

• 临床研究 •

早期大剂量纳洛酮对弥漫性轴索损伤患者 β 淀粉样前体蛋白的影响

白洪涛, 尹 勇, 苗雨露, 赵 万

(广东省深圳市龙岗区第二人民医院神经外科 518112)

摘 要:目的 观察早期大剂量纳洛酮对弥漫性轴索损伤(DAI)患者血浆 β 淀粉样前体蛋白(β -APP)的影响。方法 经头颅 CT 及 MRI 检查诊断为 DAI 的 56 例患者纳入本研究。将患者随机分为对照组、小剂量治疗组及大剂量治疗组,分别为 18、19、19 例。对照组给予常规治疗,小剂量、大剂量治疗组在常规治疗基础上,分别按 $0.1, 0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量给予纳洛酮治疗。采用 Western blot 检测 3 组患者治疗前后血浆 β -APP 浓度。结果 治疗后 1、3、7 d, 3 组患者血清中 β -APP 含量较治疗前均有统计学意义($F=0.131, P=0.010$)。治疗后 1 d, 3 组患者血清中 β -APP 含量间差异均无统计学意义($F=0.570, P=0.612$);治疗后 3、7 d, 3 组患者血清中 β -APP 含量间差异均有统计学意义($F=1.820, 1.460; P=0.012, 0.000$)。结论 早期大剂量纳洛酮可有效降低 DAI 患者血清中 β -APP 的表达。

关键词: 弥漫性轴索损伤; β 淀粉样前体蛋白; 纳洛酮

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.11.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)11-1094-02

Effect of high-dose naloxone on the expression of β -amyloid precursor protein in diffuse axonal injury at early stage

Bai Hongtao, Yin Yong, Miao Yulu, Zhao Wan

(Department of Neurosurgery, the Second People's Hospital of Longgang District, Shenzhen, Guangdong 518112, China)

Abstract: Objective To observe the effect of high-dose naloxone on the expression of β -amyloid precursor protein (β -APP) in diffuse axonal injury (DAI) at early stage. **Methods** Fifty-six patients with DAI diagnosed by CT and MRI were included. The patients were divided into control group ($n=18$), small-dose treatment group ($n=19$), and high-dose treatment group ($n=19$). The control group was received the normal treatment, while the small-dose and high-dose treatment groups were received intravenous naloxone $0.1 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ and $0.4 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, respectively. The expression of β -APP in the serum of cases in the three groups before and after treatment were detected by western blot. **Results** On 1, 3, and 7 days after treatment, the expression of β -APP in the three groups decreased compared with that before the treatment ($F=0.131, P=0.010$). On the first day after treatment, the difference of β -APP expression among the three groups was not significant ($F=0.570, P=0.612$). On the third and seventh day after treatment, the differences of β -APP expression among the three groups were significant ($F=1.820, 1.460; P=0.012, 0.000$, respectively). **Conclusion** High-dose naloxone can effectively decrease the expression of β -APP in the serum of DAI patients at early stage.

Key words: diffuse axonal injury; β -amyloid precursor protein; naloxone

弥漫性轴索损伤(Diffuse axonal injury, DAI)是一种头部在加速运动时脑深部组织因剪应力作用引起的原发性闭合性颅脑损伤,一直以来无特效的救治措施^[1]。纳洛酮作为一种人工合成的非特异性阿片受体拮抗剂,在颅脑损伤后早期应用可抑制阿片受体的激活,从而产生降低颅内压、减轻脑水肿、改善脑代谢及意识障碍的作用。但其治疗颅脑损伤的用量、疗程仍存在争议^[2]。 β 淀粉样前体蛋白(β -APP)是一种具有受体样结构的大分子跨膜糖蛋白,由高尔基体产生并由轴突的快轴浆运输通道运输^[3-4]。有研究表明,DAI 后不久神经元 β -APP 的表达即上调,检测 DAI 后血浆 β -APP 的浓度可作为判断 DAI 损伤严重程度及治疗有效与否的可靠指标^[1]。本实验通过观察早期大剂量纳洛酮治疗后 DAI 患者 β -APP 浓度的变化,以期为大剂量纳洛酮用于临床治疗 DAI 的安全性及有效性提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2007 年 6 月至 2011 年 3 月在本院经临床检查诊断为 DAI 的 56 例患者纳入本研究。其中,男 33 例,女 23 例;年龄 20~62 岁,平均 (33.32 ± 10.26) 岁。因交通事故致伤者 31 例,高处坠落致伤者 13 例,打击致伤者 5 例,手术致者 7 例。参照文献^[5]确立本组患者的纳入标准:(1)头部遭受加速性旋转外力作用;(2)创伤后昏迷,但受伤后至入院时间小于 6 h;(3)CT 扫描和(或)MRI 检查证实大脑皮质和髓质交界处、神经核团和白质交界处、胼胝体、脑干有单发或多发直径小于 2 cm 的无占位效应出血灶及脑室内出血、脑弥漫性肿胀、蛛网

膜下腔出血,中线结构无明显移位;(4)无明确定位神经体征。排除标准:(1)患有高血压病、糖尿病、肝肾功能不全等严重慢性疾病者;(2)严重的多发伤和(或)复合伤者;(3)已使用其他类似药物或对纳洛酮代谢造成影响的药物者;(4)入院时已双瞳孔散大、眼球固定、无自主呼吸者。56 例患者中,伴发脑挫裂伤者 14 例,伴发颅内血肿者 8 例,伴发脑室内出血者 5 例。格拉斯哥昏迷评分(GCS)3~5 分者 31 例,6~8 分者 25 例,平均 5.84 分。根据患者同等伤情随机分为对照组、小剂量治疗组及大剂量治疗组,分别为 18、19、19 例。3 组患者年龄($F=0.037, P=0.963$)、性别($\chi^2=2.144, P=3.142$)、GCS 评分($F=0.654, P=0.526$)、致伤原因($\chi^2=0.70, P=0.15$)等临床指标比较,差异无统计学意义,见表 1。

1.2 治疗方法 取得所有患者家属的知情同意后,对照组常规给予保持呼吸道通畅、循环支持、降颅压、防治血管痉挛、维持内环境平衡等治疗。小剂量、大剂量治疗组在对照组的常规治疗基础上,分别按 $0.1, 0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量给予纳洛酮治疗,加入生理盐水 250 mL 另管静脉滴注,维持 24 h;3 d 后将剂量调整为 $4.8 \text{ mg}/\text{d}$,加入生理盐水 250 mL 另管静脉滴注,维持 24 h;共治疗 10 d。治疗前及治疗后 1、3、7 d,采集患者晨起空腹静脉血 2 mL 于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中,轻轻摇匀以充分抗凝,分离血浆, -20°C 冰箱保存待测。参照文献^[6]的方法制作十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)。在微量离心管中,用 2 倍 SDS 加样缓冲液 1:1 稀释待测血清样品, 100°C 煮沸 5 min。100 V 恒压下电泳至溴酚

表 1 对照组、小剂量及大剂量治疗组患者一般情况比较(̄x±s)

组别	n	年龄(岁)	性别(男/女)	GCS 评分(分)	致伤原因(n)			
					车祸	高处坠落	打击	手术
对照组	18	31.36±8.96	11/7	5.71±2.30	10	4	2	2
小剂量治疗组	19	32.00±9.89	10/9	5.80±2.44	10	5	2	2
大剂量治疗组	19	33.12±10.68	12/7	5.75±2.27	11	4	1	3

蓝前沿到达分离胶,将电压调整至 200 V,继续电泳至预染蛋白质分子质量标准所示目的分子质量出现为止。用转移缓冲液冲洗凝胶,并浸泡 30 min 进行平衡。剪一块凝胶大小的硝酸纤维素(NC)滤膜标记正反面,转移缓冲液浸泡 15 min,将纤维垫片、滤纸、NC 滤膜及凝胶置入含有冷却装置的转移槽中。注入 4℃转移缓冲液,100 V 电转移 60 min。后取出 NC 滤膜,TBS 缓冲液冲洗后置入 3%的牛血清清蛋白(BSA)中,室温下振动 60 min;将 NC 滤膜置于抗 APP 一抗孵育,室温下振动 60 min;用 TTBS 冲洗 NC 滤膜 6 次,每次室温振动 5 min;将 NC 滤膜置于辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠二抗中孵育,室温下振动 60 min;用 TIBS 冲洗 6 次,每次振动 5 min;将化学发光底物(ECL)A、B 液等体积混合;NC 滤膜浸润在混合液中 5 min;将 NC 滤膜在暗室中置 X 线感光胶片上曝光 30 s,将感光胶片放入显影剂中 5 min,清水冲洗 2 次,放入定影剂中 10 min,清洗,晾干。图像分析采用 Tiger 凝胶图像分析仪进行。采用 Western blot 检测 3 组患者血浆 β-APP 的平均吸光度值,以此表示 β-APP 表达。治疗后 1、3、7 d,采用 GCS 评分系统对患者进行评分;同时,在治疗过程中观察并记录皮疹、肝肾功能损害、躁狂、精神障碍等与过量应用纳洛酮的药物不良反应,评估药物的安全性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,所有数据均以 ̄x±s 表示,组间比较采用单因素方差分析和非参统计分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不良反应结果 治疗期间,小剂量及大剂量治疗组均未发生皮疹、肝肾功能损害、躁狂、精神障碍等与过量应用纳洛酮相关的不良反应。

2.2 GCS 评分比较 治疗后 1、3 d,对照组、小剂量及大剂量治疗组之间 GCS 评分比较,差异均无统计学意义(P>0.05);治疗后 7 d,对照组、小剂量及大剂量治疗组之间 GCS 评分比较,差异有统计学意义(P<0.05),见表 2。

表 2 治疗后不同时间对照组、小剂量及大剂量治疗组患者 GCS 评分比较(分,̄x±s)					
时间	对照组 (n=19)	小剂量治疗组 (n=19)	大剂量治疗组 (n=19)	F	P
治疗后 1 d	5.72±2.01	5.79±2.40	6.01±2.30	0.832	0.540
治疗后 3 d	5.88±2.36	5.93±2.62	6.42±2.55	0.746	0.925
治疗后 7 d	6.38±2.87	6.98±3.11	8.85±3.23	0.612	0.010

表 3 治疗后不同时间对照组、小剂量及大剂量治疗组患者血清 β-APP 含量比较(ng/mL,̄x±s)					
时间	对照组 (n=19)	小剂量治疗组 (n=19)	大剂量治疗组 (n=19)	F	P
治疗前	130.64±64.96	114.01±58.64	113.27±62.32	0.690	0.320
治疗后 1 d	100.10±52.21	111.26±50.48	112.03±57.84	0.570	0.612
治疗后 3 d	90.34±50.26	79.93±48.33	63.12±47.61	1.820	0.012
治疗后 7 d	71.20±30.16	65.75±25.20	44.38±23.27	1.460	0.000

2.3 β-APP 含量比较 治疗前及治疗后 1 d,对照组、小剂量及大剂量治疗组患者血清中 β-APP 含量比较,差异无统计

意义(P>0.05);治疗后 3、7 d,对照组、小剂量及大剂量治疗组患者血清中 β-APP 含量比较,差异有统计学意义(P<0.05),见表 3。治疗后 1、3、7 d,对照组、小剂量及大剂量治疗组患者血清中 β-APP 含量较治疗前差异有统计学意义(P<0.05)。

3 讨 论

DAI 由于头部在外力作用下瞬间的旋转使脑在惯性驱使下作非线性加-减速运动,产生一种与旋转轴相垂直的剪切力;剪切力作用于神经纤维致轴索损伤,作用于脑实质血管致脑组织内点状出血^[5]。以伤后数小时至数天出现轴突肿胀和轴突回缩球为主要病理学特征^[6]。正常脑组织中 β-APP 主要存在于多囊结构、核膜、高尔基体和粗面内质网中,由于其表达水平很低而不易被检测^[7]。在机械性损伤、缺血缺氧及兴奋性毒素等病理因素作用下,β-APP 可作为一种快速反应性蛋白而诱导表达增高^[8]。Sherriff 等^[9]研究发现,在肿胀的轴索中可见 β-APP 阳性反应,且头部损伤后 β-APP 阳性的轴索部位表现为 DAI 中所描述的轴索回缩球,提示轴索 β-APP 的免疫反应性可能代表了轴突损伤。外伤性脑损伤导致的细胞骨架崩解、细胞轴浆流动停止是 β-APP 在轴突积聚的一个重要原因,故而较多学者认为 β-APP 是轴突损伤和断裂很好的标志物^[10-11]。纳洛酮作为阿片受体拮抗剂,可通过拮抗阿片受体而减轻 β-APP 所产生的病理效应,保护脑组织^[12]。但目前有关纳洛酮治疗 DAI,对患者血清中 β-APP 的蛋白表达研究却较为少见。为此,本研究纳入了受伤后至入院时间小于 6 h 的 DAI 患者,以期检测早期大剂量纳洛酮对 DAI 患者 β-APP 的影响作用。

本研究采用 0.1、0.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹两种剂量的纳洛酮对患者进行了治疗,并应用 Western blot 检测了对照组、小剂量及大剂量治疗组患者血清中 β-APP 的蛋白表达情况。结果显示,治疗后 3 d 大剂量治疗组患者血清中 β-APP 的蛋白表达较其他两组明显降低。DAI 后 3~5 d 往往是脑水肿和继发性神经损害的高峰期,此时的 β-APP 含量能更准确地反映患者的病情程度。本研究结果表明,纳洛酮大剂量治疗能更显著的降低 DAI 患者脑水肿高峰期的 β-APP 含量,从而更有效地控制颅内压,减轻脑水肿,改善脑代谢。作者还发现,治疗后 7 d 大剂量治疗组患者的 GCS 评分明显高于其他两组。说明纳洛酮能明显改善 DAI 患者的临床症状和预后。纳洛酮治疗颅脑损伤的机制,国内外多有相关研究,现就本院的实验结果总结如下:(1)可竞争性阻断内源性阿片受体与中枢和外周神经的结合,抑制软膜血管收缩,增加脑血流和脑灌注压。缓解脑血管痉挛,改善脑组织的微循环和组织供氧,减少继发性损害^[13]。(2)抑制氧自由基的产生和抗脂质过氧化作用,稳定细胞膜及溶酶体,减少溶酶释放。(3)内皮素是目前所知最强烈的血管收缩因子。颅脑损伤后,内皮素水平明显升高且与临床症状加重相符,从而引起一系列反应,损害神经细胞^[14]。而纳洛酮的应用可降低内皮素水平,提高降钙素基因相关肽水平,保护神经元^[15]。(4)解除内源性阿片肽物质对呼吸、心血管的抑制作用,抑制外周血管平滑肌收缩,提高心肌输出量,调节血压,改善循环,增加脑干血氧供应,保护生命中枢。提示纳洛酮治疗脑外伤有一定的时间窗限制,越早用药,(下转第 1099 页)

- cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 120(5):999-1005.
- [3] Jiang S, Haider HKh, Idris NM, et al. Supportive interaction between cell survival signaling and angiocompetent factors enhances donor cell survival and promotes angiomyogenesis for cardiac repair[J]. *Circ Res*, 2006, 99(7): 776-784.
 - [4] Li W, Ma N, Ong LL, et al. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(8):2118-2127.
 - [5] Bartunek J, Croissant JD, Wijns W, et al. Pretreatment of adult bone marrow mesenchymal stem cells with cardiomyogenic growth factors and repair of the chronically infarcted myocardium[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(2):H1095-H1104.
 - [6] Song H, Kwon K, Lim S, et al. Transfection of mesenchymal stem cells with the FGF-2 gene improves their survival under hypoxic conditions[J]. *Mol Cells*, 2005, 19(3): 402-407.
 - [7] Tang YL, Tang Y, Zhang YC, et al. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(7):1339-1350.
 - [8] Jun-Ichiro J, Nagaya N, Yoshinori M, et al. Transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with myocardial infarction: Benefit of a novel nonviral vector, cationized dextran[J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(2):313-322.
 - [9] Noble MI, Belcher PR, Drake-Holland AJ. Limitation of infarct size by trimetazidine in the rabbit[J]. *Am J Cardiol*, 1995, 76(6):41B-44B.
 - [10] Di Pasquale P, Lo Verso P, Bucca V, et al. Effects of trimetazidine administration before thrombolysis in patients with anterior myocardial infarction: short-term and long-term results[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1999, 13(5): 423-428.
 - [11] 乔建晶, 李树仁. 骨髓间充质干细胞移植调节心肌梗死后炎症反应的研究现状[J]. *心血管病学进展*, 2010, 31(5): 729-732.
 - [12] Liao YH, Cheng X. Autoimmunity in myocardial infarction[J]. *Int J Cardiol*, 2006, 112(1):21-26.
 - [13] Du YY, Zhou SH, Zhou T, et al. Immuno-inflammatory regulation effect of mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of myocardial infarction[J]. *Cytotherapy*, 2008, 10(5):469-478.
 - [14] Stagg J, Galipeau J. Immune plasticity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2007, 20(180):45-66.
 - [15] Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, et al. Oxidative stress and neutrophil activation—the two keystones of ischemia/reperfusion injury[J]. *Int J Cardiol*, 2002, 86(1): 41-59.

(收稿日期:2011-11-29 修回日期:2012-01-07)

(上接第 1095 页)

其防止神经细胞凋亡的效果越好。

综上所述,早期大剂量应用纳洛酮治疗弥漫性轴索损伤,可促进患者神经功能恢复及改善预后,同时无明显药物不良反应发生,具有较好的安全性,值得临床推广应用。但由于本研究样本量较小,有关其更可靠的疗效及禁忌证尚有待今后更大样本量的研究加以探讨。

参考文献:

- [1] 段志新,王洪财,吴芳芳,等.大鼠弥漫性轴索损伤后 β -淀粉样前体蛋白表达的动态变化[J].*神经损伤与功能重建*, 2009, 4(6):391-393.
- [2] Blumberg PC, Scott G, Manavis J, et al. Staining of amyloid precursor protein to study axonal damage in mild head injury[J]. *Lancet*, 1994, 344(8929):1055-1060.
- [3] 刘洪恩,孙晓川. β 淀粉样前体蛋白与弥漫性轴索损伤[J]. *创伤外科杂志*, 2005, 7(1):73-75.
- [4] Dan W, Tang WY, Liu FY, et al. The fluctuation of absolute power values of electroencephalogram for evaluation the efficacy of different dose of naloxone in brain injury[J]. *Chin J Clin Rehabil*, 2005, 9(13):192-195.
- [5] 庄仲伟,费智敏,王勇,等. 弥漫性轴索损伤的诊断与治疗[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2008, 13(5):296-297.
- [6] 江基尧. 弥漫性轴突损伤的概念和病理机制[J]. *中华神经外科杂志*, 2006, 22(11):645-647.
- [7] 江基尧,朱诚. 现代颅脑损伤学[M]. 上海:第二军医大学出版社, 1999:197-222.
- [8] 金冬雁,黎孟枫. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 北京:科学出版社, 1999:881-885.
- [9] Sherriff FE, Bridges LR, Sivaloganathan S. Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for betar amyloid precursor protein[J]. *Acta Neuropathol(Berl)*, 1994, 87(1):55-60.
- [10] 潘隆盛,许百男,周定标,等. 大鼠弥漫性轴突损伤早期淀粉样前体蛋白(β -APP)表达的实验研究[J]. *解放军医学杂志*, 2006, 31(9):899-900.
- [11] 蔡韬,廖达光. 弥漫性轴索损伤的临床诊治分析[J]. *中国现代医生*, 2008, 46(13):49-51.
- [12] 罗良生,李英斌,张健,等. 弥漫性轴索损伤的影像与临床分析[J]. *临床神经外科杂志*, 2008, 5(3):131-132.
- [13] 李建初,袁光华,柳之仪,等. 血管和浅表器官彩色多普勒超声诊断学[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1999:82.
- [14] 关国梁,黄志雄,林启明,等. 拉罗通对颅脑外伤患者神经功能的保护作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2003, 20(4): 470-471.
- [15] 罗晓阳,章翔,王嘉军,等. 纳洛酮对脑挫裂伤大鼠血浆及海马中内皮素、肿瘤坏死因子和降钙素基因相关肽含量的影响[J]. *中国急救医学*, 1997, 9(2):1650-1652.

(收稿日期:2011-11-18 修回日期:2011-12-17)