

神经生长因子不同给药方式对坐骨神经吻合后修复与再生的影响**

王黎明, 唐际存, 辛林伟, 李强, 周英琼, 陈灏, 古振林

Effects of nerve growth factor injection via different ways on repair and regeneration of the sciatic nerve after its anastomosis

Wang Li-ming, Tang Ji-cun, Xin Lin-wei, Li Qiang, Zhou Ying-qiong, Chen Hao, Gu Zhen-lin

Abstract

BACKGROUND: Nerve growth factor (NGF) can promote the repair of nerve after nerve injury. However the advantages and disadvantages of different treatment methods are still unclear.

OBJECTIVE: To investigate the effects of intrathecal injection and local injection of NGF on repair and regeneration of rabbit sciatic nerve after its anastomosis.

METHODS: Sciatic nerves from 24 New Zealand white rabbits were cut-off and then sutured. NGF at 30 μg or saline at the same dose were injected intrathecally or locally into the rabbits.

RESULTS AND CONCLUSION: After 12 weeks of sciatic nerve injury, the sheath of sciatic nerve was thickened in the intrathecal injection group, nerve fibers arranged in neat rows and was similar with normal nerve fibers; the nerve conduction velocity, number of myelinated nerve fibers and myelin sheath thickness in the intrathecal injection group were obviously increased compared with the other groups ($P < 0.05$), the local injection group took the second place. NGF can promote the repair and regeneration of peripheral nerve after its anastomosis, and the intrathecal injection NGF is superior to local injection.

Wang LM, Tang JC, Xin LW, Li Q, Zhou YQ, Chen H, Gu ZL. Effects of nerve growth factor injection via different ways on repair and regeneration of the sciatic nerve after its anastomosis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(7): 1169-1172. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

Department of Limb Trauma and Hand Surgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 540001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Wang Li-ming*, Studying for master's degree, Physician, Department of Limb Trauma and Hand Surgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 540001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
lmwang453@163.com

Correspondence to: Tang Ji-cun, Associate professor, Department of Limb Trauma and Hand Surgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 540001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
tangjicun@126.com

Supported by: Health Program of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. z2009046*

Received: 2011-11-09
Accepted: 2011-12-08

摘要

背景: 神经生长因子对神经损伤后的修复有促进作用,但目前对不同用药方式的优劣性尚有争议。

目的: 观察鞘膜内与局部应用神经生长因子对兔坐骨神经吻合后修复与再生的影响。

方法: 将 24 只新西兰大白兔坐骨神经切断后再缝合,分别向兔鞘膜内或损伤局部注射 30 μg 神经生长因子或等量生理盐水。

结果与结论: 坐骨神经损伤后 12 周,鞘膜内注射神经生长因子组损伤坐骨神经鞘膜增厚,神经纤维排列较整齐,与正常神经纤维差异不大;且其神经干传导速度、有髓神经纤维数目、髓鞘厚度也明显高于其他组($P < 0.05$),损伤局部注射神经生长因子组次之。说明神经生长因子具有促进外周神经吻合后修复与再生的功能,鞘膜内应用优于局部注射。

关键词: 神经生长因子;鞘膜内;局部注射;给药方式;坐骨神经损伤;神经修复;神经再生

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.07.008

王黎明, 唐际存, 辛林伟, 李强, 周英琼, 陈灏, 古振林. 神经生长因子不同给药方式对坐骨神经吻合后修复与再生的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(7): 1169-1172. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

随着显微外科技术的发展,神经断端吻合修复已不是难题,周围神经损伤吻合后的功能修复和再生是个复杂的临床问题,如何提高周围神经损伤后重建的效果一直是研究的热点^[1]。周围神经损伤后的微环境构成对神经的再生具有重要的意义,在这些微环境因素中,神经营养素家族尤其是神经生长因子(nerve growth factor, NGF)的作用尤为突出,对维持神经细胞存活和再生意义重大,在临床上也展示出了广阔的应用前景。然而,NGF在周围神经损伤中的应用方式多样,哪一种给药方式效果更好、更方便、更经济,一直还在探索中。实验以坐骨神经损伤兔为模型,观察鞘膜内与局部应用神经生长因子对兔坐骨神经吻合后修复与再生的影响。

1 材料和方法

设计: 随机分组对照动物实验。

时间及地点: 于2011-03/08在桂林医学院实验室完成。

材料:

实验动物: 清洁级健康成年新西兰大白兔24只,体质量2.5~3.0 kg,雌雄不限,购于广西医科大学动物中心。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
鼠抗人 S-100 蛋白、快捷型酶表羊抗鼠/兔 IgG 聚合物	福州迈新生物技术开发公司
鼠 NGF(苏肽生)	北京舒泰神生物制药股份有限公司
光学显微镜	日本 Olympus 公司

桂林医学院附属医院四肢创伤、手外科, 广西壮族自治区桂林市 540001

王黎明★, 男, 1984年生, 汉族, 山东省日照市人, 桂林医学院在读硕士, 医师, 主要从事四肢创伤显微外科方面的研究。
lmwang453@163.com

通讯作者: 唐际存, 副教授, 桂林医学院附属医院四肢创伤、手外科, 广西壮族自治区桂林市 541001
tangjicun@126.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2012)07-01169-04

收稿日期: 2011-11-09
修回日期: 2011-12-08
(20111016002/WLM-L)

实验方法:

实验分组、造模与干预: 将 24 只家兔随机分为 4 组, 每组 6 只。用体积分数 0.7% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)耳缘静脉注射麻醉后, 俯卧位固定, 取右侧大腿后内侧切口, 依次切开皮肤及皮下组织, 分离股二头肌、半腱肌和半膜肌肌间隙, 暴露坐骨神经, 在胫腓神经分叉以上 2 cm 处切断坐骨神经, 于 12 倍手术显微镜下用 8-0 无损伤缝线将切断神经原位外膜缝合 6~8 针。吻合后鞘膜内注射 NFG 组在吻合口远端鞘膜内注射鼠 NGF 30 μg, 损伤局部注射 NGF 组在吻合口局部注射鼠 NGF 30 μg, 鞘膜内和损伤局部对照组分别在吻合口远端鞘膜内或损伤局部注射等体积生理盐水, 逐层缝合。4 组兔均一次性给药, 分笼标记, 在相同条件下饲养 12 周。

大体观察: 主要观察兔伤口的愈合情况、足底溃疡及愈合情况, 取材时观察神经吻合处有无炎症、与周围组织有无粘连及有无神经瘤形成。

神经电生理检查: 坐骨神经损伤 12 周, 取各组兔原手术切口, 自梨状肌下缘至胫腓神经分叉处切取坐骨神经, 应用 BL-410 生物机能实验系统测坐骨神经干神经传导速度。

组织学观察: 造模后 12 周, 取吻合口远端神经节段, 用体积分数 10% 甲醛溶液固定 24 h 后, 石蜡包埋, 切片行常规苏木精-伊红染色。Olympus 光学显微镜下观察神经再生情况, 神经外膜及血管再生情况, 神经髓鞘脱失及空泡变性等。

免疫组织化学染色: 将石蜡切片经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。加入 1 滴鼠抗人 S-100 蛋白室温下孵育 1 h, 再用 PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 加入快捷型酶标羊抗鼠/兔 IgG 聚合物, 室温孵育 15 min, 再次用 PBS 冲洗 3 次。加入 DAB 显色剂, 镜下观察 10 min, 用蒸馏水冲洗, 苏木精复染, PBS 冲洗返蓝, 经梯度乙醇脱水干燥、透明, 中性树脂胶封固, 镜检并用 HPIAS-1000 高清晰图像分析系统分析。

主要观察指标: 损伤坐骨神经的大体形态, 再生情况, 及神经传导速度和 S-100 蛋白的表达。

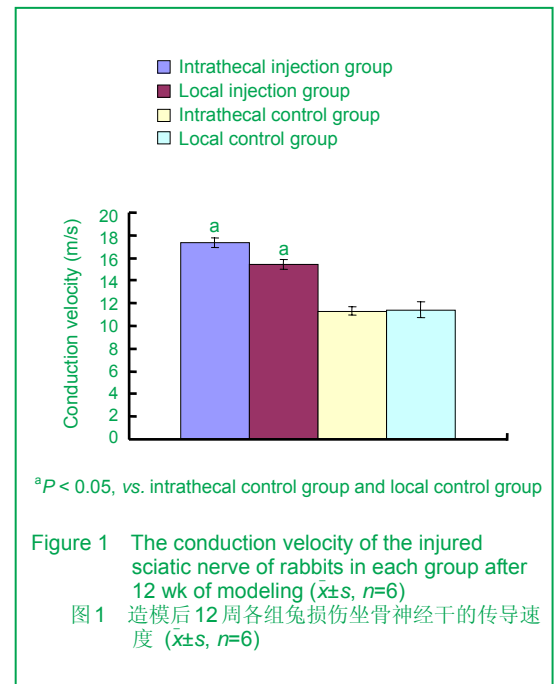
统计学分析: 实验数据由第一作者应用 SPSS 15.0 统计软件进行处理。组间计量资料比较采用方差分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。P < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

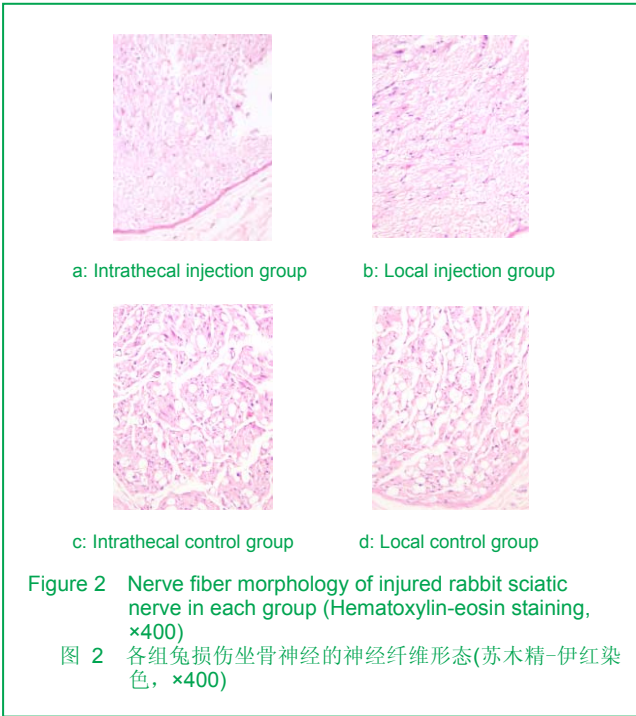
2.1 实验动物数量分析 实验共纳入 24 只白兔, 均进入结果分析。

2.2 各组兔的大体观察结果 造模后全部切口 I 期愈合。所有动物均存活, 坐骨神经损伤侧下肢跛行明显, 随时间延长鞘膜内注射 NFG 组恢复最好。造模后 2 周起, 各组患侧足趾均出现红肿, 部分发生溃疡, 造模后 12 周均愈合。取材时各组未见炎症反应, 与周围组织未见明显粘连, 吻合处稍有膨大。

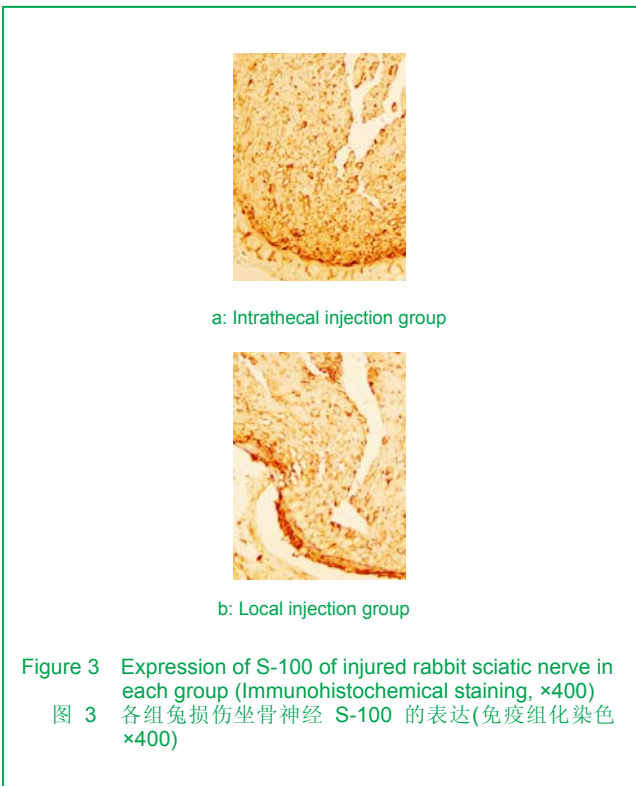
2.3 各组兔损伤坐骨神经的传导速度 造模后 12 周, 切取足够长损伤坐骨神经, 采用 BL-410 生物机能实验系统测坐骨神经干神经传导速度, 将缝合处置于刺激电极与接收电极之间, 结果发现鞘膜内注射 NFG 组的神经传导速度最快 (P < 0.05), 损伤局部注射 NGF 组次之, 鞘膜内和损伤局部对照组神经传导速度较慢, 见图 1。



2.4 各组兔损伤坐骨神经的组织学改变 造模后 12 周, 鞘膜内注射 NFG 组可见具有完整鞘膜的神经纤维, 鞘膜增厚, 排列较整齐, 空泡变性不明显, 可见分化完好的毛细血管, 与正常神经纤维差异不大; 损伤局部注射 NGF 组可见轻度水肿变性, 具有完整鞘膜神经纤维, 髓鞘较薄, 可见无髓轴突; 鞘膜内和损伤局部对照组均见水肿及空泡变性, 可见明显增生的血管, 见图 2。



2.5 各组兔损伤坐骨神经S-100的表达 造模后12周进行抗S-100免疫组化染色, 棕黄色为阳性有髓鞘神经纤维, 见图3。



在光学显微镜放大400倍下计数有髓神经纤维数目, 取5个视野, 取其平均数, 进行统计学分析; 随机抽取各组每个切片5个视野, 在高清晰度彩色图像处理系统作图像分析, 在相同条件下, 计算每个视野内5个有髓神经纤维髓鞘厚度, 并取其平均数, 进行统计学分

析。结果发现, 鞘膜内注射NGF组有髓神经纤维数目和髓鞘厚度明显高于其他3组($P < 0.05$), 损伤局部注射NGF组有髓神经纤维数目和髓鞘厚度明显高于鞘膜内和损伤局部对照组($P < 0.05$), 而鞘膜内和损伤局部对照组比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表1。

表 1 各组兔损伤坐骨神经有髓神经纤维数目及髓鞘厚度的比较结果

Table 1 The number of myelinated nerve fibers and myelin thickness of injured rabbit sciatic nerve in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Group	The number of myelinated nerve fibers (n)	Myelin sheath thickness (μm)
Intrathecal injection	2 012.17±153.86 ^{ab}	1.49±0.15 ^{ab}
Local injection	1 652.33±105.03 ^a	1.23±0.13 ^a
Intrathecal control	1 067.17±105.94	0.65±0.07
Local control	1 068.00±123.92	0.49±0.14

^a $P < 0.05$, vs. intrathecal control group and local control group; ^b $P < 0.05$, vs. local injection group

3 讨论

NGF是较早被发现并应用于临床的促进神经生长的药物, 是一种经典的靶源性神经营养因子, 在神经损伤后大量表达的生物活性物质^[2-4]。NGF是一种多肽类物质, 它主要由许旺细胞、中枢的神经胶质细胞、变性的神经远段及不同来源的细胞合成并分泌^[5-6], 可沿轴突逆行运输至神经元胞体, 发挥对神经元的作用及促进轴突生长^[7-11], 维持神经元存活, 维持交感神经和感觉神经细胞的存活、分化和成熟^[12], 同时还有轴突导向作用^[13], 在损伤局部建立起一定的浓度梯度, 可吸引再生轴芽沿建立方向向远段生长^[14]。有研究表明, 周围神经损伤后, 给予外源性的NGF, 损伤的轴突可逆行运输外源性的NGF^[15], 使NGF到达相应神经元胞体, 经过一系列合成代谢的复杂过程, 促使再生轴突延长、促进再生轴突髓鞘化^[16-19]。

评价再生神经成熟的指标主要有形态学、电生理及功能恢复方面, 神经是否为有效再生主要看再生神经内是否有较成熟的有髓神经纤维^[20]。实验中应用NGF的两组在神经干传导速度及有髓鞘神经纤维数目均优于未应用的对照组。进一步证实NGF对损伤的周围神经具有营养、促进再生及修复的作用。

目前神经营养因子用于治疗周围神经损伤的用药方式主要有: ①在损伤局部一次性给药。②通过皮下注射、肌肉注射等方式全身用药。③局部通过微渗透泵缓释。④应用转基因技术在损伤局部移植表达神经营养因子的细胞^[21-22]。外源性应用到体内后, 受影响的因素很多, 其活性的维持及作用效果与使用途径、方式、剂量等均有一定的关系, 但目前较为认同的不是直接作用于

神经细胞, 而是经过膜受体形成复合物, 通过与其受体形成复合物后经逆行运输作用而促进受损神经的功能恢复^[23]。实验中鞘膜内注射 NGF 组较损伤局部注射 NGF 组在神经电生理、有髓鞘神经纤维计数、髓鞘厚度均明显增高。这与鞘膜内直接应用生长因子可较长时间维持生物浓度, 可提高生物利用度等有关。

总之, 实验发现, NGF 具有促进外周神经损伤后的功能修复与再生的功能, 鞘膜内应用 NGF 优于局部应用 NGF。

致谢: 感谢桂林医学院附属医院病理科, 桂林医学院生理学教研室老师的指导和帮助, 感谢桂林医学院动物实验中心提供的实验条件。

4 参考文献

- [1] Millesi H. Reappraisal of nerve repair. Surg Clin North Am. 1981; 61(2): 321-340.
- [2] Friedel RH, Schnürch H, Stubbusch J, et al. Identification of genes differentially expressed by nerve growth factor- and neurotrophin-3-dependent sensory neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;78(1):12670-12675.
- [3] Shi FD, Liu D, Li CJ. Xiandai Zhongxiyi Jiehe Zazhi. 2008;17(27): 4181-4182.
史福东, 刘东, 李长江. 神经生长因子在周围神经损伤中的应用[J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 17(27): 4181-4182.
- [4] Aloe L, Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology. Trends Cell Biol. 2004;14(7):395-399.
- [5] Lipps BV. Isolation of nerve growth factor (NGF) from human body fluids; saliva, serum and urine: comparison between cobra venom and cobra serum NGF. J Nat Toxins. 2000;9(4):349-356.
- [6] Niu KL, Li B, Xiao JW. Dulixue Zazhi. 2009;23(2):152-155.
牛凯龙, 李斌, 肖经纬. 施万细胞在周围神经损伤修复中可能的分子机制[J]. 毒理学杂志, 2009, 23(2): 152-155.
- [7] Gold BG, Mobley WC, Matheson SF. Regulation of axonal caliber, neurofilament content, and nuclear localization in mature sensory neurons by nerve growth factor. Neurosci. 1991;11(4):943-955.
- [8] Lin LF, Doherty DH, Lile JD, et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science. 1993;260(5111):1130-1132.
- [9] Schindelhauer D, Schuffenhauer S, Gasser T, et al. The gene coding for glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) maps to chromosome 5p12-p13.1. Genomics. 1995;28(3):605-607.
- [10] Luo J, West JR, Pantazis NJ. Nerve growth factor and basic fibroblast growth factor protect rat cerebellar granule cells in culture against ethanol-induced cell death. Alcohol Clin Exp Res. 1997;21(6):1108-1120.
- [11] Hood B, Levene HB, Levi AD. Transplantation of autologous Schwann cells for the repair of segmental peripheral nerve defects. Neurosurg Focus. 2009;26(2):E4.
- [12] Lü Y, Guo JX, Li WZ, et al. Zhongguo Shiyong Shenjingjibing Zazhi. 2009;12(14):5-6.
吕昀, 郭建新, 李文战, 等. 神经生长因子实验性脑梗死大鼠神经细胞调之的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2009, 12(14): 5-6.
- [13] Fortun J, Hill CE, Bunge MB. Combinatorial strategies with Schwann cell transplantation to improve repair of the injured spinal cord. Neurosci Lett. 2009;456(3):124-132.
- [14] Chicoine MR, Park TS, Vogler GP, et al. Predictors of ability to walk after selective dorsal rhizotomy in children with cerebral palsy. Neurosurgery. 1996;38(4):711-714.

- [15] Luo YX, Fang H, Pang QJ, et al. Zhonghua Shouwaike Zazhi. 1997;13(1):3-5.
罗永湘, 方煌, 庞清江, 等. 神经生长因子对周围神经运动纤维再生的影响[J]. 中华手外科杂志, 1997, 13(1): 3-5.
- [16] Zhang YC, Wang GH, Zhang ZH. Xi'an Yike Daxue Xuebao. 2001;22(5):459-462.
张引成, 王贵利, 张政华. 神经节苷脂M1介导神经生长因子对运动神经元再生的影响[J]. 西安医科大学学报, 2001, 22(5): 459-462.
- [17] Chen YS, Wang-Bennett LT, Coker NJ. Facial nerve regeneration in the silicone chamber: the influence of nerve growth factor. Exp Neurol. 1989;103(1):52-60.
- [18] Hu YE, Mao JH, Zhu Y, et al. Nerve growth factor pretreatment against glutamate-induced hippocampal neuronal injury: action mechanism of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10. Neural Regen Res. 2010;5(1):5-9.
- [19] Shi ED, Wang BC, Sun QS. Nerve growth factor and injured peripheral nerve regeneration. Neural Regen Res 2008;3(11): 1273-1276.
- [20] Xu X, Yee WC, Hwang PY, et al. Peripheral nerve regeneration with sustained release of poly(phosphoester) microencapsulated nerve growth factor within nerve guide conduits. Biomaterials. 2003;24(13):2405-2412.
- [21] Li Z, Peng J, Guo Q, et al. Effects of local release of hepatocyte growth factor on peripheral nerve regeneration in acellular nerve grafts. Exp Neurol. 2008;214(1):47-54.
- [22] Matsuyama T, Mackay M, Midha R. Periphperal nerve repair and grafting techniques: a review. NeurolMed Chir(Tokyo). 2000; 40(4):187-199.
- [23] Bowles WR, Sabino M, Harding-Rose C, et al. Chronic nerve growth factor administration increases the peripheral exocytotic activity of capsaicin-sensitive cutaneous neurons. Neurosci Lett. 2006;403(3):305-308.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 广西壮族自治区卫生计划资助项目 (z2009046), 课题名称: 鼠神经生长因子鞘膜内注射对周围神经吻合后修复与再生的研究。

作者贡献: 实验由第一、二作者设计, 第一、二、七作者实施, 第三、四、五、六作者评估, 第一作者成文, 第二作者审核, 第一、二作者对文章负责。

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: 实验过程中对动物的处置符合科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关要求。

本文创新性: 检索 CNKI, Sciencedirect, Sprilink 数据库, 检索时间 2001-01/2011-03, 检索关键词为: 神经生长因子、神经损伤; nerve growth factor, nerve injury. 检索结果表明, 国内外此类动物实验传统的用药方法是局部用药、全身用药、含神经生长因子药物培养液培养等。实验通过鞘膜内应用神经生长因子这一新方法, 通过检测神经传导速度、吻合远端有髓神经纤维数目及髓鞘厚度, 证实其可促进周围神经再生及功能恢复, 生物利用率高, 在临床上简单易行。