论著

文章编号:1000-5404(2008)10-0960-04

肉毒杆菌毒素A水凝胶对大鼠骨骼肌远期作用的形态学观察

钟华红,陈静嫦,吴河坪,麦光焕 (中山大学中山眼科中心,中山大学眼科学国家重点实验室,广州 510060)

摘 要:目的 探讨肉毒杆菌毒素A(botulinum toxin A, BTXA)水凝胶对大鼠骨骼肌(腓肠肌)远期作用的形态学影响及其意义。**方法** 将BTXA行示踪标记配制^{125}I-BTXA水凝胶与^{125}I-BTXA水溶液,进行样品放射性强度测定。12只SD大鼠用随机数字表法分为A、B两组,每组6只,大鼠右侧腓肠肌注射BTXA水凝胶,左侧腓肠肌注射等体积生理盐水作对照,于注射后6个月(A组)、12个月(B组)切取腓肠肌标本,常规病理HE染色、1%氯化金染色,透射电子显微镜观察组织结构变化。**结果** ^{125}I-BTXA水凝胶与^{125}I-BTXA水溶液放射性强度比较无统计学差异($P>0.05$);光镜下大鼠腓肠肌组织形态无明显改变;透射电镜观察,注射后6个月,出现不可逆性肌纤维溶解,肌膜下线粒体嵴肿胀、空泡变,局部肌浆网增厚、扩张;注射后12个月,肌细胞损伤无明显改善。**结论** BTXA在水凝胶中的浓度与在生理盐水中相当,BTXA水凝胶作用的骨骼肌远期超微结构形态不能恢复正常,其对骨骼肌在远期仍有影响。

关键词: 肉毒杆菌毒素A;水凝胶;腓肠肌;组织形态学

中图法分类号: R322.74;R329.24;R988.1 **文献标识码:** A

Long-term morphologic changes in skeletal muscles of SD rats after botulinum toxin A gel injection

ZHONG Hua-hong, CHEN Jing-chang, WU He-ping, MAI Guang-huan (Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: Objective To investigate the long-term morphologic changes of the gastrocnemius muscles of SD rats after botulinum toxin A (BTXA) gel induced paralysis. **Methods** BTXA labeled with ^{125}I was obtained. The radioactivity measurement was taken to measure the solubility of BTXA in gel and BTXA solution (normal saline as solvent). The right gastrocnemius muscles of 12 SD rats were injected with BTXA gel and the left gastrocnemius muscles injected with normal saline were used as controls. HE staining and 1% gold chloride staining were used to study the tissue changes 6 months and 12 months after BTXA gel injection and transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructural changes. **Results** The radioactivity of ^{125}I-BTXA gel and ^{125}I-BTXA solution had no significant differences ($P>0.05$). Histopathologic examination showed no changes in the right gastrocnemius muscles injected with BTXA gel, but ultrastructurally the myopathic changes were clearly visible, like diffuse sarcomere disruption and saroplasmic reticulum expanding. The myofibre degeneration showed no remission 12 months after BTXA gel injection. **Conclusion** BTXA is dissolved in gel evenly. The long-lasting myofibre degeneration in BTXA gel paralyzed muscles may reflect that the paralyzed muscles fail to regain their unique function and recovery of muscle contraction.

Key words: botulinum toxin A; gel; the gastrocnemius muscle; histomorphology; transmission electron microscopy

肉毒杆菌毒素A(botulinum toxin A,BTXA)最早报道注射眼外肌代替手术治疗斜视[1],以后逐渐被拓展到其他临床研究领域,如治疗眼动力障碍性和神经肌肉障碍性疾病,植物神经紊乱性疾病,甚至美容除皱、缓解疼痛等,并取得了良好的疗效。但BTXA临床应用的远期效果并不稳定,常需要通过重复注射以逐步达到效果。目前,临床常用BTXA水溶液剂型,由于其较容易向周围组织扩散,注射眼外肌治疗斜视时容易引起相邻肌肉麻痹,出现上睑下垂、垂直性斜视等并发症。本研究将BTXA水溶液剂型改良为水凝胶剂型,观察BTXA在水凝胶中的溶解情况,并从组织形态超微结构等方面研究其对骨骼肌的远期作用,探讨

作者简介:钟华红,女,广东省东莞市人,博士研究生,主要从事斜视与弱视方面的研究。电话:(020)87330484,E-mail: hh_zhong@hotmail.com

通信作者:麦光焕,电话:(020)87330484,E-mail: ghm44@163.com

收稿日期:2007-10-24;修回日期:2008-03-13

BTXA 水凝胶注射治疗某些神经肌肉障碍性疾病的可行性和长期有效性。

1　材料与方法

1.1　试剂与仪器

BTXA(兰州生物制品公司),氯胺-T(Ch-T)、$Na_2S_2O_5$、Sephaderx G-25 凝胶(Sigma 公司,美国),玻璃酸钠注射液(山东博士伦福瑞达制药有限公司),VID Ⅲ半自动图像分析系统(A. M. S,英国),H-7500 透射电镜(Hitachi 公司,日本)。

1.2　BTXA 水凝胶的制备及溶解状态分析

1.2.1　示踪药物^{125}I-BTXA 的制备[2]　　将 20 054 kBq NaI^{125}(北京同位素所),55 U BTXA(100 U/ml),30 μl 氯胺-T(Ch-T,2.0 mg/ml)常温下反应 3 ~ 5 min,搅拌,加入 2.6 mg/ml $Na_2S_2O_5$ 30 μl、5% KI 100 μl,最后终止反应,用 Sephaderx G-25 凝胶过滤法将^{125}I-BTXA 进行纯化。

1.2.2　^{125}I-BTXA 水凝胶制备　　4 ℃时,按 1∶3(体积比)将纯化的^{125}I-BTXA 和玻璃酸钠注射液在玻璃酸钠原装注射器中进行负压混合,约 50 min,制成^{125}I-BTXA 水凝胶。另按 1∶3(体积比)将^{125}I-BTXA 和生理盐水进行混合,配成^{125}I-BTXA 水溶液。

1.2.3　样品放射性强度测定　　分别在^{125}I-BTXA 水凝胶和^{125}I-BTXA 水溶液中按随机数字表法选取 5 段,每段各 0.1 ml,进行放射性强度测定。

1.3　实验动物分组

健康 SD 雌性大鼠 12 只(由中山大学实验动物中心提供,编号:0013271),体质量 0.15 ~ 0.20 kg,按随机数字表法分为 A、B 两组,分别在注射后 6 个月(A 组)、12 个月(B 组)处死,每组 6 只。采用自身双侧对照,右后肢腓肠肌内注射未示踪的 BTXA 水凝胶,为实验侧;左后肢腓肠肌内注射等体积生理盐水,为对照侧。另取未注射的 SD 大鼠 2 只,取其腓肠肌标本作空白对照。

1.4　实验模型建立

在 4 ℃下,将未示踪的 BTXA 水溶液(250 U/ml)与玻璃酸钠注射液进行负压混合,约 50 min,配备成 BTXA 水凝胶(125 U/ml)。按大鼠体质量予氯胺酮(50 mg/kg)和氯丙嗪(25 mg/kg)混合液腹膜腔内注射麻醉,在右后肢膝关节后侧中心与跟腱连线中点进针,深度约 2 mm 刺入腓肠肌,注射 BTXA 水凝胶 0.1 ml (12.5 U),对照侧腓肠肌注射 0.1 ml 生理盐水,常规喂养。

1.5　取材及检测

分别在注射后 6 个月(A 组)、12 个月(B 组)将大鼠用断颈法处死,取实验侧、对照侧及空白对照组腓肠肌标本,进行以下观察。

1.5.1　常规病理 HE 染色　　作后肢后外侧切口,钝性分离出胫神经,沿神经束走向,在神经纤维进入肌肉处切取小块肌肉组织,立即置于 10% 甲醛溶液中固定 24 h,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,作厚 5 μm 纵切片,常规病理 HE 染色观察。

1.5.2　肌细胞直径及截面积测定　　取腓肠肌中份肌肉,作厚 5 μm 横切片,HE 染色后用 VID Ⅲ半自动图像分析系统测定肌细胞直径及截面积。每个标本取 6 个切面,每个切面不重叠测定 6 个低倍镜视野中单个肌细胞的直径及横截面积。

1.5.3　1% 氯化金染色　　于胫神经进入腓肠肌处取小块肌肉组织,剪成 2 ~ 3 mm^3 大小,浸入 20% 甲酸溶液中固定 5 min,肌肉透明后移入 1% 氯化金溶液中染色 1 ~ 2 h, 20% 甲酸溶液还原 12 ~ 24 h,蒸馏水清洗,放入纯甘油溶液中保存,压片后光学显微镜下观察。

1.5.4　透射电镜超微结构观察　　将神经入肌处小块肌肉组织修成 1 mm × 1 mm × 3 mm 大小,先后置入 4% 戊二醛和 1% 锇酸溶液中双重固定,梯度乙醇脱水,环氧树脂 Epon 812 包埋,超薄切片后常规醋酸铀-枸橼酸铅双重染色,H-7500 透射电镜下观察腓肠肌超微结构的变化。

1.6　统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计学软件,用独立样本 t 检验比较0.1 ml ^{125}I-BTXA 水凝胶和^{125}I-BTXA 水溶液单位放射性强度,经配对样本 t 检验比较实验侧和对照侧肌细胞直径及截面积。

2　结果

2.1　^{125}I-BTXA 水凝胶和^{125}I-BTXA 水溶液放射性强度比较

两者平均放射性强度分别为(1 267 513.8 ± 48 450.0) cpm 和(1 251 496.2 ± 68 570.4) cpm,放射性强度比较无统计学意义(P = 0.681,表 1)。

表 1　^{125}I-BTXA 水凝胶和^{125}I-BTXA 水溶液放射性强度比较(cpm)

^{125}I-BTXA 编号	^{125}I-BTXA 水凝胶	^{125}I-BTXA 水溶液
1	1 251 147	1 294 697
2	1 325 021	1 145 509
3	1 290 171	1 257 247
4	1 276 027	1 235 023
5	1 195 203	1 325 005

2.2　BTXA 水凝胶对大鼠骨骼肌远期作用形态学观察

2.2.1　外观表现　　BTXA 水凝胶注射后 1 ~ 2 周实验侧的大鼠后肢开始明显萎缩,大鼠跛行,2 个月后逐渐恢复,观察至注射后 6 个月(A 组),大鼠实验侧后肢粗细与对照侧基本相同,12 个月(B 组)大鼠实验侧后肢粗细与对照侧外观无明显差别。

2.2.2　常规病理 HE 染色　　A、B 两组实验侧腓肠肌纤维排列整齐,肌纤维束未见明显萎缩,未见明显胶质纤维增生,周围及囊内神经完好,无明显脱髓鞘改变,与对照侧相比无明显差异。

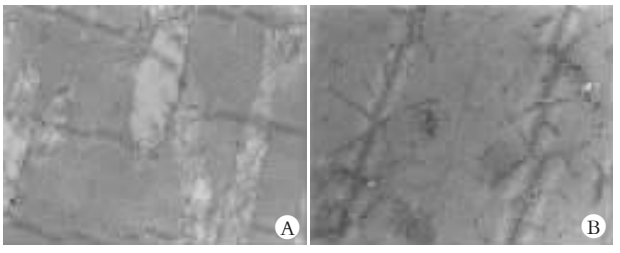
2.2.3　肌细胞直径及截面积测定　　经配对样本 t 检验,实验侧腓肠肌细胞直径及截面积与对照侧比较差异无统计学意义(P > 0.05,表 2)。

表 2　2 组腓肠肌细胞直径及截面积观察(n = 36, $\bar{x} \pm s$)

检测位置	A 组		B 组	
	直径(μm)	截面积(μm^2)	直径(μm)	截面积(μm^2)
实验侧	75.58 ± 7.18	4 518.30 ± 877.18	92.08 ± 5.57	6 676.59 ± 808.10
对照侧	81.67 ± 4.65	5 249.69 ± 592.52	92.50 ± 4.18	6 728.11 ± 604.06

2.2.4 1%氯化金染色 A、B组实验侧光镜下肌肉运动终板呈棕褐色“梅花形”结构,直径为23~30 μm,分布比较密集,肌纤维萎缩不明显,结缔组织无明显增生。运动终板在形态、着色、数量及分布上与对照侧无明显差异。

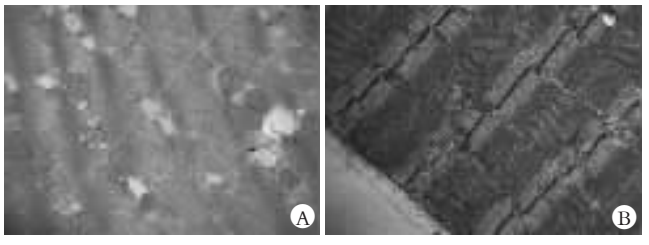
2.2.5 电镜超微结构观察 A组实验侧可见不可逆性局部肌丝,肌节排列紊乱甚至断裂、融合、缺失,三联管结构紊乱,Z线部分断裂,肌膜下线粒体嵴变短、肿胀甚至发生空泡变,肌浆网扩张,糖原颗粒变化不明显,运动终板结构正常,周围神经无脱髓鞘改变,肌纤维间微血管可见内皮细胞增生,血管内膜不光滑,但基底膜完整。其中有部分肌纤维中部见线粒体分布于Z线周围,呈“麦穗样”分布(图1)。A组对照侧超微结构未见异常。



A:线粒体肿胀,空泡变;B:线粒体分布于Z线周围,呈“麦穗样”分布

图1 腓肠肌注射BTXA水凝胶后6个月实验侧超微结构观察 (TEM×25 000)

B组实验侧可见更为明显弥漫性的肌节排列紊乱,肌膜下线粒体肿胀、空泡变,肌浆网增厚扩张,运动终板结构正常,周围神经无脱髓鞘改变,微血管增多(图2)。B组对照侧超微结构未见异常。



A:线粒体肿胀,肌浆网扩张;B:肌纤维结构未见异常

图2 腓肠肌注射生理盐水后12个月实验侧超微结构观察 (TEM×25 000)

3 讨论

运动神经元与其效应器——骨骼肌之间存在着相互依存的营养联系,运动神经元如与靶组织失去联系,则可能发生营养障碍甚至蜕变死亡;骨骼肌组织如去神经支配后,将因失去神经营养而发生退化、萎缩、变性和纤维化[3]。BTXA是肉毒杆菌产生的一种嗜神经外毒素,它可以迅速、可逆地与胆碱能神经末梢受体位点结合,进入神经元细胞质,激活酶促反应,特异性地阻断Ca^{2+}依赖性、含Ach包涵小体的释放作用,使受累肌肉发生去神经样改变,导致肌肉麻痹[4]。

传统的BTXA使用剂型常为BTXA水溶液,但由于其较容易向周围组织扩散,特别在眼外肌注射治疗斜视时,常会引起注射临近部位的肌肉麻痹。玻璃酸钠是透明质酸的钠盐形式,其结构简单,具有生物相容性好、高度黏弹性、无毒、无抗原性、无致敏性、无热源性、无致癌性、可生物降解等特性,目前作为一种可吸收的高分子生物医学材料被广泛应用于眼科手术及眼科制剂的赋形剂等。我们将BTXA与玻璃酸钠结合,改良为BTXA水凝胶注射剂型,通过碘标记检测分析,结果显示BTXA在水凝胶中的浓度与在生理盐水中相当。而玻璃酸钠较水溶液可增加BTXA药物局部黏附性和局部停留时间,减少药物向周围弥散,从而使BTXA作用范围更为明确。

既往有研究用BTXA水溶液注射兔骨骼肌,发现注药后2周内肌肉出现明显萎缩,3个月后恢复至原大小的80%[5]。这与本研究大鼠后肢早期外观变化基本符合,说明BTXA水凝胶同BTXA水溶液一样早期对骨骼肌有麻痹效应。有实验证明,BTXA麻痹骨骼肌后,肌肉萎缩,神经末梢轻度脱髓鞘改变,神经肌肉接头处会再形成以神经芽和洋葱球样结构为特征的神经再生[6],通常麻痹肌肉的功能完全从毒素效应中恢复过来需要6~9个月[7]。本研究大鼠腓肠肌注射6~12个月后外观未见萎缩,光镜下观察其组织病理形态也未发现异常改变,推测与神经纤维的营养性功能恢复有关。

研究表明,神经再生新生轴突必须与相应的靶器官建立准确的联系才能恢复正常的神经传导通路,而BTXA注射骨骼肌后,其去神经支配作用后神经再生时神经肌肉接头的解剖和生理并不能完全恢复到原来的状态[8]。我们观察到,BTXA水凝胶作用后6个月大鼠腓肠肌光镜下病理形态虽未见改变,但超微结构已经发生了不可逆的损伤,随着时间的延长,骨骼肌的结构并不能完全恢复到原始状态。由此可见,一方面BTXA对骨骼肌早期产生去神经支配效应,远期骨骼肌结构仍不能完全恢复,支持了某些疾病可经单次或多次BTXA注射得到永久性治愈;另一方面,临床BTXA治疗肌肉痉挛性疾病常需多次注射的原因,可能是由于神经支配骨骼肌的病理改变不充分,所以不能维持对肌肉的长期麻痹作用。本研究BTXA水凝胶对骨骼肌远期结构的影响,客观上证实了其临床治疗眼动力障碍性和神经肌肉障碍性疾病的可行性和长期有效性。关于BTXA水凝胶对骨骼远期功能影响则有待进一步研究。

参考文献：

[1] 陈静嫦，麦光焕. 肉毒杆菌毒素在眼科的临床应用现状[J]. 国外医学：眼科学分册，2004，28(5)：343－348.
[2] 陈静嫦，麦光焕，余新平，等. 兔眼内直肌注射肉毒杆菌毒素水凝胶的药物分布[J]. 眼科新进展，2007，27(3)：193－195.
[3] 李成仁，陈德英，李 巍，等. 神经干细胞移植对大鼠脊髓损伤后腓肠肌的影响[J]. 第三军医大学学报，2003，25(1)：36－39.
[4] Vittal H, Pasricha P F. Botulinum toxin for gastrointestinal disorders: therapy and mechanisms[J]. Neurotox Res, 2006, 9(2－3): 149－159.
[5] Ravch F, Hamdy R. Effect of a single botulinum toxin injection on bone development in growing rabbits [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2006, 6(3): 264－268.
[6] Childers M K. Targeting the neuromuscular junction in skeletal muscles [J]. Am J Phys Med Rehabil, 2004, 83(10 suppl): S38－S44.
[7] Crouch E R. Vse of botulinum toxin in strabismus[J]. Curr Opin Ophtholmol, 2006, 17(5): 435－440.
[8] Kranjc B S, Sketelj J, D'Albis A, *et al*. Long－term changes in myosin heavy chain composition after botulinum toxin a injection into rat medial rectus muscle [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(3): 3158－3164.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2008)10-0963-01

个案与短篇

双肺弥漫性网格状斑片状阴影1例

曹国强[1]，谢武文[2]，胡明碧[2]，王兴胜[1]，王方文[1]（[1]第三军医大学大坪医院野战外科研究所呼吸内科，重庆 400042；[2]重庆市巴南区人民医院内科，重庆 401320）

1 临床资料

患者，男性，52岁，机关干部。因咳嗽咯痰40余天，加重伴劳力性气促4 d以肺部间质性病变于2007年12月7日入我院。患者于2007年10月受凉后出现咳嗽，咯少许白色泡沫样痰液，伴有咽喉干痒不适。无发热、咯血胸痛，无潮热盗汗等不适。发病初曾自服“新康泰克”和“青霉素V钾”效果不佳。入院前15 d在私人诊所治疗6 d(具体用药不详)，患者咳嗽症状稍缓解，痰液有所减少，但咽喉部干痒明显，并出现劳力性气促。12月3日到当地区医院诊治，胸片提示两中上肺弥漫性密度增高阴影，诊断为：“高血压性心脏病，肺水肿”，给予利尿、降压和抗感染治疗。2 d后复查胸片原肺部病变无变化，胸部CT检查提示两肺间质性炎症，给予雾化吸入和抗感染治疗。4 d后再次复查胸片仍无明显变化。12月7日转入我院。患者既往无呼吸系统病史。吸烟30年，每日30支。发现高血压1年，没有规律服降压药物。入院体检：体温37.3 ℃，脉搏87次/min，呼吸21次/min，血压142/84 mmHg。口唇稍发绀，双侧锁骨上均可触及1枚直径约0.5 cm大小的淋巴结，质地软，无压痛，活动度好。双侧前胸近胸骨旁处深吸气末闻及细湿啰音。心率87次/min，律齐，无杂音。无杵状指(趾)。实验室检查：WBC 7.7×10^9/L，中性粒细胞0.562，红细胞 4.62×10^{12}/L，血红蛋白147 g/L，血小板 163×10^9/L。血气分析：pH 7.46。胸部64排CT：双肺纹理增多并呈网状 $p(CO_2)$ 36 mmHg，$p(O_2)$ 70 mmHg。肝肾功能正常，大小便常规正常。2007年12月7日胸部CT示，两肺可见斑片状、条索状和网状高密度影，边缘不清(图1)。血沉：15 mm/h。肿瘤标志物正常范围。12月18日肺功能检查：FVC 3.17 L，占预计值80%；FEV_1 2.67 L，占预计值83%；TLC 5.28 L，占预计值83%；DLCO 5.9 mmol·kPa^{-1}·min^{-1}，占预计值64%。

2007年12月10日纤维支气管镜检查：气管、支气管腔内可见少许黄色黏稠分泌物，吸引后各管腔通畅，黏膜完整光滑，未见管腔狭窄、阻塞与新生物。右肺中叶分泌物PAS染色发现可疑阳性颗粒。12月14日在局麻下行支气管肺泡灌洗(BAL)，右中叶注入37 ℃生理盐水50 ml，2 min后回吸，1 min后见少许丝状蛋白样物质溢出，之后液体变为微黄浑浊乳状，灌洗液离心沉渣PAS染色阳性(图2)，奥新蓝染色(AB)阴性，肺泡蛋白沉着症(pulmonary alveolar proteinosis, PAP)诊断成立。确诊后对该患者在局麻下进行BAL，每周1次，每次不超过2个肺叶，术前30 min口服可待因30 mg，肌肉注射杜冷丁50 mg，术中高浓度吸氧。每次灌洗总量不超过500 ml，灌洗时监测生命体征和动脉血氧饱和度(SaO_2)，当 $SaO_2<85\%$ 时停止灌洗，等 SaO_2 恢复到95%时再灌洗。灌洗后3 d给予静脉注射抗生素预防感染。住院期间分别对各叶段灌洗2次，患者呼吸困难基本消失。2008年1月14日肺功能检查：FVC 3.54 L，占预计值的89%；FEV_1 2.92 L，占预计值90%；TLC 5.95 L，占预计值95%；DLCO 6.9 mmol·kPa^{-1}·min^{-1}，占预计值75%。随访1个月患者无明显不适。目前，此患者仍在随访中。

2 讨论

肺泡蛋白沉着症最早是由Costello等[1]报道。截止到2005

（下转968页）

作者简介：曹国强，男，河北省景县人，博士，主任医师，教授，主要从事气道炎症方面的研究，发表论文35篇。电话：(023)68757781

收稿日期：2008-04-01；修回日期：2008-04-08