DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.05.014
第26卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 5
408 2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)05-0408-04

睫状神经营养因子对大鼠视神经不全损伤后轴浆运输的影响

李 灿,王 一 (第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨睫状神经营养因子(CNTF)对大鼠视神经(optic nerve, ON)中度不全损伤后轴浆运输的影响。方法 成年雌性Wistar大鼠50只,用无创血管夹于球后1.5 mm钳夹ON 10 s,造成ON中度损伤,于伤后即刻、伤后1、2、4和8周CNTF治疗组玻璃体腔内注射人重组睫状神经营养因子(rhCNTF)2 μg,对照组注射等量双蒸水。分别在不同的时间(1、2、4、8和12周)应用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)观察ON不全损伤后顺行轴浆运输的变化。结果 伤后1~2周在损伤点后HRP顺染纤维度骤然下降,于上丘均未见HRP显色;伤后4周ON及上丘顺染密度逐渐增强至8周达高峰,对照组ON损伤远端顺染纤维度恢复至正常的12.87%,而治疗组至31.86%。两组间于ON损伤远端和上丘HRP顺染密度均有非常显著性差异($P<0.01$)。结论 CNTF可改善ON不全损伤后轴浆运输状况,促进ON结构的恢复。

关键词:视神经;不全损伤;CNTF;HRP;轴浆运输
中图法分类号:R338;R349.32;R651.3 文献标识码:A

Effects of rhCNTF on axoplasmic transport following incomplete injury of optic nerves of adult rats

LI Can, WANG Yi (Ophthalmology Research Center; Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on the recovery of axoplasmic transport following incomplete injury of the optic nerves (ON) of the adult rats. **Methods** Moderate injury of the optic nerves of 50 adult female rats was induced by crushing the optic nerves for 10 seconds using hemostatic forceps. Recombinant human CNTF (rhCNTF) was injected into the vitreous cavity of CNTF-treated group at 0, 1, 2, 4, and 8 weeks after injury. However, the same volume of distilled water was injected into the vitreous cavity of the control rats. The changes of axoplasmic transport were assessed by anterograde labelling combined with horseradish peroxidase (HRP) at 1, 2, 4, 8, and 12 weeks after injury. **Results** The labelling density at ON distal to the site of injury by HRP obviously decreased at 1 and 2 weeks after injury, and gradually enhanced at 4 weeks and peaked at 8 weeks after injury. The recovery ratios of axoplasmic transport in CNTF-treated group and control group at 8 weeks after injury were 31.86% and 12.87%, respectively. No HRP reaction product was observed in the superior colliculus at 1 and 2 weeks after injury. There was significant difference of the HRP anterograde labeling density in ON and the superior colliculus between the CNTF-treated group and the control group during 4 to 12 weeks after injury ($P<0.01$). **Conclusion** CNTF can improve the status of axoplasmic transport following incomplete injury of the optic nerves, resulting in the promotion of the recovery of visual functions.

Key words: optic nerve; incomplete injury; ciliary neurotrophic factor; horseradish peroxidase; axoplasmic transport

许多研究证明睫状体神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)是一种多效能的神经营养因子,对多种神经元的存活以及视网膜神经节细胞均有支持作用[1,2],同时对轴突的生长有明显的促进作用[3]。而轴浆运输在神经损伤后神经元存活、神经修复及再生中有重要的作用。本实验采用HRP酶组织化学方法观察CNTF对视神经不全损伤后轴浆运输功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年雌性Wistar大鼠50只,体质量150~200 g,由第三军医大学实验动物中心提供。分为CNTF治疗组和对照组各25只。并分为伤后1、2、4、8、12周5个时间点,两组每时间点各5只动物。实验期间,动物在同一条件下由第三军医大学实验

基金项目:全军医药卫生科研基金资助项目(01Z039)
Supported by the Scientific Research Foundation for Medical Science and Public Health of PLA (01Z039)

作者简介:李 灿(1968—),女,重庆市垫江县人,硕士,副主任医师,主要从事视神经损伤与再生方面的研究。电话:(023)68171339

收稿日期:2003-07-17;修回日期:2003-12-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

动物中心喂养。

1.2　动物模型制作及给药方式

1.2.1　模型制作　　速眠新(0.5 ml/kg)肌肉注射麻醉。大鼠侧卧位, 于显微镜下剪开外眦角及颞侧球结膜, 分离结膜下组织及球后组织, 暴露视神经, 用无创血管夹于球后 1.5 mm 钳夹视神经 10 s, 造成中度视神经损伤(参照前期实验已建立的大鼠视神经不同程度不全损伤模型)。避免损伤眼动脉, 术后滴抗生素眼液, 涂抗生素眼膏。单眼(右眼)视神经损伤, 术后观察大鼠眼底血液供应情况, 确认无缺血者纳入实验。

1.2.2　药物注射　　动物麻醉后, 用消毒后的 10 μl 微量推进器吸取药物, 于大鼠眼球上方赤道部(距角巩膜缘 3 mm)斜向后下方进针, 于瞳孔直视下观察针尖避免损伤晶体。治疗组玻璃体腔内注射 rhCNTF 2 μl (1 μg/μl), 对照组玻璃体腔内注射无菌双蒸水 2 μl。注射时间为损伤即刻、术后 1、2、4、8 周。rhCNTF 由军科院范明教授赠送, 纯度 95%。

1.3　标本的制作

动物损伤眼玻璃体腔内注射 33% HRP 10 μl 存活 72 h 后, 麻醉下开胸, 经左心室插管至升主动脉, 先用 0.9% 生理盐水 250 ml 后用 0.5% 多聚甲醛+2.5% 戊二醛 250 ml 灌注固定 1 h, 取出 ON 及中脑放入 30% 蔗糖后固定液中 4 ℃过夜, 次日冰冻切片, ON 纵切 20 μm, 每标本间隔 3 片取 1 片, 共取 3 片; 中脑冠状切片 50 μm, 间隔 5 片取 1 片, 共取 3 片, 接片于 5% 蔗糖磷酸缓冲液中, 按四甲基联苯胺-钨酸铀法(TMB-st)[4] 漂染成色。贴片后在低倍镜下选定损伤远端 2 mm 及上丘顶部位置, 采用 Leica QWin 图像自动分析系统, 在统一放大倍数(×200)下, 以颜色分割识别 HRP 顺染纤维, 检测 ON(250 μm×300 μm)及上丘(150 μm×250 μm)HRP 顺染纤维面密度, 每标本数据取 3 张切片所测面密度的平均值。正常值取自未损伤眼 ON 顺行示踪结果。

1.4　统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS11.0 软件中 t 检验。

2　结果

2.1　正常视神经 HRP 顺行示踪

正常 ON 显示密集均匀纵行排列呈蓝色的轴突(图 1), ON 顺染密度自视乳头-视交叉呈递减性, 上丘显示呈蓝色的球形终末膨体和串珠或沙砾样神经终末(图 2)。

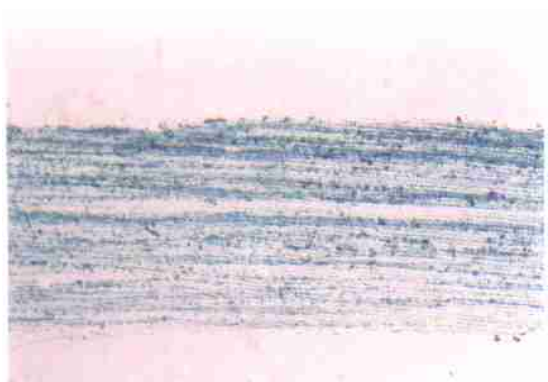


图 1　HRP 顺行示踪, 正常视神经　(HRP× 100)

Fig 1　Anterograde labeling with rtRP in normal optic nerve　(HRP× 100)



图 2　顺行示踪, 正常上丘　(HRP× 100)

Fig 2　Anterograde labeling with HRP in normal superior colliculus　(HRP× 100)

2.2　视神经损伤远端 HRP 顺染纤维密度变化

损伤后 1~2 周, 在损伤点远端 HRP 顺染纤维密度骤然下降(图 3), 第 1 周损伤远端治疗组与对照组无显著性差异($P>0.05$); 伤后 2 周治疗组轴浆运输开始恢复; 伤后 4 周, 两组损伤远端轴浆运输恢复较明显, 并逐渐增强于第 8 周达高峰(图 4), 对照组恢复至正常的 12.87%, 而治疗组恢复至正常的 31.86%; 伤后 12 周较 8 周 HRP 顺染纤维密度有所下降。损伤远端 HRP 显色分布不均匀, 扭曲、间断或局部膨胀。ON 损伤远端 HRP 顺染纤维密度于 2~12 周两组间均有非常显著性差异($P<0.01$)(表 1)。

表 1　视神经损伤远端 HRP 顺染纤维面密度($n=5$, %, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　HRP area density of ON distal to the site of injury
($n=5$, %, $\bar{x}\pm s$)

Group	Normal	1 week	2 weeks	4 weeks	8 weeks	12 weeks
Treated	72.52±8.94	2.48±0.51	6.16±1.66	17.35±3.41	23.11±3.54	18.46±4.42
Control	76.93±7.90	2.37±0.60	2.87±0.65	8.28±2.49	9.90±1.98	8.91±2.41
t		0.303	4.105	4.832	7.146	4.238
P		0.769	0.003	0.001	0.000	0.003

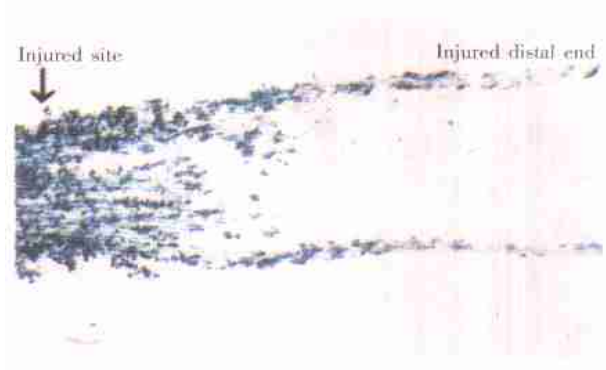


图 3　伤后 1 周, HRP 阻断于损伤近端　(HRP× 100)

Fig 3　HRP was blocked proximal to the site of injury 1 week after injury　(HRP× 100)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

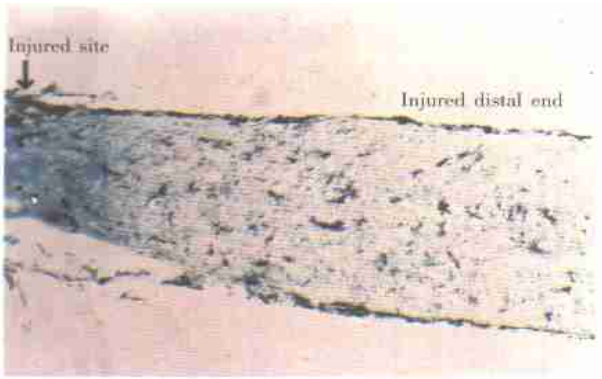


图 4 治疗组伤后 8 周，视神经损伤远端 HRP 顺染 (HRP× 100)

Fig 4 HRP anterograde labeling fibers distal to the site of injury in CNTF-treated group 8 weeks after injury (HRP× 100)

2.3 上丘 HRP 顺染纤维度变化

在 1～2 周于上丘均未见 HRP 显色；伤后 4 周，上丘可见较弱的 HRP 显色；至 8 周 HRP 顺染纤维度达高峰(图 5)。上丘 HRP 顺染纤维密度于第 4～12 周两组间均有非常显著性差异($P<0.01$)(表 2)。



图 5 治疗组伤后 8 周，上丘 HRP 顺染 (HRP× 100)

Fig 5 HRP anterograde labeling of superior colliculus in CNTF-treated group 8 weeks after injury (HRP× 100)

表 2 上丘 HRP 顺染面密度($n=5$，%，$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 HRP area density in the superior colliculus ($n=5$ %, $\bar{x}\pm s$)

Group	Normal	4 weeks	8 weeks	12 weeks
Treated	65.66±8.39	8.18±2.19	11.76±2.59	9.00±2.28
Control	62.88±8.18	3.13±0.93	5.78±1.49	5.04±0.87
t		4.744	4.457	4.525
P		0.004	0.002	0.002

3 讨论

轴浆运输是以神经微管为骨架，通过交联于轴浆运输物质与神经微管之间的 ATP 酶-移动素(Kinesin)和动力蛋白(dynein)水解 ATP 产生能量，引起轴浆运输的发生[5]。阻碍视神经轴浆流的主要原因：视神经损伤、高眼压、低眼压及缺血性视神经病变。视网膜神经节细胞合成的轴突再生所需营养物质以及神经元性或靶源性的神经营养因子均依赖于轴浆运输。轴突损伤造成神经组织水肿及微循环障碍、线粒体及微管微丝等细胞器肿胀、崩解，能量合成降低，物质合成不足，轴浆运输障碍。神经损伤即出现的顺行和逆行轴浆运输和电传导障碍称为休克状态[6]，原因首先是由于轴突直接损伤阻碍轴浆流通过；其次损伤区神经水肿至束内压增高神经轴突持续缺氧，继发轴浆运输受阻，传导功能障碍。Hanke[7] 实验证明一定程度的不全 ON 损伤随着神经水肿的消退 2～3 周后顺行和逆行的轴浆运输可部分恢复。本研究通过 HRP 顺行示踪观察到中度 ON 损伤，轴浆运输经短暂的休克期后对照组于伤后 4 周开始恢复，而治疗组于伤后 2 周即开始恢复；伤后第 8 周对照组恢复至正常的 12.87%，而 CNTF 治疗组恢复至 31.86%，明显强于对照组。表明虽然 ON 不全损伤后轴浆运输能自发性部分恢复，但应用 CNTF 可促进和增强这种能力。

轴浆运输功能可能与视网膜神经节细胞的损伤程度、轴浆转运物质合成功能状态、再生能力均密切相关。视神经部分损伤不同于视神经横断伤，因其部分神经纤维并未离断，而神经功能修复和再生所需的结构和功能物质，均由胞体合成并通过轴浆转运供给，因此，视网膜神经节细胞功能状态直接决定了神经超微结构是否能够恢复。我们根据预实验结果以及 Mey[8] 和 Cui 等[9] 研究报道玻璃体腔内重复注射神经营养因子较单次应用对视网膜神经节细胞起到更明显的保护作用，故在本实验中选择 rhCNTF 2 μg 玻璃体腔内重复注射。CNTF 持续应用可能通过：①替代靶源性的神经营养因子或促进其逆向运输，增强视网膜神经节细胞对原发损伤尤其是继发损伤的抵抗能力，减轻轻微损伤和未损伤的神经元继发变性、凋亡，恢复正常细胞功能，及时合成大量轴突修复和轴突延长所需的结构和功能物质，增加轴浆运输的速度，从而起到对 RGCs 较长期的保护作用，而延缓了神经组织变性的进程，保存相对较多的神经纤维；②加强神经细胞内物质合成和新陈代谢，缓解组织水肿，减轻局部压力，改善神经组织内环境，而有利于病变的神经纤维轴浆运输功能的恢复；③增强其再生反应[10]，不全损伤后再生轴突的延长可能也参与轴浆运输的恢复，而逆行的轴浆运输恢复又可促进神经元存活和再生。我们同时于上丘观察到 HRP 顺染终端密度的增加，是否在这些正常物质运输功能的神经纤维终端中，有无再生轴突终端和重建的突触，因无法

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

区别于残存的神经纤维终端而尚待进一步研究。

参考文献:

[1] Cui Q, So K F, Yip H K. Major biological effects of neurotrophic factors on retinal ganglion cells in mammals[J]. Biol Signals Recept, 1998, 7(4): 220—226.

[2] Watanabe M, Fukuda Y. Survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells in adult cats[J]. Prog Retin Eye Res, 2002, 21(6): 529—553.

[3] Cui Q, Lu Q, So K F, *et al*. CNTF, not other trophic factor, promotes axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(3), 760—766.

[4] 顾耀铭, 陈以慈, 叶鹿鸣. 钨酸钠作为稳定剂的最灵敏的 HRP-TMB-I. 光镜研究[J]. 神经解剖学杂志, 1990, 6(1): 121.

[5] Caleo M. Different rates of horseradish peroxidase transport in the optic nerve of neonatal and adult rats[J]. Neurosci, 1996, 72(3): 725—730.

[6] Wolin M J, Lavin P J. Spontaneous visual recovery from traumatic optic neuropathy after blunt head injury[J]. Am J Ophtholmol, 1990, 109(4): 430—435.

[7] Hanke J. Anatomical correlations of intrinsic axon repair after partial optic nerve crush in rats[J]. Ann Anat, 2002, 184(2): 113—123.

[8] Mey J, Thanos S. Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo[J]. Brain Res, 1993, 602(2): 304—317.

[9] Cui Q, Harvey A R. CNTF promotes the regrowth of retinal ganglion cell axons into murine peripheral nerve grafts[J]. Neuroreport, 2000, 11(18): 3999—4002.

[10] Jo S A, Wang E, Benowitz L I. Ciliary neurotrophic factor is and axogenesis factor for retinal ganglion cells[J]. Neuroscience, 1999, 89(2): 579—591.

（编辑　汪勤俭）

文章编号: 1000-5404(2004)05-0411-01

个案与短篇

瓣膜置换术后六次室颤合并顽固性心律失常及 ARDS 救治成功 1 例

Successful treatment of obstinate arrhythmia and ARDS after valve replacement: a case report

易广兵, 肖颖彬, 陈　林, 刘　健, 陈柏成, 曾祥君　（第三军医大学新桥医院心血管外科, 重庆 400037）

顽固性心律失常及 ARDS 等是心脏瓣膜置换术后的严重并发症, 也是病人死亡的主要原因。现总结 1 例成功救治的体会报告如下。

1　临床资料

1.1　一般资料

患者, 女, 38 岁, 体质量 62 kg, 经超声心动图等诊断为: 风湿性心脏病, 二尖瓣重度狭窄伴轻度关闭不全, 主动脉瓣重度狭窄伴轻度关闭不全, 三尖瓣关闭不全。

1.2　手术和心脏复苏过程

患者在全麻体外循环下行二尖瓣及主动脉瓣置换术。常规建立体外循环, 先经主动脉根部间断顺灌冷血停跳液, 行二尖瓣置换, 置入 25 号双叶机械瓣。再经冠状静脉窦间断逆灌冷血停跳液, 行主动脉瓣置换, 置入 21 号双叶机械瓣。手术顺利, 心脏电击复跳, 为房颤心律, 心室率 90～140 次/min。循环稳定后停机拔管, 主动脉阻断 95 min, 机器转流 137 min。停体外循环后 15 min 至关闭胸腔后, 反复出现顽固性室颤 6 次, 予 30～60 J 心内电除颤。复苏后为快速性房颤心律, 阵发性室速, 心室率 140～190 次/min, 血压 75/60 mmHg 左右。予利多卡因针 50 mg 静推、可达龙针 5 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ 持续微泵输注, 阵发性室速得以控制, 心室率降为 100～154 次/min, 关胸返回 ICU。

1.3　术后监护和治疗

返回 ICU 后心电监护示不纯性房扑, 频发室早, 右束支传导阻滞伴蝉联现象, 心率 120～160 次/min, 血压 80/62 mmHg 左右。予可达龙针 5 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ 持续微泵输注, 西地兰针 0.2 mg 间断静推, 纠正心律失常, 控制心室率。同时予多巴胺针 8 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$、肾上腺素针 0.05 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ 持续微泵输注, 纠正低心排出量综合征。术后第 3 日循环改善, 可达龙针及肾上腺素针逐渐减量停药。

术后第 4 日, 患者出现烦躁, 测 PaO_2/FiO_2 下降为 73, 血常规示 WBC 22.01×10^9/L, N0.927, 床旁 X 线胸片示: 双肺散在斑片状阴影。术后第 5 日气管插管内反复吸出大量稀血水样痰, 复查胸片示双肺渗出进行性加重, 右肺呈"白肺"样改变, 明确诊断为肺部感染、ARDS。调整呼吸机为定容控制通气, SIMV+PSV+PEEP, 设置 PEEP 为 8 cmH_2O, PSV 为 5～15, 吸氧浓度 60%～90%, 吸呼比 1.5∶1。加用甲基强的松龙针 80 mg 静滴 1/d, 减少肺毛细血管渗出, 泰能针 0.5 g 静滴 2/d 抗感染, 同时控制液体入量, 加强利尿, 行混合静脉营养, 热量 167～208.5 kJ $\cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$, 反复行痰液和血液细菌、霉菌培养。经上述治疗 4 d, 患者症状明显好转, 复查 X 线胸片示双肺渗出明显吸收, PaO_2/FiO_2 升为 304。遂顺利脱离呼吸机, 停用甲基强的松龙, 根据药敏实验改用丁胺卡那霉素针 0.4 g 静滴 1/d, 阿奇霉素片 0.5 g 口服 1/d。

转出 ICU 后, 患者心肺功能恢复较慢, 出现伤口愈合不良, 反复胸腔积液, 双下肢水肿。经积极强心、利尿及对症支持治

作者简介: 易广兵(1976—), 男, 湖北省谷城县人, 硕士研究生, 医师, 主要从事瓣膜病变的外科治疗方面的研究。电话: (023)68774607

收稿日期: 2003-10-22; 修回日期: 2004-02-20

（下转 415 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net