

[文章编号] 1671-587X(2012)01-0037-05

## 靶向 PTTG 和 survivin 基因共干扰质粒对 U251 细胞的沉默效率

徐松柏<sup>1</sup>, 刘宝斌<sup>1</sup>, 赵红光<sup>2</sup>, 于洪泉<sup>1</sup>, 李蕴潜<sup>1</sup>, 张显峰<sup>1</sup>, 张宇<sup>1</sup>, 金铮<sup>1</sup>, 赵刚<sup>1</sup>

(1. 吉林大学第一医院神经外科, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学第一医院核医学科, 吉林 长春 130021)

**[摘要]** 目的: 探讨共干扰质粒 pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA 对 U251 细胞人垂体瘤转化基因 (PTTG) 和生存素 (survivin) 基因表达的影响。方法: U251 细胞分为 5 组, 分别为正常细胞对照组、Lipo2000 + pGenesil-2.1 HK 组 (HK 阴性对照组)、Lipo2000 + pGenesil-2.1-PTTG siRNA、Lipo2000 + pGenesil-2.1-survivin siRNA 及 Lipo2000 + pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA。应用 RT-PCR 法、流式细胞术和 Western blotting 方法检测转染 36 h 后的各组 U251 细胞 PTTG 与 survivin 基因 mRNA 和蛋白表达。结果: 3 个干扰组的 U251 细胞中 PTTG 和 survivin 基因 mRNA 和蛋白表达水平均较 HK 阴性对照组显著降低 ( $P < 0.01$ ), 以共干扰质粒 pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA 组降低最明显。结论: 共干扰 pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA 质粒对 U251 细胞中 PTTG 与 survivin 基因的沉默效应强于单独沉默其中某一基因的干扰质粒。

**[关键词]** 垂体肿瘤转化基因; 生存素; RNA 干扰; 胶质瘤

**[中图分类号]** Q26; R739.41 **[文献标志码]** A

## Silence effects of double interfering vector targeting PTTG and survivin genes on U251 cells

XU Song-bai<sup>1</sup>, LIU Bao-bin<sup>1</sup>, ZHAO Hong-guang<sup>2</sup>, YU Hong-quan<sup>1</sup>, LI Yun-qian<sup>1</sup>,  
ZHANG Xian-feng<sup>1</sup>, ZHANG Yu<sup>1</sup>, JIN Zheng<sup>1</sup>, ZHAO Gang<sup>1</sup>

(1. Department of Neurosurgery, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China;

2. Department of Nuclear Medicine, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

**Abstract: Objective** To explore the effects of double interfering vector pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA on PTTG and survivin gene expressions in human U251 glioma cell line. **Methods** U251 cells were divided in to five groups; normal control, negative control (Lipo2000 + pGenesil-2.1 HK), Lipo2000 + pGenesil-2.1-PTTG siRNA, Lipo2000 + pGenesil-2.1-survivin siRNA and Lipo2000 + pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA groups. The PTTG and survivin protein and mRNA levels in every group were measured with flow cytometry, Western blotting and RT-PCR method after U251 cells were transfected with these plasmids. **Results** The PTTG and survivin protein and mRNA levels in Lipo2000 + pGenesil-2.1 PTTG siRNA, Lipo2000 + pGenesil-2.1 survivin siRNA and Lipo2000 + pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA groups were decreased significantly compared with negative control group ( $P < 0.01$ ), especially in pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA group. **Conclusion** The silence effects of double interfering vector pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA on PTTG and survivin gene in U251 cells are stronger than those of pGenesil-2.1-PTTG siRNA or pGenesil-2.1-survivin siRNA.

**Key words:** pituitary tumor transforming gene; survivin; RNAi; glioma

**[收稿日期]** 2011-04-02

**[基金项目]** 教育部博士点基金资助课题 (20070183193); 吉林省科技厅自然科学基金资助课题 (200705108, 200505228)

**[作者简介]** 徐松柏 (1978-), 男, 吉林省长春市人, 讲师, 医学博士, 主要从事胶质瘤基因治疗的研究。

**[通信作者]** 赵刚 (Tel: 0431-88782463, E-mail: jackieshew@sina.com)

胶质瘤的发生发展常常为多基因共同作用的结果<sup>[1-3]</sup>,因此在制定胶质瘤的基因治疗策略时不应仅靶向单个基因。垂体肿瘤转化基因(pituitary tumor transforming gene, PTTG)与生存素(survivin)作为癌基因与胶质瘤的发生发展密切相关,PTTG是一种强有力的肿瘤转化基因,参与胶质瘤细胞的有丝分裂、细胞周期的进行、DNA修复及细胞凋亡几个关键的活动<sup>[4-6]</sup>。survivin是有丝分裂及程序性细胞死亡关键调控因子,并且与肿瘤发生发展的许多环节有密切关联<sup>[7-8]</sup>。PTTG与survivin基因在大多数恶性肿瘤都有表达,在正常组织中几乎未见表达,并且二者在刺激肿瘤细胞恶性增殖生长的过程中,相互之间也可能存在相互促进的倾向<sup>[9-10]</sup>,故二者是胶质瘤基因治疗的理想靶点。在恶性胶质瘤细胞系U251中二种基因均呈强表达,这也为本研究奠定了基础。本研究通过前期合成的靶向PTTG与survivin的共干扰质粒对胶质瘤细胞株U251细胞进行干扰,探讨共干扰质粒对PTTG和survivin基因表达的影响

## 1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂 人脑胶质瘤细胞株U251为本科研究室保存。阴性干扰质粒pGenesil-2.1-HK siRNA、PTTG干扰质粒pGenesil-2.1-PTTG siRNA、survivin干扰质粒pGenesil-2.1-survivin siRNA和双干扰质粒pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA由本科研究室构建并保存;胎牛血清、IMDM培养基购自Gibco公司(美国);阳离子脂质体lipofectamine 2000购自Invitrogen公司(美国);RT-PCR试剂盒、DL2000 marker和PCR引物均购自Takara公司(大连);兔抗人survivin单抗、兔抗人PTTG单抗和HRP标记的山羊抗兔IgG为美国Santa Cruz公司产品,其他生化试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养和转染 U251细胞用含10%胎牛血清的IMDM培养液,于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中常规培养。细胞转染采用阳离子脂质体介导法,按Lipofectamine 2000说明书操作。

1.3 双干扰质粒pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA作用后U251细胞PTTG和survivin蛋白表达检测 实验分为5组,分别为正常细胞对照组、Lipo2000+pGenesil-2.1 HK组(HK阴性对照组)、Lipo2000+pGenesil-2.1-PTTG siRNA、Lipo2000+pGenesil-2.1-survivin siRNA和

Lipo2000+pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA,每组8复孔。质粒转染U251细胞36 h后收集其中4复孔细胞,以4%多聚甲醛固定5 min, Triton打孔5 min,冷乙醇固定30 min以上, PBS洗涤2次,再将细胞混匀,加入PTTG单克隆鼠抗人一抗(1:50),室温下作用1 h, PBS洗涤2次,加入FITC标记的羊抗小鼠二抗(1:50),室温避光作用30 min后,流式细胞仪检测蛋白表达百分率,同理用相同的方法检测另外4孔survivin蛋白的表达百分率。通过Western blotting法检测各组细胞中PTTG及survivin蛋白表达水平,实验分组同上,使用ECL发光试剂盒,于暗室曝光观察蛋白表达情况,照相记录,分析结果。

1.4 转染后PTTG与survivin基因mRNA表达水平检测 Primer 3.0软件设计并合成引物(Takara公司,中国大连)。RT-PCR过程按照试剂盒说明书操作:SYBR Premix Ex TaqTM(2×) 12.5 μL, PCR Forward Primer(10 μmol·L<sup>-1</sup>) 0.5 μL, PCR Reverse Primer(10 μmol·L<sup>-1</sup>) 0.5 μL, ROX Reference Dye II(50×) 0.5 μL, 模板cDNA 2.0 μL, ddH<sub>2</sub>O(灭菌蒸馏水) 9.0 μL, 总计反应体系为25 μL。人内参照GAPDH基因引物序列:上游,5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3';下游,5'-GAGGCAT-TGCTGATGATCTTG-3';目的片段长度472 bp。人PTTG基因引物序列:上游,5'-AGTTTCAA-CACCACGTTTTGGC-3';下游,5'-CTTTTCA-AGCTCTCTCCT-3';扩增产物长度为352 bp。人survivin基因引物序列:上游,5'-CCACCG-CATCTCTACATTCA-3';下游,5'-CAAGTCT-GGCTCGTTCTCAGT-3';扩增产物长度为115 bp。

1.5 统计学分析 采用SPSS 14.0软件包进行统计学处理,mRNA及蛋白表达率以百分率表示,组间比较采用卡方检验。

## 2 结果

2.1 共干扰质粒pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA转染后U251细胞PTTG和survivin蛋白表达 流式细胞术检测各组质粒转染U251细胞36 h后PTTG及survivin蛋白表达水平,正常对照组、HK阴性对照组、pGenesil-2.1-PTTG siRNA、pGenesil-2.1-survivin siRNA和pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA组PTTG蛋白表达百

分率分别为 47.7%、46.3%、20.3%、40.5% 和 11.9%，即 pGenesil-2.1-PTTG siRNA、pGenesil-2.1-survivin siRNA 和 pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA 对 U251 细胞中 PTTG 蛋白表达干扰效率分别约为 57.4%、15.1% 和 75.1%，3 个干扰组 U251 细胞中 PTTG 蛋白表达量较阴性对照组均显著降低 ( $P < 0.01$ )，以共干扰组 PTTG 的表达降低最明显。而 5 个组 survivin 蛋白表达百分率分别为 78.9%、77.5%、60.2%、29.5% 和 17.4%，即 pGenesil-2.1-PTTG siRNA、pGenesil-2.1-survivin siRNA 和 pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA 对 U251 细胞中 survivin 蛋白表达干扰效率分别约为 23.7%、62.6% 和 77.9%，3 个干扰组 U251 细胞中 survivin 蛋白表达量较 HK 阴性对照组均显著降低 ( $P < 0.01$ )，以共干扰组 survivin 的表达降低最明显。同时通过 Western blotting 检测各组的 PTTG 及 survivin 蛋白表达情况，结果分别见图 1 和 2，与流式细胞术检测结果基本一致。

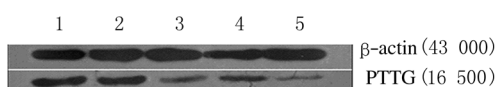


图 1 各组 PTTG 蛋白表达的 Western blotting 结果

Fig.1 Western blotting results of PTTG protein expressions in various groups

Lane 1: Normal control group; Lane 2: HK negative control group; Lane 3: pGenesil-2.1-PTTG siRNA group; Lane 4: pGenesil-2.1-survivin siRNA group; Lane 5: pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA group.

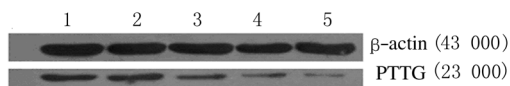


图 2 各组 survivin 蛋白表达的 Western blotting 结果

Fig.2 Western blotting results of survivin protein expressions in various groups

Lane 1: Normal control group; Lane 2: HK negative control group; Lane 3: pGenesil-2.1-PTTG siRNA group; Lane 4: pGenesil-2.1-survivin siRNA group; Lane 5: pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA group.

2.2 双干扰质粒 pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA 转染后 U251 细胞 PTTG 和 survivin 基因 mRNA 表达 半定量 RT-PCR 法检测结果:

pGenesil-2.1-PTTG siRNA、pGenesil-2.1-survivin siRNA 和 pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA 3 个转染组 PTTG mRNA 表达水平分别约为 25.0%、58.5% 和 17.5%，较正常对照组 (67.5%，HK 阴性对照组为 65.0%) 分别减低约 60%、12% 和 74%；pGenesil-2.1-PTTG siRNA、pGenesil-2.1-survivin siRNA 和 pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA 3 个转染组 survivin mRNA 表达水平分别约为 65.0%、25.0% 和 11.4%，较正常对照组 (75.0%，HK 阴性对照组为 74.4%) 分别减低约 13.0%、70.0% 和 85.0%，电泳结果见图 3 和 4。转染双基因干扰质粒 pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA 36 h 后，相应的 PTTG 和 survivin 基因的 mRNA 表达水平与正常对照和 HK 阴性对照组比较明显降低 ( $P < 0.05$ )，表明所构建的 pGenesil 2-PTTG-survivin siRNA 能同时有效地干扰 PTTG 和 survivin 基因 mRNA 的表达。

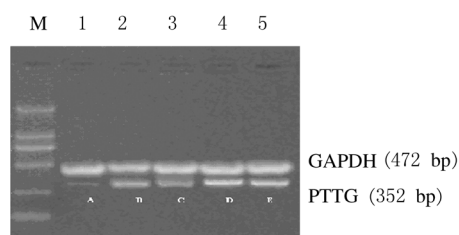


图 3 各组 U251 细胞中 PTTG mRNA 表达的电泳图

Fig.3 Electrophoregram of PTTG mRNA expressions in U251 cells in various groups

M: DL 2 000 marker; Lane 1: pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA group; Lane 2: pGenesil-2.1-survivin siRNA group; Lane 3: pGenesil-2.1-PTTG siRNA group; Lane 4: HK negative control group; Lane 5: Normal control group.

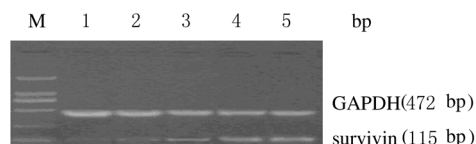


图 4 各组 U251 细胞中 survivin mRNA 表达的电泳图

Fig.4 Electrophoregram of survivin mRNA expression of U251 cells in various groups

M: DL 2 000 marker; Lane 1: pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA group; Lane 2: pGenesil-2.1-survivin siRNA group; Lane 3: pGenesil-2.1-PTTG siRNA group; Lane 4: HK negative control group; Lane 5: Normal control group.

### 3 讨论

本研究利用流式细胞术及 Western blotting 法分析各组 PTTG 蛋白表达率:正常对照组与 HK 阴性对照组无比较明显差异,而 3 个干扰质粒组的表达率均低于 HK 阴性对照组,且 3 组 PTTG 的表达率同样存在明显的差异性,以 pGenesil-2.1 PTTG-survivin siRNA 组最低,说明该组同时沉默 PTTG 和 survivin 的干扰质粒对 U251 细胞 PTTG 蛋白的表达产生了最强抑制效果(干扰效率 75.1%),而 pGenesil-2.1-survivin siRNA 组的蛋白表达率(40.5%)虽也明显低于 HK 阴性对照组,但对 U251 细胞的 PTTG 表达的抑制效果(干扰率 15.1%)却不如其他 2 个干扰组。从机制上来看,在 pGenesil-2.1-PTTG siRNA 组,干扰质粒表达出针对于 PTTG mRNA 的 shRNA,对 PTTG 基因直接产生沉默效应,因此该转染组的 PTTG 蛋白的表达受到明显的抑制并不难理解;在 pGenesil-2.1-survivin siRNA 组,干扰质粒载体只表达针对 survivin 基因的 shRNA,对于 PTTG 的 mRNA 并无直接的沉默效应,但从本实验结果来看,该组 PTTG 蛋白的表达虽然没有 pGenesil-2.1-PTTG siRNA 组下降明显,但与 HK 阴性对照组比较仍有明显的降低。本文作者认为:pGenesil-2.1-survivin siRNA 组 PTTG 蛋白的表达抑制效应与 survivin 基因的沉默密切相关,沉默 survivin 基因,可以诱导肿瘤细胞趋向凋亡,各种癌基因表达的活跃度也可降低<sup>[11-12]</sup>,pGenesil-2.1-survivin siRNA 组 U251 细胞癌基因 PTTG 蛋白表达的下降证明了本文作者的分析。在 pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA 组,表达载体同时表达出针对 PTTG 和 survivin 的 shRNA,对 2 种癌基因同时产生干扰效应,沉默其表达,以上 2 种抑制 PTTG 蛋白表达的机制产生了协同效应,因此对于 U251 细胞 PTTG 蛋白的干扰效率也最强,达到了 75.1%。

本研究中各实验组 survivin 蛋白表达结果表明:正常对照组与 HK 阴性对照组表达率无明显差异,而 3 个干扰质粒组的表达率均低于 HK 阴性对照组,且 3 组 survivin 蛋白的表达率同样存在明显的差异性,以联合干扰组最低(11.4%),说明联合干扰组同时沉默 PTTG 和 survivin 的干扰质粒对 U251 细胞 survivin 蛋白的表达产生了最强抑制效果(干扰效率 85.6%),而 pGenesil-2.1-

PTTG siRNA 组的 survivin 蛋白表达率(60.2%)虽也明显低于 HK 阴性对照组,但对 U251 细胞的 survivin 表达的抑制效果(干扰效率 23.7%)却不如其他 2 个干扰组。从机制上来看,在 pGenesil-2.1-PTTG siRNA 组,干扰质粒载体只表达针对 PTTG 基因的 shRNA,对于 survivin 的 mRNA 并无直接的沉默效应,但从本实验结果来看,pGenesil-2.1-PTTG siRNA 组对 survivin 基因的干扰虽然没有 pGenesil-2.1-survivin siRNA 组(干扰效率 62.6%)明显,但与 HK 阴性对照组比较仍有明显的降低(干扰效率 23.7%)。本文作者认为:本组 survivin 蛋白的表达抑制效应与 PTTG 基因的沉默密切相关,沉默 PTTG 基因可以抑制肿瘤细胞过度增生状态,降低肿瘤的增殖活性,在整体上调解肿瘤细胞状态的同时也降低了某些癌基因的过度表达,本实验结果也支持上述推断。在 pGenesil-2.1-survivin-siRNA 组,干扰质粒表达出针对于 survivin mRNA 的 shRNA,对 survivin 基因直接产生沉默效应,该转染组的 survivin 蛋白的表达受到明显的抑制(干扰效率 62.6%)并不难理解,从客观上证明了本实验构建的干扰载体的有效性;pGenesil-2.1-PTTG-survivin siRNA 组对 U251 细胞 survivin 蛋白的干扰效率最强,达到了 77.9%,与干扰 PTTG 的原理类似,2 种抑制机制的协同效应增大了干扰效率。半定量 RT-PCR 法分析各组 PTTG 和 survivin mRNA 水平结果与蛋白表达结果基本一致,进一步证实所构建的共干扰载体可有效降低 U251 细胞中 PTTG 和 survivin 基因的表达。

PTTG 和 survivin 两种基因均为调控细胞有丝分裂的关键性基因,研究其相互关系对癌细胞增殖调控有着重要作用。上述研究结果证实:同时沉默 PTTG 和 survivin 两种基因的干扰效果强于单独沉默一种基因。本实验结果为进一步揭示 PTTG 和 survivin 基因在胶质瘤中的作用奠定了基础。

#### [参考文献]

- [1] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways [J]. *Nature*, 2008, 455 (7216): 1061-1068.
- [2] Baulac S, Baulac M. Advances on the genetics of mendelian idiopathic epilepsies [J]. *Neurol Clin*, 2009, 27 (4): 1041-1061.
- [3] deGroot JF, Sulman EP, Aldape KD, et al. Multigene sets for clinical application in glioma [J]. *J Natl Compr Canc*

- Netw, 2011, 9 (4): 449-456.
- [4] Chamaon K, Kirches E, Kanakis D, et al. Regulation of the pituitary tumor transforming gene by insulin-like-growth factor-I and insulin differs between malignant and non-neoplastic astrocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331 (1): 86-92.
- [5] Genkai N, Homma J, Sano M, et al. Increased expression of pituitary tumor-transforming gene (PTTG) -1 is correlated with poor prognosis in glioma patients [J]. *Oncol Rep*, 2006, 15 (6): 1569-1574.
- [6] Tfelt-Hansen J. The role of calcium-sensing receptor and signalling pathways in the pathophysiology in two in vitro models of malignant hypercalcemia; the rat rice H-500 Leydig testis cancer and prostate cancer (PC-3) cells. Expression and regulation of pituitary tumor transforming gene in Leydig testis cancer and astrocyte and astrocytoma cells [J]. *Dan Med Bull*, 2008, 55 (1): 17-46.
- [7] Shirai K, Suzuki Y, Oka K, et al. Nuclear survivin expression predicts poorer prognosis in glioblastoma [J]. *J Neurooncol*, 2009, 91 (3): 353-358.
- [8] Zhen HN, Li LW, Zhang W, et al. Short hairpin RNA targeting survivin inhibits growth and angiogenesis of glioma U251 cells [J]. *Int J Oncol*, 2007, 31 (5): 1111-1117.
- [9] Chao JI, Liu HF. The blockage of survivin and securin expression increases the cytochalasin B-induced cell death and growth inhibition in human cancer cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 69 (1): 154-164.
- [10] Chintharlapalli S, Papineni S, Lee SO, et al. Inhibition of pituitary tumor-transforming gene-1 in thyroid cancer cells by drugs that decrease specificity proteins [J]. *Mol Carcinog*, 2011, 50 (9): 655-667.
- [11] Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin [J]. *Nature*, 1998, 396 (6711): 580-584.
- [12] Lladser A, Sanhuesa C, Kiessling R, et al. Is survivin the potential Achilles' heel of cancer? [J]. *Adv Cancer Res*, 2011, 111 (1): 1-37.

## 纳洛酮治疗脑梗死患者 89 例临床分析

浙江省绍兴市人民医院神经内科 浙江大学绍兴医院(浙江 绍兴 312000) 孙新芳, 肖桂荣, 桂小红

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 2 月—2010 年 2 月本院神经内科所收治的住院脑梗死患者 89 例, 将其分成常规治疗组和纳洛酮治疗组。常规治疗组 44 例, 男性 25 例, 女性 19 例, 年龄 40~82 岁, 平均年龄(62.4±11.3)岁; 纳洛酮治疗组 45 例, 男性 24 例, 女性 21 例, 年龄 41~80 岁, 平均年龄(61.2±9.3)岁。2 组患者在年龄、性别构成比以及并发症、神经功能缺损方面差异无统计学意义( $P>0.05$ )。同时 2 组患者均经 MRI 或头颅 CT 诊断, 均符合 1995 年全国第 4 届脑血管会议的诊断依据, 2 组患者的发病时间均在 48 h 内, 在入院前均未行溶栓与抗凝治疗。两组患者经临床神经功能缺损评分判定: 轻度 20 例, 中度 44 例, 重度 25 例。

1.2 治疗方法 常规治疗组: 使用甘露醇脱水治疗, 20%甘露醇加 250 mL 静脉点滴, 每日 4 次, 对心律失常者或心功能不全患者禁用; 10%甘油加 500 mL 液体静脉点滴, 每日 1 次; 抗血小板聚集药物低分子右旋糖酐 500 mL 静脉点滴, 每日 1 次, 一个疗程为 10~14 d; 尿激酶或链激酶行溶栓治疗。纳洛酮治疗组在常规组基础上, 给予纳洛酮静脉点滴, 2 mg 纳洛酮加 250 mL 生理盐水, 每日 1 次, 2 周 1 个疗程。

1.3 疗效判定标准及统计学分析 2 组患者在入院治疗 24 h 内及治疗 5 周后, 依据全国第 4 届脑血管病学制定方案给予神经功能缺损与生活能力状态量表评定。治愈: 病残度为 0 级, 神经功能缺损评分减少 90%以上; 显效: 病残度 1~3 级, 神经功能缺损评分减少 46%~90%; 有效: 神经功能缺损评分减少 17%~45%; 无改善: 神经功能缺损评分未减少, 甚至有所增加, 减少与增加在 18%以内; 恶化: 神经功能缺损评分增加 18%以上。采用 Excel 数据库进行资料整理, 2 组间有效率比较采用  $\chi^2$  检验。

### 2 结果

2 组患者神经功能缺损与生活能力状态评定结果: 纳洛酮治疗组, 治愈 11 例(24.4%), 显效 20 例(44.4%), 有效 10 例(22.2%), 无改善 4 例(8.9%), 恶化 0 例(0), 总有效率 91.0%; 常规治疗组, 治愈 6 例(13.6%), 显效 13 例(29.5%), 有效 6 例(13.6%), 无改善 14 例(31.8%), 恶化 5 例(11.4%), 总有效率 56.7%, 2 组总有效率比较差异有统计学意义( $\chi^2=10.780, P<0.05$ )。

### 3 讨论

临床研究表明: 神经元的损伤主要是因脑梗死发生后缺血区微循环障碍,  $\beta$ -内啡肽释放大量增加, 对神经元的传入与传出通路产生抑制。纳洛酮可阻断阿片受体, 从而解除  $\beta$ -内啡肽对神经元传入与传出通路的抑制作用, 促进神经功能损伤的快速恢复, 同时对  $\beta$ -内啡肽产生拮抗, 使脑血流量增加, 最大限度避免了再灌注损伤。纳洛酮对细胞膜有保护作用, 通过直接作用于神经细胞, 稳定溶酶体酶, 对蛋白水解酶产生抑制, 对脂质过氧化有抑制作用。纳洛酮治疗可逆转 ATP 酶的活性, 并阻滞钙离子出现内流, 对细胞膜起到了稳定作用, 减小损伤范围。