

• 实验研究 •

川芎嗪在大鼠坐骨神经损伤修复中的作用及其机制研究

李宇洁¹ 李洋¹ 王冠¹ 李尧² 卓乃强^{1△}

[摘要] 目的:观察川芎嗪对神经血管基膜的Ⅳ型胶原(Collagen Ⅳ)及层连蛋白(Laminin)的影响,探讨川芎嗪治疗坐骨神经损伤的作用机制。方法:Sprague Dawley (SD)大鼠随机分为假手术组(NC组)、川芎嗪组(TMP组,200 mg/kg)和生理盐水组(NS组,200 mg/kg)。以钳夹方式制作坐骨神经挤压伤模型,造模成功后采用大鼠坐骨神经功能指数(SFI)、大鼠网格爬行实验作为行为学评价。进行苏木精-伊红(HE)染色,观察其病理结构形态。用免疫组化技术检测川芎嗪对坐骨神经血管基膜Ⅳ型胶原及层连蛋白表达水平的影响。结果:SD大鼠神经血管基膜 HE 染色及Ⅳ型胶原、层连蛋白表达部位及水平,川芎嗪组与假手术组比较差异均有统计学意义($P<0.01$);川芎嗪组与生理盐水组相比,坐骨神经功能指数值有明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。网格实验表明,川芎嗪组与假手术组相比差异有统计学意义($P<0.01$);川芎嗪组较生理盐水组踏空次数明显减少($P<0.01$)。HE 染色结果表明,川芎嗪组与生理盐水组相比,胶质细胞及炎性细胞增生明显。免疫组化实验结果表明,川芎嗪组和生理盐水组在大鼠坐骨神经损伤后Ⅳ型胶原、层连蛋白的表达分布于血管周围、血管内皮细胞、基膜、胶质细胞;生理盐水组的表达主要位于血管周围;川芎嗪组Ⅳ型胶原及层连蛋白表达明显增加,差异有统计学意义($P<0.05, 0.01$),假手术组分析结果为阴性。结论:川芎嗪能促进大鼠坐骨神经微血管基膜成分Ⅳ型胶原和层连蛋白的表达,促进血管生成,改善微循环,提升大鼠坐骨神经功能指数,治疗大鼠坐骨神经损伤。

[关键词] 川芎嗪;周围神经损伤;坐骨神经损伤;血管再生

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)03-0017-06

DOI: 10.20085/j.cnki.issn1005-0205.240304

Efficacy and Mechanism of Tetramethylpyrazine in Repair of Sciatic Nerve Injury in Rats

LI Yujie¹ LI Yang¹ WANG Guan¹ LI Yao² ZHUO Naiqiang^{1△}

¹ Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan China;

² Southwest Medical University, Luzhou 646099, Sichuan China.

Abstract Objective: To explore the mechanism of tetramethylpyrazine (TMP) on the treatment of sciatic nerve injury (SNI) by regulating the basal membrane of nerve vessels. **Methods:** Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into control group, the model of sciatic nerve crush injury was made by means of hemostatic forceps. These rats were randomly divided into sham operation group (NC group), tetramethylpyrazine group (TMP group, 200 mg/kg), and normal saline group (NS group, 200 mg/kg). Sciatic nerve function index (SFI) and grid crawling experiments were used for behavioral evaluation. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe its pathological structure and morphology. Immunohistochemistry was used to assess the expression level of Collagen Ⅳ and Laminin expression in sciatic nerve vascular basal membrane. **Results:** SFI results showed that there were significant differences between the two modeling groups and

the NC group ($P<0.01$). The TMP group had a significant increase in the SFI compared with the NS group ($P<0.01$). The results of grid crawling experiments showed that there were significant differences between the two modeling groups and the NC group ($P<0.01$). The miss times in TMP group was significantly lower than that in NS group ($P<0.01$).

基金项目:西南医科大学附属医院院级课题(2017-QB-15)

西南医科大学校级课题(2018-ZRQN-120)

¹ 西南医科大学附属医院(四川 泸州, 646000)

² 西南医科大学

△通信作者 E-mail: Znq0101@163.com

The HE staining results of the TMP group showed irregular arrangement of some neuronal axons and Schwann cells, and more edema and rupture of cells compared with the NC group. The proliferation of glial cells and inflammatory cells was significantly increased in TMP group compared with the NC group. The results of immunohistochemistry showed that the expression of type IV collagen and laminin in the TMP group and NS group was distributed around the blood vessels, vascular endothelial cells, basal membrane and glial cells after SNI, and the expression in NS group was mainly distributed around blood vessels. The expression of type IV collagen and laminin in TMP group increased significantly compared with the NC group ($P < 0.05, 0.01$), and the analysis results in NC group were negative. **Conclusion:** TMP can effectively improve the SFI of rats, enhance the proliferation of sciatic nerve vascular endothelial cells, reduce apoptosis, promote the expression of Collagen IV and Laminin in sciatic nerve microvascular basal membrane components, thereby promoting angiogenesis and improving lower limb function in rats after SNI.

Keywords: tetramethylpyrazine; peripheral nerve injury; sciatic nerve injury; revascularization

坐骨神经损伤 (Sciatic Nerve Injury, SNI) 具有高致残率、神经功能难恢复等特点^[1-2], 且继发病变会蔓延至周围正常组织, 导致慢性功能丧失^[3]。坐骨神经损伤继发性损害病因尚不清楚, 但微循环障碍被认为是发生继发性损伤的重要原因之一^[4-6]。川芎嗪 (四甲基吡嗪, Tetramethylpyrazine, TMP) 可抗血小板聚集, 预防血栓形成, 扩张小动脉, 增强心肌收缩率, 并抑制细胞凋亡、减轻炎症反应^[7-11]。本研究旨在评估川芎嗪在改善微循环方面的疗效, 并探讨其治疗坐骨神经损伤的机制, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8~10 周龄雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠, 体重为 200~250 g, 由成都达硕生物科技有限公司提供。饲养于西南医科大学动物实验中心, 人工控制环境温度为 22~24 °C, 相对湿度为 60%~80%。术后分笼饲养, 标准饲料和饮水让其自行摄食, 不加限制。若饲养期间出现实验动物死亡, 则依次补入。动物实验经西南医科大学伦理委员会批准。

1.2 实验药物及试剂

盐酸川芎嗪注射液购自河南辅仁怀庆堂制药有限公司, 10% 水合氯醛和 10% 甲醛溶液由西南医科大学中心实验室配制; 蔗糖、甘油、牛胎血清、苏木精-伊红 (HE) 染色剂、柠檬酸钠购自碧云天公司; 乙醇、OCT 冰冻切片包埋剂、PBS 液、青链霉素混合液、Hanks 溶液及 Hoechst 33258 染液购自北京索莱宝科技有限公司; 5-溴-2-脱氧尿苷购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; TUNEL 试剂盒购自上海罗氏制药有限公司; 一抗稀释液、Anti-collagen IV 抗体、Anti-Laminin 抗体购自美国 Abcam 生物技术有限公司。

1.3 实验仪器

-80 °C 低温冰箱及普通立式冰箱购自青岛海尔集团, 离心机购自上海卢湘仪离心机仪器有限公司, 流式细胞仪购自 THERMO FISHER 科技 (中国) 有限

公司, 激光共聚焦显微镜购自 THERMO FISHER 科技 (中国) 有限公司, 摇床购自杭州齐威仪器有限公司, 普通光学显微镜购自 OLYMPUS 公司, 蜡块切片机购自德国 Leica 公司, 电子天平购自梅特勒-托利多国际贸易 (上海) 有限公司, 电热恒温水温箱和烘烤箱购自上海齐欣科学仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 动物分组、给药及造模 雄性成年 (Sprague Dawley, SD) 大鼠随机分为假手术组 (NC 组, 40 例)、川芎嗪治疗组 (TMP 组, 40 例) 和生理盐水组 (NS 组, 40 例)。其中假手术组只暴露坐骨神经而不夹持, 川芎嗪组及生理盐水组以止血钳钳夹方式制作坐骨神经挤压伤模型, 见图 1。在股骨结节下 0.5 cm 处, 平行于坐骨神经干走行方向, 切开长约 1.0~1.5 cm 切口, 钝性分离显露梨状肌, 游离出左侧坐骨神经。除假手术组以外, 其余各组大鼠均用同一规格止血钳垂直钳夹坐骨神经干, 3 扣扣满, 连续夹 3 次, 每次 10 s, 间隔 10 s。神经干挤压伤宽度约 4 mm。川芎嗪组术后 30 min 起用 2% 盐酸川芎嗪注射液 200 mg/kg 进行腹腔注射, 1 次/d, 持续 5 d; 生理盐水组用等量等频率的生理盐水 (10 mL/kg) 作对照治疗 (第 1 天和第 3 天分别给药至处死前)。假手术组、川芎嗪组及生理盐水组大鼠分别用于组织切片染色 (20 例) 以及流式细胞术 (20 例)。各组分别取 5 只大鼠于术后第 1, 3, 7, 14 天四个时间点取材后处死, 于近端约 5 mm 处剪断神经, 取出组织为坐骨神经损伤组织, 长约 5 mm, 作苏木精-伊红染色, 观察其病理结构形态, 免疫组化检测 IV 型胶原 (Collagen IV) 及层连蛋白 (Laminin) 表达水平的影响。

1.4.2 取材时间及方式 各组分别于术后第 1, 3, 7, 14 天四个时间点取材, 对大鼠行腹腔内推注麻醉, 麻醉剂选用水合氯醛, 于近端约 5 mm 处剪断神经, 取出坐骨神经损伤组织。

1.4.3 动物行为学观察 坐骨神经功能指数 (Sciatic Nerve Function Index, SFI) 计算: 用墨水将待测大鼠

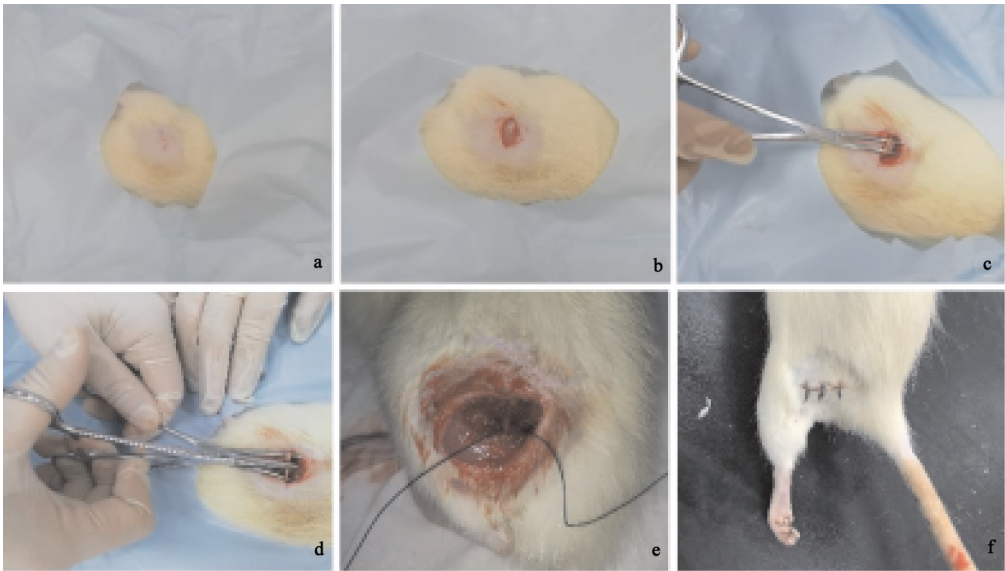


图 1 川芎嗪治疗组和生理盐水组坐骨神经挤压损伤模型建立

双侧后足染色,放于行走箱内,不干预其在行走箱内活动轨迹,对大鼠患侧足、健侧足足印的三个变量进行测量,用 Bain 公式进行计算^[12],神经完全失用时 SFI=−100,坐骨神经功能完全正常时 SFI=0。

网格爬行实验:用铁丝制成的网格,每小格之间的距离为 2.5 cm,长宽总长度均为 100 cm,将金属网格与地面成 45°固定于支撑物上,将大鼠放置在网格下端,大鼠后肢离开网格即完成实验,记录期间大鼠下肢踏空次数。

1.4.4 HE 染色 取各组大鼠坐骨神经组织切片,二甲苯脱蜡后进行 HE 染色,封片后置于显微镜下观察各组间组织病理变化。

1.4.5 免疫组化检测 10%甲醛浸泡 24 h 后,取各组大鼠坐骨神经组织进行包埋切片,依据鼠 Anti-collagen IV 抗体试剂盒及鼠 Anti-Laminin 抗体试剂盒说明书进行免疫组化(Immunohistochemistry, IHC)反应。在光学显微镜下对比观察各组大鼠肺组织中抗原分布,并对各组进行免疫组化评分。

1.5 统计学方法

将数据录入 Excel 表格,采用 SPSS22.0 数据统计软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式记录,数据符合正态分布且方差齐时采用 t 检验,组间比较用 LSD 法;若数据不符合正态分布则采用秩和检验(U 检验),

$P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠坐骨神经功能指数测定结果

如表 1 所示,造模前大鼠后肢活动正常,活动自如,未发现有活动障碍及生理缺陷;造模两组的坐骨神经功能指数与假手术组相比均有显著性降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);川芎嗪组与生理盐水组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。造模后第 3 天,川芎嗪组与生理盐水组坐骨神经功能指数稍升高,与假手术组相比有显著性降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);川芎嗪组与生理盐水组相比,坐骨神经功能指数明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。造模后第 7 天,川芎嗪组与生理盐水组坐骨神经功能指数较前明显改善;与假手术组相比有显著性降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),但川芎嗪组与生理盐水组均较前增高,且川芎嗪组较生理盐水组相比升高更明显,差异有统计学意义($P < 0.01$)。造模后第 14 天,川芎嗪组与生理盐水组坐骨神经功能指数较造模后第 3 天和第 7 天明显改善,但与假手术组相比生理盐水组仍然有显著性降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);川芎嗪组接近但仍低于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.01$);川芎嗪组较生理盐水组显著升高,且差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 大鼠坐骨神经功能指数测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	造模后第 1 天	造模后第 3 天	造模后第 7 天	造模后第 14 天
假手术组	-18.70 ± 2.04	-14.19 ± 2.95	-8.79 ± 2.29	-8.09 ± 1.15
川芎嗪组	-100	-83.61 ± 2.10	-50.74 ± 2.20	-16.52 ± 1.30
生理盐水组	-100	-89.40 ± 3.02	-59.79 ± 4.46	-26.89 ± 3.95

2.2 大鼠网格爬行实验测定结果

如表 2 所示,在第 1,3,7 天的比较中,大鼠都出现不同程度的左下肢踏空情况,川芎嗪组与生理盐水组

踏空次数比较差异无统计学意义($P > 0.05$),两个造模组与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);随着时间的推移,各组大鼠的踏空次数逐渐减少,假手

术组几乎恢复正常,第14天川芎嗪组与生理盐水组踏空次数差异有统计学意义($P < 0.01$),造模两组与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);每组各时

间段踏空次数的纵向比较中,第14天与第1天比较差异有统计学意义($P < 0.01$),表明大鼠下肢功能逐渐恢复。

表2 大鼠网格爬行实验踏空次数统计($\bar{x} \pm s$,次)

组别	造模后第1天	造模后第3天	造模后第7天	造模后第14天
假手术组	4.28±0.66	3.52±0.57	1.76±0.71	0.40±0.57
川芎嗪组	15.28±1.43	12.28±1.40	7.32±0.97	1.96±0.77
生理盐水组	15.76±1.45	12.96±1.34	8.32±0.97	3.76±0.71

2.3 HE染色结果

200倍显微镜下观察结果见图2,假手术组神经元轴突、雪旺细胞排列整齐,炎性细胞浸润较少,神经形态完整。川芎嗪组部分神经元轴突、雪旺细胞不规则排列,细胞水肿、破裂较多,随着时间推移,炎性细胞浸

润,胶质细胞增生,治疗后轴突、雪旺细胞逐渐恢复规整。生理盐水组神经元轴突、雪旺细胞不规则排列,细胞水肿、破裂较多,随着时间推移,胶质细胞及炎性细胞增生不如川芎嗪组明显。

2.4 免疫组化检测结果

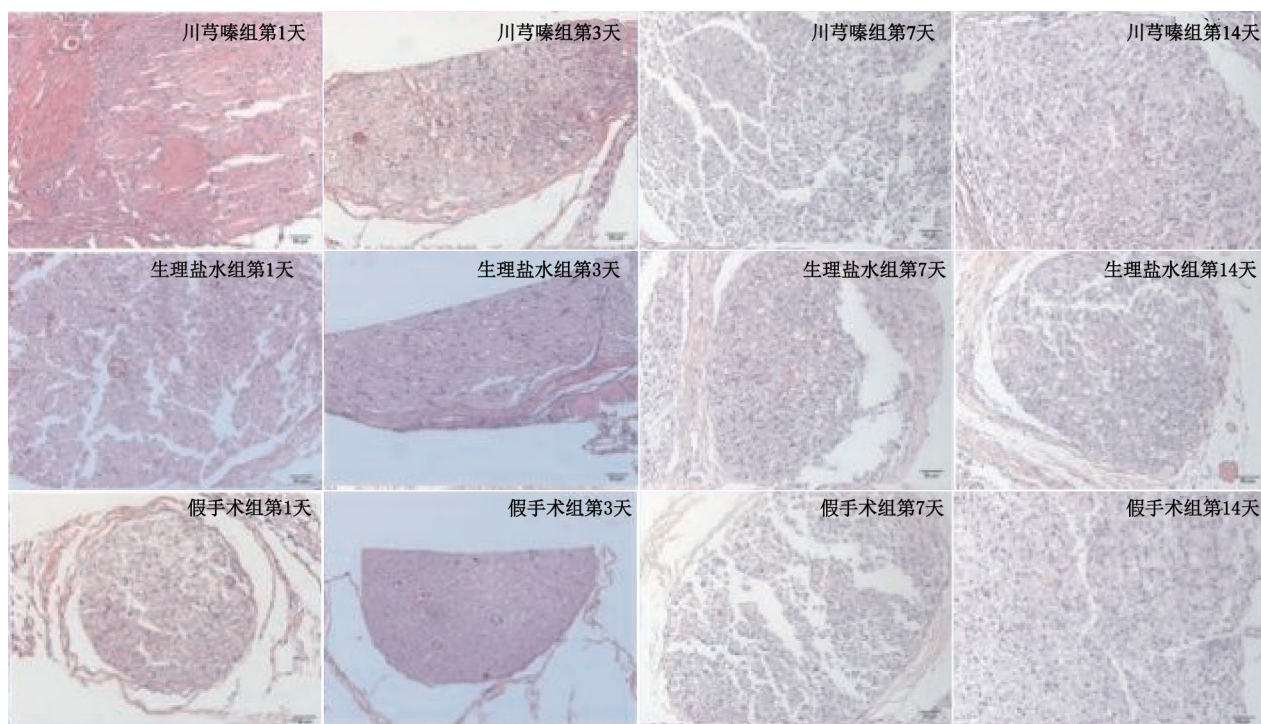


图2 HE染色光镜观察结果(×200)

利用Image J软件分析免疫组化染色强度评分,在400倍光镜下观察结果见图3和图4。川芎嗪组和生理盐水组在大鼠坐骨神经损伤后Ⅳ型胶原及层连蛋白的表达基本一致,且主要分布于血管周围、血管内皮细胞、基膜、胶质细胞;而假手术组的表达主要位于血管周围。但川芎嗪组与生理盐水组两组之间有明显差异:川芎嗪组的Ⅳ型胶原及层连蛋白阳性表达明显强于生理盐水组,其中川芎嗪组第1,3,7天表现为强阳性,第14天表现为中等阳性;生理盐水组第1,3,7天表现为中等阳性,第14天表现为弱阳性,假手术组分析结果为阴性。

3 讨论

外周神经损伤修复是目前外科创伤领域重点关注的问题之一。坐骨神经损伤段及邻近正常神经组织处

于持续性的低血流灌注状态,虽然外周神经对能量的需求较低,可以迅速适应无氧代谢,因此大部分损伤都是可逆的^[13-14],但严重的缺血低氧易导致代谢需求增高,同时耐低氧能力差的神经细胞出现缺血性坏死^[15-16]。

川芎嗪是一种从伞形科植物川芎中发现的生物活性单体,可以抑制自由基产生、清除氧自由基、提高内源性超氧化物歧化酶(SOD)活性^[17],随着药理研究的深入,在治疗心脑血管疾病方面具有确切的疗效,临床应用范围日益广泛,并且取得了很好的疗效^[18]。目前关于川芎嗪对坐骨神经损伤动物模型保护作用的实验性研究逐年增多,其保护机制涉及到抑制凋亡、减轻炎症、神经营养等,但川芎嗪对坐骨神经损伤的改善微循环作用的研究报道较少,且其改善微循环的具体机制

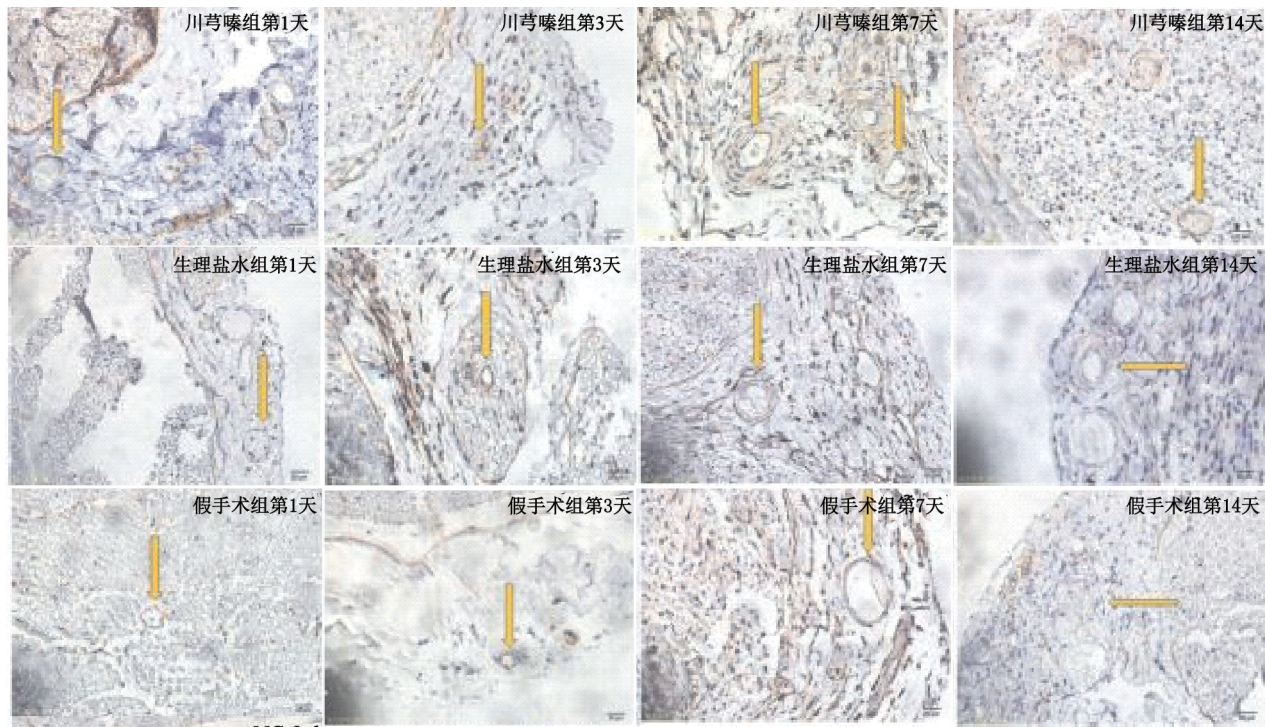


图 3 血管基膜Ⅳ型胶原蛋白表达结果(×400)

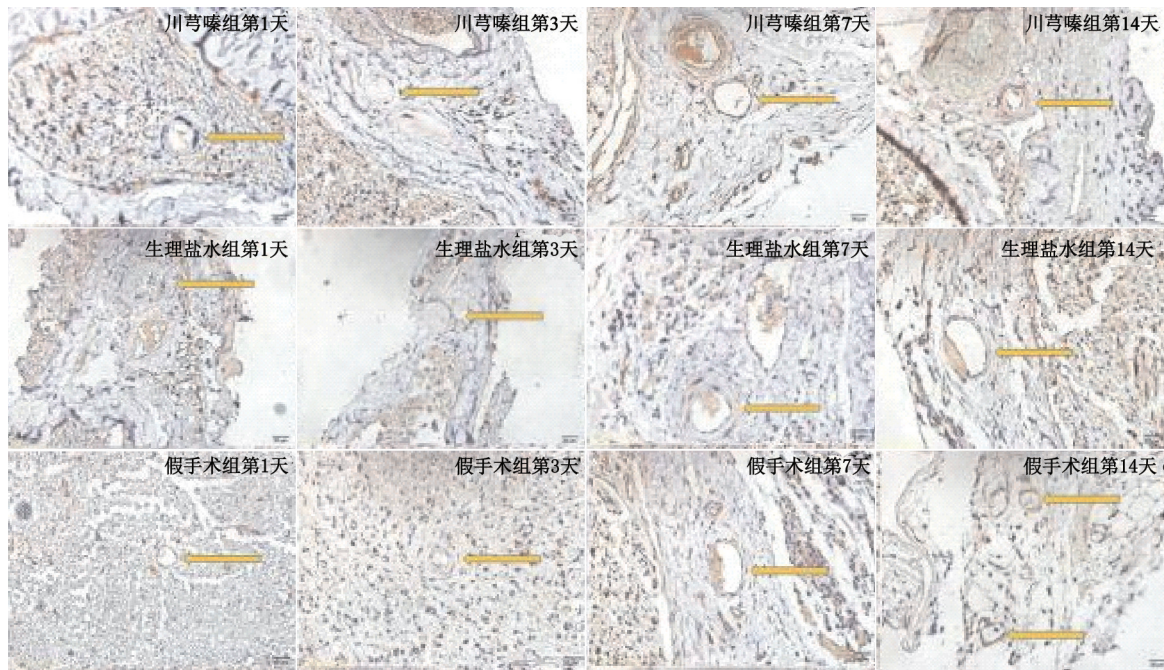


图 4 血管基膜层连蛋白表达结果(×400)

尚不明确。目前对于川芎嗪治疗脊髓损伤的研究成果中,发现损伤段及邻近段脊髓的新生血管数目和血管容积分数在川芎嗪治疗组显著增加^[19-20]。由此推测,在川芎嗪治疗坐骨神经损伤的过程中,促进血管再生可能是川芎嗪改善坐骨神经损伤后微循环障碍的重要途径。

本实验结果表明川芎嗪干预组部分神经元轴突、雪旺细胞不规则排列,细胞水肿、破裂较多,但随着干预时间推移,炎性细胞浸润减少,胶质细胞增生,轴突、雪旺细胞逐渐恢复规整。Ⅳ型胶原和层连

蛋白由血管内皮细胞分泌,作为在哺乳动物中基膜的主要组成部分,广泛分布于全身各组织,起到结构连接的作用^[21]。坐骨神经损伤后神经发生微循环障碍、神经内缺血缺氧、血-神经屏障(Blood-Nerve Barrier,BNB)被破坏,引起神经水肿,其神经元轴突、髓鞘均会发生一系列改变^[22]。神经缺血、水肿会使成纤维细胞浸润,合成分泌增加的Ⅳ型胶原和层连蛋白形成新的基膜成分,使受损部位与神经其他部位分隔开,减少炎性细胞浸润,新的血管壁基膜成分可以恢复血-神经屏障功能^[23],坐骨神经损伤第 1 天

后Ⅳ型胶原、层连蛋白表达较假手术组均明显增强,表达分布于血管内皮细胞、基膜、胶质细胞,而假手术组的表达主要位于血管周围。川芎嗪组Ⅳ型胶原、层连蛋白阳性表达在14 d内均高于生理盐水组,由此推论川芎嗪可能通过调节神经血管内皮Ⅳ型胶原、层连蛋白的表达,促进血管生成,改善微循环,从而治疗坐骨神经损伤。

目前川芎嗪调节胶原成分细胞机制尚不明确,对Ⅳ型胶原、层连蛋白后期的影响作用,以及对损伤后Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原的影响及其机制,仍然需要在将来的研究中继续明确,以期进一步探究川芎嗪对外周神经损伤治疗的机制。

综上所述,川芎嗪可使坐骨神经微血管基膜成分对Ⅳ型胶原、层连蛋白的表达增高,通过促进血管生成,改善微循环,实现坐骨神经修复,扭转继发性损害进程,是改善大鼠坐骨神经损伤的机制之一。

参考文献

- [1] 刘娜,冯阳阳,唐洲平.脂肪干细胞移植治疗坐骨神经损伤的研究进展[J].神经损伤与功能重建,2020,15(6):347-348.
- [2] CHU X L, SONG X Z, LI Q, et al. Basic mechanisms of peripheral nerve injury and treatment via electrical stimulation[J]. Neural Regen Res, 2022, 17(10): 2185-2193.
- [3] THATTE M R, HIREMATH A, GOKLANI M S, et al. Peripheral nerve injury to the lower limb: repair and secondary reconstruction[J]. Indian J Plast Surg, 2019, 52(1): 93-99.
- [4] 王泽穆,宋清清,周波,等.鼠神经生长因子治疗大鼠坐骨神经损伤的疗效[J].江苏医药,2019,45(12):1193-1196.
- [5] 林耀发,宗海洋,胡显腾,等.大鼠坐骨神经损伤后Spastin表达变化的实验研究[J].中国修复重建外科杂志,2017,31(1):80-84.
- [6] 黄懿璐,杨晓楠,祁佐良.周围神经损伤修复中血运重建的研究进展[J].中华整形外科杂志,2021,37(8):934-939.
- [7] SAFA B, SHORES J T, INGARI J V, et al. Recovery of motor function after mixed and motor nerve repair with processed nerve allograft[J]. Plastic and Reconstructive Surgery, 2019, 7(3): e2163.
- [8] LIAO I C, WAN H, QI S, et al. Preclinical evaluations of acellular biological conduits for peripheral nerve regeneration[J]. Journal of Tissue Engineering, 2013, 4: 20417-31413481036.
- [9] BUCHAIM R L, ANDREO J C, BARRAVIERA B, et al. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on peripheral nerve regeneration using fibrin glue derived from snake venom[J]. Injury, 2015, 46(4): 655-660.
- [10] 李伯翰,郭伟伟,谢潇,等.低能量激光技术对周围神经再生的机制和特点[J].中华老年口腔医学杂志,2017,15(5):310-313.
- [11] 张晗,徐义明,白跃宏.周围神经损伤后物理治疗及进展[J].中国康复,2011,26(5):376-379.
- [12] KAVLAK E, BELGE F, ÜNSAL C, et al. Effects of pulsed electromagnetic field and swimming exercise on rats with experimental sciatic nerve injury[J]. Journal of Physical Therapy Science, 2014, 26(9): 1355-1361.
- [13] PABARI A, YANG S Y, SEIFALIAN A M, et al. Modern surgical management of peripheral nerve gap[J]. Journal of Plastic, Reconstructive Aesthetic Surgery, 2010, 63(12): 1941-1948.
- [14] ALLUIN O, WITTMANN C, MARQUESTE T, et al. Functional recovery after peripheral nerve injury and implantation of a collagen guide[J]. Biomaterials, 2009, 30(3): 363-373.
- [15] LAUDER A, LEVERSEDGE F J. Long segment, mixed sensorimotor nerve reconstruction with allograft: a case report of high radial nerve injury[J]. J Bone & Joint Surg, 2020, 10(1): 0207.
- [16] ZHANG L, NI Y, LI Y, et al. Ligustrazine facilitates hair cell regeneration in the cochlea following gentamicin ototoxicity[J]. Neural Regeneration Research, 2010, 5(10): 735-740.
- [17] 孙斯琪,李琳,储利胜,等.川芎嗪预处理骨髓间充质干细胞移植对脑缺血大鼠神经细胞凋亡的影响[J].中华中医药杂志,2017,32(3):380-383.
- [18] 梁日欣,关天增,廖福龙,等.川芎嗪预处理对心肌缺血再灌注所致血管内皮细胞损伤的保护作用[J].微循环学杂志,2002(4):4-5.
- [19] 吴杨鹏,杨晓慧,劳克诚,等.携川芎嗪超分子导电水凝胶表征分析及对脊髓损伤大鼠的修复作用[J].中国组织工程研究,2024,28(10):1505-1511.
- [20] 李姝君,漆国栋,漆伟,等.川芎嗪对脊髓损伤后小鼠神经保护作用的实验研究[J].中国中药杂志,2023,48(14):3848-3854.
- [21] WILSON J R, FORGIONEN, FEHLINGS M G. Emerging therapies for acute traumatic spinal cord injury[J]. Canadian Medical Association Journal, 2013, 185(6): 485-492.
- [22] 刘恒,曹瑞治.纤维蛋白凝胶携载血管内皮生长因子修复大鼠坐骨神经损伤的组织学观察[J].山西医药杂志,2014,43(15):1778-1781.
- [23] ZHANG P X, HAN N, KOU Y H, et al. Tissue engineering for the repair of peripheral nerve injury[J]. Neural Regen Res, 2019, 14(1): 51-58.

(收稿日期:2023-09-11)