DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.028
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

文章编号:1000-5404(2002)04-0439-03

论著

联合应用NGF和CNTF对大鼠坐骨神经损伤后功能恢复的影响

楚燕飞[1],朱 刚[1],陈 菁[2],李兵仓[2],王宪荣[1],冯 华[1] (第三军医大学:[1]附属西南医院神经外科,重庆 400038;[2]附属大坪医院野战外科研究所第六研究室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨联合应用神经营养因子(Nerve growth factor,NGF)和睫状神经营养因子(Ciliary neurotrophic factor,CNTF)对大鼠坐骨神经损伤后再生及功能恢复的影响。方法 用硅胶管桥接120只大鼠左侧坐骨神经长6 mm缺损,随机分为4组,分别行NGF+CNTF、CNTF、NGF、生理盐水(NS)靶肌肉注射。术后行坐骨神经功能指数(SFI)、电生理检测、病理学检查。结果 联合应用NGF和CNTF组SFI恢复率、各项电生理及轴突图像分析指标明显优于单独用药组。结论 联合应用NGF和CNTF可明显促进大鼠坐骨神经损伤后再生与功能恢复。

关键词:周围神经;NGF;CNTF;损伤
中图法分类号:R349.32;R651.3 文献标识码:A

Effect of co-application of NGF and CNTF to functional recovery after sciatic nerve injury in rats

CHU Yan-fei, ZHU Gang, CHEN Jing, LI Bing-cang, WANG Xian-rong, FENG Hua (Department of Neurosugery, Southwest hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of co-application of nerve growth factor (NGF) and ciliary neurotrophic factor (CNTF) on the regeneration and functional recovery of transected sciatic nerve in rats. Methods A total of 120 Wistar rats were divided randomly into 4 groups. The sciatic nerve was transected and then bridge-connected with silicone tube. The NGF+CNTF group received target muscle injection of NGF 100 ng/kg, and CNTF 100 ng/kg every day. CNTF group received 100 ng/kg, NGF group100 ng/kg. And NS group was given equal normal saline. The sciatic nerve functional index (SFI) measurement, electrophysiolgical assessment and morphometric analysis were performed for all the animals. Results The SFI, electrophysiologic parameters (nerve conduction velocity and amplitude of compound muscle action potentials), myelineted axons were significantly higher in NGF+CNTF group than in other groups. Conclusion Co-application of NGF and CNTF can enhance peripheral nerve regeneration and functional recovery.

Key words: peripheral nerve; nerve growth factor; ciliary neurotrophic factor; injury

周围神经损伤一直是临床治疗和基础研究的难题,近年来人们对硅胶管周围神经再生室深入研究发现,再生室内有多种神经营养因子表达增高[1]。其中对神经营养因子(Nerve growth factor, NGF)和睫状神经营养因子(Ciliary neurotrofic factor, CNTF)研究较多,但研究多集中于考虑单独用药对神经再生的影响,而联合应用NGF和CNTF对周围神经再生和功能恢复的影响缺乏相关报道。本研究探讨联合用药对周围神经损伤后再生和功能恢复的影响,及其对治疗周围神经损伤重要意义。

1 材料和方法

1.1 动物及实验分组

Wistar雌性大白鼠(大坪医院实验动物中心提供)120只,体重225~250 g,随机分为NGF(人重组NGF,100 μg/支,Sigma)+CNTF(PeproTech EC Ltd提供人重组CNTF,25 μg/支)治疗组、CNTF治疗组、NGF治疗组及生理盐水组(Normal saline, NS),每组30只,以上每组又随机分为1、2、3月组,每组10只。

1.2 坐骨神经损伤模型

NGF+CNTF治疗组、CNTF治疗组、NGF治疗组及生理盐水组经1%戊巴比妥钠(30~40 mg/kg)腹腔麻醉,无菌条件下,左下肢背侧纵向切口,于股二头肌和股外侧肌之间钝性分离,游离坐骨神经,距离梨状肌下缘5 mm处将坐骨神经锐性切断,并切除5 mm神经,坐骨神经两断端分别套入1 cm长的硅胶管(内径1.6 mm、外径2.4 mm)中,在10倍手术显微镜下用8-0无创缝合针线将神经外膜与硅胶管分别缝合固定一针,两神经断端相距6 mm。

1.3 用药剂量和方法

CNTF 100 ng/kg体重,NGF 100 ng/kg体重。术中在硅胶管内滴加药物1次,术后于股二头肌以下肌肉每日肌注1次,连续1个月。NS组滴加和肌注等量生理盐水。

1.4 坐骨神经功能指数(Sciatic nerve function index)评定

自制大鼠行走箱,宽8.5 cm,长50 cm,一侧开门。将白纸裁成与行走箱等长等宽放在箱底在培养皿内放入少许棉花,倒入少量碳素墨水使棉花浸湿,将大鼠后足在培养皿内蘸一下,放入行走箱一端,让其自行走向箱的另一端,并从侧门走出。每侧足留下3或4个足印。术前10 d和术后每10 d检测实验侧足(E)、正常侧足(N)的足印长度(Print length factor, PIF)、足距宽度(Toe spread factor, TSF)、中间足趾宽度(Intermediary toe spread factor, ITF),直至3个月。将上述3个变量代入Bain公式

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)
作者简介:楚燕飞(1971-),男,河南省睢县人,硕士研究生,医师,主要从事中枢及周围神经损伤方面的研究。电话:(023)68754153。
收稿日期:2001-09-02;修回日期:2001-10-10

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

计算出 SFI。

SFI= －38.3(EPL-NPL)/NPL＋109.5(ETS-NTS)/NTS＋13.3(EIT-NIT)/NIT-8.8。

正常大鼠 SFI 为 0，坐骨神经完全离断指标为－100[2]。

1.5 电生理检测

术后 30、60、90 d 用肌电诱发电位仪检测坐骨神经传导速度、复合肌肉动作电位的波幅。

1.6 病理学检查

电生理检查完毕后，多聚甲醛灌注固定，取硅胶管内再生坐骨神经 3% 戊二醛固定，Epon812/618 定向包埋，超薄切片经枸橼酸铅染色后在 JEM-1200E 透射电镜下观察再生神经轴突形态，并进行单位面积再生轴突记数和直径测定。

1.7 统计学分析

采用配对资料的 t 检验。

2 结果

2.1 SFI

联合用药组 SFI 的恢复效果明显优于单独用药组和 NS 组，见图 1。

2.2 电生理检测

联合用药组比单独用药组神经传导速度快，波幅高，差异有显著性，见表 1、2。

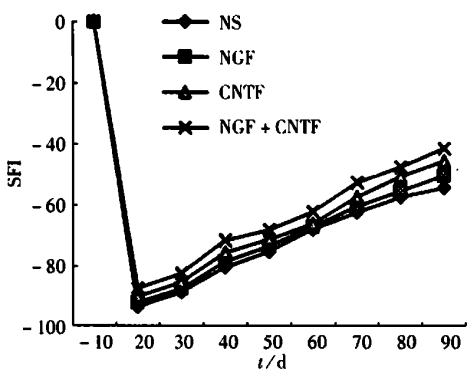


图 1 各处理组各时间点 SFI 恢复情况比较

Fig 1 Comparison of SFI at different time points after operation among different groups

表 1 各处理组各时间点坐骨神经传导速度的比较(m/s，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of nerve conduction velocity of every group at different time points(m/s，$\bar{x}\pm s$)

Group	30 d *	60 d **	90 d ***
NGF＋CNTF	14.63±0.56	26.32±1.26	37.58±1.38
CNTF	13.28±0.75	22.66±1.32	32.84±1.51
NGF	10.95±0.70	18.91±1.31	28.64±0.97
NS	7.00±1.13	14.24±0.97	22.91±0.76

*：$P<0.01$、**：$P<0.01$、***：$P<0.01$

表 2 各处理组各时间点复合肌肉动作电位的波幅的比较(mV，$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Comparison of compound muscle action potentials amplitudes of every group at different time points (mV，$\bar{x}\pm s$)

Group	30 d *	60 d **	90 d ***
NGF＋CNTF	5.26±0.55	7.39±0.44	9.88±0.77
CNTF	4.18±0.40	5.64±0.68	8.05±0.60
NGF	3.22±0.46	4.42±0.41	6.27±0.59
NS	2.11±0.52	3.09±0.67	4.78±0.43

*：$P<0.01$、**：$P<0.01$、***：$P<0.01$

2.3 病理学检查

术后 30 d 各组坐骨神经均可成功跨越硅胶管，见图 2。联合用药组再生神经中段有髓神经纤维数目、直径均优于单独用药组，差异显著 $P<0.01$，见表 3、4，图 3、4。

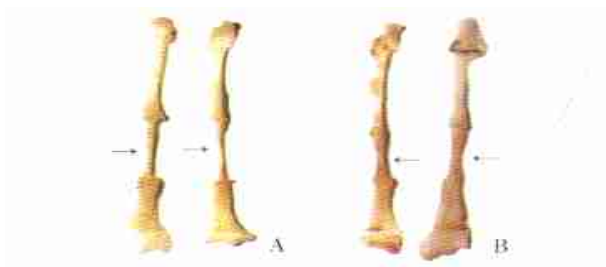


图 2 NGF＋CNTF 和 CNTF 治疗后 30 d，再生神经跨越硅胶管连接远端，且联合给药组(B)再生神经(➡)直径比 CNTF 组(A)粗。

Fig 2 30 days after treated by CNTF and NGF＋CNTF, the regenerated nerve bridged the silicone tube and reached the remote end. The regenerated nerve(➡) of NGF＋CNTF group(Fig B) was thicker than CNTF group(Fig A)

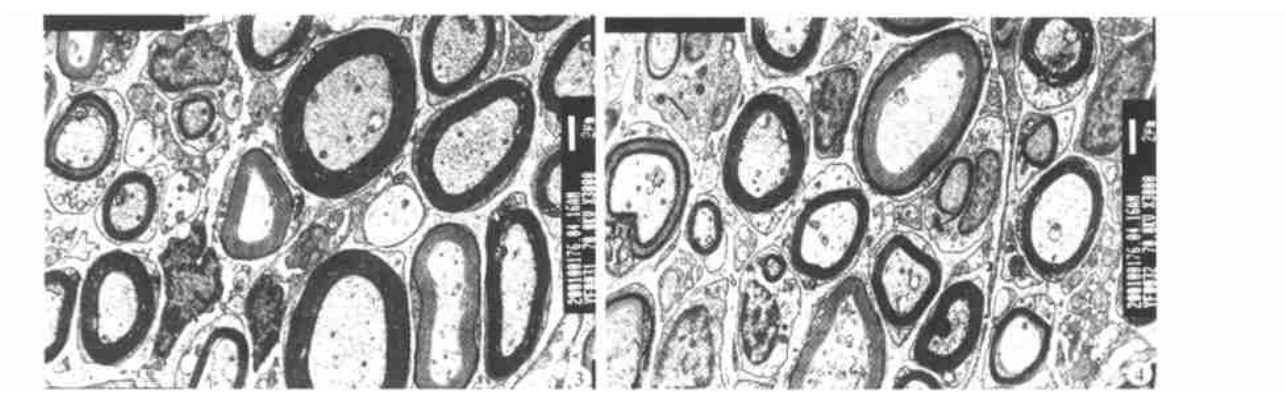


图 3 NGF＋CNTF(图 3)、CNTF(图 4)治疗后 90 d，联合给药组再生神经排列紧密，且髓神经纤维，直径、髓鞘厚度均优于 CNTF 组

Fig 3 90 days after treated by NGF＋CNTF(Fig 3) and CNTF(Fig 4), the regenerated nerve of NGF＋CNTF group arrasyed tightly, both myelineted axons and myelin sheath were thicker that of CNTF group

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

表 3　单位横断面再生有髓神经纤维数的比较(条, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Comparison of myelineted axons counts of every group at different time points($\bar{x}\pm s$)

Group	30 d	60 d **	90 d ***
NGF+CNTF	244±10	329±14	374±10
CNTF	223±12	276±12	345±14
NGF	194±16	244±9	309±16
NS	181±16	217±12	272±16

*: $P<0.01$、**: $P<0.01$、***: $P<0.01$

表 4　再生有髓神经纤维直径的比较(nm, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Comparison of myelineted axons diameters of every group at different time points(nm, $\bar{x}\pm s$)

Group	30 d	60 d **	90 d ***
NGF+CNTF	349±15	377±10	410±11
CNTF	335±9	352±6	388±13
NGF	319±9	333±9	352±7
NS	287±7	313±14	326±10

*: $P<0.01$、**: $P<0.01$、***: $P<0.01$

3　讨论

NGF 是最早发现的神经营养因子, 该因子释放不受钙流影响, 可被轴突终末摄取并朝胞体作逆向转运, NGF 对感觉神经元和交感神经元具有营养作用, 对运动神经元再生也起着潜在的调节作用[3]。CNTF 是由 200 个氨基酸组成的酸性蛋白, 分子量为(10×10^3)~(20×10^3), 神经元内源性 CNTF 主要来源于周围神经雪旺细胞, 中枢神经胶质细胞以及神经元的自分泌[5]。CNTF 不仅能维持感觉、交感和副交感神经元存活, 促进其突起生长, 还能维持运动神经元存活。局部给予外源性 CNTF 能明显促进轴突再生及再髓鞘化过程, 加快再生神经结构成熟和功能恢复[4]。

CNTF 在周围神经切断早期其远段神经表达减少, 直至 3~4 周神经恢复再生时才表达增加, 说明早期补充外源性 CNTF 可弥补损伤部位 CNTF 含量的不足, 而增加对受损神经的营养支持作用。CNTF 在周围神经再生过程中表达减少与 Ras 细胞外信号调节激酶(ERK)的激活有关, 而 EPK 是与雪旺细胞激活相关的激酶之一[5]。雪旺细胞上存在有 NGF 和 CNTF 受体, 局部滴加 NGF 和 CNTF 在外周促进雪旺细胞增殖和髓鞘形成, 并能通过逆行轴浆运输保护脊髓神经元, 而靶肌肉注射既可增加局部 NGF 和 CNTF 的含量, 又可通过血行运输保护脊髓神经元, 促进轴突生长。

NGF 和 CNTF 均能促进周围神经损伤后再生与功能重建, 其中 CNTF 的效果明显优于 NGF, 本研究的结果和以往研究结果一致[6]。但以往研究多集中考虑单一因素对周围神经功能恢复的影响, 而周围神经损伤后的功能恢复取决于脊髓神经元、局部的微环境和靶肌肉等多种因素, 其中在周围神经损伤后局部就可检测到 20 多种神经营养因子表达增高。说明联合应用神经营养因子符合周围神经损伤后再生的病理生理环境, 本实验通过联合应用 NGF 和 CNTF 促进坐骨神经再生的功能指标及形态学指标均明显优于单独用药, 其机制除单一因子的作用外, 还可能通过非共价键形成异二聚体增强神经营养因子的功能[7]。本实验中, 直至 3 月坐骨神经的功能学指标及形态学指标仍未恢复到正常水平, 提示联合用药的剂量和方式仍有待进一步研究。目前神经营养因子治疗周围神经损伤的用药方式主要有在损伤局部一次性给药、靶肌肉注射、腹腔内注射、局部通过微渗透泵缓慢释放, 通过转基因技术将表达神经营养因子的细胞移植到损伤局部[8]。但一次性给药难以保证药物的持续作用, 腹腔内注射存在病人的耐受问题, 微渗透泵存在有排斥反应和体内吸收问题, 基因治疗的载体选择和伦理道德问题仍未解决, 这些方法都难以在临床推广应用。本研究通过局部用药结合靶肌肉注射 NGF 和 CNTF 明显促进周围神经再生, 给临床应用 NGF 和 CNTF 提供了一个较为合理有效的给药方式。本研究根据 CNTF 在神经损伤早期表达减少, 直至 3~4 周神经恢复再生时才表达增加的变化特点而考虑用药一月, 但用药时间国内外争论较多, 尚需进一步探索。文献[9]报道大剂量全身给予 CNTF 制剂脊髓神经元凋亡数量明显增加, 合理的给药浓度仍需进一步探索。

参考文献:

[1] Yin Q. Neurotrophins, neurons and peripheral nerve regeneration[J]. J Hand surg Br, 1998, 23(4): 433—437.

[2] 沈江宁, 朱家凯. 坐骨神经指数在神经功能评价中的应用[J]. 中华显微外科杂志, 1993, 16(4): 284.

[3] Gold B G. Regulation of axonal caliber, neurofilument content, and nuclear localization in mature sensouy neurons by nerve growth factor[J]. J Neurosci, 1991, 11(4): 943.

[4] 韩久卉, 张英泽, 许秀兰, 等. 睫状神经营养因子对周围神经损伤后再生的影响[J]. 中国骨伤, 2000, 13(10): 585—587.

[5] Abe K, Namikawa K. Inhibition of Ras extracellular-signal-regulated kinase (ERK) mediated signaling promotes ciliary neurotrophic factor (CNTF) expression in Schwann cells[J]. J Neurochem, 2001, 77(2): 700—703.

[6] 方有生. 周围神经损伤的药物治疗现状和进展[J]. 现代康复. 2000, 4(11): 1610—1612.

[7] Zum A D, Winkel l, Menoud A, *et al*. Combined effects of GDNF, BDNF and CTNF on motoneuron differentiation *in vitro*[J]. J Neurosci res, 1996, 44(): 133.

[8] 佟晓杰. 周围神经再生及其影响因素[J]. 现代康复, 2000, 4(10): 1456—1457.

[9] Hammarberg H, Piehl F, Risling M, *et al*. Differential regulation of trophic factor receptor mRNAs in spinal motoneurons after sciatic nerve transection and ventral root avulsion in the rat[J]. J Comp Neurol, 2000, 426(4): 587—601.

(编辑　陈聪连)

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