

·短篇论著·

大鼠坐骨神经损伤后不同部位注射鼠神经生长因子对脊髓运动神经元的保护

孙鸿安¹ 张冬艳¹ 郝永红¹ 李 阔¹ 林巧茂¹ 徐文玉¹ 穆德兴¹

目前随着社会生产的发展,周围神经损伤的临床病例越来越多^[1],但目前临床药物治疗的手段仍很单一,近年来仅鼠神经生长因子(nerve growth factor,NGF)得到商用并广泛应用于临床治疗周围神经损伤,且获得很好的疗效,它也是首个被发现,研究最清楚的一个神经营养因子,其具有神经营养与促进神经突触再生的作用,对神经细胞的生长发育与再次分化发挥重要调节作用,是参与损伤神经再生和修复的重要物质^[2-3],本研究以大鼠坐骨神经离断后再吻合创造损伤模型,研究大鼠躯体不同部位肌注 NGF 对脊髓组织运动神经元的保护和周围神经损伤再生修复的作用,为临床上 NGF 治疗外周神经损伤寻找更好疗效的注射办法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取健康9—10周龄、体重250—300g的清洁级SD雄性大鼠120只,北京维通利华公司提供。随机分为4组:离断吻合后臀部吻合处注射盐水组(A组,n=30),离断吻合后左上肢肌肉注射NGF组(B组,n=30),离断吻合后右下肢肌肉注射NGF组(C组,n=30),离断吻合后臀部吻合处注射NGF组(D组,n=30),各组吻合术后统一饲养5d后随机处死15只,21d后处死剩余15只。

1.2 实验方法

1.2.1 建立周围神经损伤模型:10%的水合氯醛(3ml/kg)腹腔注射麻醉,成功暴露右侧坐骨神经后,距梨状肌下孔约0.5cm处切断坐骨神经,以10—0医用尼龙缝合线行神经外膜端-端吻合,每端4针,针距夹角90°,手术步骤均在手术显微镜下完成,给予适量抗生素预防术区感染,分笼喂养。

1.2.2 药物干预:术后鼠神经因子(采用武汉海特生物制药股份有限公司生产商品名金路捷mNGF 20ug生物活性不低于9000AU)即按30μg/kg/d mNGF分别给予左上肢肱二头肌、右下肢股二头肌及臀部吻合处注射,盐水组臀部吻合处每日肌注等量生理盐水。

1.2.3 标本采集固定:各组在吻合术后5d处死,方法为10%

的水合氯醛(3ml/kg)腹腔麻醉后,处死动物开胸暴露心脏,37℃含镉离子的生理盐水行主动脉灌注后,沿坐骨神经逆行追踪暴露并取出与之相连的L4—6节段脊髓(以L5为中心)1cm;饲养21d后麻醉后处死动物,用钝粗针头经心尖部入主动脉后,剪开右心耳放血,快速注入温生理盐水200ml,待流出血液变清亮后,快速注入含4%多聚甲醛的PBS固定液200ml,再以200ml相同固定液维持滴注约1h后取材。暴露右侧近段坐骨神经,取出以吻合口为中心,长约1cm的神经段。沿坐骨神经逆行追踪暴露并取出与之相连的L4—6节段脊髓(以L5为中心)1cm。标本浸泡于上述固定液24h。

1.2.4 Ca²⁺浓度测定:37℃含镉离子的生理盐水行主动脉灌注后,取出脊髓段,置入37℃溶液温育20min。置70—80℃烤箱烘干72h至恒重,称量后加入浓硝酸和高氯酸各1ml,常温消化,48h置于80—100℃烤箱,蒸发12h。再放入石棉炉,使样本无机化,稀释离心,取上清液,用原子吸收分光光度计测血钙浓度。Ca²⁺离子质量浓度(μmol/L)=测定液Ca²⁺离子浓度/样品烘干后的质量×稀释倍数。

1.2.5 TUNEL检测:采用原位细胞凋亡(TUNEL)检测试剂盒(武汉博士德生物科技公司)进行检测,实验方法严格按照说明书进行。统计各组脊髓切片TUNEL检测凋亡细胞,计算阳性数。

1.2.6 神经纤维镀银染色:采用改良Glees法行神经组织镀银染色,观察神经吻合口处神经纤维的生长形态。

1.3 数据采集及统计学分析

Hpias-1000彩色病理分析系统下每种检测至少选两张切片,每张切片取2个(×100)或3个(×200)不重叠视野进行观察,测量照片至少每组需30张以上。用SPSS11.5软件进行统计学分析,所有数据以均数±标准差表示。各组均数两两比较用t检验。

2 结果

2.1 大鼠术后表现

术后4组过半数的大鼠双后肢出现不同程度水肿、自

食、糜烂等表现,而C、D组大鼠出现上述症状的时间较晚、程度较低,出现者也能较早的恢复。B、C、D组大鼠在3周左右双后肢的运动功能都有不同程度的恢复,D组则在2周左右就有恢复且较其余组早,A组运动功能恢复最差。

2.2 大鼠脊髓运动神经元HE染色

光镜下,各组运动神经元均出现细胞核偏位,尼氏小体浓缩、减少,细胞数目减少,B、C、D组间细胞数目差异有显著性意义,D组与A、B、C组相比,残存运动神经元细胞数目较其他组数目最多。(表1)

2.3 Ca²⁺浓度测定

Ca²⁺在脊髓神经元凋亡中细胞内Ca²⁺释放与钙超载是造成神经元损害的重要因素。术后5d时取L5为中心1cm脊髓节段使用原子吸收光谱分析仪做Ca²⁺浓度测定,按照Ca²⁺离子质量浓度(μmol/g)=测定液Ca²⁺离子浓度/样品烘干后的质量×稀释倍数计算公式,D组Ca²⁺离子质量浓度数值低于B、C、A组, $t(8.478) \geq t_{0.01}(3.653)$ 差异有显著性意义。见表2。

2.4 TUNEL染色阳性细胞计数

光镜下,脊髓凋亡前角运动神经元细胞阳性表达在细胞核,阳性凋亡细胞表现为细胞核呈棕黄色,细胞核染色质浓聚致密的斑点状,核固缩,细胞皱缩,细胞碎裂,形成凋亡小体(apoptosis body),术后21d时各组均发现有凋亡细胞存在。经TUNEL检测发现凋亡细胞数目D组<C组<B组<A组,各组两两比较 t 检验有显著性意义且发现D组均数值最低(4.95±0.47)。见表2,图1—4。

2.5 神经纤维镀银染色

各组术后21d处死时从神经纤维镀银染色切片可见:各组均有部分神经纤维通过吻合口;而C、D组较A、B组有较多神经纤维通过吻合口,且神经纤维排列较好,A组神经纤维通过最差,但C、D组银染图片差异不明显(图5—6)。

3 讨论

3.1 周围神经损伤后外源性NGF在脊髓运动神经元的凋亡与神经损伤再生修复中的作用

周围神经损伤的再生需要一定数量神经元的存活^[3],在

表1 脊髓前角神经元HE染色计数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	5d处死大鼠前角神经元计数	21d处死大鼠前角神经元计数
A组	30	53.67±3.30	60.29±4.52
B组	30	72.26±3.18 ^①	71.54±3.51 ^①
C组	30	78.76±2.43 ^{②③}	84.01±3.34 ^{②③}
D组	30	91.84±2.95 ^③	99.19±3.67 ^③

①与A组比较 $P < 0.05$;②与B组比较 $P < 0.05$;③与C组比较 $P < 0.05$

表2 术后5d时术后以L5为中心1cm脊髓节段Ca²⁺浓度 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/g dry wt}$)

组别	A组 (n=15)	B组 (n=15)	C组 (n=15)	D组 (n=15)
Ca ²⁺ 浓度	9.35±0.32 ^①	8.37±0.24 ^{②③}	8.41±0.40 ^③	6.20±0.27 ^①
凋亡前角运动神经元数目(个)	9.12±0.64 ^①	7.12±0.69 ^{②③}	5.99±0.33 ^③	4.95±0.47 ^①

①与A组比较 $P < 0.05$;②与C组比较 $P > 0.05$;③与D组比较 $P < 0.05$ 。

图1 离断吻合后臀部吻合处注射盐水组(A组)(TUNEL,×100)

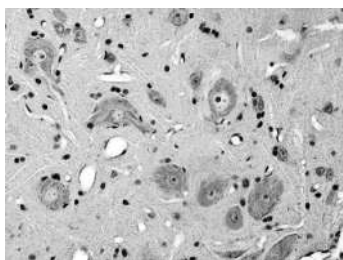


图2 离断吻合后左上肢肌肉注射NGF组(B组)(TUNEL,×200)

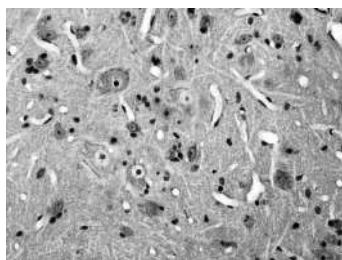


图3 离断吻合后右下肢肌肉注射NGF组(C组)(TUNEL,×200)

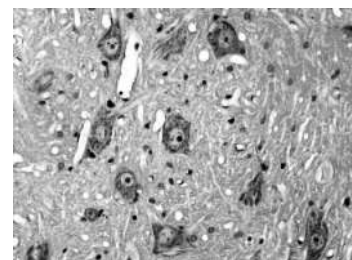


图4 离断吻合后臀部吻合处注射NGF组(D组)(TUNEL×200)

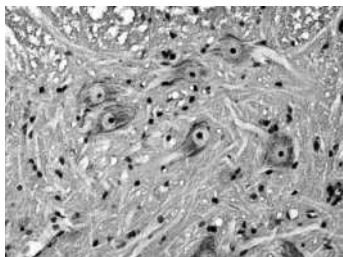
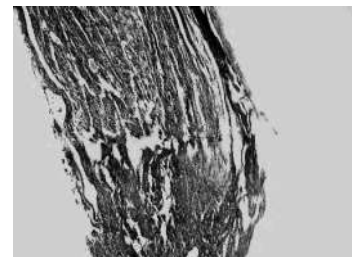


图5 离断吻合后臀部吻合处注射NGF组(D组)(镀银染色,×100)



图6 离断吻合后臀部吻合处注射盐水组(A组)(镀银染色,×50)



周围神经损伤后早期,因神经血管损伤,造成了脊髓直接的损伤,脊髓神经元的细胞膜上Ca²⁺通道即开始开放(主要是L型钙离子通道),使得细胞内钙离子超载,造成神经细胞内Ca²⁺浓度增高,钙泵失活,Ca²⁺清除功能障碍,线粒体膜电位减少,启动了细胞凋亡的信号系统并阻断了逆行轴浆营养作用,使脊髓前角运动神经元失去了靶器官的营养支持和刺激因素,引起了运动神经元的萎缩和凋亡^[4-5],而给予外源性NGF能显著促进神经元的有丝分裂、分化、修复,促进雪旺细胞及胶质细胞生长,促进血管再生,使髓鞘修复,能保护受损神经元免遭继续损害,减少神经细胞的死亡,支持神经元的存活^[2,6-8],可明显促进脊髓前角神经元重新表达神经生长因子受体,使神经元的胞体增大^[9]。已有研究表明^[10-12],周围神经损伤后可诱导成熟的雪旺细胞等非神经细胞表达NGF及NGF受体,外源性NGF可以利用相应的胞体和轴突通过损伤的轴突逆行运输,使NGF达到相应胞体,经过合成代谢促进轴突再生及髓鞘化。国内学者进一步研究发现^[13-15],周围神经损伤局部给予NGF,脊髓残存的运动神经元更多,更能保证神经轴索再生,这也跟本实验结果相符,早期应用NGF后可以降低急性期脊髓组织Ca²⁺离子水平,TUNEL检测也发现注射药物D组较ABC组凋亡的前角运动神经元数目少、残存的神经元(HE染色)数目多且坐骨神经的轴突再生修复较好。

3.2 不同部位注射NGF对大鼠坐骨神经修复的影响

外源性NGF对周围神经损伤虽有上述明确的积极肯定作用,但目前临床上因连续的肌肉注射引发了进行性肌肉疼痛及扩大了皮肤的疼痛范围^[16],导致注射NGF疼痛剧烈,患者不能耐受,一般采用双侧臀部、双侧三角肌等部位轮换注射NGF,但这些临床不同部位注射NGF对脊髓神经营养保护的差异性未曾有相关基础研究,不能证实不同部位注射NGF的有效性。本研究通过动物实验观察早期及中期(5d、21d)不同损伤治疗时间给予神经元HE染色、脊髓Ca²⁺离子浓度、神经元TUNEL凋亡细胞测定、坐骨神经纤维镀银染色,进一步发现了不同躯体部位注射NGF,臀部注射药物D组(注射部位最靠近神经损伤处)Ca²⁺离子平均浓度最低,残存的运动神经元最多,凋亡的运动神经元最少,证明了不同部位注射有差异性,损伤局部肌注效果最佳,结合最近郑湘予等的研究发现其健侧肌肉给予NGF注射对周围神经再生没有发现明显的疗效^[17],说明NGF可能在损伤局部促进神经再生的作用较全身给药明显,这跟本实验结果相近,可能局部注射NGF浓度更高、局部药物浓度持续时间更长^[18],或者外源性NGF更能诱导局部的雪旺细胞等非神经细胞表达NGF及NGF受体^[19],总之,这为临床上NGF用药方式提出了新的指导,未来可在周围神经损伤局部肌肉注射NGF以达到更好的神经恢复效果。

参考文献

- [1] 姜加权,高志明,王毅,等.周围神经损伤的影响学研究进展[J].现代生物医学进展,2009,19(17):3348—3350.
- [2] Aloe L, Rocco ML, Bianchi P, et al. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use[J]. J Transl Med, 2012, 29: 239—239.
- [3] 王英超,孙红梅,董振香.注射用鼠神经生长因子[J].中国新药杂志, 2007, (16)18: 1538—1539.
- [4] Dery MA, Rousseau G, Benderdour M, et al. Atorvastatin prevents early apoptosis after thoracic spinal cord contusion injury and promotes locomotion recovery[J]. Neurosci Lett. 2009, 453(1):73—76.
- [5] Yu WR, Liu T, Fehlings TK, et al. Involvement of mitochondrial signaling pathways in the mechanism of Fas-mediated apoptosis after spinal cord injury[J]. Neurosci, 2009, 29(1):114—131.
- [6] 黄海涛,刘华蔚,敏胡.神经营养因子促周围神经再生的研究进展[J].神经解剖学杂志, 2013, 29(5):599—602.
- [7] 孙鸿安,程爱国,张冬艳,等.不同时间窗吻合大鼠坐骨神经后应用CNTF对脊髓运动神经元内Ca²⁺的作用[J].第四军医大学学报, 2009, 30(24):2989—2991.
- [8] 赵海婷,毕方方,陈启华,等.神经生长因子促血管生成与神经再生的相关性研究[J].医学临床研究杂志, 2014, 9(31): 1677—1680.
- [9] Shim ode H, Ueki A, Morita Y. Nerve growth factor attenuates hippocampal cholinergic deficits and operant learning impairment in rats with entorhinal cortex lesions[J]. Behav Pharmacol, 2005, 14(2):179—190.
- [10] Shao H, Shu H, Wang C, et al. Expression of nerve growth factor and its receptor in distracted tibial nerve after limb lengthening[J]. Anat Rec(Hoboken), 2013, 296:333—339.
- [11] Zhong Y, Shen X, Liu X, et al. The early effect of nerve growth factor in the management of serious optic nerve contusion[J]. Clin Exp Optom, 2010, 93:466—470.
- [12] 陈燕涛,何清,刘尚礼.神经生长因子治疗周围神经损伤的前瞻性研究[J].中华创伤骨科杂志, 2006, 8:744—746.
- [13] 高延明,李靖年.局部应用神经生长因子对坐骨神经损伤模型大鼠修复与再生的影响[J].大连医科大学学报, 2013, 4:336—340.
- [14] 崔雅珍,崔贝贝.周围神经再生与神经生长因子给药途径的关系[J].中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(14):2714—2718.
- [15] 雄鹰,刘海滨,王为,等.局部持续分泌神经生长因子促进周围神经再生作用的研究[J].临床军医杂志, 2006, 5(34): 529—532.
- [16] Hayashi K, Shiozawa S, Ozaki N, et al. Repeated intramuscular injections of nerve growth factor induced progressive muscle hyperalgesia, facilitated temporal summation, and expanded pain areas[J]. Pain, 2013, 16:2344—2352.
- [17] 郑湘予,文建国,王福建,等.不同给药途径生长因子对坐骨神经再生的影响[J].中华小儿外科杂志, 2013, 34(7):539—542.
- [18] Huang J, Xiang J, Yan Q, et al. Dog tibial nerve regeneration across a 30mm defect bridged by a PRGD/PDLLA/β-TCP/NGF sustained-release conduit[J]. J Reconstr Microsurg, 2013, 9(2):77—87.
- [19] 于志勇,杨大志,刘洪涛,等.神经生长因子基因修饰的雪旺细胞在神经元损伤后修复中的作用[J].中华骨科杂志, 2011, 12(31):1352—1357.