

益气化瘀方对大鼠腰神经根受压后神经肌肉终板再生修复的作用

周重建, 王拥军, 施 杞, 侯宝兴, 刘 梅

(上海中医药大学脊柱病研究所, 上海中医药大学龙华医院伤骨科, 上海 200032)

[摘要] 目的 探讨大鼠 L₅ 神经根受压后,在神经再生修复过程中,益气化瘀方对神经肌肉接头部神经元的作用。方法 48 只大鼠随机分为 10、20、30、60 d 对照组和益气化瘀方组。制作大鼠 L₅ 神经根受压模型,益气化瘀方组给予益气化瘀方灌胃,对照组给予等量生理盐水。造模后 10、20、30、60 d 取大鼠比目鱼肌,采用多克隆蛋白基因产物 9.5 作为神经元标记,应用免疫组织化学法结合激光共聚焦扫描显微技术,观察神经肌肉接头部末梢神经再生修复的过程。环蛇毒素荧光结合剂显示运动终板,NIH 图像分析技术测定末梢神经与运动终板的重叠面积。结果 肌肉失神经支配后,益气化瘀方组的末梢神经在神经肌肉接头部的聚集、出芽及延伸均显著地早于对照组。在神经再生修复期间,益气化瘀方组的末梢神经与运动终板的重叠速度、范围及神经肌肉接头的再构筑,亦显著地优于对照组。结论 益气化瘀方能促进神经元的增生,增强其再生能力,加快神经肌肉接头的重建,显著地缩短神经再生修复的进程。

[关键词] 中草药; 脊神经根; 创伤,神经系统; 再生; 运动神经肌肉终板; 基因产物,蛋白质

[中图分类号] R651.22 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2003)04-0277-04

Effect of Yiqi Huayu Recipe on regeneration process after L₅ nerve root compression in rats

ZHOU Chong-Jian, WANG Yong-Jun, SHI Qi, HOU Bao-Xing, LIU Mei

(Institute of Spinal Disease, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

[ABSTRACT] **Objective** To study the effect of Yiqi Huayu Recipe on neurons in neuromuscular junction after L₅ nerve root compression in rats. **Methods** By using immunohistochemistry, confocal laser scanning techniques and protein gene product 9.5 as a neuronal marker, the motor endplates were visualized with fluorescein-conjugated α -BTX. The effect of Yiqi Huayu Recipe on nerve terminals of neuromuscular junction at 10, 20, 30, 60 days after L₅ nerve root compression was observed in rat soleus muscles during regeneration. The overlap areas of terminals and endplates were measured with NIH image technique. **Results** As for the aggregates, sprouts, extension of nerve terminal during regeneration, the connecting speed and range of nerve terminal with endplates, as well as the reformation of neuromuscular junctions during regeneration, Yiqi Huayu Recipe group was better than that of the control group. **Conclusion** Yiqi Huayu Recipe can promote the hyperplasia of neurons and enhance the regeneration function. It also can accelerate the neuromuscular junction reformation and shorten the process of regeneration.

[KEY WORDS] drugs, Chinese herbal; spinal nerve roots; trauma, nervous system; regeneration; motor endplate; gene products, protein

[J Chin Integr Med, 2003, 1(4): 277-280]

在神经肌肉接头部,神经-肌肉之间的信号传递必须通过突触予以实施和维持,突触传递是其中最具特征性的功能^[1]。由于神经肌肉接头部的突触区域较易接近,且可观察单个的神经末梢,因此特别适于作为研究轴突终端细胞支架成分的模型^[2]。周围神经损伤后,再生神经通常能自发地找到原先的突触并对原先的运动终板优先进行神经再支配。然而尚不清楚肌纤维是如何促使这些易感神经再生的。一种假设是变性可导致某些可溶性因子的释放,它们能刺激轴突生长和突触的重建^[3]。在哺乳类动物的周围神经系统中,轴突的生长存在 3 种形式:(1) 损伤轴突的神经再生;(2) 轴突终端的局部重建;(3)

未受损轴突的侧芽进入失神经支配区域。蛋白基因产物 9.5 (protein gene products 9.5, PGP_{9.5}) 可出现在所有损伤神经的轴突成分中,包括原轴突和来自神经节的再生神经芽^[4],是显示轴突生长的特定标记。我们曾采用激光共聚焦扫描显微技术结合免疫组织化学法确定了 PGP_{9.5} 在大鼠肌肉突触部的分布^[5],表明 PGP_{9.5} 在研究和证实神经肌肉接头部神经元和细胞间关系的实验中是一种很好的示踪物质。

随着社会的老龄化,骨赘相关疾病不断增多,严

重影响人类的健康及生活质量。目前用于临床治疗的各种神经营养因子虽对神经元胞体具有一定的保护作用,但由于来源不易、价格昂贵及有一定的副作用等原因,使其临床应用受到了限制。我们自拟的益气化痰方由黄芪、麝香、川芎等组成,具有益气化痰、行气通络的作用,在临床上长期用于治疗因骨赘导致的神经根受压疾病,疗效显著。为了探求益气化痰方治疗失神经支配及在神经再生修复过程中的作用机制,我们采用 PGP_{9.5} 作为特定标记,对大鼠比目鱼肌的轴突进行免疫染色,并与对照组比较,观察肌内神经分支的分布特征及再生神经的生长参数,结果表明,益气化痰方对于神经再生修复过程中神经肌肉接头的重建(包括神经末梢的生长)具有明显的促进作用。

1 材料与方

1.1 实验动物与分组 3 月龄雄性 SD 大鼠 48 只(上海中医药大学动物实验中心提供),体重 300 ~ 320 g,随机分为 10、20、30、60 d 对照组和 10、20、30、60 d 益气化痰方组,共 8 组,每组 6 只。

1.2 模型制备与取材 采用本研究所 1999 年建立的腰神经根压迫造模方法^[6]。大鼠经氯胺酮 0.10 ~ 0.12 g/kg 腹腔注射麻醉后,以 L_{4,5} 椎体间隙为中心,后背正中切开长度约 4 cm,逐层切开后暴露椎板,去除 L_{4,5} 棘突、椎板及 L_{4,5} 右侧关节突,充分暴露马尾神经及右侧 L₅ 神经根,将(30 ± 1.5)mg 的硅胶片置于 L₅ 神经根与硬膜囊交界处的腋部,局部固定,逐层缝合,待大鼠苏醒后,放回笼中饲养。术后第 2 天,益气化痰方组给予益气化痰方灌胃,对照组给予等量生理盐水灌胃。按预定时间分别观察 10、20、30、60 d 后,用乙醚麻醉大鼠,打开胸腔,用 0.01 mol/L pH 7.6 的磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffer saline, PBS)行心内灌注,再用以 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 液稀释的 4% 多聚甲醛固定液进行前固定,取右侧比目鱼肌,用别针将标本固定在小盘中(以防止肌肉收缩),然后用上述固定液再行后固定约 6 ~ 8 h,去除肌肉周围的结缔组织后,将肌肉浸入 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 液中,放置于 250 g/L 的蔗糖溶液中 48 h 用于冻结保护,然后将标本置于包埋液中,立即用液氮冷冻,放置于深低温冰箱中备用。标本用 Frigocut Germany 恒冷(-20 °C)切片机行纵切片,切片厚 50 μm,并保存于含有 0.01 mol/L PBS 液的容器内。

1.3 中药 益气化痰方由黄芪、川芎、人工麝香、人工牛黄、汉防己等中药组成,水煎浓缩后,按生药 5.03 g · kg⁻¹ · d⁻¹ 给大鼠鼻饲灌胃,按不同分组分

别给药 10、20、30 和 60 d。

1.4 免疫组织化学实验 实验均采用游离切片染色。切片经 0.01 mol/L PBS 液和 0.4% Triton-X/PBS 液 2 次冲洗后,放入含有 0.05% NaN₃ 的 1% 小牛血清白蛋白的 PBS 液中孵化 2 h,末梢神经用多克隆蛋白基因产物 PGP_{9.5} 作为神经元标记,稀释度为 1:1600 ~ 1:2000,置室温过夜后,再加入 2 抗 Texas 红抗兔 IgG(Jackson),稀释度为 1:200,置于室温中 4 h 进行显色。用稀释度为 1:50 的 α -环蛇毒素荧光结合剂对比目鱼肌突触后膜的乙酰胆碱受体进行染色,置于室温中 4 ~ 6 h 进行染色。切片经多次 PBS 液洗涤约 1 ~ 2 h 后用封片液(Vector)封片。

1.5 激光共聚焦扫描显微技术 用荧光显微镜(Zeiss Axiophot)观察异硫氰酸荧光素和 Texas 红双重染色的切片,然后用装有氩和氩离子的激光共聚焦显微镜(CLSM-GB200 Olympus)观察其复染物质,使用 488 nm 激发异硫氰酸荧光素,568 nm 激发 Texas 红,为了降低假阳性率,每张切片分别于 1 波道和 2 波道进行拍摄。

1.6 图像分析 在神经肌肉接头部,可以清晰地观察到被 α -环蛇毒素荧光结合剂染色并显示绿色异硫氰酸荧光的乙酰胆碱斑以及覆盖于乙酰胆碱区域的红色 PGP_{9.5} 标记。采用 NIH 图像分析系统(美国 Apple 公司),分别对 10、20、30、60 d 对照组和 10、20、30、60 d 益气化痰方组大鼠的运动终板与末梢神经的重叠面积进行三维形态测定及定量分析。每组随机选取 10 ~ 12 张切片,共有 50 个运动终板。为确保测量的精确性,剔除侧面像的运动终板。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 8.0 统计软件包进行数据处理,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,采用两样本均数比较的 *t* 检验。

2 结果

2.1 L₅ 神经根受压后的组织化学观察

2.1.1 L₅ 神经根受压后 10 d 大鼠 L₅ 神经根受压 10 d 后,运动终板区域不仅丢失了乙酰胆碱受体,也缺乏覆盖的神经末梢,乙酰胆碱受体斑的形态亦变小、变细、崩解成碎片,或由于变性肌纤维的萎缩而使终板发生皱缩等[图 1(A、B),见封三]。对照组[图 1(A),见封三]除肌内神经被 PGP_{9.5} 轻度着染外,其末梢分支尚未到达运动终板区域[图 1(A[^]),见封三];而益气化痰方组[图 1(B),见封三]无论是肌内神经的染色强度还是其直径均明显大于对照组,同时能看到其末梢已接近[图 1(B[^]),见封三]或进入了运动终板区域[图 1(B[^])],见

封三]。

2.1.2 L₅ 神经根受压后 20 d 对照组和益气化痰方组的 PGP_{9.5} 染色开始逐渐增强,再生的末梢神经开始朝运动终板方向延伸。对照组神经末梢已到达运动终板区域,但仅极少数与乙酰胆碱斑发生重叠[图 1(C),见封三],而益气化痰方组的重叠面积[图 1(D),见封三]远远大于对照组,同时可以见到从运动终板边缘已延伸出数十微米长的神经芽[图 1(D[△]),见封三]。

2.1.3 L₅ 神经根受压后 30 d 此时大部分再生神经末梢已到达运动终板,表现出较为成熟的形态,乙酰胆碱斑形态亦渐趋规则,与神经末梢重叠面积逐渐扩大,以精细的结构覆盖在终板区域,[图 1(E、F),见封三]。对照组[图 1(E),见封三]可见到 3 种情况:(1)部分重叠较好的运动终板和正在延伸的神经芽[图 1(E[△]),见封三];(2)重叠不完全的终板;(3)重叠较差的运动终板。而益气化痰方组[图 1(F),见封三]除偶尔见到再生不全的终板及短小的神经芽外[图 1(F[△]),见封三],大部分神经肌肉接头已开始趋于正常,末梢神经与乙酰胆碱斑亦已很好地发生了重叠[图 1(F),见封三]。

2.1.4 L₅ 神经根受压后 60 d 此时,除肌内神经和末梢神经表现为不规则与无序外,益气化痰方组绝大部分的再生神经末梢三维结构及乙酰胆碱斑形态已恢复正常[图 1(H),见封三];而对照组仍能看到不少与末梢神经重叠不完全的运动终板,并可见到正在退缩中的神经芽[图 1(G[△]),见封三]和多神经支配现象[图 1(G),见封三],提示整个神经再生修复过程尚未完成。

2.2 末梢神经与运动终板重叠面积的测定 采用 NIH 图像分析技术,测定正常大鼠、对照组及益气化痰方组大鼠 L₅ 神经根受压后 10、20、30、60 d 末梢神经与运动终板的重叠面积(μm²),结果见图 2。

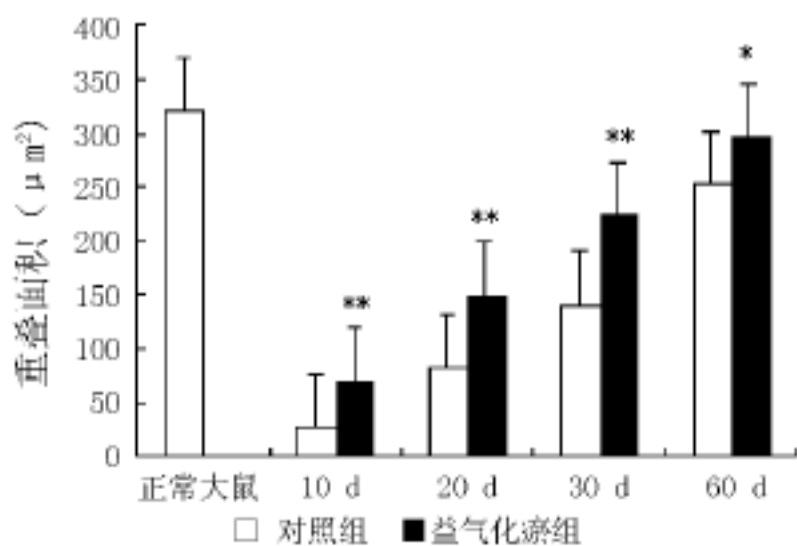


图 2 大鼠 L₅ 神经根受压后末梢神经与运动终板的重叠面积(μm²)

正常大鼠为(320.0 ± 81.8) μm²;对照组失神经支配后 10、20、30、60 d,分别为(26.2 ± 19.9) μm²、(71.5 ± 45.3) μm²、(140.1 ± 57.5) μm²、(242.2 ± 76.1) μm²;益气化痰方组则分别为(67.9 ± 47.2) μm²、(148.6 ± 72.5) μm²、(222.9 ± 79.1) μm²、(296.5 ± 83.2) μm²。益气化痰方组与对照组比较,有显著性差异(P < 0.05 或 P < 0.01)。提示在整个神经再生修复过程中,益气化痰方对神经元具有明显的促进作用。

3 讨论

PGP_{9.5} 是一种神经元胞质蛋白,是良好的周围细小神经纤维的标记物,已被广泛地应用于舌乳头和味蕾的神经支配研究^[7-9]。本实验采用 PGP_{9.5} 免疫组织化学法结合激光共聚焦扫描技术,显示了神经再生修复期间最早阶段再生运动神经末梢非常细微的结构以及自腰神经根受压起的 60 d 内再生神经末梢的成熟过程。L₅ 神经根受压后,肌肉失神经支配和神经再支配导致了运动终板、轴突及神经末梢形态发生了一系列的变化。我们发现,肌肉短暂失神经支配后,伴随着神经末梢的消退,运动终板区域失去了部分乙酰胆碱受体。上述变化与突触的竞争有关:(1)它们发生在轴突撤退期间;(2)它们大多优先发生在多神经支配的运动终板上。与此同时,原来的运动终板区域开始进行神经肌肉接头的重建,大部分局限在窄沟内的亚突触膜逐渐被再生神经末梢所覆盖。尽管神经支配形态与正常形态之间存在多处差异,但这些精确的神经再支配表明,原始的突触与再生神经之间可能有某种特异的亲和力。实验结果显示,益气化痰方组无论是乙酰胆碱受体斑的形态复原,还是 PGP_{9.5} 的染色强度,轴突末梢的出芽速度及到达运动终板的时间均明显优于对照组,表明益气化痰方具有显著促进再生神经生长的作用。我们通过测量沟内的细胞结构来估算被再生神经末梢覆盖的后突触膜量^[10]。应用 NIH 图像分析技术,我们测量了神经末梢与突触的重叠面积,结果发现整个神经再生期间(< 60 d),对照组和益气化痰方组的重叠面积均呈由低到高趋势,而益气化痰方组神经末梢与乙酰胆碱受体的接触面积明显高于对照组,至神经再支配 2 个月时,其最终的改变几乎接近于正常肌肉,而此时对照组的后突触膜也与再生的神经末梢发生重叠,但仍有 30% 的终板没有被覆盖。益气化痰方能促进神经细胞生长,加快其到达运动终板的速度,因此较对照组能明显缩短神经再生修复的进程,且其末梢神经无论是早期的出芽数量还是后期的突起退缩以及运动终板神经再支

配的形态表现均明显优于对照组,证明益气化痰方还能明显改善神经再生期神经纤维的质量。研究表明,雪旺氏细胞是促进神经再生的重要因素,神经末梢雪旺氏细胞对运动轴突的变性反应是一个主动的过程^[11],它们的相互作用维持着运动终板正常的细胞结构。雪旺氏细胞含有促进细胞黏附、迁移及轴突生长的各种分子,还可合成多种促进轴突生长的因子,如神经生长因子、脑源性神经营养因子、胰岛素样生长因子等^[12,13]。我们过去的实验也证实,益气化痰方对神经根损伤后神经末梢雪旺氏细胞的增殖及轴突生长具有明显的促进作用^[14]。

依据中医理论,骨赘的基本病机为“气虚血瘀,本虚标实”,对此我们采用“益气化痰,标本兼顾”法治疗因骨赘所致的神经根受压疾病,自拟益气化痰方。方中黄芪益气升阳、固表内托、利水退肿;麝香活血通络、散结止痛;川芎行气活血、祛风止痛等,通过补气,使气行血活,从而达到治疗的目的。现代药理研究证实,上述中药可扩张血管,改善局部血液循环,为雪旺氏细胞的增生创造有利的微环境,促进巨噬细胞和雪旺氏细胞释放各种能增强再生神经生长的促神经营养因子,促进雪旺氏细胞浆膜或基底膜的分泌以形成适合神经末梢生长的介面。

[参考文献]

- 1 Tuffery AR . Growth and degeneration of motor endplates in normal cat hind limb muscles [J] . J Anat, 1971, 110(2) : 221-247 .
- 2 Yee WC, Pestronk A, Alderson K, *et al* . Regional heterogeneity in the distal motor axon: three zones with distinctive intrinsic components [J] . J Neurocytol, 1988, 17(5) : 649-656 .
- 3 Letourneau PC . Differences in the organization of actin in the growth cones compared with the neuritis of cultured neurons from chick embryos [J] . J Cell Biol, 1983, 97(4) : 963-973 .
- 4 Okajima S, Mizoguchi A, Masutani M, *et al* . Synap-

physin immunocytochemistry in the regenerating sprouts from the nodes of Ranvier in injured rat sciatic nerve [J] . Brain Res, 1993, 631(1) : 133-136 .

- 5 周重建, 施 杞, 王拥军, 等 . 大鼠腰神经根损伤后 PGP9 5 在运动终板再生修复过程中的形态表现 [J] . 安徽医科大学学报, 2002, 37(4) : 272-275 .
- 6 王拥军, 万 超, 沈培芝, 等 . 实验性腰神经根压迫模型的建立 [J] . 中国中医骨伤科杂志, 1999, 7(1) : 9-12 .
- 7 Ahpin P, Ellis S, Arnott C, *et al* . Prenatal development and innervation of the circumvallate papilla in the mouse [J] . J Anat, 1989, 162 : 33-42 .
- 8 Mistretta CM, Goosens KA, Farinas I, *et al* . Alterations in size, number, and morphology of gustatory papillae and taste buds in BDNF null mutant mice demonstrate neural dependence of developing taste organs [J] . J Comp Neurol, 1999, 409(1) : 13-24 .
- 9 Ringstedt T, Ibanez CF, Nosrat CA . Role of brain-derived neurotrophic factor in target invasion in the gustatory system [J] . J Neurosci, 1999, 19(9) : 3507-3518 .
- 10 周重建, 施 杞, 王拥军, 等 . 大鼠腰神经根损伤后乙酰胆碱斑的实验研究 [J] . 安徽医科大学学报, 2001, 36(3) : 178-180 .
- 11 Bixby JL, Lilien J, Reichardt LF . Identification of the major proteins that promote neuronal process outgrowth on Schwann cells *in vitro* [J] . J Cell Biol, 1988, 107(1) : 353-361 .
- 12 Heumann R, Korsching S, Bandtlow C, *et al* . Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection [J] . J Cell Biol, 1987, 104(6) : 1623-1631 .
- 13 Meyer M, Matusoka I, Wetmore C, *et al* . Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA [J] . J Cell Biol, 1992, 119(1) : 45-54 .
- 14 周重建, 施 杞, 王拥军, 等 . 益气化痰方对腰神经根压迫模型神经肌肉接合部施旺细胞的作用 [J] . 中国中医骨伤科杂志, 2002, 10(6) : 1-4 .

[收稿日期] 2003-09-04 [本文编辑] 黄文华 周庆辉

《中西医结合学报》已获准成为允许发布 处方药广告的医学药学专业刊物

根据《中华人民共和国药品管理法》第六十条规定,经卫生部和国家食品药品监督管理局共同审核,《中西医结合学报》已被认定为可以发布处方药广告的医学、药学专业刊物。

《中西医结合学报》杂志社