doi:10.11659/jjssx.05E024089

·基础研究·

不同浓度辛伐他汀对大鼠坐骨神经损伤后再生作用的研究

李云虎[1],曹峻玮[1],李 晨[1],张靖雨[1],顿爱社[2],王洪宾[3] (1.山东第一医科大学口腔医学院2021级口腔医学本科专业,山东 济南 250117;2.山东第一医科大学口腔医学院口腔基础医学教研室,山东 济南 250117;3.山东第一医科大学临床与基础医学院人体解剖学教研室,山东 济南 250117)

[摘 要] **目的** 探究不同浓度辛伐他汀对坐骨神经损伤后神经再生的影响。**方法** 将大鼠随机分为正常组、对照组、低剂量组、高剂量组,每组3只。除正常组外,其他组均建立成年大鼠坐骨神经挤压损伤模型。正常组和对照组大鼠口饲清水,低剂量组和高剂量组大鼠分别口饲4 mg/mL、40 mg/mL的98%辛伐他汀。采用坐骨神经功能指数(SFI)、HE染色、劳克坚牢蓝(LFB)染色及免疫荧光染色等评估大鼠坐骨神经再生情况。**结果** 高剂量组大鼠术后7 d、14 d的SFI高于对照组($P<0.05$);低剂量组与对照组大鼠术后7 d、14 d的SFI比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。HE染色及LFB染色结果显示:与对照组相比,高剂量组大鼠神经元数量增多,神经纤维及髓鞘更为清晰和密集,神经功能明显恢复;而低剂量组大鼠的坐骨神经则未见明显改善。免疫荧光染色结果显示:与对照组相比,高剂量组免疫荧光强度增高,而低剂量组免疫荧光强度降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 高剂量辛伐他汀可通过调控M2型巨噬细胞的表达,促进周围神经再生。

[关键词] 辛伐他汀;坐骨神经;再生;大鼠
[中图分类号] R745.4 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-05-20

Study on the mechanism of different concentrations of simvastatin on regeneration of sciatic nerve injury in rats

LI Yun-hu[1], CAO Jun-wei[1], LI Chen[1], ZHANG Jing-yu[1], DUN Ai-she[2], WANG Hong-bin[3] (1. Grade 2021, Bachelor of Stomatology, College of Stomatology, Shandong First Medical University, Jinan Shandong 250117, China; 2. Department of Preclinical Stomatology, College of Stomatology, Shandong First Medical University, Jinan Shandong 250117, China; 3. Department of Human Anatomy, College of Clinical and Basic Medical Sciences, Shandong First Medical University, Jinan Shandong 250117, China)

Abstract: Objective To explore the effects of different concentrations of simvastatin on nerve regeneration after sciatic nerve injury. **Methods** Rats were randomly divided into the normal group, the control group, the low-dose group and the high-dose group, with 3 rats in each group. Except for the normal group, adult rat sciatic nerve crush injury models were established in the other groups. Rats in the normal group and the control group were orally administered with water, while those in the low-dose group and high-dose group were orally administered with 98% simvastatin at dosages of 4 mg/mL and 40 mg/mL, respectively. The sciatic nerve regeneration in rats was evaluated by sciatic function index (SFI), HE staining, luxol fast blue(LFB) staining and immunofluorescence staining, etc. **Results** The SFI of rats in the high-dose group 7 days and 14 days after surgery were higher than those in the control group ($P<0.05$); there was no significant difference in SFI of rats between the low-dose group and the control group 7 days and 14 days after surgery($P>0.05$). HE staining and LFB staining results showed that compared with the control group, the number of neurons of rats in the high-dose group increased, the nerve fibers and myelin were clearer and denser, and the nerve function was significantly restored; while no significant improvement was observed in the sciatic nerve of rats in the low-dose group. The immunofluorescence staining results showed that compared with the control group, the immunofluorescence intensity in the high-dose group increased, while that in the low-dose group decreased, the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** High-dose simvastatin can promote peripheral nerve regeneration by regulating the expression of M2 macrophages.

Keywords: simvastatin; sciatic nerve; regeneration; rat

辛伐他汀隶属他汀类药物,通过竞争性抑制甲羟戊酸途径的3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A(3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A,HMG-CoA)还原酶,可减少肝胆固醇的合成,临床上也一直将其作为降胆固醇的一线药物[1]。近年来,多项研究表明,辛伐他汀还具有心肌保护、促进血管生成、抗炎、抗氧化、免疫调控及神经保护等诸多作用[2-4]。还有研究显示,辛伐他汀可通过改善局灶性脑缺血-再灌注损伤,抑制诱导型一

[基金项目] 2022年本科生研究计划(SRTP)暨大学生创新创业训练计划项目(2022104391561);2023年泰安市科技创新发展项目(政策引导类)(2023NS245)

[通信作者] 顿爱社,E-mail:das1977@163.com;王洪宾,E-mail:wanghongbinsd1981@126.com

氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)活性,减少NO生成,从而发挥神经保护作用[5-6]。辛伐他汀联合阿司匹林可用于预防脑血栓形成及再发,在脑梗死治疗中具有改善神经功能的作用,但低剂量辛伐他汀治疗急性脑梗死效果不确切[7]。此外,辛伐他汀还可通过抑制白细胞内皮屏障迁移,在神经损伤中发挥抗炎作用[6,8]。另Xavier等[6]研究指出,辛伐他汀可能通过免疫调节加速坐骨神经功能以及形态恢复。但不同剂量辛伐他汀的作用可能有所不同[9-10]。目前有关辛伐他汀能否促进周围神经再生仍存争议,且辛伐他汀对周围神经再生的剂量-效应关系不明。基于此,本研究拟通过建立大鼠坐骨神经挤压损伤模型,探讨不同剂量辛伐他汀对周围神经再生的作用。

1 材料与方法

1.1 动物及主要仪器和试剂

健康成年SPF级SD大鼠12只,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司[动物生产许可证号:SCXK(鲁)20220006],体质量约250 g,于饲养房适应性喂养2周。主要试剂:98%辛伐他汀、生理盐水注射液、多聚甲醛灌注液、医用酒精、10%水合氯醛、HE染色试剂盒、劳克坚牢蓝(luxol fast blue,LFB)染色试剂盒、免疫荧光试剂盒等。主要仪器:光学显微镜、荧光显微镜。

1.2 方法

1.2.1 动物建模及分组 采用随机数字表法将大鼠分为正常组、对照组、低剂量组、高剂量组,每组3只。正常组和对照组大鼠口饲清水,低剂量组和高剂量组大鼠分别口饲4 mg/mL、40 mg/mL的98%辛伐他汀,持续每日给药至取材。术后21 d和28 d,取建模大鼠坐骨神经损伤处及正常组大鼠相应部位的坐骨神经制作切片。

除正常组外,其他组大鼠均进行坐骨神经损伤模型建立:于大鼠左侧股后取长6~8 mm的正中纵行切口。钝性分离并牵开股二头肌、半腱肌、半膜肌,仔细游离并显露粗大的坐骨神经。在坐骨结节下6~8 mm的位置,用止血钳夹闭坐骨神经主干,施加适当压力(止血钳满3扣)并持续5 s,松开止血钳30 s后再次夹闭,重复操作3次。完成第3次夹闭坐骨神经5 s的操作后进行测量,若发现坐骨神经夹闭损伤处宽度增加至3 mm,认为模型构建成功。9-0无创线标记损伤位置,4-0慕丝线缝合切口。

1.2.2 坐骨神经功能指数(sciatic function index,SFI)评估 于术后3、7、14、17、21、28 d对大鼠进行足迹分析,评估坐骨神经功能。具体方法:将大鼠后肢踝关节浸于颜料中进行着色,然后将大鼠放于步行槽的一侧,诱导其自主走到另一侧,每侧后肢会分别留下5~6个足印。选择术后7 d、14 d印迹清晰的足印测量正常足(N)和伤侧足(E)的足印长度(print length,PL)、足趾宽度(toe width,TS)、中间足趾宽度(inter-toe distance,IT),计算SFI。SFI=109.5(ETS-NTS)/NTS-38.3(EPL-NPL)/NPL+13.3(EIT-NIT)/NIT-8.8,其范围为-100~0,其中0代表正常,-100则为完全损伤。

1.2.3 HE染色观察神经恢复状况 将术后21 d和28 d制备的各组大鼠冰冻切片于室温恢复后,以乙醇-乙醚(1∶1)固定液固定10 min,苏木素染色2 min,分化液分化10 s,水洗1~2 min,反蓝液反蓝5 min,水洗1~2 min,伊红染色2 min,水洗1~2 min,脱水、透明、封片后显微镜下观察神经恢复状况。

1.2.4 LFB染色观察髓鞘 将术后21 d和28 d制备的各组大鼠冰冻切片室温恢复后4%多聚甲醛固定10 min,95%乙醇脱水,用LFB染色液染色,室温环境过夜,95%乙醇去除多余染色液,接着用蒸馏水冲洗,然后LFB分化液分化15 s后,70%乙醇分色至灰白质清晰,蒸馏水冲洗,伊红染色液复染0.5~2 min,水洗,脱水、透明、封片后显微镜下观察。

1.2.5 免疫荧光染色观察髓鞘 将术后28 d制备的各组大鼠冰冻切片于室温恢复,以5%多聚甲醛固定30 min,PBS冲洗3次,每次5 min;Triton X-100透化15 min,PBS再次冲洗3次,每次5 min;封闭液封闭60 min后弃封闭液,加CD206单克隆抗体,4 ℃孵育过夜;弃一抗,PBS洗3次,每次10 min;加入二抗室温孵育60 min;弃二抗,PBS冲洗3次,每次10 min;DAPI染色3 min后,PBS冲洗3次,每次10 min;封片后荧光显微镜下观察。

1.3 统计学处理

采用SPSS 26.0软件对数据进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较用t检验。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SFI结果

高剂量组大鼠术后7 d、14 d的SFI高于对照组,差异有统计学意义($t=-3.344$,$P=0.029$;$t=-4.703$,$P=0.009$);低剂量组大鼠术后7 d、14 d的SFI与对照组比较,差异均无统计学意义($t=2.355$,$P=0.078$;$t=1.932$,$P=0.126$),见表1。

表1　各组大鼠SFI比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	术后7 d	术后14 d
对照组	3	−20.31±1.41	−19.02±1.74
低剂量组	3	−23.66±2.02	−21.96±1.98
高剂量组	3	−16.71±1.22*	−13.09±1.32*

*:与对照组比较,P<0.05

2.2　HE染色

HE染色结果显示,术后21 d和28 d,与对照组相比,高剂量组大鼠的神经损伤修复效果明显,包括:①神经纤维的密度较高,排列更规则;②神经元数目增加;③中性粒细胞和淋巴细胞的数量较少。而低剂量组大鼠的坐骨神经则未见以上改善。与术后21 d相比,低、高剂量组大鼠术后28 d上述指标可见好转,见图1。

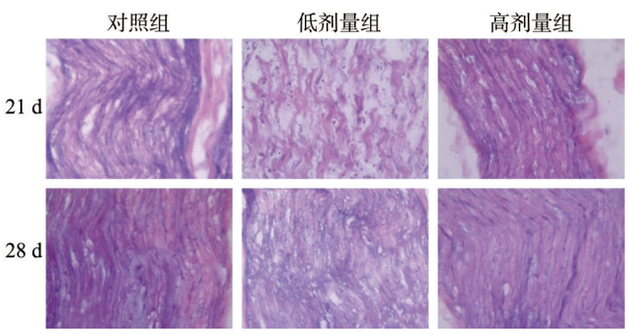


图1　大鼠坐骨神经损伤修复HE染色(×400)

2.3　LFB染色

术后21 d和28 d染色结果显示,对照组大鼠坐骨神经的髓鞘稀疏,郎飞结部分可见;与对照组相比,高剂量组及低剂量组大鼠坐骨神经的髓鞘排列更加密集,郎飞结可见,髓磷脂形状规则,边界清晰,神经损伤明显改善。此外,与术后21 d相比,术后28 d低、高剂量组大鼠的神经损伤进一步改善,见图2。

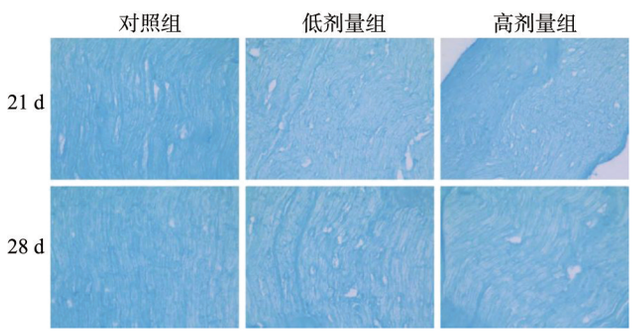
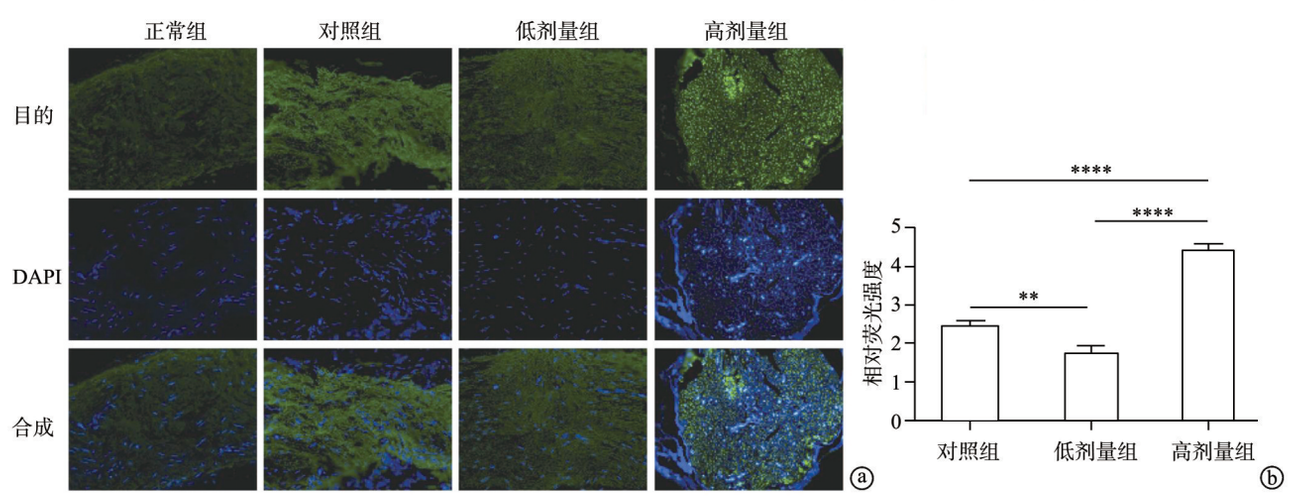


图2　大鼠坐骨神经损伤修复LFB染色(×400)

2.4　免疫荧光染色

免疫荧光染色结果显示,术后28 d,正常组大鼠无坐骨神经损伤,其相对荧光强度显著低于其余3组;高剂量组大鼠相对荧光强度高于对照组和低剂量组,差异有统计学意义(P<0.05),表明高剂量组M2型巨噬细胞表达水平显著升高。低剂量组相对荧光强度低于对照组,差异有统计学意义(P<0.05),表明低剂量组M2型巨噬细胞表达水平显著降低,见图3。



a:各组免疫荧光染色结果(×400);b:各组相对荧光强度　****:P<0.000 1;**:P<0.01

图3　大鼠坐骨神经免疫荧光染色及相对荧光强度

3　讨论

研究表明,辛伐他汀对脑神经功能缺损具有改善作用,但存在剂量依赖性,只有高剂量辛伐他汀才具有明显的改善效果[11-14]。本研究以大鼠坐骨神经损伤模型为基础,探讨了辛伐他汀对周围神经损伤后再生功能的影响及其对周围神经的作用是否具有浓度依赖性,结果显示,高剂量辛伐他汀可使神经损伤大鼠神经纤维排列规则、神经元数量增多;免疫荧光染色结果显示,高剂量辛伐他汀能够促进M2型巨噬细胞表达水平的增加。已有研究表明,M2型巨噬细胞高表

达,可能与髓鞘T细胞激活抑制、炎症因子[如白细胞介素(interleukin)-1β、IL-6和肿瘤坏死因子-α]的产生减少、巨噬细胞炎症反应和炎症信号通路相关蛋白TBK1、TLR4表达水平降低等有关[15-16]。除抗炎作用以外,辛伐他汀通过提高抗氧化酶超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性,逆转氧化应激所致损伤,促进神经修复,且其抗氧化作用具有剂量依赖性[8]。另一项研究表明,辛伐他汀通过抑制NF-κB信号通路而发挥抗抑郁作用也与药物剂量有关[17]。本研究设立低剂量组和高剂量组,用于检测药物的剂量-效应关系,免疫荧光染色结果显示,低剂量辛伐他汀给药后大鼠坐骨神经损伤局部神经纤维排列仍然比较稀疏、松散、混乱,M2型巨噬细胞表达水平与对照组相比显著降低;而高剂量组则表现出显著的改善效果。这说明辛伐他汀在周围神经损伤的治疗中具有正向的剂量-效应关系。低剂量辛伐他汀给药未达到理想治疗效果,可能与少突胶质细胞稳定性、持续损伤掩盖微弱修复效应、药物治疗量最大浓度阈值等因素有关。

综上所述,辛伐他汀可通过促进M2型巨噬细胞的表达减轻神经炎症,有利于坐骨神经损伤后的再生修复。且在一定药物浓度内,药物剂量与治疗效果存在正向对应关系。本研究也存在不足之处,如动物数量少、未进行其他给药方式,而给药剂量也仅仅选择了两种浓度等。未来将采用扩大样本量、使用更多的研究手段等方式进一步研究,阐明药物的作用机制。

[参考文献]

[1] Zahedipour F, Butler AE, Rizzo M, et al. Statins and angiogenesis in non-cardiovascular diseases[J]. Drug Discov Today, 2022, 27(10): 103320. doi:10.1016/j.drudis.2022.07.005.

[2] Koushki K, Shahbaz SK, Mashayekhi K, et al. Anti-inflammatory action of statins in cardiovascular disease: the role of inflammasome and toll-like receptor pathways[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2021, 60(2): 175-199. doi:10.1007/s12016-020-08791-9.

[3] 姜虹羽,庄秀娟,蔡思铭,等. 辛伐他汀抑制川畸病大鼠心肌损伤[J]. 中南医学科学杂志,2024,52(1):36-39. doi:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2024.01.008.

[4] 仝云梦. 辛伐他汀在免疫调控下对血管新生的作用研究[D]. 大连:大连医科大学,2023. doi:10.26994/d.cnki.gdlyu.2023.000908.

[5] Dai Q, Gao XH, Chu YZ, et al. Statins for neuroprotection in spontaneous intracerebral haemorrhage (STATIC): protocol for a multicentre, prospective and randomised controlled trial[J]. BMJ Open, 2024, 14(6): e079879. doi:10.1136/bmjopen-2023-079879.

[6] Xavier AM, Serafim KG, Higashi DT, et al. Simvastatin improves morphological and functional recovery of sciatic nerve injury in Wistar rats[J]. Injury, 2012, 43(3): 284-289. doi:10.1016/j.injury.2011.05.036.

[7] 李玉轩. 不同剂量辛伐他汀治疗急性脑梗死的临床疗效分析[J]. 中国医药指南,2012,10(25):143-144. doi:10.15912/j.cnki.gocm.2012.25.459.

[8] Faraj R, Paine D, Black SM, et al. Anti-inflammatory effects of statins in lung vascular pathology: from basic science to clinical trials[J]. Adv Exp Med Biol, 2021, 1303: 33-56. doi:10.1007/978-3-030-63046-1_3.

[9] Cai T, Abel L, Langford O, et al. Associations between statins and adverse events in primary prevention of cardiovascular disease: systematic review with pairwise, network, and dose-response meta-analyses[J]. BMJ, 2021, 374: n1537. doi:10.1136/bmj.n1537.

[10] 查 飞,杨明华. 不同剂量辛伐他汀治疗老年高血压合并高脂血症的临床疗效及安全性[J]. 延边大学学报,2024,47(5):556-558. doi:10.16068/j.1000-1824.2024.05.008.

[11] 张 欣. 辛伐他汀联合阿司匹林治疗脑血栓形成的疗效及对神经功能缺损的影响研究[J]. 中国现代药物应用,2020,14(2):102-104. doi:10.14164/j.cnki.cn11-5581/r.2020.02.049.

[12] Namazi H, Emami M, Nazhvani FD, et al. Simvastatin *vs*. L-Carnitine: an experimental study on optimizing nerve repair[J]. Turk Neurosurg, 2019, 29(5): 710-717. doi:10.5137/1019-5149.JTN.25821-19.2.

[13] 焦继峰,龙治华. 大剂量辛伐他汀联合阿替普酶对急性脑梗死患者神经功能的影响[J]. 西北药学杂志,2020,35(2):277-282. doi:10.3969/j.issn.1004-2407.2020.02.027.

[14] 李丽君,曹孟玲. 不同剂量辛伐他汀治疗脑梗死的效果比较[J]. 临床合理用药杂志,2020,13(28):41-43. doi:10.15887/j.cnki.13-1389/r.2020.28.017.

[15] 孙 涛,张 鹏,程葆华,等. 辛伐他汀对大鼠坐骨神经慢性压迫性损伤模型氧化应激和炎症的影响[J]. 解剖学研究,2019,41(3):173-176. doi:10.20021/j.cnki.1671-0770.2019.03.004.

[16] 李张珂,马 涛,满明昊,等. 辛伐他汀对创伤性脑损伤小鼠继发性炎症抑制作用及机制研究[J]. 陕西医学杂志,2022,51(11):1332-1336. doi:10.3969/j.issn.1000-7377.2022.11.003.

[17] 张海娜,徐 慧,余旭奔,等. 辛伐他汀对脂多糖诱导的小鼠抑郁行为及神经炎症的影响[J]. 中国药理学通报,2017,33(3):373-378. doi:10.3969/j.issn.1001-1978.2017.03.016.

(编辑:杨 颖)