

丁公藤注射液对牛蛙 坐骨神经结构和传导的影响

叶文博 姜芳 丁韶萍 戴素梅

提 要 稀释的丁公藤注射液(IE)涂布于离体的牛蛙坐骨神经,可阻滞神经冲动的传导.10% IE可使神经干复合动作电位 $A_{\alpha\beta}$ 、 A_{δ} 和C诸成分的潜伏期均延长;而25% IE不仅能使各类成分的潜伏期发生显著性延长,而且能使各类成分的幅度有显著性的减小.上述浓度IE的传导阻滞作用是可逆的,并具有明显的量效关系.同样,透射电镜观察发现经IE处理的牛蛙的离体坐骨神经C类纤维轴膜膨胀双层磷脂膜结构变异.这提示IE对神经的传导阻滞作用可能同神经纤维的轴膜结构的变化有关.

关键词 丁公藤注射液;神经轴膜;髓鞘;传导阻滞

中图法分类号 R971.1; Q422

0 引 言

丁公藤(*Erycibe obtusifolia Benth*)系旋花科丁公藤属植物.它具有消肿、止痛作用.丁公藤注射液临床用于急慢性风湿性关节炎、类风湿性关节炎、肥大性腰椎炎、坐骨神经痛、腰痛、腿痛、手脚麻痺等疾病的治疗^[1],至今尚未见到有关它对于神经纤维结构及兴奋传导影响的报道.本实验用稀释的丁公藤注射液处理牛蛙坐骨神经,然后分别通过电生理方法测量神经传导的可能变化和通过透射电镜观察神经纤维在形态结构方面可能发生的变化,探索丁公藤注射液对神经结构和传导的影响.

1 材 料 和 方 法

1.1 坐骨神经标本的制作和丁公藤注射液的稀释

实验动物:牛蛙,体重200~350克,雌雄不限.由枕骨大孔毁脑,按常规方法制备坐骨神经标本.标本两端用线结扎,防止轴浆外流.用0.65% NaCl溶液和丁公藤注射液(上海中药

制药一厂生产, Injection Erycibe, IE) 按1:19, 1:9, 1:3的比例配制成5%, 10% 和25% 稀释的丁公藤注射液(IE)。

1.2 电镜超薄切片制作和观察

坐骨神经标本分别用0.65% NaCl 溶液或5% IE, 10% IE, 25% IE 局部(4mm) 涂布12min, 然后用0.65% NaCl 溶液冲洗后, 将处理部分切成1mm 长的小段, 放入2.5% 戊二醛中固定。然后, 用磷酸缓冲液冲洗3次后, 再用1% 锇酸固定。随后, 进行常规脱水。脱水后, 用丙酮+ VCD- DER 736包埋剂(1:1) 浸透3h, 再用纯VCD- DER 736包埋剂浸透2h。由包埋剂处理的标本置于60℃ 温箱恒温处理2d, 随后自然冷却, 作超薄切片。随后, 用饱和醋酸铀染色30min 和柠檬酸铅染色10min。最后, 通过透射电镜观察并拍照。

1.3 神经冲动数据的采集^[2]

剥制好的坐骨神经放入自制的屏蔽盒, 中枢端放在刺激电极S 处, 外周端放在记录电极处。记录电极R₁和R₂分别置于药室两侧, 距离刺激电极S 分别为16mm 和33mm, 药室宽4mm。紧贴记录电极R₂的外侧剪断神经, 便于记录单相的复合动作电位。在屏蔽盒内放一些湿棉球, 盖上盒盖, 保持盒内空气湿润。

主要实验仪器有IS-2型智能刺激器、光耦合线形刺激隔离器、WFZ-87多功能直流放大器(均为中科院上海生理所研制)、BM 微机A/D 卡(东南大学研制)。刺激方波为恒流。记录复合动作电位A 成分时, 刺激方波的波宽为0.05ms, 幅度为0.1~0.6mA; 直流放大器增益×100, 滤波100Hz, 时间常数5s; 数据采样间隔T 为0.06ms。每次被保存的数据是1次刺激产生的结果。

记录复合动作电位B 成分和C 成分时, 刺激方波的波宽为0.5ms, 幅度为0.5~3mA; 直流放大器增益×1000, 滤波3Hz, 时间常数5s; R₁进行数据采样时, 采样间隔T 为0.32ms; R₂进行数据采样时, 采样间隔T 为0.48ms; 每次被保存的数据是8次刺激结果的平均迭加。

加药前, 将浸有0.65% NaCl 溶液的棉球放入药室, 包裹在神经干周围。每隔4min 对复合动作电位诸成分采样一次, 共3次, 它们的平均值作为实验组对照值。加药时, 去除原有的棉球, 吸干药室中的溶液, 将浸有5%, 10% 或25% IE 的棉球放入药室, 包裹在神经干周围。给药时间12min, 其间每隔4min 对复合动作电位诸成分采样一次。12min 后立即将浸有IE 的棉球拿去, 并用0.65% NaCl 溶液冲洗多遍。洗药后, 每隔4min 对复合动作电位诸成分采样一次, 一般采3次。

1.4 数据的测量和统计

1.4.1 通过电镜照片测量神经纤维轴膜内的纤维直径和轴膜的厚度

因为考虑到受药物处理后轴膜厚度会变化, 所以, 以轴膜内的直径取代神经纤维的直径。测量中, 凡遇横切面为非圆的纤维, 则以 $1/2(\text{长轴} + \text{短轴})$ 为直径。

1.4.2 将所记录的复合动作电位各成分分别进行潜伏期和幅度的测量

1.4.3 所测得的数据用 StatSoft, Inc 的 6.0 of STATISTIC for Windows 中的 Basic Statistics/Tables 和 ANOVA/MANOVA 等程序进行处理

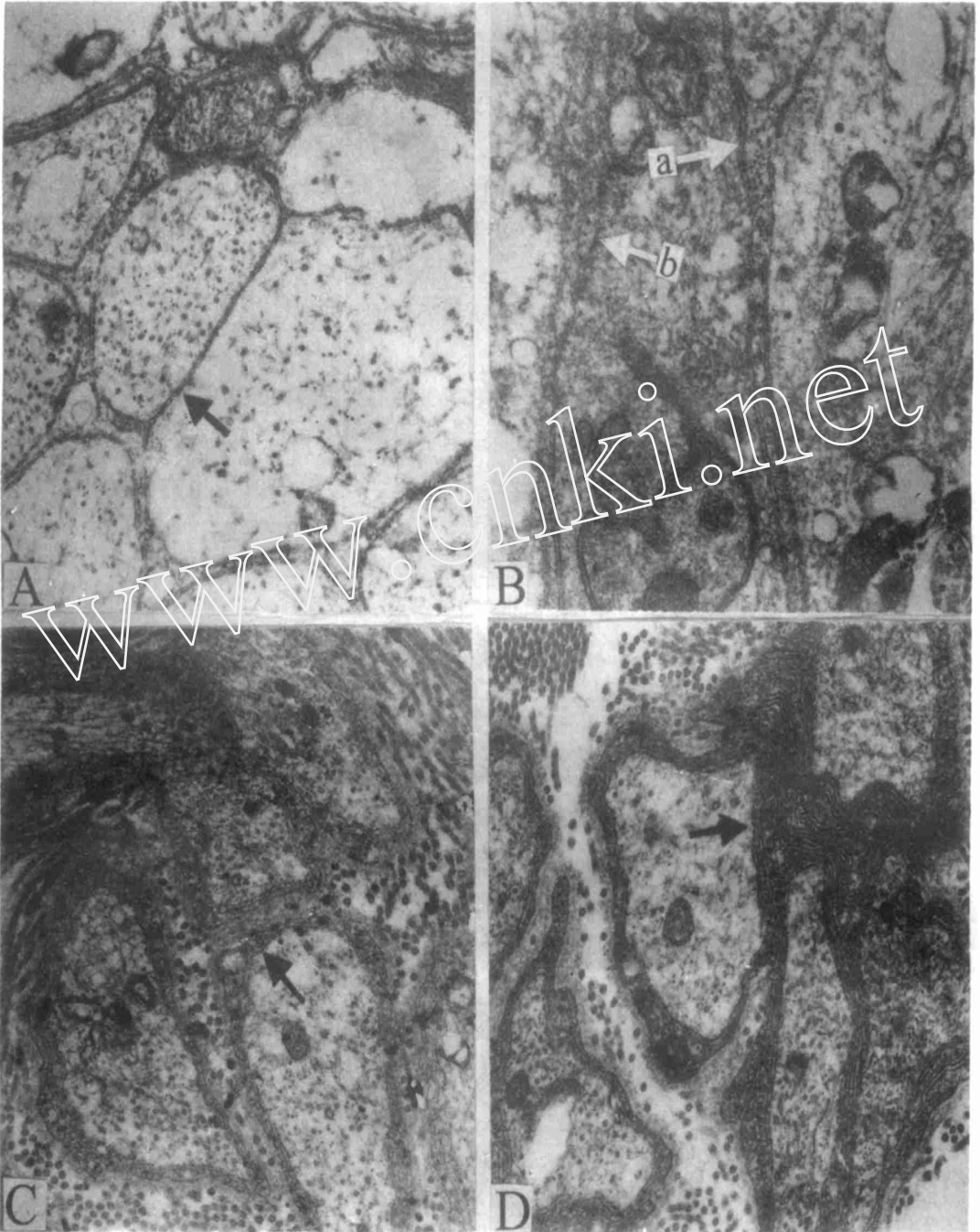


图1 各组的牛蛙坐骨神经C类纤维轴膜结构

- | | |
|--------------------------------|---------|
| A. 对照组牛蛙坐骨神经C类纤维轴膜结构(横切) | ×30,000 |
| B. 5% IE处理12min后的C类纤维轴膜结构(纵切) | ×30,000 |
| C. 10% IE处理12min后的C类纤维轴膜结构(横切) | ×30,000 |
| D. 25% IE处理12min后的C类纤维轴膜结构(横切) | ×30,000 |

2 实验结果

2.1 IE 对牛蛙坐骨神经形态结构的影响

图1分别显示0.65% NaCl 处理(对照组)、5% IE 处理组、10% IE 处理组和25% IE 处理组的牛蛙坐骨神经C类纤维轴膜结构。对照组C类纤维轴膜呈现清晰的双层结构,其厚度薄而均匀;5% IE 处理组、10% IE 处理组和25% IE 处理组的轴膜膨胀,厚度增加,出现多层结构。方差分析结果表明:对照组和IE处理组的轴膜厚度存在极显著性差异($F = 51.390, p < 0.000001$) (表1),而它们的纤维直径则不存在显著性差异($F = 1.705, p < 0.17$);对照组为 $1.271 \pm 0.402 \mu\text{m}$ ($n = 22$),5% IE 组为 $1.516 \pm 0.475 \mu\text{m}$ ($n = 5$),10% IE 组为 $1.388 \pm 0.412 \mu\text{m}$ ($n = 17$),25% IE 组为 $1.173 \pm 0.348 \mu\text{m}$ ($n = 26$)。

表1 牛蛙坐骨神经C类纤维轴膜的变化($\bar{x} \pm s$)

	对照组	5% IE 组	10% IE 组	25% IE 组
轴膜厚度(mm)	22.7 ± 3.3	$48.9 \pm 11.5^*$	$108.9 \pm 21.8^{* \#}$	$118.5 \pm 26.9^{* \#}$
样本数 n	8	8	8	8

* 同对照组比较, $p < 0.001$ # 同5% IE 组比较, $p < 0.001$

10% IE 组同25% IE 组比较, $p < 0.49$, 两者无显著性差异。

2.2 IE 对牛蛙坐骨神经复合动作电位的影响

在室温 $16 \sim 22$ 条件下,对照组牛蛙坐骨神经干复合动作电位诸成分的潜伏期(刺激电极距离记录电极33mm)和传导速度见表2。C成分在时程上有明显差别的两部分,被分成C₁和C₂两个亚成分^[2]。

表2 牛蛙坐骨神经复合动作电位诸成分潜伏期和传导速度

	A _{αβ}	A _δ	B	C ₁	C ₂
潜伏期(ms)	0.8~1.4	2.3~3.8	13.9~26.9	68.6~93.6	93.6~155.5
传导速度(m/s)	23.3~39.9	8.7~14.5	1.2~2.4	0.35~0.48	0.21~0.35

IE 首先影响各类神经纤维的传导速度,使复合动作电位诸成分潜伏期延长(药室宽4mm);然后影响它们的幅度。经12min的处理,从R₂的记录看,5% IE 仅使C成分的潜伏期有显著的延长;10% IE 可使A_{αβ}、A_δ和C成分潜伏期都发生了显著延长;而25% IE 不仅能使诸成分潜伏期都发生了显著延长,而且能使A_{αβ}、A_δ、B和C成分的幅度减小,尤其是C成分(图2)。IE 的影响有明显的量效关系。从R₁的记录看,各成分的潜伏期和幅度都没有R₂的记录那样大的变化,而且幅度有所增加(表3,表4)。

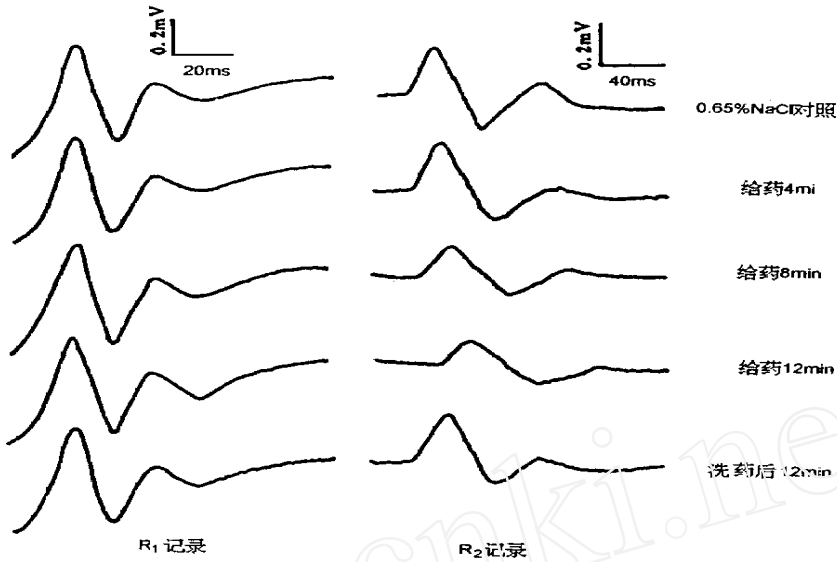


图 2 25% IE 处理后, 复合动作电位 C 成分的变化

表 3 IE 处理 12min 时复合动作电位诸成分潜伏期的延长值 ($\bar{x} \pm s, ms$)

	5% IE		10% IE		25% IE	25% 恢复 IE
	R ₂	R ₁	R ₂	R ₂	R ₂	
A _{0β}	0.1 ± 0.1	0 ± 0.4	0.2 ± 0.2** (n = 10)	0.5 ± 0.3** (n = 5)	0.3 ± 0.3	
A _δ	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.4** (n = 7)	2.0 ± 0.8** (n = 5)	1.1 ± 0.9	
B	1.6 ± 2.0	-	0.7 ± 0.2 (n = 2)	2.7 ± 1.5 (n = 3)	0.5 ± 0.8	
C ₁	3.2 ± 1.5**	0.4 ± 0.9	7.1 ± 5.9** (n = 9)	21 ± 5.0** (n = 6)	4.6 ± 3.2	
C ₂	5.1 ± 5.0*	6.4 ± 8.6	6.1 ± 1.6** (n = 5)	44 ± 1.7** (n = 5)	8.1 ± 2.3**	

* 同 0.65% NaCl 溶液处理(给药前对照)相比, $p < 0.05$, 下同.

** 同 0.65% NaCl 溶液处理(给药前对照)相比, $p < 0.01$, 下同.

R₁ 为药室之前的记录电极, 它只能记录尚未到达药室的动作电位, 下同.

R₂ 为药室之后的记录电极, 它记录到通过药室的动作电位, 下同.

表 4 IE 处理 12min 时复合动作电位诸成分幅度与对照组的比值 ($\bar{x} \pm s$)

	5% IE	10% IE		25% IE	25% 恢复 IE
	R ₂	R ₁	R ₂	R ₂	R ₂
A _{0β}	0.9 ± 0.1 (n = 6)	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1 (n = 10)	0.4 ± 0.3* (n = 5)	0.9 ± 0.1
A _δ	0.9 ± 0.0 (n = 6)	1.1 ± 0.7	0.8 ± 0.2 (n = 7)	0.1 ± 0.3* (n = 5)	0.5 ± 0.4*
B	0.9 ± 0.1 (n = 3)	-	0.5 ± 0.2 (n = 2)	0.1 ± 0.1** (n = 3)	0.9 ± 0.1
C ₁	0.9 ± 0.1 (n = 7)	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.2 (n = 9)	0.5 ± 0.1* (n = 6)	0.9 ± 0.1
C ₂	0.7 ± 0.1 (n = 7)	1.4 ± 0.3	0.9 ± 0.2 (n = 5)	0** (n = 5)	0.8 ± 0.2

表 5 25% IE 处理后复合动作电位诸成分潜伏期、幅度的变化 ($\bar{x} \pm s$)

	给药后						洗药后	
	4m in		8m in		12m in		12m in 内	
	潜伏期延长 (m s)	幅值比 (%)	潜伏期延长 (m s)	幅值比 (%)	潜伏期延长 (m s)	幅值比 (%)	潜伏期延长 (m s)	幅值比 (%)
A $\alpha\beta$	0.2 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2	0.4 \pm 0.3*	0.6 \pm 0.2	0.5 \pm 0.3**	0.4 \pm 0.3*	0.3 \pm 0.3	0.9 \pm 0.1
A δ	0.7 \pm 0.3	0.3 \pm 0.4*	1.1 \pm 0.7*	0.2 \pm 0.3*	2.0 \pm 0.8**	0.1 \pm 0.3*	1.1 \pm 0.9	0.5 \pm 0.4*
B	1.6 \pm 0.7	0.5 \pm 0.2*	2.4 \pm 1.0	0.2 \pm 0.1*	2.7 \pm 1.5	0.1 \pm 0.1**	0.5 \pm 0.8	1.0 \pm 0.1
C ₁	6.0 \pm 3.2	0.8 \pm 0.3	11 \pm 5.2**	0.7 \pm 0.2	21 \pm 5.0**	0.5 \pm 0.1*	4.6 \pm 3.2	0.9 \pm 0.1
C ₂	11 \pm 1.2**	0.7 \pm 0.1*	23 \pm 3.4**	0.4 \pm 0.2**	44 \pm 1.7**	0**	8.1 \pm 2.3**	0.8 \pm 0.2

3 分析和结论

轴膜为轴突表面的一层极薄的膜,是神经元质膜的延续,其厚度为几十纳米,由双层磷脂、蛋白质等组成。在高倍电镜下,它呈现为两条黑线,中间夹一条浅色的带。两层相对排列的磷脂分子的亲水性的磷酸化头部位于膜的两侧表面,而疏水性的脂质尾部位于膜的内部。具有不同功能的蛋白质分子镶嵌在磷脂层的表面或其中。因为用来加强电子显微照片反差的钨酸同蛋白质有强烈的结合力,所以,可以认为两条黑线代表蛋白质层,浅色带代表磷脂层^[3]。C类纤维是无髓鞘纤维,作为细胞边界的两条黑线夹一条浅色带的轴膜比较明确,容易辨认。当用IE涂布处理牛蛙坐骨神经后,发现C类纤维轴膜膨胀,厚度增加,出现“多层”结构;复合动作电位的潜伏期延长和幅度下降。随着用药浓度的增加,轴膜结构变化的程度增加,复合动作电位的潜伏期进一步延长。25%IE使轴膜出现普遍的、严重的“多层”结构,不仅使复合动作电位的潜伏期显著地延长,而且使复合动作电位的幅度显著地下降(图1,图2,表1~表5)。实验表明:由IE引起的牛蛙坐骨神经C类纤维轴膜结构的变异和由它引起的复合动作电位C成分传导速度和幅度的变化是一致的;这种变化同IE的浓度的变化是相关的,它们具有量效关系。值得注意的是从R₁的记录看,各成分的潜伏期和幅度都没有R₂的记录那样大的变化(表3,表4),而且幅度有所增加。这提示,IE对神经动作电位传导的阻滞作用很可能是一种去极化阻滞作用。因为去极化可由细胞膜的破坏或由膜通道和膜钠-钾泵活动的削弱引起^[4]。从电镜照片图1中的A图中可见清晰的双层磷脂膜(箭头所指);B图显示5%IE处理12m in后的轴膜结构纵切,纤维右侧的双层磷脂膜清晰(箭头a所指),而其左侧的磷脂膜已现模糊(箭头b所指);C图和D图分别为10%IE和25%IE处理12m in后的轴膜结构横切,图中箭头所示处可见轴膜明显增厚。受IE处理后,结构改变的轴膜很可能会改变其离子通透性,导致轴膜的去极化和兴奋传导阻滞。电生理实验表明IE的传导阻滞作用部分可能是功能性的,因为这种传导阻滞作用是可逆的。一般在洗药12m in后,复合动作电

位诸成分的幅值和潜伏期都能得到部分恢复(表3~表5)这提示轴膜的兴奋传导功能得到了部分的恢复. IE对牛蛙坐骨神经复合动作电位 $A_{\alpha\beta}$, A_{δ} 和 B 成分的传导也有阻滞作用. $A_{\alpha\beta}$, A_{δ} 和 B 类纤维都是由髓鞘包裹的有髓纤维. 髓鞘同轴膜一样, 也由双层磷脂膜组成. 作为临床的镇痛剂, IE对轴膜结构的影响和对兴奋传导的阻滞作用的发现将有助于我们进一步了解它的镇痛机制.

参 考 文 献

- 1 上海医药工业研究院. 药品集第九分册 神经系统药物, 上海: 上海科技出版社, 1985: 56
- 2 叶文博, 薛韶萍, 李劲. 野木瓜注射液对牛蛙坐骨神经传导的影响. 上海师范大学学报(自然科学版), 1997, 26(4): 49
- 3 O t t o s o n D. Physiology of the Nervous System. London: The Macmillan Press LTD, 1983: 14
- 4 鲁 T C, 傅尔顿 J F. 医学生理学和生物物理学(上册), 北京: 科学出版社, 1978: 57

Effects of Injection Erycibe on the Sciatic Nerve of Bullfrog

Ye Wenbo Jiang Fang Ding Shaoping Dai Sum ei
(College of Life and Environment Science)

Abstract Injection Erycibe (IE) was locally applied on a part of the Sciatic Nerve of Bullfrog. 12 minutes after administration with 5% IE, 10% IE and 25% IE respectively, the latencies of C components of the compound action potential were delayed and the bi-layers structure of axon membrane of C fibre was changed correspondingly. There was dependency between concentration of IE and its effects on the nerve.

Key words Injection Erycibe; axon membrane; nerve conduction