坐骨神经损伤后雏菊叶龙胆的修复作用实验研究

刘 鑫[1],藏金月[2],辛娟娟[2],马天怡[2],霍东升[2],蔡志平[2] (1. 内蒙古包钢第三职工医院外二科,内蒙古 包头 014010;2. 内蒙古包头医学院人体解剖学教研室,内蒙古 包头 014060)

[摘 要] **目的** 观察雏菊叶龙胆是否对坐骨神经损伤后有促进功能恢复的作用,其中是否有睫状神经营养因子的参与。**方法** 雄性 Wistar 大鼠 225 只,右侧坐骨神经离断后显微镜下缝合。造模后随机分为对照组、雏菊叶龙胆 25 mg 组、50 mg 组、75 mg 组和甲钴胺组 5 组。对照组生理盐水注射,其他组相应剂量的雏菊叶龙胆及甲钴胺注射,1、3、5 周测定神经传导速度及腓肠肌肌细胞截面积,免疫组化分析睫状神经营养因子(CNTF)阳性细胞比率。**结果** 雏菊叶龙胆 50 mg、75 mg 组与对照组、甲钴胺组神经传导速度相比有明显差异,雏菊叶龙胆 25 mg 组与 75 mg、50 mg 组相比有明显差异($P=0.025$)。3 周时对照组、甲钴胺组、雏菊叶龙胆 25 mg、50 mg、75 mg 组腓肠肌肌细胞截面积分别为:(455.06 ± 29.38) μm^2、(679.03 ± 81.48) μm^2、(465.31 ± 71.55) μm^2、(670.24 ± 91.26) μm^2、(669.28 ± 78.54) μm^2,对照组、雏菊叶龙胆 25 mg 组与其他组比较有显著差异($P<0.05$)。3 周时各组睫状神经营养因子免疫组化可见雏菊叶龙胆 25 mg 组和对照组与雏菊叶龙胆 50 mg、75 mg 组比较结果有统计学差异。**结论** 雏菊叶龙胆可促进坐骨神经损伤后功能恢复,可促进神经功能恢复中有睫状神经营养因子参与。

[关键词] 雏菊叶龙胆;坐骨神经;神经再生;睫状神经营养因子
[中图分类号] R745.42 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)02-0115-03

Experimental study of Bellidifolin in enhancing rehabilitation of injuried sciatic nerve

LIU Xin, ZANG Jin-yue, XIN Juan-juan, MA Tian-yi, HUO Dong-sheng, CAI Zhi-ping (the Second Surgery Department, Inner mongolia Baogang No. 3 Hospital, Baotou Inner mongolia 014010, China)

Abstract: Objective To study the rehabilitation effect of Bellidifolin for injuried sciatic nerve, and to explore whether ciliary neurotrophic factor (CNTF) is involved in this mechanism. **Methods** The right sciatic nerver of 225 male wistar rats was cut and sewed under microscopy. Rats were devided into 5 groups, as control group, Bellidifolin 25 mg group, 50 mg group、75 mg group and Mecobalamin group. The control group were injected sodium chloride, other groups were injected different dose of Bellidifolin and Mecobalamin. 1, 3 and 5 weeks later, the motor nerve conduction velocity (MNVC) and gastrocnemius muscle cross - sectional area were detected, CNTF positive area were analysed by immunohistochemical method. **Results** There were differences among bellidifolin groups, control group and mecobalamin group in Nerve conduction velocity. Within Bellidifolin groups, 50 mg group compared with 25 mg and 75 mg groups, there were statistically differences ($P=0.025$). Three weeks after operation, gastrocnemius muscle cross-sectional area of control group, mecobalaming grop and Bellidifolin 25 mg group, 50 mg group, and 75 mg group were (455.06 ± 29.38), (679.03 ± 81.48), (465.31 ± 71.55), (670.24 ± 91.26) and (669.28 ± 78.54) respectively, compared with control group and Bellidifolin 25 mg group, others had a significant difference ($P<0.05$). CNTF expression showed billidifolin 50 mg group are higher than others ($P<0.05$). **Conclusion** Bellidifolin can improve the rehabilitation of injured sciatic nerve. CNTF is involved in this mechnism.

Keywords: Bellidifolin; sciatic nerve; nerve rehabilitation; ciliary neurotrophic factor

坐骨神经损伤临床比较多见,发病率高、症状明显、危害较大[1]。因此,坐骨神经损伤后如何能有效促进损伤神经功能再生,提高修复治疗效果,一直是临床和基础的关注焦点,也是一个迄今没有完全解决的难题。中药治疗有着整体和局部双重兼顾的优势,其过程也符合神经损伤修复的综合过程[2],是非常具有发展前景的治疗方式。睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)能促进多种运动神经元的存活,具有多种生物活性[3],在神经系统发育、分化和神经损伤修复过程中具有重要意义[4]。雏菊叶龙胆(Bellidifolin)为龙胆科 1 年生植物,全草入蒙药,蒙古族医学上作为"桑地格"使用,有清热解毒的功效。近些年发现,该药对脑出血、脑血栓等脑血管疾病也有很好的疗效[5-6]。尽管许多研究都报道其对中枢神经系统功能恢复有一定的促进作用,但对周围神经功能恢复方面的研究尚处于起步阶段,国内外的报道并不多见。因此,我们以大鼠坐骨神经损伤模型来进行观察,探讨雏菊叶龙胆是否对神经损伤有促进功能修复的作

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201402002
[基金项目] 2012 年内蒙古自然科学基金面上项目(2012MS1103)
[通讯作者] 蔡志平,硕导,教授,电话:(0472)7167887
[收稿日期] 2014-01-02 [修回日期] 2014-01-30

用,并探讨其作用机制中是否有局部释放睫状神经营养因子的机制参与。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

取 2 月龄清洁成年雄性 Wistar 大鼠,体质量 250 ~ 300 g,共 225 只。动物及饲料均购于内蒙古大学动物实验中心(SCXK(蒙)2002-0001),实施手术前先进行适应性饲养 3 ~ 5 d。雏菊叶龙胆由包头医学院药学院提供,用生理盐水配成 25 mg/kg、50 mg/kg、75 mg/kg 不同浓度的药液,置于 4 ℃条件下保存备用。甲钴胺片购于北京星昊医药有限公司,每片 0.5 mg,用生理盐水配制成 100 μg/kg 的溶液。

1.2 实验方法

1.2.1 坐骨神经损伤模型的制备 10% 水合氯醛进行腹腔注射麻醉(3 mL/kg),仰卧固定、脱毛、消毒,无菌条件下右下肢股后纵切口约 1.5 cm,分离骨骼肌,充分显露并游离坐骨神经,于梨状肌下缘 0.8 cm 处离断,缝合神经外膜并做标记,逐层关闭切口。所有操作均由 1 人完成。术后观察动物清醒后,分笼饲养,勤换垫料以防止足底溃疡发生。

1.2.2 实验动物分组 将造模成功的大鼠以每组 45 只随机数字表法分为 5 组。实验组以 25 mg/kg、50 mg/kg、75 mg/kg 的剂量分别腹腔注射雏菊叶龙胆,连续 5 周,每天 1 次。甲钴胺组注射 100 mg/kg 甲钴胺,该药广泛应用于周围神经病的临床治疗;对照组给予同样剂量生理盐水。各组又都以右侧为损伤侧,左侧为健康对照进行对比。

1.2.3 检验指标及方法 于第 1 周、3 周、5 周时重新麻醉动物,将原来的切口切开,暴露出坐骨神经吻合口处。采用 BL-420 F 电生理仪检测记录神经平均传导速度(motor nerve conduction velocities,MNCV)。取手术侧腓肠肌,用 4% 多聚甲醛溶液进行固定,脱水、石蜡包埋、切片及 HE 染色。利用 Imagin-J 图像软件放大 1 000 倍下进行测量计算肌细胞截面积,求其平均值。术后 3 周时,取切口吻合处远端坐骨神经组织 5 mm,正常侧也取相应节段的神经组织,用 4% 多聚甲醛 PBS 液进行固定,脱水、透明、石蜡包埋、切片及烤片,按照购买的免疫组化试剂盒说明方法,对切片的 CNTF 蛋白进行检测,摄取图像。每组随机取 15 张切片,显微镜下图像分析软件测定阳性细胞面积与总面积比值,分析计算每组细胞的阳性比率。

1.3 数据统计及分析

统计数据结果用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS 15.0 软件包进行统计分析。采用两样本均数差别的显著性检验(t 检验),方差不齐时采用 t 检验,α 取 0.05。以 $P < 0.05$ 为显著性检验水准。

2 结果

2.1 各组神经传导速度测定值

第 1、3、5 周检测记录神经平均传导速度结果见表 1。各组大鼠的坐骨神经平均传导速度检测中,生理盐水组在 1、3、5 各周都较低,而甲钴胺组传导速度值较高,与生理盐水组、雏菊叶龙胆 25 mg 组相比,差异有明显的统计学意义($P = 0.019$)。但在各时间点雏菊叶龙胆 25 mg 组与生理盐水组相比,差异不明显,还不能说明这二者之间有统计学差异($P = 0.17$)。而雏菊叶龙胆 50 mg 组与 75 mg 组相比,差异也没有明显统计学意义。而这 2 组与甲钴胺组相比,差异有统计学意义($P = 0.035$)。

表 1 各时间段坐骨神经平均传导速度($\bar{x} \pm s$, $n = 15$, m/s)

组别	1 周	3 周	5 周
生理盐水组	13.25 ± 3.70	15.58 ± 3.06	19.69 ± 2.29
甲钴胺组	25.46 ± 2.41 *	26.48 ± 3.08 *	28.12 ± 3.01 *
雏菊叶龙胆 25 mg 组	14.51 ± 2.24	16.07 ± 2.11	21.19 ± 1.78
雏菊叶龙胆 50 mg 组	19.84 ± 2.48 *#	19.56 ± 3.43 *#	24.24 ± 3.97 *#
雏菊叶龙胆 75 mg 组	17.25 ± 3.43 *#	16.92 ± 2.70 *	20.16 ± 2.84 *#

*:与生理盐水组和雏菊叶龙胆 25 mg 组比较,$P < 0.01$;#:与生理盐水组、甲钴胺组和雏菊叶龙胆 25 mg 组比较,$P < 0.05$

2.2 腓肠肌肌细胞截面积测量结果

利用 Imagin-J 图像分析系统对各组大鼠不同时间的腓肠肌 HE 染色切片(图 1)中肌细胞截面积进行测定,结果见表 2。术后 3 周可见甲钴胺组、雏菊叶龙胆 50 mg 组与 75 mg 组细胞截面积较大。细胞排列整齐,紧密。生理盐水组可见细胞排列紊乱,细胞间隙增加。其中甲钴胺组、雏菊叶龙胆 50 mg 组、75 mg 组与其他组比较,差异具有统计学意义($P = 0.016$),而这 3 组之间无显著性差异。

表 2 各组不同时间腓肠肌细胞截面积($\bar{x} \pm s$, $n = 15$, μm^2)

组别	1 周	3 周	5 周
生理盐水组	443.19 ± 80.33	455.06 ± 29.38	499.61 ± 76.41
甲钴胺组	672.90 ± 48.22 *	679.03 ± 81.48 *	722.33 ± 57.38 *
雏菊叶龙胆 25 mg 组	454.39 ± 50.04	465.31 ± 71.55	488.25 ± 70.28
雏菊叶龙胆 50 mg 组	605.84 ± 85.12 *	670.24 ± 91.26 *	713.58 ± 62.49 *
雏菊叶龙胆 75 mg 组	644.92 ± 60.23 *	669.28 ± 78.54 *	693.32 ± 59.64

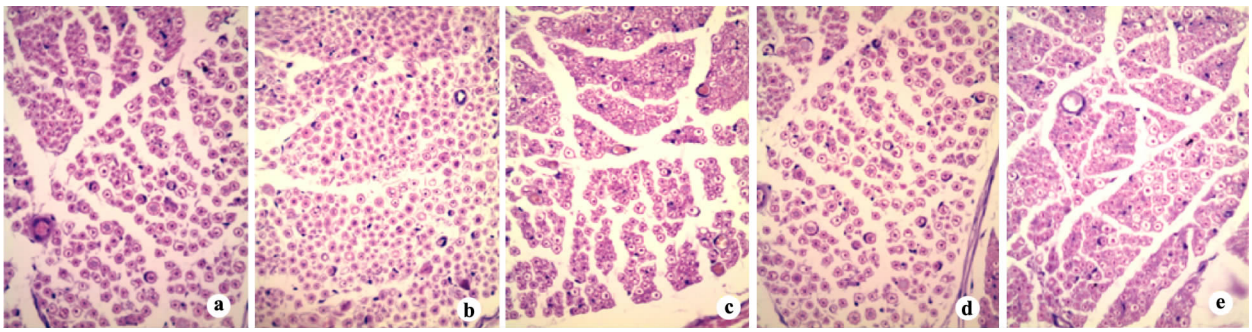
*:与其他组比较,$P < 0.05$

2.3 免疫组化检测 CNTF 结果

各组分别于第 3 周行免疫组织化学方法检测坐骨神经中 CNTF,检测结果中阳性细胞占细胞总面积的比例结果见图 2。由图中可见生理盐水组与雏菊叶龙胆 25 mg 组比较,2 者之间没有显著统计学差异,这 2 组与甲钴胺组、雏菊叶龙胆 50 mg 组、75 mg 组比较,差异有统计学意义($P = 0.033$),而在甲钴胺组与雏菊叶龙胆 50 mg 组、75 mg 组之间相比,差异没有统计学意义($P = 0.065$)。

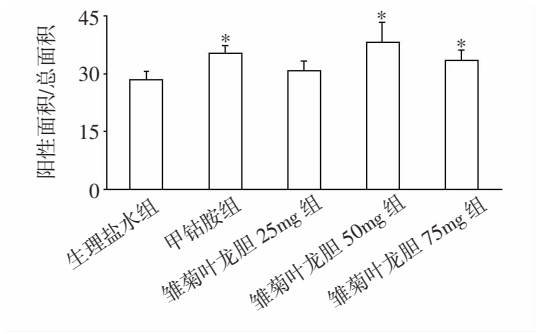
3 讨论

平均传导速度作为电生理的一项指标,其值大小与纤维直径、髓鞘厚度及成熟程度有关[7]。神经胶质细胞包绕轴突形成髓鞘和神经膜,在神经纤维的再生修复中起诱导营养及促进轴突生长和成熟的作用[8]。坐骨神经损伤后,肌细胞直径及其截面积随失神经支配时间的延长呈进行性下降,是肌肉萎缩的可靠形态



a:生理盐水对照组;b:甲钴胺组;c:雏菊叶龙胆 25 mg 组;d:雏菊叶龙胆 50 mg 组;e:雏菊叶龙胆 75 mg 组

图 1　腓肠肌 HE 染色(×200)



*:与生理盐水和雏菊叶龙胆 25 mg 组比较,$P<0.05$

图 2　各组 CNTF 阳性细胞比率

学指标。本实验中雏菊叶龙胆各剂量组与甲钴胺组相比,甲钴胺对改善坐骨神经离断缝合术后功能恢复方面作用相对要优于雏菊叶龙胆 25 mg 组,可能因为临床应用雏菊叶龙胆也是组入方剂,单独用药效果不如联合其他中、蒙药使用效果好。提示本实验室进一步的研究可以在蒙药的组合作用方面进行深入研究。

雏菊叶龙胆 25 mg 组的效果与其他 2 组相比,在提高实验动物神经传导速度和腓肠肌肌细胞截面积方面,效果相对差一些,结果有明显统计学差异。考虑该药物的作用也有一定的浓度范围[9-11],低于此浓度则药物不能发挥作用,与注射生理盐水的作用无显著统计学差异。50 mg 与 75 mg 剂量组相比,更大剂量可见效果与 50 mg 组作用相当,还不能说明剂量增加后作用更强,2 者相比没有明显统计学差异。可能是因为药物本身选择的浓度范围比较大,进一步可适当用不同剂量细分,深入探索药物的量效关系,为临床有效用药积累实验资料。通过本实验的研究发现,雏菊叶龙胆 50 mg、75 mg 组在促进神经功能恢复的过程中,神经远端的 CNTF 含量增高,提示在雏菊叶龙胆促进神经生长的过程中有 CNTF 局部释放增加的过程,为进一步研究其作用机理奠定了基础。

[参考文献]

[1] 郑玉涛,叶维健. 诊疗坐骨神经损伤的局部解剖学基础及临床分析[J]. 局解手术学杂志,2008,17(5):322 - 324.

[2] Toth CC, Willis D, Twiss JL, et al. Locally synthesized calcitonin gene-related Peptide has a critical role in peripheral nerve regeneration[J]. Neuropathol Exp Neurol, 2009, 68(3): 326 - 337.

[3] McDonald JR, Ko C, Misner D, et al. Expression and characterization of recombinant human ciliary neurotrophic factor from E. Coli [J]. Blochem Biophys Acta, 1991, 1090(1): 70.

[4] Lindsay RM, Weigand SJ, Altar CA, et al. Neurotrophic fators: from molecule to man[J]. Trends Neurosci, 1994, 17(5): 182 - 190.

[5] 张剑辉,宋慧君,李淑媛,等. 雏菊叶龙胆酮对局灶性脑缺血性操作的保护作用及机制探讨[J]. 中国药理学通报,2005,21(2):220 - 224.

[6] 宋慧君,张建辉,闫　平,等. 雏菊叶龙胆酮对缺血性脑损伤保护作用的实验研究[J]. 大连医科大学学报,2007,29(2):110 - 112.

[7] 周　鹏,董乐乐,杨占君,等. 人参皂甙 Rg1 促大鼠坐骨神经再生的初步研究[J]. 内蒙古医学杂志,2011,43(4):413 - 415.

[8] 陈　惠,向唯聂,杨耀防,等. 微囊化兔坐骨神经组织细胞移植对脊髓损伤后大鼠 GDNF 表达的影响[J]. 局解手术学杂志,2011, 20(6):602 - 605.

[9] Kim BS, Choy WS, Chung MS, et al. Modified end-to-side neurorrhaphy enhances axonal sprouting: a motor functional and morpho-logical study [J]. Orthopedics, 2007, 30(10): 853 - 858.

[10] Song C, Oswald T, Yan H, et al. Repair of partial nerve injury by bypass nerve grafting with end-to-side neurorrhaphy[J]. Reconstr Microsurg, 2009, 25(8): 507 - 515.

[11] Yu WR, Liu T, Fehlings TK, et al. Involvement of mitochondrial signaling pathways in the mechanism of Fas-mediated apoptosis after spinal cord injury[J]. Eur Neurosci, 2009, 29(1): 114 - 131.

(编辑:周小林)