

## 神经再生素促进大鼠坐骨神经损伤后再生

周鸣鸣<sup>1,2</sup>, 张俊芳<sup>1</sup>, 丁 斐<sup>1\*</sup> (1. 南通大学江苏省神经再生重点实验室, 南通 226001; 2. 南通大学生命科学学院)

**[摘要]** **目的:**探讨神经再生素(NRF)对大鼠坐骨神经损伤后再生的影响。**方法:**SD大鼠30只,雌雄各半,随机分为3组:NRF低、高剂量组和空白对照组。分别于坐骨神经夹伤术后10、15、20 d测定大鼠坐骨神经功能指数(SFI),分离出大鼠双侧坐骨神经行电生理学检测,计算神经干动作电位恢复率;各组随机选取2只大鼠,应用透射电镜观察再生坐骨神经超微结构;其余大鼠行光镜下观察脊髓腰膨大(L<sub>4</sub>~L<sub>6</sub>)、夹伤远端处坐骨神经、损伤侧腓肠肌组织,并测定脊髓前角运动神经元数、再生有髓神经纤维数、腓肠肌肌细胞截面积等指标。**结果:**术后10 d各组SFI无显著差异,术后15 d仅仅高剂量组SFI明显优于对照组( $P<0.01$ ),术后20 d高、低剂量组SFI均优于对照组( $P<0.01, P<0.05$ );术后20 d高、低剂量组及对照组大鼠坐骨神经干动作电位的恢复率分别为(57±26)%、(44±15)%、(31±9)%,其中高剂量组与对照组相比有显著差异( $P<0.05$ );高剂量NRF组的有髓神经纤维成熟度优于对照组,而变性纤维少于对照组;光镜下NRF高剂量组再生神经纤维排列致密整齐、结构均匀,腓肠肌肌细胞饱满、排列整齐,双侧脊髓前角运动神经元更接近;NRF高剂量组脊髓前角运动神经元计数、有髓神经纤维计数均显著高于对照组( $P<0.05, P<0.01$ ),NRF高、低剂量组腓肠肌肌细胞截面积显著高于对照组( $P<0.01, P<0.05$ )。**结论:**NRF能促进坐骨神经再生及其功能恢复。

**[关键词]** 神经再生素;坐骨神经;创伤和损伤;神经再生

**[中图分类号]** R 651.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)09-0937-04

### Nerve regeneration factor promotes nerve regeneration after sciatic nerve injury in rats

ZHOU Ming-ming<sup>1,2</sup>, ZHANG Jun-fang<sup>1</sup>, DING Fei<sup>1\*</sup> (1. The Key Laboratory of Neuroregeneration of Jiangsu Province, Nantong University, Nantong 226001, China; 2. School of Life Science, Nantong University)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the promoting effect of nerve regeneration factor (NRF) on nerve regeneration after sciatic nerve injury in rats. **Methods:** Thirty Sprague-Dawley rats, including 15 females and 15 males, were equally randomized into 3 groups: low dose NRF group, high dose NRF group and control group. Rats' sciatic nerves were injured by crushing and sciatic function index (SFI) was determined by walking tract analysis at days 10, 15 and 20 after crushing. Then sciatic nerves on both sides were dissociated for electrophysiology study and the recovery rate of nerve conduction velocity (NCV) was calculated. Then, 2 rats were randomly selected from each group and the ultrastructure of regenerated sciatic nerves was observed by electron microscope. Meanwhile, the spinal cord segments (L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub>), the distal site of injured sciatic nerve and the injured gastrocnemius muscle in other rats were observed by light microscope. The count of motor neurons of anterior horn, the number of myelinated fibers, the transverse section area of gastrocnemius muscle cells and other parameters were determined. **Results:** At day 10 after crushing, SFI scores had no significant difference between 3 groups; at day 15 after crushing, SFI score of high dose NRF group was significantly higher than that of the control group ( $P<0.01$ ); at day 20 after crushing, SFI scores of 2 NRF groups were significantly higher than those of the control group ( $P<0.01, P<0.05$ ). At day 20 after crushing, the recovery rates of NCV in the high dose group, the low dose group and the control group were (57±26)%, (44±15)% and (31±9)%, respectively, with significant difference between the high dose group and the control group ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, the high dose group had more mature myelinated nerve fibers and less degenerated nerve fibers. In the high dose group, the layout of regenerated nerve fibers was dense and well-arranged, the gastrocnemius muscle cells was well alive and neatly arranged, and the bilateral motor neurons of anterior horn was more close to each other. The numbers of motor neurons of anterior horn and myelinated nerve fibers in high dose group were significantly higher than those in control group ( $P<0.05, P<0.01$ ); the transverse section areas of gastrocnemius muscle cells in both NRF groups were significantly higher than those in the control group ( $P<0.01, P<0.05$ ). **Conclusion:** NRF can promote the regeneration of peripheral nerves and improve the recovery of their function.

**[KEY WORDS]** nerve regeneration factor; sciatic nerve; wounds and injuries; nerve regeneration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(9):937-940]

在中药治疗神经损伤、神经退行性疾病方面,研究者们已积累了许多经验和临床资料。探索中药有效成分治疗神经损伤,促进受损神经功能恢复,是当今中医学和神经科学领域研究的热点之一。神经再生素(nerve regeneration factor, NRF)是从中药

**[基金项目]** 国家“973”计划项目子课题(2003CB515306)。Partly Supported by National Program on Key Basic Research Projects(973 Program)(2003CB515306)。

**[作者简介]** 周鸣鸣, 博士生, 讲师。现在复旦大学上海医学院, 上海 200032。

\* Corresponding author. E-mail: dingfei@ntu.edu.cn

中提取的一种有效组分(中国专利申请号:01108209.7),属甾酮类。以往的研究<sup>[1~3]</sup>表明,NRF可有效地促进离体培养的大鼠背根神经节细胞生长,具有明显的促进神经生长、防止神经细胞凋亡的作用。本研究采用大鼠坐骨神经损伤模型,探讨NRF对外周神经损伤再生的促进作用<sup>[4,5]</sup>。

## 1 材料和方法

1.1 动物和试剂 健康成年SD大鼠30只(由南通大学实验动物中心提供),体质量(220±20)g,雌雄各半,随机分成3组:NRF高、低剂量组及对照组。NRF由南通大学神经科学研究所提供,批号:2002-12-28,注射用水溶解至适当浓度备用。

1.2 模型制备 复合麻醉剂(2 ml/kg)腹腔麻醉大鼠,右臀部作1.5 cm切口,在距梨状肌下缘0.5 cm处以特制钳子,钳夹坐骨神经3次,每次10 s,间隔10 s,挤压损伤的宽度为3 mm。损伤远端以9-0尼龙线作标记,缝合切口<sup>[6]</sup>。术后每日腹腔注射给药,NRF低、高剂量组分别按2、10 mg/kg给药,对照组给予等体积的注射用水。

1.3 坐骨神经功能指数(SFI)的测定 分别于术后10、15、20 d行大鼠足迹实验,即大鼠双侧后足蘸红色印油行走后每侧足留下四、五个足印,测量足印长度(print length, PL)、足趾宽度(toe spread, TS)、中间足趾距离(intermediary toe spread, IT),将上述3个变量代入Bain公式计算出SFI<sup>[7]</sup>: $SFI = -38.3(E_{PL} - N_{PL})/N_{PL} + 109.5(E_{TS} - N_{TS})/N_{TS} + 13.3(E_{IT} - N_{IT})/N_{IT} - 8.8$ ,公式中各变量前加E代表实验侧,加N代表正常侧,SFI以0为正常值,-100为神经完全断离的指标<sup>[8]</sup>。

1.4 电生理学检测 利用SUPER LAB D-95系统作电生理学检测。术后20 d在麻醉下分离出双侧大鼠坐骨神经,将刺激电极和记录电极分别钩在神经夹伤处近侧端和远侧端,刺激近侧端,诱发复合动作电位,测量两刺激电极间的距离得出神经干动作电位传导速度(NCV)。以上数值均计算其恢复率(实验侧数值/健侧数值×100%)。

1.5 组织学检查 大鼠经电生理学检测后,NRF低剂量组、NRF高剂量组和空白对照组每组随机取2只切取夹伤远端神经约3 mm,置25 g/L戊二醛固定作透射电镜检查。其余大鼠用40 g/L多聚甲

醛常规灌注,取脊髓腰膨大(L<sub>4</sub>~L<sub>6</sub>)、夹伤远端处坐骨神经、双侧腓肠肌,石蜡包埋、切片。脊髓和肌肉作H-E染色,坐骨神经作三色染色。利用Leica Q 550 IW图像分析系统进行脊髓前角运动神经元计数、再生有髓纤维计数和肌细胞截面积测定。

1.6 统计学处理 采用STATA7.0统计分析软件对实验结果进行单因素方差分析。

## 2 结果

2.1 SFI测定 NRF低、高剂量组及对照组术后10 d测定值分别为-76.71±12.28, -75.49±9.59, -77.11±13.63;术后15 d分别为-57.22±18.93, -34.49±10.40, -56.54±10.22;术后20 d分别为-39.34±4.87, -30.99±8.03, -54.77±12.07。术后10 d实验组与对照组SFI无显著差别;术后15 d高剂量组大鼠SFI明显优于对照组( $P < 0.01$ );术后20 d与对照组相比,高、低剂量组SFI大鼠有显著改善( $P < 0.01, P < 0.05$ )。

2.2 电生理检测 术后20 d大鼠电生理学测定结果表明:高剂量组大鼠坐骨神经干动作电位的恢复率[(57±26)%]明显优于对照组[(31±9)%, $P < 0.05$ ],而低剂量组[(44±15)%]与对照组差异不大。

2.3 组织学检查 术后20 d,损伤侧坐骨神经及腓肠肌光镜检查结果显示:对照组大鼠再生神经中可见增生的神经膜细胞,神经纤维排列稀疏而紊乱(图1A);腓肠肌细胞欠饱满、排列欠整齐(图1B);而高剂量NRF组再生神经纤维排列致密而整齐,结构均匀(图1C);腓肠肌细胞饱满、排列整齐(图1D)。H-E染色结果显示高剂量NRF组双侧脊髓前角运动神经元数目接近(图1E),而对照组双侧脊髓前角运动神经元数目明显不等,受损侧数目明显少于健侧(图1F)。与空白对照组相比,NRF高剂量组脊髓前角运动神经元计数、有髓神经纤维计数均显著升高( $P < 0.05, P < 0.01$ ),而NRF低剂量组无显著变化;NRF高低剂量组腓肠肌肌细胞截面积显著升高( $P < 0.01, P < 0.05$ ;表1)。再生神经电镜观察结果显示,对照组可见到较多变性的轴突,再生有髓神经纤维排列稀疏,髓鞘较薄板层结构紊乱成熟度欠佳(图1G);高剂量NRF组可见较成熟、排列致密的有髓神经纤维,髓鞘较厚,变性纤维少(图1H)。

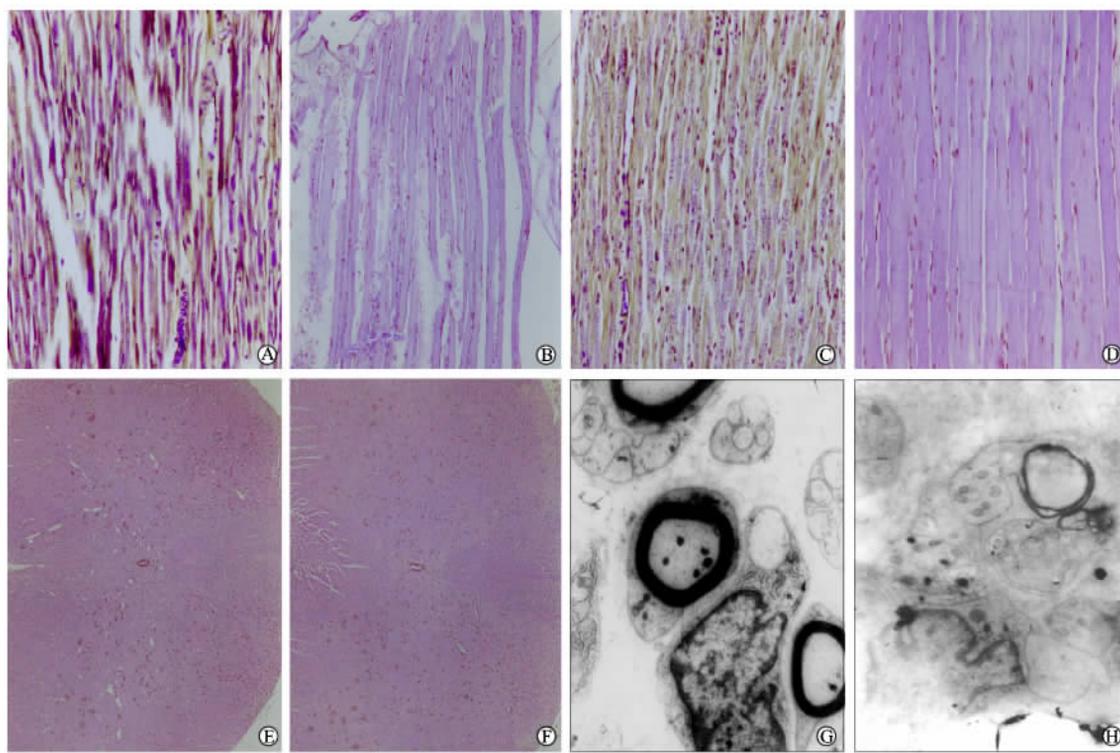


图 1 各组大鼠脊髓腰膨大、再生坐骨神经及腓肠肌组织学检查结果

Fig 1 Histological morphology of lumbar intumescencia, regenerated nerve and gastrocnemius of rats in each group

A: Longitudinal section of regenerated never; Schwann cells hyperplast, and myelinated nerve fibers were sparsely and mussily distributed (Trichrome stain,  $\times 250$ ); B: Longitudinal section of gastrocnemius; the myocyte was retracted and disorganized (H-E stain,  $\times 125$ ); C: Longitudinal section of regenerated never; myelinated nerve fibers were tightly and tidily distributed (Trichrome stain,  $\times 250$ ); D: Longitudinal section of gastrocnemius; the myocytes were full and neat (H-E stain,  $\times 125$ ); E: Transverse section of lumbar intumescencia; showing that the numbers of spinal motor neurons were similar on both sides (H-E stain,  $\times 12$ ); F: Transverse section of lumbar intumescencia; showing the numbers of spinal motor neurons were different in the operated and control side (H-E stain,  $\times 12$ ); G: Transverse section of regenerated never; the regenerated myelinated nerve sheath was thick and compact (Uran-lead counterstain,  $\times 6\ 000$ ); H: Transverse section of regenerated never; the regenerated myelinated nerve sheath was thin and wrecked (Uran-lead counterstain,  $\times 6\ 000$ ); Group A, B, F, and H are control groups of NRF groups C, D, E, and G, respectively

表 1 实验大鼠脊髓前角运动神经元、有髓神经纤维计数及腓肠肌肌细胞截面积的检测

Tab 1 Number of motor neuron, regenerated myelinated nerve fiber and area of muscle cross section

( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

Group	Motor neuron	Regenerated myelinated nerve fiber	Muscle cross section ( $A/\mu m^2$ )
NRF low dose	82.2 $\pm$ 8.7	1 627 $\pm$ 183	350.2 $\pm$ 42.9 *
NRF high dose	87.8 $\pm$ 7.6 *	1 879 $\pm$ 121 **	369.0 $\pm$ 36.8 **
Control	77.1 $\pm$ 10.1	1 569 $\pm$ 166	316.1 $\pm$ 45.8

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group

### 3 讨论

NRF 是从中药中提取的有效组分。以往的研究<sup>[9-11]</sup>表明:(1)NRF 可提高体外培养的大鼠背根神经节细胞活力,促进背根节细胞突起的生长;(2)

在NRF促进神经生长过程中,神经元基因出现了特异表达的cDNA条带,经DNA测序和GenBank检索,提示这些特异性表达的cDNA与细胞增殖调控基因相关;(3)在NRF作用下,大脑皮层神经元与细胞分裂增殖、蛋白质合成的相关基因(如钙调素结合蛋白、蛋白磷酸化酶、核糖体蛋白、促细胞分裂因子、微管驱动蛋白、锌指蛋白激酶等)表达水平上调;而抑制细胞分裂基因如抑制细胞分裂因子表达下调。提示NRF可从基因调控水平促进大脑皮层细胞生长;(4)NRF对新生大鼠坐骨神经切断后相关脊髓细胞凋亡具有保护作用;(5)NRF具有促PC12细胞神经元性分化的作用,并可有效地防止PC12细胞凋亡;(6)NRF可激活ERF1/2信号转导途径,这种激活作用可能通过MEK1/2的活化,部分依赖于某种PKC的活化,但可能不需要ERF1/2信号转

导途径。这些均提示 NRF 可有效的促进神经生长、防止神经元凋亡。

为进一步探讨 NRF 对外周神经再生的影响,本研究采用大鼠坐骨神经夹伤模型,通过大鼠 SFI、电生理、组织学检测,观察 NRF 对大鼠坐骨神经损伤后的功能恢复、神经干动作电位传导速度、组织学检测和电镜超微结构的影响。结果表明 NRF 可明显提高大鼠 SFI、坐骨神经干动作电位的恢复率,可有效地防止坐骨神经损伤后脊髓前角运动神经元的凋亡,促进损伤神经的再生。

NRF 作为一种中药提取物,具有水溶性高、毒副作用极低的特点,可有效地改善损伤神经功能、促进周围神经再生,显示出该药具有潜在的开发应用前景。本研究为将 NRF 应用于临床治疗神经损伤、防治神经退行性变疾病提供了实验依据。

#### [参考文献]

- [1] 丁 斐,刘 梅,顾晓松.神经再生素对背根神经节细胞 GAP-43 和 NF-L 基因表达的影响[J].中国药科大学学报,2001,32: 231-234.
- [2] 刘 梅,强 亮,丁 斐.神经再生素对神经细胞生长影响的实验研究[J].南通医学院学报,2002,22:357-359.
- [3] 陈 罡,王晓冬,丁 斐.神经再生素对新生大鼠脊髓细胞凋亡的影响[J].中国药科大学学报,2002,33:58-61.
- [4] 张沛云,顾晓松,王晓冬.人工组织神经移植体辅加神经生长因子修复大鼠坐骨神经缺损[J].中华显微外科杂志,2002,25: 126-128.
- [5] 张 烽,顾玉东,徐建光,等.银杏叶提取物促进大鼠坐骨神经再生的实验研究[J].中华显微外科杂志,2000,23:279-281.
- [6] Smith GM, Rabinovsky ED, Memanaman JL, et al. Temporal and spatial expression of ciliary neurotrophic factor after peripheral nerve injury[J]. Exp Neurol, 1993,121:239-247.
- [7] Hare GM, Evans PJ, Mackinnon SE, et al. Walking track analysis: A long-term assessment of peripheral nerve recovery [J]. Plast Reconstr Surg, 1992, 89: 251-258.
- [8] Bain 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: 129-138.
- [9] 刘 梅,顾晓松,刘 炎.中药“神经再生素”促神经生长过程中基因差异性表达的初步研究[J].神经解剖学杂志,2001,17: 11-17.
- [10] 丁 斐,顾星星,王 东,等.神经再生素对皮层细胞基因表达影响的基因芯片研究[J].中国药科大学报,2003,34:78-80.
- [11] 强 亮,丁 斐,顾晓松.神经再生素激活 PC12 细胞 ERK1/2 的实验研究[J].神经解剖学杂志,2003,19:369-372.

[收稿日期] 2006-08-12

[修回日期] 2006-09-03

[本文编辑] 贾泽军,孙 岩

## 《药学服务与研究》征订启事

《药学服务与研究》杂志是第二军医大学主管、第二军医大学长海医院主办的我国第一本有关药学服务方面的全国性专业学术期刊,主要报道药学尤其是药学服务的研究进展和实践,介绍国内外药学领域的新知识、新技术、新方法和新成果,为安全、有效、经济用药提供理论和实践信息。国内统一连续出版物号 CN 31-1877/R,国际标准连续出版物号 ISSN 1671-2838。本刊学术性强,图文并茂,印刷装帧精美。

读者对象为从事医药卫生工作的中高级科研、医疗、教学、管理、生产、营销机构的人员和高等医药院校的师生。本刊创刊于 2001 年 12 月,现在已经成为中国科技核心期刊、中国科技论文统计源期刊、中国生物学数据库核心期刊,中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,并已被国际著名检索期刊和数据库,如美国化学文摘(CA)、俄罗斯文摘杂志(VINITI)、美国国际药文摘(IPA)和荷兰 Elsevier 文献数据库[Elsevier Bibliographic Databases,该数据库包括著名的荷兰《医学文摘》(EM)]收录和利用,也被国内很多大型数据库和文摘类期刊收录和利用。本刊国内外公开发行,邮发代号 4-706,国外发行代号 BM 3731。现为双月刊,双月末出版,大 16 开,正文 80 页,国内每期(册)定价 10 元,全年共 60 元。敬请及时到当地邮局订阅,也可直接汇款至本杂志社订阅,免邮寄费。

地 址:上海市长海路 174 号,邮 编:200433

电 话:021-65519829(兼传真),021-25074639

E-mail: PharmCR@yaoxue.net