DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.06.019

兔面神经撞击伤后神经丝蛋白的变化及丙酸睾丸酮的促修复作用

姜燕平* 王正国 刘宝松 朱佩芳 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室) 重庆,400038

提 要 目的:研究面神经撞击伤后面神经核内神经丝蛋白(NFP_{200})的变化及丙酸睾丸酮(TP)治疗的影响。方法:利用BIM-Ⅱ型生物撞击机致兔右侧面神经干损伤,应用ABC免疫组化染色方法,观察损伤后1、3、7、14 d和21 d面神经核内NFP_{200}的改变,电镜观察面神经干超微结构变化,以及TP对这些改变的影响。结果:面神经损伤第1天,伤侧面神经核区NFP_{200}免疫反应阳性神经元开始减少,第7天降至最低,伤后14 d逐渐上升。TP治疗组各时相点NFP_{200}的含量明显高于对照组。与对照组相比,伤后第21天TP组面神经干电镜观察可见较多的新生髓鞘。结论:TP治疗可增加伤后面神经核内NFP_{200}的含量,因而有助于面神经损伤后的修复与再生。

关键词 面神经;神经丝蛋白(NFP_{200});丙酸睾丸酮(TP)
中图法分类号 R651.3;R977.12

随着交通事故、暴力事件的增多,累及面神经损伤的颌面部撞击伤发生率不断升高。因此,面神经损伤的修复研究日益受到各国学者的广泛重视。现已发现,周围神经再生过程中,神经元及其轴突中的神经丝蛋白(NFP_{200})含量发生改变,表明NFP_{200}与神经元的轴突再生密切相关[1]。本研究旨在探讨面神经撞击伤及修复过程中面神经核内NFP_{200}的改变以及丙酸睾丸酮(Testesterone propionate,TP)的促修复作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

1.1.1 分组 雄性新西兰兔[体重(2.61±0.38)kg]80只。随机分为伤后1、3、7、14 d和21 d TP治疗组及相应5个时相点的对照组(生理盐水),每组8只动物。

1.1.2 致伤 1.5%戊巴比妥钠30 mg/kg耳缘静脉麻醉,暴露右侧面神经主干,在茎乳孔远端1 cm处用BIN-Ⅱ型生物撞击机[2]致伤,撞击锤质量1.5 kg,撞击速度8.5 m/s,撞击面积0.78 cm^2,撞击压缩幅度1 cm。

治疗组于伤后当日于伤侧耳后皮下注射TP 3 mg/kg,对照组注射生理盐水3 mg/kg,每日1次至取材。

1.1.3 取材及制片 各组动物抵达其时相点后麻醉下不同部位取材。

1.1.3.1 脑干 用于免疫组化染色(每组4只)。经升主动脉快速灌注4℃生理盐水500 ml及4%多聚甲醛1 000 ml,每只动物水平切面切取一块3 mm厚脑干薄片(以桥延沟为中点),4%多聚甲醛后固定24 h。

1.1.3.2 面神经干 电镜取材作超微结构检查(每组4只)。用4℃生理盐水200 ml和1 000 ml 4℃ Karnovsky's液灌注,取右侧面神经干一块(5 mm长,以面神经撞击点为中心),2.5%戊二醛中后固定2 h,透射电镜观察。

1.2 免疫组织化学

脑干标本块经20%蔗糖固定12 h,15 μm冰冻切片。每块标本选10张切片融贴在玻片上。Streptavidin-peroxidase(SP)法免疫染色(福州迈新生物技术开发公司)[3],抗NFP_{200}单克隆抗体购自Sigma公司,苏木素复染。

1.3 统计学处理

分别计算每张切片面神经核内NFP_{200}阳性反应神经元的数量,组间差异采用t检验。

2 结果

2.1 大体观察

伤后即刻每只动物均有短暂的抽搐及呼吸暂停。10~30 min后动物心率、呼吸、瞳孔均在正常范围。3 h后动物完全清醒,可自行进食水。

致伤后伤侧眼睑中度下垂、角膜反射显著减弱。电刺激伤侧口角无收缩反应、胡须无颤抖。撞击部位软组织肿胀、有少量出血及渗出,撞击区面神经干充血、水肿,呈暗红色,面神经连续性尚好,无明显移位。第3天,面神经干严重肿胀、直径达3~4 mm(正常面神经干直径为1.5 mm),外膜下有散在出血。第7天和第21天取材时见神经外膜增厚,并与周围组织有粘连。

2.2 免疫组化

正常侧面神经的α、β、γ、δ、ε亚核团内可见散在分布的NFP_{200}免疫反应阳性神经元的胞体及其突起,呈棕黄色。伤后第1天,NFP_{200}开始减少,第7天降至最低,见图1。早期脑干伤侧面神经核内有大量的胶质细胞浸润,部分神经元发生空泡样改变,第14天伤侧NFP_{200}免疫反应阳性神经元逐渐增多,第21天,增强的免疫染色密度开始降低。计算机图像分析显示,伤后第14天TP治疗组NFP_{200}的含量显著多于对照组($P<0.01$),其数值及组化染色结果见表1、图2。

* 姜燕平,女,37岁,主治医师,博士研究生

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

表1 伤侧面神经核内 NFP_{200} 阳性反应神经元数量的变化

Tab 1 Change of NFP_{200} in facial nucleus of injured side

Group	1st day	3rd day	7th day	14th day	21st day
Treatment	58.8±9.1	34±12.5	21.5±5.0**	39.0±8.4*	59.7±9.3*
Control	60.2±5.5	31.6±9.0	15.7±5.8	32.9±7.6	53.4±7.8

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

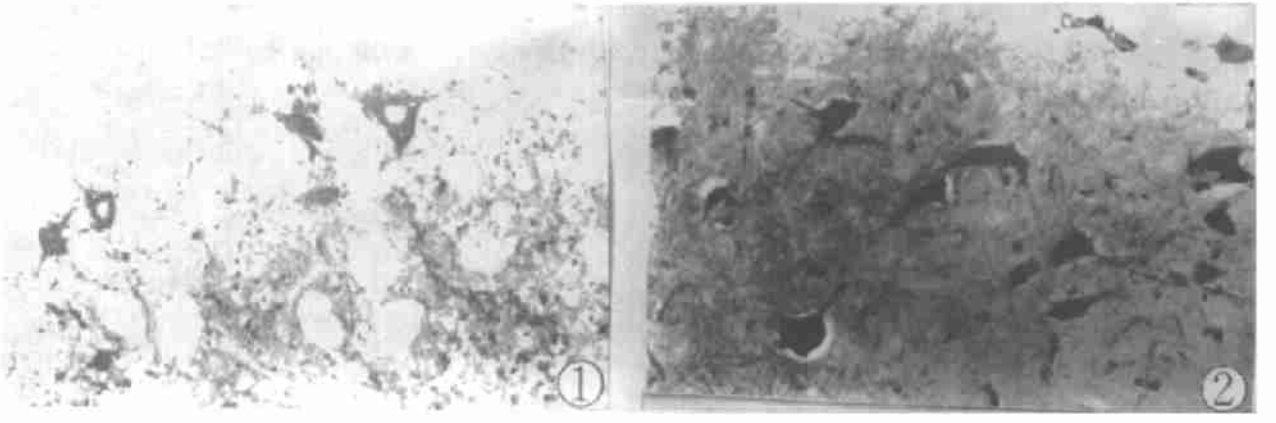


图1 伤后7 d NFP_{200} (S-P×400)

Fig 1 NFP_{200} 7 d after injury (S-P×400)

图2 伤后14 d NFP_{200} (S-P×400)

Fig 2 NFP_{200} 14 d after injury (S-P×200)

2.3 电镜

伤后1 d,髓鞘肿胀,间隙水肿,伤后3 d,髓鞘板层内结构模糊不清,出现斑片状和宽条带状融合,线粒体肿胀,空泡变性。伤后7 d,髓鞘局部出现崩解,微丝、微管稀疏。伤后第21天与对照组相比,TP治疗动物神经干的雪旺氏细胞内核糖体明显增多,可见较多的新生髓鞘,见图3,对照组可见纤维母细胞增生,周围分泌大量的胶原基质,见图4。

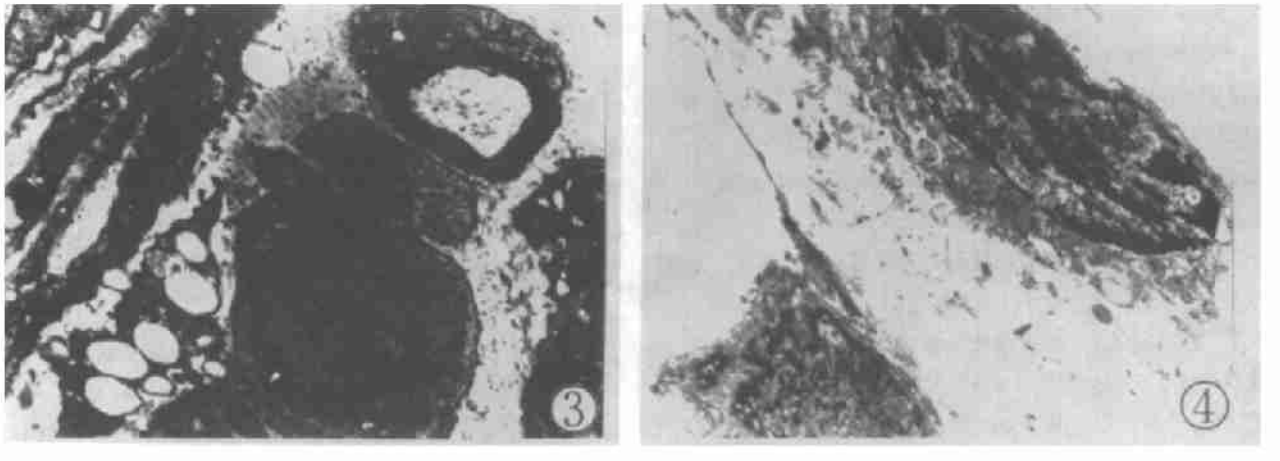


图3 治疗组伤后21 d (TEM×6 000)

Fig 3 Treatment group 21 d after injury (TEM×6 000)

图4 对照组伤后21 d (TEM×8 000)

Fig 4 Control group 21 d after injury (TEM×8 000)

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

3 讨论

3.1 实验模型及面神经撞击伤的特点

周围神经损伤的修复是神经外科领域研究的重要课题之一。建立实验模型的目的在于提供一种量化手段，客观评价各种方法进行神经损伤修复或治疗的效果。本研究采用面神经撞击伤的实验模型，通过撞击力和撞击过程中的复合应力效应使周围组织受到挤压、牵拉和震荡，造成面神经中度损伤。有学者认为神经被拉长 10%，将引起神经的功能障碍，而伸长 15%～20%时，则出现形态学方面的一系列改变[4]。为减少合并伤对结果的影响，我们直接撞击面神经干，致其中度偏重损伤[5]。该模型所致伤情稳定、重复性好，能满足实验要求。

3.2 神经损伤后 NFP_{200} 的表达

NFP_{200} 是一种分子量 200 kD 的神经丝蛋白，由神经元胞体合成。正常情况下，NFP_{200} 以磷酸化及非磷酸化两种形式存在于神经元。周围神经损伤后及再生期间，受损神经细胞体内 NFP_{200} 基因表达发生变化。一般在损伤早期 NFP_{200} 表达明显降低，伤后 14 d 随着神经的再生过程，其含量逐渐恢复至正常。这表明 NFP_{200} 与神经元的轴突再生过程有密切关系[6]。

3.3 TP 对神经再生的影响

中枢神经系统是包括 TP 在内的所有类固醇激素作用的重要靶器官及代谢场所，已查明面神经运动神经元和面部肌肉的肌细胞均含有雄激素受体[7]，在面神经挤压伤的研究中发现，TP 可显著增加伤后兔面神经中 NFP_{200} 的合成，加速面神经的修复过程，其作用机制可能是促进了神经元中细胞骨架蛋白合成的增多[8]。我们的实验结果证实：TP 可使面神经损伤后 NFP_{200} 合成增多，因而促进神经修复及再生。因此，单克隆抗 NFP_{200} 抗体可作为判断神经损伤程度及再生情况的标准，用于神经损伤及修复的研究。

参考文献

1 Grafstein B, Forman D S. Intracellular transport in neurons. Physiol Rev, 1980, 60(4): 1167

2 孙立英，王正国. BIM-Ⅰ型及Ⅱ型卧式生物撞击机的研制. 中华创伤杂志，1993，9(2)：114

3 任占平. 应用 SP 免疫组化染色法的体会. 诊断病理学杂志，1994，1(3)：176

4 刘继峰. 神经牵拉损伤的研究. 中华实验外科杂志，1994，11(6)：375

5 王亦璁. 创伤早期处理. 北京：人民卫生出版社，1994. 731～733

6 Mohiudin L, Tomlinson D R. Impaired molecular regenerative responses in sensory neurones of diabetic rats: gene expression changes in dorsal root ganglia after sciatic nerve crush. Diabetes, 1997, 46(12): 2057

7 Yu W H, McGinnis M Y. Androgen receptor levels in cranial nerve nuclei and tongue musclesin rats. J Neurosci, 1986, 6(5): 1302

8 Gold B G, Storm Dickerson T, Austin D R. Regulation of aberrant neurofilament phosphorylation in neuronal perikarya. Brain Res, 1993, 626(1-2): 23

（收稿：1998-12-28；修回：1999-04-13）

（编辑　张大春）

Effects of testosterone propionate on changes of neurofilament protein in facial nucleus after facial nerve impact injury in rabbits

Jiang Yanping, Wang Zhengguo, Liu Baosong, Zhu Peifang (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To investigate the changes of neurofilament protein (NFP_{200}) in facial nucleus after facial nerve impact injury and the effects of testosterone propionate (TP) on them. Methods: After the model of facial nerve impact injury was established with Type BIM-II biological impact machine on the right side of face in rabbits, the content of NFP200 in right facial nucleus and ultrastructural changes of facial nerve at different time phases of the 1st, 3rd, 7th, 14th and 21st day after injury were determined with immunohistochemistry and electron microscopy respectively. Results: The neurons with positive NFP_{200} immunohistochemical reaction in the facial nucleus on damaged side began to decrease on the 1st day and reached the lowest on the 7th day after injury, then increased gradually in both groups. NFP_{200} was significantly higher in TP-treated group than in the control on the 7th and 14th day after injury ($P<0.01$). Electron microscopy showed that there was new myelinogeny in facial nerve in TP-treated group and proliferation of fibroblast cells in the control on the 21st day after injury. Conclusion: TP is helpful for repair and regeneration of the injured facial nerve for it can increase the content of NFP_{200} in facial nucleus after injury.

Key words facial nerve; neurofilament protein; testosterone propionate; rabbit

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