

·基础研究·

微波对坐骨神经损伤大鼠脊髓内生长相关蛋白-43表达的影响

张素娟¹ 吴 军^{1,2}

摘要

目的:观察微波对坐骨神经损伤大鼠脊髓内生长相关蛋白-43(GAP-43)表达的影响,探讨微波促进周围神经再生的作用机制。

方法:选取成年雄性SD大鼠64只,制成右侧坐骨神经钳夹损伤模型,随机分为微波治疗组和非治疗对照组,各32只,每组又分为3d、7d、14d、28d四个时间段各8只。治疗组于造模24h后取俯卧位,双腿伸直固定于实验台上,采用2450MHz微波辐射治疗,输出功率为6W,6min/次,5次/周,休息2d,直到取材的前一天。对照组于治疗组治疗同时予6min空白对照。于相应时间行大鼠一般状态观察,坐骨神经功能指数(SFI)测定及免疫组化染色观察GAP-43的表达。

结果:微波治疗组术后大鼠一般状态优于对照组,治疗组SFI指数在术后第14天即出现明显升高,对照组则在术后第21天才开始明显升高,并且术后第14、21、28天治疗组SFI指数明显高于对照组($P<0.01$),免疫组化染色示坐骨神经损伤后脊髓内GAP-43表达增强,在术后第3、7、14天治疗组GAP-43明显高于对照组($P<0.05$, $P<0.01$)。

结论:周围神经损伤后早期应用微波辐射治疗能增加GAP-43的表达,促进损伤神经再生及功能恢复。

关键词 微波;坐骨神经损伤;生长相关蛋白-43;坐骨神经功能指数

中图分类号:R745 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2011)-11-1004-05

Effect of microwave on growth associated protein-43 expression in spinal cord after sciatic nerve injury of rats/ZHANG Sujuan, WU Jun//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2011,26(11): 1004—1008

Abstract

Objective: To investigate the effect of microwave on expression of growth associated protein-43(GAP-43) in spinal cord after sciatic nerve injury of rats, and to explore the mechanism of microwave promoting regeneration of peripheral nerves.

Method: Sixty-four male adult SD rats were used to establish forceps crushed models on right sciatic nerve, and randomly divided into two groups: microwave treated groups ($n=32$) and operative control groups($n=32$). Each group was divided into 3d($n=8$), 7d($n=8$), 14d($n=8$) and 28d($n=8$) postoperation groups. Then the rats of microwave treated group were fixed on a table prostrated and the injured part were exposed to 2450MHz microwave at 6W for 6min each time, 5d each week from the 1st d after operation to 1d before to be sampled. The rats of control group were also fixed on a table prostrated at the same time, but without microwave exposure. The general state of rats were observed, the sciatic functional index(SFI) was analyzed and immunohistochemistry staining techniques were used for the detection of GAP-43.

Result: The general state in microwave treated group were better than that in control group. The SFI index in microwave treated group rose obviously on the 14th d postoperation, while in control group rose on the 21th d postoperation. The SFI indexes on the 14th、21th and 28th d postoperation in microwave treated group were significantly higher than those in control group ($P<0.01$). The immunohistochemical staining showed that GAP-43 pro-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.11.004

1 大连医科大学附属第二医院康复医学科,大连,116027; 2 通讯作者
作者简介:张素娟,女,在读硕士研究生; 收稿日期:2011-01-16

tein expression in spinal cord increased after sciatic nerve injury, and on the 3th, 7th and 14th d postoperation in microwave treated group GAP-43 increased significantly compared with those in control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$).

Conclusion: Microwave could enhance the expression of GAP-43 and promote the regeneration and function recovery of injured peripheral nerve after early microwave irradiation.

Author's address The Second Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian, 116027

Key word microwave; sciatic nerve lesions; growth-associated protein; sciatic functional index

临床上,周围神经损伤是一种常见的疾病,虽然可用显微外科技术治疗,但术后功能恢复仍不十分理想^[1]。现阶段如何促进神经再生,最大程度地减少继发损伤,恢复神经功能,已成为研究的重点。生长相关蛋白(growth-associated protein, GAP-43)是一种胞膜磷酸蛋白质,由损伤神经元合成,由胞体运送至轴突,最后浓缩于生长锥,是轴突生长锥膜的主要成分并占其总蛋白量的1%,与轴突生长密切相关^[2]。研究发现^[3],中枢或外周神经损伤后,受损神经元合成的GAP-43可迅速增加20—100倍,当神经再生完成时其含量逐渐恢复至正常水平。因此,GAP-43可作为研究神经再生的首选分子标志。目前,物理因子已被广泛地应用于促进神经再生的治疗,如高频电、超声、激光、电刺激、高压氧等。微波作为高频电疗法的范畴之一,具有较广泛的生物学效应和安全性^[4],但微波是否参与周围神经损伤后脊髓内GAP-43表达的调节,国内外研究报道甚少。鉴于此,本实验在建立大鼠坐骨神经钳夹损伤模型基础上,采用局部微波辐射治疗,行大鼠一般状态观察,坐骨神经功能指数(sciatic functional index, SFI)测定及免疫组化染色的方法观察微波对坐骨神经损伤大鼠脊髓内GAP-43表达的影响,探讨微波促进周围神经再生的作用机制,为临床早期应用微波改善周围神经损伤患者症状及预后提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

成年雄性SD大鼠64只(大连医科大学实验动物中心提供),体重220—280g,编号标记后随机分为微波治疗组和非治疗对照组各32只,每组又各分为术后3d、7d、14d、28d四个时间段各8只。

1.2 主要仪器与试剂

TJSM-92微波治疗仪(天津市赛盟医疗科技有

限公司);手术器械;咬骨钳(上海医疗器械有限公司);OLYMPUS B×S1多功能显微镜(日本奥林巴斯公司)等。DAB显色试剂盒(中杉金桥生物有限公司);通用S-P检测试剂盒(河北博海生物工程开发有限公司);GAP-43抗体(美国Bioworld公司)等。

1.3 模型制备

实验动物于术前8h禁食、禁饮,4%水合氯醛(30—40ml/kg)腹腔注射麻醉,俯卧位,四肢固定于鼠架上,常规备皮消毒后,于右侧股骨干中段后方纵行切开约1cm的皮肤切口,钝性剥离股二头肌和半腱肌、半膜肌之间的肌肉间隙,暴露坐骨神经。在梨状肌下缘1cm处用玻璃棒挑起坐骨神经,用同一把血管钳的同一部位钳夹,力度为1扣,10s×3次,每次间隔5s,损伤宽度为3mm。取下止血钳后肉眼下神经干被夹扁,呈半透明状,但未断裂,造成Sunderland II°损伤^[5]。常规分层缝合肌肉、皮肤。

1.4 微波治疗

微波治疗组于造模24h后取俯卧,双腿伸直固定于实验台上,采用国产TJSM-92微波治疗仪,输出频率2450MHz,波长12.24cm,直径7cm的圆柱形辐射器距右大腿后部正中中部3cm辐射治疗,输出功率为6W(相当于辐射部位的功率密度为156mW/cm),6min/次,5次/周,休息2d,直到取材的前一天。对照组与治疗组治疗同时逐一在微波仪旁固定于实验台,进行6min空白对照。

1.5 采集标本和制备组织切片

到达实验存活期的大鼠,4%水合氯醛(30—40ml/kg)腹腔注射麻醉后,仰卧位固定,打开胸腔,暴露心脏。用穿刺针经左心室心尖插管至主动脉,止血钳固定,剪开右心耳。先以50—100ml生理盐水快速冲洗血液,待右心耳流出的液体变清亮时,再用新鲜配置的4%多聚甲醛磷酸缓冲液300—400ml先快后慢持续灌注固定30min。灌注完毕咬骨钳咬开椎管,完整暴露和游离与坐骨神经相连的L4—L6

脊髓节段,立即浸入4%多聚甲醛液中固定24h,脱水、透明及石蜡包埋,切片厚度约4 μ m。

1.6 坐骨神经功能指数测定

自制一长50cm、宽15cm的行走箱通道,将白纸裁成与行走箱等长、等宽后铺于箱底,通道近端放一鼠箱,长20cm、宽15cm、高15cm,单侧开门,通道远端放一鼠笼。分别于术后第7、14、21、28天将大鼠双后肢蘸碳素墨水,放于行走箱近端入口,大鼠在向远端爬行过程中每侧后肢各留下4—5个足印,选择印迹清晰的足印分别测量正常足(N)和伤侧足(E)的3个指标:①足印长度(PL):即从足尖到足跟的最大距离;②足趾宽度(TS):第1趾到第5趾的距离;③中间足趾宽度(IT):第2趾到第4趾的距离,结果精确到0.1mm。将上述数据代入Bain公式,测得坐骨神经指数SFI^[6]。

$$SFI = -38.3[(EPL - NPL) / NPL] + 109.5[(ETS - NTS) / NTS] + 13.3 [(EIT - NIT) / NIT] - 8.8$$

SFI=0为正常,SFI=-100为完全损伤。

1.7 免疫组织化学染色(S-P染色)

切片脱蜡至水,3% H₂O₂室温孵育12min,以消除内源性过氧化物酶的活性;微波抗原修复10min;10%山羊血清封闭,室温孵育15min,倾去血清;滴加1:200比例稀释的一抗(兔抗GAP-43抗体)4℃过夜;加二抗37℃孵育20min;加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素,室温孵育30min;DAB显色剂显色;自来水充分冲洗,苏木精复染,脱水,透明,中性树胶封固。以PBS置换一抗作为空白对照,用已知阳性切片作为阳性对照。

1.8 统计学分析

利用OLYMPUS显微镜、IPP 6.0图像处理软件进行图像采集和处理。免疫组织化学染色的每张切片在400倍镜下随机选取5个视野,通过IPP6.0图像处理软件系统处理,计算每张切片的GAP-43免疫阳性细胞数。使用SPSS 11.5统计软件包对实验结果进行t检验,以P<0.05为有显著性意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状态观察

术后受试大鼠均表现为活动较少、饮食少、大便硬结、尿少、拖膝行走,术后24h起大鼠睡眠食欲无

明显变化。所有大鼠手术切口愈合良好,无感染,对照组有5只大鼠出现小片的足跟或足趾溃疡,1只大鼠发生自残,治疗组无足趾溃疡发生,治疗组术后一般状态优于对照组。整个实验过程中无大鼠死亡。

2.2 坐骨神经功能指数

治疗组SFI指数在术后第14天即出现明显升高,对照组则在术后第21天才开始明显升高,并且术后第14、21、28天治疗组SFI指数明显高于对照组(P<0.01),术后第7天差异无显著性意义(表1)。

2.3 免疫组化结果

大鼠坐骨神经钳夹损伤后各组大鼠患侧腰髓横切片上可见GAP-43免疫阳性产物,以背角胶状质和腹角处最明显,白质染色淡,阳性产物的亚细胞定位主要分布于核内,胞浆及神经突起染色相对较浅。脊髓GAP-43阳性细胞表现为多角形、三角形及椭圆形,主要见于神经元、再生的雪旺细胞和神经胶质细胞等(见图1),且着色深。治疗组损伤后第3天GAP-43免疫反应增强,第14天阳性细胞数达到高峰(42.75 \pm 1.69),第21天时稍减弱(36.50 \pm 1.29),但仍高于对照组,第28天时阳性细胞明显减少,免疫反应着色变浅。对照组在损伤后第21天GAP-43阳性神经元数量达高峰(32.25 \pm 2.21),第28天时表达减弱。治疗组脊髓内GAP-43免疫阳性细胞数在术后第3、7、14天明显高于对照组(P<0.05, P<0.01),差异有显著性意义(表2)。

表1 两组坐骨神经损伤大鼠不同时间段SFI值 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	损伤时间			
		术后第7天	术后第14天	术后第21天	术后第28天
治疗组	32	-74.41 \pm 0.48 ^②	-49.47 \pm 2.30 ^①	-38.06 \pm 3.37 ^①	-23.55 \pm 2.01 ^①
对照组	32	-75.45 \pm 2.46	-62.04 \pm 1.75	-51.51 \pm 2.98	-41.24 \pm 2.31
P	-	0.435	0.000	0.001	0.000

与对照组比较:①P<0.01;②P>0.05

表2 两组坐骨神经损伤大鼠不同时间段脊髓中GAP-43阳性细胞数 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	损伤时间			
		术后第7天	术后第14天	术后第21天	术后第28天
治疗组	32	34.75 \pm 2.50 ^②	42.75 \pm 1.69 ^②	36.50 \pm 1.29 ^①	14.50 \pm 1.29 ^③
对照组	32	18.25 \pm 1.71	29.01 \pm 1.83	32.25 \pm 2.21	17.49 \pm 2.58
P	-	0.000	0.000	0.016	0.339

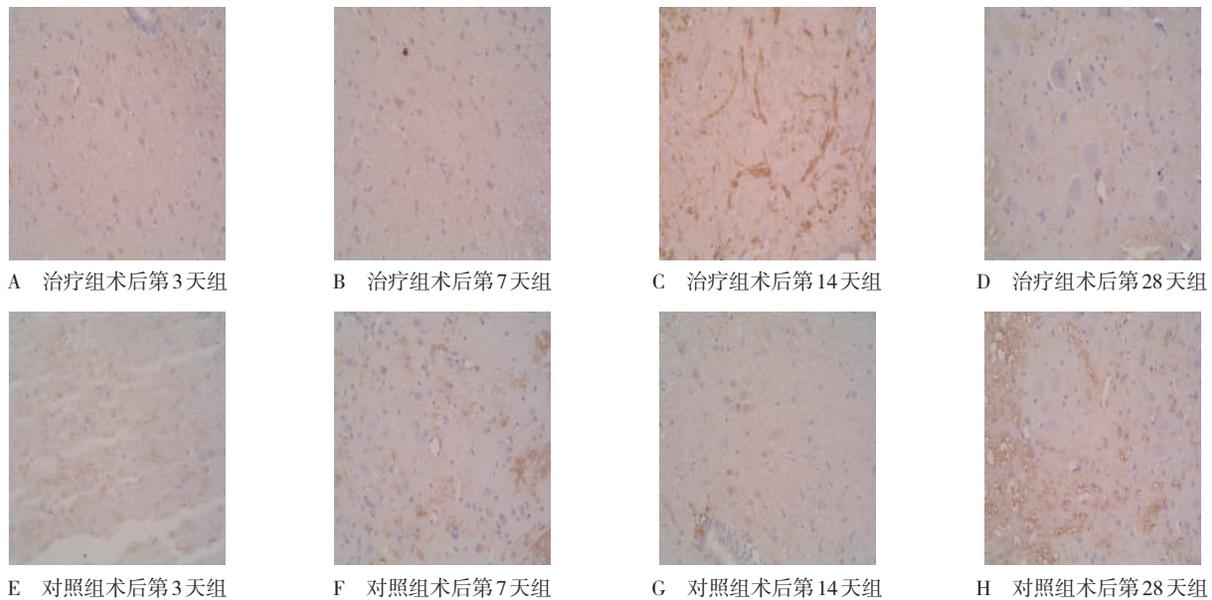
与对照组比较:①P<0.05;②P<0.01;③P>0.05

3 讨论

研究表明^[7],周围神经损伤后不仅该神经元及

图1 两组大鼠术后不同时间点脊髓内 GAP-43 免疫组织化学染色观察

(×400)



其突起发生相应的反应,中枢的神经元胞体也发生一系列的生物学变化。神经损伤的远侧端发生轴突变性和脱髓鞘,称为 Waller 变性,构成髓鞘结构的雪旺细胞(Schwann cells, SCs)开始活跃增殖,其数目可增加至正常时的 10 倍以上,并形成互相连接的细胞带,即 Bungner 带,远端轴突开始以 1—4mm/d 的速度通过 Bungner 带逆行性生长^[8]。SCs 分泌多种促进神经再生的神经营养因子和细胞外基质,如神经生长因子、脑源性神经生长因子、睫状神经营养因子、生长相关蛋白等,构成周围神经再生的微环境^[9],Bolin 等^[10]证实哺乳动物神经再生取决于雪旺细胞的活性。Woolf 等^[11]描述了轴突变性后 3.5h 生长锥中即有 GAP-43 免疫反应,4h 到 8d 之间施万细胞亦表达 GAP-43。Mason 等^[12]发现轴突生长有赖于神经元表达生长相关因子(如 GAP-43),GAP-43 在生长、分化和再生的轴突末梢含量极高,最显著特征是可促进轴突生长锥向前延伸并且牢固附着于周围基质,防止轴突回缩,在神经系统发育、轴突再生及神经损伤修复中起着至关重要的作用,能诱导、刺激和调节轴突再生和髓鞘形成^[13]。秦登友等^[14]采用免疫组化技术观察了大鼠坐骨神经切断、卡压及再卡压损伤后不同阶段脊髓、神经节及坐骨神经中 GAP-43 表达的变化规律,结果发现,无论何种损伤方式致轴突完全离断其反应结果均相似,坐骨神经切断缝合和

卡压组,光镜下术后第 4 天腰骶髓运动神经元和背根节细胞均出现强阳性反应,腰骶髓横切片显示 GAP-43 表达伤后第 7 天组最为明显,第 14 天后渐减弱,30d 后模糊不清,神经切断缝合组和卡压伤组染色结果相同,均以伤后 14d 组染色最强,再卡压伤组与同期其他损伤组比较染色强。Curtis^[15]在压迫大鼠损伤脊髓后 2d,发现损伤周围细胞内 GAP-43 表达增加,4d 时轴突呈阳性反应,第 14 天阳性细胞最多,随后阳性细胞逐渐减少,最后呈阴性反应。本实验显示神经损伤后脊髓内 GAP-43 表达规律与上述研究一致,并且微波治疗组损伤后第 14 天脊髓内 GAP-43 阳性细胞数即达到高峰(42.75 ± 1.69),第 21 天时稍减弱(36.50 ± 1.29),在第 3、7、14 天时间点上治疗组阳性细胞数均明显高于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$),差异具有显著性意义。本文结果表明,周围神经损伤后微波作用明显,能增加 GAP-43 早期表达,并使其表达量较对照组长时间维持在更高的水平,促进神经功能恢复。目前认为再生过程中 GAP-43 作为蛋白激酶 C 抑制剂及改变 G 蛋白活性参与神经损伤修复活动,G 蛋白与其受体反应产生抑制信号致生长锥生长停止^[16],而微波治疗可能是促使 GAP-43 大量表达,使其与 G 蛋白竞争性结合以解除抑制信号允许生长锥继续引导轴突生长和延伸。另一方面 GAP-43 可与钙调素结合,依靠蛋白

激酶C的活动使钙调素从GAP-43释放,触发蛋白激酶C对GAP-43的磷酸化,磷酸化的GAP-43能抑制磷脂酰肌醇激酶的活性,钙调素和蛋白激酶C均参与了第二信使过程,与神经再生有关^[17]。本实验还观察到微波治疗组大鼠SFI指数在第14、21、28天也显著高于对照组($P<0.01$)。沈宁江等^[18]实验证明SFI指数与神经损伤恢复程度呈正相关,并认为SFI指数是观察和评价坐骨神经损伤修复程度的可靠指标之一,周围神经具有传导和营养功能,其功能发挥有赖于神经结构的完整性,因此,可以通过SFI指数间接判断神经损伤的修复程度,本文结果可以反映出微波对神经损伤的功能恢复具有明显促进作用。

由于周围神经再生过程涉及范围广,影响因素多及修复过程慢等特点^[19],现阶段如何促进神经再生,最大程度地减少继发损伤,恢复神经功能,已成为研究的重点。本实验采用频率2450MHz的微波,其振荡频率更高,除产生温热作用外,有较明显的非热效应。低功率微波辐射虽无组织温度的明确升高,组织内仍有离子、偶离子的高速移动,偶极子和胶体粒子的旋转,细胞膜上荷电离子浓度的改变,细胞膜通透性的改变、细胞结构改变等,已被证实具有广泛的生物学效应^[20]。修复组织损伤,加速组织再生;增加GAP-43早期表达,并使其表达量长时间维持在高水平,从而诱导、刺激和调节轴突再生和髓鞘形成,提高损伤神经再生和修复速度,促进神经功能恢复。本文结果不仅为临床早期应用微波促进周围神经再生提供一些理论基础,并有力地支持了GAP-43与神经修复、突触再生密切相关这一观点。周围神经再生过程复杂,小功率微波是如何加速神经再生,其机制还不是很明确,有待探讨。

参考文献

- [1] Pereira Lopes FR, Frattini F, Marques SA, et al. Transplantation of bone-marrow-derived cells into a nerve guide resulted in transdifferentiation into Schwann cells and effective regeneration of transected mouse sciatic nerve[J]. *Micron*, 2010, 41(7):783—790.
- [2] Zhao J, Yao Y, Xu C. Expression of the neural specific protein, GAP-43, dramatically lengthens the cell cycle in fibroblasts[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2009, 27(6):531—537.
- [3] Tolner EA, van Vliet EA, Holtmaat AJ, et al. GAP-43 mRNA and protein expression in the hippocampal and parahippocampal region during the course of epileptogenesis in rats[J]. *Eur J Neurosci*, 2003, 17(11):2369—2380.
- [4] Tian D, Luo J, Zhang Q, et al. Effects of decimeter wave and sodium hyaluronate product on postoperative adhesions in flexor tendon[J]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2008; 22(11):1318—1322.
- [5] Sunderland SA. classification of peripheral nerve injured producing loss of function[J]. *Brain*, 1951, 74:491.
- [6] Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat[J]. *Plast Reconstr Surg*, 1989, 83(1):129—138.
- [7] Gadsden J, Gratenstein K, Hadzic A. Intraneural injection and peripheral nerve injury[J]. *Int Anesthesiol Clin*, 2010, 48(4):107—115.
- [8] Gordon T, Chan KM, Sulaiman OA, et al. Accelerating axon growth to overcome limitations in functional recovery after peripheral nerve injury[J]. *Neurosurgery*, 2009, 65(4):A132—144.
- [9] 朱家恺, 罗永湘, 陈统一. 现代周围神经外科学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2007.461.
- [10] Bolin LM, Lismaa TP, Shooter EM, et al. Isolation of activated adult Schwann cells and a spontaneously immortal Schwann cell clone[J]. *Neurosci Res*, 1992; 33(2):231—238.
- [11] Woolf CJ, Reynolds ML, Molander C, et al. The growth-associated protein GAP-43 appears in dorsal root ganglion cells and in the dorsal horn of the rat spinal cord following peripheral nerve injury[J]. *Neuroscience*, 1990, 34(2):465—478.
- [12] Mason MR, Campbell G, Caroni P, et al. Overexpression of GAP-43 in thalamic projection neurons of transgenic mice does not enable them to regenerate axons through peripheral nerve grafts[J]. *Exp Neurol*, 2000; 165(1):143—152.
- [13] Chakravarthy B, Rashid A, Brown L, et al. Association of Gap-43 (neuromodulin) with microtubule-associated protein MAP-2 in neuronal cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 371(4):679—683.
- [14] 秦登友, 王国英, 刘大庸, 等. 大鼠坐骨神经损伤与再生中GAP-43表达的实验研究[J]. *神经解剖学杂志*, 1995, 11(3):221—224.
- [15] Curtis R, Green D, Lindsay RM, et al. Up-regulation of GAP-43 and growth of axons in rat spinal cord after compression injury[J]. *Neurocytol*, 1993, 22(1):51—64.
- [16] Verkade P, Verkleij AJ, Gispens WH, et al. Ultrastructural evidence for the lack of co-transport of B-50/GAP-43 and calmodulin in myelinated axons of the regenerating rat sciatic nerve[J]. *J Neurocytol*, 1996, 25(10):583—595.
- [17] Holahan MR, Honeqger KS, Tabatadze N, et al. GAP-43 gene expression regulates information storage[J]. *Learn Mem*, 2007, 14(6):407—415.
- [18] 沈宁江, 朱家恺. 坐骨神经功能指数在神经功能评价中的应用[J]. *中华显微外科杂志*, 1993, 16(4):284.
- [19] Jungnickel J, Haastert K, Grzybek M, et al. Mice lacking basic fibroblast growth factor showed faster sensory recovery[J]. *Exp Neurol*, 2010, 223(1):166—172.
- [20] Xu S, Ning W, Xu Z, et al. Chronic exposure to GSM 1800-MHz microwaves reduces excitatory synaptic activity in cultured hippocampal neurons[J]. *Neuroscience Letters*, 2006, 398(3):253—257.