文章编号：1000-5404(2008)11-1025-03

论著

IGF-1 对大鼠坐骨神经再生早期的影响

李光振[1]，朱　刚[1]，陈　菁[2]，冯　华[1]，王宪荣[1]　（第三军医大学：西南医院神经外科，全军神经系统疾病微创诊治专科中心，重庆 400038，[2] 大坪医院野战外科研究所第六研究室，创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室，重庆 400042）

摘　要：目的　探讨胰岛素样生长因子-1 对大鼠坐骨神经再生早期的影响。方法　建立大鼠坐骨神经切割伤模型，通过硅胶管进行桥接，实验组于再生室内注入胰岛素样生长因子-1，对照组注入等量生理盐水，于术后 3、5、7、9、11 d 取材，用 SABC 免疫组化法检测轴突再生情况以及雪旺细胞数目、形态和排列方式的变化。结果　①雪旺细胞：在对照组，术后 3 d，断端间隙内仅可见少量雪旺细胞，术后 7 d，雪旺细胞数量明显增多，术后 11 d，整个间隙内的雪旺细胞排列呈有序的条索状。在实验组，术后 3 d，雪旺细胞即明显增多，以后各相同时相点雪旺细胞数目均明显高于对照组。②再生轴突：在对照组，术后 5 d，轴突开始长出，术后 7 d 轴突快速增长，至第 11 天，再生的轴突已长过 5 mm 的间隙到达神经远端。在实验组，术后 3 d 轴突即开始长出，9 d 就快到达远端。结论　胰岛素样生长因子-1 能促进轴突延伸和雪旺细胞增殖，明显促进坐骨神经再生。

关键词：坐骨神经；再生；胰岛素样生长因子-1
中图法分类号：R322.85；R329.28；R651.302　　文献标识码：A

Effect of insulin-like grow factor 1 on early regeneration of rat sciatic nerve

LI Guang-zhen[1], ZHU Gang[1], CHEN Jing[2], FENG Hua[1], WANG Xian-rong[1] ([1]Department of Neurosurgery, Southwest Hospital, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 6, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective　To investigate the role of insulin-like grow factor 1 (IGF-1) on the regeneration of peripheral nerve after operation. Methods　The right sciatic nerve of adult female SD rats was transected and bridged with silicone tube. IGF-1 was injected into the silicone tube in the treated group, while normal saline instead in control group, with 30 rats in each group. On postoperative day 3, 5, 7, 9 and 11, the regeneration of axons was observed by SABC immunohistochemical methods with anti-neurofilment 200, and the proliferation of Schwann cells was measured with anti-S-100. Results　Significant difference was seen in the length of regenerating neurites and the number of Schwann cells at all time points between two groups ($P<0.01$). Conclusion　Local application of IGF-1 in the regenerative chamber after transaction promotes the proliferation of Schwann cells and the growth of neurites.

Key words: sciatic nerve; regeneration; insulin-like growth factor-1

研究报道胰岛素样生长因子-1（insulin-like growth factors-1，IGF-1）对周围神经再生有促进作用[1,2]，但侧重于对再生后期的功能评价，IGF-1 对神经再生早期的作用仍不清楚。本实验拟在神经再生的早期观察 IGF-1 对轴突、雪旺细胞的影响，为周围神经损伤的治疗提供实验依据。

基金项目：国家重点基础研究发展规划项目（"973"项目）（G1999054206）
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G1999054206)
作者简介：李光振，男，河南省邓州市人，硕士，主治医师，主要从事神经再生方面的研究，现在解放军 150 医院神经内科。电话：15896523378
通信作者：朱　刚，电话：(023)68754153，E-mail：Zhugang666@yahoo.com.cn
收稿日期：2006-11-09　修回日期：2007-09-15

1　材料与方法

1.1　动物分组及手术方法

成年雌性 SD 大鼠（由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供）60 只，体质量 220～250 g。随机数字表法分为实验组和对照组，每组 30 只，每组又分为 3、5、7、9、11 d 5 个小组，每小组 6 只。用速眠新Ⅱ（1.0 ml/kg）肌肉注射麻醉后，在无菌条件下，解剖并分离出右侧坐骨神经，于股中部切断，将两断端原位套入 7 mm 长的硅胶管（内径 1.6 mm、外径 2.4 mm）中，采用两定点缝合法，用 10-0 无创缝合线将神经外膜与硅胶管缝合固定，两断端相距 5 mm，实验组用微量注射器予再生室内注入 IGF-1（购自 CytoLab 公司）50 μl（20 ng/ml），对照组注入等量生理盐水作对照。术后各组大鼠分笼统一喂养。

1.2　动物取材及切片的制备

根据术前分组按时取材，经多聚甲醛灌注固定后，取完整

的再生组织放入4%多聚甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋。按片厚5 μm做纵行连续切片。

1.3 免疫组织化学染色

采用SABC法:切片常规脱蜡至水,3% H_2O_2溶液处理10 min,微波修复抗原,5% BSA封闭,间隔切片加抗神经微丝200单克隆抗体和抗S-100多克隆抗体(均由武汉博士德公司提供,稀释度1∶100),4 ℃冰箱过夜,加相应二抗,加SABC,DAB显色,苏木精轻度复染,脱水,透明,封片,显微镜观察。每批染色设阴性对照。

每个标本取两种染色切片各1张于显微镜下观察断端间雪旺细胞(即抗S-100免疫阳性细胞,表现为细胞质呈棕黄色染色)的增殖、分化情况及轴突(即抗NF200阳性棕黄色条索)的延伸情况。在400倍数下计数每个视野下抗S-100阳性细胞数目;用显微镜中的标尺测量轴突的再生长度(从神经近断端到轴突末梢的距离)。

1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.0统计软件,进行 t 检验。

2 结果

2.1 大体标本观察

对照组:术后3 d,神经两断端间由暗红色血凝块连接起来,至术后11 d,断端间组织完全为白色胶冻状。而实验组在术后9 d时,神经断端间组织已完全为白色胶冻状。

2.2 雪旺细胞

对照组:术后3 d,断端间隙内仅可见少量雪旺细胞,体积小,局限在距断端2 mm范围内。术后5 d,雪旺细胞略增多。术后7 d(图1),雪旺细胞明显增多,体积增大,细胞突起增多,有些雪旺细胞已通过细胞突起连接起来。术后9 d,在近端4 mm范围内,雪旺细胞呈条索状排列,在远端1 mm范围内,部分雪旺细胞也已连成条索状。术后11 d,整个间隙内,雪旺细胞呈有序的条索状排列。实验组:术后3 d,断端间隙内已可见较多雪旺细胞。术后5、7(图2)、9 d的雪旺细胞数量及分布情况分别类似与对照组的7、9、11 d。术后11 d,整个间隙内,雪旺细胞条索状排列更加有序。对照组和实验组各时间点雪旺细胞计数相比,均有非常显著性差异($P<0.01$),见表1。

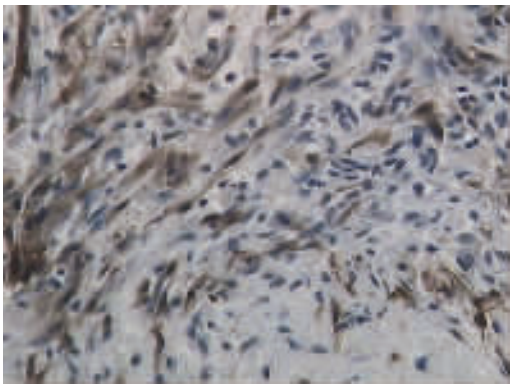


图2 实验组术后7 d,雪旺细胞明显增多,大部分已连成条索状 (SABC×200)

表1 两组各时间点雪旺细胞数目统计($\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d
对照组	7.83±1.47	9.17±1.33	16.83±2.23	21.83±1.60	22.17±2.32
实验组	10.83±1.47[a]	16.17±1.47[a]	22.50±1.87[a]	24.50±1.52[a]	28.67±2.16[a]

a:$P<0.01$,与对照组比较

2.3 再生轴突

对照组:术后3 d(图3),近端短距离及整个远端轴突呈颗粒状变性。术后5 d,轴突长出约0.02 mm。术后7 d,轴突长出约1 mm。术后9 d,轴突已达再生室中远部。术后11 d,再生的轴突已跨越5 mm的间隙到达远端。实验组:术后3 d(图4),轴突已长出约0.02 mm。术后5 d,轴突长出约1 mm。术后7 d,轴突已达再生室中部。术后9 d,再生的轴突将到达远端。术后11 d,横跨再生室的轴突排列更加有序。对照组和实验组各时间点轴突再生长度相比均有非常显著性差异($P<0.01$),见表2。

表2 两组各时间点轴突再生长度统计(mm,$\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d
对照组	0	0.026±0.004	1.084±0.036	3.163±0.090	5.061±0.042
实验组	0.025±0.003[a]	1.063±0.285[a]	2.236±0.143[a]	4.144±0.109[a]	6.191±0.123[a]

a:$P<0.01$,与对照组比较

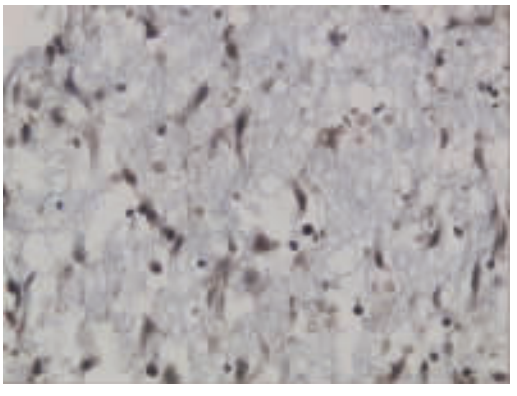


图1 对照组术后7 d,少部分雪旺细胞已通过细胞突起连接起来 (SABC×200)

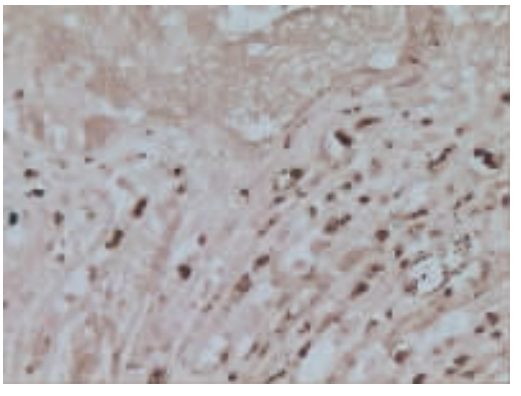


图3 对照组术后3 d,近断端轴突仍呈颗粒状变性,未见轴突延伸 (SABC×200)

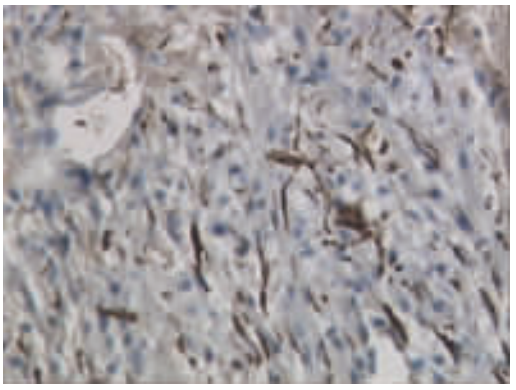


图 4　实验组术后 3 d，近端轴突已开始向前延伸　（SABC × 200）

3　讨论

胰岛素样生长因子（insulin-like growth factors，IGFs）家族成员包括 IGF-1 和 IGF-2 两种，分别为 70、67 个氨基酸组成的单链多肽，其相对分子质量分别为 7 649 和 7 471，由 3 个双硫键交叉连接而成，与胰岛素有很大的同源性，空间结构也十分近似。身体中许多组织可以产生 IGFs，如神经、肌肉、肝脏等。IGF-1 具有广泛的生理功能：具有脑保护作用；能够保持失神经肌肉的体积和重量，减慢运动终板的退变速度[3]；刺激软骨细胞的增殖和分化，防止骨质疏松等。IGFs 可通过靶细胞表面的 IGF-1 受体、胰岛素受体和 IGF-2 受体等不同受体途径起作用，但在促进神经再生过程中，主要通过 IGF-1 受体介导[4]。IGFs 的作用由 IGFs 的结合蛋白（IGFBPs）来调节，迄今已发现 6 种 IGFBPs，不同的 IGFBP 对 IGF 的亲和力不同。

Bothwell[5] 于 1982 年首先在体外观察到 IGF 有利于轴突的生长。在培养的脊髓运动神经元中亦有类似的变化[6]。Glazner 等[7] 发现在受损伤的周围神经及失神经的肌肉中，IGF-1 与 IGF-2 mRNA 的水平显著地升高。Pu 等[8] 应用原位杂交技术进一步证实，损伤神经中 IGF-1 与 IGF-2 mRNA 的增加与雪旺细胞的增殖正相关。吴岚晓等[9] 在培养大鼠雪旺细胞时加入 IGF-1，能使培养的雪旺细胞增殖加快，提前进入平台期。雪旺细胞的增殖与 IGF-1 的浓度在一定范围内呈现量效关系。Cheng 等[10] 用免疫组化发现周围神经损伤后巨噬细胞产生 IGF-1，雪旺细胞表达 IGF-1 受体，还分泌 IGFBPs 来增加局部 IGF-1 的生物活性。但是有关 IGF-1 对外周神经损伤修复的作用文献报道较少。2006 年 Chen[11] 及 2007 年 Koriyama 等[12] 研究发现 IGF-1 在外周神经损伤的修复中起重要作用，尤其在金鱼视网膜神经结细胞再生早期 IGF-1 有明显上调。这些研究提示 IGF-1 在外周神经损伤和修复中有重要作用。

本实验结果显示坐骨神经损伤后早期应用 IGF-1 可明显促进坐骨神经再生，其可能机制是：IGF-1 与雪旺细胞表达的 IGF-1 受体结合，促进雪旺细胞增殖、迁出，增殖的雪旺细胞又能分泌多种神经营养因子加快轴突再生速度，促进坐骨神经再生进程。因此，IGF-1 间接通过雪旺细胞来加速轴突再生。该研究结果为周围神经再生的治疗提供实验依据。但 IGF-1 能否直接促进轴突再生，尚需进一步研究。

参考文献：

[1] 张志军，高炳庆，梁传余，等. 胰岛素样生长因子对面神经损伤的修复作用[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志，2004，12(1)：7－9.

[2] Kanje M，Skottner A，Sjoberg J，*et al*. Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve[J]. Brain Res，1989，486(2)：396－398.

[3] Day C S，Buranapanitkit B，Riano F A，*et al*. Insulin growth factor-1 decreases muscle atrophy following denervation[J]. Microsurgery，2002，22(4)：144－151.

[4] Czech M P. Signal transmission by the insulin-like growth factors[J]. Cell，1989，59(2)：235－238.

[5] Bothwell M. Insulin and somatemedin MSA promote nerve growth factor-independent neurite formation by cultured chick dorsal root ganglionic sensory neurons[J]. J Neurosci Res，1982，8(2－3)：225－231.

[6] Caroni P，Grandes P. Nerve sprouting in innervated adult skeletal muscle induced by exposure to elevated levels of insulin-like growth factors[J]. J Cell Biol，1990，110(4)：1307－1017.

[7] Glazner G W，Morrison A E，Ishii D N. Elevated insulin-like growth factor (IGF) gene expression in sciatic nerves during IGF-supported nerve regeneration[J]. Brain Res Mol Brain Res，1994，25(3－4)：265－272.

[8] Pu S F，Zhuang H X，Ishii D N. Differential spatio-temporal expression of the insulin-like growth factor genes in regenerating sciatic nerve[J]. Brain Res Mol Brain Res，1995，34(1)：18－28.

[9] 吴岚晓，秦　煜，顾立强，等. 胰岛素样生长因子 1 促许旺细胞生长的实验研究[J]. 广东医学，2000，21(6)：447－448.

[10] Cheng H L，Randolph A，Yee D，*et al*. Characterization of insulin-like growth factor-I and its receptor and binding proteins in transected nerves and cultured Schwann cells[J]. J Neurochem，1996，66(2)：525－536.

[11] Chen M H，Chen P R，Chen M H，*et al*. Gelatin-tricalcium phosphate membranes immobilized with NGF，BDNF，or IGF-1 for peripheral nerve repair：an *in vitro* and *in vivo* study[J]. J Biomed Mater Res A，2006，79(4)：846－857.

[12] Koriyama Y，Homma K，Sugitani K，*et al*. Upregulation of IGF-I in the goldfish retinal ganglion cells during the early stage of optic nerve regeneration[J]. Neurochem Int，2007，50(5)：749－756.

（编辑　薛国文）