DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.15.017
第25卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 15
2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

文章编号:1000-5404(2003)15-1349-03

论著

蛇毒神经生长因子对大鼠坐骨神经损伤功能恢复的量效作用

陈恒胜,曾 琳,龙在云,邵 阳,王永堂,伍亚民 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第三研究室,重庆 400042)

提 要:目的 研究蛇毒神经生长因子(Snake nerve growth factor, sNGF)对大鼠坐骨神经损伤修复的量效作用。方法 建立大鼠坐骨神经钳夹模型,术后肌注不同剂量(300、900、2 700 U/kg)的sNGF,通过展爪反射,趾间距,脊髓诱发电位、运动诱发电位观察,评定蛇毒神经生长因子对大鼠坐骨神经损伤修复的量效作用。结果 不同剂量sNGF明显促进受损周围神经运动和感觉功能的恢复,sNGF的上述作用与NGF的剂量有关。中剂量900 U/kg效果较明显。结论 sNGF对大鼠坐骨神经损伤的修复作用具有一定的量效关系。

关键词:神经生长因子;神经挤压伤;蛇毒
中图法分类号:R392.11;R651.3 文献标识码:A

Dose effect of snake nerve growth factor on functional recovery of crushed nerve in rats

CHEN Heng-sheng, ZENG Ling, LONG Zai-yun, SHAO Yang, WANG Yong-tang, WU Ya-min (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the dose effect of snake nerve growth factor (sNGF) on functional recovery of crushed sciatic nerves in rats. **Methods** Animal models of the crushed sciatic nerve were established in 50 Wistar rats and then divided into 5 groups: normal saline (NS) group, the low dose sNGF group, the moderate dose sNGF group, the high dose sNGF group and normal control group. sNGF was injected intramuscularly once a day for 14 d after crushing. Function repair for the crushed sciatic nerves was studied by the examination of somatosensory evoked potential (SEP), motor evoked potential (MEP) and the distance between the first and fifth toes (TS). **Results** At 2 weeks after crushing, SEP was enhanced by 26%, 50%, 86%, 90% in NS group, low dose group, moderate dose group and high dose group, respectively. There was significant difference between NS group and treated group ($P<0.01$). There was also significant difference between low dose group and moderate dose group. However, there was no significant difference between moderate dose group and high dose group. Changes of MEP were the same as those of SEP. The TS was longer than that of the control group at 2 and 3 weeks in treated group. Significant difference was found between low dose group and moderate dose group and high dose group. **Conclusion** sNGF may repair the crushed nerve in rats in a dose-dependent manner.

Key words: nerve growth factor; crushed nerve injury; snake venom

研究表明,蛇毒神经生长因子(Snake nerve growth factor, sNGF)对大鼠坐骨神经损伤的修复具有明显的促进作用[1]。但sNGF从外源性应用到体内后,受影响因素较多,其活性的维持及作用效果与使用途径、方式、及剂量等均有关系。本实验在原有的实验基础上,探讨蛇毒神经生长因子对大鼠坐骨神经损伤修复的量效作用。

1 材料与方法

1.1 动物及实验分组

Wistar大鼠75只(由本院实验动物中心提供),随机分单纯损伤组、治疗组和生理盐水对照组,治疗组又分为低剂量组(300 U/kg)、中剂量组(900 U/kg)和高剂量组(2 700 U/kg)。每组15只大鼠。

1.2 实验模型制备

参照王民生等[2]的实验方法并稍作改进,用戊巴比妥钠(20~40 mg/kg)腹腔麻醉后,在无菌操作条件下,经左臀部外侧显露坐骨神经,在梨状肌下缘1.5 cm处,用特制的无齿蚊式钳钳夹坐骨神经,钳夹力量为一扣,钳夹持续2 min,造成2 mm的

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054203)
作者简介:陈恒胜(1965—),男,重庆市人,实验师,主要从事神经损伤与再生修复及康复医学工程方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68757433
收稿日期:2002-07-24;修回日期:2003-01-23

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

挫伤。

1.3 用药剂量及用药方法

按实验模型制备处理后，即刻在损伤神经周围肌肉注射蛇毒神经生长因子（分别按上述高、中、低剂量），继而每天肌注1次，连续给药14 d。依次处理后4周内，对各组大鼠观察下列指标。

1.4 观察指标

1.4.1 展爪反射 趾并拢不能分开为展爪反射消失，能展开与健侧相同为正常。

1.4.2 趾间距 将大鼠损伤足掌面蘸墨汁，然后放于铺放白纸的平地，取其自然行走足迹，测量1～5趾趾间距。

1.4.3 脊髓感觉诱发电位（SEP） 无菌条件下，切开动物背部皮肤，将两根直径约为1 mm，裸露3～5 mm的银针电极沿L_4～L_5椎间隙缓慢插入棘间韧带，然后将该电极固定，作为SEP的记录电极；同时将两根针电极插入胫后神经走行处，两电极相距1 cm，用作刺激电极，刺激强度10～15 V，波宽0.2 ms，频率4 Hz的单方波电脉冲刺激神经，电位经WD-4000型诱发电位仪记录[1]。

1.4.4 运动诱发电位（MEP） 将SEP的记录电极用作MEP的刺激电极，同时将两根针电极插入腓肠肌，两电极相距1～2 cm，用作MEP的记录电极，刺激强度0.7～1.5 V，波宽0.1 ms，频率4 Hz的单方波脉冲刺激L_4～L_5脊髓[1]。

1.5 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS统计软件进行t检验。

2 结果

2.1 展爪反射

术后动物伤肢均出现踝下垂，趾并拢不能分开，展爪反射消失，动物呈跛行步态，后肢拖地行走。NGF治疗后，展爪反射出现不同程度的恢复，并具有较明显的量效关系。对照组和治疗组间差异显著（$P<0.01$）；且低剂量组和高、中剂量组有显著差异（$P<0.01$）；高、中剂量组间差异不显著，见表1。

表1 各组大鼠展爪反射的恢复时间（t/d）

Tab 1 Recovery time of expanding paw reflection after injury（t/d）

	Initial recovery time	Entire recovery time	Average recovery time
Control	17	30	24.4
Low-dose	14	28	20.5 △
Moderate-dose	11	26	15.6 △△##
High-dose	10	21	16.3 △△##

△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* control；##：$P<0.01$ *vs* low-dose group

2.2 趾间距

各组大鼠1～5趾趾间距，给药后有不同程度的恢复，见表2。

2.3 SEP

术前全部动物均可记录到波形为N1、P1、N2、P2、N3的SEP，伤后全部动物SEP的早期成分N1、P1、N2、P2波消失。治疗组术后3周消失的早期成分全部恢复，对照组术后4周全部恢复，见表3。

表2 坐骨神经损伤后不同时间1～5趾趾间距（l/cm，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Changes of TS after sciatic nerve injury（l/cm，$\bar{x}\pm s$）

Group	Pre-injury	Post-injury (Week)			
		1	2	3	4
Injury	1.70±0.12	0.97±0.14 *	1.13±0.15 *	1.40±0.17 *	1.69±0.12
NS	1.67±0.18	0.98±0.15 *	1.10±0.17 *	1.41±0.18 *	1.60±0.15
Low-dose	1.68±0.18	0.89±0.13 *	1.13±0.20 *	1.39±0.28 *	1.68±0.16
Moderate-dose	1.67±0.15	1.04±0.19 *	1.30±0.24 *△	1.60±0.18△△##	1.65±0.17
High-dose	1.73±0.15	0.92±0.13 *	1.37±0.34 *△##	1.74±0.14△△##	1.76±0.18

*：$P<0.01$ *vs* pre-injury；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* NS；##：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* low-dose group

表3 坐骨神经损伤后不同时间SEP恢复的百分数（%）

Tab 3 Recovery of SEP at different time after injury（%）

Group	Pre-injury	Post-injury (Week)			
		1	2	3	4
Injury	100	0	20	76	100
NS	100	0	26	84	100
Low-dose	100	0	50 *	100	100
Moderate-dose	100	13	86 **	100	100
High-dose	100	6	90 **	100	100

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* NS

2.4 MEP

术前全部动物均可记录到波形为N1、P1、N2、P2、N3、P3、N4的MEP，伤后全部动物MEP的早期成分N1、P1波消失，术后不同时间各组动物N1、P1波恢复的百分数，见表4。

表4 各组大鼠不同时间MEP恢复的百分数（%）

Tab 4 Recovery of MEP at different time after injury（%）

Group	Pre-injury	Post-injury (Week)			
		1	2	3	4
Injury	100	0	0	50	86
NS	100	0	0	46	94
Low-dose	100	0	40 *	86 *	100
Moderate-dose	100	0	76 **	90 *	100
High-dose	100	0	80 **	100 **	100

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* NS

3 讨论

本实验sNGF治疗组的展爪反射、SEP、MEP出现提前，表明大鼠坐骨神经损伤后靶器官注射蝮蛇毒NGF不仅可促进感觉神经再生，而且可促进运动神经再生。

坐骨神经损伤后，靶源性NGF供应中断，神经元胞体发生变性损害，同时，由于局部的钳夹损伤，轴突的近远侧端发生变性，近神经胞体端轴突中NGF含量急剧下降，而NGF受体含量升高[3,4]，外源性补充NGF后，残端NGF转运增加，从而有利于损伤神经的再生修复，因此，神经损伤后，外源性局部给予NGF在一定

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

程度上可满足神经再生的需要。但是，外源性 sNGF 应用到体内后，受影响因素较多，其生物学效应的维持与给药剂量有一定的关系。尤其是蛇毒 NGF，其剂量与效应的关系还不是很明确。国内郝文学[5]检测了江浙蝮蛇毒 NGF 的生物活性，结果表明不同浓度的蛇毒 NGF 均能刺激鸡胚背根神经节的生长，其浓度仅在 0.2 μg/ml 即可引起最大的生物学效应。尹维田等[6]对 11 例前臂及碗部神经断裂采用了模拟神经再生室的小间静脉桥接法，室内一次性注入 2 000 U 的蝮蛇毒 NGF，外源性提高再生室内 NGF 的浓度，经 1 年的随访观察，表明蝮蛇毒 NGF 一次性给药，可促进神经再生。王子明等[7]采用坐骨神经半切模型，靶器官分别注射 sNGF 300、900、2 700 U，连续注射 10 d，结果表明，各剂量组均能促进神经再生，但各剂量组之间无显著差异。本实验各用药组与对照组均有明显差异，但低剂量组与中、高剂量组亦有明显差异，中、高剂量组间无差异。表明中剂量 900 U 即可满足神经再生的需要，再加大剂量已无必要。这与王子明等的结果不同，可能与所用模型不同有关。总之，由于神经损伤修复是个复杂的过程，体内影响因素较多，因此，具体的最佳用药方式及用药剂量有待更进一步的研究。

参考文献：

[1] 陈恒胜，伍亚民，廖维宏. 蛇毒神经生长因子对大鼠坐骨神经损伤修复作用的实验研究[J]. 创伤外科杂志 2002, 4(2): 97－99.

[2] 王民生，陈中伟，张光键，等. 神经生长因子(NGF)促进挤压伤坐骨神经再生[J]. 中华骨科杂志 1996, 16(3): 166－168.

[3] Pang Q J, Luo Y X, Wu Y G, *et al*. Experimental studies on peripheral nerve regeneration enhanced by nerve growth factor[J]. J Tongji Med Univ, 1993, 13(1): 34－39.

[4] Heumann R, Miller M S. Changes of nerve transection[J]. J Cell Biol, 1987, 104(6): 1623－1631.

[5] 郝文学. 血栓与抗栓酶[M]. 沈阳: 沈阳出版社, 1992. 635－640.

[6] 尹维田，潘　清，崔树森，等. 神经生长因子促进周围神经再生临床应用初步报告[J]. 中华手外科杂志, 1997, 13(1): 6－8.

[7] 王子明，杨恒文，李　芳，等. 神经生长因子对大鼠坐骨神经半切损伤后的作用观察[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(2): 150－152.

（编辑　郭建秀）

（上接 1348 页）

1.4　永生细胞株的复苏

迅速将冻存管放入 37 ℃水浴，不停振荡，见 1/2～1/3 融化时，在无菌超净台将细胞吸入已经放有 5 ml 全培养液的 10 ml 培养瓶中，37 ℃培养，24 h 后观察，视具体情况加液或换液或分瓶。

2　结果与讨论

采用上述方法，我们成功的建立了含 3 个黎族主要支系的永生细胞库。其中仔孝黎永生细胞系 66 株，男性占 56%，女性占 44%；杞黎永生细胞系 76 株，男性占 55.26%，女性占 44.74%；本地黎 54 株，男性占 56%，女性占 44%。应用 EB 病毒转化外周血 B 淋巴细胞加环胞霉素 A 法建立永生细胞系，可以永久的保存有重要研究价值的个体基因组。该方法与其它方法相比，所需时间短，成功率高，环胞霉素 A 的作用是特异性的抑制 TLC 中的 RNA 聚合酶Ⅱ，因而使 TCL 失去对 EB 病毒的免疫监视作用，从而阻止了 TLC 对 BLC 的杀伤作用。国内外报道用该方法建立永生细胞系的成功率可达 70%～100%[6-8]。我们在 3 个黎族亚系永生细胞库的建立过程中，建株成功率分别达到 97%(仔孝黎)、95%(杞黎)和 85%(本地黎)，取得满意可靠的结果。已成功建立的永生细胞株经冻存后复苏的成功率均达到 100%，同时经染色体 G 显带分析未见异常。我们还对所有细胞株的提供者及细胞转化程序建立了系统的档案。

永生细胞株可以随时用于对人类基因组多样性的研究[3]，是认识人类进化、种族血缘、衍变以及生老病死等生命活动的先决条件，是战胜疾病克服生存障碍的永恒财富。3 个黎族主要支系(占黎族总人口 88%)的永生细胞库，是在海南经济迅速发展，各民族与隔离群由于基因漂移，融合加速，遗传多样性逐步消失的边缘获得的。它使黎族独特的基因组得到系统地、永久地保存。为今后深入研究黎族的基因结构，全面了解致病基因和易感基因在黎族人群中的分布以及揭示黎族的源与流和各支系之间的关系提供了永久性的资料。

关键词：永生细胞系；少数民族；EB 病毒

中图法分类号：R329.2　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Schull W J. Genetic Diversity survey[J]. Science, 1998, 279(5347): 14.

[2] Pennisi E. NRC OKs Long-delayed survey of human genome diversity[J]. Science, 1997, 278(5338): 568.

[3] 许丽萍，杜若甫. 人类基因组多样性计划的新动态[J]. 中华医学遗传学杂志, 1999, 16(2): 108－110.

[4] 杜若甫. 中国的少数民族[M]. 北京：科学出版社, 1994. 29.

[5] Neitzel H A. A routine method of establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines[J]. Hum Genet, 1986, 73(4): 320－326.

[6] 王建中，刘耀荃. 海南岛黎族社会调查(上卷)[M]. 广西：广西民族出版社, 1992. 11－12.

[7] 夏家辉，李麓芸. 染色体病[M]. 北京：科学出版社, 1989. 15.

[8] Pelloquin F, Lamelin J P, Lenoir G M. Human B lymphocytes immortalization by Epstein-Barr virus in the presence of cyclosporin A[J]. *In Vitro* Cell Dve Biol, 1986, 22(12): 689－694.

（编辑　张　宁）

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