

• 基础研究 •

神经生长因子和电刺激对去神经大鼠腓肠肌组织结构和肌纤维类型的影响

苏利强¹, 陈建萍¹, 张玮¹, 李翠玲², 余忠舜¹, 喻治达¹, 刘龢¹

[摘要] 目的 探讨神经生长因子(NGF)和低频电刺激对去神经骨骼肌的形态结构和骨骼肌类型转变的影响。方法 以去神经大鼠为模型,分别对模型大鼠的腓肠肌注射 NGF,施加频率为 2 Hz 的电刺激 30 d,采用免疫组织化学法、图像分析法观测肌肉形态结构的变化情况和肌肉类型的转变情况,分析两者各自的作用。结果 去神经组肌纤维排列混乱,细胞间界限不明显;去神经注射 NGF 组和去神经电刺激组肌纤维排列较去神经组整齐,细胞间界限较明显,细胞核数目较正常组多。与正常组比较,其他各组 I 型肌纤维所占比例增加($P < 0.05$),II 型肌纤维所占比例下降($P < 0.05$);去神经注射 NGF 组、去神经电刺激组和去神经组两种类型肌纤维比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。结论 注射 NGF 和施加低频电刺激能使去神经骨骼肌形态结构趋向好转。

[关键词] 神经生长因子;电刺激;肌肉类型

Effects of Nerve Growth Factor and Electricity Stimulus on Configuration and Fibre Type of Gastrocnemius of Denervated Rats SU Li-qiang, CHEN Jian-ping, ZHANG Wei, et al. The Department of Physical Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi, China

Abstract: **Objective** To explore the effects of nerve growth factor (NGF) and low frequency electricity stimulus on the configurations of skeletal muscle cells and the change of muscle fibre types in the denervated skeletal muscle separately. **Methods** The denervated rat model was established and model animals were injected with the NGF and given the stimulus (frequency = 2 Hz) about 30 days. The configurations and the change of muscle fibre types were observed by immunohistochemistry and image analysis. **Results** The muscle fibre was in chaos and the boundary was not obvious among cells in the denervated rats; the muscle fibre of the denervated rats with NGF injection and low frequency electricity stimulus was more regular and the boundary of cells was clearer, the cells number was more than those of the denervated rats. Compared to normal rats, the proportion of I muscle fibre in the denervated rats increased ($P < 0.05$), whereas the proportion of II muscle fibre decreased ($P < 0.05$); it had no significant differences of the two types of muscle fibre between the denervated rats with NGF injection, low frequency electricity stimulus and the denervated rats ($P > 0.05$). **Conclusion** NGF injection and low frequency electricity stimulus can make the configurations of denervated muscle to better.

Key words: nerve growth factor; electricity stimulus; muscle type

[中图分类号] R337 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)11-1036-02

[本文著录格式] 苏利强,陈建萍,张玮,等. NGF 和电刺激对去神经大鼠腓肠肌组织结构和肌纤维类型的影响[J]. 中国康复理论与实践,2008,14(11):1036-1037.

骨骼肌是人体最大的运动器官,其肌纤维类型和蛋白同功型的多样性,以及在不同肌组织中的分布和构成比例,决定其对复杂功能的适应性。肌肉类型与运动训练息息相关,也是运动训练关注的问题之一。然而,对肌肉类型的转变一直有不同的观点,其中肌肉类型对神经元的依赖性是其中的一个主要观点,即:肌肉类型的转变是通过改变神经冲动的频率或者神经分泌的特殊物质,对不同肌肉类型的基因表达有特殊的作用。本研究用去神经大鼠为模型,分别给以电刺激和注射神经生长因子(nerve growth factor, NGF),观测比较肌肉类型的转变和肌纤维的形态结构变化,以探讨肌肉类型转变过程中神经冲动和 NGF 各自的作用,并探讨其在治疗神经受伤导致的肌肉形态学变化中的作用。采用去神经大鼠为模型可以避免神经冲动和 NGF 对肌肉类型转变的共同作用。

1 材料与方

1.1 实验动物及分组 2 月龄健康雄性 SD 大鼠 32 只,分正常组、去神经组、去神经注射 NGF 组、去神经电刺激组,每组 8 只,后 3 组麻醉后切断坐骨神经,然后缝合。适应 8 d 后,对各组动物进行实验。

1.2 方法 3%戊巴比妥钠腹腔麻醉(1 ml/kg 体重)后,将大

鼠俯卧位固定于鼠板上,剪去尾根及左下肢的鼠毛,消毒,自坐骨神经结节至大腿外上方连线内 1/3 处切口,暴露坐骨神经,无菌条件下切断一段神经,缝合。局部肌肉注射庆大霉素 0.5 ml,术后连续注射 3 d。再适应 5 d 后,对去神经注射 NGF 组在手术侧腓肠肌处分别注射 NGF 0.2 ml,每天 1 次。对去神经电刺激组,采用自制大鼠固定器固定清醒大鼠,在手术侧腓肠肌给予频率 2 Hz 的电刺激,每天刺激 2 次,每次持续 20 min。去神经组手术后自由喂养,作为阴性对照,正常组作为正常对照。30 d 后处死动物,取腓肠肌腹部,用 4%甲醛固定,石蜡包埋切片(横切),厚度为 5 μ m。用 SABC 法,采用 Skeletal Myosin (slow) 抗体(购自武汉博士德生物工程有限公司)标记 I 型肌纤维多肽,操作过程按说明书,然后用苏木精复染细胞核。采用图像分析系统,在显微镜下(400 倍)观察肌纤维的形态结构,拍照,每张选 5 个高倍视野,检测各组动物两种肌纤维数量;然后进行相对统计分析。

1.3 统计学处理 所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 12.0 统计软件进行组间比较独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 肌纤维组织结构变化 镜下可见:正常组细胞排列整齐,细胞核数目不多;去神经组肌纤维排列混乱,细胞间界限不明显;去神经注射 NGF 组和去神经电刺激组肌纤维排列较去神经组整齐,细胞间界限较明显,细胞核数目较正常组多。

2.2 肌纤维类型变化 与正常组比较,其他各组 I 型肌纤维所

占比例增加 ($P < 0.05$), II 型肌纤维所占比例下降 ($P < 0.05$); 去神经注射 NGF 组、去神经电刺激组和去神经组两种类型肌纤维比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 各类型肌纤维所占比例比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	I 型肌纤维	II 型肌纤维
正常组	14.48 ± 3.19	85.52 ± 3.19
去神经组	23.46 ± 4.91 ^a	76.54 ± 4.91 ^a
去神经注射 NGF 组	20.17 ± 4.19 ^a	79.83 ± 4.19 ^a
去神经电刺激组	22.84 ± 3.26 ^a	77.16 ± 3.26 ^a

注: a. 与正常组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

3.1 NGF 和电刺激对肌纤维组织结构的影响 肌肉功能的发挥是以肌纤维的结构为基础的, 肌纤维每一种结构的变化都对肌肉的功能有一定的影响, 其中神经支配是维持肌肉功能的重要条件。但神经对肌肉的作用不只是发送神经冲动, 越来越多的证据证明, 神经对肌肉有营养作用。对神经损伤的骨骼肌实施运动训练, 可使肌肉释放神经营养因子, 减轻骨骼肌萎缩^[1]。NGF 是交感神经元和发育中的感觉神经元存活、生长和分化所必需的营养因子。另外, 正常骨骼肌内有 NGF 存在, 但当骨骼肌失神经支配后, 无论是红肌还是白肌, 短时间内 NGF 含量呈下降趋势。NGF 由 α 、 β 和 γ 等亚单位组成, 其中 β 亚单位是具有生物活性的成分, 分子量为 13 200 kDa, 其结构与胰岛素相似, 对受损神经元有促再生和保护作用, 并可促进离体培养的去神经交感神经元和感觉神经元轴突的生长。NGF 具有保护神经细胞, 促进其生长、分化的作用, 主要的生物学作用是诱导神经纤维定向生长、控制存活神经元的数量、促进损伤神经元修复、促进淋巴细胞增殖分化、促进干细胞向神经细胞转化等^[2,3]。有研究显示, 剪断大鼠坐骨神经制成腓肠肌和比目鱼肌失神经支配模型, 分别于神经损伤后 1、3、7 和 14 d 取材, 运用免疫组织化学方法检测失神经支配红、白肌肉的 NGF 含量, 结果腓肠肌和比目鱼肌失神经支配后 NGF 含量均下降。因此, 周围神经损伤会引起其相应支配靶器官(肌肉)组织内 NGF 含量发生变化, 表明 NGF 对维持骨骼肌正常的形态和功能有重要作用。本实验结果显示, NGF 可使去神经肌纤维排列整齐, 细胞间界限明显, 对维持骨骼肌细胞结构的完整性有重要作用, 但 NGF 对肌肉营养作用的具体机制尚需进一步研究。

Sainons 等研究了电刺激对受累肌肉功能恢复的应用前景, 发现在肌肉失神经支配时期予以可维持一定肌力和肌肉体积的电刺激, 能够最大限度地改善临床常见的失神经肌萎缩^[4]。Dow 等发现, 功能性电刺激能延缓成年大鼠趾长伸肌失神经萎缩^[5]。低频电刺激对肌肉结构形态的维持也很重要^[6]。本实验结果显示, 低频电刺激对去神经肌肉的肌纤维排列有明显作用, 可能是慢性低频电刺激可引起肌肉血供、骨骼肌纤维内氧化酶活性和肌糖原含量的增加。神经营养活性和电刺激都是维持失神经支配肌肉结构的因素, 并且需要各种因素共同作用^[7]。

3.2 NGF 和电刺激对肌纤维类型的影响 肌肉的形态是处在动态变化中的, 为了适应机能需要和激素信号或神经肌肉活动的改变, 具有可逆性改变其肌纤维组成的能力, 这是由于基因在复制和翻译中的改变导致基因表现型的变化而引起的^[8]。研究发现, 肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)的转变反

映了 MHC 基因表达的特定路线: I → IIa → IIb → IIx, 并且方向可逆^[9]。神经支配、激素、功能负荷和慢性电刺激等条件的改变使得纤维表现型沿此路线进行向左或右的转化。

神经支配的调节决定了不同类型 MHC 异构体的表达, 而这种表达决定了不同类型的 MHC。神经支配调节的实质取决于到达肌纤维的电刺激频率, 但也不能忽略神经对肌肉的营养功能。本实验结果显示, 去神经后, 在失去神经的营养作用和电冲动的情况下, 分别注射 NGF 和给予低频电刺激使得肌纤维类型由 II 型向 I 型转变。肌纤维类型的转变是复杂的多因素的, 机制可能受成肌调节因子 MyoD 家族的影响。Sakuma 等通过 Western Blot 分析认为, 快肌纤维与慢肌纤维相比, MyoD 蛋白水平比 Myf-5 明显增高, 而慢肌纤维中, 肌浆蛋白(myogenin)的水平最高。myogenin mRNA 主要在 I 型肌纤维表达, MyoD mRNA 主要在 II 型肌纤维表达^[10]。失神经支配时, 所有 MyoD 家族的表达均快速上升。低频电刺激和 NGF 可能均能使 MyoD mRNA 的调节能力下降, 使肌纤维类型从 II 型向 I 型转变。

总之, 本研究显示失神经后慢性电刺激和注射 NGF 都能使肌纤维的形态结构得到好转, 肌纤维的排列比去神经组整齐, 细胞间界限较明显, 提示慢性电刺激和注射 NGF 都可以减缓神经损伤导致的肌肉形态学发生恶性改变。与正常组比较, 其他组都出现 I 型肌纤维百分比增大, 提示在治疗神经损伤导致的肌肉萎缩方面可以对 I 型肌纤维进行针对性治疗。肌肉类型转变是复杂的、多因素的, NGF 和电刺激的作用并非互相独立, 而是互相依赖、互相影响, 肌肉类型的转变受多种神经营养因子以及电刺激的共同作用, 有关因素和引起肌肉类型转变的条件和机制尚待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 范晓华, 纪树荣, 周红俊. 减重平板步行训练对完全性脊髓损伤患者下肢骨骼肌萎缩与步行能力的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2008, 14(1): 50-52.
- [2] 娄晓辉, 张亚卓, 孙梅珍. 应用人骨髓基质细胞治疗大鼠缺血性脑梗塞的实验研究[J]. 中华神经外科杂志, 2002, 18(5): 302.
- [3] 张沛云, 顾晓松, 王晓冬. 人工组织神经移植术辅加 NGF 修复大鼠坐骨神经缺损[J]. 中华显微外科杂志, 2002, 25(2): 126.
- [4] Dow DE, Dennis RG, Faulkner JA. Electrical stimulation attenuates denervation and age-related atrophy in extensor digitorum longus muscles of old rats[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2005, 60(4): 416-424.
- [5] 李琦, 王金武, 曾炳芳. 神经肌电刺激治疗失神经肌肉萎缩研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(5): 478-480.
- [6] Salmons S, Ashley Z, Sutherland H, et al. Functional electrical stimulation of denervated muscle basic issues[J]. Artif Organs, 2005, 29, (3): 199-202.
- [7] 王敬博, 罗永湘, 刘文革. 失神经支配红白肌感觉神经营养活性研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2002, 16(3): 152-154.
- [8] Baldwin KM, Haddad F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle[J]. J Appl Physiol, 2001, 90(1): 345-357.
- [9] Lefaucheur L, Milan D, Ecolan P, et al. Myosin heavy chain composition of different skeletal muscles in Large White and Meishan pigs[J]. J Anim Sci, 2004, 82(7): 1931-1941.
- [10] Sakuma K, Watanabe K, Sano M, et al. The adaptive response of MyoD family proteins in overloaded, regenerating and denervated rat muscles[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1428(2-3): 284-292.

(收稿日期: 2008-07-08)

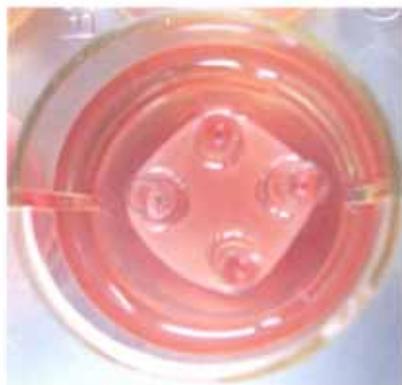


图2.1 支气管模型构建后7d(大体)



图2.2 支气管模型构建后14d(大体)

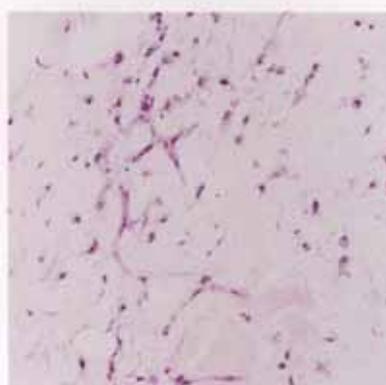


图2.3 支气管模型构建后14d (H&E染色, 20×)

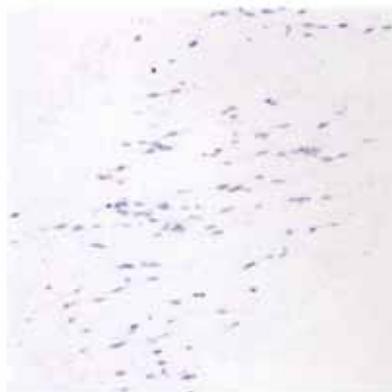


图2.4 支气管模型构建后14d
(广谱CK免疫组织化学染色, 20×)

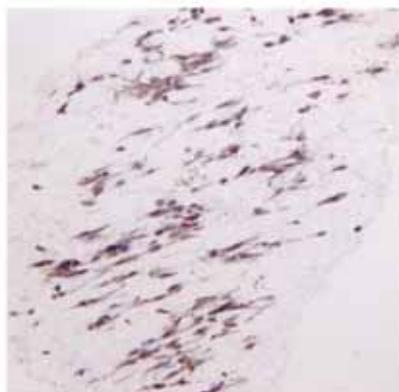


图2.5 支气管模型构建后14d
(Vimentin免疫组织化学染色, 20×)

图1.1~1.6 正文见P1034,
图2.1~2.5 正文见P1039.