大量释放激活血小板释放 5-羟色胺(5-HT),引起一系列级联反应^[9]。CGRP 是迄今为止发现的外周和中枢扩张最强的神经肽,是导致神经血管扩张的主要因素之一。但本实验提示模型组 CGRP 含量较溶媒组有升高的趋势,但差异没有统计学意义。CGRP 由三叉神经血管末梢释放,主要通过扩张大脑和硬脑膜血管、释放肥大细胞炎症介质、传递颅内血管伤害性信息至中枢等方式在偏头痛发病中发挥着关键作用^[10]。CGRP 表达部位多在硬膜等大脑疼痛组织处。本实验检测的是腹主动脉血 CGRP,故含量增高不显著。

c-fos 基因是研究较为深入的即刻早期基因之一,其激活和表达可作为神经活动和基因活动的功能标志,是脑功能定位研究的标记之一。fos 的免疫反应性为神经元亚群受到伤害性刺激和相关伤害路径判定提供了一个很好的鉴别方法。在偏头痛的疼痛路径中(导水管周围灰质、下丘脑)应用甚广。本研究发现中脑导水管附近模型组 c-fos 阳性细胞表达增多,提示 DA、GTN 诱导的血管舒缩在此有中枢伤害。刘若卓等^[11]采用电刺激大鼠上矢状窦硬脑膜发现 Fos 免疫反应阳性神经元主要位于中脑 PAG 的腹外侧区,提示该区神经元激活参与了头痛的痛觉传导通路。尽管本实验采用动物模型与此不同,但是 c-fos 表达部位却类似。

偏头痛是中枢神经系统(CNS)对多种刺激的一种特殊应答反应,皮下注射 DA、GTN 后观察到 ET、SP 含量增多,ET、SP 诱导的血管舒缩及其中枢应答、低 β -EP 的痛觉增敏和 PAG 可能参与偏头痛的调控。刺激、c-fos 基因表达、血管活性物质(ET、SP 及

β -EP 等)之间的相关性目前仍未知晓,可作为以后研究的重点,用来进一步阐明偏头痛的发病机制。

参考文献

- 1 章正祥,曹克刚,高永红,等.多巴胺、硝酸甘油诱导血管舒缩异常 SD 大鼠模型的建立[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(7):65-68,71
- 2 李凡,舒斯云,包新民.多巴胺受体的结构和功能[J].中国神经科学杂志,2003,19(6):405-410
- 3 Charbit AR, Akerman S, Goadsby PJ. Trigemino-cervical complex responses after lesioning dopaminergic A11 nucleus are modified by dopamine and serotonin mechanisms[J]. Pain, 2011, 152(10): 2365-2376
- 4 Olesen J. The role of nitric oxide (NO) in migraine, tension-type headache and cluster headache[J]. Pharmacol Ther, 2008, 120(2): 157-171
- 5 George Paxinos, Charles Watson. 大鼠脑立体定位图谱[M].3版.北京:人民卫生出版社,2005
- 6 Joshi G, Pradhan S, Mittal B. Vascular gene polymorphisms (EDNRA -231 G>A and APOE HhaI) and risk for migraine[J]. DNA Cell Biol, 2011, 30(8): 577-584
- 7 Mosnaim AD, Diamond S, Wolf ME, et al. Endogenous opioid-like peptides in headache. An overview[J]. Headache, 1989, 29(6): 368-372
- 8 Nappi G, Facchinetti F, Martignoni E, et al. Plasma and CSF endorphin levels in primary and symptomatic headaches[J]. Headache, 1985, 25(3): 141-144
- 9 Lance JW, Lambert GA, Goadsby PJ, et al. Brainstem influences on the cephalic circulation: experimental data from cat and monkey of relevance to the mechanism of migraine[J]. Headache, 1983, 23(6): 258-265
- 10 Durham PL. CGRP-receptor antagonists - a fresh approach to migraine therapy? [J]. N Engl J Med, 2004, 350(11): 1073-1075
- 11 刘若卓,于生元,王贺波,等.刺激大鼠上矢状窦区硬脑膜对中脑导水管周围灰质 c-fos 蛋白表达的影响[J].中国康复医学杂志,2003,18(1): 10-13 (收稿日期:2012-08-28) (修回日期:2012-09-26)

系统性红斑狼疮患者外周血调节性 T 细胞与 Th17 细胞失衡的研究

马纪林 蔡 龙 施华萍 周红娟 刘小贤 汪 卫 郑红霞 于健宁

摘 要 目的 通过检测系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患者外周血 CD4⁺CD25^{high}调节性 T 细胞(regu-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81274161,81001307);浙江省自然科学基金资助项目(Y2090918);浙江省医药卫生科学研究基金计划项目(2012RCA046,2011KYA137,2007A162);杭州市科技发展计划项目(20080333Q28,20110733Q15,20110833B26)

作者单位:310003 杭州,浙江省中西医结合医院风湿免疫肾脏科