

睫状神经营养因子对周围神经损伤后再生的影响

韩久卉 张英泽 许秀兰 田德虎
(河北医科大学第三医院, 河北 石家庄 050051)

【摘要】 目的 研究睫状神经营养因子(CNTF)对周围神经损伤后再生的影响。方法 用硅胶管桥接大鼠双侧坐骨神经缺损,形成神经再生室。左侧室内注入基因重组人 CNTF,右侧注入生理盐水(NS)。术后 14、30、60 和 90 天取材,行大体、光镜、电镜观察。术后 90 天行轴突图像分析、电生理检测及霍乱毒素-辣根过氧化物酶(CB-HRP)逆行追踪。结果 与对照侧相比,实验侧再生有髓神经纤维数目较多、轴突较粗且髓鞘较厚,复合肌肉动作电位(CMAP)的潜伏期较短、神经传导速度较快且波幅较高。实验侧 CB-HRP 标记的脊髓前角运动细胞数明显多于对照侧。结论 外源性 hCNTF 有明显促进周围神经再生作用。

【关键词】 睫状神经营养因子 神经再生 电生理 组织化学

Effect of ciliary neurotrophic factor on the regeneration of transected peripheral nerve HAN Jiuhui, ZHANG Yingze, XU Xiulan, et al. The Third Affiliated Hospital, Hebei Medical University(Hebei Shijiazhuang, 050051)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of ciliary neurotrophic factor(CNTF) on the regeneration of transected peripheral nerves. **Methods** Sciatic nerves in the middle of bilateral legs of 40 SD rats were resected for 5mm and the two cut ends were bridged by a silicone tube to form a regeneration chamber of nerve. Gene recombination human CNTF(hCNTF) was injected into left chamber and 0.9% saline(NS) was in right. Bridged nerves were exposed and observed at 14th, 30th, 60th, 90th days after operation and the samples were observed by light and electron microscopes. Image pattern analysis of axon, electrophysiological examination and cholera toxin horse radish peroxidase(CB-HRP) mark test were done at 90th days after operation. **Results** The regenerated nerves of CNTF sides had more medullated fibers, larger mean axons diameters and thicker myelin sheath than those of control sides. Incubation periods of complex muscle action potential(CMAP) of CNTF sides were shorter than that of control sides, nerve conductive velocity was quicker and wave amplitude higher. Motor cells of cornu anterius medullae spinalis marked with CB-HRP were more than that of control sides. **Conclusion** Exogenous hCNTF can promote regeneration of peripheral nerve.

【Key Words】 Ciliary neurotrophic factor Nerve regeneration Electrophysiology Histochemistry

周围神经损伤后,精湛的显微外科修复技术为神经再生提供了良好的基础,但神经功能的恢复仍不理想。近年来发现睫状神经营养因子(Ciliary Neurotrophic Factor, CNTF)在神经再生过程中起着重要的营养支持作用^[1,2],但目前关于 CNTF 对周围神经再生影响的报导较少。本实验用大鼠坐骨神经硅胶管再生室模型,管内注入基因重组人 CNTF(hCNTF)^[3],从电生理、组织化学及形态学方面探讨 CNTF 对神经再生的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物分组及手术方法 取体重 180~220g SD 大鼠 40 只,双侧大腿后部正中切口,显露坐骨神经,在梨状肌下缘 10mm 处切除 5mm 长的一段神经,任其回缩。在 10 倍手术显微镜下以 9-0 无创线将神经两断端分别套入长 10mm 的

硅胶管中(外径 2mm,内径 1.5mm),神经两断端间相距 6mm。左侧为实验侧,室内注入 hCNTF(1ml 含 25 μ g CNTF,第二军医大学神经生物教研室提供);右侧为对照侧,室内注入等量生理盐水(NS)。

1.2 检测项目

2.2.1 大体及光镜观察 分别于术后 14、30、60 和 90 天暴露桥接神经处观察桥接体外观,测量两侧再生神经干直径。分别在两吻合口近、远端 2mm 处及再生神经中段取 2mm 长神经段固定于 10% 中性福尔马林液,行石蜡切片,HE 染色;标本直接入 0.5% 四氧化锇液行髓鞘染色,石蜡切片。光镜下观察再生神经横切面显微结构。

2.2.2 电镜观察 于上述相同时间取标本经 2.5% 戊二醛溶液固定, PBS 清洗, 1% 锇酸后固定, 逐级酒精、丙酮脱水, E

pon812、815 树脂包埋, 铀和铅染色后, 制成超薄切片, 透射电镜观察。

1.2.3 轴突图像分析 采用电脑图像分析处理系统对术后 90 天远段四氧化锇染色标本作图像分析, 计数有髓神经纤维数目、轴突直径及髓鞘厚度, 每个视野测定 200~ 400 根神经纤维。

1.2.4 电生理检测 术后 90 天用 DISA1500 型肌电诱发电位仪(Dantes, Danmark) 行复合肌肉动作电位(CMAP) 检查, 测量记录潜伏期(LAT)、神经传导速度(CV)和波幅(AMP)。

1.2.5 CB-HRP 逆行标记 将 15μ130% CB HRP 多点注入术后 90 天及正常大鼠腓骨肌中, 存活 72 小时后行心脏灌注固定。取腰骶髓作厚 40μm 横断面冰冻切片, 经 HRP TMB 孵育成色、贴片及 1% 中性红复染, 光镜下计数实验侧、对照侧及正常大鼠单侧被标记的脊髓前角运动细胞数。

1.3 统计学处理 数据间用配对 t 检验。

2 结果

2.1 大体及光镜观察 术后 14 天, 两侧硅胶管外均有一层完整结缔组织膜, 实验侧硅胶管内两神经断端已被再生神经桥接起来, 对照侧两断端间仍有距离。光镜下实验侧再生神经中段可见再生轴突, 但未越过远端吻合口。术后 30 天, 硅胶管外结缔组织膜较厚, 两侧硅胶管内均有再生神经干通过。光镜下两侧轴突均已越过远端吻合口进入远段神经内, 实验侧有较多再生轴突及髓鞘形成, 有神经束结构形成。对照侧轴突排列较稀疏, 神经束状结构不明显。术后 60 天, 再生神经干较 30 天时明显增粗。光镜下两侧再生神经干内部结构已比较成熟, 束状结构明显, 有大量轴突和髓鞘形成。但实验侧再生神经纤维密集, 直径粗大, 分布均匀(图 1)。对照侧神经纤维排列较稀疏, 分布不均匀, 且粗细不一(图 2)。术后 90 天, 两侧再生神经干与近段神经干直径几乎接近。光镜下, 实验侧远段再生神经纤维密集, 直径粗大, 分布均匀。对照侧再生神经纤维分布不均匀, 且粗细不一。

2.2 电镜观察 术后 14 天, 实验侧近端神经纤维发出许多新生轴芽, 在轴芽内有许多线粒体、神经微丝、囊泡等细胞器, 再生轴芽被雪旺细胞鞘包裹(图 3)。对照侧组织结构仍紊乱, 未见新生轴芽, 可见松散旧鞘管(图 4)。术后 30 天, 实验侧可见有髓及无髓神经纤维, 髓鞘较厚, 再生轴突形态规则。对照侧组织结构仍紊乱, 成纤维细胞较多, 髓鞘较薄, 形态不规则, 内部结构不成熟。术后 60 天, 实验侧有髓神经纤维再生显著, 排列规则, 轴突粗大, 髓鞘厚, 明暗层结构清晰(图 5)。对照侧轴突数目少, 髓鞘薄, 结构欠成熟(图 6)。

2.3 轴突图像分析 术后 90 天实验侧再生神经远段有髓神经纤维数目、直径及髓鞘厚度均大于对照侧, 统计学分析有显著差异(表 1)。

表 1 有髓神经纤维数目、直径及髓鞘厚度比较($\bar{x} \pm s$)

侧别	轴突数目(个/mm ²)	轴突直径(μm)	髓鞘厚度(μm)
CNTF 侧	3510 ± 437.92	3.91 ± 0.43	1.23 ± 0.13
NS 侧	2048 ± 414.87	2.88 ± 0.53	0.98 ± 0.20
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01

2.4 电生理检测 术后 90 天电生理检测显示: 实验侧比对照侧潜伏期短, 神经传导速度快, 波幅高, 统计学分析有显著性差异(表 2)。

表 2 神经电生理测试结果比较($\bar{x} \pm s$)

侧别	潜伏期(ms)	传导速度(m/s)	波幅(mv)
CNTF 侧	2.32 ± 0.96	32.48 ± 5.52	5.98 ± 2.74
NS 侧	3.07 ± 1.04	19.67 ± 6.55	3.20 ± 1.30
P 值	< 0.05	< 0.01	< 0.01

2.5 CB-HRP 逆行神经标记 术后 90 天 CB HRP 逆行神经标记显示: 被 CB-HRP 标记的脊髓前角运动细胞集中在 L₃~L₅ 节段的前角外侧核。正常大鼠单侧标记的细胞数比实验侧多, 但两组数值没有显著性差异(p > 0.05)。实验侧比对照侧标记的细胞数多(p < 0.01), 且细胞色深, 突起较多、较长(表 3, 图 7、8)。

表 3 CB-HRP 逆行标记脊髓前角运动细胞数比较($\bar{x} \pm s$)

侧别	例数	标记细胞数	P 值
正常侧	6	54.38 ± 8.68	—
实验侧	8	49.40 ± 11.52	> 0.05*
对照侧	8	26.62 ± 6.29	< 0.01**

* 正常侧/实验侧 ** 实验侧/对照侧

3 讨论

CNTF 生物效应广泛, 在体及离体实验均表明 CNTF 能支持周围感觉、交感及运动神经元存活和分化, 非神经细胞如少突胶质细胞、小胶质细胞和肝细胞对外源性 CNTF 也具有反应性。CNTF 还对去神经支配的骨骼肌具有营养作用, 能缓解去神经支配引起的肌肉萎缩、湿重降低及蛋白丢失。周围神经切断后, 神经远段 CNTF 免疫反应性、生物活性及 mRNA 水平急剧降低, 当出现轴突再生和髓鞘形成时, CNTF mRNA 水平才开始上调^[1]。近来实验研究也发现, 在人神经损伤后 2 个半月的远近断端中, CNTF 免疫阳性染色强度高于正常神经, CNTF 在发生退行性变化的神经组织中表达呈上升趋势^[4]。这种现象提示早期局部补充外源性 CNTF 可弥补损伤部位 CNTF 的含量不足, 从而增加对受损神经的营养支持作用。

再生轴突数目增多并不能说明实验侧再生质量高于对照侧, 因为神经近端发出许多小的轴芽长过神经缺损后, 有可能终止于瘢痕组织或神经瘤或误长入感觉神经鞘而被修支。这样, 这些再生轴突并不能到达其特异性靶器官, 它们不会有助于神经功能恢复, 而只是改变了横截面的神经纤维计数和神经干直径^[5]。但我们结合 CB-HRP 逆行追踪, 对标记的脊髓前角运动细胞计数表明, 增加的轴突数不仅仅是由于轴突侧支形成增多, 还由于发出这些侧支的初级运动神经元的增加, 这些神经元的再生轴突跨越了受损部位到达了靶器官。电生理检测表明两侧再生神经功能都有不同程度恢复, 但实验侧 CMAP 的潜伏期短, 神经传导速度快, 波幅高, 这说明实验侧神经、肌肉功能状态高于对照侧, 其机理可结合轴突图像分析加以解释: 实验侧有髓神经纤维直径和髓鞘厚度高于对照侧, 粗大的神经纤维与其靶器官形成突触联系的机会大, 神经冲动传导的速度与神经纤维直径及髓鞘厚度成正比^[6]。本实验表明, CNTF 能明显促进轴突再生及再髓鞘化过程, 进而促进了再生神经结构成熟, CNTF 有明显促周围神经再生作用。

关于 CNTF 促进周围神经再生的机制目前还不十分清楚。有的学者认为损伤局部 CNTF 经逆行性轴流输送到脊

髓前角受损神经元胞体发挥营养支持作用,减缓受损神经逆行性变性,使轴突再生开始的部位更接近于手术修复处,从而使再生速度加快,并且减少轴突数的损失和其直径的缩小。同时,这些因素还可导致迅速的轴突—雪旺氏细胞间的相互作用及再鞘过程,促进再生神经纤维的成熟^[7]。

(本文图 1~8 见插页第 1 页)

参考文献

- [1] Richardson PM. Ciliary neurotrophic factors. *Pharmacol Ther*, 1994, 63(2): 187.
- [2] 许家军,何成.睫状神经营养因子神经生长因子对周围神经再生的作用. *中华手外科杂志*, 1997, 13(1): 16.
- [3] 何成,陈江野,陆长林,等.人睫状神经营养因子基因在大肠杆菌

中的表达. *生物化学与生物物理学报*, 1995, 27(6): 675.

- [4] 顾晓松,严志强,范明,等. CNTF 和 NGF 在损伤后变性神经组织中的表达与分布. *中华显微外科*, 1998, 21(2): 121.
- [5] Hare CMT, Evans PJ, Mackinnon SE, et al. Walking track analysis: a long term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg*, 1992, 89(2): 251.
- [6] Badalamente MA, Hurst LC, Paul SB, et al. Enhancement of neuromuscular recovery after nerve repair in primates. *J Hand Surg*, 1987, 12B(2): 211.
- [7] Koliatsos VE, Clatterbuck RE, Winslow JW, et al. Evidence that brain derived neurotrophic factor is a trophic factor for motor neurons in vivo. *Neuron*, 1993, 10(3): 359.

(收稿: 1998 11-06 修回: 1999 04 19 编辑: 房世源)

• 实验室技术 •

不脱钙骨超薄切片的制备

常超英 刘恩

(中国中医研究院骨伤科研究所, 北京 100700)

对于骨折和骨病的深入研究,要求建立不脱钙骨超薄切片技术。在超微结构水平观察骨组织内钙盐的沉积、构筑及其变化,有助于阐明骨病、骨吸收和骨修复过程中,钙盐的代谢活动;运用脱钙骨制备的标本,不能提供相应的资料。

1 材料和方法

1.1 动物和取材 试验用成年雄性 Wistar 大鼠,在戊巴比妥钠腹腔麻醉下,迅速取出股骨头、股骨颈和腰椎椎体。

1.2 依次按以下步骤制备超薄切片: (1) 立即投入 2% 多聚甲醛 3% 戊二醛溶液内固定 2 小时, 4℃; (2) 4℃ 0.1M 磷酸缓冲液冲洗 2 小时; (3) 4℃ 1% 锇酸溶液后固定 2 小时; (4) 梯度丙酮脱水; (5) 浸渗 Spurr: 用丙酮 Spurr 混合液分 3 步浸渗, 每步 2 小时。丙酮: Spurr 的比例依次为 3:1, 1:1 和 1:3; (6) Spurr 包埋液包埋; (7) LKB-V 超薄切片机和钻石刀切片, 厚度 500 埃; (8) 醋酸铀 枸橼酸铅双重复染。

1.3 日本 JEM 1200EX 透射电镜观察和拍照。

2 电镜观察结果

2.1 骨细胞与骨基质 骨细胞陷窝的周围有大量钙盐沉积。可见处于不同钙化时期的骨细胞(图 1), 早期埋入钙化基质内的骨细胞, 含有比较多的细胞器。在骨基质中, 可见到聚集成团的针形羟基磷灰石结晶(图 2)。羟基磷灰石结晶的长轴与胶原的长轴一致, 并且沿胶原的长轴分布。大量钙盐沉积在胶原上, 可以掩盖胶原的周期性横纹。

2.2 软骨细胞和软骨基质 一些软骨细胞的周围有钙盐沉积, 形成类骨质。类骨质内的软骨细胞出现固缩和变形, 其周围看见基质小泡(图 3)。

3 讨论

制备不脱钙骨超薄切片, 需要活体取材或灌注取材, 并且迅速投入固定液内固定。取材样本的体积以 1mm × 1mm × 1mm 为宜; 更需要避免机械性损伤。这样可以最大限度地保

持骨组织, 特别是骨内钙盐的原形。

样本的体积为 1mm³ 时可以被固定液迅速浸透^[1], 所以可以不采用灌注固定。由于 Karnosky 氏多聚甲醛 戊二醛混合液有比较强的穿透力, 对细胞又有良好的固定作用^[2,3], 所以比较适宜不脱钙骨样本的固定。早年, 多采用二甲硫酸钠缓冲液配制骨标本的固定液; 而 Palumbo 等^[4] 推荐使用磷酸缓冲液, 因为它对细胞结构的保存更好, 我们的经验和体会与 Palumbo 的观点一致。

浸透与包埋是制备不脱钙骨超薄切片的关键步骤。不脱钙骨密度高, 给包埋剂的浸透造成困难; 由于骨质脆硬, 如果包埋剂浸透不充分, 势必无法获得完整的超薄切片。根据 Dickson, Bancroft 和郑若玄等对于包埋剂粘度与浸透时间和效果关系的观点^[1,3,5], 我们采用低粘度的 Spurr 包埋剂, 而且从低浓度开始, 逐级增加, 取得比较满意的结果。为了克服 Spurr 包埋剂造成的样本“嗜染性”下降, 我们采用了醋酸铀染色。此外, Spurr 包埋液的毒性比较大, 在操作过程中必须十分小心。万一皮肤被 Spurr 包埋液污染, 须立即用清水和肥皂冲洗干净, 切不可使用有机溶剂^[3]。

(本文图 1~3 见插页第 1 页)

参考文献

- [1] Dickson GR. Methods of calcified tissue preparation. Elsevier Science Publishers B. V., 1984, 79~145.
- [2] Karnosky MJ. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol*, 1965, 27: 137~138.
- [3] Bancroft JD, Stevens A. Theory and practice of histological techniques. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1977, 326~370.
- [4] Palumbo C, Palazzini S, Zaffe D, et al. Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit: An ultrastructural study of cytoplasmic processes. *Acta Anat*, 1990, 137(4): 350~358.
- [5] 郑若玄. 实用细胞学技术. 北京: 科学出版社, 1980, 176~196.

(编辑: 李为农)

睫状神经营养因子对周围神经损伤后再生的影响

(正文见 585 页)

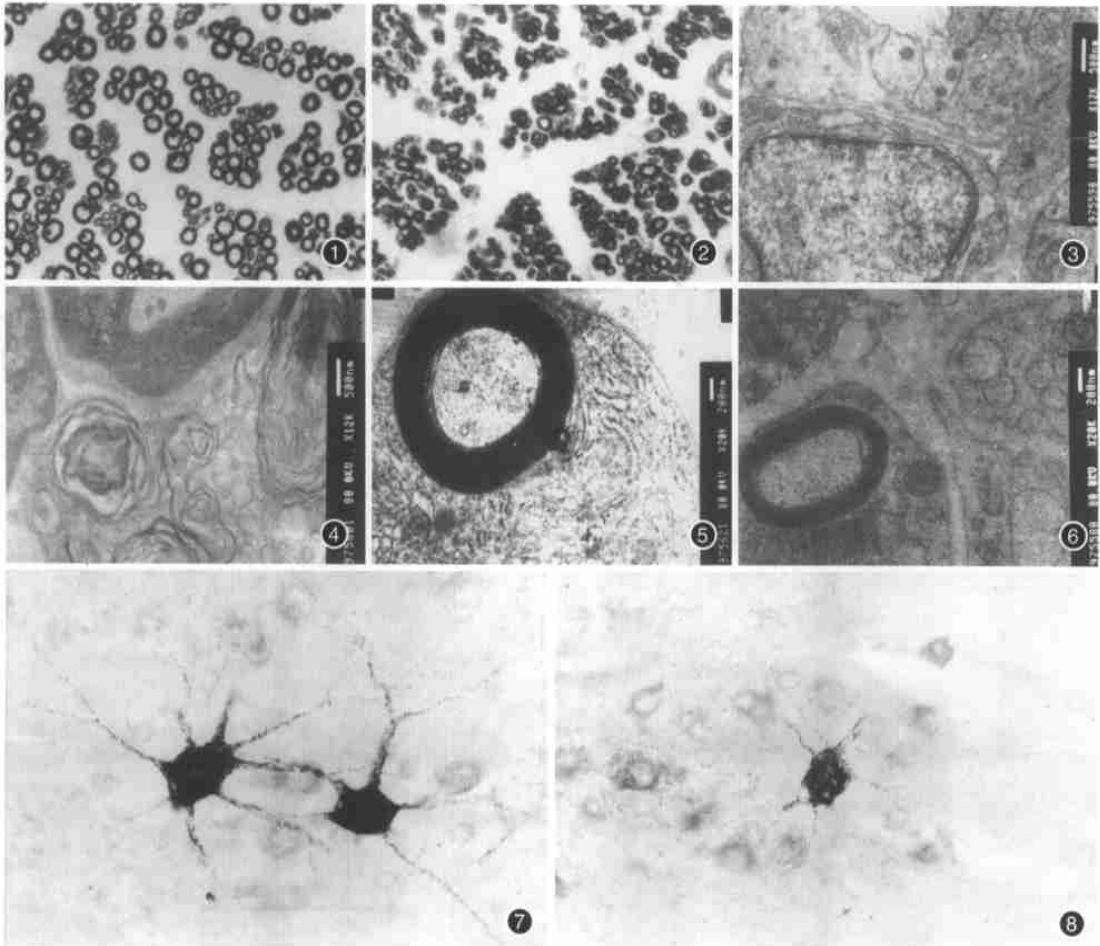


图1 术后60天,实验侧神经远段,再生神经纤维直径粗大,排列整齐,四氧化铁髓鞘染色 $\times 400$ 图2 术后60天,对照侧神经远段,再生神经纤维直径细小,粗细不均,四氧化铁髓鞘染色 $\times 400$ 图3 术后14天,实验侧神经近段,可见新生轴芽及雪旺细胞。透射电镜 $\times 12000$ 图4 术后14天,对照侧神经近段,可见松散旧鞘管,未见新生轴芽。透射电镜 $\times 12000$ 图5 术后60天,实验侧神经中段,髓鞘较厚,明暗板层结构清晰。透射电镜 $\times 20000$ 图6 术后60天,对照侧神经中段,髓鞘较薄。透射电镜 $\times 20000$ 图7 实验侧CB-HRP标记的脊髓前角运动细胞,突起多且长。 $\times 180$ 图8 对照侧CB-HRP标记的脊髓前角运动细胞数少,突起短。 $\times 180$

不脱钙骨超薄切片的制备

(正文见 587 页)

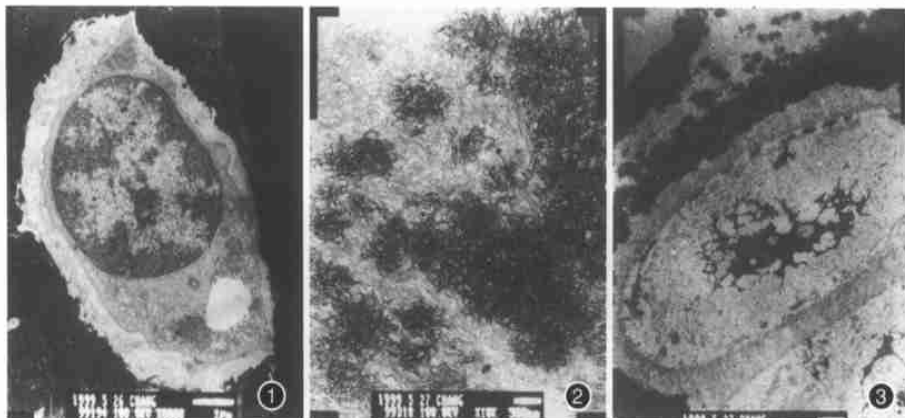


图1 骨细胞和骨基质 透射电镜 $\times 8000$ 图2 羟基磷灰石结晶聚集团 透射电镜 $\times 10K$ 图3 软骨细胞退变、坏死,其周围为钙化区 透射电镜 $\times 2500$