DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.09.007
第24卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 9
2002年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2002

文章编号:1000-5404(2002)09-1017-03

论著

几丁质在大鼠坐骨神经损伤早期修复作用的研究

程赛宇,阮怀珍,张金海,吴喜贵 (第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨几丁质(chitin)对坐骨神经损伤早期(伤后30天内)所引起的脊髓前角运动神经元死亡以及功能丧失的保护作用。方法 实验动物随机分成对照(SAL)组和实验(chitin)组,采用硅胶管套接大鼠切断的坐骨神经,硅胶管内给予生理盐水(SAL)或几丁质溶液(chitin),分别于术后7、14和30 d应用尼氏染色,酶组织化学染色方法,检测神经损伤侧的脊髓前角运动神经元死亡数目,及酸性磷酸酶(ACP)的变化幅度;测量术后10、20和30 d坐骨神经功能指数(SFI)的恢复率。结果 与SAL组比较,术后7、14和30 d,chitin组脊髓前角运动神经元死亡率分别降低了6.31%、6.26%和10.15%;脊髓前角运动神经元中酸性磷酸酶变化的幅度分别下降了46%、57%和87%;术后10、20、30 dSFI恢复率分别提高了1.44%、2.52%和5.69%。结论 几丁质对周围神经损伤后的神经元死亡有较好的保护作用和良好的促恢复作用。

关键词:几丁质;外周神经;损伤;神经元
中图法分类号:Q421;R338.1 文献标识码:A

Protective effect of chitin on neurons in early stage after sciatic nerve injury in rats

CHENG Sai-yu, RUAN Huai-zhen, ZHANG Jin-hai, WU Xi-gui (Department of Neurobiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of chitin on spinal cord neurons and functional recovery in the early stage after sciatic nerve axotomy. Methods Upon silicone-tubulization of transected sciatic nerve in the adult rats, either 0.9% saline or 1% chitin solution was injected into the silicone chamber. The status of motor neuron death in lateral nucleus of spinal cord anterior horn was observed with Nissl staining 7, 14 and 30 d after sciatic nerve transection, and the changes in activity of acid phosphatase in spinal cord was observed with enzyme histochemistry. The recovery of sciatic function was observed by sciatic function index in 10, 20 and 30 d respectively after sciatic nerve transection. Results ① Chitin decreased lesion-induced motor neuron death in lateral nucleus of spinal cord anterior horn by the percentage of 6.31%, 6.26% and 10.15% respectively 7, 14 and 30 d after sciatic nerve transection. ② Chitin decreased the change in activity of acid phosphatase in spinal corn by the percentage of 46%, 57% and 87% respectively 7, 14 and 30 d after sciatic nerve transection. ③ Chitin promoted the functional recovery by 1.44%, 2.52% and 5.69% respectively in 10, 20 and 30 d after sciatic nerve transection. Conclusion These results suggest that chitin is capable of protecting motor neurons from death induced by peripheral nerve injury and promoting recovery of injured nerve.

Key words: chitin; peripheral nerve; injury; neuron

神经系统的再生与修复是一个非常复杂的过程,研究周围神经损伤的最终目的是要使损伤的神经达到功能恢复。虽然外科修复神经的技术已达到很高的水平,但损伤神经的功能修复效果仍不满意[1]。本研究应用具有良好组织相容性和生物降解性的几丁质作为神经修复的基质以探索外周神经损伤后chitin对神经元的保护作用和促修复作用,为外周神经损伤的治疗提供新的理论基础。

1 材料和方法

1.1 几丁质溶液

精制几丁质粉末(Sigma公司提供)溶解于LiCl(7%)和Me2N AC混合液中,制成1%的几丁质溶液。

1.2 动物模型及实验分组

SD大鼠30只,雌雄不拘(第三军医大学实验动物中心提供),体重150~220 g,随机将动物分成2组:生理盐水(Normal saline, SAL)组和几丁质(chitin)组,每组15只。动物的一侧坐骨神经不进行手术作为正常对照侧,另一侧作为手术侧。以1%戊巴比妥钠(30~40 mg/kg)腹腔麻醉,左下肢背侧部纵向切口,暴露股二头肌,经肌间钝性分离,游离坐骨神经,切除距梨状肌下缘3 mm以下长约2 mm的坐骨神经,用9~0无创缝线套接神经断端入8 mm长的硅胶管(外径2 mm,内径1 mm)中,神经断端间距5 mm。术中依不同组别动物,用微量注射器分别将生理盐水、1%几丁质溶液(Sigma)25μl注入硅胶管内神经断端间。

1.3 动物固定、取材和染色

两组动物分别于术后7、14及30 d,以1%戊巴比妥钠腹腔麻醉。4%低聚甲醛经心灌注固定,取脊髓L4~6节段存于30%蔗糖甲醛液4 ℃过夜。冰冻连续切片,片厚30 μm(行ACP染色)或10 μm(行尼氏染色)。①尼氏染色:切片用0.1%甲苯胺蓝常温染色2~4 h,乙醇分色;②按Gomori法[2]进行ACP染色,切片在孵育液(3.2% β-甘油磷酸钠;3.3% 硝酸铅;巴比妥-醋酸缓冲液,pH 5.0)中37 ℃染色3 h,蒸馏水洗后入1%硫化铵溶液1 min,蒸馏水洗后酒精脱水。二甲苯透明,中型树脂封固。

1.4 坐骨神经功能指数测定

自制大鼠足印行走盒,宽10 cm,长50 cm,白纸放于盒子底部。两组大鼠分别于术前及术后10、20、30 d,双足蘸碳素墨水后放入行走盒一端,大鼠自行走向另一端。每只足即在白纸上

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054206)
作者简介:程赛宇(1975—),男,云南省昆明市人,硕士研究生,助教,主要从事神经损伤、修复方面的研究。电话:(023)68752232
收稿日期:2001-09-24;修回日期:2001-11-17

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

留下 3~4 个足印。正常侧和损伤侧足印分别测量三个变量。①足印长度(PL):足印的最长距离,即从足跟到足尖的距离。②足趾宽度(TS):第一趾到第五趾连线的距离。③中间足趾距离(IT):第二趾到第四趾连线的距离。将上述三个测量值带入 Bain 公式计算出 SFI[3]。以 SFI= 0 为正常值,SFI= -100 为神经完全断离的指标,计算出 SFI 的恢复率。

1.5 统计学处理

染色的标本进行光镜下细胞计数和计算机图像分析(德国产 IBAS-Ⅰ+Ⅱ型),实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用计算机经双样本 t 检验程序(PDA-2)进行处理。

2 结果

2.1 脊髓前角运动神经元的存活率

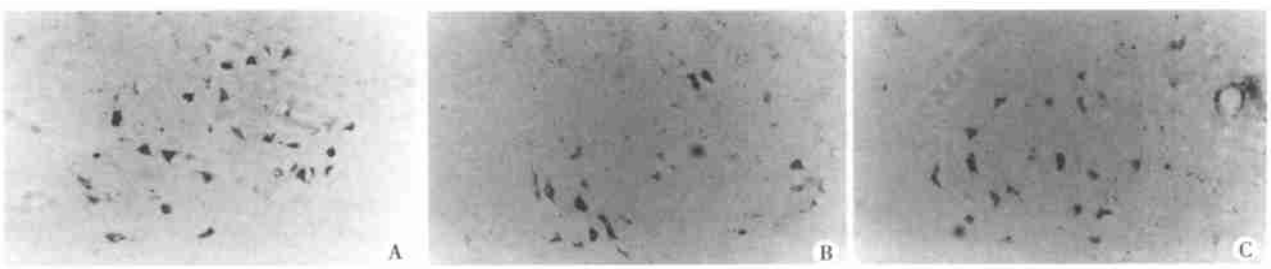
坐骨神经切断 7、14、30 d 后,取 L5 节段脊髓,计数前角外侧核大、中型神经元数目,以损伤侧(左侧)与正常侧(右侧)同类神经元的比率作为脊髓前角运动神经元的存活率。通过 t 检验进行组间比较,结果见表 1。从中可以看出术后 7、14、30 d,chitin 组脊髓前角运动神经元的存活率与 SAL 组差异显著。这一结果表明,chitin 能保护坐骨神经损伤后脊髓前角运动神经元的死亡并促进其存活,见图 1。

表 1 坐骨神经损伤后脊髓前角运动神经元记数的百分率(%,$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Percentage of spinal motoneurons after sciatic nerve transection(%, $\bar{x}\pm s$)

	SAL	Chitin
7 d	83.33±5.6	89.64±5.7 **
14 d	78.61±6.1	84.87±4.8 **
30 d	70.16±6.5	80.31±5.2 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* SAL



A: Normal side; B: Injured side of SAL group 30 d after sciatic nerve transection; C: Injured side of chitin group 30 d after sciatic nerve transection

图 1 坐骨神经损伤后脊髓 L5 节段尼氏体染色 (Nissl× 100)

Fig 1 L5 spinal segment after sciatic nerve transection (Nissl× 100)

2.2 ACP 活性

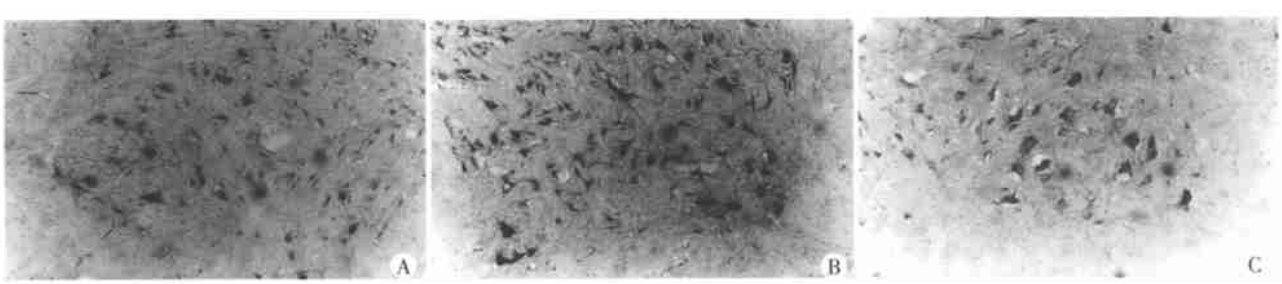
脊髓正常侧前角外侧核大、中型神经元 ACP 酶阳性反应颗粒呈浅黄色,SAL 组脊髓修复侧前角外侧核大、中型神经元酶阳性颗粒呈深棕色,而 chitin 组相应部位神经元酶阳性颗粒近浅棕色,与正常侧相近。坐骨神经切断后 7、14、30 d 后,SAL 组及 chitin 组的正常侧和损伤侧脊髓前角外侧核 ACP 阳性面积百分率及组间 t 检验见表 2。可以看出术后 7、14 和 30 d SAL 组与 chitin 组间百分率的差异显著,说明 chitin 能够缓解外周神经损伤造成的神经元 ACP 活性升高,见图 2。

表 2 坐骨神经损伤后脊髓前角 ACP 阳性面积的百分率(%,$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Percentage of the ACP stained area of spinal segments after sciatic nerve transection(%, $\bar{x}\pm s$)

	SAL	Chitin
7 d	226±36	180±41 *
14 d	283±46	226±36 **
30 d	249±45	162±47 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* SAL



A: Normal side; B: Injured side of SAL group 30 d after sciatic nerve transection; C: Injured side of chitin group 30 d after sciatic nerve transection

图 2 坐骨神经损伤后脊髓 L5 节段 ACP 染色 (ACP× 100)

Fig 2 L5 spinal segment after sciatic nerve transection (ACP× 100)

2.3 坐骨神经功能指数(SFI)

以 SFI= 0 为正常值,SFI= -100 为神经完全断离的指标,计算 SFI 的恢复率(%)。术后 10、20、30 d 实验组及对照组的 SFI 恢复率及 t 检验结果见表 3。可以看出,chitin 组的恢复率与 SAL 组间差异显著。说明 chitin 能促进外周神经损伤后的功能恢复。

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

表 3　各组 SFI 的恢复率(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Percentage of SFI recovery after sciatic nerve transection(%, $\bar{x}\pm s$)

	10 d	20 d	30 d
SAL	1.54±0.12	8.35±0.16	19.32±0.25
chitin	3.90±0.14 *	10.87±0.15 *	25.01±0.11 **

*: $P<0.05$　**: $P<0.01$ *vs* SAL

3　讨论

几丁质又称甲壳素, 是地球上仅次于植物纤维素的第二大天然生物资源, 是近年来在国际上颇为引起轰动的一种特殊物质, 是目前发现的自然界中惟一带正电荷的可食性的动物纤维素—含有氨基多糖的高分子化合物。几丁质的化学学名为: [(1, 4)-2-脱氧(β-D-葡萄糖)或β-(1→4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-D-葡萄糖] (也称N-乙酰基-D-葡萄胺-线型生物聚合体; Polyβ-1, 4-N-Acetyl-glucosamine), 简称聚N-乙酰葡萄糖胺。它的基本单位是乙酰葡萄糖胺, 由1 000～3 000个乙酰葡萄糖胺残基通过β-1, 4糖甙链直线连接成的聚合物[4]。研究表明, 几丁质无毒性、无刺激性、无免疫原性、不溶血, Anes实验阴性, 同时还可促进平滑肌细胞再生和抑制成纤维细胞生长[5,6]。几丁质为构成细菌壁的主要多糖纤维素, 可被溶菌酶溶解。几丁质植入体内后, 吸引单核细胞将自身吞噬, 逐渐被机体吸收[7]。几丁质除了具备一般医用材料的性能外, 还具备了作为周围神经修复用的组织工程材料的三点要求: ①几丁质材料具有多孔性和高孔隙率, 可为种子细胞提供生存的三维空间, 利于细胞进行气体交换, 获得足够的营养物质和排除废料。②几丁质材料便于加工成所需形状, 并有一定的机械强度, 可保证新形成的组织具有所需的外形。③几丁质在体内可被溶菌酶降解, 亦可被脱氨基酶降解, 降解产物为葡萄糖, 可被机体吸收[7]。因此几丁质在人工皮肤、骨修复材料、手术缝线和抗凝血材料等方面广泛应用。其在神经损伤修复中的作用也成为探索的热点。

研究已经证实, 影响神经再生的主要原因之一就是瘢痕组织阻碍了近端神经向远端生长的过程。与其它一些促神经生长物质相比, 几丁质最显著的特点在于能抑制成纤维细胞的生长, 防止瘢痕形成[6]。同时几丁质良好的组织相容性及其可吸收性、无免疫原性等都是极为有利的特性。另外, 外周神经损伤的早期, 再生轴突未能到达远端神经以致经逆行轴浆运输至胞体的神经营养因子及其它营养物质明显减少, 这是神经元胞体逆行性变的原因之一。外周神经损伤后局部给予chitin, 作为基质可作用于受损的神经, 减轻胞体逆行性变, 并提供良好的环境, 使神经再生的物质供给得到保证。有研究显示chitin对面神经缺损有明显的促再生作用[8]。

外周神经损伤后, 神经元相继发生死亡或蜕变, 细胞机构发生变化, 如粗面内质网解聚、溶酶体增多以及多种酶活性的变化, 其中ACP活性变化最具代表性[9]。ACP是溶酶体的标志酶。损伤的神经元溶酶体增加、活性增强, 溶酶体水解酶释放增加使细胞受损死亡。另外, 尼氏体的数量可以直接反映存活神经元数目的多少。因此, 尼氏体数目和ACP酶活性能反映神经元逆向变性的程度。脊髓L4～6节段前角外侧核的ACP酶阳性反应颗粒以神经元中最为明显, 上述核团大部分神经元的轴突进入到坐骨神经中。因此, 观察上述核团的神经元数目和ACP酶的活性变化基本能反映坐骨神经损伤后神经元的蜕变情况。

除了形态学的观察外, 损伤神经的功能恢复情况也是评价治疗措施优劣的重要指标。1982年Medlinaceli首先提出SFI评价大鼠坐骨神经修复后功能恢复的情况, 并提出SFI的计算公式, 后经Carlton, Bain[3]反复实验与修改, 使SFI计算公式更加完善, 更加准确可靠, 被公认为是非常有价值的评价坐骨神经再生的检查方法[10]。

我们采用适度长度的硅胶管套接损伤的神经能提高神经再生的准确性或趋向性, 也为chitin的作用发挥提供有益的空间。在此动物模型上给以chitin溶液能减少损伤侧脊髓运动神经元死亡的数目, 降低脊髓运动神经ACP活性变化的幅度, 并促进神经功能指数的恢复。这些结果说明, 给予chitin溶液能保护外周神经损伤后运动神经元的死亡和退行性变, 能很好的促进神经功能的恢复, 这些作用有赖于chitin的生物特性。我们的实验结果为探索治疗神经损伤更新的方法和途径提供了理论依据。

参考文献:

[1] Fu S Y, Gordon M. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration[J]. Mil Neurobiol, 1997, 14(1—2): 67—94.

[2] 陈啸梅, 周文郁, 彭俊云, 等. 组织化学手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 141—142, 172—174.

[3] Bain J R, Mackinnon S E, Hunter D A, *et al*. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat[J]. Plast Reconstr Surg, 1989, 83(1): 129—138.

[4] 陈耀华. 人类第6生命要素-甲壳素(几丁质、几丁聚糖)科学[J]. 锦州医学院学报, 1999, 20(5): 48—53; 1999, 20(6): 59—63; 2000, 21(1): 65—68; 2000, 21(2): 72—75.

[5] 陈广西, 刘万顺, 六晨光. 几丁质的研究与进展[J]. 生物工程进展, 1997, 17(3): 5—9.

[6] 侯春林, 卢建熙, 包聚良, 等. 几丁质生物学特性研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 1993, 7(2): 115.

[7] Hiranos, Susuki K, Murata J, *et al*. chitin, chitosan and related enzymes [J]. Carbohydrates Res, 1985, 137: 205.

[8] 陶泽璋, 黄孝文, 华清泉, 等. 几丁质再生室修复面神经缺损的实验研究[J]. 中国耳鼻咽喉外科杂志, 1999, 5(3): 160—162.

[9] Lewin G R, Bard Y A. Physiology of neurotrophins[J]. Annu Rev Neurosci, 1996, 19(3): 289—317.

[10] Dijkstra J R, Meek M F, Robinson P H. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex[J]. J Neurosci Methods, 2000, 96(2): 89—96.

(编辑　陈聪连)

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