

坐骨神经损伤模型大鼠神经传导速度及损伤运动神经元内生长相关蛋白43表达与磁刺激干预*★

王 维¹, 苑秀华², 王中莉², 刘 宁², 李隆广¹

Effects of magnetic stimulation on nerve conduction velocity and the expression of growth associated protein 43 in rats after sciatic nerve injury

Wang Wei¹, Yuan Xiu-hua², Wang Zhong-li², Liu Ning², Li Long-guang¹

Abstract

BACKGROUND: Magnetic stimulation may promote the repair of nerve injury.

OBJECTIVE: To explore the effect of magnetic stimulation on nerve conduction velocity and growth associated protein 43 expression of corresponding spinal motor neuron in rats after sciatic nerve injury.

METHODS: A number of 60 SD rats were randomly assigned into 3 groups: experiment group ($n=24$), model group ($n=24$) and sham-operation group ($n=12$). The mouse sciatic nerve was clamped by a new hemostatic forcep with a length of 17 centimeters. The clamping tension was adjusted by locking the 2nd interlocking teeth with a pressure of 21.95×10^3 Pa, lasting for 10 seconds to construct sciatic nerve injury model. At 24 hours after the model construction, the experiment mice were treated with a daily magnetic stimulation of 0.09 T.

RESULTS AND CONCLUSION: According to immunohistochemical staining, at the 2nd, 4th, 8th and 12th weeks after model construction, the expression of growth associated protein 43 in L₄₋₅ motor neurons in the experiment group was significantly higher than that of the model group at the same time point ($P < 0.05$). Electrophysiology examination showed that compare with the model group, the regenerated nerve of the experiment group had faster conduction velocity, higher amplitude and shorter latent period at the 12th week after model construction ($P < 0.05$). These results demonstrate that the magnetic stimulation can speed up the nerve conduction of injured sciatic nerve, increase the expression of growth associated protein 43 in corresponding motor neurons and promote the repair of sciatic nerve injury in rats.

Wang W, Yuan XH, Wang ZL, Liu N, Li LG. Effects of magnetic stimulation on nerve conduction velocity and the expression of growth associated protein 43 in rats after sciatic nerve injury. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(46): 8617-8620. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 磁刺激可促进损伤神经的修复。

目的: 观察磁刺激对大鼠损伤坐骨神经神经传导速度及相应水平脊髓运动神经元内生长相关蛋白43表达的影响。

方法: 将60只SD大鼠随机分为实验组($n=24$)、模型组($n=24$)和假手术组($n=12$)，用一新的长17cm的止血钳错夹坐骨神经至第二扣，以 21.95×10^3 Pa维持10s制备损伤模型。造模后24h，实验组每天给予0.09T的磁刺激。

结果与结论: 造模后第2、4、8、12周，免疫组织化学染色显示实验组脊髓L₄₋₅运动神经元生长相关蛋白43的表达较模型组相应时间点明显增高($P < 0.05$)；造模后12周，电生理检测发现，与模型组比较，实验组再生神经传导速度加快，波幅升高，潜伏期缩短($P < 0.05$)。说明磁刺激能提高损伤坐骨神经的传导速度，增加其对应脊髓节段运动神经元中生长相关蛋白43的表达，对大鼠损伤坐骨神经的修复起促进作用。

关键词: 磁刺激；坐骨神经；神经传导速度；生长相关蛋白43；神经保护

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.46.016

王维, 苑秀华, 王中莉, 刘宁, 李隆广. 坐骨神经损伤模型大鼠神经传导速度及损伤运动神经元内生长相关蛋白43表达与磁刺激干预[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(46):8617-8620. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

磁刺激已应用于神经损伤的临床治疗中^[1-2]。研究发现它对生物体具有较广泛的生物学效应和安全性^[3-4]。一系列研究表明，生长相关蛋白43(growth associated protein 43, GAP-43)在周围神经损伤的修复过程中发挥重要作用^[5]。

实验以特定强度和频率的磁刺激作用于大鼠损伤的坐骨神经，通过观察神经传导速度及损伤坐骨神经对应脊髓节段运动神经元中

GAP-43的表达，探讨磁刺激对周围神经损伤的治疗作用。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间和地点: 于2010-05在中国医科大学中心实验室完成。

材料:

实验动物: 健康清洁级成年雄性Wistar大鼠60只，体质量180~220 g，由辽宁医学院动物实验中心提供，许可证号：SCXK(辽)2009-

¹Department of Rehabilitation, Third Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China; ²Department of Rehabilitation, First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Wang Wei★, Master, Associate chief physician, Department of Rehabilitation, Third Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China dubutianxia315@163.com

Supported by: the Foundation of Liaoning Educational Committee, No. 20061007*

Received: 2011-04-19
Accepted: 2011-08-16

¹ 辽宁医学院附属第三医院康复科，辽宁省锦州市121000；² 中国医科大学附属第一医院康复科，辽宁省沈阳市110001

王维★，男，1972年生，辽宁省锦州市人，满族，2010年中国医科大学毕业，硕士，副主任医师，主要从事骨科及神经损伤康复的研究。dubutianxia315@163.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225 (2011)46-08617-04

收稿日期:2011-04-19
修回日期:2011-08-16
(20110315009/WLM-LX)

0015。

试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
旋磁治疗仪	上海电子仪器厂
神经电图仪	上海海神医疗电子仪器有限公司
石蜡切片机	德国莱卡公司
显微镜	日本奥林巴斯公司
电子天平	德国赛多利斯公司
DAB 显色液	武汉博士德公司
免疫组化试剂盒及抗体	北京中杉金桥生物科技有限公司

方法:

实验分组与大鼠坐骨神经损伤模型的制备: 将60只大鼠随机分为实验组($n=24$)、模型组($n=24$)和假手术组($n=12$)。采用体积分数1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉实验组和模型组大鼠, 暴露左后肢坐骨神经, 于距坐骨结节6~8 mm处用同一把新的长17 cm止血钳尖端钳夹神经10 s, 压强为 21.95×10^3 Pa(以杠杆等效力测定法测定)^[6], 神经挫压长度为2 mm。钳夹后见坐骨神经变菲薄, 将神经放回原位, 于神经损伤点处用9-0无创尼龙线标记。30 min后检测大鼠伤侧坐骨神经动作电位潜伏期、波幅, 当神经传导速度降至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^[7]。假手术组只暴露左侧坐骨神经但不做钳夹, 并在相应部位做标记后缝合。

造模后干预: 造模后24 h, 实验组采用旋磁治疗仪进行干预, 旋磁治疗仪磁头直径6 cm, 磁头含2枚直径1.5 cm的磁柱, 异名极并置, 两极中心距离2.7 cm, 表面磁场强度0.09 T, 旋转速度2 500 r/min, 将大鼠固定于特制有机玻璃盒内, 磁头距大鼠左下肢术区约0.6 cm, 使大鼠臀部及双后肢均在磁场中, 30 min/次, 1次/d, 直至取材。假手术组及模型组均不给予磁刺激。

电生理检测坐骨神经传导速度: 采用上海海神NDI-200P+型神经电图仪, 刺激强度为1~20 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0.10~0.20 ms, 刺激频率1 Hz。记录方法: 造模后第12周, 将假手术组剩余的3只, 模型组及实验组剩余的6只大鼠用1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉后, 暴露其左后肢坐骨神经, 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, 将钩形银针电极分别置于神经损伤处(标记物)的近端及远端, 近端刺激远端记录, 两电极间距离测定采用精度为0.2 mm的游标卡尺直接测量, 测定并记录神经传导速度、波幅及潜伏期。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。

免疫组织化学检测损伤坐骨神经对应脊髓节段GAP-43的表达: 分别于造模后2, 4, 8, 12周取各组大鼠(实验

组和模型组每个时间点6只, 假手术组每个时间点3只), 麻醉处死后40 g/L多聚甲醛灌注固定, 沿十二肋基部切断脊柱、脊髓, 沿坐骨神经走行切取L₄₋₅段脊髓, 放40 g/L多聚甲醛中4 ℃固定过夜, 常规脱水, 透明, 石蜡包埋, 行5 μm厚连续切片, 常规ABC法进行免疫组织化学染色, 一抗为兔抗鼠GAP-43 (1:1 000)单克隆抗体, 显微镜下观察GAP-43在脊髓运动神经元中的表达。采用HPIAS-1000高清晰彩色医学图文分析系统进行图像分析, 每只大鼠取4张切片, 每张切片随机选取2个400倍视野进行测量。分析平均积分吸光度值: 以组织周边区域的吸光度作为本底校正值, 测量GAP-43免疫反应产物的吸光度, 其数值越大, 说明蛋白表达越强。

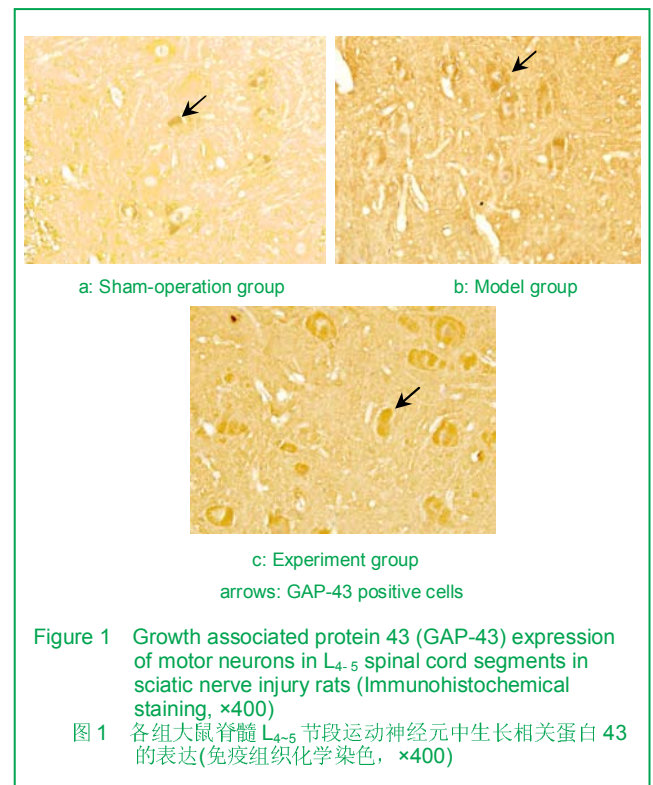
主要观察指标: 各组大鼠损伤坐骨神经对应脊髓节段GAP-43的表达及坐骨神经传导速度。

统计学分析: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 12.0软件处理。两组间均数比较方差齐时采用Student *t* 检验, 方差不齐时采用近似*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验共纳入60只大鼠, 均进入结果分析。

2.2 坐骨神经损伤大鼠脊髓L₄₋₅节段GAP-43的表达见图1。



光镜下观察见免疫反应阳性产物均呈棕褐色颗粒状。在假手术组, 大鼠脊髓L₄₋₅节段GAP-43免疫阳性产

物主要分布在前角运动神经元胞体, 见图1a。

模型组大鼠脊髓L₄₋₅节段运动神经元可见中等数量棕褐色的GAP-43免疫阳性颗粒, 表达呈中度阳性, 见图1b。

实验组大鼠脊髓L₄₋₅节段运动神经元中可见大量棕褐色的GAP-43免疫阳性颗粒, 表达呈强阳性, 见图1c。

图像分析结果显示, 造模后2周时, 模型组和实验组大鼠脊髓L₄₋₅节段GAP-43表达明显增高, 至造模后8周达高峰, 12周后逐渐降低, 表达趋势基本一致。与模型组对应时间点比较, 实验组大鼠脊髓L₄₋₅节段GAP-43表达显著增加($P < 0.05$), 见表1。说明磁刺激可上调脊髓内GAP-43的表达。

表 1 实验组、模型组及假手术组大鼠患侧坐骨神经相应脊髓节段生长相关蛋白 43 的表达
Table 1 Growth associated protein 43 expression of ipsilateral spinal segment corresponding to the sciatic nerve injury ($\bar{x} \pm s$, absorbance)

Time after model construction (wk)	Sham-operation group (n=3)	Model group (n=6)	Experiment group (n=6)
2	0.127 1±0.020 3 ^a	0.284 2±0.004 1	0.288 4±0.005 1 ^a
4	0.127 2±0.011 4 ^a	0.484 2±0.003 3	0.488 8±0.005 0 ^a
8	0.127 1±0.080 7 ^a	0.688 9±0.203 9	0.786 2±0.004 3 ^a
12	0.127 1±0.913 4 ^a	0.585 0±0.004 5	0.589 1±0.005 5

^a $P < 0.05$, vs. model group

2.3 各组大鼠损伤坐骨神经的传导速度 电生理学检测结果显示, 造模后第12周时, 实验组神经传导速度明显快于模型组($P < 0.05$), 且潜伏期缩短, 波幅增高, 但仍未达到正常水平, 见表2。

表 2 造模后第 12 周实验组、模型组及假手术组大鼠患侧坐骨神经传导情况
Table 2 Ipsilateral sciatic nerve conduction at 12 wk after model construction ($\bar{x} \pm s$)

Item	Sham-operation group (n=3)	Model group (n=6)	Experiment group (n=6)
Nerve conduction velocity (m/s)	14.24±1.16 ^a	8.19±0.89	10.45±0.76 ^a
Latent period (ms)	1.04±0.04 ^a	1.85±0.02	1.38±0.04 ^a
Amplitude (mV)	7.50±0.61 ^a	3.11±0.21	6.12±0.48 ^a

^a $P < 0.05$, vs. model group

3 讨论

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^[8]。随着对周围神经损伤临床观察和实验研究的不断深入, GAP-43在神经损伤修复中的作用日益受到重视。GAP-43在神经元的发育、再生以及突触可塑性变化中具有非常重要的作用, 被认

为是轴突生长的内在决定因素之一。当周围神经损伤后, 受损神经元胞体GAP-43的合成明显增加, 并沿轴突运输浓聚于生长锥, 促进轴突的黏附、分支、伸长以及增强生长锥对局部生长等信号的反应。当周围神经再生完成后, GAP-43又恢复到正常水平^[9]。

实验中动物模型的制作使大鼠坐骨神经造成的损伤属于Sunderland分型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。

实验结果发现神经损伤后2周脊髓神经元胞浆中GAP-43表达升高, 神经损伤后8周达高峰, 12周开始下降, 但磁刺激治疗后各时间点GAP-43表达实验组均高于模型组, 表明磁刺激可促进GAP-43表达上调, 缩短轴突重建时间。实验观察磁刺激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GAP-43表达的影响, 旨在探讨旋磁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。

磁刺激作为神经电刺激技术, 在临床上广泛用于神经电生理检测和神经肌肉疾病的治疗, 具有无痛、无创、安全等特点。磁刺激发生器利用高压、高能电流在刺激线圈内瞬间放电, 诱导出高强磁场, 能无衰减地透过皮肤、肌肉、和骨组织, 使受到刺激局部被诱导出局部电位。国内外的研究结果提示, 电磁刺激能通过Ca²⁺通道蛋白的表达来促进神经细胞的增殖, 磁刺激亦可以影响DNA合成, RNA转录^[10-11]。何予工^[12]采用磁疗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模型组快。实验采用钳夹法制作大鼠坐骨神经损伤模型, 从造模后24 h起对实验组大鼠损伤侧坐骨神经局部进行磁刺激治疗, 模型组进行无效辐射, 12周时分别对两组大鼠损伤侧坐骨神经传导速度进行检测。结果表明: 磁刺激治疗的大鼠造模后坐骨神经传导速度、波幅均高于模型组, 该结果与上述学者研究结果一致。提示: 磁疗治疗能促进周围神经损伤后神经传导速度的恢复, 缩短损伤后神经修复的时程。

振荡的外部磁场促进周围神经再生还可能因为磁场微弱的涡电流, 影响体内电子运动的方向和细胞内外离子的分布、改变细胞膜电位, 引发生物效应从而影响神经的兴奋性^[13]。磁场可以改善神经和局部组织的微循环, 消炎镇痛、减轻局部水肿、消除无菌性炎症, 激活内分泌素, 从而对损伤神经具有修复作用^[14]。

总之, 磁刺激能够加速大鼠坐骨神经损伤后神经髓鞘及轴索的再生, 增加脊髓内GAP-43蛋白的表达和神经传导速度。

4 参考文献

[1] Wan LD, Xia R, Ding WL. Electrical stimulation enhanced remyelination of injured sciatic nerves by increasing neurotrophins. *Neuroscience*. 2010;169(3):1029-1038.

[2] Mikami Y, Oqura T, Kubo T, et al. Inducing peripheralsym pathetic nerve activity by ther apeutic electrical stimulation. *Orthop Surg (Hong Kong)*. 2005;13(2):167-170.

[3] Sparing R, Dafotakis M, Meister IG, et al. Enhancing language performance with non-invasive brain stimulation: a transcranial direct current stimulation study in healthy humans. *Neuropsychologia*. 2008;46(1):261-268.

[4] Williams JA, Imamura M, Fregni F. Updates on the use of non-invasive brain stimulation in physical and rehabilitation medicine. *J Rehabil Med*. 2009;41(5):305-311.

[5] Brosamle C, Huber AB, Fielder M, et al. Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment. *J Neurosci*. 2000;20(21):8061-8068.

[6] Zhang ZQ, Liu JX, Ren SZ, et al. *Zhonghua Liliiao Zazhi*. 1991; 3:137-139.
张志强,刘景祥,任世祯,等.磁疗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] Tang J, Hua Y, Su J, et al. Expression of VEGF and neural repair after alprostadiol treatment in a rat model of sciatic nerve crush injury. *Neurol India*. 2009;57(4):387-394.

[8] Shimizu K, Ito A, Yoshida T, et al. Bone tissue engineering with human mesenchymal stem cell sheets constructed using magnetite nanoparticles and magnetic force. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;82(2):471-480.

[9] Denny JB. Molecular mechanisms, biological actions, and neuropharmacology of the growth-associated protein GAP-43. *Curr Neuropharmacol*. 2006;4(4):293-304.

[10] Shao B, Wang XH, Zhou N, et al. *Zhonghua Wuli Yixue yu Kangfu Zazhi*. 2011;33(1):10-13.
邵彬,王晓红,周宁,等.磁刺激对脊髓损伤后神经细胞凋亡的影响及机制研究[J].中华物理医学与康复杂志,2011,33(1):10-13.

[11] Ito A, Ino K, Hayashida M, et al. Novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng*. 2005;11(9-10):1553-1561.

[12] He YG. *Henan Yike Daxue Xuebao*. 2006;31(2):160-161.
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.

[13] Kotak VC, Sadahiro M, Fall CP. Developmental expression of endogenous oscillations and waves in the auditory cortex involves calcium, gap junctions, and GABA. *Neuroscience*. 2007;146(4):1629-1639.

[14] Grassi C, Ascenzo MD, Torsello A, et al. Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated Ca²⁺ channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. *Cell Calcium*. 2004;35(4):307-315.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 辽宁省教育厅基金资助项目(20061007)。

作者贡献: 苑秀华进行实验设计, 实验实施为王维, 实验评估为王中莉, 资料收集为刘宁, 王维成文, 李隆广审核, 王维对文章负责。

致谢: 感谢辽宁医学院动物实验中心, 组织学与胚胎学实验室提供的帮助和支持。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验过程中对动物处置符合 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关要求。

本文创新性:

提供证据: 检索 Pubmed 及 CNKI 数据库, 检索时间: 2000-06/2011-06, 检索关键词: “磁刺激、坐骨神经、神经传导速度、生长相关蛋白 43、神经保护/ magnetic stimulation, sciatic nerve injury, motor conduction velocity, neural growth associated protein”, 未见与本文密切相关的研究。

创新点说明: 应用磁刺激治疗周围神经损伤, 并观察磁刺激对大鼠损伤坐骨神经神经传导速度及相应水平脊髓运动神经元内生长相关蛋白 43 表达的影响, 具有创新性。



本刊组织构建栏目已出版“神经损伤动物模型”研究的相关文章: 学术部

○不同电刺激参数致颈神经椎孔外卡压动物模型的建立

王金武, 李琦, 芮碧宇, 等.

2009, 13(24): 4663-4667

[关键词]慢性颈肩痛; 电刺激; 刺激参数; 椎孔外颈神经卡压

○大鼠脊髓完全性损伤模型的建立

张红, 刘维钢, 等.

2009, 13(33): 6540-6543

[基金]国家自然科学基金资助项目(30760063)
[关键词]急性; 完全性脊髓损伤; 动物模型; 大鼠

○脊髓慢性损伤模型的构建

钱军, 孙正义, 马维虎

2010, 14(28): 5293-5296

[基金]甘肃省中青年科技研究基金项目

(0806RJYG018)

[关键词]脊髓损伤; 慢性; 骨组织工程; 动物模型; 病理变化; 大鼠

○β淀粉样蛋白1-40和氯化铝双干预阿尔茨海默病大鼠模型的建立

刘志安, 赵妮妮, 马凯, 等.

2010, 14(40): 6917-6921

[基金]江苏省脑病生物信息重点实验室开放课题(JSBL0903); 江苏省研究生科研创新计划项目(苏教研[2009]10号); 江苏省高校自然科学基金项目(07KJB310117)

[关键词]氯化铝; β淀粉样蛋白1-40; 阿尔茨海默病; 大鼠; 动物模型

○制备神经细胞实验性缺氧缺糖模型的简易方法

邓敏, 鞠晓东, 张楠, 等.

2009, 13(7): 1393-1396

[基金]国家自然科学基金资助项目(30700906, 30500254, 30740049); 教育部博士点基金资助项目(20070001784)

[关键词]缺氧缺糖; 去氧酶; 神经细胞培养; 乳酸脱氢酶测定

○以拉力参数构建兔腰骶神经牵拉损伤模型

保国锋, 崔志明, 张金波, 等.

2008, 12(42): 8384-8387

[基金]江苏省卫生厅重点招标课题(K200408); 江苏省六大人才高峰(06-B-053); 南通市社会发展计划(S2007019)

[关键词]腰骶椎; 神经根; 脊髓; 牵拉; 形态学; 兔; 动物模型

○选择性结扎节段动脉致局灶性脊髓缺血损伤动物模型的建立

谭美云, 郭杏, 王远辉

2010, 14(24): 4407-4410

[关键词]节段动脉; 脊髓缺血损伤; 腰动脉; 兔; 动物模型