文章编号:1000-5404(2005)14-1463-04

论著

NGF促周围神经再生过程中对血管生成的影响

张玉波,伍亚民,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 探讨再生周围神经中神经生长因子(nerve growth factor, NGF)促血管生成作用及其促血管作用对周围神经再生的影响。**方法** 用单通道的硅胶管桥接75只Wistar大鼠1 cm的坐骨神经缺损,在桥接管内给药,并将它们随机分为4组:生理盐水组(A组)、几丁糖组(B组,医用几丁糖简称几丁糖),NGF+几丁糖组(C组),NGF+几丁糖+抗VEGF组,前3组每组20只,术后7、14、30 d,用免疫组化的方法检测大鼠再生坐骨神经新生血管内皮细胞中CD34、Factor Ⅷ、VEGF的表达,并作半定量分析。术后14 d,Holmes染色再生坐骨神经纤维。**结果** 生理盐水组、几丁糖组再生坐骨神经中表达的CD34、Factor Ⅷ、VEGF比较没有显著性差异,NGF+几丁糖组上述三抗原的表达比生理盐水组或几丁糖组有明显增加($P<0.05$),NGF+几丁糖+抗VEGF组再生坐骨神经血管中的CD34和VEGF的表达完全被抑制,Factor Ⅷ的表达与NGF+几丁糖组相比也显著减少($P<0.01$ 46)。Holmes染色发现,术后14 d再生坐骨神经纤维数量及排列规则程度:NGF+几丁糖组>几丁糖组>生理盐水组>NGF+几丁糖+抗VEGF组。**结论** NGF可能通过促进VEGF产生发挥促周围神经再生作用。

关键词: 神经生长因子;血管内皮细胞生长因子;神经再生;血管生成
中图法分类号: R322.85; R364.33; R977 **文献标识码:** A

Nerve growth factor prmoting angiogenesis in the regenerative perpheral nerve

ZHANG Yu-bo, WU Ya-min, 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 evaluate not only the effects of nerve growth factor (NGF) upon angiogenesis in the regenerative sciatic nerves of rats but also the impact of angiogenesis on regeneration of perpheral nerve. **Methods** Seventy-five rats were assigned randomly to four groups: normal saline group ($n=20$), chitosan group ($n=20$), NGF-chitosan Group ($n=20$), NGF-chitosan-antiVEGF group ($n=15$). The 10-mm defect of the sciatic nerves from every rat was bridged with silica gel conduit in the left latter limb. CD34, Factor Ⅷ, VEGF in the blood vessel of the regenerative sciatic nerves were observed by immunohistochemical staining at 7, 14, 30 d after operation. The regenerative sciatic nerves were dyed by the Holmes method at 14 d. **Results** The expression of CD34, Factor Ⅷ, VEGF in the regenerative sciatic nerves had not distinct difference in normal saline group and chitosan group and the expression of CD34, Factor Ⅷ, VEGF in NGF-chitosan group were significantly more than normal saline group and chitosan group ($P<0.05$). The expression of CD34 and VEGF in NGF-chitosan-antiVEGF group were absolutely inhibited in the regenerative sciatic nerves of rats, and the expression of Factor Ⅷ was markedly less than NGF-chitosan group($P<0.01$). The quantity and regular array of regenerative nerve fiber in four groups from high to low at 14 d after operation by Holmes dyeing: NGF-chitosan group, chitosan group, physiological saline group, NGF-chitosan-antiVEGF group. **Conclusion** NGF may promote regeneration of the rasurg percpheral nerves the regenerative peripheral nerves through increasing VEGF.

Key words: nerve growth factor; vascular endothelial cell growth factor; nerve regeneration; angiogenesis

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目, G1999054206)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Project, G1999054206)

作者简介: 张玉波(1974-),男,湖北省天门市人,硕士研究生,医师,主要从事神经损伤与再生修复方面的研究。电话:(023)66357597,E-mail:jfjzyb@163.com
通讯作者: 伍亚民,电话:(023)68757453,E-mail:yaminwu65@hotmail.com

收稿日期: 2005-02-01; **修回日期:** 2005-04-12

神经生长因子(nerve growth factor,NGF)作为一种传统意义上的神经营养因子,它能促进中枢及外周神经系统的发育与分化,维持神经系统的正常功能,促进感觉神经纤维、交感神经纤维及损伤的运动神经纤维的再生,并对神经元有保护作用。NGF 促进轴突再生的作用与 NGF 能抑制受损神经元细胞死亡有关。在周围神经再生过程中,血供非常重要,它会影响神经内微环境的恒定,影响雪旺细胞的增殖,从而影响轴索再生和髓鞘的再形成。而 NGF 除了保护周围神经损伤后的上位脊髓神经元,以利轴突再生外,近来研究表明 NGF 还具有促非神经组织的血管生成作用[1~3],但对其在再生周围神经中的血管生成作用及其对损伤后周围神经再生修复的影响尚少有报道,而我们在比较 NGF 和睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor,CNTF)的差异性研究时发现了 NGF 有促周围再生神经中血管生成的现象。因此本实验作了进一步的研究,并发现 NGF 促血管生成对于周围神经的再生影响巨大,其可能是通过促进 VEGF 产生发挥促周围神经再生作用,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物分组

健康成年清洁级 Wistar 大鼠 75 只,雌雄不拘,体质量 200~250 g(由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),随机分成 4 组:生理盐水组,注射生理盐水 5 μl。几丁糖组,先后注入 5 μl 生理盐水和 100 μl 的医用几丁糖凝胶(上海其胜制药)。NGF + 几丁糖组,注入 5 μl 生理盐水、100 μl 的医用几丁糖凝胶及 20 ng/μl 的 NGF 5 μl。NGF + 几丁糖组 + 抗 VEGF 组,除注入 NGF + 几丁糖组的试剂外,还加入小鼠抗大鼠 VEGF 单抗(1 μg/μl,Chemicon 公司)5 μl。前 3 组每组动物 20 只,NGF + 几丁糖组 + 抗 VEGF 组 15 只。

1.2 模型制作

参考文献[4]的模型制作过程,以 10 g/L 戊巴比妥钠 40 mg/L 腹腔内注射麻醉,取左侧股后作斜切口,暴露坐骨神经,经梨状肌出口下方 5 mm 处切除坐骨神经约 8 mm,任其回缩,造成 10 mm 缺损,用 12 mm 长、外径 2.4 mm 的内径 1.2 mm 的硅胶管(上海新亚医用橡胶厂出产)桥接缺损。用 9-0 号无损伤显微缝线将神经远、近端外膜与硅胶管缝合,各固定 2 针。而后将已桥接坐骨神经的硅胶管放回到坐骨神经解剖位。用 0 号丝线逐层缝合肌膜和皮肤切口后,动物室饲养。

1.3 观察指标

1.3.1 Holmes 染色 取术后 14 d 每组再生坐骨神经,40 g/L 的多聚甲醛灌注固定后石蜡切片,作 Holmes 银染,观察各组再生坐骨神经纤维生长情况。

1.3.2 电镜观察 术后 60 d,生理盐水组,几丁糖组,NGF + 几丁糖组大鼠各取 5 只,取材后经固定、脱水、块染、浸透、包埋、超薄切片制备等步骤后,将样品放在覆有支持膜的铜网上观察,低倍镜下寻找组织切片中毛细血管,微小动、静脉,内皮细胞;高倍放大下,拍摄显微照片。

1.3.3 组化检测 在术后第 7、14、30 天时,每次分别将生理盐水组,几丁糖组,NGF + 几丁糖组,NGF + 几丁糖 + 抗 VEGF 组大鼠各取 5 只,用 10 g/L 的戊巴比妥钠以 40 mg/kg 腹腔注射麻醉,40 g/L 的多聚甲醛灌注固定后冰冻切片,用免疫组化方法进行 CD34、Factor Ⅷ、VEGF 检测。所用试剂主要有兔抗大鼠 CD34 和兔抗大鼠 Factor Ⅷ多克隆抗体(工作浓度均为 1∶100,Santa Cruz),小鼠抗大鼠 VEGF 单抗(工作浓度 1∶500),免疫组化染色 S-P 试剂盒和 DAB 显色试剂盒,二者均由北京中山试剂公司提供。用 0.01 mol/L 的 PBS 代替一抗作阴性对照,染色方法按试剂盒说明进行。

1.3.4 计数方法 CD34、Factor Ⅷ、VEGF 的阳性染色,呈棕黄色至深棕色,其中 CD34 阳性染色微血管参照 Weidner[5] 微血管计数方法,凡呈现棕色单个内皮细胞或内皮细胞群者作为一个血管计数,在 100 倍视野下选择染色切片的血管密集区,在 200 倍视野下,选 5 个再生神经近端视野,计数每个视野中微血管量,求其平均值。采用类似方法选择 Factor Ⅷ、VEGF 的染色切片,统计其阳性染色点数目。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Excel 2000 软件,比较每组间差异采用 t 检验。

2 结果

2.1 Holmes 染色

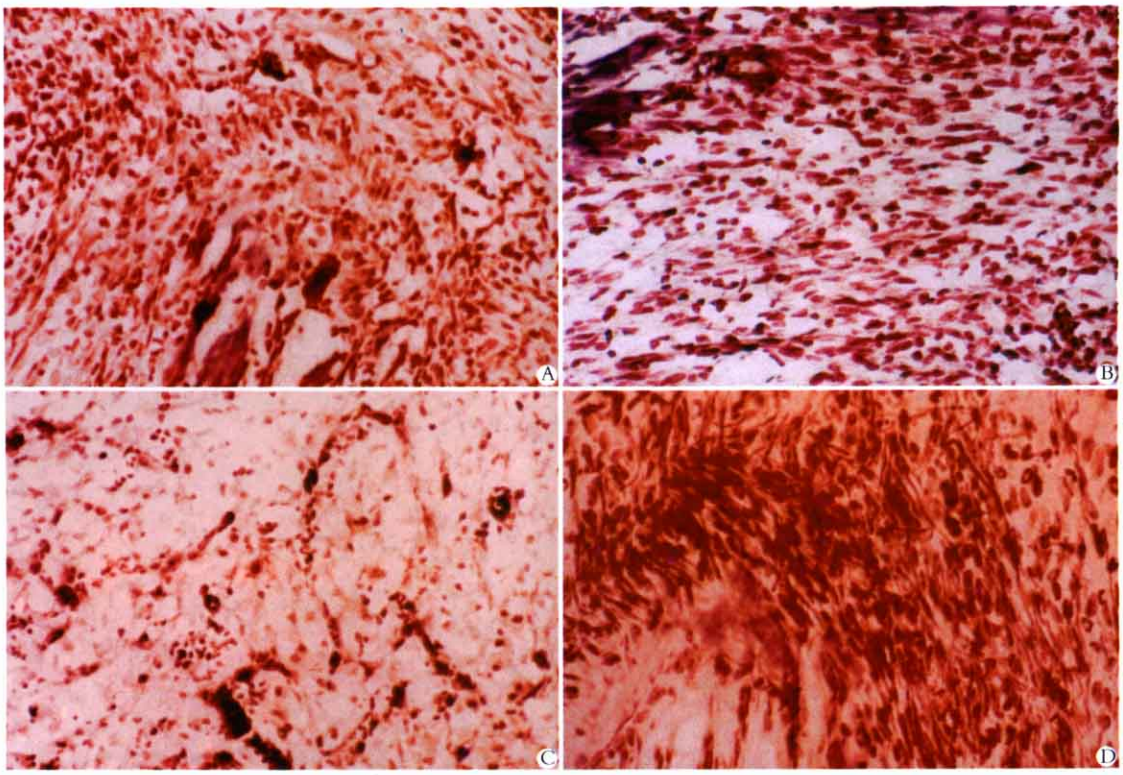
术后 14 d 再生近端坐骨神经纤维 Holmes 染色发现,生理盐水组再生坐骨神经纤维少而短,排列紊乱;几丁糖组纤维稍增多,长度较短,排列较整齐;NGF + 几丁糖 + 抗 VEGF 组再生神经纤维比生理盐水组还少,几乎见不到神经纤维生长,NGF + 几丁糖组纤维生长良好,数目明显增多,排列较为整齐,纤维长度也更长。根据再生坐骨神经纤维数量、长度及排列规则程度有:NGF + 几丁糖组 > 几丁糖组 > 生理盐水组 > NGF + 几丁糖 + 抗 VEGF 组。见图 1。

2.2 透射电镜观察

在术后 60 d 对 NGF + 几丁糖组坐骨神经进行超微结构观察,发现再生坐骨神经中的微小血管和毛细血管(图 2)。

2.3 免疫组化染色

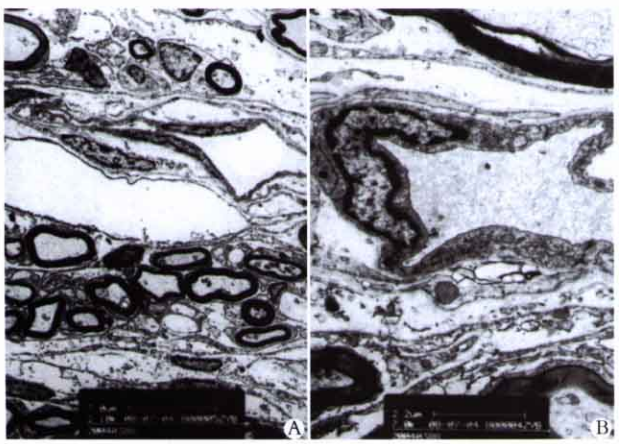
术后 7、14、30 d,NGF + 几丁糖组再生坐骨神经近端 CD34 和 Factor Ⅷ 的表达均显著高于生理盐水组或几丁糖组($P < 0.05$),而几丁糖与生理盐水组间无显著性差异,术后 14 d 再生坐骨神经近端 CD34 和 Factor Ⅷ的表达最多,NGF + 几丁糖组不同时相点间有显著性差异($P < 0.05$)。具体见表 1。实验发现,NGF + 几丁糖组 + 抗 VEGF 组再生坐骨神经中 CD34 和 VEGF 的表达完全被抑制。以术后 14 d 为例,NGF + 几丁糖组 + 抗 VEGF 组再生坐骨神经近端 Factor Ⅷ的表达也显著少于 NGF + 几丁糖组[(56.4 ± 5.41)、(131.4 ± 26.55),($P < 0.01$)],但与生理盐水组、几丁糖组间无显著性差异。实验还发现 NGF 能显著促进再生周围神经中 VEGF 的表达,术后 14 d,NGF + 几丁糖组 VEGF 的表达显著高于几丁糖组[(51 ± 5.70)、(26.4 ± 8.73),$P < 0.01$)],而几丁糖组与生理盐水组间无显著性差异($P > 0.05$)。



A：Normal saline；B：Chitosan；C：NGF-chitosan-antiVEGF；D：NGF-chitosan

图 1　术后 14 d 再生坐骨神经近端染色结果（Holmes 染色法 ×200）

Fig 1　Dyeing results of the regenerative sciatic nerves at14 d after operation（Holmes method ×200）



A：The tiny blood vessels（TEM ×2 100）；B：The capillary vessels（TEM ×7 000）

图 2　术后 60 d NGF + 几丁糖组再生坐骨神经内微小血管和毛细血管

Fig 2　The tiny blood vessels and capillary vessels in the regenerative sciatic nerves in NGF-chitosan group at 60 d after operation

表 1　不同时相点 3 组微血管计数和 Factor Ⅷ 阳性染色点计数（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　The counting of the tiny blood vessels and Factor Ⅷ staining dots in three groups in different stage（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

Group	7 d		14 d		30 d	
	CD34	Factor Ⅷ	CD34	Factor Ⅷ	CD34	Factor Ⅷ
Normal saline	12.4 ± 2.30	4.2 ± 3.03	56.2 ± 19.59	48.2 ± 10.43	33.6 ± 4.22	45.2 ± 8.73
Chitosan	14.4 ± 3.71	5.2 ± 2.28	52.6 ± 13.61	56.4 ± 8.26	33.2 ± 5.63	44.0 ± 12.31
NGF-chitosan	25.0 ± 4.06#	12.0 ± 2.24#	106.6 ± 15.49#	131.4 ± 26.55#	85.8 ± 6.69#	70.0 ± 4.30#

#：$P<0.01$，*vs* chitosan group

3　讨论

CD34 是分子量为（100 ~ 120）×10^3 的跨膜细胞表面糖蛋白，是造血祖细胞、内皮细胞祖细胞和小血管内皮细胞表面的标志[6]。文献[7,8]报道 CD34 抗体是毛细血管的内皮细胞标记物，故常用其标记新生血管。Factor Ⅷ 由血管内皮细胞及巨核细胞合成，存在于内皮细胞和巨核细胞的 Weibel-Palade 氏体及血小板 α 颗粒中，分子量达百万至千万以上。抗 Factor Ⅷ

抗体主要标记较大管径血管，在毛细血管中很少标记[7~10]。SantaCruz 公司的 Factor Ⅷ 多克隆抗体能特异性地与较大管径的内皮细胞结合，是鉴别较大管径血管的标志。VEGF 具有特异地促进血管内皮细胞的增殖，促进新生血管和侧支循环形成[11]，维持和调节血管功能等作用，它不仅能促进毛细血管的萌芽，而且能促进微动脉形成[12]。

我们用 CD34、Factor Ⅷ 分别标记再生周围神经中的毛细血管和较大管径血管。为在一定程度上防止 NGF 在体内过快地降解失活，相对延长其在体内释放和作用时间，实验中采用医用几丁糖凝胶作为缓释剂，作为载体的缓释剂本身可逐渐被组织吸收且几乎无刺激作用。而且实验中发现几丁糖本身并没有促血管作用。

研究表明 NGF + 几丁糖组再生周围神经中 CD34、Factor Ⅷ 的表达显著高于几丁糖组和生理盐水组，说明 NGF 能促进再生坐骨神经中毛细血管的生成和较大管径血管的增加。NGF 促再生周围神经中血管生成是明显的，VEGF 在其中起着非常重要的作用。实验显示：术后 14 d，NGF + 几丁糖组再生周围神经中 VEGF 的表达显著高于几丁糖组和生理盐水组，而且 NGF 促再生周围神经中 VEGF 的表达还具有一定的剂量效应，在促 VEGF 的表达上，500 ng NGF > 100 ng NGF > 50 ng NGF，且它们间具有显著性差异（$P < 0.05$，文章待发表），激光共聚焦显微镜扫描发现 VEGF 与 CD34 或 Factor Ⅷ 都有非常明显的共表达（文章待发表），以上说明了 NGF 能显著促进再生周围神经血管中 VEGF 的表达，实验还显示，加入 VEGF 抗体后，再生周围神经中 CD34 和 VEGF 的表达完全被抑制，而且再生坐骨神经近端 Factor Ⅷ的表达也显著减少（$P < 0.01$），也就是说 VEGF 的抗体显著抑制再生周围神经中的血管生成，由此我们认为 VEGF 在 NGF 促再生周围神经中血管生成方面起非常重要的作用[13]。

Holmes 染色显示，根据再生坐骨神经纤维数量、长度及排列规则程度有：NGF + 几丁糖组 > 几丁糖组 > 生理盐水组 > NGF + 几丁糖 + 抗 VEGF 组。从前面的免疫组化和半定量分析可知：几丁糖组和生理盐水组再生坐骨神经中有一些血管生成，可维持一定的血供，能见到一些再生神经纤维，NGF + 几丁糖 + 抗 VEGF 组再生坐骨神经中血管生成很少（完全抑制了 CD34 的表达，显著抑制了 vWf 的表达），血供严重缺乏，也几乎不见神经纤维生长。而 NGF + 几丁糖组中由于 NGF 有明显的促血管生成作用，再生坐骨神经的血供相对较丰富，再生神经纤维最多，生长也最快最好，排列也较为规则。提示血管生成、血供改善对神经纤维的再生具有重要作用。由此可见 VEGF 的表达增高对于受损周围神经的再生起着至关重要的作用，可能是由于 VEGF 在其中发挥了促血管生成作用，而 VEGF 的高表达是由于 NGF 的作用引起，因此 NGF 促周围神经再生的作用可能与其促血管生成关系密切。以往的研究认为 NGF 促进轴突再生的作用与 NGF 能抑制受损神经元细胞死亡有关。但不可否认 NGF 的促周围神经中血管生成可能在周围神经再生中起着重要的作用，NGF 经 VEGF 促进再生周围神经中血管生成对于受损周围神经的再生也非常重要。

参考文献：

[1] Seo K, Choi J, Park M, *et al*. Angiogenesis effects of nerve growth factor (NGF) on rat corneas[J]. J Vet Sci, 2001, 2(2): 125 - 130.

[2] Emanueli C, Salis M B, Pinna A, *et al*. Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs[J]. Circulation, 2002, 106(17): 2257 - 2262.

[3] Steinle J J, Granger H J. Nerve growth factor regulates human choroidal, but not retinal, endothelial cell migration and proliferation[J]. Auton Neurosci, 2003, 108(1 - 2): 57 - 62.

[4] 杨恒文，陈恒胜，伍亚民，等. 神经生长因子对大鼠坐骨神经损伤后腰髓前角神经元的影响[J]. 中华创伤杂志，2002，18(2)：111 - 112.

[5] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36(2): 169 - 180.

[6] Acarregui M J, England K M, Richman J T, *et al*. Characterization of CD34 + cells isolated from human fetal lung[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 284(2): L395 - L401.

[7] Bachetti T, Morbidelli L. Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions[J]. Pharmacol Res, 2000, 42 (1): 9 - 19.

[8] Muller A M, Hermanns M I, Skrzynski C, *et al*. Expression of the endothelial markers PECAM - 1, vWF, and CD34 in vivo and in vitro [J]. Exp Mol Pathol, 2002, 72(3): 221 - 229.

[9] Kawanami O, Matsuda K, Yoneyama H, *et al*. Endothelial fenestration of the alveolar capillaries in interstitial fibrotic lung diseases[J]. Acta Pathol Jpn, 1992, 42(3): 177 - 184.

[10] Yamamoto M, Shimokata K, Nagura H. An immunohistochemical study on phenotypic heterogeneity of human pulmonary vascular endothelial cells[J]. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1988, 412(5): 479 - 486.

[11] Thomas K A. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent[J]. J Biol Chem, 1996, 271(2): 603 - 606.

[12] Turrini P, Gaetano C, Antonelli A, *et al*. Nerve growth factor induces angiogenic activity in a mouse model of hindlimb ischemia[J]. Neurosci Lett, 2002, 323(2): 109 - 112.

[13] 张天飞，蒋登金，郭光金. 血管内皮细胞因子与血管生成的研究进展[J]. 局解手术学杂志，2003，12(4)：296 - 298.

（编辑 栾 嘉）