DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.027
第24卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 12
2002年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2002

文章编号:1000-5404(2002)12-1433-04

论著

面神经断裂后大鼠面神经核区神经元凋亡和星形胶质细胞变化的实验研究

方泽强,杨 军,李慧增,孙 远 (第三军医大学附属西南医院口腔科,重庆 400038)

提 要:目的 研究面神经断裂后面神经核区神经元凋亡基因bcl-2,bax和星形胶质细胞变化及其意义。方法 大鼠面神经离断后,采用免疫组化的方法,通过图像分析对面神经核区神经元bcl-2,bax的表达和星形胶质细胞变化进行定量分析。结果 面神经断裂后15 d面神经核区神经元出现凋亡高峰,bcl-2/bax在面神经断裂后15 d达最低,与正常对照组相差显著($P<0.01$);GFAP阳性细胞达最多,细胞着色最明显,与正常对照组相差显著($P<0.01$)。结论 bcl-2和bax可能在面神经元凋亡过程中发挥重要作用;星形胶质细胞反应与面神经元的损伤和修复关系密切。

关键词:面神经断裂;凋亡;bcl-2;bax;星形胶质细胞
中图法分类号:R322.85;R329.28;R745.12 文献标识码:A

Changes of astrocytes and apoptosis of neurons in facial nerve nucleus after facial nerve transection in rats

FANG Ze-qiang, YANG jun, LI Hui-zeng, SUN Yuan (Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the changes of astrocytes and expressions of bcl-2 and bax in neuron apoptosis in facial nerve nucleus after facial nerve transection in rats. Methods A total of 72 rats were equally divided into normal control, and facial neurotmesis groups. Six rats were killed 3, 7, 15, 21, 30 and 60 d after transection respectively and same amount of rats were killed in same time interval in the control group. Brain samples were taken from the aboue mentioned rats and the facial neuron apoptosis was detected with TUNEL, and expressions of bcl-2 and bax and changes of GFAP in the astrocytes of facial nerve nucleus were studied with immunohistochemical methods and image analyses separately. Results The apoptotic peak of facial neurons and remarkable expression of bcl-2 and bax appeared in 15 d after the facial neurotmesis, while the expression ratio of bcl-2/bax were the lowest. Meantime, the reaction of the astrocytes(GFAP)was remarkable, too. All the changes were statistically significantly compared with the control groups ($P<0.01$). Conclusion bcl-2 and bax have important effect on the apoptosis of facial neurons, whereas the reaction of astrocytes is significantly correlated with the damage and repair of the facial neurons after the facial neurotmesis.

Key words: neurotmesis; apoptosis; bcl-2; bax; astrocytes

细胞凋亡是在一定条件下有核细胞表面分子接收到诱导因子刺激并将信号传入细胞内部,而引发的细胞死亡过程,是一种基本的生理机制,又是许多疾病发生发展的病理基础。bcl-2原癌基因可以抵消多种凋亡刺激;而bax可以促进凋亡。bcl-2和bax之间的作用对于细胞凋亡具有重要作用。许多研究表明,bcl-2和bax在包括外伤、缺氧、放射性损伤、应激反应在内的许多因素所诱导的细胞凋亡过程中发挥重要作用。外周神经损伤,由于改变了神经营养因子的运输通道和神经元的生存环境,进而导致神经元bcl-2和bax表达变化,进一步实验显示bcl-2和bax的表达改变参与了神经元和外周神经的继发性病理变化。神经组织由神经元和神经胶质细胞组成,神经胶质细胞是神经元的10~50倍,能够分泌多种细胞因子,在神经组织修复与再生过程中发挥重要作用。其中星形胶质细胞的作用在神经胶质细胞中占重要地位。关于面神经断裂后面神经元凋亡和面神经元bcl-2,bax的表达变化以及面神经核星形胶质细胞的反应,研究甚少。我们通过免疫组化研究了面神经元凋亡与凋亡基因bcl-2和bax的关系以及星形胶质细胞在面神经损伤中的作用;对面神经损伤过程中面神经元凋亡的机制作了初步的探讨,同时也为临床上面神经断裂的修复和避免面神经元大量死亡提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物来源与分组

Wistar大鼠72只(第三军医大学实验动物中心提供),雌雄不拘,体重(200±10) g,用随机数字表法,随机分为正常6组和面神经断裂6组(3、7、15、21、30、60 d),每组6只。

1.2 动物模型的建立

参照文献[1],建立以右侧面神经断裂为实验对象的动物模型。麻醉(1%戊巴比妥钠50~60 mg/kg)大鼠,暴露右侧茎乳孔及面神经干,实验组距茎乳孔0.5 cm处剪断面神经干,再去掉面神经干远端0.5 cm,防止再生。对照组不处理面神经,缝

作者简介:方泽强(1966-),男,湖北省武穴市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事口腔颌面外伤治疗和修复的研究,发表论文6篇。电话:(023)68753636
收稿日期:2002-05-10;修回日期:2002-06-20

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

合伤口。

1.3 标本的采集和处理

取所需时相点的动物，经左心室升动脉插管，灌注温生理盐水和 4 ℃ Bouin 固定液，取脑，参照文献[2]定位面神经核。水平面切取一块 5 mm 脑干（以桥延沟为中心），入 20％蔗糖溶液中至下沉，冰冻冠状切片（5 μm），每 5 片取 1 片，用于检测。

1.4 凋亡神经元、bcl-2 和 bax 的表达以及星形胶质细胞的检测

采用 TUNEL 法检测凋亡神经元（TUNEL 检测试剂盒由北京中山生物技术公司提供）；ABC 染色法检测 bcl-2，bax（兔抗单克隆抗体，Sigma；其中 bcl-2 一抗工作浓度为 1∶200，bax 一抗工作浓度为 1∶300）的表达；通过 ABC 染色法检测胶质纤维酸性蛋白（GFAP）的改变来观察星形胶质细胞（兔抗人 GFAP 多克隆抗体，Sigma；一抗工作浓度为 1∶200）的变化。bcl-2 和 bax 的表达和 GFAP 阳性细胞由同济医科大学提供的 HPIAS－1000 图像分析系统采集图像并分析数据。

1.5 统计学处理

计量资料采用单因素方差分析。计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 凋亡神经元的检测结果

本实验结果显示，正常有少量的 TUNEL 阳性细胞。实验组从 3 d 开始，TUNEL 阳性细胞开始增加，15 d 达凋亡高峰，见图 1，与正常对照组相差非常显著（$P<0.01$）；高峰之后，TUNEL 阳性细胞有所减少，仍高于正常对照组，见表 1。

表 1 面神经断裂后面神经元凋亡检测结果
（$n=6$，$\bar{x}\pm s$，个/200 倍视野）

Tab 1 Apoptosis of facial neurons after facial neurotmesis
（$n=6$，$\bar{x}\pm s$，cells/a field of × 200）

Group	3 d	7 d	15 d	21 d	30 d	60 d
Control	1.12±.074	1.18±.068	1.21±0.91	1.26±0.72	1.15±0.81	1.17±0.85
Experimental	3.38±1.12	6.96±2.23	11.68±3.77*	10.92±3.14	10.13±2.98	9.94±2.76

*：$P<0.01$ *vs* Control

2.2 bcl-2 和 bax 的检测结果

表 2 面神经断裂后面神经元 bcl-2 表达检测结果
（$n=6$，$\bar{x}\pm s$，平均光密度）

Tab 2 Expression of bcl-2 in facial neuron after facial neurotmesis
（$n=6$，$\bar{x}\pm s$，OD）

Group	3 d	7 d	15 d	21 d	30 d	60 d
Control	6.2±1.8	6.5±2.1	6.1±1.5	6.8±2.2	5.9±1.6	5.7±1.7
Experimental	8.1±2.8	16.7±6.5	20.5±8.6*	13.2±4.9	11.3±4.2	9.4±3.2

*：$P<0.01$ *vs* Control

表 3 面神经断裂后面神经元 bax 表达检测结果（$n=6$ $\bar{x}\pm s$，平均光密度）

Tab 3 Expression of bax in facial neuron after facial neurotmesis
（$n=6$ $\bar{x}\pm s$，OD）

Group	3 d	7 d	15 d	21 d	30 d	60 d
Control	15.1±4.8	15.4±4.9	14.9±4.2	15.5±4.7	15.3±4.5	15.6±4.3
Experimental	18.4±6.3	40.7±14.3	68.9±16.2*	38.2±13.2	21.8±8.2	19.1±6.8

*：$P<0.01$ *vs* Control

正常成年大鼠面神经元 bcl-2 和 bax 表达很低，实验组从 3 d 开始增加，15 d 免疫阳性细胞着色最强，见图 2、3，平均光密度与对照组相差非常显著（$P<0.01$），但 bcl-2/bax 值却降至最低。以后逐渐下降，60 d 基本恢复正常，见表 2、表 3。

2.3 星形胶质细胞的检测结果

GFAP（Glial fibrillary acid protein）在星形胶质细胞阳性表达，而神经节细胞、神经元、成纤维细胞、少突胶质细胞阴性表达。正常面神经核 GFAP 阳性细胞稀疏，胞体小，胞核难以辨认。面神经断裂后同侧面神经核 GFAP 阳性细胞数 3 d 开始增加，15 d 达最多，胞体肥大，胞浆丰富，突起增多，延长，免疫组化染色，细胞着色最明显，见图 4，与对照组相差非常显著（$P<0.01$）。30 d 上述反应逐渐减弱，60 d 后仍可见星形胶质细胞反应，但胞体明显缩小，染色变浅，反应强度仍高于对照组。

表 4 面神经断裂后面神经核 GFAP 阳性细胞检测结果
（$n=6$ $\bar{x}\pm s$，个/mm²）

Tab 4 Number of GFAP positive astrocytes in facial nerve nucleus after facial neurotmesis（$n=6$，$\bar{x}\pm s$，cells/mm²）

Group	3 d	7 d	15 d	21 d	30 d	60 d
Control	9.2±2.3	20.1±2.1	18.4±2.6	19.4±1.6	18.9±1.9	19.5±2.2
Experimental	22.1±1.5	24.4±2.5	31.2±3.2*	27.6±2.9	25.3±2.3	23.2±2.2

*：$P<0.01$ *vs* Control

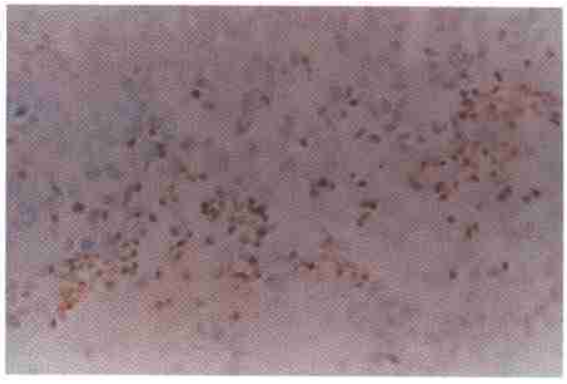


图 1 断裂后 15 d TUNEL 阳性细胞明显增多 （ABC× 100）

Fig 1 TUNEL positive cells increased obviously 15 d after facial neurotmesis （ABC× 100）

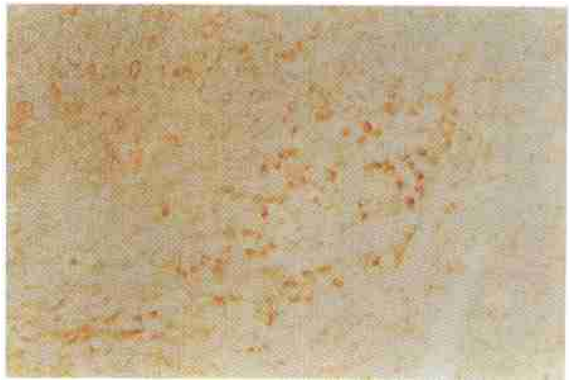


图 2 断裂后 15 d 面神经元 bcl-2 表达增强 （ABC× 100）

Fig 2 Strongly expressed bcl-2 in facial neuron 15 d after facial neurotmesis （ABC× 100）

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

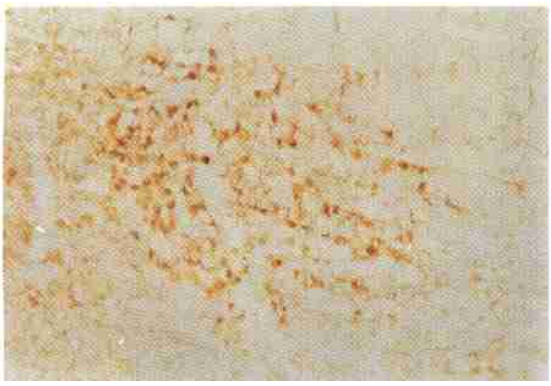


图 3　断裂后 15 d 面神经元 bax 表达增强　(ABC× 100)

Fig 3　Strongly expressed bax in facial neuron 15 d after facial neurotmesis　(ABC× 100)



图 4　断裂后 15 d 面神经核 GFAP 阳性细胞　(ABC× 100)

Fig 4　GFAP positive astrocytes in facial nerve nucleus after facial neurotmesis (ABC× 100)

3　讨论

随着各种外伤的增多, 面神经损伤的机会也在增加。面神经损伤所引起的一系列的变化和修复成为颌面外科研究的重点之一。研究表明, 外周神经损伤后的修复过程与其神经元的存活状态紧密相关。外周神经损伤后不但外周神经干发生变化, 神经元也发生典型的改变, 即细胞凋亡(Apoptosis)[3]。bcl-2 基因在滤泡 B 细胞淋巴瘤中由 t(14; 18)染色体异位活化, 编码分子量为 26×10^3 的蛋白。bcl-2 可以抑制多种因素引起的细胞凋亡[4], 而 bax 可以促进细胞凋亡。bcl-2/bax 的比例决定细胞凋亡与否[5]。星形胶质细胞在维持中枢神经系统(CNS)内环境的稳定, 介导 CNS 的免疫反应, 合成和分泌各种生物活性因子, 参与 CNS 损伤修复等方面均起重要作用[6]。本研究采用面神经断裂模型, 通过 TUNEL 和 ABC 免疫组化染色法观察了面神经核的凋亡和凋亡基因 bcl-2、bax 以及星形胶质细胞的反应情况。它们在面神经断裂后染色均增强, 数目增加, 断裂后 15 d 均达到反应高峰, 与对照组差别显著。

在哺乳动物细胞中的 bcl-2、bax 定位在线粒体外层膜, 内质网和核膜上。Oitvai 等[7] 认为, 细胞内 bcl-2 和 bax 固有比率是决定细胞对凋亡刺激是否易感的关键因素。当 bcl-2 过剩时, 细胞得到保护; bax 可以通过其自身形成的 bax 同二聚体和/或与 bcl-2 形成 bax-bcl-2 异二聚体而发挥作用, bax 同二聚体促进细胞凋亡, bax-bcl-2 异二聚体则抑制细胞凋亡[8], 因此, bcl-2 和 bax 表达比例决定细胞在受到凋亡刺激后是否发生凋亡。研究表明, bcl-2 抑制细胞凋亡的机制可能是抗氧化效应, 阻止细胞内 Ca^{2+} 流动, 控制细胞信号传导途径或调节 K-ras/raf 介导的信号传导从而抑制细胞凋亡[9]。本实验结果提示, 实验组 bcl-2/bax 降低, 术后 15 d 达最低, 与面神经元凋亡高峰一致, 这说明 bcl-2 和 bax 在面神经核区的面神经元凋亡过程中发挥重要作用。虽然术后 30 d 以后, bcl-2 和 bax 表达已基本恢复正常, 但凋亡面神经元仍然高于正常, 这表明神经元一旦出现凋亡, 将是不可逆转的, 也无法得到有效的补充; 该结果同时也说明, 面神经的断裂修复具有明显的时效性, 及时有效的修复对面神经功能的恢复将产生重要影响。

研究表明, 在神经系统发育时期, 有 50%的各类神经元发生凋亡, 这是由于一些神经元不能获得足够的特异性神经营养因子(NTFs)来维持细胞本身存活的缘故[10]。在正常状态下, 神经元与其微环境中的 NTFs 之间有一个"稳定状态", 靶组织或支持组织所产生的 NTFs 被轴突末端摄取, 然后逆行输送到神经元胞体, 调节神经元代谢和维持神经元的存活[11]。神经元获得营养支持的途径具有多样性, NTFs 可在早反应基因诱导下合成, 经内分泌或自分泌到神经细胞的核周体; 神经元本身也可以合成 NTFs。但是雪旺氏细胞及神经支配的靶器官是 NTFs 的主要来源。因此, 面神经断裂后面神经元不能获得足够的 NTFs, 这可能是导致部分面神经元凋亡的主要原因。同时也说明, 对于外周神经断裂, 尽快恢复其连续性和轴浆逆行运输通道, 恢复神经元所需的营养因子的供应, 对于减少神经元的死亡, 促进神经的再生与功能恢复具有重要意义。

星形胶质细胞(Astrocyte)作为 CNS 的结构和功能的重要组成部分, 不仅具有支持作用, 而且全面参与了 CNS 的各种病理生理过程。星形胶质细胞在 CNS 损伤修复过程中的突出特点是对各种伤害性刺激表现出迅速活跃的反应。显著特征是在损伤局部形成反应性胶质化(Reactive gliosis)[12], 星形胶质细胞具有活跃的吞噬功能, 可以吞噬损伤局部的组织碎片, 变性坏死的组织, 为神经元的存活与再生创造良好的微环境[13], 同时也可以分泌包括 NTFs 在内的大量细胞因子, 增强神经元的营养和代谢, 抵消了因为外周轴突断裂而导致神经元营养因子缺乏的不利影响, 从而有利于提高神经元的存活率与外周神经的再生。也有研究表明, 星形胶质细胞在促进修复的同时, 由于胶质瘢痕的形成, 再生轴突不能到达靶细胞, 难以形成神经环路, 得不到来自靶细胞的营养和功能支持, 神经元存活所需

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

的营养因子不能得到及时的补充，引起神经元的溃变和死亡[14]。

本实验结果显示，星形胶质细胞反应与面神经元损伤之间关系密切。星形胶质细胞是一个功能十分复杂的细胞，适度的星形胶质细胞反应有利于增强神经元的营养和代谢，提高神经元的存活，促进损伤神经的修复，过度的反应因为胶质瘢痕的形成而影响神经元的营养代谢，不利于神经元的存活，对外周神经损伤的恢复将产生有害的影响。因此，如何调整星形胶质细胞的功能，最大限度的发挥其营养神经元的有益功能，减少其不利影响，是值得进一步研究和探讨的问题，也将对面神经断裂后的恢复产生一定的影响。

参考文献：

[1] Serpe C J, Sanders V M, Jones K J. Kinetics of facial motorneuron loss following facial nerve transection in severe combined immunodeficient mice [J]. J Neurosci Res, 2000, 62(2): 273－278.

[2] Radpour S, Gacek R R. Facial nerve nucleus in the cat. Further study[J]. Laryngoscope, 1980, 90(4): 685－692.

[3] Ygge J. Neuronal loss in lumbar dorsal root ganglia after proximal compare to distal sciatic nerve resection a quantitative study in the rat[J]. Brain Res, 1989, 478(62): 143－149.

[4] Vaux D L, Cory S, Adams J M. bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells[J]. Nature, 1998, 335(89): 440－442.

[5] Sato T, Hanada M, Bodrud S, *et al*. Interaction among members of the bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(48): 9 238－9 242.

[6] Yu A C, Lee Y L, Fu W Y, *et al*. Gene expression in astrocyte during and after ischemia[J]. Prog Brain Res, 1997, 105(39): 245.

[7] Oltvai Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J. bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homology, bax that accelerates programmed cell death[J]. Cell, 1993, 74(89): 609－619.

[8] Stadelman C, Mews I, Srinivasan A, *et al*. Expression of cell death-associated proteins in neuronal apoptosis associated with pontosubicular neuron necrosis[J]. Brain Pathol, 2001, 11(3): 273－281.

[9] Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer C G, *et al*. Prion protein protects human neurons against bax-mediated apoptosis[J]. J Biol Chem, 2001, 276(42): 39 145－39 149.

[10] Takuma K. Delayed apoptosis and its regulation in astrocytes[J]. Yakugaku Zasshi, 2001, 121(9): 663－669.

[11] Raff M C, Barres B A, Burne J F, *et al*. Programmed cell death and the control of cell survival lesions from the nervous sysytem[J]. Science, 1993, 262(95): 695－699.

[12] Ray S K, Matzelle D D, Wilford G G, *et al*. Inhibition of calpain－mediated apoptosis by E-64 d-reduced immediate early gene (IEG) expression and reactive astrogliosis in the lesion and penumbra following spinal cord injury in rats[J]. Brain Res, 2001, 916(1－2): 115－126.

[13] Corley S M, Ladiwala U, Besson A, *et al*. Astrocytes attenuate oligodendrocyte death *in vitro* through an alpha(6) integrin-laminin-dependent mechanism[J]. J Neurooncol, 2001, 54(1): 23－29.

[14] Cassina P, Peluffo H, Pehar M, *et al*. Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis [J]. Brain Pathol, 2001, 11(3): 273－281.

（编辑 王 红）

（上接 1432 页）

2 结果

术后 5 d 复诊切口均已愈合，下睑轻度肿胀；术后 2 周复诊 60 例患者自觉效果满意。观察眼袋消失，下睑皮肤无色素沉着，无睑外翻。2 例术后 10 d 发生单侧继发性出血，约 3～5 ml，伴球结膜轻度淤血，予局部压迫、口服止血药，出血停止；2 例术后 10 d 出现球结膜水肿，予帕利白滴眼液滴眼，2 d 后水肿消失。1 例术后 1 月出现复视，眼科会诊后考虑下斜肌可能受损，口服 ATP 及理疗，半年后恢复正常。术后 1 年电话随访该组 60 例患者，效果满意。

3 讨论

Ultrapulse 5000C 型 CO_2 激光可控制高峰值功率的短脉冲达 1/30 000 s，可在整个脉冲期间保持极高的峰值能量，并在瞬间汽化靶组织。由于该激光作用于靶组织并对其产生破坏的时间短于向周围组织热扩散的时间，从而避免了对周围组织造成热损伤，使其愈合过程与常规手术无明显差别。本组切口愈合均在 1 周内。对工作生活影响较小。

应用该激光对组织可进行汽化、切割，并能封闭小血管，术中基本免去了止血这一步骤，切口又不用缝合。使手术时间明显缩短。

眼袋整形的传统术式已沿用多年，它的优点是可以切除皮肤松弛严重患者多余的皮肤，但有它不可避免的缺点，其中患者最大的顾虑是可能遗留切口瘢痕，其次是可能形成眼睑外翻。随着激光医学的发展，使这些顾虑可以消除。由于激光特殊的生物学效应，可以使术中切割和凝固的组织收缩，无需切除下睑的皮肤，但对松弛的皮肤无作用，避免了瘢痕及睑外翻。

麻醉剂选用 1%利多卡因，其优点在于无需皮试，且有抗心律失常的作用。

加压冰敷的目的是减轻激光可能产生的热传导对周围组织的损伤。虽然切口几天就能愈合，但由于下睑组织较松弛，部位接近眼部，敷料加压包扎较困难，为使切口下的组织正常愈合，应嘱患者 2 周内避免剧烈活动。

本组 4 例在术后 10 d 出现的情况是由于当时的医嘱患者未记清，以为术后恢复很好，无任何不适，而用力洗脸和参加健身活动所致。1 例出现复视，原因是开展手术初期，对于激光能量及使用激光刀的切割技巧经验不足，导致可能损伤下斜肌及周围肌间膜，这是今后应注意的方面。另外，由于手术时，患者仰卧，眼袋情况与站立时有差别，所以，术前一定要仔细观察眼袋的具体部位、大小，予以标记，术中根据两侧的具体情况，切除脂肪组织，尽最大可能使两侧对称，切除时不要用力牵拉脂肪组织，切除过多，可能造成下睑凹陷，影响美观。当然，用激光行眼袋整复也有局限性，对于不是以脂肪疝为主且皮肤非常松弛的病例仍然以传统术式为佳。

关键词：眼袋；激光手术
中图法分类号：R779.63 文献标识码：B

参考文献：

[1] 齐兴国，解 翔，闫瑞红，等. 超脉冲 CO_2 激光在眼袋整复中的应用[J]. 实用美容整形外科杂志，1998, 9(1): 12－13.

[2] 章庆国，万志新. 下睑袋整形术中眶隔脂肪的保留和利用[J]. 实用美容整形外科杂志. 1997, 8(1): 36－37.

（编辑 张大春）

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