

## 免疫抑制对大鼠周围神经损伤再生的影响

孙美庆<sup>1</sup>, 季正伦<sup>2</sup>, 江 华<sup>1\*</sup>, 张敬德<sup>2</sup>

(1. 第二军医大学长征医院整形外科, 上海 200003; 2. 第二军医大学长海医院整形外科, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:**探讨免疫抑制治疗对周围神经损伤再生的影响。**方法:**49只SD大鼠随机分为7组,每组7只,分别为空白对照组、坐骨神经钳夹、横断、缺损损伤动物模型免疫抑制治疗组以及各自生理盐水对照组。各损伤免疫抑制治疗组大鼠术后腹腔内注射免疫抑制剂环磷酰胺,生理盐水对照组大鼠腹腔内注射生理盐水。术后采用足迹分析、电生理以及组织形态学观察评价神经再生和功能恢复的情况;采用免疫组化方法检测损伤局部自身免疫反应状况。**结果:**神经损伤后免疫抑制治疗组神经功能指数优于生理盐水对照组,电生理(神经传导速度)和组织形态观察显示免疫抑制治疗组神经功能恢复优于生理盐水对照组。免疫组化结果表明免疫抑制治疗使神经损伤局部免疫球蛋白沉积明显少于生理盐水对照组。**结论:**免疫抑制治疗可减轻周围神经损伤后发生的自身免疫反应,从而改善了周围神经损伤后再生的微环境,促进了神经的再生。

**[关键词]** 免疫抑制法;环磷酰胺;周围神经;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)09-0941-05

### Effects of immunosuppression on post-injury regeneration of peripheral nerve in rats

SUN Mei-qing<sup>1</sup>, JI Zheng-lun<sup>2</sup>, JIANG Hua<sup>1\*</sup>, ZHANG Jing-de<sup>2</sup> (1. Department of Plastic Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Plastic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the effects of immunosuppression treatment on peripheral nerve injury and regeneration in rats. **Methods:** Forty-nine SD rats were randomly divided into 7 groups: sciatic nerve (in the middle of left thigh) forceps-crushing + cyclophosphane, transecting + cyclophosphane, resecting groups + cyclophosphane, forceps-crushing + normal saline, transecting + normal saline, resecting groups + normal saline, and blank control groups. Cyclophosphane and normal saline were intraperitoneally injected into rats post-operatively. Peripheral nerve regeneration and its related function were assessed by walking track analysis, electrophysiology and histomorphology; immunohistochemistry method was used to evaluate the local autoimmune reactions 12 weeks after operation. **Results:** Cyclophosphane treated animals had higher scores of sciatic function index (SFI) compared to animals in the corresponding normal saline groups. The electrophysiological (nerve conduction velocity) and morphological examinations showed better regeneration of the myelinated axons in immunosuppression-treated animals compared to the corresponding normal saline groups. The immunohistochemistry showed that the intensities of the local immunological response in immunosuppression groups were obviously lower as compared to the corresponding normal saline groups. **Conclusion:** There is local autoimmune reaction in post-traumatic nerve regeneration and this autoimmune reaction may influence nerve regeneration. Cyclophosphane treatment can suppress this autoimmune reaction and improve the micro-environment for nerve regeneration.

**[KEY WORDS]** immunosuppression; cyclophosphamide; peripheral nerves; wounds and injuries; nerve regeneration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(9): 941-945]

周围神经损伤一直是临床治疗的难题。目前的研究<sup>[1]</sup>认为,周围神经损伤后将发生一系列自身免疫反应,这种自身免疫反应将影响周围神经的再生。有研究<sup>[2]</sup>证明脊髓损伤后发生自身免疫反应,免疫抑制治疗可以促进脊髓损伤后神经轴突的再生。但免疫抑制对周围神经损伤再生的作用机制目前尚不清楚。

本实验着重观察周围神经损伤后的免疫反应以及免疫抑制治疗对周围神经再生微环境及轴突再生的影响,为临床改善周围神经损伤后修复效果提供

实验研究资料。

### 1 材料和方法

1.1 动物分组与手术方法 2个月龄清洁级SD大鼠49只,雄性,体质量220~240g,随机分成7组(每组7只)。0组为空白对照,1、3、5组为免疫抑制

**[作者简介]** 孙美庆, 博士生, 主治医师、讲师。

E-mail: drsun@vip.sina.com

\* Corresponding author. E-mail: dosjh@sh163.sta.net.cn

治疗组,2、4、6组为生理盐水对照组。空白对照组不施行任何手术。其余大鼠以3%戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔注射麻醉,俯卧位固定。左侧股后部作纵形切口,无菌条件下显露坐骨神经,自股中部分别行(1)钳夹(1、2组):钳夹损伤远端9-0缝线标记;(2)切断(3、4组):横断损伤后利用显微外科技术以9-0缝线外膜缝合法修复;(3)切除(5、6组):切除约10 mm长坐骨神经,将切下神经段应用显微外科技术原位自体神经移植修复。手术操作结束后大鼠即送入清洁级动物房分笼饲养,术后去除发生自残的动物,每组随机选取其中的5只动物。实验组术后腹腔内注射环磷酰胺10 mg/(kg·d),对照组腹腔内注射同等容量的生理盐水。疗程3个月。

1.2 研究指标观察与测定

1.2.1 坐骨神经功能指数(SFI, sciatic function index)测定 实验动物分别于术前1 d和术后每周按文献<sup>[3]</sup>方法测量足迹长度(PL)、趾展宽度(TS)、中间趾展宽度(IT)。将数值代入 Bain 公式计算出 SFI<sup>[4]</sup>(图1),以 SFI=0 为正常值, -100 为神经完全断离指标。

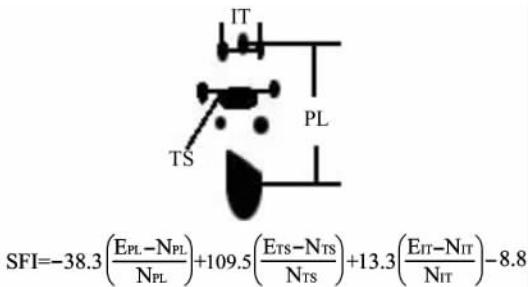


图1 PL、TS、IT 测量示意图以及 Bain SFI 计算公式

Fig 1 PL, TS, and IT measurement and formula for SFI calculation

E: Experimental side; N: Normal side

1.2.2 神经电生理检查 术后3个月,全部动物在全麻下显露坐骨神经(麻醉与手术方法同前),采用第二军医大学基础医学部生理学教研室研制的MPA-IV型多道生物信号分析系统进行神经电生理检查。检测神经肌肉动作电位(muscle-nerve action potential, MAP)和神经干动作电位(nerve action potential, NAP),测定运动神经传导速度(muscle-nerve conductive velocity, MNCV)和混合神经传导速度(compound nerve conductive velocity, CNCV)。

1.2.3 免疫球蛋白沉积测定 电生理检查后,迅速切取一段神经(距损伤处近端、远端各4 mm)。冰冻

切片后,采用FITC标记的羊抗鼠IgG(Sigma公司)荧光抗体直接法染色,缓冲甘油封片后,立即在荧光显微镜下(日本尼康公司产)观察免疫荧光着色并摄片。为使各组照片之间具有可比性,曝光和冲印时间一致。

1.2.4 组织形态学检查 电生理检查结束后,利用显微外科技术,尽快切取损伤处远侧约5 mm长的神经组织,置于3%磷酸缓冲的戊二醛固定液中,4℃固定24 h,1%锇酸后固定1.5 h,逐级乙醇脱水, Epon 812/618 定向包埋,半薄切片(1×10<sup>-10</sup> m厚)1%甲苯胺蓝染色,光镜下观察定位,超薄切片枸橼酸铅染色,日立H-800透射电镜观察。

1.2.5 形态分析 1%甲苯胺蓝染色的半薄切片直接置于通用颗粒计算机图像分析系统显微镜下(中国科学院自动化技术公司研制),通过摄像系统和视频捕捉卡将标本图像采入电脑,运用图像分析系统软件自动计数单位面积内有髓神经纤维数目、髓鞘厚度以及神经纤维直径。

1.3 统计学处理 实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用非配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 大鼠坐骨神经功能指数 各组大鼠术前及术后12周SFI的恢复情况的动态变化如图2所示。

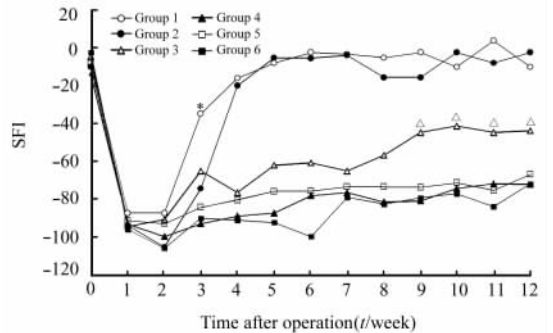


图2 各组术后 SFI 恢复情况

Fig 2 SFI before and after operation

\* *P* < 0.05 vs Group 2; △ *P* < 0.05 vs Group 4

6组之间术前SFI无显著性差异;钳夹损伤免疫治疗组(1组)术后SFI恢复较生理盐水对照组(2组)要快,在术后第3周时两组差异显著(*P* < 0.05),第4周后两组基本恢复正常,无显著差异;横断损伤缝合免疫治疗组(3组)术后SFI恢复较生理盐水对照组(4组)快,从术后第9周开始两组相差显著(*P* < 0.05),但与功能恢复正常的钳夹组比较差异仍显著;神经缺损行自体移植免疫治疗组(5

组)术后 SFI 恢复较生理盐水对照组(6 组)快,但两组在术后 12 周内相差不显著;所有横断一期缝合、神经缺损自体移植组动物的神经功能在术后 12 周内均未完全恢复正常(SFI<-40)。

2.2 免疫球蛋白沉积测定 各组免疫荧光组化结果

如图 3 所示,按免疫荧光强度分级标准<sup>[5]</sup>,免疫球蛋白沉积程度测定结果见表 1。实验结果表明大鼠周围神经损伤程度越重,免疫球蛋白沉积越多,而免疫抑制治疗组免疫球蛋白沉积程度较生理盐水对照组要少。

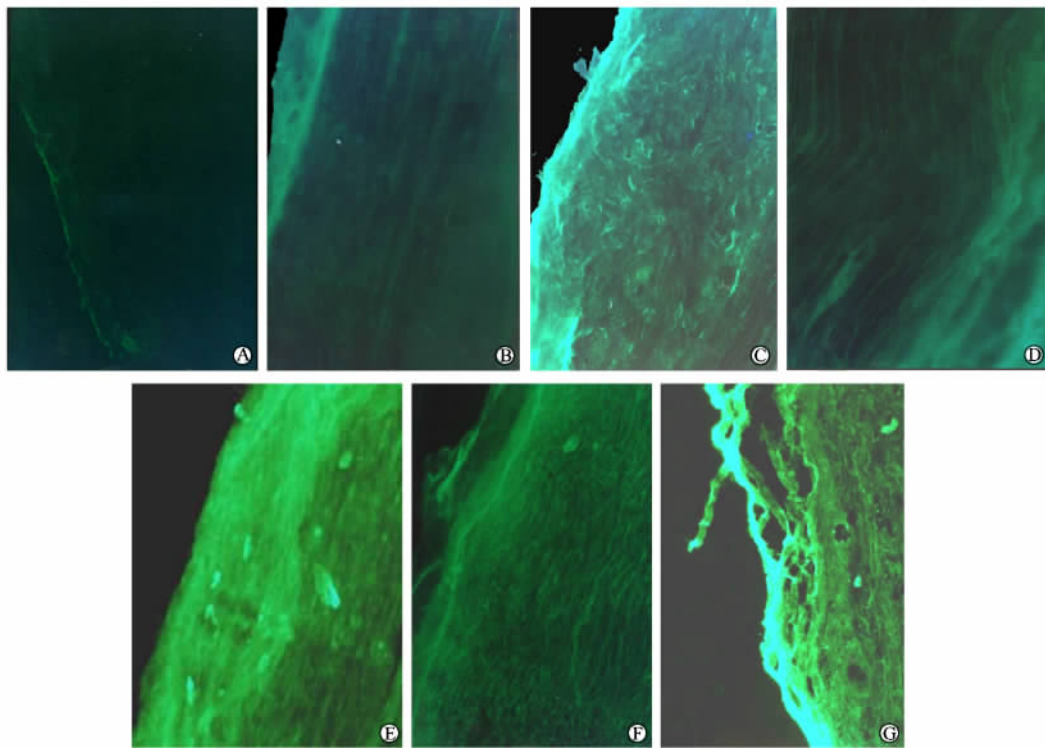


图 3 周围神经损伤局部免疫球蛋白沉积荧光测定结果

Fig 3 The results of local immunoglobulin detection

A: Normal CG immunofluorescence (-); B: Forceps crushing EG: immunofluorescence(±); C: Forceps crushing CG: immunofluorescence(+); D: Transecting EG: immunofluorescence(+); E: Transecting CG: Immunofluorescence(++); F: Resecting EG ; immunofluorescence(+); G: Resecting CG: immunofluorescence(##). CG: Control group; EG: Experimental group

表 1 免疫球蛋白沉积测定结果

Tab 1 Deposit of immunoglobulin

| Group | Injury grade | Drug (ip)     | Immunofluorescence intensity |
|-------|--------------|---------------|------------------------------|
| 0     | -            | -             | -                            |
| 1     | Slight       | CTX           | ±                            |
| 2     | Slight       | Salt solution | +                            |
| 3     | Moderate     | CTX           | +                            |
| 4     | Moderate     | Salt solution | ++                           |
| 5     | Serious      | CTX           | +                            |
| 6     | Serious      | Salt solution | ##                           |

2.3 电生理观察 各组神经肌肉动作电位与神经干动作电位的出现率均为 100%。神经钳夹损伤免疫抑制剂治疗组与生理盐水对照组的运动神经传导速度相差不明显;神经横断损伤和神经缺损损伤实验组运动神经传导速度(MNCV)显著快于生理盐水对照组,但均明显低于空白对照组(35.65±5.89)

m/s(P<0.05)。混合神经传导速度(CNCV)各免疫抑制剂治疗组与盐水对照组之间差别不显著,但均明显低于空白对照组(34.49±7.00) m/s(P<0.05)。见表 2。

2.4 组织学观察

2.4.1 电镜检查结果 各组大鼠损伤 12 周后,电镜下可见再生神经由再生有髓神经纤维、无髓神经纤维、神经膜细胞、血管、胶原纤维及很少的退变髓鞘构成。各组有髓神经纤维数目较多,但成熟程度不同。各对照组可见较多的无髓纤维及大量的胶原成分,免疫治疗组再生轴突髓鞘排列较对照组侧紧密,有髓轴突数多于对照组,髓鞘亦厚,胶原成分明显较对照组少(图 4)。

2.4.2 图像分析结果 如表 3 所示,空白对照组神经纤维计数最少,钳夹损伤中免疫抑制剂治疗组单位面积再生有髓神经纤维计数显著少于生理盐水对照

组,横断损伤中免疫抑制治疗组计数较生理盐水对照组为多,但无显著差别;免疫抑制治疗组的再生有髓神经纤维的髓鞘厚度均显著大于各自的生理盐水对照组;钳夹损伤和横断损伤中免疫抑制治疗组神

经再生轴突直径显著大于生理盐水对照组,但神经缺损损伤免疫抑制治疗组直径与生理盐水对照组比较无显著差异。

表 2 各免疫抑制剂治疗组与对照组神经传导速度的比较

Tab 2 Comparison of nerve conduction velocity between experimental and control groups

(n=5,  $\bar{x} \pm s, v/m \cdot s^{-1}$ )

| Group             | Forceps crushing injury |              | Transecting injury |              | Resecting injury |              |
|-------------------|-------------------------|--------------|--------------------|--------------|------------------|--------------|
|                   | MNCV                    | CNCV         | MNCV               | CNCV         | MNCV             | CNCV         |
| Normal saline     | 25.46 ± 4.64            | 24.25 ± 5.08 | 17.92 ± 3.99       | 17.70 ± 4.70 | 13.55 ± 4.55     | 12.98 ± 3.72 |
| Immunosuppression | 29.93 ± 5.63            | 25.57 ± 4.29 | 25.96 ± 5.52*      | 20.58 ± 4.27 | 20.01 ± 3.82*    | 15.79 ± 4.39 |

\* P < 0.05 vs normal saline group

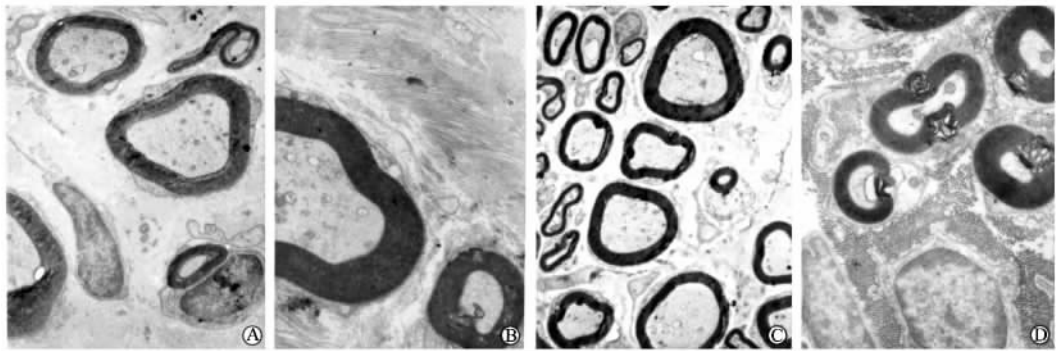


图 4 电镜检查

Fig 4 Electron microscopic examination(A-C: ×500; D: ×700)

A: Forceps crushing injury experimental side; less collagen in the regeneration nerve; B: Forceps crushing injury control side; more collagen in the regeneration nerve; C: Transecting injury experimental side; less collagen in the regeneration nerve; D: Transecting control side; more collagen in the regeneration nerve

表 3 再生有髓神经纤维计数、髓鞘厚度、神经轴突直径

Tab 3 Nerve axon count, myelene sheath thickness and diameter of regenerated nerves

(n=5,  $\bar{x} \pm s$ )

| Group | Nerve axon count (/100 $\mu m^2$ ) | Myelene sheath thickness (d/ $\mu m$ ) | Nerve axon diameter (d/ $\mu m$ ) |
|-------|------------------------------------|--|-----------------------------------|
| 0     | 98.0 ± 9.0                         | 1.74 ± 0.46                            | 8.34 ± 2.83                       |
| 1     | 165.4 ± 24.9**                     | 1.47 ± 0.40** $\Delta$                 | 6.05 ± 2.11** $\Delta$            |
| 2     | 247.6 ± 17.1                       | 1.01 ± 0.21                            | 4.89 ± 1.42                       |
| 3     | 224.6 ± 20.3 $\Delta$              | 1.24 ± 0.32** $\Delta$                 | 4.30 ± 1.30** $\Delta$            |
| 4     | 201.0 ± 20.3                       | 0.92 ± 0.22                            | 3.78 ± 1.19                       |
| 5     | 270.2 ± 16.7 $\Delta$              | 1.03 ± 0.25** $\Delta$                 | 3.38 ± 0.90 $\Delta$              |
| 6     | 233.8 ± 37.3                       | 0.76 ± 0.20                            | 3.40 ± 1.07                       |

\*\* P < 0.01 vs Group 2,4,6;  $\Delta$  P < 0.05 vs Group 0

### 3 讨论

周围神经系统由于和中枢神经系统一样存在血-神经屏障,能够阻止淋巴细胞和抗体进入神经实

质内,没有主要组织相容性复合体(MHC),故多年来一直被认为是“免疫豁免区”。但近来研究<sup>[6,7]</sup>发现血循环中的淋巴细胞可以进出周围神经系统,并且能够表达 MHC II 类抗原、补体受体 3(CR3)以及 Fc- $\gamma$  受体 III。周围神经损伤后,血-神经屏障破坏,神经性抗原漏出<sup>[8]</sup>,进入血循环而产生抗神经节苷脂抗体和抗髓鞘自身抗体等多种特异性抗体。同时,MHC II 类抗原表达增强,神经实质内的抗原递呈细胞摄取并递呈神经性抗原后激活免疫反应,引起免疫球蛋白的合成和免疫球蛋白 IgG 的沉积<sup>[1,5]</sup>、免疫细胞的浸润。本实验证明周围神经损伤后,局部有免疫球蛋白 IgG 的沉积,神经损伤程度越重,免疫球蛋白沉积越多,神经再生和功能恢复越差。神经纤维再生和功能恢复同免疫球蛋白沉积呈负相关,表明神经损伤后局部发生的免疫反应对神经再生起着抑制作用。

环磷酰胺在临床上的应用非常广泛,是一种常用而又经济的免疫抑制剂,具有确实可靠的免疫抑制效果。本实验免疫荧光染色结果也证实,环磷酰胺能有效抑制周围神经损伤后的自身免疫反应,局部免疫球蛋白的沉积明显较生理盐水对照组为少,而其中钳夹损伤免疫抑制组和横断损伤免疫抑制组动物的神经功能也得到显著的改善。其原因我们认为可能是因为环磷酰胺抑制了神经损伤后的自身免疫反应,减轻了这种免疫反应对神经再生的不利影响,从而改善周围神经再生的微环境,促进了神经的再生。生理盐水对照组的免疫球蛋白沉积程度与损伤的程度有关,损伤越重,则免疫球蛋白沉积量越多,神经功能恢复也越差。De Medinaceli 等<sup>[5]</sup>也报道周围神经损伤后将发生自身免疫反应,局部有免疫球蛋白的沉积。本实验采用全身免疫抑制方法,抑制神经损伤后发生的免疫反应,结果也证实在钳夹损伤以及神经横断动物中可以加快或提高神经功能的恢复,促进损伤后神经的再生。本期望神经损伤越重,免疫反应越重,则免疫抑制治疗的效果就越明显,但实验结果表明,虽然电生理和形态学显示所有实验组神经再生显著优于对照组,但在损伤后12周内,神经缺损损伤自身神经移植实验组(5组)的动物经免疫治疗后SFI恢复较生理盐水对照组(6组)无显著差异,神经轴突直径方面两组之间也无显著差异。而且即使是神经横断损伤免疫抑制组(3组)功能也未完全恢复。这说明还有其他因素影响了神经损伤后的再生,免疫因素只是起到一定的阻碍作用。

另外,神经吻合口处过多的纤维组织增生及瘢痕形成一直被认为是使轴突再生错位及妨碍轴突生长的重要因素之一,控制纤维组织增生和瘢痕形成有利于神经轴突的再生。许多研究表明神经损伤后损伤局部和损伤的远端都会有明显的胶原增生<sup>[9]</sup>,一般认为胶原的增生将妨碍神经的再生,抑制胶原的增生将有利于控制纤维组织增生和瘢痕的形成,从而有利于神经的再生<sup>[9]</sup>。环磷酰胺可以显著减少组织损伤后胶原和肉芽组织的增生<sup>[10]</sup>,这也是环磷酰胺能促进神经再生的原因之一。

综上所述,我们认为周围神经损伤后,血-神经屏障遭到破坏,神经性抗原漏出,同时引起神经组织

对MHC II类抗原表达增强,导致损伤部位免疫反应的发生,从而抑制神经的再生。本实验结果提示,周围神经损伤后将发生免疫反应,免疫反应的程度与损伤程度正相关,对神经再生有一定的抑制作用。免疫抑制剂环磷酰胺的应用可以减轻这种免疫反应,并且在一定程度上促进了神经再生。因此,我们认为,周围神经损伤后的再生受到多种因素的影响,其中免疫因素在神经再生中起到一定作用,而免疫抑制可以改善神经损伤后再生的微环境,促进神经的再生。

#### [参考文献]

- [1] Liu L, Tornqvist E, Mattsson P, et al. Complement and clusterin in the spinal cord dorsal horn and gracile nucleus following sciatic nerve injury in the adult rat[J]. *Neuroscience*, 1995, 68: 167-179.
- [2] Ibarra A, Correa D, Willms K, et al. Effects of cyclosporin-A on immune response, tissue protection and motor function of rats subjected to spinal cord injury[J]. *Brain Res*, 2003, 979(1-2): 165-178.
- [3] 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: 284-287.
- [4] 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.
- [5] De Medinaceli L, Church AC, Wang YN. Posttraumatic autoimmune reaction in peripheral nerve: effect of a single injury[J]. *Exp Neurol*, 1985, 88: 372-384.
- [6] Quattrini A, Previtali SC, Kieseier BC, et al. Autoimmunity in the peripheral nervous system[J]. *Crit Rev Neurobiol*, 2003, 15: 1-39.
- [7] Carlton JM, Goldberg NH. Quantitating integrated muscle function following reinnervation[J]. *Surg Forum*, 1986, 37: 611.
- [8] Stoll G, Griffin JW, Li CY, et al. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophage in myelin degradation[J]. *J Neurocytol*, 1989, 18: 671-683.
- [9] Millesi H. Healing of nerves[J]. *Clin Plast Surg*, 1977, 4: 459-473.
- [10] Jensen LT, Garbarsch C, Horslev-Petersen K, et al. Collagen metabolism during wound healing in rats. The aminoterminal propeptide of type III procollagen in serum and wound fluid in relation to formation of granulation tissue[J]. *APMIS*, 1993, 101: 557-564.

[收稿日期] 2006-06-27

[修回日期] 2006-08-28

[本文编辑] 贾泽军