

超短波对大鼠周围神经缺损修复术后神经再生的影响*

张立新¹ 佟晓杰² 贾桦² 李振华²

摘要 目的:通过检测小剂量超短波对脱细胞同种异体神经移植修复大鼠坐骨神经缺损后再生神经传导速度、患侧胫前肌湿重比率、患侧 L4 脊髓内脑源性神经营养因子(BDNF)和降钙素基因相关肽(CGRP)的表达,来观察小剂量超短波对周围神经缺损修复术后神经再生的影响。**方法:**将 36 只 Wistar 大鼠随机分成 3 组:正常组(n=4),对照组(n=16)及实验组(n=16),对照组采用脱细胞同种异体神经移植修复大鼠坐骨神经 1cm 缺损,实验组于术后第 2 天开始给予小剂量超短波治疗,7min/天,1 次/天,直至取材,后两组分别于术后第 2、4、8、12 周时检测患侧 L4 脊髓内 BDNF 及 CGRP 蛋白表达,术后第 12 周时行患侧胫前肌湿重比率及再生神经电生理检测。**结果:**①对照组术后第 2 周时患侧 L4 脊髓内 BDNF 表达已开始增高,第 4 周时达高峰,第 8 周后逐渐降低,第 12 周时仍显著高于正常对照组,与对照组相比,实验组只有在第 8 周时 BDNF 蛋白表达明显高于对照组($P<0.05$),其余各时间点差异无显著性意义。②对照组患侧 L4 脊髓内 CGRP 蛋白表达与 BDNF 表达趋势基本一致,实验组在术后各时间点脊髓内 CGRP 蛋白表达均明显高于对照组($P<0.05$)。③与对照组相比,术后第 12 周时实验组再生神经传导速度加快,波幅升高,潜伏时缩短,胫前肌湿重比率明显增加($P<0.05$)。**结论:**小剂量超短波可以促进大鼠周围神经缺损修复术后神经髓鞘及轴索的再生,此作用可能与小剂量超短波上调患侧脊髓内 CGRP 蛋白的表达,延长 BDNF 表达的高峰持续时间有关。

关键词 超短波;周围神经再生;脑源性神经营养因子;降钙素基因相关肽

中图分类号:R493,R741 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-08-0695-04

Effects of ultrashortwave on peripheral nerve regeneration after nerve gap repairing surgery/ZHANG Lixin, TONG Xiaojie, JIA Hua, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(8):695—698

Abstract Objective: To observe the effects of low dose ultrashortwave on peripheral nerve regeneration by means of detecting regeneration nerve conduction velocity, tibialis anterior muscle wet weight ratio, expressions of brain derived neurotrophic factor(BDNF) and calcitonin gene-related peptide(CGRP) of L4 spinal cord after acellular nerve allografts (ANA) repairing the sciatic nerve gap in rats. **Method:** Thirty-six Wistar rats were divided into three groups randomly, normal group (n=4), control group (n=16), experiment group (n=16). ANAs were put on 10 mm gap of sciatic nerve in rats of control group. 24 hours after operation, low dose ultrashortwave therapy was administrated to the rats in experiment group. 7min, once a day, until the end of experiment. Expressions of BDNF and CGRP in spinal cord of the rest two groups, 2nd w, 4th w, 8th w, 12th w after operation were detected and analyzed statistically. Regenerative nerve conduction velocity, tibialis anterior muscle wet weight ratio of injured side were also detected 12 weeks after the operation. **Result:** ①The expression of BDNF of spinal cord at injured site in control group increased at the 2nd week and was up to the highest at the 4th week, decreased at 8th w, but higher than normal group at the 12th week. The expression of BDNF of spinal cord in experiment group at the 8th week was higher than that in control group ($P<0.05$). But the difference at other time was not obvious. ②The expression tendency of CGRP correlated with BDNF. The expression of CGRP of spinal cord at injured side in experiment group was higher than that in control group at different time. ($P<0.05$). ③Compared with control group, regenerative nerve conduction velocity in experiment group accelerated, wave amplitude advanced, latency time shortened and tibialis anterior muscle wet weight ratio increased. ($P<0.05$). **Conclusion:** Low dose ultrashortwave can promote nerve myelin and axon regeneration.

Author's address Nanjing North Street, Heping District, Shenyang, 110001

Key words ultrashortwave; peripheral nerve regeneration; brain derived neurotrophic factor; calcitonin gene-related peptide

周围神经损伤较为常见,由于其修复和再生机制非常复杂,受许多因素的影响,神经长距离缺损修复术后可连接神经断端,促进神经再生,但再生速度及功能恢复均缓慢,并造成支配靶器官萎缩及功能

* 基金项目:辽宁省教育厅高校科研基金资助项目(05L449)

1 中国医科大学附属第一医院康复医学科,110001

2 中国医科大学基础医学院人体解剖学教研室

作者简介:张立新,女,主治医师,博士

收稿日期:2008-09-03

障碍,因此成为临床治疗难点之一^[1]。以往的研究表明,小剂量超短波治疗可扩张血管,改善神经和周围组织的血液循环及组织营养,加强局部组织代谢和神经系统功能,达到消炎、消除水肿的目的,因此可用于周围神经损伤早期治疗^[2],但其具体作用机制尚不十分清楚。脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)作为一种重要的神经营养因子,具有神经保护功能,并在突触的形成、神经突起形态的维持等方面起着重要的作用。降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是一种由37个氨基酸组成的活性多肽,在中枢和周围神经系统内分布广泛,其表达变化与神经损伤后的再生过程关系密切^[3-4]。因此, BDNF和CGRP蛋白的表达可以成为标志神经再生的指标。本文采用电生理测定、胫前肌湿重比率及免疫组织化学等方法检测脱细胞同种异体神经移植物(acellular nerve allografts, ANA)修复大鼠坐骨神经缺损后神经传导速度、胫前肌萎缩程度及患侧L4脊髓内BDNF和CGRP蛋白的表达,来进一步探讨小剂量超短波促周围神经再生的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及手术方法

采用低渗-除垢剂法制备ANA^[5]。健康Wistar大鼠36只(中国医科大学实验动物部提供),体重180—220g,雌雄不拘。编号随机分为正常组(n=4)、对照组(n=16)和实验组(n=16),术前8h禁食水,10%水合氯醛(350mg/kg体重)腹腔注射麻醉,大鼠右侧股后部正中切口,暴露并小心分离坐骨神经,自梨状肌下缘5mm处切除坐骨神经8mm,任其两端自然回缩后,造成神经缺损达10mm,用长10mm ANA桥接于神经两断端间的缺损处,在10倍手术显微镜下用9—0无损伤缝合线端端缝合神经外膜3针,然后用4万U庆大霉素冲洗创面后缝合肌肉及皮肤。正常组仅暴露右侧坐骨神经后缝合肌肉和皮肤。术后各组分笼喂养,每笼4只。

1.2 术后处理

术后24h,实验组采用上海电子仪器厂生产的五官超短波治疗机处理,频率为40.68MHz,最大输出功率为40W,调谐后第3档输出功率约为14.24W。输出功率测定采用光度学测定法。将大鼠固定于特制有机玻璃盒内,直径4cm圆形电极对置于下肢坐骨神经部位。使大鼠臀部及双后肢均在电场中。电极与鼠皮肤间隙为2.0cm,7min,1次/天,直至取材。正常组及对照组不给予上述处理。

1.3 观测指标及检测方法

1.3.1 电生理检测:采用上海海神NDI-200P+型神经电图仪,刺激强度为1—20mA,一般以波形达最大振幅,且不引起周围无关肌肉收缩为宜,刺激时间0.1—0.2ms,刺激频率1Hz。记录方法:术后第12周,将大鼠用10%水合氯醛麻醉后,暴露其右后肢坐骨神经,切断梨状肌,充分暴露坐骨神经中枢端,并向下暴露至腓神经入肌点处。将钩形银针电极分别置于移植物近端及远端,近端刺激,远端记录,两电极间距离测定采用精度为0.2mm的游标卡尺直接测量,测定并记录神经传导速度、波幅及潜伏时。

1.3.2 胫前肌湿重比率测定:电生理检测后,立即取出健(左)侧及患(右)侧胫前肌,于精确度为万分之一的电子天平上称出胫前肌湿重,然后计算出胫前肌湿重比率。

胫前肌湿重比率=(患侧胫前肌湿重/健侧胫前肌湿重)×100%。

1.3.3 L4脊髓内BDNF及CGRP蛋白:采用免疫组织化学染色法检测脊髓内BDNF及CGRP蛋白表达。大鼠麻醉后快速开胸暴露心脏,经左心室插管,用肝素生理盐水快速冲出血液至清澈,再用含4%多聚甲醛的0.1mol/L PB先快速灌注至大鼠四肢抽搐后再缓慢灌注至肝脏组织发硬,然后取出患侧坐骨神经相应的脊髓L4(找出坐骨神经根后,向上追踪),常规固定,脱水,石蜡包埋,用切片机连续切片,片厚5μm,70℃烤片过夜。试剂盒及一抗均购自武汉博士德公司。具体步骤如下:切片常规脱蜡至水,蒸馏水洗3min,3次;入3%H₂O₂处理10min阻断内源性过氧化物酶,0.01mol/LPBS振动漂洗5min,3次;然后入0.01mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH6.0),微波炉加热至沸腾后断电,间隔5—10min,反复1—2次,冷却后PBS洗2次;滴加5%BSA封闭液,室温20min,甩去多余液体,不洗;滴加1:100兔抗BDNF或兔抗CGRP 4℃冰箱孵育过夜, PBS洗2min,3次;生物素化羊抗兔IgG(1:200)室温孵育20min, PBS洗2min,3次;滴加SABC,室温孵育20min, PBS洗5min,4次;DAB显色液显色5—15min,以PBS终止反应。苏木素轻度复染,自来水返蓝15min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,以中性树胶封片。阴性对照用正常羊血清代替一抗,其余的步骤与上述相同,结果为阴性。每只动物随机选5张切片,脊髓前角每张切片选2个高倍视野(×400),用MetaMorph/DP10/BX41图像分析系统分析脊髓前角的免疫反应阳性运动神经元个数。

1.4 统计学分析

数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 SPSS11.0 软件处理。两组间均数比较方差齐时以 Student *t* 检验, 方差不齐时以近似 *t* 检验。检验水准取 $\alpha=0.05$, 当 $P<0.05$ 时认为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 各组大鼠脊髓内的 BDNF 及 CGRP 蛋白表达

见表 1。正常成年大鼠腰段脊髓中前角运动神经元即有 BDNF 蛋白表达, 又有 CGRP 蛋白表达, 阳性物质主要集中在胞浆, 胞核为阴性。对照组术后 2 周时 L4 脊髓内 BDNF 及 CGRP 表达均明显增高, 第 4 周时达高峰, 第 8 周后逐渐降低, 表达趋势基本一致。经超短波治疗后, 实验组脊髓内 BDNF 表达高峰延长至第 8 周, 与对照组相比, 差异具有显著性 ($P<0.05$), 其余各时间点与对照组相比无明显差异 ($P>0.05$)。而实验组患侧脊髓内 CGRP 表达在术后第 2 周, 第 4 周, 第 8 周, 第 12 周时均明显高于对照组, 差异具有显著性 ($P<0.05$)。结果显示, 小剂量超短波治疗可明显上调脊髓内 CGRP 的表达, 而对于 BDNF 表达则可延长其高峰维持的时间。

2.2 电生理学检测及胫前肌湿重比率

见表 2。电生理学检测结果显示, 术后第 12 周时, 实验组神经传导速度明显快于对照组 ($P<0.05$), 潜伏时缩短, 波幅增高, 但还未达到正常; 在胫前肌萎缩程度上, 实验组轻于对照组 ($P<0.05$), 但仍远不及正常组。由此可见肌肉萎缩程度的恢复慢于神经传导速度的恢复。

表 1 各组大鼠患侧坐骨神经相应脊髓内 BDNF 及

指标组别时间	CGRP 蛋白表达 (n=16, $\bar{x}\pm s$)			
	BDNF		CGRP	
	实验组	对照组	实验组	对照组
第 2 周	10.25 $\pm$ 2.06 ^①	10.67 $\pm$ 0.21	5.50 $\pm$ 0.61 ^②	3.50 $\pm$ 0.71
第 4 周	12.67 $\pm$ 2.52 ^①	13.67 $\pm$ 3.21	10.57 $\pm$ 1.51 ^②	6.67 $\pm$ 0.58
第 8 周	13.50 $\pm$ 0.74 ^②	8.33 $\pm$ 1.53	8.00 $\pm$ 0.35 ^②	6.50 $\pm$ 0.71
第 12 周	7.83 $\pm$ 1.83 ^①	7.67 $\pm$ 1.53	7.33 $\pm$ 0.50 ^②	4.33 $\pm$ 0.52

与对照组比较: ① $P>0.05$, ② $P<0.05$

表 2 各组术后第 12 周神经传导速度及

组别	鼠数	胫前肌湿重比率情况 ($\bar{x}\pm s$)			
		神经传导速度(m/s)	潜伏时(ms)	波幅(mV)	胫前肌湿重比率(%)
正常组	4	14.24 $\pm$ 1.16	1.04 $\pm$ 0.04	7.50 $\pm$ 0.61	100
对照组	16	8.19 $\pm$ 0.89	1.85 $\pm$ 0.02	3.11 $\pm$ 0.21	37.57 $\pm$ 3.97
实验组	16	10.45 $\pm$ 0.76 ^①	1.38 $\pm$ 0.04 ^①	6.12 $\pm$ 0.48 ^①	45.88 $\pm$ 2.97 ^①

①与对照组相比, $P<0.05$

3 讨论

周围神经急性损伤, 尤其是周围神经长距离缺损的治疗一直是临床工作中的难题^[1]。寻求非生物材料移植日渐受到重视^[6]。以往的研究表明, 用低渗脱细胞的组织工程学方法^[4], 制备脱细胞同种异体神

经移植, 脱去周围神经的细胞成分, 降低了免疫原性, 保存了含有促神经生长的神经营养因子、神经黏附因子等神经外基质成分^[5]。该移植修复大鼠坐骨神经缺损, 可以促进神经再生, 具有良好的组织相容性, 适用于周围神经移植手术。

BDNF 是神经营养因子家族中重要成员, 它与神经生长因子有 50% 同源性, 对中枢和周围神经系统均有广泛作用。具有促神经损伤后轴突再生和功能恢复的作用^[8-9], 在突触的形成、神经突起形态的维持等方面起着重要的作用, 脊髓前角运动神经元主管运动功能。因此, 脊髓前角内 BDNF 蛋白及基因的表达可以成为标志神经再生的一个指标。本研究显示, BDNF 在正常成年大鼠的脊髓及肌肉内均有表达, 对维持神经元的生理功能具有重要作用^[10], 与以往的研究一致^[11-13]。而且在神经移植术后有高表达, 说明内源性 BDNF 在神经受损后发挥着重要的促神经再生作用^[14], 而且内源性 BDNF 对周围神经的再生和髓化也起着重要作用^[15]。

本研究中, 对照组术后第 2 周时 L4 脊髓内 BDNF 表达已增高, 第 4 周时达高峰, 第 8 周后逐渐降低, 第 12 周时仍明显高于正常对照组, 显示内源性 BDNF 在神经受损后发挥重要作用。经超短波治疗后, 实验组脊髓内 BDNF 表达只在第 8 周时明显高于对照组, 差异具有显著性 ($P<0.05$), 其余各时间点与对照组相比无明显差异 ($P>0.05$), 表明超短波治疗主要延长脊髓内 BDNF 表达的高峰维持时间。

CGRP 是一种神经肽类物质, 在神经系统内有广泛分布, 神经损伤后可刺激相关部位的 CGRP 表达上调, 并且 CGRP 的持续表达与神经再生过程密切相关^[2]。研究表明 CGRP 的释放和含量增加可能与下列功能相关: 调节神经血流^[16]; 增加 cAMP 合成以提高神经元的兴奋性^[17]; 触发神经元与胶质细胞联系和促进立早基因的表达^[18-19]; 提高神经突生长率和增强轴浆运输能力等^[20]。外周轴突损伤后 CGRP 在运动神经元中的持续和增强表达可以促进神经元的成功生存^[4], 因而对神经损伤后再生过程非常重要。本研究显示, 实验组患侧脊髓内 CGRP 表达在术后第 2、4、8、12 周时均明显高于对照组, 差异具有显著性 ($P<0.05$)。结果表明, 小剂量超短波治疗在各个时间段均可明显上调脊髓内 CGRP 的表达, 作用随着治疗次数的增加而延长, 促神经再生的作用持久。

张志强等^[21-22]在研究超短波对周围神经损伤后影响时发现, 经过超短波治疗可使神经挫压伤造成的 Seddon II 度(不完全性)损伤后运动恢复、神经传

导速度加快,还可促进脊髓降钙基因相关肽的表达^[23]。本研究采用张志强等^[19]报道的超短波治疗剂量进行实验研究,发现此剂量的超短波治疗可使脱细胞同种异体神经移植修复大鼠坐骨神经缺损后患侧胫前肌湿重增加,坐骨神经传导速度加快、波幅增高、潜伏时缩短,说明超短波治疗对 Seddon III 度神经损伤同样有效。并且在整个治疗过程中未发现有任何副作用。同时研究发现在神经再生的过程中,肌肉萎缩程度的恢复远远慢于神经传导速度的恢复,因此在治疗期间宜采用其他方法以减缓肌肉萎缩^[24]。

总之,小剂量超短波可加速脱细胞同种异体神经移植修复大鼠坐骨神经缺损后神经髓鞘及轴索的再生,减缓肌肉萎缩,增加脊髓内的 CGRP 蛋白表达,延长 BDNF 蛋白高峰维持时间,为临床应用提供了理论基础。

参考文献

- [1] 田德虎.周围神经急性损伤与康复[J].中国康复医学杂志,2008,(11):965—966.
- [2] 田德虎,米立新,赵峰.周围神经损伤的物理治疗[J].中国康复医学杂志,2004,19(3):239—240.
- [3] Snyder SK, Byrnes KR, Borke RC, et al. Quantitation of calcitonin gene-related peptide mRNA and neuronal cell death in facial motoneurons following axotomy and 633 nm low power laser treatment [J]. Lasers Surg Med, 2002, 31(3):216—222.
- [4] Chang HM, Wei IH, Tseng CY, et al. Differential expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and choline acetyltransferase (ChAT) in the axotomized motoneurons of normoxic and hypoxic rats [J]. J Chem Neuroanat, 2004, 28(4):239—251.
- [5] 刘承吉,孙景致,佟晓杰,等.组织工程化天然神经支架的制备[J].解剖科学进展,2003,9(3):197—200.
- [6] 李政,王伟.NGF/PLGA 复合神经导管修复大鼠周围神经缺损的实验研究[J].中国康复医学杂志,2007,(3):234.
- [7] 孙慧哲,佟晓杰,曹德寿,等.脱细胞同种异体神经移植物的制备及成分分析[J].解剖科学进展,2004,10(2):106—108,111.
- [8] Marcol W, Kotulska K, Larysz-Brysz M, et al. Extracts obtained from predegenerated nerves improve functional recovery after sciatic nerve transection [J]. Microsurgery, 2005, 25(6):486—494.
- [9] Eberhardt KA, Irintchev A, Al-Majed AA, et al. BDNF/TrkB signaling regulates HNK-1 carbohydrate expression in regenerating motor nerves and promotes functional recovery after peripheral nerve repair [J]. Exp Neurol, 2006, 198(2):500—510.
- [10] Yuan Q, Wu W, So KF, et al. Effects of neurotrophic factors on motoneuron survival following axonal injury in newborn rats [J]. Neuroreport, 2000, 11 (10) :2237—2241.
- [11] 柏顺明,冯忠堂,李明,等.脊髓挤压伤后 BDNF mRNA 表达的 RT-PCR 研究[J].昆明医学院学报,2002,23(3):14—17.
- [12] 韩艳秋,饶明俐,贾治. BDNF 和 NT23 在糖尿病周围神经病大鼠肌肉中的表达周围神经病发病中的作用[J].中风与神经疾病杂志,2006,23(1):65—67.
- [13] 刘杨,刘季,王亚方,等.大鼠脊髓挫伤后 BDNF 表达的实验性研究[J].中国法医学杂志,2007,22(1):15—18.
- [14] 丁辉,何平.脑源性神经营养因子研究进展及在儿科的应用[J].国外医学·妇幼保健分册,2005,16 (1):13—15.
- [15] 张建一,李芳,刘忠浩. BDNF 对小鼠周围神经损伤后髓化与再生作用的实验研究 [J]. 中国现代医学杂志,2003,13(14):26—28.
- [16] Hotta H, Sato A, Sato Y, et al. Stimulation of saphenous afferent nerve produces asodilatation of the vasa nervorum via an axon reflex-like mechanism in the sciatic nerve of anesthetized rats [J]. Neurosci Res, 1996, 24(3):305—308.
- [17] Ebersberger A, Charbel IP, Vanegas H, et al. Differential effects of calcitonin gene-related peptide and calcitonin gene-related peptide 8-37 upon responses to N-methyl-D-aspartate or (R,S)-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate in spinal nociceptive neurons with knee joint input in the rat [J]. Neuroscience, 2000, 99(1):171—178.
- [18] Morara S, Wimalawansa SJ, Rosina A. Monoclonal antibodies reveal expression of the CGRP receptor in Purkinje cells, interneurons and astrocytes of rat cerebellar cortex [J]. Neuroreport, 1998, 9(16): 3755—3759.
- [19] Priller J, Haas CA, Reddington M, et al. Calcitonin gene-related peptide and ATP induce immediate early gene expression in cultured rat microglial cells [J]. Glia, 1995, 15(4): 447—457.
- [20] Hiruma H, Saito A, Ichikawa T, et al. Effects of substance P and calcitonin gene-related peptide on axonal transport in isolated and cultured adult mouse dorsal root ganglion neurons [J]. Brain Res, 2000, 883(2):184—191.
- [21] 张志强,刘景祥,任世祯,等.超短波对大鼠坐骨神经损伤后运动神经传导速度的影响[J].中华理疗杂志,1991,14(3):137—139.
- [22] 张春莲,胡淑英,刘挺.两种电疗治疗周围神经损伤临床及实验研究[J].实用医学杂志,1996,12(6):406—407.
- [23] 芮永军,张蕾,王骏,等.超短波对大鼠坐骨神经损伤后脊髓内 GAP-43 和 CGRP 表达的影响 [J]. 中华手外科杂志, 2006, 22 (6): 370—372.
- [24] 李高峰,田德虎,张英泽,等.周围神经卡压术后的康复治疗[J].中国康复医学杂志,2007,(2):178—179.