维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2003年第12卷第5期
J Regional Anat & Operative Surg, 2003, Vol.12, No.5

大鼠坐骨神经端侧吻合术后IGF-IR表达的实验研究

许愿忠，易西南，曾志成
（中南大学湘雅医学院人体解剖与神经生物学系，湖南 长沙 410013）

［摘 要］**目的** 检测坐骨神经端侧吻合后IGF-IR的表达规律，探讨其在促进侧芽生长中的作用。**方法** 大鼠胫、腓神经端侧吻合，分为术后3、7、14、21、28 d五组，免疫组织化学染色检测IGF-IR，并结合侧芽生长情况进行分析。**结果** ①脊髓IGF-IR术后表达增加，7 d最高；②背根节IGF-IR 3 d和7 d表达最高，随后下降，28 d时仍高于对照侧；③HE染色显示，术后14 d吻合口有少量再生纤维通过，28 d时再生纤维数量明显增多。**结论** 端侧吻合后IGF-IR的表达与侧芽生长过程有关，促进和维持侧芽再生。

［关键词］IGF-IR；端侧吻合；周围神经；侧芽生长
［中图分类号］Q954.67+4 ［文献标识码］A ［文章编号］1672-5042(2003)05-0323-03

The experimental study of IGF-IR expression after end-to-side neurorraphy of rat sciatic nerve

XU Yuan-zhong, YI Xi-nan, ZENG Zhi-cheng
(Applied Anatomy Laboratory, Department of Anatomy and Neurobiology, Xiang-Ya Medical School, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: Objective To study the law of IGF-IR expression and its role in promoting collateral sprouting after sciatic nerve end-to-side neurorraphy. **Methods** After end-to-side neurorraphy of rat tibial nerve and peroneal nerve, IGF-IR expression both in DRG and in spinal cord were detected with immnohistochemistry technique after 3, 7, 14, 21 and 28 days of the operation and analyzed according to collateral sprouting results. **Results** ①IGF-IR express increased in spinal cord and attach vertex after 7 days of the operation; ②In dorsal root ganglion, IGF-IR maximal expressed at first two time points after the operation, and then declined but higher than normal; ③Hematoxylin & Eosin staining revealed that a few regenerated axons appeared at neurorraphy site after 14 days, and manifolded significantly after 28 days of the operation. **Conclusion** IGF-IR expression is correlated with collateral sprouting after end-to-side neurorraphy and can promote and maintain the regeneration process.

Keywords: IGF-IR; end-to-side neurorraphy; peripheral nerve; collateral sprouting

周围神经端侧吻合术是将损伤神经远端缝合到邻近健康神经干的显微手术方法。端侧吻合后健康神经干可发出侧芽进入损伤神经并重新支配靶器官[1]。在残端不可用、缺损太长、肿瘤切除或根性撕脱无法行传统端-端吻合的神经损伤病例，端侧吻合方法的出现给其康复带来了希望。类胰岛素生长因子(IGFs)是具有刺激生长作用和胰岛素样代谢活性的多肽，包括IGF-Ⅰ和IGF-Ⅱ两种亚型，其主要通过与其Ⅰ型酪氨酸激酶受体结合发挥生物学效应[2]。已有研究证明，在周围神经端侧吻合术中应用外源性IGFs可以促进神经侧芽再生和肢体功能恢复[3-4]。但端侧吻合后IGFs受体特别是其Ⅰ型受体的时空变化情况、在侧芽再生过程中的作用及机制目前尚不是十分清楚。本文实验利用大鼠坐骨神经端侧吻合模型，检测其Ⅰ型受体(包括α、β亚单位，IGF-IRα)在不同时间和部位的表达规律，为更好的理解其参与侧芽再生过程及提高术后功能恢复提供帮助。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康SD大鼠30只，雌雄不限，体重(200±50)g，随机分为3、7、14、21和28 d组，每组6只。

1.2 动物模型

2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(0.2 ml/50 g体重)，无菌操作，右下肢股中部皮肤切口约3 cm，手术显微镜下暴露、游离坐骨神经，于胫、腓神经分叉下约3 mm切断腓总神经，近端结扎、翻转180°固定于股内侧肌；分叉下约10 mm处胫神经侧面外膜开窗，直径约2 mm；于开窗处用9/0医用尼龙缝合线无张力外膜端侧缝合，远端腓总神经与胫神经缝合3针，间距120°；手术区应用适量青霉素粉剂，分层缝合肌肉、皮肤；左下肢作为正常对照侧，不进行任何手术，分笼饲养。动物分别存活3、7、14、21、28 d。

1.3 标本准备

腹腔麻醉后开胸经左心室插管，先用0.9%生理盐水100 ml冲洗、然后4%多聚甲醛磷酸缓冲液200 ml灌注固定，取脊髓腰骶膨大、两侧相应节段背根节(L_3-L_6)和吻合口段坐骨神经，4 ℃固定过夜，浸糖(20%、30%蔗糖)至标本沉底，连续冰冻切片，片厚20 μm。

［基金项目］湖南省卫生厅资助课题(B2003-007)
［收稿日期］2003-10-02 ［修回日期］2003-11-26

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.4 免疫组织化学

漂浮法：3% H_2O_2 处理 15 min，漂洗 3×10 min，5% BSA + 0.3% Triton-100 封闭 1 h，IGF-IRα 多克隆兔抗 + 0.1% Triton-100 孵育 4 ℃ 冰箱过夜（武汉博士德公司产品 1:200），洗 3×10 min，羊抗兔 IgG(1:200，vector 公司)2 h，洗 3×10 min，SABC 液 1 h(SABC 试剂盒系 vector 公司产品 1:200)，洗 3×10 min，0.05% DAB + 0.03% H_2O_2 显色 5～30 min，贴片，晾干，梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片（漂洗液均为 0.01 mol PBS）。设用 0.1 mol PB 代替一抗作为阴性对照。

1.5 HE 染色

神经吻合口段纵切片，常规苏木素-伊红(HE)染色。

1.6 结果观察及数据处理

观察 DRG 和脊髓切片在不同时相点时 IGF-IRα 的表达情况，观察吻合口处再生纤维的生长情况。免疫组化结果采用病理图像分析系统(HPIAS-1000 型)，每只动物实验侧脊髓和背根节切片每隔 10 张取 1 张，计数各时相点 IGF-IRα 阳性细胞数、数据收集、整理，以均数 ± 标准差表示，采用 SPSS10.0 软件包处理，ANOVA 分析。

2 结果

2.1 大体观察

术后各组大鼠右下肢运动困难，脚趾屈曲并拢，展趾不能，呈现腓神经功能丧失体征；术侧胫前肌轻度萎缩，对照侧胫前肌圆润、饱满；各组动物术后无感染发生，14、21 和 28 d 组部分动物有溃疡发生。标本取材时，各组吻合口局部有轻微粘连，3 d 时胫、腓神经吻合点清晰可见，两者未完全融合；7、14、21 d 各组胫、腓神经完全融合，吻合口模糊；28 d 组吻合口处光滑，神经外膜融为一体。

2.2 术侧脊髓、背根节 IGF-IRα 免疫组化阳性细胞数量变化

阴性对照为阴性。脊髓、背根节细胞计数如下，对照侧脊髓和背根节均有少量 IGF-IRα 表达阳性细胞，分别为(7.2 ± 1.4)和(20.2 ± 1.3)。其余各组脊髓、背根节计数分别为 3 d(18.3 ± 2.0)、(40.1 ± 1.4)，7 d(30.3 ± 1.8)、(40.4 ± 1.2)，14 d(22.0 ± 1.4)、(36.2 ± 0.9)，21 d(19.7 ± 1.3)、(29.6 ± 1.3)，28 d(18.8 ± 1.5)、(28.9 ± 0.9)(图 1～2)。统计学分析显示，各组脊髓和背根节阳性细胞数方差齐性分析 P 值分别为 0.063 和 0.214，以 $\alpha = 0.05$ 水准不拒绝 H0，认为各组阳性细胞数目的方差齐。q 检验(S-N-K)脊髓、背根节术后各组 IGF-IRα 阳性细胞数目与对照组相比均具有显著性差异（$P < 0.01$），各时相点组间比较显示，脊髓：3 d 和 28 d 组之间及 21 d 和 28 d 组之间差异无统计学意义（P 值分别为 0.349、0.097，大于 0.05），其余各组间相比差异均有统计学意义（$P < 0.05$）；背根节：除 3 d 和 7 d 组以及 21 d 和 28 d 组差异无统计学意义（P 值为 0.317 和 0.088，大于 0.05）外，其余各组相比差异均有统计学意义（$P < 0.05$）。

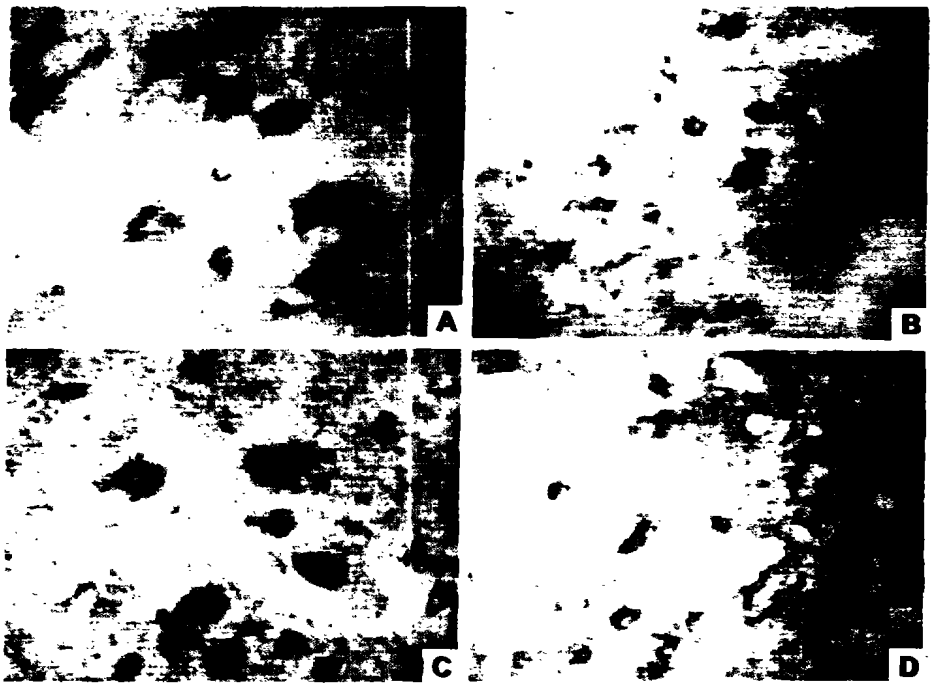


图 1 A：术后 7 d 脊髓前角 IGF-IRα 阳性神经元（×500）；B：术后 7 d 脊髓后角 IGF-IRα 阳性神经元（×500）；C：术后 28 d 脊髓前角 IGF-IRα 阳性神经元（×500）；D：术后 28 d 脊髓后角 IGF-IRα 阳性神经元（×500）

2.3 HE 染色观察

术后 3 d，腓神经远端与胫神经干未完全融合，有大量炎性细胞浸润；7 d 时腓神经远端与胫神经干完全融合，炎性细胞浸润减少，但未见有再生侧芽轴突穿过吻合口；术后 14 d，有少量再生纤维通过吻合口进入腓神经远端，纤维排列较紊乱；28 d 时可见有大量再生纤维通过吻合口向腓神经远端生长，纤维排

维普资讯 http://www.cqvip.c

列较为整齐。

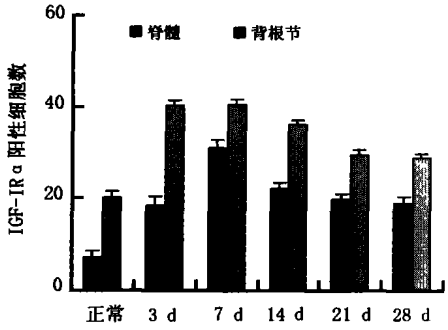


图2 端侧吻合术后各时相点 IGF-IRα 阳性细胞数

3 讨论

端侧吻合术后长入腓总神经的再生纤维来源有3种可能:①胫神经干发出的侧芽,②腓神经残端的轴突生芽再进入远端,③胫神经开窗时损伤的少数轴突的生长锥[5-6]。本实验在施行吻合手术时将腓神经残端结扎、翻转180°固定于股内侧肌,并在分叉下10 mm进行吻合,避免了腓神经近端轴突重新生芽再生到达远端的情况;胫神经外膜开窗在高倍手术显微镜下进行,利用显微缝合针将其扯破,基本上避免了对胫神经轴突的损伤,所以本文观察到的通过吻合口的再生轴突主要是由胫神经发出的侧芽。

IGFs(IGF-I、IGF-II)是一种终生表达的生长因子,在促进细胞增殖和分化细胞的存活方面起着非常重要的作用。在周围神经损伤后应用外源性IGFs能明显的促进损伤神经的再生效果,而端侧吻合修复长段神经缺损时可以促进再生轴突生芽进入受损神经远段。IGFs受体包括I和II两种亚型,其主要通过与I型酪氨酸激酶受体结合激活细胞内磷酸化级联过程,IGF-IIR在信号通路方面的生物学重要性目前还不完全清楚[2]。本实验观察到IGF-IR在端侧吻合术后3 d既在背根节内表达急剧升高(主要为小细胞),并一直持续到术后7 d。3 d时脊髓IGF-IR阳性表达细胞也开始增加,主要为前角前外侧运动神经元,后角感觉神经元仅出现个别阳性细胞;术后7 d是IGF-IR表达最高峰,此时前后角呈现大量阳性神经元,这与Fortes等[7]的实验观察结果相一致。结合HE染色结果,3 d和7 d时尚未见有胫神经侧芽进入腓神经远端,说明此时机体IGFs分泌增加,处于激活正常胫神经干在远端溃变腓神经产生的各种因子协同引导下的生芽信号阶段。14 d时有少量侧芽纤维通过吻合口进入腓神经,而此时IGF-IR的表达在脊髓和背根节均已开始下降,说明IGF-IR在参与启动侧芽生长机制后,其生物学效应下调,但直到术后28 d IGF-IR的表达仍高于正常生理状态下的表达,说明在启动侧芽生长信号后还需要一定程度的IGFs发挥作用维持神经再生过程,这可能是由于腓总神经切断后远端内的雪旺细胞在经历了Wallerian变性的初级阶段后,需要IGF-IR介导的生物效应帮助其恢复正常的生理功能,因为IGFs可以阻滞损伤后失去顺行运输的营养因子作用的雪旺细胞的凋亡[8];同时还可能是术后28 d侧芽再生过程还没有完全结束,再生纤维还没有完全成熟,而IGF-IR的信号传导作用也是轴突损伤后再髓鞘化过程所必需的[9]。

综上所述,IGF-IR在端侧吻合后的侧芽再生过程中发挥着重要的作用,参与介导正常胫神经侧芽生长信号的启动;当侧芽开始生长后,IGF-IR表达相应下降,但仍保持在一定的高水平维持侧芽生长过程。实验结果提示术后尽早应用外源性IGFs有利于提高端侧吻合的侧芽再生率,而较长期的应用IGFs则有利于再生轴突的成熟。

[参考文献]

[1] Zhang Z, Soucacos PN, Jinyan BO, et al. Evaluation of collateral sprouting after end-to-side coaption using a fluorescent double labeling technique[J]. Microsurgery, 1999, 19(6): 281-286.

[2] Schmid C. Insulin-like growth factors[J]. Cell Biol Int, 1995, 19(5): 445-457.

[3] Tiangco DA, Papakonstantinou KC, Mullinax KA, et al. IGF-I and end-to-side nerve repair: a dose-response study[J]. J Reconstr Microsurg, 2001, 17(4): 247-256.

[4] Caplan J, Tiangco DA, Terzis JK. Effects of IGF-II in a new end-to-side model[J]. J Reconstr Microsurg, 1999, 15(5): 351-358.

[5] 易西南,李昌琪,李明波,等. 周围神经端侧吻合再生纤维来源的实验研究[J]. 中国临床解剖学杂志,2001, 19(3): 252-253.

[6] Al-Qattan MM. Terminolateral neurorrhaphy: review of experimental and clinical studies[J]. J Reconstr Microsurg, 2001, 17(2): 99-108.

[7] Fortes WM, Noah EM, Liuzzi FJ, et al. End-to-side neurorrhaphy: evaluation of axonal response and upregulation of IGF-I and IGF-II *in a non-injury model*[J]. J Reconstr Microsurg, 1999, 15(6): 449-457.

[8] Delaney CL, Cheng HL, Feldman EL. Insulin-like growth factor-I prevents caspase-mediated apoptosis in Schwann cells[J]. J Neurobiol, 1999, 41(4): 540-548.

[9] Mason JL, Xuan S, Dragatsis I, et al. Insulin-like growth factor (IGF) signaling through type 1 IGF receptor plays an important role in remyelination[J]. J Neurosci, 2003, 23(20): 7710-7718.

(编辑:兰阳军)