

·基础研究·

A型肉毒毒素对痉挛性瘫痪大鼠腓肠肌作用的实验研究

高宝勤¹ 王拥军² 孙异临³ 张邵东³ 邓亚仙¹ 杨伟力¹ 杨丽英¹
黄海涛¹ 谢天¹ 俞进⁴ 李光⁴

摘要 目的:研究A型肉毒毒素注射致痉挛瘫痪大鼠腓肠肌及相关结构超微结构的改变。方法:150只大鼠随机分A、B、C、D4组;A组为30只,单纯颅骨钻孔;B组为40只,C组为50只,D组为30只,各组均以适宜电流刺激破坏左侧锥体束制备痉挛瘫痪模型。C组、D组给予腓肠肌痉挛肌肉注射A型肉毒毒素6u/kg/肌群;D组,于注射后辅以运动训练。B组为对照组,给予注射等体积生理盐水。各组于注射后不同时间进行神经行为学检测、肌肉及相关组织结构透射电镜检查。结果:C组和D组的神经、肌肉组织改变情况均较对照B组明显。C组和D组,均观察到神经芽生现象。训练后D组大鼠神经行为学及超微结构改善明显。肌膜两侧呈现不同的病理改变。结论:A型肉毒毒素肌肉注射导致的超微结构改变较单纯肌痉挛造成的改变更为明显;肌细胞膜对肉毒毒素具有阻隔作用,A型肉毒毒素可能有诱发神经芽生作用。运动训练对大鼠神经行为学有明显改善,运动训练可促进病变肌肉超微结构改善。

关键词 A型肉毒毒素;痉挛性瘫痪;超微结构

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-08-0683-04

The experimental study on effects of BTX-A on gastrocnemius muscle of spastic paralytic rat's/GAO Baoqin, WANG Yongjun, SUN Yilin, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(8):683—686

Abstract Objective: To study the effects of botulinum toxin-A (BTX-A) on the ultrastructural change of gastrocnemius muscle and relative tissue of spastic paralytic rats. **Method:** A total of 150 rats were randomly divided into four (A,B,C,D) groups. All rats of 4 groups were drilled a hole on the skull; rats of B,C,D groups were underwent electrical destroy at left pyramidal tract; after that saline and BTX-A were injected into gastrocnemius muscle of spastic paralytic group B rats and group C and D rats respectively; then let the group D rats to exercise in rolling cage. The ultrastructural changes of gastrocnemius muscle and related tissue of spastic paralytic rats in different period were studied by transmission electronic microscopy. **Result:** The ultrastructural changes of muscle and related tissues were more obviously in group C and D than that in group B. After 3 months the behaviors and ultrastructures of muscles and related tissues were improved in group D. Nerve sproutings were also observed in group C and D under transmission electronic microscopy. The pathologic changes were different at both sides of muscle membranes. **Conclusion:** The changes of ultrastructure in muscles after injection of BTX-A are more distinct than that in rats of single spastic models. The membranes of muscle cells can seemly prevent the penetrating of BTX-A. BTX-A maybe induces the nerve sprouting. Exercises can obviously improve the function of nerve and movement, and can promote the resume of muscular ultrastructure.

Author's address Department of Pediatrics, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing, 100050

Key words botulinum toxin-A; spastic paralysis; ultrastructure

A型肉毒毒素(botulinum toxin-A, BTX-A)对注射部位组织结构影响的研究已有记载^[1]。1973年Gutmann, 1992年Chon在肉毒毒素侵入的伤口组织中发现明显的神经突触后膜的退变。1995年Sherif等在正常大鼠注射肉毒毒素所致肌肉神经病理性改变进行的研究中也证实了上述现象。本研究将进一步探讨BTX-A注射后对大鼠痉挛肌肉,以及运动训练辅以BTX-A注射对痉挛肌肉超微结构及大鼠行

为学的影响,为BTX-A注射和功能训练治疗肌肉痉挛性疾病提供理论和实践依据。

1 首都医科大学附属北京天坛医院儿科,100050

2 首都医科大学附属北京天坛医院神经内科

3 北京市神经外科研究所

4 首都医科大学附属北京天坛医院 病理科

作者简介:高宝勤,男,主任医师,博士

收稿日期:2008-03-07

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

清洁级成年雄性 Wistar 大鼠 170 只, 鼠龄 2—3 个月, 体重 160—220g, 由首都医科大学动物中心提供。动物分组: 取 150 只大鼠随机分为 4 组:A 组, 30 只(单纯颅骨钻孔);B 组 40 只(颅骨钻孔+电流刺激锥体束破坏);C 组 50 只(颅骨钻孔+电流刺激锥体束损伤+BTX-A 注射);D 组 30 只(颅骨钻孔+电流刺激锥体束损伤+BTX-A 注射+运动训练)。每组再分为 3d 组、7d 组、15d 组、30d 组、90d 组。

1.2 实验方法

1.2.1 痉挛性瘫痪模型的制备: 采用电流刺激锥体束毁损法:B、C、D 各组均予 2.5 mA 直流电刺激破坏左侧椎体束 30s, 间隔 30s, 刺激 2 次, 制备痉挛性瘫痪模型。

1.2.2 成功模型判定方法及标准: 悬吊实验: 使大鼠前腿抓住一个水平的玻璃棒(直径 0.5cm)离开桌面记录大鼠抓住玻璃棒持续的时间, 进行评分。评分标准: 1 分 <10s; 2 分: 11—30s; 3 分: 31—120s; 4 分: 121—300s; 5 分 >300s。异常判定标准: 分值低于对照组均数-1.96 倍标准差。

1.2.3 研究对象的处理: A 型肉毒毒素(兰州生物制品研究所生产), 100U/支。A 组不予注射; B 组注射等体积生理盐水; C 组, D 组均予肉毒毒素 6U/kg 胫肠肌注射。D 组于注射后第 2 天开始采用自转笼使大鼠进行跑动锻炼, 每日半小时, 每月训练 25d, 共训练 3 个月。

A 组及 B、C、D 各组于局部注射后第 3 天, 7 天, 15 天, 30 天, 90 天分别进行神经行为学检测。

1.2.4 活组织检查: A 组及 B、C 组分别于局部注射后第 3 天, 7 天, 15 天, 30 天, 90 天, D 组于第 15 天, 30 天, 90 天, 先对右下肢肌肉进行大体观察后, 再取右下肢腓肠肌组织, 进行形态学研究。

取材分组情况见表 1。

表 1 BTX-A 注射后瘫痪鼠右侧
腓肠肌活检分组情况 (只)

组别	例数	第 3 天	第 7 天	第 15 天	第 30 天	第 90 天	观察项目
A	30	6	6	6	6	6	光镜、电镜
B	30	6	6	6	6	6	肌肉组织
C	30	6	6	6	6	6	形态学研究
D	18			6	6	6	

将对照组、实验组所取标本均行电镜观察。电镜标本: 修成 1mm³, 按常规方法制成透射电镜样品, 半薄切片 1μm, 光学显微镜定位后制成超薄切片 40μm。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 11.50 统计软件进行 F 检验, 行组间

两两比较, 进行显著性检验。

2 结果

2.1 各组动物悬吊试验比较

实验前, A 组与其余三组间两两比较无显著性差异。A 组不同时间段之间比较无显著性差异。试验第 3 天时, A 组与 B 组、C 组比较有显著性差异。试验第 7 天时, A 组与 B 组、C 组比较有显著性差异。试验第 15 天时, A 组与 B 组、C 组、D 组比较有显著性意义。试验第 30 天时, A 组与 B 组、C 组比较有显著性意义, A 组与 D 组比较没有显著性差异。试验第 90 天时, A 组与 B 组、C 组、D 组比较有显著性意义, A 组与 D 组比较没有显著性差异。D 组实验前与实验后第 15 天比较有显著性差别; 与第 30 天、第 90 天时比较差异不显著。实验前、实验后第 15 天, C 组与 D 组比较无显著性差异。实验后第 30 天、第 90 天时 C 组与 D 组比较其差异有显著性意义, 见表 2。

表 2 各组动物悬吊试验比较 (x±s)

组别	实验前	第 3 天	第 7 天	第 15 天	第 30 天	第 90 天
A	2.00±0.63	2.33±1.03	2.50±1.04	2.50±0.83	2.50±0.54	2.66±0.81
B	2.50±1.04	5.33±2.06	6.33±2.25	6.16±1.47	5.66±2.80	5.83±2.04
C	2.83±0.75	5.33±2.06	4.83±1.47	4.33±1.96	5.00±2.60	4.66±1.63
D	2.16±0.75				3.83±2.13	3.00±3.00
						2.00±0.89

2.2 肌肉活检形态学研究结果

2.2.1 大体结果: 对照组、实验组大鼠右下肢肌肉无明显肉眼可见的病理改变。

2.2.2 电镜结果。

A 组: 试验第 30 天形态正常(图 1)。

B 组: 制模后第 7 天见线粒体集中分布于 Z 线两旁、肌膜下, 部分浓缩; 第 15 天出现个别肌纤维萎缩, Z 线部分断裂, 浓缩的线粒体增多, 线粒体在 Z 线两侧聚集呈现较为典型的“麦穗”样改变(图 2)。



图 1 A 组试验第 30 天正常终板结构



图 2 B 组制模后第 7 天右腓肠肌电镜观察
Z 线断裂, 线粒体浓缩分布于 Z 线两侧呈麦穗样改变

第 30 天、第 90 天肌纤维进一步萎缩, 部分萎缩的肌细胞被胶原替代。肌纤维间微血管可见内皮细胞增生, 管腔变窄, 血管内膜不光滑, 基底膜完整, 周围有髓、无髓神经结构正常, 无脱髓鞘改变(图 3)。

C 组: 肌膜、核膜结构完整, 形态正常。第 7 天运动终板突触前膜内神经递质小泡明显增多(图 4)。

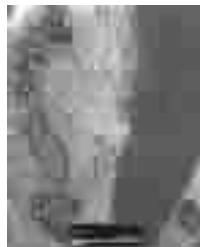


图3 B组制模后第90天右腓肠肌电镜观察
肌纤维萎缩,有髓神经无髓神经结构正常

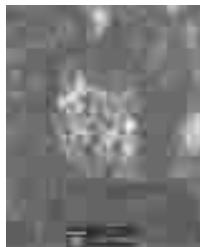


图4 C组 BTX-A 注射后第7天右腓肠肌电镜观察
触前膜内神经递质小泡明显增多

第15天,在同一个切片内,肌细胞膜两侧表现出正常与异常同时存在的特征性病理变化。一侧见散在肌纤维萎缩,Z线紊乱,部分消失;胞浆内出现脂滴或空泡(图5)。

BTX-A注射第30天见可疑终板样结构,即细胞膜局部出现较多深而密的皱褶,皱褶处可见较多成簇的性质不明的深染颗粒,但未见神经递质小泡(图6)。



图5 C组 BTX-A 注射后第15天右腓肠肌电镜观察
肌细胞膜两侧不同肌细胞表现出正常与异常同时存在的特征性病理变化。



图6 C组 BTX-A 注射后第30天右腓肠肌电镜观察
细胞膜局部较多深而密的皱褶,见较多成簇的性质不明的深染颗粒,未见神经递质小泡。

C组,第90天肌纤维萎缩与肥大并存。

D组:与C组比较,第15天无明显不同。第30天可见肌纤维萎缩与肥大并存,线粒体增多,部分浓缩,肌节部分紊乱,肌糖元增多,肌丝部分被糖元替代(图7)。第90天,肌丝正常,线粒体增多,运动终板结构正常。



图7 D组第30天右腓肠肌电镜观察
肌纤维萎缩与肥大并存,线粒体增多,部分浓缩,肌节部分紊乱,肌糖元增多。

3 讨论

本实验采用直流电毁损锥体束的方法成功制备

了痉挛性瘫痪模型,在此基础上,对痉挛肌肉组织注射BTX-A,采用透射电镜观察单纯痉挛肌、痉挛肌BTX-A注射后,以及痉挛肌BTX-A注射辅以运动训练几种情况下肌肉组织超微结构改变。

本实验采用2.5mA直流电,刺激2次,每次30s,间隔30s电毁损锥体束的方法成功制备了痉挛性瘫痪模型。悬吊试验科学实用。

A组经颅骨钻孔并未损害锥体束,各项神经行为学检测均正常。A组不同时期的肌肉组织光镜下大体观察及电镜超微结构均正常。

肉毒毒素是一种肌肉松弛剂,进入人体后会选择性地侵入神经组织,作用于神经肌肉接头的突触前膜^[2],使神经递质小泡与突触前膜的锚定、融合受阻,抑制调节肌肉的收缩与舒张的神经递质——乙酰胆碱的释放而引起松弛性麻痹。这种肌肉松弛时间可维持3—6个月^[3]。C、D组大鼠腓肠肌注射BTX-A后第7天下肢痉挛症状出现改善,15—30d改善最明显,第90天又出现痉挛瘫痪症状。此与国内外文献报道的肉毒毒素治疗显效时间相一致。

C、D组痉挛性肌肉注射BTX-A后,肌肉萎缩程度及肌纤维结构破坏情况均较对照B组严重。文献报道^[4],运动神经元与肌细胞间存在着依赖于神经冲动的复杂关系,肌细胞正常形态结构维持需要靠一些神经营养因子的作用,失神经支配的最大变化是这种神经营养因子丢失,导致肌肉形态结构、生理生化及新陈代谢等方面的变化。进而在第15—30d上述现象进一步增多,并在有髓神经纤维处也有出现,同时还可见深而密的类似于突触后膜的皱褶出现,其间有不明显性质的深染颗粒,有可能是孤立的神经递质,但无神经递质小泡存在。文献报告^[5]最早的神经芽生出现在BTX-A注射后24h。我们认为孤立的神经递质即为芽生(sprouting)的最初表现。在外科性失神经中并没有发现神经芽生现象出现。BTX-A肌注后诱导神经芽生的信号物质,如类胰岛素样生长因子结合蛋白增多,肌肉特异性络氨酸激酶增加,CAP-23基因和CAP-43基因激活有关^[6]。

D组于BTX-A肌注30d后,其肌纤维有明显的代偿肥大。90d后肌肉组织纤维结构清晰完好,代偿肥大,考虑与肢体主动活动,肌肉发生舒缩挤压有关,这一方面促进了肌肉血液循环加速了静脉及淋巴回流,使组织间水肿得以减轻,从而缩短血液中氧及营养物质与肌细胞之间的弥散距离,有利于肌肉内氧及代谢产物的交换,另一方面,通过机械性地将肌纤维拉长或缩短,使肌肉保持一定的弹性,防止关

节僵直及废用性肌萎缩,为再生的神经纤维到达靶器官作良好的准备^[4]。

以往理论认为,上位神经元损伤一般不会引起相应肌肉萎缩。最近有人通过脑性瘫痪肌肉病理证实,脑性瘫痪患儿的痉挛肢体肌肉是存在肌萎缩的。该作者推测肌肉对外周神经具有逆向营养作用,当肌肉处在痉挛状态,能量过度消耗,造成肌肉本身营养不良,从而对外周神经逆向营养减弱,外周神经营养不良对肌肉的营养也相应减弱,形成了一种恶性循环,最终导致明显的肌肉营养不良及肌肉萎缩。所以,上位神经元损伤所造成的肌肉萎缩,起源于肌肉本身,肌萎缩呈持续性,是一个缓慢过程,如得不到相应干预及治疗,会随着时间延长而加重。

C组、D组于BTX-A注射7d后,突触前膜内囊泡明显增多(图7),推测由于囊泡受BTX-A抑制不能接触突触前膜,造成囊泡在突触前膜内堆积有关。该实验,首次从形态学上证实BTX-A通过抑制突触小泡与前膜接触可能是作用机制之一。无论是C组还是D组在BTX-A注射15d后均未见到突触前膜内囊泡增多的现象,提示突触小泡形态维持时间小于7d。

C组注射15d出现明显的超微结构改变。注射后第30天肌纤维继续萎缩,证实BTX-A的作用仍然持续存在。BTX-A注射后第90天肌纤维萎缩与肥大并存,肌节紊乱,但部分得以改善,提示已进入药效减低期及肌肉和相关结构恢复时期^[7]。需要强调的是,以上改变在同一个样本上仅发生在同一个肌膜包括的一组肌纤维内,而在肌膜的另一侧,则呈现基本正常的结构。这一现象似乎说明,BTX-A注射后的扩散范围是有限的,肌细胞膜对其有明显的阻隔作用,这提示BTX-A局部注射是安全的。

D组:腓肠肌(协同肌):与C组比较,第3天时病理改变无明显区别。第7天,15天时可见肌纤维萎缩与肥大并存,线粒体增多,部分浓缩,肌节部分紊乱,肌丝部分被替代,肌纤维Z线紊乱呈轻、中度不等的“麦穗”样变。第30天时微血管及肌糖元增多,运动终板集中分布。第90天时,肌细胞可见明显肥大,肌节尚清晰,Z线基本恢复正常。肌丝正常,线粒体增多。总的形态学改变提示运动锻炼后神经肌

肉等组织处在高代谢状态,这就有利于能量供应及瘫痪肌的恢复。和实验组C比较具有明显的结构上的改善^[8]。

试验中,于BTX-A注射后30d时,无论是C组或D组,均看到了疑似的芽生现象(图7),A、B组均未见有芽生发生。而有趣的是这种芽生结构只发生在BTX-A作用侧,而于肌细胞膜的另一侧则无芽生发生。这一现象可能提示BTX-A注射具有直接或间接启动或通过诱发某种促神经生长因子促发这种芽生的作用,但这种芽生发生的机制仍不清楚。假若BTX-A有这种诱导作用,可能为未来的促神经再生制剂研发提供理论和实践基础。

4 结论

BTX-A肌肉注射导致的肌纤维及相关结构改变如纤维化、囊泡聚集、线粒体异常聚集浓缩、Z线破坏等超微结构改变,较单纯肌痉挛造成的超微结构改变更为明显,提示BTX-A注射对肌肉及相关结构是有破坏作用的;运动训练对大鼠神经行为学有明显改善,运动训练可促进病变肌肉超微结构恢复正常。

参考文献

- [1] Dessa LA, Mazzocchi M, Rubino C. An objective assessment of botulinum toxin A effect on superficial skin texture [J]. Ann Plast Surg, 2007, 58(5):469—473.
- [2] Hanson MA, Stevens RC. Cocrystal structure of synaptobrevin-II bound to botulinum neurotoxin type B at 2.0 resolution[J]. Nat Struct Biol, 2000, 7 (8):687—692.
- [3] Santafe MM, Urbano FJ, Lanaza MA, et al. Multiple types of calcium channels mediate transmitter release during functional recovery of botulinum toxin type A poisoned mouse motor nerve terminals[J]. Neuroscience, 2000, 95:227—234.
- [4] Sunderland S. Factors influencing the development and severity of the changes in denervated muscle. Nerve injury and Repair [M]. London: Sunderland, 1991. 241—249.
- [5] Pamphlett R. Early terminal and nodal sprouting of motor axons after botulinum toxin[J]. J Neurol Sci, 1989, 92(2-3):181—192.
- [6] Meunier FA, Schiavo G, Molgo J. Botulinum neurotoxins: from paralysis to recovery of functional neuromuscular transmission[J]. J Physiol Paris, 2002, 96: 105—113.
- [7] Chen CM, Stott NS, Smith HK. Effects of botulinum toxin A injection and exercise on the growth of juvenile rat gastrocnemius muscle [J]. J Appl Physiol, 2002, 93 (4): 1437—1447.
- [8] Connell AL, Vrbová G. Temporary loss of activity prevents the increase of motor unit size in partially denervated rat soleus muscles[J]. J Physiol, 1991, 434: 107—119.