

- flame rule[J]. Muscle Nerve, 2006, 34(2): 135-144
- 3 Takeshima Y, Yagi M, Okizuka Y, *et al.* Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center[J]. J Hum Genet, 2010, 55(6): 379-388
- 4 Murugan S, Chandramohan A, Lakshmi BR. Use of multiplex Ligation-dependent probe amplification (MLPA) for Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene mutation analysis[J]. Indian J Med Res, 2010, 132: 303-311
- 5 张艳芝, 熊晖, 王小竹, 等. 假肥大型进行性肌营养不良患者的基因型表型分析及随访研究[J]. 北京大学学报: 医学版, 2010, 42(6): 661-666
- 6 Magri F, Del Bo R, D'Angelo MG, *et al.* Clinical and molecular characterization of a cohort of patients with novel nucleotide alterations of the dystrophin gene detected by direct sequencing[J]. BMC Med Genet, 2011, 12: 37
- 7 刘敏娟, 谢敏, 毛君, 等. 第二代测序技术在假肥大型肌营养不良基因诊断中的应用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2012, 29(3): 249-254
- 8 Lim BC, Lee S, Shin JY, *et al.* Genetic diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing technology: comprehensive mutational search in a single platform. [J] J Med Genet, 2011, 48(11): 731-736
- 9 Monaco AP, Bertelson C J, Liechti-Gallati S, *et al.* An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus[J]. Genomics, 1988, 2(1): 90-95
- 10 Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, *et al.* Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2008, 23(1): CD003725
- 11 Moxley RT 3rd, Pandya S, Ciafaloni E, *et al.* Change in natural history of Duchenne muscular dystrophy with long-term corticosteroid treatment: implications for management[J]. J Child Neurol, 2010, 25(9): 1116-1129
- 12 Reay DP, Niizawa GA, Watchko JF, *et al.* Effect of NF- κ B inhibition on AAV9 minidystrophin gene transfer to the mdx mouse [J]. Mol Med, 2012, 9(18): 466-476

(收稿日期: 2014-04-25)

(修回日期: 2014-04-29)

美金刚对沙鼠脑缺血后海马 PARP-1 的表达及细胞凋亡的影响分析

杨剑文 杨期明 李爱平 雷 涛

摘要 **目的** 研究美金刚对沙鼠脑缺血后海马 PARP-1 的表达及细胞凋亡的影响。**方法** 采用夹闭双侧颈总动脉的方法制作沙鼠局灶性脑缺血模型; 运用 Western blot 技术观察 PARP-1、caspase-3 的表达, 在电镜下观察海马区细胞线粒体结构的变化。**结果** PARP-1、caspase-3 的表达随缺血再灌注的时间延长增强, 线粒体结构损伤逐渐加重, 美金刚干预组后 PARP-1、caspase-3 的表达明显减弱, 线粒体结构损伤减轻, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 美金刚可能通过减弱 PARP-1、caspase-3 的表达, 抑制细胞凋亡, 保护神经元。

关键词 美金刚 PARP-1 Caspase-3 局灶性脑缺血

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

Analysis of Effect of Memantine on Apoptosis and Expression of PARP-1 in the Hippocampus of Cerebral Ischemia in Gerbils. Yang Jianwen, Yang Qiming, Li Aiping, *et al.* Department of Neurology, The Elderly Hospital of Hunan Province, Hunan 410015, China

Abstract Objective To study the effect of memantine on apoptosis and expression of PARP-1 in hippocampus of cerebral ischemia in gerbils after Mongolia. **Methods** Focal cerebral ischemia model of gerbil was made by occluding bilateral common carotid arteries. The expression of PARP-1 and caspase-3 was observed by Western blot technology. The changes of mitochondrial structure in hippocampal at different time was observed by the electron microscope. **Results** With prolonged cerebral ischemia and reperfusion, the expression of caspase-3 and PARP-1 and mitochondrial structural injury was gradually increased in un-memantine groups. They were decreased significantly in memantine group ($P < 0.01$). **Conclusion** The memantine may inhibit apoptosis and protect neurons by reducing the expression of PARP-1 and caspase-3.

Key words Memantine; PARP-1; Caspase-3; Focal cerebral ischemia

作者单位: 410015 长沙, 湖南省老年医院神经内科/湖南省老年病研究所

脑缺血后神经元再灌注损伤的研究较多,细胞发生缺血后,对缺氧最敏感的线粒体等细胞器首先出现肿胀、断裂、坏死等病理改变。其机制复杂,可能与脑细胞的能量代谢紊乱、兴奋性氨基酸毒性、自由基损伤、炎症反应及神经元内钙超载等多个环节有关,最终导致神经元凋亡或坏死。多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymeras, PARPs) 是其中重要的调控因子之一,是 DNA 损伤诱导激活的蛋白。盐酸美金刚是一种强电压依赖性的受体阻断剂,可以有效调控兴奋性递质,减缓神经退化过程^[1]。本实验通过复制建立沙鼠脑缺血再灌注模型,探讨盐酸美金刚的神经保护作用。

材料与方法

1. 主要材料与试剂:健康雄性蒙古沙大鼠 48 只,10 月龄,体质量 $95 \pm 9\text{g}$,由中南大学湘雅医学院动物实验中心专人饲养(购自中南大学湘雅医学院动物实验室,实验动物许可证号:NO43006700001053)。盐酸美金刚(丹麦灵北药厂生产),PARP-1 及 caspase-3 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司提供)。

2. 动物模型的复制与建立:按数字表法随机分为缺血再灌注组、美金刚干预组、假手术组,正常对照组,每组 12 只,在局麻下手术微血管夹夹闭双侧颈总动脉 15min 后松夹再灌注恢复血流,最后缝合皮肤,并分别于再灌注第 6h、1 天、7 天、30 天断头取脑,其中美金刚干预组在手术当天给予胃灌注美金刚[按 $10\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,丹麦灵北药厂生产],3 次/天,至处死当天。

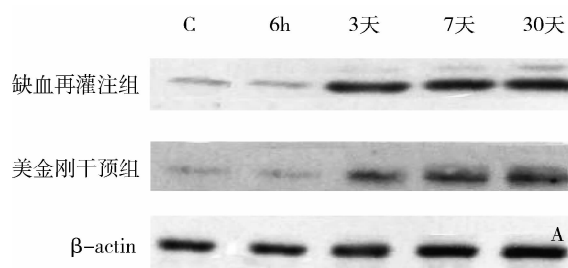


图 1 PARP-1 和 caspase-3 的 Western blot 表达

A. PARP-1; B. caspase-3; C. 正常对照组

2. 电镜结果:在正常对照组及假手术组中神经元细胞含丰富的线粒体,线粒体及细胞质膜、核膜结构完整。脑细胞发生缺血再灌注损伤后线粒体、高尔基复合体等细胞器出现肿胀,早期线粒体嵴仍然可见,随着再灌注时间延长,线粒体嵴断裂或部分消失。但美金刚干预组虽然线粒体结构依然肿胀,但线粒体嵴仍可见,核膜完整,受损程度明显减轻

3. 电镜标本的制备:断头取海马区脑组织经 4% 多聚甲醛前固定、2.5% 戊二醛磷酸缓冲液预固定等多次固定、漂洗及脱水等处理然后在电镜下观察、拍照。

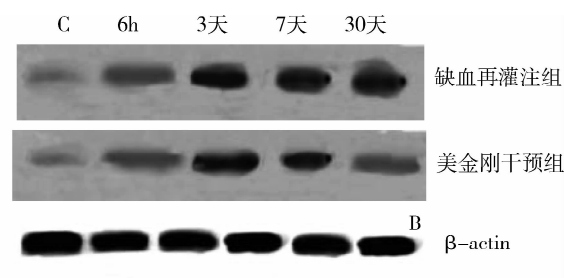
4. PARP-1 及 caspase-3 活性的测定:将沙鼠脑组织剪碎,各加入一定比例改良 RIPA 裂解液,在冰浴条件下进行组织匀浆、离心,弃除沉淀,贮存于 -80°C 冰箱中待用。用生化法测定 PARP-1 及 caspase-3 活性。

5. Western blot 测定:PARP-1 及 caspase-3 每份样品取样 200g,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳采用 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒,电压积层胶 80V,分离胶 120V。半干法将蛋白转移至 PVDF 膜上,加入 Western 封闭液在室温封闭 3h 后,参考一抗说明书稀释一抗(山羊多克隆 PARP-1, Santa Cruz)杂交, 4°C 过夜。封闭液漂洗,再加二抗后室温下摇床杂交 1h,漂洗后放射自显影。Western blot 蛋白带测定光密度 (OD) 值。B-actin 为内参照。

6. 统计学方法:用 SPSS 16.0 统计学软件包对结果进行统计分析,计量资料各组检测结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各组组间比较用 t 检验,组内比较用单因素方差分析 (ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Western blot 分析结果:脑组织 PARP-1、caspase-3 表达随缺血再灌注时间延长呈动态变化,在正常对照组、假手术组未见表达,而在缺血再灌注 6h、1 天、7 天、30 天组,随再灌注时间延长表达增高,美金刚干预组 PARP-1、caspase-3 表达下降,在 30 天下降更明显(图 1)。



(图 2)。

3. 海马区组织 PARP-1 及 caspase-3 活性:随着缺血再灌注时间的延长,PARP-1 及 caspase-3 活性增加,与正常对照组、假手术组相比,PARP-1 及 caspase-3 活性有统计学差异 ($P < 0.01$),而美金刚干预组与缺血再灌注组相比 PARP-1 及 caspase-3 活性降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。

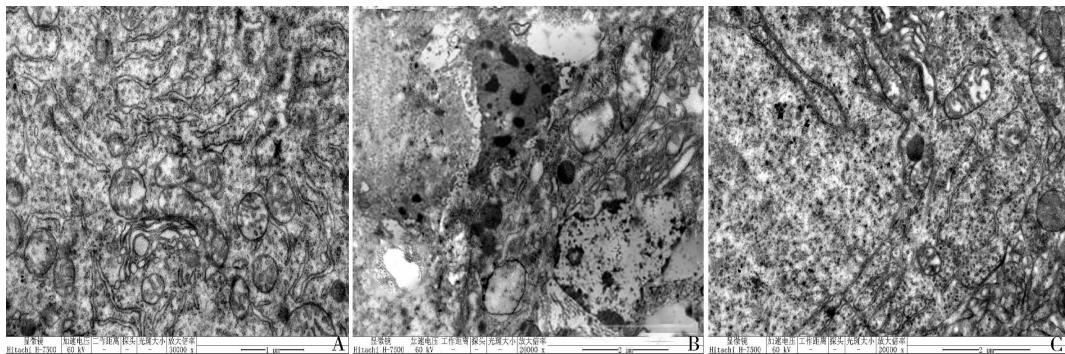


图 2 电镜结果 (× 20000)

A. 假手术组; B. 缺血再灌注组 (30 天); C. 美金刚干预组 (30 天); 在缺血再灌注组中线粒体肿胀, 线粒体嵴断裂明显, 高尔基复合体和 ER 的囊腔扩大, 成碎片, 形成空泡, 溶酶体数量大而且胞体到处可见空泡, 核仁正常; 美金刚干预组受损程度明显减轻

表 1 海马区组织 PARP - 1 及 caspase - 3 活性 ($\bar{x} \pm s$)		
组别	PARP - 1 活性 (U/mg prot)	caspase - 3 活性 (U/mg prot)
缺血再灌注组		
6h	10. 824 ± 0. 439	50. 127 ± 0. 136
3 天	28. 510 ± 0. 270 *	64. 724 ± 0. 320 *
7 天	39. 112 ± 0. 186 * ^Δ	74. 334 ± 0. 102 * ^Δ
30 天	45. 513 ± 0. 256 * ^{#Δ}	80. 024 ± 0. 147 * ^{#Δ}
美金刚干预组		
6h	11. 304 ± 0. 237	51. 115 ± 0. 341
3 天	26. 720 ± 0. 138 * ^Δ	58. 546 ± 0. 235 * ^Δ
7 天	30. 415 ± 0. 222 * ^Δ	60. 774 ± 0. 223 * ^Δ
30 天	34. 635 ± 0. 238 * ^Δ	69. 715 ± 0. 310 * ^Δ
假手术组	9. 621 ± 0. 137	49. 124 ± 0. 630
正常对照组	9. 820 ± 0. 230	49. 724 ± 0. 331

与假手术组比较, * $P < 0. 01$; 与同时间美金刚干预组比较, [#] $P < 0. 05$; 与正常对照组比较, ^Δ $P < 0. 01$

讨 论

研究多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶 (poly ADP - ribose polymeras, PARPs) 的文献很多, 到目前为止, 已经发现 18 个多聚腺苷酸二磷酸核糖基聚合酶 (PARP) 它们以 NAD^+ 为底物, 催化生成 PAR 聚合物, 它们作用各异。一部分作用于相同的蛋白因子, 一些相互协同修饰靶蛋白和调节细胞, 其中 PARP - 1 是第 1 个被发现具有修饰活性的蛋白^[2]。

研究发现, 在脑缺血后, 可以引起多种形式的氧化性 DNA 损伤, 这些 DNA 损伤可能是诱导缺血神经元凋亡的重要因素, DNA 损伤后, PARP - 1 被激活, PARP - 1 是一个可以选择性识别并结合 DNA 结合蛋白酶, 从而修复 DNA 断裂基因, 这个过程需要消耗细胞内的 NAD^+ 和 ATP^[3,4]。笔者的实验结果显示, 假手术组 PARP - 1 蛋白呈弱表达, 脑缺血再灌

注发生后, PARP - 1、caspase - 3 蛋白表达均较对照组明显增加, 随着缺血时间和再灌注时间的延长逐渐增强, 虽然缺血后神经细胞 PARP - 1、caspase - 3 蛋白表达增加, 但随着缺血或再灌注时间的延长, 被水解而失去了修复 DNA 的酶活性, 使 DNA 修复能力减弱。

在缺血再灌注损伤发生后 PARP - 1 催化 PAR 聚合物生成, PAR 进入线粒体促使线粒体释放 caspase - 3 等凋亡因子并向细胞核转位, 继发性促进 PARP - 1 表达, 实验中电镜下发现缺血再灌注损伤后线粒体等细胞器出现肿胀、断裂等。有研究表明, 线粒体通透性孔抑制剂 cyclosporinA 可阻断钙蛋白酶介导的 caspase - 3 释放, 从而阻断 caspase - 3 途径, 保护神经元, 降低缺血性损伤。caspase - 3 已被证实是 PARP 重要的下游效应分子。盐酸美金刚是一种治疗痴呆的药物, 是一种 NMDA 受体阻断剂, 通过阻断 NMDA 受体, 从而有效调控兴奋性递质。脑缺血再灌注后导致能量衰竭和兴奋性氨基酸毒性、炎症反应、程序性细胞死亡或细胞凋亡等^[5]。脑缺血后, PARP - 1 通过消耗 NAD^+ 引起细胞死亡, 通过激活 NMDA 受体诱导 PARP - 1 过表达, 将出现细胞内 NAD^+ 储存下降, 导致细胞死亡^[6]。同时细胞内 PRAP - 1 水平升高, 升向线粒体内转位, 促进线粒体释放 caspase - 3 引起细胞死亡。PARP - 1 作为 NF - κ B 和 caspase - 3 的辅助因子, 参与 NF - κ B 和 caspase - 3 调控的表达^[7,8]。在笔者的实验中美金刚干预组 PARP - 1、caspase - 3 的表达下降, 在 30 天组最明显, 线粒体结构损伤较轻, 推测美金刚可能通过抑制 PARP - 1 释放或调控 caspase - 3 等多凋亡因子, 缩小脑梗死体积和改善受损的神经功能, 具体机

制还有待于进一步探讨。

参考文献

- 1 邹吉丽,尹照萍,张利群,等.大鼠心肌缺血再灌注早期 PARP-1 的表达及其抑制剂 3-AB 对心肌梗死面积的影响[J].中国动脉硬化杂志,2013,21(6):497-502
- 2 于孟斌,杨予涛.PAR 的生物学与病理学功能[J].中国生物化学与分子生物学报,2008,24(12):1097-1102
- 3 刘建丰,苏志强,张丽.等.亚低温对大鼠局灶性脑缺血再灌注后多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶表达的影响[J].中风与神经疾病杂志,2007,24(4):443-446
- 4 Marie-France L, Kristin M, Servent, et al. A third zinc-binding domain of human poly (ADP-ribose) polymerase 1 coordinates DNA-dependent enzyme activation[J]. Biol Chem, 2008, 283 (33): 4105-4114

- 5 宋亚楠,冀建伟.盐酸美金刚治疗阿尔茨海默病的疗效观察[J].中国实用神经疾病杂志,2009,12(6):25-27
- 6 冯荣芳,王建华,吕佩源,等.小剂量多奈哌齐联合美金刚治疗老年性痴呆的疗效及安全性[J].脑与神经疾病杂志,2010,18(6):425-428
- 7 赵晓玲,刘艳,张仲,曾仲,等.阿托伐他汀联合美金刚治疗中重度阿尔茨海默病的疗效和安全性[J].中国实用神经疾病杂志,2010,13(21):9-11
- 8 Þorsteinsson AP, Grossberg GT, Mintzer J, et al. Memantine treatment in patients with mild to moderate Alzheimer's disease already receiving a cholinesterase inhibitor: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Curr Alzheimer Res, 2008, 5(1): 83-89

(收稿日期:2014-03-03)

(修回日期:2014-03-20)

射频热凝联合臭氧消融治疗 腰椎间盘突出症的临床研究

李少华 张东阳 刘首芳

摘要 **目的** 比较射频热凝联合臭氧消融与单纯臭氧消融治疗腰椎间盘突出症临床效果。**方法** 回顾性分析笔者医院采取射频热凝联合臭氧消融法和单纯臭氧消融法治疗的腰椎间盘突出症患者各 70 例,选择性分为治疗组(射频热凝联合臭氧消融组)和对照组(臭氧消融组)。治疗后采用 MacNab 法评定两组患者的临床疗效,并测定两组患者 VAS 和 ODI 评分,以及腓总神经和胫后神经肌电图 F 波传导速度。**结果** 治疗组临床疗效优于对照组。治疗后治疗组腓总神经和胫后神经肌电图 F 波传导速度均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗后两组 VAS 和 ODI 评分与治疗前比较明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗后治疗组 VAS 和 ODI 评分明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 射频热凝联合臭氧消融可有效缓解腰椎间盘突出症患者的临床症状,改善下肢神经功能,疗效优于单纯臭氧消融治疗。

关键词 射频热凝 臭氧 腰椎间盘突出症

[中图分类号] R681 [文献标识码] A

Clinical Study of Radiofrequency combined with Ozone Ablation for Lumbar Disc Herniation. Li Shaohua, Zhang Dongyang, Liu Shoufang. The Ninth People's Hospital of Zhengzhou City, Henan 450053, China

Abstract Objective To observe the clinical efficacy of radiofrequency combined with Ozone ablation in treatment of lumbar disc herniation. **Methods** Seventy patients with lumbar disc herniation allocated into the treatment group were treated using radiofrequency ablation in combination of Ozone ablation, while 70 patients with lumbar disc herniation allocated into the control group were treated with Ozone ablation. After completion of treatment, clinical efficacy was evaluated by MacNab method for two groups of patients; meanwhile, VAS and ODI scores were measured, as well as EMG F-wave conduction velocity of common peroneal and tibial nerves. **Results** Clinical efficacy of the treatment group was better than that of the control group. After termination of treatment, EMG F-wave conduction velocity of Peroneal nerve and posterior tibial nerve of the treatment group were higher significantly ($P < 0.05$) than those of the control group. VAS and ODI scores of the treatment group were significantly lower compared with the control group ($P < 0.05$). After completion of treatment, VAS and ODI score of both groups was significantly lower than that of pre-treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** Radiofrequency in combination with Ozone ablation can effectively alleviate symptoms in patients with lumbar disc herniation, and improve lower extremity nerve function. Moreover, it is more effective than pure ozone ablation.

Key words Radiofrequency; Ozone ablation; Lumbar disc herniation