

超短波对大鼠坐骨神经损伤后神经传导速度及其损伤运动神经元内 VEGF 表达的影响

李巍巍^{1,2}, 苑秀华², 张立新², 杨坚¹

[摘要] **目的** 研究超短波治疗对大鼠坐骨神经钳夹伤后神经传导速度(MCV)及其相应水平脊髓运动神经元内血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。**方法** 选取 60 只 SD 大鼠,钳夹其坐骨神经制作周围神经损伤模型,然后随机分为实验组、对照组各 24 只和假手术组 12 只。实验组术后对其坐骨神经钳夹伤处进行超短波辐射。对照组术后进行无效辐射。假手术组仅暴露单侧坐骨神经。三组大鼠分别于术后 1、2、4 和 6 周末采用电生理及免疫组织化学染色方法观察超短波治疗对大鼠坐骨神经 MCV 及其 L₄₋₅ 脊髓运动神经元 VEGF 阳性染色颗粒及吸光度水平的变化。**结果** 术后 1 周,实验组和对照组大鼠损伤侧坐骨神经 MCV 值均未测出,术后 2 周起实验组和对照组大鼠损伤侧坐骨神经 MCV 值可测出,且超短波治疗组大鼠术后 2、4、6 周其损伤侧坐骨神经 MCV 值均明显高于对照组($P<0.05$)。超短波治疗组大鼠 L₄₋₅ 脊髓运动神经元 VEGF 阳性染色颗粒平均积分吸光度值(IOD)在术后各同一时间点均高于对照组($P<0.05$)。**结论** 超短波能促进大鼠周围神经损伤后 MCV 的恢复,增加其损伤脊髓运动神经元中 VEGF 的表达,改善组织缺血缺氧,对大鼠坐骨神经钳夹伤后神经的修复起保护作用。

[关键词] 超短波;坐骨神经损伤;运动神经传导速度;血管内皮生长因子

Effect of Ultrashort Wave Therapy on Motor Conduction Velocity and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor of Damaged Movement Neurons in Rats with Sciatic Nerve Injury LI Wei-wei, YUAN Xiu-hua, ZHANG Li-xin, et al. Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Shanghai Xuhui Center Hospital, Shanghai 200031, China

Abstract: Objective To investigate the effect of ultrashort wave therapy on motor conduction velocity (MCV) and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rats with sciatic nerve injury. **Methods** The models of peripheral nerve injury were established by forceps clip of sciatic nerve and then a total of 60 SD rats were divided randomly into three groups, including experimental group (n=24), control group (n=24) and sham operation group(n=12). The rats of experimental group were treated by ultrashort wave therapy after operation. The injured sciatic nerve and spinal cord in waist were sampled at the 1st,2nd,4th,6th week respectively after operation and were observed by electrophysiology and immunohistochemistry. **Results** After operation, the MCV of sciatic nerve in both experimental group rats and control group rats is zero in 1st week. Since 2nd week, the MCV of sciatic nerve in rats of both two groups began to arise and the MCV of injured sciatic nerve in rats of experimental group was higher than that in the control group ($P<0.05$). In injured spinal cord motoneuron, the Integrated Optical Density(OD) of VEGF in experimental group was higher than that in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Ultrashort wave therapy could increase the value of MCV of sciatic nerve and the expression of VEGF in spinal cord in rats, and so it could protect the injured peripheral nerve.

Key words: ultrashort wave; sciatic nerve injury; motor conduction velocity(MCV); vascular endothelial growth factor(VEGF)

[中图分类号] R745.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2010)08-0744-04

[本文著录格式] 李巍巍,苑秀华,张立新,等.超短波对大鼠坐骨神经损伤后神经传导速度及其损伤运动神经元内 VEGF 表达的影响[J].中国康复理论与实践,2010,16(8):744—747.

周围神经损伤一直是很棘手的世界性医学难题,同时,损伤后其神经功能的恢复一直是临床康复的研究热点之一^[1-3]。超短波作为该领域一种物理治疗方法近年来正在我国推广应用。研究发现它对生物体具有较广泛的生物学效应和安全性^[4]。随着实验手段的

不断进步和基础研究的不断深入,一系列研究表明,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在周围神经组织损伤的发病和修复过程中,均起着重要的作用^[5]。因此,本实验将特定波长和功率的超短波作用于损伤的周围神经局部,通过研究超短波治疗对大鼠坐骨神经钳夹伤后神经传导速度(motor conduction velocity, MCV)及其相应水平脊髓损伤的运动神经元 VEGF 表达的影响,旨在进一步探讨超短波治疗对周围神经损伤起保护作用的机制,为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型制备 共选取体重 200~250 g

基金项目:辽宁省教育厅基金资助项目;物理因子对视神经损伤后神经再生的影响(20061007)。

作者单位:1. 上海市徐汇区中心医院康复科,上海市 200031;2. 中国医科大学附属第一医院康复医学科,辽宁沈阳市 110001。作者简介:李巍巍(1980-),女,内蒙古通辽市人,硕士,住院医师,主要研究方向:神经康复。通讯作者:苑秀华。

成年雄性 SD 大鼠 60 只(中国医科大学动物实验中心提供)。1%戊巴比妥钠(30 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉,麻醉后腹卧位固定于手术台上,常规备皮,消毒。手术暴露大鼠右后肢坐骨神经,于距坐骨结节 6~8 mm 处,用同一把新的微动脉夹尖端钳夹神经,持续时间为 10 s,压力为 21.95×10^3 Pa(以杠杆等效力测定法测定)^[6],神经搓压长度为 1.5 mm,造成 Seddon II 度损伤。钳夹后见坐骨神经变菲薄,将神经放回原位,平神经损伤点处用 9-0 无创尼龙线标记。术后 30 min 检测大鼠右侧坐骨神经动作电位潜伏期、波幅,当 MCV 降至 10 m/s 以下时,认为坐骨神经轴索及髓鞘断裂或受到损伤,证实造模成功^[6],缝合关闭切口。整个过程在无菌条件下进行。然后将动物随机分为实验组和对照组,每组各 24 只。假手术组 12 只,在大鼠麻醉后,仅暴露右侧坐骨神经但不做钳夹并在相应部位做标记后缝合。术后 3 组在同一条件下分笼饲养。术后 24 h 后开始进行实验。

1.2 实验仪器和试剂及处理方法 五官超短波治疗机(上海医用设备厂),DLISA Neuromatic-2000C 型神经电图仪(丹麦),SYD-PK 漂烘烤片机(誉得公司),Feitz 1512(德国),电热恒温培养箱(山东潍坊医疗器械厂),显微图像分析系统(MetaMorph/DP10/BX41, UIC/OLYMPUS,US/JP)。一抗:兔抗鼠 VEGF(1:100)(北京中山生物工程有限公司提供);二抗:生物素化羊抗鼠 IgG(武汉博士德生物工程有限公司提供),DAB 显色试剂盒(福州迈新生物工程有限公司提供)。

五官超短波治疗机,频率为 40.68 MHz,最大输出功率为 40 W,调谐后第 3 挡输出功率为 14.24 W。输出功率测定采用光度学测定法^[6]。照度测量采用上海险峰电影机械厂生产的 ZF-2 型照度计,将大鼠固定于特制有机玻璃盒内,直径 8 cm 圆形电极对置于下肢挫压部位,使鼠臀部及双后肢均在电场中,电极与鼠皮肤间隙为 1.5~2.0 cm。实验组大鼠于术后第 1 天至术后 6 周行超短波辐射,每日在固定时间作用 1 次,每周 5 次,每次 7 min,直到取材的前 1 d 停止超短波辐射。对照组均在相同条件下进行无效辐射。

1.3 运动神经传导速度(MCV)测定 各组大鼠分别于术后 1、2、4 和 6 周,采用 DLISA Neuromatic-2000C 型神经电图仪,刺激强度约为 20 mA,一般以波形达最大振幅,且不引起周围无关肌肉收缩为宜,刺激时间 0.1~0.2 ms,刺激频率 1 Hz。记录方法:将大鼠用胺碘酮麻醉后,暴露其右后肢坐骨神经,切断梨状肌,充分暴露坐骨神经中枢端,并向下暴露至腓神经入肌点处。将钩形针电极分别置于平损伤点标记处和损伤点远端 15 mm 处,两电极间距离测定采用精度为 0.2 mm 的游标尺直接测量,为 14 mm。记录电极置于神

经入肌点处,记录时以综合肌电出现的波峰前缘为准。

1.4 免疫组化检测 各组大鼠分别于术后 1、2、4 和 6 周,用 40 g/L 多聚甲醛快速灌注固定。腹卧位固定于手术台上,背部正中切口,沿十二肋基部切断脊柱、脊髓。用止血钳,眼科剪刀切开椎弓板,沿坐骨神经走行切取 L_{4~5}段脊髓入 40 g/L 多聚甲醛中。于 4 ℃固定过夜,常规脱水,透明,石蜡包埋,连续切片约 5 μm 厚,裱于涂有 APES 载玻片上,烤片备用。兔抗鼠 VEGF(1:100)ABC 法常规程序进行免疫组织化学染色,显微镜下观察切片中组织染色以及 VEGF 在脊髓运动神经元中的表达。

1.5 显微图像分析 采用 HPIAS-1000 高清晰彩色医学图文分析系统,每例标本取 4 张切片,每张切片随机选取 2 个 400 倍视野进行测量。分析项目:平均积分吸光度值(Integrated Optical Density,IOD)(以组织周边区域的吸光度作为本底校正值,测量 VEGF 免疫反应产物的光密度,其数值越大,说明蛋白表达越强)。

1.6 统计学分析 实验所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示。应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,两组间均数的比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 时为有显著性差异。

2 结果

2.1 MCV 未经超短波作用,假手术组大鼠坐骨神经 MCV 值约为 60 m/s。实验组和对照组大鼠术后 1 周右侧坐骨神经 MCV 值均未测出,亦未见有肌收缩;术后 2 周 MCV 值约为 2 m/s,勉强可见极微弱肌收缩;术后 4 周 MCV 值约为 5~6.5 m/s,可见微弱肌收缩;术后 6 周 MCV 值为 15~17.5 m/s,可见明显肌收缩。2、4、6 周时实验组 MCV 值均高于对照组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠神经损伤后各周 MCV 测定及比较(m/s)

组别	1 周	2 周	4 周	6 周
假手术组	60.267±0.0285	60.153±0.0452	60.361±0.0186	60.248±0.0365
对照组	—	2.2021±0.0485	6.0160±0.1424	16.2650±0.1405
实验组	—	2.2647±0.0972a	6.1110±0.1272b	17.0155±0.1587c

注:与对照组相比,a: $P=0.018$;b: $P=0.032$;c: $P=0.000$ 。

2.2 大鼠 L_{4~5} 脊髓运动神经元 VEGF 的表达

2.2.1 术后 4 周 L_{4~5} 脊髓运动神经元 VEGF 的表达 在光镜下观察,免疫反应阳性产物均呈棕褐色颗粒状。在假手术组大鼠 L_{4~5} 脊髓中,VEGF 免疫阳性颗粒状结构主要分布在前角运动神经元胞体。见封三彩图 1.1。

免疫组化染色结果显示,术后 4 周实验组大鼠 L_{4~5} 脊髓前角运动神经元可见大量棕褐色的 VEGF 免疫阳性颗粒,其表达呈强阳性。见封三彩图 1.2。而对照组大鼠术后 4 周 L_{4~5} 脊髓前角运动神经元可见中等数量棕褐色的 VEGF 免疫阳性颗粒,其表达呈中等强度阳性。见封三彩图 1.3。

2.2.2 大鼠术后 VEGF 阳性神经元 IOD 的表达及其

动态变化 采用 VEGF 阳性神经元 IOD 可定量分析 3 组大鼠术后不同时间点 L_{4~5} 脊髓运动神经元 VEGF 阳性神经元表达的结果。IOD 表示阳性细胞内信号的强度,吸光度值越大信号越强,说明 VEGF 含量越高。各组大鼠术后 1、2、4、6 周 L_{4~5} 脊髓阳性 VEGF 运动神经元 IOD 所测结果及其表达的动态变化见表 2。术后 1 周,实验组大鼠 L_{4~5} 脊髓运动神经元阳性染色颗粒即开始增多,术后 4 周达到高峰。然后稍有下降,但术后 6 周实验组大鼠 L_{4~5} 脊髓运动神经元阳性染色颗粒仍维持在较高水平。

表 2 3 组大鼠 L_{4~5} 脊髓阳性运动神经元 IOD 比较(x±s)

组别	1 周	2 周	4 周	6 周
假手术组	0.1271±0.0203	0.1272±0.0114	0.1271±0.0807	0.1271±0.9134
对照组	0.2842±0.0041	0.4842±0.0033	0.6889±0.2039	0.5850±0.0045
实验组	0.2884±0.0055a	0.4888±0.0050b	0.7862±0.0043c	0.5891±0.0055d

注:与对照组相比,a: P=0.009;b: P=0.002;c: P=0.039;d: P=0.015。

3 讨论

近年来,在周围神经损伤的早期康复中,物理因子对损伤神经的功能恢复起着重要的作用^[3,6]。本研究采用前瞻性随机对照的方法,观察超短波治疗对大鼠坐骨神经钳夹伤后不同时间点电生理及相应脊髓节段运动神经元中 VEGF 表达的影响,旨在进一步探讨超短波治疗对周围神经损伤修复的有效性及其对周围神经损伤起保护作用的可能机制,为其临床应用提供理论依据。

临床上常把机械性神经损伤按 Sedden 分类法分为 I~Ⅲ度:Sedden I 度即神经失用;Sedden II 度即轴突断伤;Sedden III 度即神经断伤^[5]。本实验动物模型的制作采用国内报道的方法,搓压时间由 3 s 增加至 10 s^[6],对大鼠坐骨神经造成的损伤属于 Sedden II 度,即其轴突及髓鞘断裂而神经外膜相对保持完整,损伤部位以下即远侧段发生瓦勒氏变性,其功能恢复是完全的,此时的轴突再生比神经切断后的再生有效,因此,早期的物理因子治疗对损伤神经的功能恢复具有重要意义。

周围神经损伤后的电生理表现取决于神经损伤的类型和程度,其病理基础为轴突和脱髓鞘改变。若为轴突变性,肌电图表现为靶肌出现纤颤电位、正锐波等失神经电位;若为脱髓鞘改变,电生理改变为神经传导速度减慢或消失^[7]。本研究由于实验条件的限制,在电生理检查方面仅进行大鼠坐骨神经钳夹伤后神经传导速度(MCV)的检测。一般认为,Sedden II 度损伤后神经变性较轻,个别 Sedden II 度神经损伤在伤后 2 周红肌运动终板处神经末梢并未完全变性,仍可见有突触小泡存在。就神经纤维再生速度而言,一般认为,神经缝合为 1.0~3.3 mm/d,神经搓压为 3.5~5.0 mm/d。临床以 Tinel 征确定时,神经缝合为 1~2 mm/d,神经搓压为 1~3 mm/d^[6-7]。本研究实验组和

对照组大鼠坐骨神经钳夹伤后,从损伤点到腓总神经入肌点距离为 25~30 mm,测定其坐骨神经 MCV,术后 1 周尚未测到电位,术后 2 周可测到速度为 2 m/s 左右的传导电位,随着时间的推移及神经损伤的修复,MCV 呈上升趋势,说明损伤的坐骨神经进行再生,且其再生速度也在上述范围内。

一般认为,小剂量超短波有促进神经再生的作用,大剂量则有抑制作用^[8]。张春莲等的实验表明,钳夹家兔左侧坐骨神经后,超短波治疗组,术后 6、8 和 10 周治疗组纤颤电位,正相电位减少,出现运动单位电位;术后 12 周,超短波治疗组运动单位基本接近正常^[9]。此外,何予工等采用超短波等物理疗法治疗闭合性周围神经损伤患者 34 例,结果提示:大部分在 1~3 个疗程治疗后,肌力和功能恢复正常或接近正常,神经传导速度治疗组也比对照组快^[10]。本实验采用钳夹法制作大鼠坐骨神经损伤模型,从术后 24 h 起对实验组大鼠损伤侧坐骨神经局部进行小剂量超短波治疗。对照组进行无效辐射,并于术后 2、4、6 周分别对两组大鼠其损伤侧坐骨神经 MCV 进行检测,结果表明:超短波治疗组大鼠术后各时间点坐骨神经 MCV 值均高于对照组(P<0.05),该结果与上述学者研究结果一致。提示:超短波治疗能促进周围神经损伤后 MCV 的恢复,缩短损伤后神经修复的时程。然而,本研究仅对大鼠坐骨神经损伤后超短波治疗进行 6 周的追踪实验,随着时间的推移及周围神经损伤的恢复,超短波治疗是否与损伤的周围神经 MCV 值变化呈线性对应关系,仍需要进一步深入研究。

随着对周围神经损伤临床观察和实验研究的不断深入,VEGF 在神经损伤修复中的作用日益受到重视。天然 VEGF 以二聚体形式存在,是一种碱性的、能与肝素结合的糖蛋白,分子量约为 45 kD。有研究表明^[11],在脊髓损伤后,VEGF 与其受体发挥保护作用可能通过如下几个方面:①促进微血管形成,增加毛细血管密度,促进新生侧支循环形成,缩短血供恢复时间;②可以松弛血管平滑肌,缓解毛细血管痉挛,从而改善损伤部位的局部微循环,使脊髓免于继发性损伤;③直接作用于神经细胞膜上的酪氨酸激酶受体(VEGFR),触发神经保护与神经再生信号传导,直接对神经元、神经胶质细胞产生营养与保护作用,促进功能恢复。

有研究表明,逆行性的神经元损伤程度和其受损部位有关,神经轴突损伤的部位距离胞体越近,引起神经元变性的程度越重。坐骨神经距离脊髓较近,容易引起脊髓神经元的严重变性^[12]。因此,在本实验可动态观察实验组大鼠坐骨神经损伤后其对应 L_{4~5} 脊髓前角运动神经元中 VEGF 表达的全过程。有研究表明,

VEGF 基因的表达受多种细胞因子、癌基因、抑癌基因产物及缺氧等因素的调控。不同细胞因子诱导 VEGF 表达的信号通路及特定的转录因子有关,这些转录因子的结合位点位于 VEGF 启动子附近的区域。缺氧上调 VEGF 基因的表达与一种缺氧诱导的特异性 DNA 结合蛋白,即缺氧诱导因子-1(HIF-1)密切相关。在氧张力降低时,HIF-1 可刺激 VEGF 表达上调,通过 VEGF 对内皮细胞的强烈促有丝分裂作用,促进血管形成,改善组织血供^[13-15]。因此,VEGF 可作为一种神经生长因子和化学趋向因子,其释放能为再生轴索提供必要的附着表面,从而促进轴突和髓鞘的形成。本实验免疫组化结果显示,正常脊髓运动神经元中存在 VEGF 的表达,傅重洋^[11]等的实验结果也证明如此。此外,本实验中,实验组和对照组大鼠坐骨神经钳夹伤术后 1 周起两组大鼠 L_{4~5} 脊髓损伤的运动神经元阳性染色颗粒均开始增多,并呈上升趋势。该结果提示,在许多病理情况如缺血、缺氧、外伤、神经系统脱髓鞘及代谢等病变下,神经组织 VEGF 及其受体表达可显著增高,这种反应性的增高可对受损的神经组织起着神经保护与营养作用。

超短波可扩张血管,改善神经和周围组织的血液循环及组织营养,加强局部组织代谢和神经系统功能,达到消炎、消肿功能^[8]。本实验组大鼠予以超短波治疗,其右侧坐骨神经钳夹伤后对应 L_{4~5} 脊髓损伤的运动神经元 VEGF 阳性染色颗粒 IOD 在术后各同一时间点均高于对照组($P < 0.05$),提示:超短波能增加损伤的运动神经元中 VEGF 的表达,改善组织缺血缺氧,对周围神经损伤可起保护作用。但本实验中实验组大鼠术后 4 周损伤的运动神经元中 VEGF 表达呈高峰,术后 6 周稍有下降,是否提示我们应及时补充 VEGF 的治疗仍有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1]Wan LD, Xia R, Ding WL. Electrical stimulation enhance remyelination of injured sciatic nerves by increasing neurotrophins [J]. Neuroscience, 2010,169(3): 1029—1038.
- [2]Sherman D, Halamish-Shani T, Gershtansky Y, et al. Analysis of brachial plexus injuries reported to MRM [J]. Harefuah, 2010, 149(2): 71—76, 126, 125.

- [3]Mikami Y, Oqura T, Kubo T, et al. Inducing peripheral sympathetic nerve activity by therapeutic electrical stimulation[J]. J Orthop Surg(Hong Kong), 2009, 13(2): 167—170.
- [4]Cetin N, Aytar A, Atalay A, et al. Comparing hot pack, short-wave diathermy, ultrasound, and TENS on isokinetic strength, pain, and functional status of women with osteoarthritic knees: a single-blind, randomized, controlled trial. [J]. Am J Phys Med Rehabil. , 2008 87(6): 443—451.
- [5]Tang J, Hua Y, Su J, et al. Expression of VEGF and neural repair after alprostadi treatment in a rat model of sciatic nerve crush injury [J]. Neurol India, 2009, 57(4): 387—394.
- [6]张志强,刘景祥,任世祯,等. 超短波对大鼠坐骨神经损伤后运动神经传导速度的影响[J]. 中华理疗杂志,1991,3: 137—139.
- [7]李光华,刘宏鹏,周旭,等. 运动训练对坐骨神经损伤小鼠神经形态和功能恢复影响的研究[J]. 中国康复医学杂志, 2010,1(25): 23—26.
- [8]全国卫生专业技术资格考试专家委员会主编. 康复医学与治疗技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008: 425.
- [9]张春莲,胡淑英,刘挺. 两种电疗治疗周围神经损伤临床及实验研究[J]. 实用医学杂志,2006, 12(6): 406—407.
- [10]何予工. 物理疗法治疗闭合性周围神经损伤 34 例[J]. 河南医科大学学报, 2006, 31(2): 160—161.
- [11]傅重洋,洪光祥. 血管内皮生长因子对神经系统血管再生与神经营养作用研究进展[J]. 国外医学骨科学分册,2005, 26(5): 280—282.
- [12]王淑荣,孙忠人,戴亚美,等. 大鼠坐骨神经损伤后脊髓运动神经元神经营养因子的表达及针刺干预后的变化[J]. 中国临床康复,2004,8(31): 6954—6955.
- [13]Raivich G, Makwana M. The making of successful axonal regeneration: Genes, molecules and signal transduction pathways[J]. Brain Res Rev, 2007, 2(53): 287—311.
- [14]Towler DA. Vascular biology and bone formation: hints from HIF[J]. J Clin Invest, 2007, 117(6): 1477—1480.
- [15]Jiang M, Wang B, Wang C, et al. Angiogenesis by transplantation of HIF-1 alpha modified EPCs into ischemic limbs [J]. J Cell Biochem, 2007, 66(8): 840—848.

(收稿日期:2010-05-20 修回日期:2010-06-30)