

· 基础研究 ·

微热量超短波对大鼠坐骨神经损伤的作用及其机制研究

王晓娜 张长杰 顾莹 刘敏

【摘要】目的 探讨微热量超短波对大鼠坐骨神经损伤的疗效及其可能的作用机制。**方法** 将 54 只 SD 大鼠随机分成正常组、治疗组和对照组,每组 18 只,再根据取材时间的不同分为手术 1、2、3 周后 3 个亚组,每个亚组 6 只大鼠。治疗组和对照组采用大鼠坐骨神经钳夹损伤坐骨神经制作坐骨神经损伤模型。造模成功后,治疗组予以微热量超短波治疗。3 组大鼠均于手术 1、2、3 周后处死并取其坐骨神经,然后行苏木精-伊红(HE)、甲苯胺蓝染色,同时采用免疫组织化学法检测 3 组大鼠碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的表达。**结果** 入组 1 周后,治疗组与对照组组织学改变均表现为神经轴突变性;手术 2、3 周后,2 组大鼠坐骨神经均出现轴突再生。手术 2、3 周后,治疗组有髓神经轴突数量分别为 (238.4 ± 23.1) 个/高倍镜视野和 (556.7 ± 52.4) 个/高倍镜视野,显著多于对照组 ($P < 0.05$);且手术 1、2、3 周后,治疗组坐骨神经 bFGF 的表达亦显著高于对照组相同时间点 ($P < 0.05$)。**结论** 微热量超短波可促进坐骨神经损伤后远侧神经段的神经再生,其机制可能与其促进坐骨神经损伤后 bFGF 的表达有关。

【关键词】 大鼠; 碱性成纤维细胞生长因子; 坐骨神经; 超短波,微热量

Ultrashortwave irradiation for the repair of sciatic nerve injury and its mechanism Wang Xiaona*, Zhang Changjie, Gu Ying, Liu Min. * Department of Rehabilitation Medicine, Shandong Jiaotong Hospital, Jinan 250031, China

Corresponding author: Gu Ying, Email: xmeiforever@163.com

【Abstract】Objective To observe the effect of low doses of ultrashortwave therapy (USW) on sciatic nerve injury and to deduce its possible mechanism. **Methods** Fifty-four Sprague-Dawley rats were randomly divided into a USW group, a control group and a normal group with 18 rats in each. Each group was then sub-divided into 1 week, 2 week and 3 week subgroups with 6 rats in each. A model of peripheral nerve injury was established by forceps clipping of the sciatic nerve in the USW and control groups. The USW group was then treated with USW exposure. Rats from the appropriate subgroups were sacrificed after 1, 2 and 3 weeks of treatment. Sciatic nerve samples were stained using hematoxylin-eosin and toluidin blue. Expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) was detected by immunohistochemical methods. **Results** Degeneration of axons was observed in both the therapy and control groups after 1 week, and regeneration at the end of the 2nd and 3rd weeks. The number of axons with myelin sheaths was significantly higher in the therapy group than in the control group at the end of the 2nd and 3rd weeks. The expression of bFGF was significantly higher in the USW group compared with the control group at all observation time points. **Conclusion** USW can obviously accelerate the regeneration of the sciatic nerve, probably through increased expression of bFGF.

【Key words】 Rats; Basic fibroblast growth factor; Sciatic nerve; Ultrashortwave therapy

周围神经损伤是临床常见病、多发病。目前,针对周围神经损伤的治疗方法主要采取手术修复和药物治疗,但总体疗效并不理想。即使损伤神经已由手术修复,也仍需要辅以其它方法来促进神经再生,以更好地恢复其功能^[1]。近年来,物理治疗在周围神经损伤康复中的作用日益受到重视。据报道,超短波可促进大

鼠坐骨神经损伤后的功能恢复^[2],但其具体机制仍不明确,分析可能与其可以改善受损神经的血液供应,促进某些促神经生长因子的表达有关。最近的研究发现,外源性碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)可以提高周围神经损伤后再生轴突的密度、直径及髓鞘形成的质量,可对神经再生起重要的促进作用^[3]。本研究采用前瞻性随机对照的方法,观察微热量超短波治疗对大鼠坐骨神经损伤后不同时间点的组织学和 bFGF 表达的影响,旨在进一步探讨超短波治疗对周围神经损伤修复的有效性及其作用机制,为其临床应用提供理论依据。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2014.09.002

作者单位:250031 济南,山东省交通医院康复科(王晓娜、顾莹、刘敏);中南大学湘雅二医院康复科(张长杰)

通信作者:顾莹,Email:xmeiforever@163.com

材料与方法

一、实验动物及模型制备

成年、雄性、健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 54 只, 平均体重 150 ~ 200 g, 由中南大学湘雅二医院动物实验中心提供。将 54 只大鼠按随机数字表法分成正常组、治疗组和对照组, 每组大鼠 18 只, 再根据取材时间的不同分为手术 1、2、3 周后 3 个亚组(正常组取材时间点同治疗组和对照组), 每个亚组 6 只大鼠。

正常组大鼠常规饲养, 自由活动, 不给予造模和其他干预。治疗组和对照组大鼠入组前 1 d 下午以 9% 硫化钠行右后肢脱毛并采用 10% (3 ml/kg 体重) 水合氯醛腹腔麻醉后, 俯卧位用绷带固定四肢, 常规消毒、铺巾; 于右侧股后部纵行切口, 切开皮肤, 分离肌肉, 由股后外侧肌间隙显露坐骨神经, 在坐骨神经距梨状肌出口 5 mm 处先用 9-0 显微缝线标记, 然后用钟表镊钳夹坐骨神经 15 s 后, 缝合肌肉和皮肤。术后给予青霉素钠肌肉注射预防感染, 4 万 U/只, 每日 1 次, 连续注射 6 d。造模成功标准: 术后 6 h 测坐骨神经功能指数 (sciatic nerve function index, SFI) 为 -95 ~ -100 分, 伤口无感染^[4-7]。所有大鼠均置于相同环境分笼饲养。

二、实验仪器和试剂

器械和软件: 造模用钟表镊 (长沙医疗器械公司), 超短波治疗仪 UWM-02 型丸高超短波治疗器 (日本), 徕卡 Leica DMS1000 型光学显微镜 (德国), 图像分析软件 Image Pro Plus 6.0 版 (美国), 麦克奥迪病理图文分析系统 (中国)。试剂: bFGF 多克隆兔抗 (武汉博士德试剂公司, 工作浓度 1:50), 链霉素抗生物素一过氧化物酶免疫组化染色超敏试剂盒 (福州迈新生物技术开发公司), DAB 酶底物显色试剂盒 (福州迈新生物技术开发公司), 1% 甲苯胺蓝溶液 (中南大学湘雅二医院电镜室提供)。

三、治疗方法

日本产 UWM-02 型丸高超短波治疗器为一种便携式超短波治疗器, 最大输出功率为 50 W, 超短波频率为 27.12 MHz, 输出程度采用微热量, 2 个输出极板间距为 20 cm。治疗组大鼠于术后当天即进行微热量超短波治疗, 将大鼠置于两电极对置的电场中, 极板间距为 20 cm, 大鼠全身均暴露于电场中。每日治疗 1 次, 每次 10 min, 直至取材前 1 d。对照组大鼠仅给予未启动治疗系统的假治疗。

四、观察指标

1. 标本制备及形态学观察: 于手术 1、2、3 周后处死对应时间点的亚组, 然后采用 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液心脏灌注, 于神经损伤点远侧 1 cm 处各取 5 mm 长的 2 段神经组织, 分别放入 4% 多聚甲醛及 2.5% 的

戊二醛溶液中固定^[8]。放入 4% 多聚甲醛中的标本用于制备石蜡切片, 作苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色光镜观察及免疫组化染色定量分析; 放入 2.5% 的戊二醛溶液中的标本用于制备环氧树脂胶囊, 行 5 μ m 半薄切片, 甲苯胺蓝染色后镜下观察。在病理组织观察时, 每个取材部位切片 5 ~ 10 张, 包埋时保持组织包埋深浅的一致性, 每张切片选取 5 个观察视野, 取观察结果的平均值。

2. 甲苯胺蓝染色: 切片经 2.5% 的戊二醛溶液固定、1% 锇酸缓冲液后固定、丙酮脱水、丙酮: 包埋剂 (1:1, 环氧树脂 812) 浸透、纯包埋剂 (环氧树脂 812) 浸透、烘烤、修块、切片、1% 甲苯胺蓝溶液染色等步骤, 在光学显微镜下进行观察, 用 Image J 5.0 版软件进行图像分析, 定量分析各组有髓神经轴突的数量。

3. 免疫组织化学染色: 切片经脱蜡、水化、抗原修复后采用链霉菌抗生物素蛋白一过氧化物酶 (streptavidin-peroxidase, SP) 法进行免疫组织化学检测。阳性染色为棕褐色, 采用计算机图文分析系统对免疫组化结果进行分析, 于 400 倍高倍镜视野下选取 5 个视野, 采用 Image Plus 图像分析仪检测 bFGF 阳性平均积分光密度值, 其数值越大, 说明蛋白表达越强。

五、统计学分析

采用 SPSS 13.0 版统计学软件进行统计学分析, 所得数据均采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析, 组内两两比较采用 SNK-q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、大鼠坐骨神经纤维组织学观察

手术 1 周后, 治疗组轴突肿胀如泡沫状、崩解、脱髓鞘, 可见较多炎性细胞浸润, 组织结构疏松, 神经纤维排列紊乱; 对照组神经纤维的排列及神经轴突脱髓鞘的改变程度与治疗组类似。手术 2 周后, 治疗组神经髓鞘大部分崩解, 炎性细胞数量减少, 神经纤维的排列较前规则, 且在手术 3 周后, 其神经轴突再生明显, 神经纤维的排列规则; 而对照组轴突再生情况 (神经纤维的密度及神经纤维的排列规则程度) 与治疗组相同时间点比较均差。正常组各时间点其坐骨神经纤维排列均规则。详见图 1。

二、大鼠坐骨神经甲苯胺蓝染色观察

手术 1 周后, 治疗组以轴突变性为主, 可见极少量未完全变性的有髓神经轴突; 手术 2 周后, 其变性程度逐渐减轻、再生程度增加, 与对照组同时时间点比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 手术 3 周, 治疗组有髓神经轴突数量达到峰值, 与对照组同时时间点比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见图 2 和表 1。

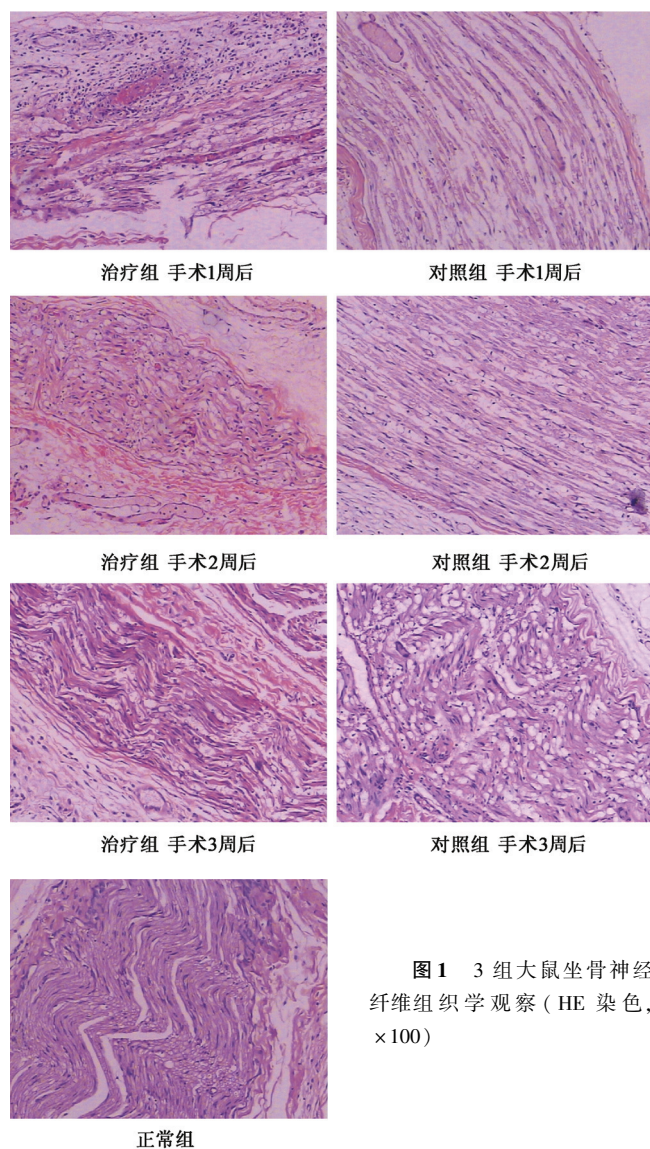


图 1 3 组大鼠坐骨神经纤维组织学观察 (HE 染色, $\times 100$)

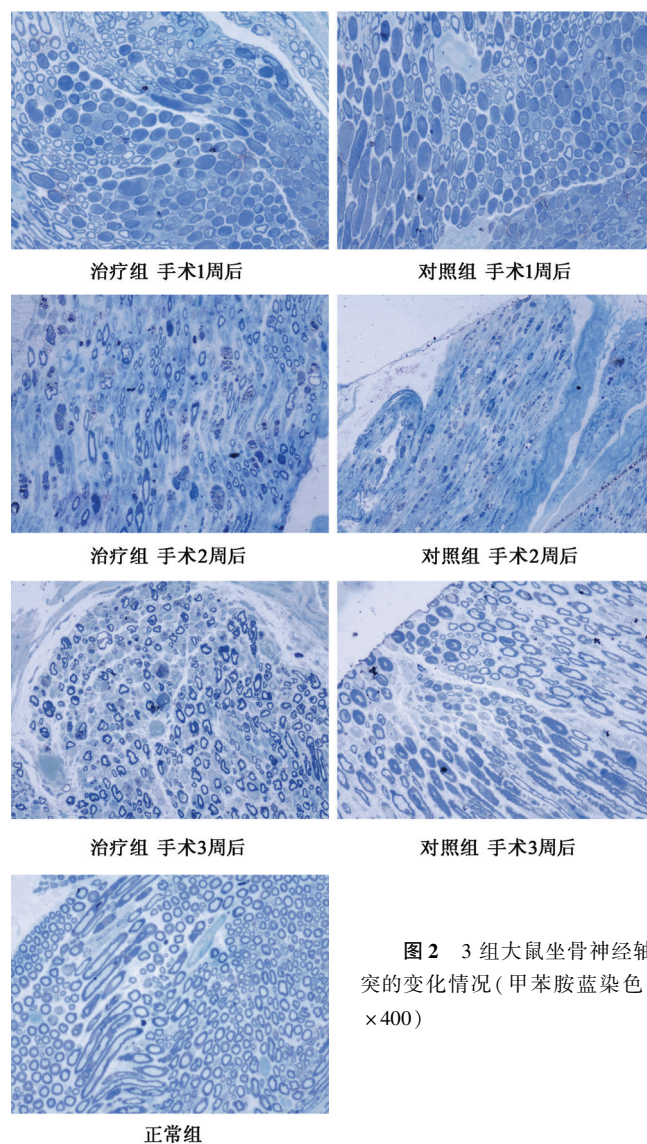


图 2 3 组大鼠坐骨神经轴突的变化情况 (甲苯胺蓝染色, $\times 400$)

表 1 3 组大鼠不同时间点损伤神经远端有髓神经轴突数量和 bFGF 表达平均积分光密度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	有髓神经轴突数量 (个/高倍镜视野)	bFGF 表达 平均积分光密度
对照组			
手术 1 周后	6	30.5 ± 5.4^a	414 ± 39.4^{ab}
手术 2 周后	6	135.3 ± 11.3^{ab}	1040 ± 52.1^{ab}
手术 3 周后	6	365.8 ± 32.9^{ab}	711 ± 69.3^{ab}
治疗组			
手术 1 周后	6	35.33 ± 6.1^a	712 ± 41.8^a
手术 2 周后	6	238.4 ± 23.1^a	1580 ± 52.0^a
手术 3 周后	6	556.7 ± 52.4^a	1040 ± 61.0^a
正常组			
手术 1 周后	6	976.6 ± 61.9	213 ± 21.1
手术 2 周后	6	961.4 ± 72.8	220 ± 21.3
手术 3 周后	6	972.5 ± 65.9	211 ± 21.4

注:与正常组同时时间点比较, $^a P < 0.05$; 与治疗组同时时间点比较, $^b P < 0.05$

三、大鼠坐骨神经纤维组织 bFGF 免疫组化染色

手术 2 周后,治疗组与对照组 bFGF 的表达达到峰值,并于手术 3 周后开始下降,且手术 1、2、3 周后,治疗组 bFGF 的表达与对照组同时时间点比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。正常组大鼠坐骨神经中神经纤维的轴浆及施万细胞的胞质 bFGF 抗原染色呈弱阳性反应。详见图 3 和表 1。

讨 论

关于超短波对受损周围神经的作用,国内外已有大量相关的研究。李巍巍等^[9]采用大鼠坐骨神经钳夹模型,术后对其坐骨神经钳夹伤处进行超短波治疗,发现超短波可促进大鼠周围神经损伤后神经传导速度的恢复,改善其组织缺血缺氧。还有研究表明,超短波治疗损伤神经,早期可显著增加神经生长相关蛋白 (growth-associated protein, GAP-43) 和降钙素基因相关

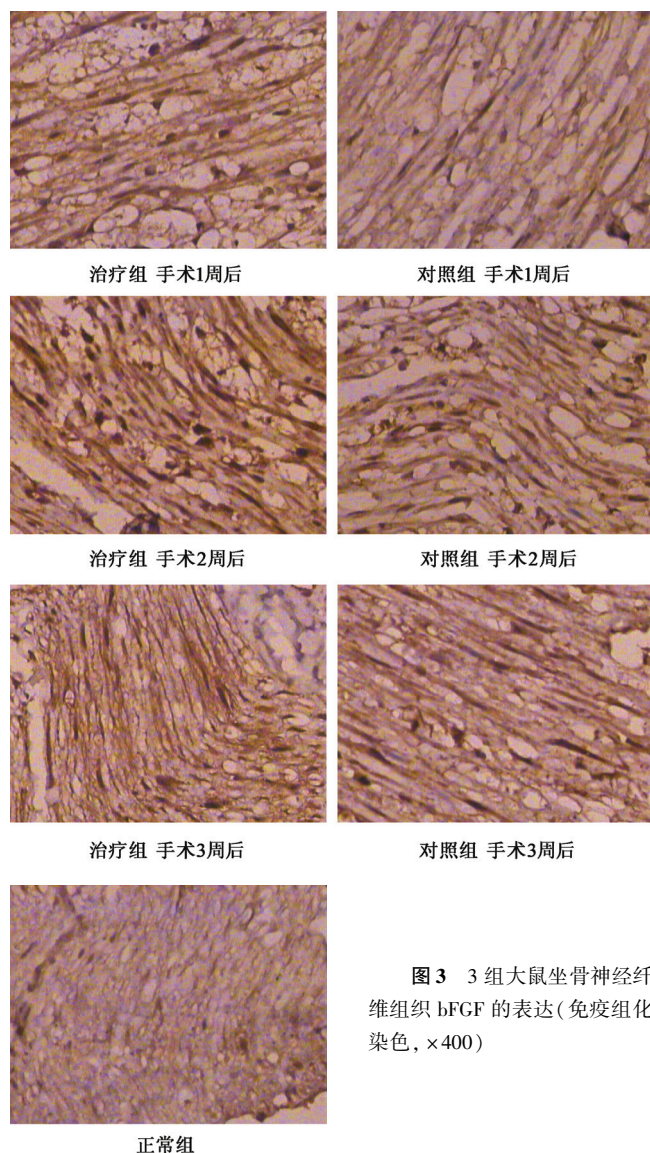


图3 3组大鼠坐骨神经纤维组织 bFGF 的表达(免疫组化染色, $\times 400$)

肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)的表达量,提示早期应用超短波治疗可促进周围神经的再生^[10]。Zhang 等^[11]在研究中将大鼠的坐骨神经切断,然后用异体神经进行移植修补,于手术 24 h 后采用小剂量的超短波治疗,结果发现,超短波可显著增加有髓神经的数量和轴突直径。

为进一步证实微超短波治疗对周围神经损伤修复的促进作用,本研究制作了大鼠坐骨神经钳夹损伤模型。实验性大鼠坐骨神经损伤的方法有多种,如撞击、挤压、结扎、切割、冷冻等,本研究采用钳夹法造成神经的不完全性损伤,损伤的特点是轴索断裂,髓鞘脱失,而神经内膜相对完整,即 Seddon 分类法的第二类损伤^[12](Seddon II 度损伤后神经变性较轻,这种损伤神经的功能恢复较快,被认为是稳定、可靠、可重复的方法)。课题组于术后当天即对治疗组大鼠进行小剂量超短波治疗,并于手术 1、2、3 周后对大鼠损伤侧的坐

骨神经进行病理组织学观察,结果发现治疗组大鼠手术 2、3 周后的坐骨神经再生程度均显著优于对照组($P < 0.05$),再次证实超短波可促进周围神经损伤后神经再生,加快损伤后神经修复的速度。

超短波治疗周围神经损伤的机制目前尚无定论。随着研究的深入,bFGF 在神经损伤修复中的作用日益受到重视。bFGF 是成纤维细胞生长因子家族的成员之一,具有丝分裂源活性的阳离子多肽,可起到保护神经元和促进神经再生的作用^[3]。其作用包括保护神经元、促进轴突再生、促进施万细胞增殖、促进血管发生和改善血供微循环等。国内外许多研究证实^[3,13-14],外源性应用 bFGF 可以提高周围神经损伤后再生轴突的密度、直径及髓鞘形成的质量。Grothe 等^[15]的研究发现,正常的周围神经可表达少量的 bFGF,而坐骨神经损伤 5 h 后,损伤近端和远端的 bFGF 及其 mRNA 开始增高,并维持 4 周,且远端的表达显著高于近端。该研究结果提示,bFGF 可刺激施万细胞和成纤维细胞的增殖,还可显著促进神经再生。本研究中,治疗组坐骨神经损伤后 bFGF 表达相对对照组持续增高,于治疗 2 周后达到峰值($P < 0.01$),表明超短波治疗可促进损伤坐骨神经 bFGF 的表达。手术 2、3 周后,治疗组的有髓神经轴突数量与对照组同时点比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示超短波治疗可促进坐骨神经钳夹伤后远侧段神经再生,而这种作用可能是通过上调 bFGF 的水平来实现的。

本研究仅观察了 3 周,随着时间的推移及周围神经损伤的恢复,超短波治疗是否与损伤的周围神经 bFGF 的变化有对应关系,以及超短波治疗对周围神经损伤修复的后续作用如何,仍需进一步深入的研究。另外,本研究中,治疗组和对照组大鼠手术 2 周后损伤的运动神经元中 bFGF 表达呈高峰,但于手术 3 周后开始下降,是否提示应及时补充 bFGF,以继续促进损伤周围神经的再生,还有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Marqueste T, Alliez JR, Alluin O, et al. Neuromuscular rehabilitation by treadmill running or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair[J]. J Appl Physiol, 2004, 96(5): 1988-1995.
- [2] 张蕾. 足迹分析法评定超短波促进大鼠坐骨神经损伤后功能恢复的研究[J]. 交通医学, 2007, 21(5): 485-486.
- [3] 王晓亮, 杨朝阳, 李晓光, 等. 应用人工神经修复大鼠坐骨神经损伤的实验研究[J]. 中国康复理论与实践, 2012, 18(6): 535-538.
- [4] 吕兰, 张长杰, 黄德清. 脉冲电磁场对大鼠坐骨神经损伤后转化生长因子 $\beta 1$ 表达的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2012, 34(7): 481-484.
- [5] 沈宁江, 朱家恺. 坐骨神经功能指数在神经功能评价中的应用[J]. 中华显微外科杂志, 1993, 16(2): 284-287.

- [6] Brain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1989, 83(1):129-138.
- [7] Bozkurt A, Deumens R, Scheffel J, et al. CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury[J]. *J Neurosci Methods*, 2008, 173(1):91-98.
- [8] Joanna M, Jane B, Laurie C, et al. Enhanced rate of nerve regeneration and directional errors after sciatic nerve injury in receptor protein tyrosine phosphatase knock-out mice [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(13):5481-5491.
- [9] 李巍巍,苑秀华,张立新,等.超短波对大鼠坐骨神经损伤后神经传导速度及其损伤运动神经元内 VEGF 表达的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2010, 16(8):744-747.
- [10] 芮永军,张蕾,王骏,等.超短波对大鼠坐骨神经损伤后脊髓内 GAP-43 和 CGRP 表达的影响[J]. *中华手外科杂志*, 2006, 22(6):370-372.
- [11] Zhang LX, Tong XJ, Sun XH, et al. Experimental study of low dose ultrashortwave promoting nerve regeneration after acellular nerve allografts repairing the sciatic nerve gap of rats[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2008, 28(4):501-509.
- [12] Lal D, Hetzler LT, Sharma N, et al. Electrical stimulation facilitates rat facial nerve recovery from a crush injury [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2008, 139(1):68-73.
- [13] Grothe C, Haastert K, Jungnickel J. Physiological function and putative therapeutic impact of the FGF-2 system in peripheral nerve regeneration- Lessons from in vivo studies in mice and rats [J]. *Brain Res Rev*, 2006, 51(2):293-299.
- [14] Novikova LN, Mosahebi A, Wiberg M. Aiginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 77(2):242-252.
- [15] Grothe C, Nikkhah G. The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration[J]. *Anat Embryol*, 2001, 204(3):171-177.

(修回日期:2014-06-17)

(本文编辑:阮仕衡)

· 外刊摘英 ·

Greater occipital nerve blocks for chronic cluster headache

BACKGROUND AND OBJECTIVE Cluster headache is a rare, but highly disabling, primary headache disorder. Treatment of episodic cluster headaches with a blockade of the greater occipital nerve (GONB) has been found to be effective. However, data is lacking concerning the efficacy of this treatment for chronic cluster headaches.

METHODS Consecutive patients presenting with a chronic cluster headache and treated with a GONB were identified. All subjects had previously reported an unsatisfactory benefit from preventative treatments. All patients underwent injections with methylprednisolone and lidocaine. At least four weeks before and after each injection, the participants recorded the frequency, duration and severity of their attacks.

RESULTS Eighty-three patients with chronic cluster headache underwent GONB. After the first injection, 57% reported a positive response, with 42% becoming pain-free. The median time to a positive effect was one day. The median duration of a favorable response was 21 days. Of those who became pain-free, 31% were pain free at day 15, 15% at day 30 and 2% at day 90. Thirty-seven patients responding to the first injection received a second injection. Of those, 84% had a further positive response, with 46% becoming pain-free. The median duration of the effect of the second injection was 21 days.

CONCLUSION This prospective study of patients with chronic cluster headache found that greater occipital nerve blocks may be useful in the management of this disorder.

【摘自:Lambru J. Greater occipital nerve loss and chronic cluster headache; a prospective, open label study. *Euro J Neurol*, 2014, 21(2):338-343.】

Sleep quality and low back pain

BACKGROUND AND OBJECTIVE Sleep problems have been reported in 50 to 60% of patients with chronic or acute low back pain (LBP). This study was designed to determine whether poor sleep quality is associated with subsequent increases in pain intensity in patients with acute LBP.

METHODS Data were obtained from a randomized, placebo-controlled trial evaluating the use of paracetamol for the treatment of acute LBP. The patients were randomly assigned to receive either paracetamol or a placebo until recovery from back pain. The sleep quality item (item 6) of the Pittsburgh Sleep Quality Index was used to evaluate sleep quality over the prior seven days. Participants were asked to rate average pain over the last 24 hours on a zero to 10-point numerical rating scale (NRS). The relationship between pain intensity and sleep quality was evaluated using repeated measurements of pain intensity and sleep quality over 12 weeks.

RESULTS Data of 1,046 individuals with acute low back pain were included in the analysis. At baseline, 633 participants reported their sleep quality to be very bad or fairly bad. The analysis found a significant association between sleep quality and subsequent pain intensity ($P < 0.001$). The strength of the association between sleep quality and subsequent LBP remained after adjusting for important LBP prognostic factors.

CONCLUSION This study demonstrates a strong relationship between sleep quality and subsequent pain intensity in patients with acute low back pain.

【摘自:Alsaadi SM, McAuley JH, Hush JM, et al. Poor sleep quality is strongly associated with subsequent pain intensity in patients with acute low back pain. *Arthritis Rheum*, 2014, 66(5):1388-1394.】