

神经妥乐平对大鼠坐骨神经损伤后脊髓运动神经元的保护作用

齐巍¹,程爱国²,刘昊²,刘佳³

[摘要] 目的 探讨大鼠坐骨神经损伤后早期应用神经妥乐平对相应脊髓运动神经元的保护作用。方法 将 108 只雄性 SD 大鼠随机分为 A 组、B 组和 C 组,每组 36 只,所有大鼠均行双侧坐骨神经切断后立即行神经外膜端-端吻合术。A 组为对照组;B 组术后予神经妥乐平治疗;C 组术后予生理盐水治疗。按术后 1 d、4 d、9 d、14 d、21 d 和 28 d 6 个时间点取 L₄~L₆ 脊髓作 Bcl-2、Bax 免疫组化检测,以及 TUNEL 检测。结果 B 组术后 9 d、14 d、21 d 的 Bcl-2/Bax 值较 A、C 组增高;B 组与 A、C 组相比,9 d 的 TUNEL 阳性细胞数量有显著性差异($P < 0.05$),14 d 的 TUNEL 阳性细胞达高峰,其中 B 组的 TUNEL 阳性细胞数量少于 A 组和 C 组($P < 0.05 \sim 0.01$)。结论 大鼠坐骨神经切断外膜端-端吻合术后,神经妥乐平可以一定程度地保护脊髓前角运动神经元避免其过度凋亡。

[关键词] 坐骨神经损伤;神经妥乐平;神经元保护;神经元凋亡;Bcl-2;Bax

Possible Protective Effect and Mechanism of Neurotrophin on Spinal Cord Motoneuron after Sciatic Nerve Injury in Rats QI Wei, CHENG Ai-guo, LIU Hao, et al. North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei, China

Abstract: **Objective** To investigate the possible protective effect of neurotrophin on the corresponding spinal cord motoneuron after sciatic nerve injury early in rats. **Methods** 108 male Sprague Dawley rats were divided randomly into Groups A, B and C with 36 animals in each group, and all animals were cut both side of sciatic nerve, instantly make the operation of end-to-end anastomose of epineurium for abscised sciatic nerve. Group A was control group. Group B was treated with neurotrophin and Group C was treated with normal saline after operation. The rats were sacrificed on 1st d, 4th d, 9th d, 14th d, 21st d and 28th d after operation. The corresponding spinal cord segments (L₄~L₆) were gotten to make Bcl-2 and Bax immunohistochemical staining and TUNEL staining. **Results** The values of Bcl-2/Bax on 9th d, 14th d and 21st d after operation of Group B were different from that of Group A and Group C. The number of positive cells stained by TUNEL staining on 9th d was significantly different among Group A, Group B and Group C ($P < 0.05$). The expression of positive TUNEL staining cells reached a peak on 14th d after operation, the number of Group B was less than that of Group A and Group C. **Conclusion** After instantly make the operation of end-to-end anastomose of epineurium for abscised sciatic nerve, neurotrophin can protect the spinal cord motoneurons to avoid apoptosis excessively in some extent.

Key words: sciatic nerve injury; neurotrophin; neuron protection; neuron apoptosis; Bcl-2; Bax

[中图分类号] R651.3 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)08-0703-02

[本文著录格式] 齐巍,程爱国,刘昊,等.神经妥乐平对大鼠坐骨神经损伤后脊髓运动神经元的保护作用[J].中国康复理论与实践,2008,14(8):703-704.

神经妥乐平(neurotrophin, NTP)具有促进轴突形成的作用,并可使神经细胞膜表面的微绒毛和微粒数量增加。NTP的这种作用与神经生长因子的作用相似,但其对脊髓运动神经元凋亡的影响尚不十分清楚。本研究旨在探讨 NTP 在坐骨神经损伤后,对相应脊髓节段运动神经元的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康 8 周龄清洁级 SD 雄性大鼠 108 只,体重 200~250 g,由北京维通利华公司提供(北京市实验动物质量合格证明编号:No. 0097414)。将 108 只大鼠随机分为 A、B、C 三组,每组 36 只,均行坐骨神经切断外膜端-端吻合术。A 组为对照组,术后无其他处理;B 组术后予 NTP 治疗;C 组术后予生理盐水治疗。再按术后 1 d、4 d、9 d、14 d、21 d 和 28 d 6 个时间点分为 6 个亚组,每个亚组 6 只大鼠。

1.2 实验方法

1.2.1 建立周围神经损伤模型 10%水合氯醛(3 ml/kg)腹腔

注射麻醉动物,成功暴露双侧坐骨神经后,距梨状肌下孔约 0.5 cm 处切断坐骨神经,立即以 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°。手术操作均在手术显微镜下完成。术后给予适量抗生素预防术区感染,分笼喂养动物。

1.2.2 药物干预 B 组动物于术毕 1 h 后腹腔注射 NTP 1 ml (1.2 个 NTP 单位)/kg。药典规定成人用量标准为 3.6~7.2 个 NTP 单位,1 次/d。本实验用量为成人的 10~20 倍。C 组动物于术毕 1 h 后腹腔注射生理盐水 1 ml/kg。B 组和 C 组 NTP 与生理盐水注射至动物被处死取材。A 组动物不予药物治疗。

1.2.3 标本采集固定 A、B、C 三组均于术后 1 d、4 d、9 d、14 d、21 d 和 28 d 取材。10%水合氯醛(3 ml/kg)腹腔麻醉后,开胸暴露心脏,用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 200 ml,待流出液体变清亮后,快速注入含 4%多聚甲醛的 PBS 固定液 200 ml,再以 200 ml 相同固定液维持滴注约 1 h 后取材。沿坐骨神经逆行追踪暴露并取出与之相连的 L₄~L₆ 节段脊髓。标本浸泡于上述固定液 24 h。

1.2.4 检测 采用 Bcl-2 及 Bax 免疫组化试剂盒(北京中杉金桥)进行检测,观察各组各时间点脊髓前角内的 Bcl-2 及 Bax 阳性表达,计算 Bcl-2/Bax 值。采用原位细胞凋亡(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)检测试剂盒(Roche)进行检测,统计各组各时间点脊髓切片凋

作者单位:1. 华北煤炭医学院 2006 级外科学研究生,河北唐山市 063000;2. 华北煤炭医学院附属医院骨外科,河北唐山市 063000;3. 北京三博脑科医院护理部,北京市 100093。作者简介:齐巍(1981-),男,河北唐山市人,硕士研究生,主要研究方向:严重创伤的救治与研究。通讯作者:程爱国(1946-),男,山西长治市人,主任医师,教授,主要研究方向:严重创伤救治,脊柱与脊髓损伤。

亡细胞,计算阳性率。采用 H_{pias}-1000 彩色病理分析系统采集并计算阳性细胞。

1.3 统计学处理 所有数据以($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 Bcl-2/Bax 值 B 组术后 9 d、14 d、21 d 的 Bcl-2/Bax 值较 A 组、C 组增高(见表 1)。

表 1 三组大鼠不同时间点 Bcl-2/Bax 值(10^3)

时间	A 组	B 组	C 组
1 d	0.9580	0.9568	0.9569
4 d	0.9931	0.9875	0.9909
9 d	0.8646	0.8686	0.8663
14 d	0.8372	0.8421	0.8371
21 d	0.8631	0.8673	0.8625
28 d	0.8600	0.8601	0.8589

2.2 TUNEL 染色阳性细胞计数 A、B、C 三组 9 d 的 TUNEL 阳性细胞数量有显著性差异($P < 0.05$),14 d 的 TUNEL 阳性细胞达高峰,其中 B 组的 TUNEL 阳性细胞数量少于 A 组和 C 组($P < 0.05 \sim 0.01$,见表 2)。

表 2 脊髓前角神经元 TUNEL 染色阳性细胞计数($\bar{x} \pm s$)

时间	A 组	B 组	C 组
1 d	0.83 ± 0.41	0.67 ± 0.52	0.50 ± 0.55
4 d	2.67 ± 0.82	1.33 ± 1.03	2.33 ± 0.82
9 d	5.17 ± 1.67	3.17 ± 1.67 ^{a,c}	5.50 ± 1.05
14 d	10.33 ± 1.21	6.67 ± 1.63 ^{b,c}	10.00 ± 1.10
21 d	6.50 ± 1.64	3.83 ± 1.17 ^{a,d}	7.00 ± 0.89
28 d	6.17 ± 0.75	3.50 ± 1.38 ^{a,c}	5.83 ± 0.75

注:a.与 A 组比较, $P < 0.05$;b.与 A 组比较, $P < 0.01$;c.与 C 组比较, $P < 0.05$;d.与 C 组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

早在 1992 年,Altman 等曾提出神经损伤后神经元胞体死亡是一种程序化的细胞死亡^[1]。进入 21 世纪后,尹方明等多年的研究结果也证实,坐骨神经损伤后脊髓前角神经元细胞死亡与细胞凋亡基本相似^[2],表明神经损伤后有一定数量的神经细胞死亡,其死亡性质属于细胞凋亡。以切断大鼠坐骨神经的方式诱发脊髓前角运动神经元的凋亡,其详细机制尚不清楚,原因可能是^[3]:①神经轴突切断后损伤了脊髓附近的血液供应,造成直接损伤;②阻断了逆行轴浆运输,神经元失去靶器官的营养支持或刺激因素,引起神经元萎缩和死亡;③也可能是中枢神经元的竞争失败效应,是体内清除多余或无功能细胞的一种表现。后者与细胞凋亡发生的基本原因一致,即机体主动清除体内有缺陷或过多细胞的一个生理过程,在受到一系列基因及其表达产物的调控下,个别细胞的主动死亡,对其周围的神经组织结构影响很小。本研究结果提示,脊髓神经元的死亡性质属于凋亡,断裂的周围神经早期吻合术是保护脊髓神经元免遭过度凋亡的重要措施之一。

通过轴突逆行运输的神经营养因子(neurotrophic factors, NTF)对维持神经元的正常功能十分重要。在神经元细胞膜上存在着神经营养因子受体(neurotrophic factor receptor, NTFR),分为高亲和力受体(high affinity NTF receptor, HNTFR)和低亲和力受体(low affinity NTF receptor, LNTFR)两种。LNTFR 是一种分子量为 75kD 的,由 400 个氨基酸构成的膜蛋

白(P75)。所有的 NTF 家族成员都与 P75 结合。在胚胎和发育早期,运动神经元有 NTFR mRNA 表达,成年后正常动物运动神经元内这种表达消失^[4]。运动神经元轴突切断常导致 LNTFR 及其 mRNA 重新表达,而 HNTFR 无相应增加^[5]。成年期动物不表达 P75,而一旦神经受到损伤,周围神经系统的运动神经元胞体、感觉神经元胞体以及坐骨神经重新表达 P75。恰在此时,又有神经元发生死亡^[6]。这可能也反映了 P75 在周围神经损伤后,其重新表达的现象与周围神经系统的神经元死亡有关^[7]。Zhou 等报道,NTF 在轴突生长过程中可能增强 NTFR 中的 LNTFR 表达,并参与细胞内信号传导^[8]。

在细胞受到凋亡刺激时,Bcl-2/Bax 值决定着细胞是生存还是凋亡。其比例最高时细胞凋亡数最少。杨萍等研究发现,外源性 Bcl-2 能使坐骨神经切断的大鼠脊髓运动神经元凋亡发生率显著降低,神经元存活增多,保护损伤的神经元,进而促进神经的再生^[9]。可见,通过控制神经元凋亡治疗周围神经损伤是有可能的。NTF 在轴突生长过程中可能参与了细胞内的信号传导^[8],而 Bcl-2 抑制细胞凋亡也可能通过控制细胞信号传导而发挥作用^[10]。所以,NTF 有可能通过影响内源性 Bcl-2 的表达达到抑制凋亡、保护脊髓神经元的目的。

本实验结果显示,B 组的 Bcl-2/Bax 值在 9 d、14 d 和 21 d 与 A 组和 C 组表现出差异(见表 1);B 组的 TUNEL 阳性细胞计数在 9 d、14 d、21 d 和 28 d 与 A 组和 C 组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),尤其是 14 d 的 TUNEL 阳性细胞计数与 A 组比较,21 d 的 TUNEL 阳性细胞计数与 C 组比较,差异有非常显著性意义($P < 0.01$),提示在大鼠坐骨神经切断外膜端吻合术后,早期应用 NTF 可以使 Bcl-2/Bax 值增高,一定程度保护脊髓前角运动神经元并且避免其过度凋亡。

[参考文献]

[1] Altman J. Programmed cell death: the paths suicide[J]. TINS, 1992, 15(8): 278-281.

[2] 尹方明,李铁林,钟世镇,等.坐骨神经损伤后脊髓前角神经元形态学的观察[J].中华实验外科杂志,2003,20(6):503-504.

[3] Jessell T. Substance P: depletion in the dorsal horn of the rat spinal cord after section of the peripheral processes of primary sensory neurons[J]. Brain Res, 1979, 168(2): 247-259.

[4] 钱叶斌,陶有略.周围神经损伤对神经元胞体的影响[J].中华显微外科杂志,2001,24(1):75-76.

[5] Koliatsos VE, Crawford TO, Prince DL. Axotomy induces nerve growth factor receptor immunoreactivity in spinal motor neurons[J]. Brain Res, 1991, 549(2): 297-304.

[6] 尹方明,余国海,胡耀民,等.坐骨神经损伤后脊髓前角运动神经元死亡性质的探讨[J].解放军广州医高专学报,1998,21(2):85-86.

[7] 尹方明,秦建强,蒋立新,等.P75 在周围神经损伤后的表达[J].中国临床解剖学杂志,2000,18(1):71-73.

[8] Zhou FQ, William D. Intracellular control of developmental and regenerative axon growth[J]. Phil Trans R Soc B, 2006, 361(1473): 1575-1592.

[9] 杨萍,应大军,宋军,等.大鼠坐骨神经切断后外源性 bcl-2 对脊髓运动神经元的保护作用[J].生理学报,2003,55(4):428-434.

[10] Krajewski S, Tanaka S, Takayama S. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes[J]. Cancer Res, 1993, 53(19): 4701-4714.

(收稿日期:2008-06-16)