

• 基础研究 •

神经生长因子与睫状神经营养因子促进大鼠坐骨神经再生的协同作用研究

李强¹, 伍亚民², 申屠刚¹, 李民²

(1. 解放军第 98 医院南京军区显微骨科中心, 浙江 湖州 313000; 2. 第三军医大学创伤外科研究所)

【摘要】 目的: 利用新型神经再生小室探讨神经生长因子 (nerve growth factor NGF) 和睫状神经营养因子 (ciliary neurotrophic factor CNTF) 促进周围神经再生的协同性作用。方法: 36 只大鼠随机分为 A、B、C 3 组, 每组 12 只, 用自行研制的梭形双通道桥接管桥接坐骨神经 10 mm 缺损。A 组, 2 支管内均注入几 糖凝胶 (100 μl); B 组, 一侧支管内注入几 糖 (100 μl) + NGF (5 μl) + 生理盐水 (5 μl), 另一侧支管内注入几 糖 (100 μl) + NGF (5 μl) + CNTF (5 μl); C 组, 一侧支管内注入几 糖 (100 μl) + CNTF (5 μl) + 生理盐水 (5 μl), 另一侧支管内注入几 糖 (100 μl) + NGF (5 μl) + CNTF (5 μl)。术后 8、16 周对再生神经的大体形态、常规病理及超微结构进行观察, 并用核黄逆行示踪评估再生神经的轴浆运输功能。结果: NGF + CNTF 侧再生神经呈淡黄色, 质韧, 弹性佳, 优于对照侧, 形态学观察见再生神经纤维数目多, 粗细均匀, 排列整齐, 有髓纤维髓鞘厚, 轴突直径大。其轴浆运输功能也明显优于对照侧。结论: NGF 与 CNTF 对促进周围神经形态结构和功能的恢复均具有明显的协同作用。

【关键词】 神经生长因子; 睫状神经营养因子; 周围神经; 神经再生; 大鼠

Research of synergistic effects of regenerative nerve fibers affected by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor in rats LI Qiang*, WU Ya-min, SHEN Tu-gang, Li Min.* Center of Micro-Orthopaedics of Nanjing Military, the 98th Hospital of PLA, Huzhou 313000 Zhejiang, China

ABSTRACT Objective To discuss the synergistic effects on regenerative nerve fibers affected by nerve growth factor (NGF) and ciliary neurotrophic factor (CNTF) with the new cabin of peripheral nerve regeneration. **Methods** Thirty-six Sprague-Dawley rats with 10 mm gap of sciatic nerve were averaged divided randomly into three groups (A, B, C), which had been bridged with the new double channel nerve conduit of fusiform shape. In group A, 100 μl chitin formed medical use was injected into the two branches of the conduit; in group B, beside injection chitin, 5 μl NGF and normal saline 5 μl NGF and CNTF were respectively injected into the two branches; in group C, beside injection chitin, 5 μl CNTF and normal saline, 5 μl NGF and CNTF were respectively injected into the two branches. At 8 and 16 weeks after operation, the morphology and ultrastructure of regenerative nerve were evaluated by HE staining and electron microscope. The function of axoplasmic transport was analyzed by nuclear yellow. **Results** The regenerative nerve in the side where NGF and CNTF were injected were light yellow, and the resilient is also senior to the ones in the control side. The diameter of the regenerative nerve fibers in the synergistic side is coincident and line up in order under light microscope, the number of myelinated or unmyelinated fibers are more, the thickness of myelinated fibers is larger, the function of axoplasmic transport was also better than the nerve in the control sides. **Conclusion** There is significant synergistic effect of NGF and CNTF on promoting the regeneration of peripheral nerve.

Key words Nerve growth factor; Ciliary neurotrophic factor; Peripheral nerve; Nerve regeneration; Rats
Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007, 20(4): 220-223 www.zggssz.com

神经生长因子 (nerve growth factor NGF) 和睫状神经营养因子 (ciliary neurotrophic factor CNTF) 分别代表了神经营养因子两大家族, 对其促进周围神经再生作用的差异性的研究报道较多, 但关于其协同作用的研究报道较少^[1-4]。由于周

围神经是混合神经, 按纤维的类型可分为无髓和有髓纤维; 按机能分为感觉和运动纤维, 再生过程相当复杂, 其不仅受到多种内外环境的调控, 而且有相当多的神经营养因子的参与。为此, 本研究利用创建的新型神经再生小室探讨 NGF 与 CNTF 促进周围神经再生的协同作用。

1 材料与与方法

1.1 实验分组与造模 选取健康成年清洁级 Sprague-Dawley

基金项目: 国家重大基础研究发展规划 (973) 项目 (G1999054206)
通讯作者: 李强 Tel 0572-7119797 E-mail lq1010@126.com

(SD)大鼠 36 只,雌雄不拘,体重 200~250 g 平均 223 g(第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所动物中心提供)。随机分为 A、B、C 3 组,每组 12 只。造模:1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔内注射麻醉。侧卧位,剃毛、消毒后,取股后斜切口,暴露右侧坐骨神经,10 倍显微镜下游离坐骨神经,并在梨状肌出口下方 5 mm 处将坐骨神经切除约 8 mm,任其回缩,造成 10 mm 缺损,用消毒好的自行研制的梭形双通道桥接管(图 1)桥接缺损段,用 10-0 无损伤显微缝合线将神经远、近断端与桥接管缝合固定 2 针,缝合方法采用两定点套接法:分别在神经干周径 180° 相对位置各缝合 1 针,使得再生神经断端套入桥接管内,并距桥接管的分叉处约 1 mm。

1.2 实验方法 A 组,桥接管的两支管内仅加入医用几丁糖凝胶 100 μ l(上海其胜生物制剂有限公司)。B 组,向两支管内注入医用几丁糖凝胶 100 μ l 后,一侧支管内注入 5 μ l NGF(20 ng/ μ l 美国 Sigma 公司)和 5 μ l 生理盐水;另一侧支管内注入 5 μ l NGF 和 5 μ l CNTF(60 ng/ μ l 美国 Sigma 公司)。C 组,向两支管内注入医用几丁糖凝胶 100 μ l 后,一侧支管内注入 5 μ l CNTF 和 5 μ l 生理盐水;另一侧支管内注入 5 μ l NGF 和 5 μ l CNTF。注入到两支管的中段(图 1),将桥接管置于适宜的位置,排除扭转现象,用 0-0 丝线套在两支管外,并缝合固定在邻近的软组织上,防止大鼠麻醉清醒后,活动下肢致桥接管移位和扭转。逐层缝合股后肌肉及皮肤切口,按常规标准统一分笼饲养。

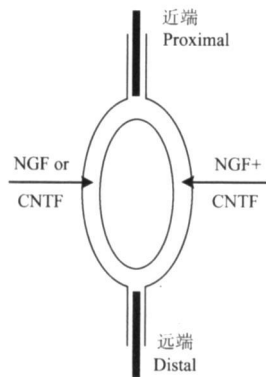


图 1 双通道桥接管示意图

Fig 1 Schematic diagram of bridged with double channel nerve conduit

1.3 术后观察与检测方法

1.3.1 一般观察 分别于术后 8、16 周观察梭形双通道桥接管有无移位、变形、塌陷及裂开,并初步观察两支管内再生神经的粗细、颜色、弹性等。

1.3.2 常规病理学观察 术后 8、16 周分别取 6 只动物,再次麻醉、固定后,剪开胸腔,左心室主动脉插管,剪开右心耳。快速灌入生理盐水 150~200 ml 待流出液体清亮后,灌注 4% 多聚甲醛约 200 ml 固定 2 h 后取再生神经,神经取出后浸入 4% 多聚甲醛中继续固定。然后将标本常规脱水、透明、浸蜡、包埋后行石蜡切片,片厚 5 μ m,HE 染色观察再生神经外膜的厚度,神经纤维的排列、走行等。

1.3.3 超微结构观察 动物灌注后,取两支管内再生神经的中段,并用 4% 戊二醛及 1% 四氧化锇(磷酸盐配制)作预固定和后固定(pH 7.2~7.4)各 2 h,乙醇及丙酮逐级脱水,采

用环氧树脂 618 定向包埋,用 Reichert Jung 超薄切片机作 0.5 μ m 厚半薄切片,每个标本切 4 张。经 1% 甲苯胺蓝-天青 II 染色后在光镜下定位,制备超薄切片,用醋酸双氧铀及枸橼酸铅染色,在 Hitachi-600 透射电镜下观察再生神经纤维的超微结构。

1.3.4 核黄示踪及激光共聚焦成像 术后 16 周,将各组余下的 6 只动物麻醉、消毒及显露桥接管。将桥接管两支管的一侧支管及管内再生的神经于远侧端切除约 2 mm,保留另一侧支管及管内再生神经。显露桥接管远侧的坐骨神经 2 mm 左右将荧光示踪剂核黄(美国 Sigma 公司)用 0.01 mol PBS 稀释成 0.5% 的浓度。用微量注射器将 6 μ l 的上述稀释液缓慢注入坐骨神经干内(15 min),注射完毕后滞针约 10 min 以防溶液外溢。原位缝合肌肉、皮下组织及皮肤切口。于术后 16~18 h 再次麻醉动物,固定、左心室插管,用生理盐水、4% 多聚甲醛常规灌注。取腰膨大部位的脊髓迅速投入 4% 多聚甲醛中固定 6 h 后,置于 30% 蔗糖溶液中脱水,直至组织完全下沉后,用德国 LEICA CM1900 冰冻切片机作连续冰冻切片,片厚 20~25 μ m,每切 5 片取 1 片,置于德国 LEICA TSC SP2 激光共聚焦显微镜下扫描成像,参数选择:PMTE:60Q Pinhole

1.5,激光波长为 405 nm。核黄自大鼠坐骨神经逆行运输至脊髓神经元细胞核内,在波长为 405 nm 激光的作用下,呈黄色荧光。

2 结果

2.1 一般观察 术后 8 周,各组桥接管周围均由少量的薄膜包绕,且有少量散在的新生血管,桥接管无移位、变形,管内医用几丁糖凝胶已降解;术后 16 周,桥接管无裂口、变形、变薄、变色、移位和塌陷,表面仍为膜状组织包绕,肉眼可见新生血管较多。B 组 NGF 侧再生纤维呈淡红色,弹性差,质嫩,C 组 CNTF 侧再生神经则呈淡黄色,稍细,而 B、C 组 NGF+ CNTF 侧再生神经明显粗大,呈淡黄色,质韧,弹性佳(图 2、3)。

2.2 再生神经常规病理学观察 术后 8 周 HE 染色显示 B、C 两组的 NGF+ CNTF 侧再生神经明显较 B 组 NGF 侧和 C 组 CNTF 侧再生神经的排列整齐,神经外膜薄;术后 16 周再生神经纤维粗细均匀,排列整齐,走行一致,接近正常的波纹状,明显优于对照侧(图 4-6)。

2.3 超微结构观察 术后 8、16 周, B、C 组 NGF+ CNTF 侧再生神经有髓与无髓纤维比例适宜,排列整齐,形态较一致,髓鞘厚度及轴突直径均较对照侧大。术后 8 周, B 组 NGF 侧可见散在的有髓纤维被大量的成纤维细胞包裹; C 组 CNTF 侧再生神经由无髓和有髓纤维组成,但数量少,轴突直径较小,大小欠一致;至术后 16 周,再生纤维的分布和排列、有髓纤维的髓鞘厚度及轴突直径仍不及 NGF+ CNTF 侧。

2.4 核黄示踪 B、C 组呈阳性标记的神经元个数及荧光强度明显多于 A 组,比较 B、C 组 CNTF+ NGF 侧和 CNTF 侧、NGF 侧的示踪结果见: CNTF+ NGF 侧被标记的神经元数目明显多于其 NGF 侧和 CNTF 侧,且荧光强度高,颗粒大,分布均匀而稠密,被标记的神经元细胞并非特异性地位于脊髓前角,腹角、侧角和后角均可见被标记的神经元(图 7-9)。

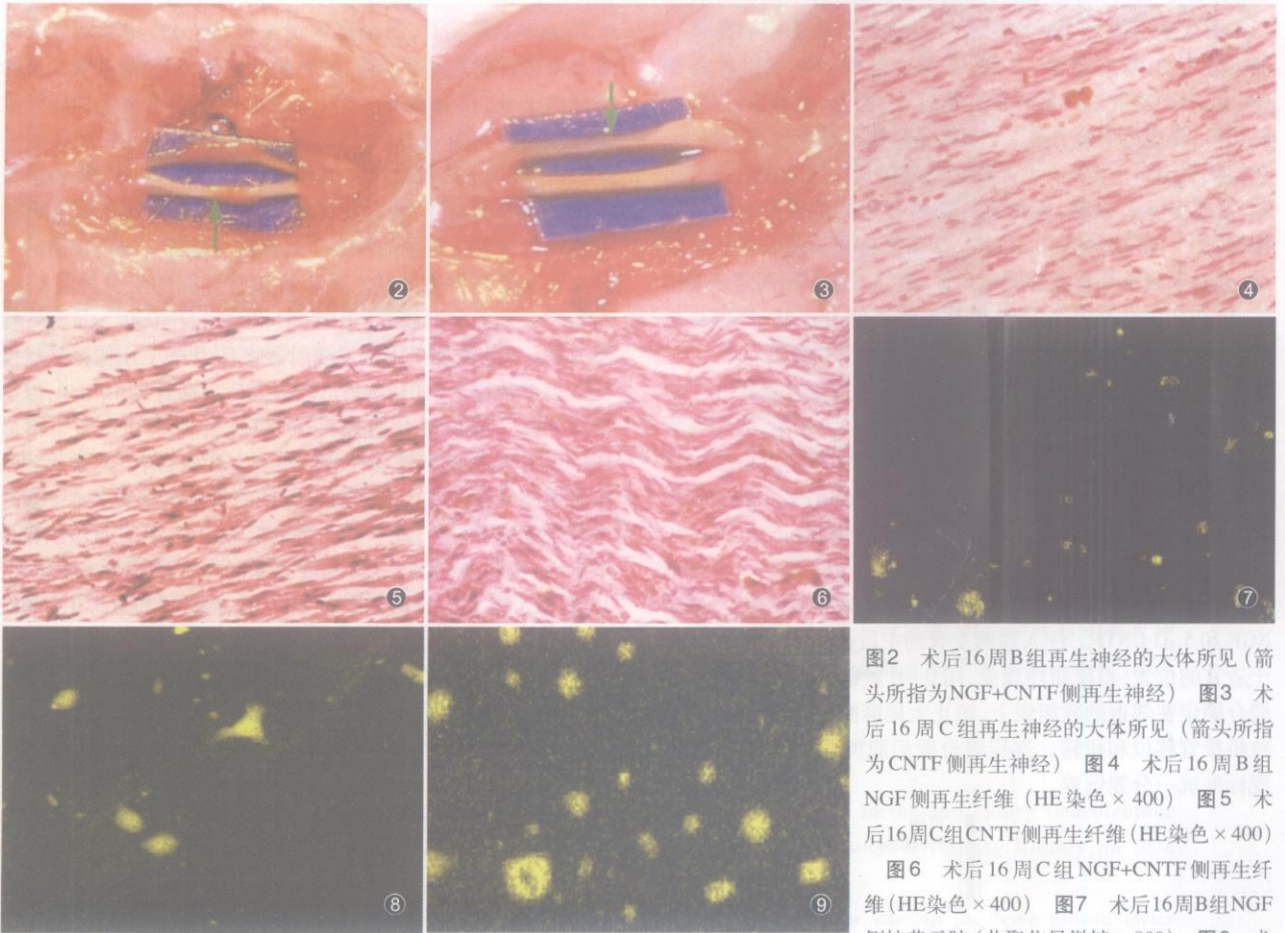


图2 术后16周B组再生神经的大体所见(箭头所指为NGF+CNTF侧再生神经) 图3 术后16周C组再生神经的大体所见(箭头所指为CNTF侧再生神经) 图4 术后16周B组NGF侧再生纤维(HE染色×400) 图5 术后16周C组CNTF侧再生纤维(HE染色×400) 图6 术后16周C组NGF+CNTF侧再生纤维(HE染色×400) 图7 术后16周B组NGF侧核黄示踪(共聚焦显微镜×800) 图8 术后16周C组CNTF侧核黄示踪(共聚焦显微镜×800) 图9 术后16周C组CNTF+NGF侧核黄示踪(共聚焦显微镜×800)

后16周C组CNTF侧核黄示踪(共聚焦显微镜×800) 图9 术后16周C组CNTF+NGF侧核黄示踪(共聚焦显微镜×800)
Fig.2 Regenerative nerve in group B with naked eyes at 16 weeks after operation (the arrow point at the regenerative nerve in the branch containing NGF and CNTF) **Fig.3** Regenerative nerve in group C with naked eyes at 16 weeks after operation (the arrow point at the regenerative nerve in the branch containing CNTF) **Fig.4** Regenerative nerve fiber of NGF lateral in group B at 16 weeks after operation (HE staining × 400) **Fig.5** Regenerative nerve fiber of CNTF lateral in group C at 16 weeks after operation (HE staining × 400) **Fig.6** Regenerative nerve fiber of NGF and CNTF lateral in group C at 8 weeks after operation (HE staining × 400) **Fig.7** Riboflavin tracing of regenerative nerve fiber of NGF lateral in group B at 16 weeks after operation (Confocal microscopy × 800) **Fig.8** Riboflavin tracing of regenerative nerve fiber of CNTF lateral in group C at 16 weeks after operation (Confocal microscopy × 800) **Fig.9** Riboflavin tracing of regenerative nerve fiber of NGF and CNTF lateral in group C at 16 weeks after operation (Confocal microscopy × 800)

3 讨论

周围神经再生的过程中不仅受到多种内、外环境的调控,而且有相当多的神经营养因子参与,因此研究神经营养因子促进周围神经再生的协同作用,对提高周围神经的再生速度和再生质量具有重要的理论意义和临床价值。既往用于比较和筛选不同神经营养因子生物学作用的差异性和协同性的研究方法主要是利用单通管直管桥接神经缺损,在管内注入不同的调节因子,分别观察各调节因子促进神经再生的效果。其实验结果常因不同个体的内、外环境的差异,一定程度上影响了研究结果的可靠性和精确性。本研究利用自行研制的梭形双通道桥接管观察 NGF 与 CNTF 促进周围神经再生的协同作用,可提高实验结果的可靠性和说服力^[1]。

本研究观察到 NGF 与 CNTF 促进周围神经再生的协同

作用表现为:联合用药侧再生神经纤维的组织形态学明显优于单独用药,再生神经纤维粗细均匀,有髓与无髓的比例适宜,且排列也趋于合理。此外,通过对再生神经的轴浆运输功能的研究观察到联合用药侧的再生神经轴浆运输功能明显强于其对照侧。说明 NGF 与 CNTF 对促进周围神经的组织形态和功能的恢复均具有较为明显的协同作用。而关于 NGF 与 CNTF 协同作用的机制目前尚不明确,但有研究认为产生这一协同作用的机制除单一因子的作用外,可能是两种因子通过非共价键形成异二聚体的缘故^[5]。Semkova等^[6]研究发现外源性 CNTF 可提高星形胶质细胞内 p75(NTR) mRNA 的水平 and 促进 NGF 的合成,当应用外源性的 CNTF 30 min 后 C-6s 表达首先增加,3 h 后 NGF mRNA 水平开始增加,6 h 后 NGF 才分泌增加,所以认为,其协同作用的机制很可能与 C-

fos相关,这也提示外源性 NGF发挥促进周围神经再生的机制可能一定程度上与 CNTF有关。

然而,NGF与CNTF的协同作用也可能与其生物学作用的差异性和特异性密切相关。周围神经损伤后,内源性 NGF与CNTF分布及代谢特点均不同,关于NGF和CNTF促进周围神经再生的作用机制和作用特点也明显存在一定差异性^[2-4]。研究表明这种差异性主要表现为NGF主要促进感觉纤维再生,而CNTF主要促进运动神经再生;NGF促进有髓纤维的再生较强,而CNTF除对有髓纤维再生具有一定的促进作用外,还可促进无髓纤维的再生。此外,NGF除具有直接促进神经再生的作用外,还具有促进周围神经血管形成的作用,一定程度上显示了其血管形成因子的作用^[7-8]。而周围神经大多为混合神经,按神经纤维类型可分为无髓和有髓纤维,按机能分为感觉和运动纤维。NGF和CNTF分别可促进感觉和运动及有髓和无髓纤维再生,这说明对促进混合神经再生而言,NGF和CNTF生物学作用的差异性和互补性可能是其协同效应的理论基础,但其内在的作用机制尚需进一步研究证实。

参考文献

1 李强,伍亚民,李民,等.梭形双通道桥接管的研制及其桥接大鼠坐

骨神经缺损的实验研究.中华创伤杂志,2004,20(4):230-233.

2 Dehleffsen K, Morik M, Meyer M. Control of local NGF mRNA synthesis by preformed factors rapidly released from peripheral nerves. Mol Cell Neurosci 2002, 20(3): 503-514

3 Abe K, Namikawa K, Honma M, et al. Inhibition of Ras extracellular signal regulated kinase (ERK) mediated signaling promotes ciliary neurotrophic factor (CNTF) expression in Schwann cells. J Neurochem, 2001, 77(2): 700-703

4 李强,李民,伍亚民. NGF与CNTF促周围神经再生作用的差异性及其协同性研究进展.中国矫形外科杂志,2004,12(7):537-539.

5 McAllister WV, Tang P, Smith J, et al. Axonal regeneration stimulated by the combination of nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor in an end-to-side model. JH and Surg (Am), 2001, 26(3): 478-488.

6 Semkova J, Krieglstein J. Ciliary neurotrophic factor enhances the expression of NGF and p75 low-affinity NGF receptor in astrocytes. Brain Res 1999; 838(1-2): 184-192

7 李强,李民,伍亚民,等.神经生长因子与睫状神经营养因子影响周围神经再生的比较研究.中华手外科杂志,2004,20(3):167-169.

8 李强,伍亚民,李民,等. NGF与CNTF促进不同类型神经纤维再生的比较研究.中华神经外科杂志,2004,20(6):446

(收稿日期:2006-04-19 本文编辑:王宏)

全国中西医结合脊柱相关疾病学术研讨会 暨《中国骨伤》杂志创刊 20周年纪念会征文通知

为促进脊柱医学的发展和学科建设,更好地为脊柱医学工作者提供展示不同学术观点的交流平台,由中国中西医结合学会和《中国骨伤》杂志社主办的全国中西医结合脊柱相关疾病学术研讨会暨《中国骨伤》杂志创刊 20周年纪念会,拟于 2007年 5月在北京召开。会议的主要议题:①脊柱相关疾病的基础和临床研究成果的交流;②成立中国中西医结合学会脊柱医学专业委员会;③《中国骨伤》杂志创刊 20周年纪念活动。欢迎全国各地从事脊柱医学工作及相关的医务人员踊跃投稿,本次研讨会为国家级继续医学教育项目,参会者将授予 I 类学分。会议期间将聘请国内外著名专家进行专题报告及举行《中国骨伤》杂志创刊 20周年编委工作会。

1 征文内容:①脊柱相关疾病的基础研究、临床研究、学术探讨、研究进展、诊疗方法等;②脊柱医学的基础理论、临床实践、整脊手法操作技法;③颈肩腰腿痛理论研究和临床诊疗方法探讨等;④脊柱针法微创技术及科研成果、学术论述、脊柱疾病的临床护理等;⑤脊柱的生物力学研究以及生物信息系统的理论探讨和实验研究,与脊柱相关的脊柱解剖学和生物力学作用机制、脊柱生物力学评价方法等;⑥脊柱外科的临床诊疗、基础研究、康复理疗、预防保健等方面的论著、综述、技术介绍和经验交流;⑦脊柱微创手术的研究发展状况,各种微创手术在脊柱手术中的临床应用,微创器械的研制等;⑧脊柱脊髓损伤基础与临床研究、脊柱脊髓损伤的康复及脊柱脊髓损伤并发症的预防和治疗、传统医学在脊柱脊髓损伤疾患中的应用;⑨与脊柱医学相关的医疗器械和保健器材的研发以及一些相关药物的开发应用等。

2 征文要求:凡未在国家级以上学术会议交流或未在公开刊物上发表的论文均可投送。论文全文在 3 000字以内并附 500字左右结构式摘要 1份,请用 A4纸打印,并寄软盘,欢迎通过 E-mail投稿。优秀论文将推荐在《中国骨伤》2007年增刊发表。

3 投稿请寄:北京市东直门内南小街甲 16号《中国骨伤》杂志社邵少云收,请在信封上注明“会议征文”字样。邮编:100700 E-mail:zggsz@ sina.com 电话:010-84020925 截稿日期:2007年 4月 30日。