

· 基础研究 ·

NGF 与 CNTF 促进周围神经电生理功能恢复的协同作用研究

李强 伍亚民 李氏 陈恒胜 曾琳 杨恒文

【摘要】目的 利用新型神经再生小室模型探讨联合应用神经生长因子(NGF)和睫状神经营养因子(CNTF)促进周围神经电生理功能恢复的效果。方法 用自行研制的梭形双通道桥接管桥接 36 只大鼠坐骨神经 10 mm 缺损,根据梭形管的两支管内注入的药物不同将动物随机分为 A 组(两支管内均注入几丁糖凝胶)、B 组(一侧支管内注入几丁糖 + NGF,另一侧支管内注入几丁糖 + NGF + CNTF)和 C 组(一侧支管内注入几丁糖 + CNTF,另一侧支管内注入几丁糖 + NGF + CNTF)。于术后 8、12 周对再生神经的大体形态、组织病理学进行观察,并对术后 12 周的再生神经行皮质感觉诱发电位(CSEP)、复合肌肉动作电位(CMAP)及神经传导速度(CV)测定。结果 A 组两支管内再生神经纤维组织形态学及电生理功能差异无统计学意义。B 组和 C 组注入 NGF + CNTF 侧再生神经纤维粗细均匀,排列整齐,明显优于对照侧,CSEP、CMAP 的潜伏期短、振幅高、传导速度快,两者差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 NGF 与 CNTF 对周围神经电生理功能的恢复具有协同作用。

【关键词】神经生长因子; 睫状神经营养因子; 周围神经; 电生理学; 协同作用

The synergetic effects of nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor on the recovery of electrophysiological function in peripheral nerve regeneration Li Qiang, WU Ya-min, LI Min, CHEN Heng-sheng, ZENG Lin, YANG Heng-wen. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 3, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

【Abstract】Objective To explore the synergistic effects of nerve growth factor (NGF) and ciliary neurotrophic factor (CNTF) on the recovery of electrophysiological function in peripheral nerve regeneration (PNR) with the new cabin model for PNR. Methods Thirty-six Sprague-Dawley rats had a 10 mm gap in their sciatic nerves, bridged with a new double channel nerve conduit in fusiform shape. They were randomly divided into three groups ($n = 12$): group A (200 μ l of chitin), group B (100 μ l of chitin and 5 μ l of NGF or NGF and CNTF) and group C (100 μ l of chitin and 5 μ l of CNTF or NGF and CNTF). The morphological and pathological changes in any regenerated nerves were observed at 8 and 12 weeks after the operation. Compound muscle action potential (CMAP), cortical somatosensory evoked potential (CSEP) and conductive velocity (CV) were observed as well. Results There was no significant difference of morphology or pathological function between the two sides in group A. The regenerative fibres were well distributed and arrayed more regularly than those in the control, while the latency of CMAP and CSEP was shorter and the amplitude was higher ($P < 0.05$). Conclusion NGF and CNTF might have synergistic effects on the recovery of electrophysiological function in peripheral nerve regeneration.

【Key words】NGF or CNTF; Peripheral nerve regeneration; Electrophysiology; Synergistic effects

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)是目前研究较为深入的两类神经营养因子(neurotrophic factors, NTFs),其对周围神经再生的促进作用不仅存在一定的差异性,而且还可能具有一定的协同作用^[1,2]。为了更科学地观察 NGF 与 CNTF 促进周围神

经再生的协同作用,本研究在创建新型神经再生小室的基础上^[3],利用该新型再生小室探讨 NGF 与 CNTF 对周围神经电生理功能恢复的协同效应。

材料与方法

一、动物手术与实验分组

选取健康成年清洁级 SD 大鼠 36 只,雌雄不拘,体重为 200 ~ 250 g,平均 223 g,由第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所动物中心提供。用 1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg 体重)行腹腔注射麻醉。侧卧位,剃毛、消毒后,取股后斜切口,暴露右侧坐骨神经,10 倍

基金项目:国家重大基础研究发展规划(973)项目(No. G1999054206)

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所三
室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室(李强现在的工作单位:浙江省
湖州 98 医院骨科)

显微镜下游离坐骨神经,并在梨状肌下孔下方 5 mm 处将坐骨神经切除约 8 mm,任其回缩,造成 10 mm 缺损,用消毒的自行研制的梭形双通道桥接管桥接缺损段,用 10-0 无损伤显微缝合线将神经远、近断端与桥接管缝合 2 针固定,缝合方法采用两定点套接法,即分别在神经干周径 180°两相对位置各缝合 1 针,使得再生神经断端套入桥接管内,并距桥接管的分叉处约 1 mm。根据桥接管内注入的药物不同,将动物分为 A、B、C 组,每组 12 只。A 组:桥接管的两支管内分别注入医用几丁糖凝胶 100 μ l (上海其胜生物制剂有限公司);B 组:向两支管内注入医用几丁糖凝胶 100 μ l 后,一侧支管内注入 5 μ l NGF (20 ng/ μ l,美国 Sigma 公司)和 5 μ l 生理盐水,另一侧支管内注入 5 μ l NGF 和 5 μ l CNTF (60 ng/ μ l,美国 Sigma 公司);C 组:向两支管内注入医用几丁糖凝胶 100 μ l 后,一侧支管内注入 5 μ l CNTF 和 5 μ l 生理盐水,另一侧支管内注入 5 μ l NGF 和 5 μ l CNTF (图 1)。将桥接管置于适宜的位置,排除扭转现象,用 0-0 丝线套在两支管外,并缝合固定在邻近的软组织上,防止大鼠麻醉清醒后,活动下肢致桥接管移位和扭转。逐层缝合股后肌肉及皮肤,按常规标准统一分笼饲养。选取术后 8、12 周两个时相点进行观测,两个时相点的动物数分别为 4、8 只大鼠。

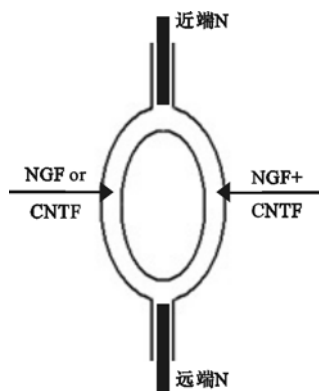


图 1 手术示意图

二、观察指标

(一) 一般观察

术后 8、12 周将各组大鼠再次麻醉,沿原切口切开皮肤,显露桥接管,观察其有无移位、变形、塌陷及裂开,并初步观察两支管内再生神经的粗细、颜色及弹性等。

(二) 电生理功能测定

1. 主要仪器:澳大利亚 ADI 公司生产的 Powerlab/16SP 诱发电位仪,日本 NARISHIGE 生产的 ST-7 大鼠立体定位仪。

2. 检测方法:术后 12 周各组分别取 8 只大鼠,用 1% 的戊巴比妥钠 (30 mg/kg 体重) 行腹腔注射麻醉,

将受检测的大鼠用 ST-7 大鼠立体定位仪固定,手术侧腿部剪毛、消毒后,切开臀大肌,剖开桥接管,显露坐骨神经。切开头颅后部皮肤,剥离骨膜,用牙科钻在与坐骨神经损伤侧的对侧皮质中央后回感觉区处(冠状缝后 3 mm,矢状缝旁开 1 mm)钻一盲孔(注意避免打穿硬脑膜,以防损伤皮质)。保持实验室内安静,温度为 30℃。

复合肌肉动作电位 (compound muscle action potential, CMAP) 的刺激条件和记录方法:刺激电极自制的双极电极,间距约 1 mm,阳极为红色,阴极为黄色;记录电极为 2 根黑色的银针电极,直接插入同侧小腿腓肠肌内,深度约 5 mm。刺激参数:采用单方波刺激,频率为 4 Hz,波宽为 0.2 ms,强度为 0.1 mA,刺激延时 5 ms,叠加 100 次,信号经前置放大器放大 10 万倍,用 ADI 公司配套的 Scope 软件记录和分析。依次刺激和记录两支管内再生神经的近、远端,每点刺激和记录 4 次,读出两刺激点的潜伏期和波幅值,根据两刺激点的潜伏期差值和距离可计算出神经传导速度。

皮质感觉诱发电位 (cortical somatosensory evoked potential, CSEP) 的刺激条件和记录方法:记录完 CMAP 后,拔出 2 根银针电极,将银球电极通过立体定位仪置于大鼠颅顶部的盲孔内作为记录电极,将参考电极置于颞旁皮下组织,并切开大鼠背侧皮肤约 1 cm,将另一参考电极插于刺激和记录点中间的脊柱椎旁肌内。刺激电极为双极银针保护电极,间距为 1 mm,置于桥接管内再生神经的近端实施电刺激,刺激参数为单方波,频率为 4 Hz,波宽为 0.2 ms,强度为 0.1 mA,刺激延时 5 ms,记录信号经计算机平均叠加 100 次,并经前置放大器放大 10 万倍,用 ADI 公司配套的 Scope 软件记录和分析。依次刺激和记录两支管内再生神经,每点刺激和记录 4 次,读出 N1 波的潜伏期和波幅值。

(三) 病理学观察

将术后 8 周的 4 只大鼠和术后 12 周电生理检测完毕后的 8 只大鼠麻醉、固定后,剪开胸腔,左心室主动脉插管,剪开右心耳。快速灌入生理盐水 150 ~ 200 ml,待流出液体清亮后,灌注 40 g/L 多聚甲醛约 200 ml。固定 2 h 后取再生神经,放入 40 g/L 多聚甲醛中继续固定。然后将标本常规脱水、透明、浸蜡、包埋后行石蜡切片,片厚为 10 μ m, Holmes 银染观察再生神经纤维的排列、走行等。

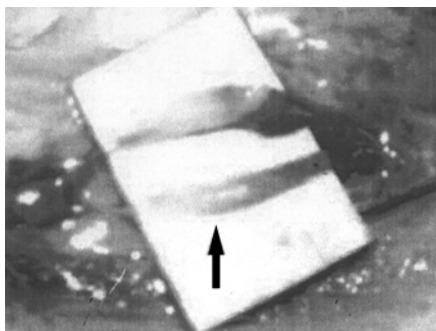
三、统计学分析

所有数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较用 t 检验。

结 果

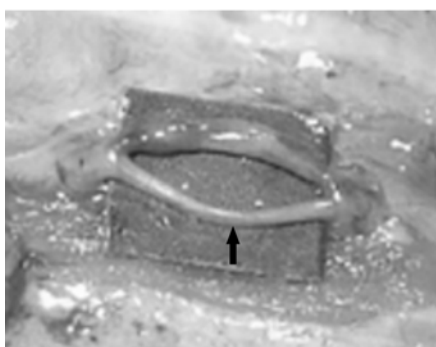
一、一般观察

术后 8、12 周,桥接管均无裂口、变形、变薄、变色、移位及塌陷。A 组桥接管内再生神经远端纤细,弹性差,但两支管内再生神经的粗细、色泽无明显差异。B 组 NGF 侧再生神经纤维呈淡红色,弹性差,质嫩。C 组 CNTF 侧再生神经则呈淡黄色,稍细,而 B、C 两组 NGF + CNTF 侧再生神经粗大,呈淡黄色,质韧,弹性佳(图 2~4)。



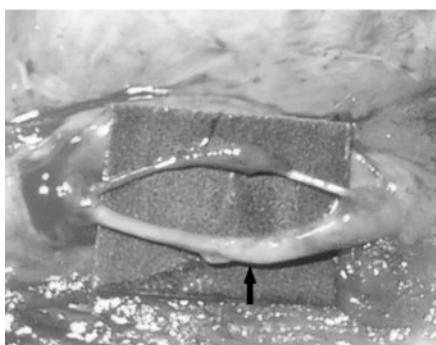
注:两支管内再生神经差异无统计学意义,均为远端纤细,弹性差(箭头所示)

图 2 术后 12 周 A 组再生神经的大体所见



注:NGF 侧呈淡红色,稍细,NGF + CNTF 侧呈淡黄色,较粗(箭头所示)

图 3 术后 12 周 B 组再生神经的大体所见



注:CNTF 侧再生神经较 NGF + CNTF 侧明显纤细(箭头所示)

图 4 术后 12 周 C 组再生神经的大体所见

二、病理学检查

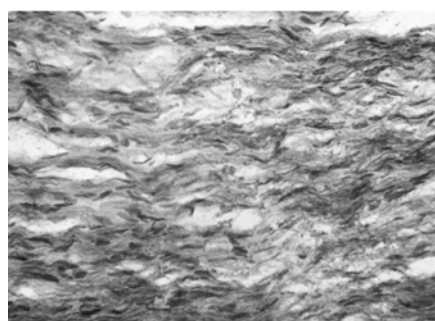
术后 8、12 周 Holmes 银染显示 B 组 NGF 侧和 C 组 CNTF 侧神经纤维排列紊乱,粗细欠均匀;而两组的

NGF + CNTF 侧再生神经纤维排列整齐,粗细均匀,走行一致(图 5~7)。



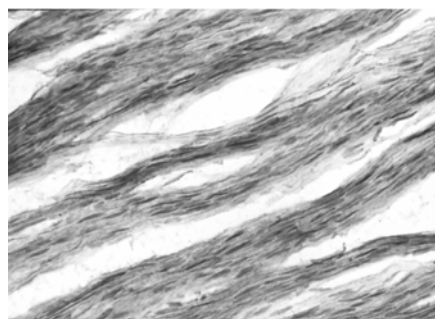
注:可见纤维排列紊乱,粗细不均

图 5 术后 12 周 B 组 NGF 侧再生神经(Holmes 银染, ×400)



注:纤维排列较紊乱

图 6 术后 12 周 C 组 CNTF 侧再生神经(Holmes 银染, ×400)



注:再生纤维排列整齐,粗细均匀一致

图 7 术后 12 周 C 组 NGF + CNTF 侧再生神经(Holmes 银染, ×400)

三、电生理功能检测

术后 12 周, A 组再生神经 CSEP 中的 N1 波和 CMAP 的峰潜时均大于 B、C 组,而波幅小于 B、C 组,传导速度较 B、C 组慢,差异有统计学意义。B 组的 NGF 侧和 C 组的 CNTF 侧再生神经 CSEP 中的 N1 波和 CMAP 的峰潜时均大于 CNTF + NGF 侧,而波幅低,差异有统计学意义($P < 0.05$), B 组 NGF 侧和 C 组 CNTF 侧再生神经的传导速度分别为 (18.70 ± 1.06) m/s、 (22.3 ± 1.86) m/s,均较其对应的 NGF + CNTF 侧慢,其间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。刺激再生神经近侧端的电生理检测结果见表 1。

表 1 各组大鼠术后 12 周 CSEP 中的 N1 波和 CMAP 峰潜时和波幅的变化($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	CSEP		CMAP		传导速度(m/s)
		峰潜时(ms)	波幅(μ V)	峰潜时(ms)	波幅(μ V)	
A 组	12	52.15 $\pm$ 3.65	5.12 $\pm$ 0.86	8.96 $\pm$ 1.11	198.65 $\pm$ 40.30	16.50 $\pm$ 2.64
B 组	12					
NGF 侧		46.32 $\pm$ 4.88 [*]	8.56 $\pm$ 1.25 [#]	7.57 $\pm$ 0.58 [#]	322.50 $\pm$ 76.20 [#]	18.70 $\pm$ 1.06 [*]
CNTF + NGF 侧		31.73 $\pm$ 2.57 ^{#Δ}	17.82 $\pm$ 2.87 ^{#Δ}	5.11 $\pm$ 0.29 ^{#Δ}	509.20 $\pm$ 37.80 ^{#Δ}	26.40 $\pm$ 1.96 ^{*Δ}
C 组	12					
CNTF 侧		46.24 $\pm$ 4.79 [#]	9.37 $\pm$ 1.46 [#]	7.50 $\pm$ 0.49 [#]	338.95 $\pm$ 79.58 [#]	18.81 $\pm$ 1.39 [#]
CNTF + NGF 侧		31.56 $\pm$ 2.79 ^{#$\star$}	17.59 $\pm$ 2.80 ^{#$\star$}	5.18 $\pm$ 0.21 ^{#$\star$}	508.20 $\pm$ 39.20 ^{#$\star$}	25.90 $\pm$ 2.80 ^{#$\star$}

注:与 A 组比较,^{*} $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$;B 组 NGF 侧与 CNTF + NGF 侧比较, ^{Δ} $P < 0.01$;C 组 CNTF 侧与 CNTF + NGF 侧比较, ^{$\star$} $P < 0.01$

讨 论

NGF 和 CNTF 是目前研究较为深入的两类 NTFs,其对周围神经再生的促进作用不仅存在一定的差异,而且还可能具有一定的协同作用。近年来,关于 NGF 与 CNTF 协同作用的离体试验研究已有报道^[4],如 CNTF 与 NGF 对促进 PC12 成活具有明显的协同作用^[5]。Semkova 等^[4]则从分子水平层面证实外源性 CNTF 可提高星形胶质细胞内 p75 mRNA 的表达水平,并能促进 NGF 的合成。因此加强对 NGF 与 CNTF 协同作用的在体研究不仅具有较强的理论意义,而且可为临床联合应用两种 NTFs 促进周围神经再生提供理论依据,具有潜在的临床价值。

既往研究 NTFs 促进周围神经再生的主要方法是利用单通道硅胶管建立再生小室,但由于该方法不能同时比较两种 NTFs 对同一神经再生的作用,其结果常受个体内、外环境的影响而缺乏精确性。为了更科学地研究 NGF 和 CNTF 促进周围神经再生的协同作用,我们利用自行研制的梭形双通道桥接管,创建了新型的再生小室,由于该新型再生小室的两支管以中轴左右对称,这为神经向两支管内再生创造了均等的环境。因此,利用此新型的神经再生小室研究 NGF 与 CNTF 促进周围神经再生的协同作用,较传统的方法更科学、更精确^[3]。

本研究观察到 B、C 组的 NGF + CNTF 侧再生神经粗大,呈淡黄色,质韧,弹性佳。Holmes 银染也显示 NGF + CNTF 侧再生纤维的排列整齐,粗细均匀,排列、走行一致。从组织形态学上初步证实了 NGF 和 CNTF 对促进周围神经的再生具有一定的协同作用。而电生理检测进一步观察到 NGF + CNTF 侧再生纤维的 CMAP 和 CSEP 峰潜时较对照侧短,波幅高,传导速度

快,两组间差异具有统计学意义($P < 0.05$),说明联合应用 NGF 与 CNTF 对周围神经电生功能的恢复同样具有较为明显的协同作用,这为实验研究和临床应用两种 NTFs 促进周围神经再生提供了更为科学和精确的理论依据。然而 NGF 与 CNTF 间协同作用的机制尚不十分明确,有研究认为,除单一因子的作用外,可能是两种因子通过非共价键形成异二聚体的缘故^[2]。此外,与其作用的差异性密切相关。因为有研究发现,CNTF 对运动和无髓纤维再生的促进作用较显著,NGF 对有髓和感觉纤维的作用较明显^[6]。而混合神经从功能上主要由感觉与运动纤维组成,在解剖上主要由有髓与无髓纤维组成。NGF 和 CNTF 影响不同类型神经纤维再生的差异性可能是其协同作用的理论基础之一,但尚需进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 李强,李民,伍亚民.雪旺氏细胞促进周围神经再生的分子机制.中华物理医学与康复杂志,2004,26:561-563.
- 2 李强,李民,伍亚民. NGF 与 CNTF 促周围神经再生作用的差异性及协同性研究进展.中国矫形外科杂志,2004,12:537-539.
- 3 李强,伍亚民,李民,等.新型神经再生小室的建立及其实验评估.中华实验外科杂志,2005,22:86-89.
- 4 Semkova I, Krieglstein J. Ciliary neurotrophic factor enhances the expression of NGF and p75 low-affinity NGF receptor in astrocytes. Brain Res, 1999,838:184-192.
- 5 Suzuki Y, Kitaura M, Wu S, et al. Electrophysiological and horseradish peroxidase-tracing studies of nerve regeneration through alginate-filled gap in adult rat spinal cord. Neurosci Lett, 2002,318:121-124.
- 6 李强,刘媛,李民,等. NGF 与 CNTF 促进不同类型神经纤维再生的比较研究.中华神经外科杂志,2004,20:446.

(修回日期:2005-12-30)

(本文编辑:松 明)