

鼠大脑提取液对坐骨神经损伤的修复研究

朱齐宁¹ 崔 静²

摘要 目的:研究鼠大脑提取液对坐骨神经损伤的修复的影响。**方法:**选用试验用的小白鼠 20 只,雌雄不限,待切断坐骨神经后随机分成四组,每组 5 只。分别为:大脑 A 组:注射鼠大脑提取液、运动训练组;大脑 B 组:注射鼠大脑提取液、不训练;生理盐水 A 组:注射 0.9% 的生理盐水、运动训练;生理盐水 B 组:注射 0.9% 的生理盐水、不训练。**结果:**对于坐骨神经损伤的修复,注射鼠大脑提取液的小白鼠比注射生理盐水的小白鼠恢复效果更明显。**结论:**注射鼠大脑提取液结合运动对小白鼠坐骨神经损伤修复有显著的影响。

关键词 神经营养因子;坐骨神经;损伤;小鼠;神经修复

中图分类号:R493 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-1242(2008)-09-0831-02

近年来,随着细胞和分子生物学的迅速发展,人们对神经损伤修复有了进一步认识,提出神经元胞体在神经损伤后功能恢复中起到重要的作用。生理状况下,神经元胞体处于动态平衡状态,以适应机体内外环境的变化。一些严重的伤害性刺激(如神经元胞体断裂)可打破其生理平衡而诱发其病变或死亡;而一些外源性因子可增强神经元生理平衡的能力,对保护神经元存活有重要作用。运动神经元的损伤和疾病后的功能恢复是一个尚未解决的难题。

本研究于周围神经损伤局部施用鼠大脑提取液,防止由于创伤所致运动神经元退化及死亡,并维持其存活、分化和生长发育,以此证明鼠大脑提取液内含有运动神经元生物活性物,即运动神经元营养因子。本实验利用鼠大脑提取液对切断小鼠右侧坐骨神经后进行用药物加训练,观察各项指标的变化,探讨运动神经损伤后鼠大脑提取液的修复作用。

1 材料与方法

1.1 实验对象

小白鼠 20 只 43g/只,由广东医学院实验动物中心提供。小白鼠随机分为 4 组:大脑 A 组:于损伤局部肌肉注射脑提取液,跑台训练;大脑 B 组:损伤局部肌肉注射脑提取液,不训练;生理盐水 A 组:于损伤局部肌肉注射生理盐水,跑台训练;生理盐水 B 组:于损伤局部肌肉注射生理盐水,不训练。公笼饲养,自由饮食,室温 23±2℃,湿度 60—70%。

1.2 鼠大脑提取液制备

试验用的大白鼠 15 只,雌雄不限,在 1% 戊巴妥钠(35mg/kg)腹腔麻醉下取其大脑,置 4℃ 冷生理盐水冲洗,称重后剪碎,加 10 倍生理盐水行组织匀浆处理,低温离心(4000G 4℃)30min,取其上清液,用针头式过滤后,分装冻存备用。

1.3 动物模型制备

本实验利用切断小白鼠坐骨神经后,引起脊髓前角运动神经元退化、死亡现象作为动物实验模型。

小白鼠用乙醚麻醉(35mg/kg)成功后,腹卧位固定于手术台上,选取右侧后肢中上部,备皮消毒,切开皮肤,显露坐骨神经,在后肢中上部切断坐骨神经,远端游离并去除 0.5cm,彻底止血。用 7—0 号无创缝线缝合,待小白鼠清醒后放回笼中,自由饮食生长,术后 30d 处死。

1.4 动物处理

自手术第 1 天起隔日注射 1 次,每侧注射 0.1ml,大脑 A 组、生理盐水 A 组每天进行跑台运动训练 1 次,使用中国杭州段氏研制的动物跑台,训练安排见表 1。

表 1 大脑 A 组、生理盐水 A 组小白鼠跑台训练安排

日程	速度(m/min)	坡度(°)	时间(min)	距离(m)
第 1 周	10	0	10	100
第 2 周	15	0	15	225
第 3 周	20	0	20	400
第 4 周	25	0	25	625

1.5 标本处理和观察指标

1.5.1 标本处理:术后 30d,将实验动物以腹腔注射 20% 乌拉坦 0.3ml 麻醉,背部正中暴露脊髓,切取 L3、L4、L5 节段脊髓,戊二醇固定,梯度酒精脱水,浸透,石蜡包埋,−20℃ 连续冷冻切片,片厚约 20μm,每间隔 5 张取 1 张,采用 1% 甲苯胺蓝进行 HE 染色。

1.5.2 肉眼观察:大体观察患肢状况:大脑 A 组:右侧断端坐骨神经与肌肉轻微粘连,神经愈合度较好,肌肉轻微萎缩,组织水肿不明显。大脑 B 组:右侧断端坐骨神经与肌肉粘连明显,神经愈合度较好,肌肉中度萎缩,组织水肿明显。生理盐水 A 组:右侧断端坐骨神经与肌肉粘连,神经联合明显,肌肉中度萎缩,组织水肿明显。生理盐水 B 组:右侧断端坐骨神经与肌肉粘连严重,神经轻微联合,肌肉严重萎缩,严重组织水肿、充血,轴突分岔明显。

1.5.3 光镜检查:40×10 倍数的显微镜下观察:取 3 个不同的视野进行观察,脊髓前角神经元胞体状况,尼氏染色 Nissl 小体状况(包括核、核仁)神经元有无浓缩、破碎,胶质细胞数量。

1.5.4 运动神经元计数:在 HE 染色切片上,运用显微镜观察分别计数双侧前角运动细胞数目,计数标准为能辨认出有细胞核的神经元轮廓数目。结果以损伤侧和未损伤侧两者的神经元轮廓、数目相比较来表示。

数据分析及处理:每一侧脊髓标本实验侧(右侧)与正常侧(左侧)脊髓前角运动神经元数目之比为该运动实验侧运动

1 湛江师范学院资产处,广东湛江,524048

2 湛江师范学院体育科学学院运动人体科学系

作者简介:朱齐宁,男,工程师

收稿日期:2007-11-14

神经元存活率。其计算公式为:

实验侧运动神经元存活率=实验侧前角神经元数/正常侧神经元数 $\times 100\%$

所测的各组数据采用组间比较的 t 检验进行显著性分析,数值均用均数 $\pm$ 标准差表示。

2 结果

各组实验动物实验侧运动神经元的存活率:将实验用小鼠坐骨神经切断术后, 每组在损伤局部分别注射提取液、生理盐水,手术 30d 后处死观察各组损伤侧脊髓前角运动神经元数目和存活率,各组间比较,神经元数目的差异均具有显著性($P<0.05$),见表 2。注射大脑提取液及生理盐水组相比均有显著差异($P<0.005$)。运动组和非运动组相比均有显著性差异($P<0.005$)。显示了注射大脑提取液加运动的效果比注射生理盐水加运动或注射生理盐水不运动的效果都好,且效果最为显著。说明鼠脑提取液具有一定的运动神经营养活性。

表 2 各组实验动物实验侧运动神经元的存活率

组别	例数	实验侧神经元数目	正常侧神经元数目	存活率 (%)
大脑 A 组 (注射大脑提取液加运动组)	5	74 $\pm$ 3 ^①	81 $\pm$ 7	91.5
大脑 B 组 (注射大脑提取液非运动组)	5	84 $\pm$ 3 ^②	97 $\pm$ 3	86.6
生理盐水 A 组 (注射生理盐水加运动组)	5	90 $\pm$ 9 ^③	107 $\pm$ 9	84.11
生理盐水 B 组 (注射生理盐水非运动组)	5	96 $\pm$ 9 ^④	102 $\pm$ 9	83.1

①大脑 A 组与大脑 B 组比较 $P<0.05$;②生理盐水 A 组与生理盐水 B 组比较 $P<0.05$;③大脑 A 组与生理盐水 A 组比较 $P<0.05$;④大脑 B 组与生理盐水 B 组比较 $P<0.05$ 。

3 讨论

本研究发现,注射了大脑提取液的小白鼠比注射生理盐水的小白鼠对于坐骨神经损伤的修复效果更明显。参加跑台训练的恢复更明显。

在小白鼠坐骨神经损伤后, 由于轴突不能自发再生,在临床上引起毁灭性的后果。周围神经损伤对神经元胞体的影响是复杂的。当神经轴突被切断或碾压损伤后, 发生 Wallerian 变性,表现为神经元胞体肿胀,核偏位和尼氏体溶解。由于神经元属终期分化细胞,本身不具备分裂增殖能力,周围神经损伤后神经元逆行性改变和死亡必然会影响神经损伤后的功能恢复。因此进一步研究周围神经损伤后神经元

胞体的变化,并加强对神经元胞体的保护,减小和避免神经元的退变和死亡, 对促进损伤神经的功能恢复有重要的意义。

在神经损伤的早期给予神经营养物质,它们可作用于细胞表面的相应受体,然后分别通过相应的信号传导通路来调控某些基因的表达,对神经元存活和轴突生长起重要作用。

神经营养因子在体内不是起单纯的神经营养作用,它具有多功能性。由于它们对靶细胞的选择性,在神经系统损伤后再生瀑布式事件中很可能仅仅作用于某一环节。加上多种神经营养因子的作用必然相互影响,而遗憾的是对各种因子的整合机制目前仍是未知。因此,神经营养因子在体内的作用机制还需深入研究,利用基因转移治疗脊髓损伤也存在基因转移效率有待提高、移植细胞的长期生存和有效表达尚待解决等问题。随着分子生物学技术的迅速发展,神经营养因子及受体研究的进一步深入,我们有理由期盼神经营养因子治疗神经损伤的美好前景。

参考文献

- [1] 张烽,顾玉东,徐建光,等.外源性表皮生长因子对大鼠坐骨神经损伤后神经保护的实验研究[J].上海医学,2000,23(7):411—413.
- [2] 朱辛为,刘伟明,李质馨,等.胎脑提取液中锌铜铁的含量[J].第四军医大学学报,2002,23(15):1436.
- [3] 韩曙,关华忠,应荣,等.人胚胎脑提取液的运动神经营养活性研究[J].中国解剖学杂志,1999,8(2):96—98.
- [4] 王常利,苏剑斌,郭玲玲,等.GDNF 及 HSV-GDNF 对坐骨神经损伤大鼠脊髓运动神经元 Bcl-2 表达的影响[J].解剖学报,2001,32(2):132—135.
- [5] 龙在云,伍亚民,陈恒胜,等.神经生长因子对损伤坐骨神经的修复作用[J].第三军医大学学报,2000,22(4):366—368.
- [6] 刘湘梅.神经生长的生物学与病理学 [M]. 北京:科学出版社,1985,36—37.
- [7] 马金忠,罗永湘,吴晓明,等.神经生长因子对运动终板变性与再生的研究[J].中华显微外科杂志,1998,21(2):118—120.
- [8] 张彩玲,王新成,孟文.胎脑中神经生长因子(NGF)的提取及生物活性鉴定的研究[J].泰山医学院学报,1994,15(1):43—47.
- [9] 许绍芬.神经生物学[M]. 第 2 版.上海:上海医科大学出版社,1999. 106—110.
- [10] 张卫国,吕德成,傅重洋,等.壳聚糖复合他克莫司释管促进大鼠坐骨神经再生的实验研究[J].中华医学杂志,2006,86(15):1065—1068.