论著

文章编号:1000-5404(2005)02-0146-04

NGF与CNTF对周围神经再生纤维超微结构影响的计量研究

李 强,伍亚民,李 民,刘 媛,曾 琳,杨恒文,李应玉 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第三研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆,400042)

提 要:目的 探讨神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)对大鼠同一坐骨神经再生纤维超微结构的影响。**方法** 用自行研制的梭形双通道桥接管桥接36只大鼠坐骨神经10 mm缺损,根据梭形管的两支内加入的药物不同将动物随机分为A组(两支管内均加入几丁糖)和B组(两支管内加入几丁糖后,再分别加入NGF和CNTF)。于术后4、8、16周取再生神经的中段行透射电镜观察,并对8、16周再生神经的有髓和无髓纤维的面积、有髓纤维轴突直径、髓鞘厚度行计量分析。**结果** A组两支管内再生神经纤维的种类、数量无显著差异。B组NGF侧再生纤维以有髓纤维为主,且其髓鞘较厚,轴突直径较大,而CNTF侧再生神经有髓和无髓纤维均增加,无髓纤维面积较NGF侧大,两者差异显著($P<0.05$)。**结论** NGF对有髓纤维的再生和髓鞘形成的作用较强,CNTF可同时促进有髓和无髓纤维再生,但其促进有髓纤维再生的作用不及NGF。

关键词: 梭形双通道桥接管;NGF;CNTF;周围神经再生;超微结构;计量研究

中图法分类号: R322.85; R329.27; R977 **文献标识码:** A

Quantitative research of the ultrastructure of regenerative nerve fibres affected by nerve growth factor or ciliary neurotrophic factor

LI Qiang, WU Ya-min, LI Min, LIU Yuan, ZENG Lin, YANG Heng-wen, LI Ying-yu (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 3, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To discuss the effects of nerve growth factor (NGF) or ciliary neurotrophic factor (CNTF) on the ultrastructures of regenerative nerve fibles. **Methods** Thirty six Sprague-Dawley rats with 10 mm gap of sciatic nerve were randomly divided into two groups which had been bridged with the new double channel nerve conduit of fusiform shape (groups A and B, $n=18$ in each group). In group A, 200 μl chitin for medical use was injected into the conduit. In group B, the two branches of the conduit respectively contained 100 μl chitin and 5 μl NGF or CNTF. At 4, 8, and 16 weeks after operation, we evaluated the ultrastructures of regenerative nerve and analyzed the difference by counting method. **Results** There was not significant difference in the regenerative nerve fibres between the two channels in group A, but in group B, the number of myelinated fibre of regenerative nerves of NGF lateral branch was much more, and the myelin sheath was also thicker. Both the myelinated fibre and unmyelinated fibres in the CNTF lateral branch increased. The diameter of axon and the area of myelinated fibre of NGF lateral branch were larger than the ones of CNTF labteral branch, and there was significant difference between them, but its area of unmyelinated fibre was smaller than that of CNTF labteral branch. **Conclusion** NGF can significantly promote regeneration and myelinization of myelinated fibres. CNTF can promote the regeneration of both myelinated and unmyelinated fibres, but the ability of regeneration and myelinization of myelinated fibre is inferior to NGF.

Key words: double channel nerve conduit of fusiform shape; nerve growth factor; ciliary neurotrophic factor; ultrastructure; peripheral nerve regeneration; quantitative research

基金项目: 国家重大基础研究发展规划(973)项目(G1999054206)

Supported by the National Key Basic Research Development and Plan of China ("973" Projects) (G1999054206)

作者简介: 李 强(1972-),男,安徽省滁州市人,硕士研究生,主治医师,主要从事周围神经损伤与修复方面的研究,现在浙江湖州98医院骨科工作,发表论文26篇。电话:(023)68757433,E-mail: lqlq101@sina.com

通讯作者: 伍亚民,电话:(023)68757453

收稿日期: 2004-08-12;**修回日期:** 2004-12-21

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)是两类目前研究最为深入的神经营养因子，但外源性 NGF 和 CNTF 作用的特点和性质尚存在诸多争议[1,2]。为了能更为科学和精确地比较 NGF 和 CNTF 促进周围神经再生作用的特点和差别，笔者自行设计、研制了梭形双通道桥接管。证明其科学性之后[3]，在梭形管的两支管内分别注入 NGF 和 CNTF，用其桥接大鼠坐骨神经 10 mm 缺损，于术后 4、8、16 周观察再生神经纤维的超微结构，并对有髓纤维和无髓纤维面积，有髓纤维轴突直径，髓鞘厚度等进行计量分析，从形态学角度探讨 NGF 和 CNTF 对周围神经再生的影响。

1　材料和方法

1.1　动物手术与实验分组

选取健康成年清洁级 SD 大鼠 36 只，雌雄不拘，体质量 200 ~ 250 g，平均 223 g(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)。1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔内注射麻醉。侧卧位，剃毛、消毒后，取股后斜切口，暴露右侧坐骨神经，10 倍显微镜下游离坐骨神经，并在梨状肌出口下方 5 mm 处将坐骨神经切除约 8 mm，任其回缩，造成 10 mm 缺损，用消毒好的自行研制的梭形双通道桥接管桥接缺损段，用 10-0 无损伤显微缝合线将神经远、近断端与桥接管缝合固定 2 针，缝合方法采用两定点套接法：分别在神经干周径 180°两相对位置各缝合 1 针，使得再生神经断端套入桥接管内，并距桥接管的分叉处约 1 mm。动物平均分为两组：A 组，从远断端向桥接管的两支管内分别注入医用几丁糖凝胶 100 μl(上海其胜生物制剂有限公司)；B 组，两支管内注入医用几丁糖凝胶 100 μl 后，并用微量注射器将 5 μl NGF(20 ng/μl, Sigma)和 5 μl CNTF(60 ng/μl, Sigma)注入到两支管的中段[3]，将桥接管置于适宜的位置，排除扭转现象，用 0-0 丝线套在两支管外，并缝合固定在邻近的软组织上，防止大鼠麻醉清醒后，活动下肢致桥接管移位和扭转。逐层缝合股后肌肉及皮肤切口，按常规标准统一分笼饲养。

1.2　标本取材及处理

术后 4、12、16 周分别将两组的 6 只动物再次麻醉、固定后，剪开胸腔、左心室插管，剪开右心耳。快速灌入生理盐水 150 ~ 200 ml，待流出液体清亮后，灌注 4% 多聚甲醛约 200 ml。取两支管内中段再生神经用经 4% 戊二醛及 1% 四氧化锇(磷酸盐配制)作预固定和后固定(pH 7.2 ~ 7.4)各 2 h，酒精及丙酮逐级脱水，采用环氧树脂 618 定向包埋，用 Reichert-Jung 超薄切片机作 0.5 μm 厚半薄切片，每个标本切 4 张。经 1% 甲苯胺蓝-天青Ⅱ染色后在光镜下定位，制备超薄切片，用醋酸双氧铀及枸橼酸铅染色，在 Hitachi-600 透射电镜下观察再生神经轴突形态。

1.3　观测指标

观察术后 4、8、12、16 周再生纤维的排列，有髓纤维与无髓纤维再生情况，有鞘纤维的髓鞘厚度，轴突直径。雪旺细胞(schwann's cell, SCs)、巨噬细胞、成纤维细胞的数量及新生血管密度。术后 8、16 周各组每个标本随机选取 4 个视野，统一放大 8 000 倍照相，应用北航 CM-2000B 型生物医学图像分析系统对再生神经有髓纤维与无髓纤维的截面积，有髓纤维髓鞘厚度，轴突直径及髓鞘厚度与轴突直径的比进行计量分析。

1.4　统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间差异用 t 检验。

2　结果

2.1　再生神经纤维的超微结构观察

术后 4 周，A 组 6 只动物仅 1 只成功再生，其余 5 只均呈芽状再生，两侧再生神经外观无显著差异，透射电镜检测未发现再生纤维，仅为 SCs、巨噬细胞、成纤维细胞及新生血管组成，其中以成纤维细胞为主(图 1)。B 组 6 只动物有 4 只再生成功，余 2 只均呈芽状再生，透射电镜观察见 NGF 侧少量的有髓纤维散落在成纤维细胞之间，SCs 较多(图 2)，而 CNTF 侧再生纤维为幼稚的无髓纤维，主要呈巢状分布，成纤维细胞的数量较少(图 3)。术后 8、16 周，再生纤维趋于成熟，但 B 组再生纤维的排列，有髓纤维与无髓纤维数量和质量均优于 A 组，比较 B 组的 NGF 侧和 CNTF 侧再生纤维：NGF 侧再生纤维的有髓纤维数量，髓鞘厚度及轴突的直径均优于 CNTF 侧，但无髓纤维的数量及面积均低于 CNTF 侧 (图 4,5)。

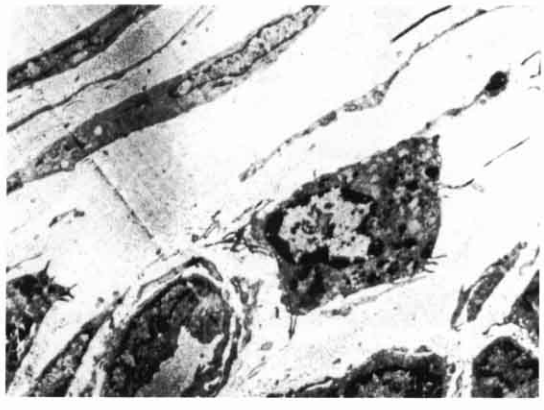


图 1　术后 4 周，A 组再生神经超微结构　未见明显的再生神经纤维　(TEM × 6 000)

Fig 1　Ultrastructure of regenerative nerve in group A at 4 weeks　(TEM × 6 000)



图 2　术后 4 周，B 组 NGF 侧再生神经超微结构　可见散在的有髓纤维被成纤维细胞所包绕　(TEM × 6 000)

Fig 2　Ultrastructure of regenerative nerve of NGF lateral in group B at 4 weeks　(TEM × 6 000)

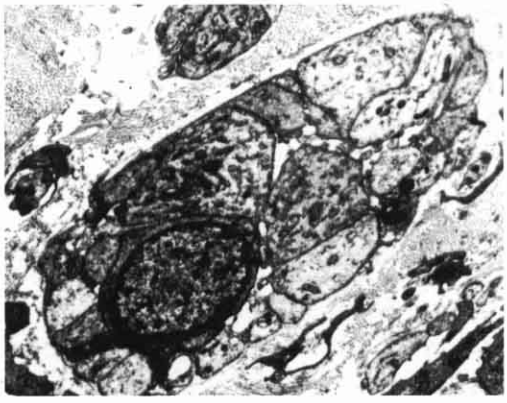


图3 术后4周,B组CNTF侧再生神经超微结构 幼稚新生纤维呈簇状分布,但未形成髓鞘 (TEM×6 000)

Fig 3 Ultrastructure of regenerative nerve of CNTF lateral in group B at 4 weeks (TEM×6 000)

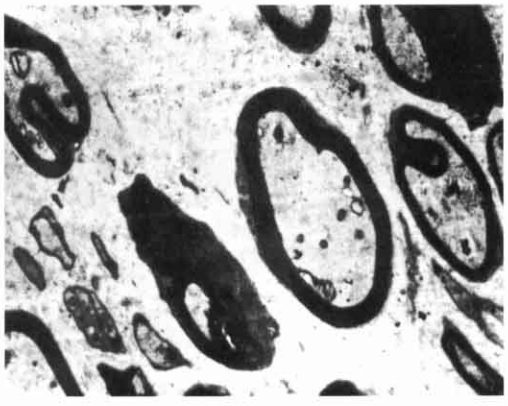


图4 术后16周,B组NGF侧再生神经超微结构 有髓纤维数目多,髓鞘厚,无髓纤维较少 (TEM×8 000)

Fig 4 Ultrastructure of regenerative nerve of NGF lateral in group B at 16 weeks (TEM×8 000)

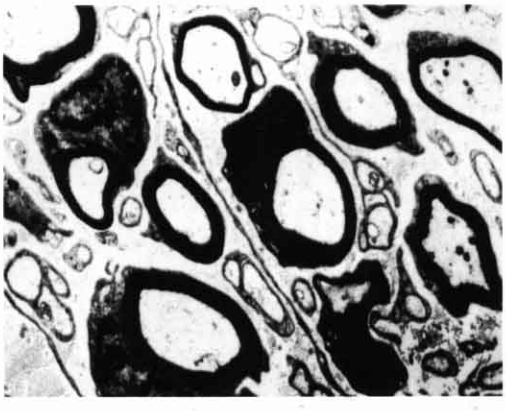


图5 术后16周,B组CNTF侧再生神经超微结构 有髓纤维与无髓纤维均较多 (TEM×8 000)

Fig 5 Ultrastructure of regenerative nerve of CNTF lateral in group B at 16 weeks (TEM×8 000)

2.2 各组再生神经纤维的超微结构计量分析

术后8周和16周再生神经的超微结构计量分析显示:与A组相比,B组再生神经的有髓纤维髓鞘厚、轴突直径大($P<0.05$)。术后8周,B组CNTF侧再生纤维的髓鞘平均厚度为0.2613±0.0385,较NGF侧0.3550±0.0572小,两者存在显著性差异($P<0.05$);术后16周两者间存在非常显著性差异($P<0.01$);轴突直径的差异与髓鞘的厚度变化相一致。且NGF侧有髓纤维的髓鞘厚度与轴突直径的比值较CNTF侧大,两者之间存在显著性差异($P<0.05$)。术后8、16周CNTF侧再生神经的无髓纤维面积均大于NGF侧,但有髓纤维面积较NGF侧小,两者差异显著($P<0.05$)。见表1~3。

表1 术后8周和16周有髓纤维的髓鞘厚度、轴突直径($n=24$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Thickness of myelin sheath and diameter of axon of myelinated fibre at 8 or 16 weeks after operation ($n=24$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Thickness of myelin sheath ($d/\mu m$)		Diameter of axon of myelinated fibre ($d/\mu m$)	
	8 weeks	16 weeks	8 weeks	16 weeks
Group A	0.2231±0.0423	0.2736±0.0305	1.8630±0.8651	1.9670±0.8962
NGF lateral in group B	0.3550±0.0572*	0.3738±0.0452*	3.8050±1.0910*	4.2017±1.276*
CNTF lateral in group B	0.2613±0.0385*##	0.3066±0.0659*#	2.0196±0.4926*##	2.2680±0.6879*#

*: $P<0.01$, **: $P<0.05$, *vs* group A; #: $P<0.01$, ##: $P<0.05$, *vs* NGF lateral in group B

表2 术后8周和16周有髓纤维髓鞘厚度与轴突直径的比值($n=24$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Ratios of the thickness of myelin sheath to the diameter of axon of myelinated fibres at 8 or 16 weeks after operation ($n=24$, $\bar{x}\pm s$)

Group	8 weeks	16 weeks
Group A	0.535±0.056	0.553±0.045
NGF lateral in group B	0.727±0.223*	0.662±0.089*
CNTF lateral in group B	0.626±0.069*#	0.601±0.058**##

*: $P<0.01$, **: $P<0.05$, *vs* group A; #: $P<0.01$, ##: $P<0.05$, *vs* NGF lateral in group B

表3 术后8周和16周有髓纤维面积和无髓纤维面积($n=24$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Area of myelinated or unmyelinated fibres at 8 or 16 weeks after operation ($n=24$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Area of myelinated fibre ($A/\mu m^2$)		Area of unmyelinated fibre ($A/\mu m^2$)	
	8 weeks	16 weeks	8 weeks	16 weeks
Group A	20.157±3.812	28.039±3.196	9.061±0.861	10.012±1.112
NGF lateral in group B	39.425±4.820*	50.087±5.395*	12.273±1.514**	12.930±1.209**
CNTF lateral in group B	26.430±3.662*#	37.987±3.220*#	18.283±1.307*##	19.305±1.465*##

*: $P<0.01$, **: $P<0.05$, *vs* group A; #: $P<0.01$, ##: $P<0.05$, *vs* NGF lateral in group B

3 讨论

NGF和CNTF分别属于两种不同类型的神经营养因子,外源性NGF和CNTF作用的特点和性质尚存在诸多争议,既往研究[1]认为NGF可能对感觉神经纤维具有促进作用,而对运动神经元的再生作用不明显,这可能与运动神经元在出生的不久NGF受体逐渐消失

有关。故外源性的 NGF 是否具有促进周围神经再生的作用，有学者曾对其提出了质疑[4]；另外也有研究发现轴突损伤后 NGF 受体又可重新表达，故认为外源性的 NGF 也具有促进周围神经再生的作用[5]。然而，这些结论主要基于利用单通道直硅胶管桥接不同大鼠坐骨神经缺损的实验研究[2]，为了能够更为精确地观察和比较 NGF 和 CNTF 对同一神经再生的影响，作者自行研制了梭形双通道桥接管，该梭形双通道桥接管具有以中轴对称的特点，可为神经向两支管内再生创造均等的环境。而医用几丁糖凝胶不仅作为神经营养因子的缓释剂，还可一定程度上限制神经营养因子的逃逸，防止两支管内的营养因子相互流动、混合，经在体实验证实利用该管研究和分析两种营养因子对同一神经再生的影响具有科学性、可行性和精确性[3]。

本研究在梭形双通道桥接管的两支管内分别注入 NGF 和 CNTF，通过定性和计量的方法观察两种营养因子对同一神经再生纤维的超微结构影响。术后 4、8、16 周的超微结构显示，与对照组 A 组相比，B 组再生纤维的髓鞘明显增厚，与既往研究结果相一致[6]。B 组 NGF 侧再生神经的有髓纤维比例明显高于 CNTF 侧，术后 4 周，即使再生纤维的数量很少，也主要是有髓纤维；术后 8、16 周再生纤维的计量研究显示：NGF 侧再生纤维的髓鞘厚度及轴突直径明显大于其 CNTF 侧，两者存在显著性差异和非常显著差异；而两侧有髓纤维的髓鞘厚度和轴突直径的比值也存在显著性差异，该结果一方面提示 NGF 具有较强的促进有髓纤维再生和髓鞘形成的作用，另一方面说明 NGF 对有髓纤维的再生作用通过促进髓鞘形成和轴索再生同步进行的，但促进髓鞘形成的作用更为明显。既往也有研究发现在周围神经损伤急性期，NGF 可减少华勒变性时髓鞘崩解；在损伤后的再生修复期，又可明显促进有髓纤维的再生和髓鞘再形成[7]。该作用可能与 SCs 的增殖有关。研究表明 NGF 可通过增加粘附分子 L_1 的表达，促进 SCs 迁移和增殖，迁移和增殖的 SCs 又可通过脂质成分促进巨噬细胞趋化[8]，而定向趋化的巨噬细胞是 SCs 分裂素的主要来源，进一步促进 SCs 的增殖和加快对变性坏死髓鞘等碎片的清除，最终发挥其促进髓鞘再形成和成熟的作用[9]。本研究观察到术后 4 周 NGF 侧再生纤维间有较多巨噬细胞浸润，也进一步佐证了上述结论。

除了对再生纤维的有髓成分进行定性和计量研究外，本研究还对再生神经的无髓纤维进行定性观察和计量分析。这是因为周围神经属于混合神经，包括有髓和无髓纤维两种成分，有髓纤维主要是传递痛、温觉的 A 类纤维，无髓纤维主要是 C 类纤维，有髓与无髓纤维若能以适宜的比例再生，可能更利于其功能的恢复。术后 4 周，B 组 NGF 侧再生神经的无髓纤维鲜见。而 CNTF 侧再生纤维主要为呈巢状分布的幼稚、未形成髓鞘的纤维；术后 8、16 周，CNTF 侧再生神经虽然有髓纤维较少，髓鞘薄，但无髓纤维较 NGF 侧多，计量研究也证实 CNTF 侧无髓纤维的面积明显大于 NGF 侧，两者差异均非常显著。

上述结果提示：通过对再生神经有髓纤维和无髓纤维的定性和计量研究，可进一步较深入地明确 NGF 与 CNTF 促进周围神经再生作用的特点，如 NGF 主要促进有髓纤维再生和髓鞘再形成，而 CNTF 可促进有髓纤维和无髓纤维以一定的比例再生。这对于周围神经而言，有髓纤维主要是传递感觉信息的 A 类纤维，其传递速度快。NGF 主要促进该类纤维的再生，这可以从形态学上解释和证实 NGF 的作用可能主要是促进感觉纤维再生；而 CNTF 的作用则主要促进有髓与无髓纤维以一定的比例再生，这也为临床选择性地应用该两类生长因子治疗不同类型神经损伤与疾病提供了实验依据和理论基础。如单纯的感觉神经损伤或脱髓鞘疾病可考虑选择 NGF；而为了促进混合神经的功能恢复，可考虑优先选择 CNTF。

参考文献：

[1] 李　强，李　民，伍亚民. NGF 与 CNTF 促周围神经再生作用的差异性及协同性研究进展[J]. 中国矫形外科杂志，2004，12(7)：537－539.

[2] 曾　琳，杨恒文，邵　阳，等. NGF 对坐骨神经损伤后腰髓与损伤神经 MBP 含量变化的影响[J]. 第三军医大学学报，2002，24(3)：326－327.

[3] 李　强，伍亚民，李　民，等. 梭形双通道桥接管的研制及其桥接大鼠坐骨神经缺损的研究[J]. 中华创伤杂志，2004，20(4)：230－233.

[4] 许家军，何　成. 睫状神经营养因子神经生长因子对周围神经再生的作用[J]. 中华手外科杂志，1997，13(1)：16－18.

[5] Rende M，Hagg T，Manthorpe M，*et al*. Nerve growth factor receptor immunoreactivity in neurons of the normal adult rat spinal cord and its modulation after peripheral nerve lesions[J]. J Comp Neurol，1992，319(2)：285－298.

[6] Kury P，Stoll G，Muller H W. Molecular mechanisms of cellular interactions in peripheral nerve regeneration[J]. Curr Opin Neurol，2001，14(5)：635－639.

[7] 李　强，伍亚民. 周围神经再生的细胞与分子机制[J]. 中国矫形外科杂志，2003，11(19－20)：1390－1392.

[8] Venezie R D，Toews A D，Morell P. Macrophage recruitment in different models of nerve injury：lysozyme as a marker for active phagocytosis[J]. J Neurosci Res，1995，40(1)：99－107.

[9] Cui Q，Lu Q，So K F，*et al*. CNTF，not other trophic factors，promotes axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci，1999，40(3)：760－766.

（编辑　刘洪娥）