

坐骨神经创伤性华勒氏变性中雪旺细胞凋亡初步研究

陈哲¹, 陈海啸¹, 陈正形², 陈汉松³, 周涛³, 卢洪胜³

(1. 浙江省台州医院骨科, 浙江 台州 317000; 2. 浙江大学医学院附属第二医院骨科; 3. 浙江省台州医院病理科)

摘要 目的:探讨成年大鼠坐骨神经创伤性华勒氏变性中雪旺细胞凋亡的存在及其时相性变化规律。方法:利用成年雌性 SD 大鼠坐骨神经横断复制华勒氏变性模型。将 74 只 SD 大鼠随机分为 12 组。1 个正常组(8 只)、11 个实验组(66 只)。每只实验组大鼠双后肢再随机分为试验肢(构成试验组)和对照肢(构成对照组)。分别于术后 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 2 d, 3 d, 4 d, 8 d, 14 d, 21 d, 30 d 共 11 个时间点, 切取坐骨神经中下段标本。检测各组神经纤维形态学改变, 雪旺细胞 S-100 蛋白和凋亡基因相关产物 Bcl-2、Fas、Bax 表达水平变化, 并用 TUNEL 法检测雪旺细胞凋亡指数。结果: 试验组雪旺细胞数量术后 24 h 开始明显减少, 术后 8 d 才开始重新增多。S-100 蛋白表达对照组变化无统计意义($P > 0.05$), 试验组则在术后 1 h, 21 d 两个时间点变化有统计意义($P < 0.05$)。雪旺细胞凋亡抑制基因产物 Bcl-2 表达, 正常组双侧肢变化无差异($P > 0.05$), 而对照组术后 6 h 明显升高, 术后 24 h, 4 d, 21 d 轻度增高($P < 0.01$), 试验组术后 6 h, 24 h, 8 d, 14 d, 30 d 进行性升高($P < 0.01$)。雪旺细胞凋亡促进基因产物 Bax 表达, 正常组双侧肢比较无差异($P > 0.05$), 而对照组术后 6 h, 3 ~ 21 d 持续高表达($P < 0.01$), 试验组 14 d 开始进行性上升($P < 0.01$)。雪旺细胞凋亡促进基因产物 Fas 表达, 正常组双侧肢比较无差异($P > 0.05$), 对照组仅轻度增高($P > 0.05$), 而试验组术后 12 h 开始进行性升高($P < 0.01$)。TUNEL 法凋亡试剂盒原位检测显示正常组雪旺细胞凋亡发生率极低, 双侧肢比较无差异($P > 0.05$); 试验组分别在术后 6 h, 24 h, 2 d, 21 d 出现大量雪旺细胞凋亡阳性核($P < 0.01$), 高峰出现在华勒氏变性早期。结论:成年大鼠坐骨神经横断后, 远侧段创伤性华勒氏变性早期存在雪旺细胞凋亡高峰。并且雪旺细胞凋亡的发生, 及凋亡相关促进基因 Bax、Fas 和抑制基因 Bcl-2 的表达均具有特定的时相性变化特点。

关键词 周围神经; 华勒氏变性; 雪旺细胞; 细胞凋亡

Preliminary investigation on Schwann cell apoptosis in Wallerian-degenerated sciatic nerve of rat CHEN Zhe, CHEN Hai-xiao, CHEN Zheng-xing, CHEN Han-song, ZHOU Tao, LU Hong-sheng. Department of Orthopaedics, Taizhou Hospital of Zhejiang Province (Zhejiang Taizhou, 317000, China)

Abstract Objective: To investigate existence and regularity of changes of Schwann cell apoptosis in Wallerian degenerated sciatic nerve of rat, and evaluate its time-related feature. **Methods:** 45 SD rats were divided randomly into one normal group (8 rats) and eleven experimental groups (66 rats). Both hind-legs of each rat in experimental groups were randomly divided into test leg (with sciatic nerve transection) and control leg (uninjured nerve). All test legs constituted a test group and all control legs constituted a control group. After operation, all rats were respectively sacrificed at 1 h, 6 h, 12 h, 2 d, 3 d, 4 d, 8 d, 14 d, 21 d and 30 d. The specimens of mid distal sciatic nerve, especially the morphological changes of the nerve, the different expression levels of S-100 protein and apoptosis related proteins such as Bcl-2, Bax, and Fas in Schwann cell were analyzed. The TUNEL method was used to detect apoptotic index of Schwann cell rate. **Results:** The test group showed Wallerian degeneration. The number of Schwann cell began to decrease at 24 h, surprisingly be rare at day 3 and 4, then began to increase from day 8 and formed Bungner belt after 14 days. Schwann cell gener-

基金项目:本课题为浙江省卫生厅立项课题(2003B169)

通讯作者:陈哲 Tel:0576-5229796 E-mail:cz6851@sina.com

ally expressed S-100 at low level in all groups. The control group was not significantly different from the normal group; There was statistical significance in the test group at 1 h and day 21. Bcl-2 positive rates of the control group and the test group apparently elevated and were significantly different from the normal group. The control group and the test group expressed Bax at high level and were significantly different from the normal group. Fas positive rate of the control group was slightly elevated, but without statistical significance compared with the normal group; Fas positive rate of the test group continuously elevated in fluctuant way, with highly statistical significance compared with the normal group. There was rarely existed Schwann cell apoptosis in the normal group, and no statistical significance of the left legs compared with the right legs; The test group showed lots of apoptotic nuclei at 6 h, 2 d, 4 d and 21 d. There was highly statistical significance of cell apoptosis compared with the normal group. **Conclusion:** Schwann cells are existed in Wallerian degeneration of rat sciatic nerve after transection, with time-related feature.

Key words Peripheral nerve; Wallerian degeneration; Schwann cell; Apoptosis

本研究利用 SD 大鼠坐骨神经横断复制华勒氏变性模型, 比较正常组、试验组(坐骨神经横断)、对照组(对侧未损伤坐骨神经)中雪旺细胞 S-100 蛋白、凋亡抑制基因产物 Bcl-2、凋亡促进基因产物 Fas 和 Bax 表达水平变化及 TUNEL 法检测凋亡细胞阳性率, 探讨华勒氏变性中雪旺细胞凋亡现象的存在及其变化特点。

1 材料与方

1.1 动物分组 成年雌性 SD 大鼠 74 只, 体重 170~250 g, 随机分为 12 组。1 个正常组(8 只), 11 个实验组(每组 6 只共 66 只)。实验组中每只大鼠的双后肢再随机分为“试验肢”和“对照肢”。所有的“试验肢”构成试验组, 所有的“对照肢”构成对照组。

1.2 取材及切片制备 2%利多卡因针剂 50 mg/kg 腹腔麻醉。四肢伸展俯卧位固定。无菌条件下, 取后肢外侧纵行切口, 显露坐骨神经。正常组, 初次手术即切取双侧神经标本。“对照肢”显露神经后, 即闭合切口。“试验肢”显露神经后, 距梨状肌下孔 0.7 cm 处, 略作游离, 显微剪一次性剪断坐骨神经, 任其断端自由回缩分开, 然后闭合切口。麻醉清醒后, 送回动物房。动物室温饲养, 自由饮食、活动。术后数日内注意创口情况。必要时用碘酒、酒精局部滴洗。若发生创口感染、裂开, 退出实验。分别于术后 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 2 d, 3 d, 4 d, 8 d, 14 d, 21 d, 30 d 共 11 个时相点, 取回相应各组大鼠, 同样腹腔麻醉, 无菌操作, 原切口打开。分别切取坐骨神经上段(长约 0.5 cm)、中段(长约 0.5 cm)、中下段(长约 1.0~1.5 cm)标本。各标本切取后, 迅速投入 10%中性福尔马林溶液。本次研究仅分析坐骨神经中下段标本, 其余标本制成石蜡块保存。每个标本随机取连续切片多张, 片厚 5 μ m。分别行 HE 染色、免疫组化及 TUNEL 标记。

1.3 免疫组化染色 采用美国 ZYMED 公司生产的 SP-9001 试剂盒: 一抗分别为兔抗 S-100 蛋白多克隆抗体、鼠抗人 Bax 蛋白单克隆抗体、鼠抗人 Bcl-2 蛋白单克隆抗体、兔抗 Fas 蛋白多克隆抗体。主要步骤如下: 切片脱蜡至水; 3%过氧化氢孵育 10 min; 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min; 滴加试剂 1(封闭用正常血清工作液), 室温孵育 10 min; 滴加适当稀释的一抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h; PBS 冲洗后滴加试剂 2(生物素标记羊抗兔 IgG), 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min; PBS 冲洗后滴加试剂 3(辣根酶标记链霉卵白素工作液), 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min; PBS 冲洗后 DAB 显

色。冲洗, 苏木素复染, 封片。作阴性对照片: 即不加一抗, 改滴加缓冲液, 其它步骤相同。

1.4 TUNEL 标记 采用美国 ZYMED 公司生产的试剂盒(In situ cell death detection kit, POD)。主要步骤如下: 石蜡切片脱蜡至水; 胰蛋白酶 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; PBS 冲洗后滴加 50 μ l TUNEL 反应混合溶液, 均匀分布后加盖玻片, 湿盒中 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min; PBS 冲洗后滴加 50 μ l 转化剂 POD, 加盖玻片, 湿盒中 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; PBS 冲洗后, 滴加 60 μ l DAB 底物溶液, 室温孵育 10 min, PBS 冲洗后苏木素复染, 中性树脂封片。染片中设置阳性对照和阴性对照, 进行质量控制。阳性对照: 经固定、通透的切片中加链球菌核酸酶以产生 DNA 链缺口; 阴性对照: 经固定、通透的切片中加 50 μ l 试剂 2 以代替 TUNEL 反应混合物。

1.5 细胞计数 用 Olympus BX50 型光学显微镜, 结合 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统进行观察, 每张切片观察 3 个高倍视野($\times 400$), 每视野数 100 个雪旺细胞, 计数反应阳性细胞百分率及细胞凋亡指数(凋亡细胞数/100 个细胞)。上述各切片阳性反应颜色均为棕黄色, 均表达在细胞浆中。

1.6 数据统计 计量资料用均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm s$)表示, 两组之间采用 t 或 t' 检验, 多组之间在方差齐性的基础上先采用单因素方差分析(One Way ANOVA t test), 后采用 Dunnett t test 进行两两比较, 得出各 P 值, 取 $P=0.05$ 为显著性水平。

2 结果

2.1 HE 结合 S-100 观察

2.1.1 形态学变化 正常神经纤维连续、排列整齐而紧密, 略呈波浪状。轴突明显, 连续穿过郎飞氏结。髓鞘因染片过程中脱脂, 呈网状(见图 1)。神经干横断后, 试验组发生华勒氏变性, 对照组也出现轻度变化: 术后 1 h: 试验组神经纤维部分轻度肿胀, 少数轴突不能着色, 束膜血管内出现大批巨噬细胞附壁、游出, 试验组与对照组雪旺 S-100 阳性率均急剧上升; 术后 6 h: 试验组神经纤维肿胀进一步明显, 部分髓鞘呈同质状, 不显色轴突增多, 两组束膜中均开始出现多量巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞, 雪旺细胞 S-100 阳性率急剧下降; 术后 12 h: 试验组神经纤维肿胀加剧, 略扭曲, 排列疏松, 对照组神经纤维开始轻度肿胀, 部分轴突不显色; 术后 24 h:

试验组雪旺细胞核开始明显减少(见图 2); 术后 2 d:试验组基底膜腔肿胀、扭曲呈串珠状,束膜内巨噬细胞 S-100 强阳性,两组雪旺细胞 S-100 阳性率均低; 术后 3 d:试验组结间体明显肿胀,呈腊肠样,髓鞘解体、碎裂广泛,基底膜腔内充满大块球状的 S-100 阳性碎屑,仍有极少量轴突残存,神经束内细胞核明显减少,雪旺细胞 S-100 阳性率较低。对照组雪旺细胞 S-100 阳性明显增多; 术后 4 d:试验组基底膜腔进一步泡状改变,腔内有多量 S-100 阳性碎屑,雪旺细胞核稀少,仅少数呈 S-100 阳性(见图 3); 术后 8 d:试验组基底膜腔内仍残留中等量 S-100 阳性碎屑,轴突完全消失,雪旺细胞核明显增多,但极少呈 S-100 阳性(见图 4),对照组神经纤维恢复

正常,束膜内仍有 S-100 强阳性巨噬细胞出现; 术后 14 d:试验组基底膜腔内尚有少量碎屑(多为 S-100 阴性),雪旺细胞核大量增多,形成 Bungner 带(见图 5),束膜中成纤维细胞带状增多,炎症细胞浸润明显减少,对照组神经外形正常; 术后 21 d、30 d:试验组基底膜腔内极少有碎屑物质,先为雪旺细胞或巨噬细胞占据,后细胞消失,腔内空虚,部分开始塌陷(见图 6),仍有部分巨噬细胞从血管游出,雪旺细胞 S-100 阳性率第 21 d 达最高,个别区域有新生轴突出现(见图 7),束膜内小血管增多,有淋巴细胞浸润,对照组神经外形正常,S-100 表达较正常组略增高。

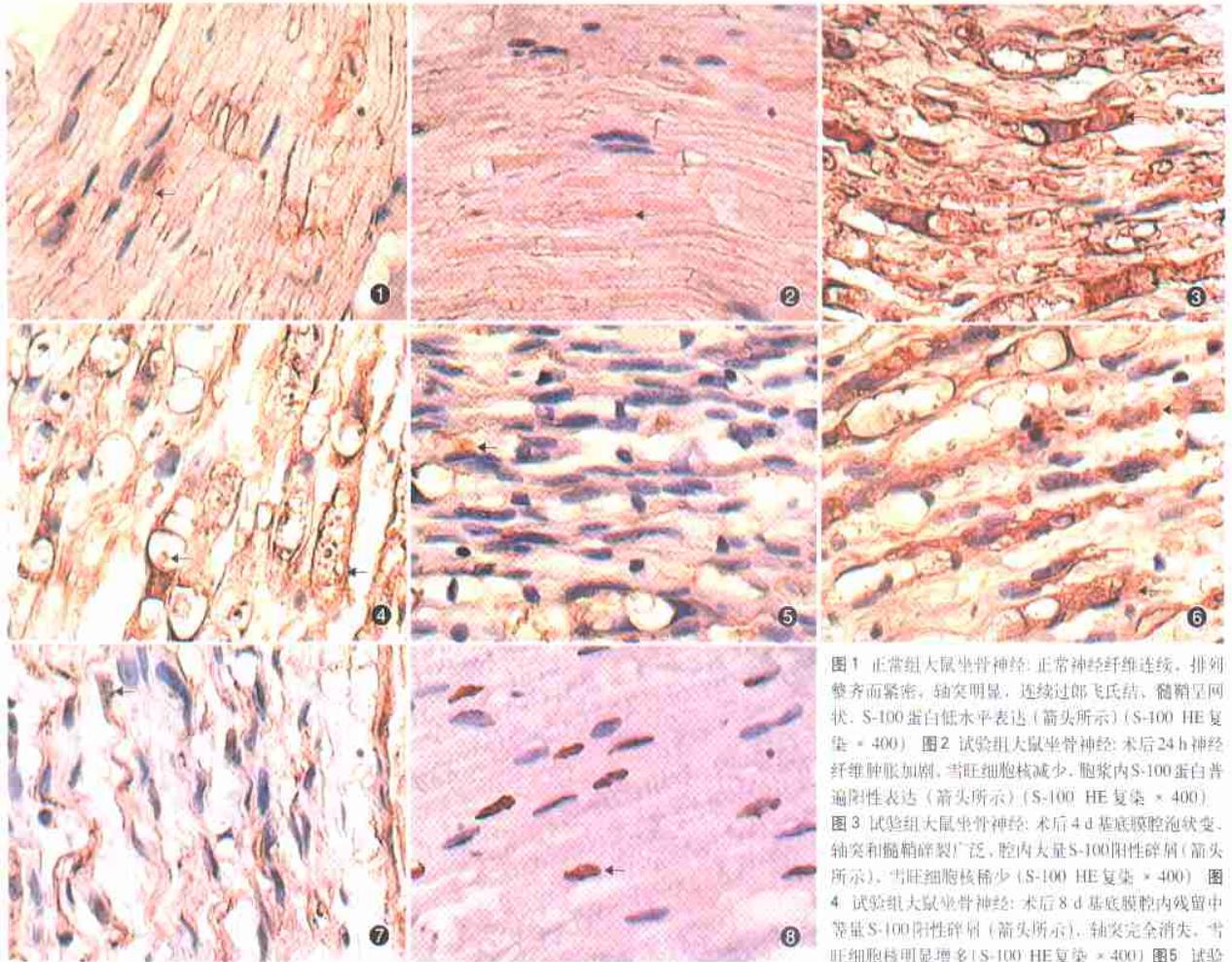


图 1 正常组大鼠坐骨神经:正常神经纤维连续,排列整齐而紧密,轴突明显,连续过郎飞氏结,髓鞘呈网状。S-100 蛋白低水平表达(箭头所示)(S-100 HE 复染 × 400) 图 2 试验组大鼠坐骨神经:术后 24 h 神经纤维肿胀加剧,雪旺细胞核减少,胞浆内 S-100 蛋白普遍阳性表达(箭头所示)(S-100 HE 复染 × 400) 图 3 试验组大鼠坐骨神经:术后 4 d 基底膜腔泡状变,轴突和髓鞘碎裂广泛,腔内大量 S-100 阳性碎屑(箭头所示),雪旺细胞核稀少(S-100 HE 复染 × 400) 图 4 试验组大鼠坐骨神经:术后 8 d 基底膜腔内残留中等量 S-100 阳性碎屑(箭头所示),轴突完全消失,雪旺细胞核明显增多(S-100 HE 复染 × 400) 图 5 试验

组大鼠坐骨神经:术后 14 d 基底膜腔内残留少量碎屑(箭头所示),雪旺细胞大量增多,形成 Bungner 带(S-100 HE 复染 × 400) 图 6 试验组大鼠坐骨神经:术后 21 d 基底膜腔内空虚,部分开始塌陷,雪旺细胞条索状排列,S-100 普遍阳性(箭头所示)(S-100 HE 复染 × 400) 图 7 试验组大鼠坐骨神经:示术后 30 d 局部有新生轴突出现(箭头所示)(S-100 HE 复染 × 400) 图 8 试验组大鼠坐骨神经:术后 6 h 神经内大量雪旺细胞呈凋亡阳性(箭头所示)(TUNEL HE 复染 × 400)

Fig1 Sciatic nerve of SD rat in normal group: Normal nerve fiber is continuous, in good order and inseparable. Neurite successively pass through Ranvier node. Myelin is reticular. The S-100 protein is expressed at low level (S-100 HE × 400) **Fig2** Sciatic nerve of SD rat in test group: At 24 h the nerve fiber swelled further, and Schwann cell nuclei began to decrease (S-100 HE × 400) **Fig3** Sciatic nerve of SD rat in test group: At 4 d the ground membrane lumen inflated like bubbles, and had lots of S-100 positive fragment in it. Schwann cell nuclei were rare (S-100 HE × 400) **Fig4** Sciatic nerve of SD rat in test group: At 8 d there still had moderate S-100 positive fragment in the lumen. Neurite vanished completely. Schwann cell nuclei began to increase obviously (S-100 HE × 400) **Fig5** Sciatic nerve of SD rat in test group: At 14 d there still had a little S-100 negative fragment in the lumen. Schwann cell nuclei massively increased and formed Bungner belt (S-100 HE × 400) **Fig6** Sciatic nerve of SD rat in test group: At 21 d the lumen were empty and part of it began to collapse. Schwann cells arranged in line, being S-100 positive generally (S-100 HE × 400) **Fig7** Sciatic nerve of SD rat in test group: At 30 d some neurites regenerated (S-100 HE × 400) **Fig8** Sciatic nerve of SD rat in test group: At 6 h there were plenty of apoptosis positive Schwann cell nuclei (TUNEL HE × 400)

2.1.2 雪旺细胞 S-100 阳性率 正常成年大鼠坐骨神经中雪旺细胞 S-100 阳性率仅 30%，双侧肢体比较无统计学差异 ($P=0.155$)。对照组一直以 30% 为基线上下波动，与正常组相比无统计学意义 ($F=1.437, P=0.177$)。试验组术后 1 h 一过性升高，术后 6 h 开始明显下降，持续到术后 4 d 才开始回升，第 21 d 达高峰，约 25%，随后逐步降低，与正常组作 ANOVA 比较无统计学意义 ($F=1.617, P=0.112$)，术后 1 h 组 ($t=2.657, P=0.021$) 和术后 21 d 组 ($t=3.353, P=0.008$) 单独与正常组作 t 检测，有统计学差异。

2.2 凋亡基因相关产物

2.2.1 雪旺细胞 Bcl-2 阳性率 正常成年大鼠坐骨神经中雪旺细胞 Bcl-2 呈低水平表达，双侧肢体比较无统计差异 ($P=0.457$)。对照组术后 1 h 无明显反应，术后 6 h 急剧上升形成高峰，术后 12 h 又急剧下降达最低点，此后分别在术后 24 h、4 d、21 d 三个时相点反复轻度增高，与正常组相比有显著性差异 ($F=3.263, P=0.001$)，尤其术后 6 h ($P=0.024$)。试验组在华勒氏变性早期仅轻度增高，变化波型与对照组基本一致，术后 1 h 无明显反应，而在术后 6 h、24 h 两个时相点上分别形成小高峰，在华勒氏变性中、晚期则持续高表达，整体曲线分别在术后 6 h、24 h、8 d、14 d、30 d 共五个时相点上波浪式进行性升高，与正常组相比有显著性差异 ($F=3.631, P=0.000$)，尤其术后 8 d 组 ($P=0.005$)、术后 14 d 组 ($P=0.014$) 和术后 30 d 组 ($P=0.014$)。

2.2.2 雪旺细胞 Bax 阳性率 正常成年大鼠坐骨神经中雪旺细胞 Bax 呈低水平表达，双侧肢体比较无统计差异 ($P=0.867$)。对照组变化明显，术后 6 h 急剧上升，术后 12 h 则急剧下降，然后重新逐渐增高，从术后 3 d 到 21 d 持续高水平表达，术后 30 d 才明显回落，与正常组相比有统计学显著性差异 ($F=3.110, P=0.002$)，尤其术后 8 d 组 ($P=0.001$) 和术后 21 d 组 ($P=0.013$)。试验组在华勒氏变性早、中期仅轻度增高，直到术后 14 d 才开始进行性上升，术后 30 d 达最高峰，与正常组相比有统计学显著性意义 ($F=2.916, P=0.003$)，尤其术后 30 d 组 ($P=0.001$)。

2.2.3 雪旺细胞 Fas 阳性率 正常成年大鼠坐骨神经内雪旺细胞 Fas 表达极低，阳性率 < 10%，双侧肢体比较无统计差异 ($P=0.598$)。对照组分别在术后 24 h、3 d、8 d、21 d 四个时相点上轻度增高，但与正常组相比无统计学意义 ($F=1.091, P=0.385$)。试验组从术后 12 h 开始波浪式进行性增高，在华勒氏变性中、晚期呈高水平表达，与正常组比较有统计学显著性差异 ($F=5.158, P=0.000$)，尤其术后 14 d 组 ($P=0.000$) 和术后 30 d 组 ($P=0.000$)。

2.3 雪旺细胞凋亡指数 (TUNEL 标记) 正常成年大鼠坐骨神经中雪旺细胞凋亡发生率极低，双侧肢体比较无统计差异 ($P>0.05$)。试验组分别在术后 6 h、24 h、2 d、4 d 和 21 d 五个时相点上出现大量凋亡细胞核，高峰出现在华勒氏变性早期 (见图 8)，与正常组比较有统计学显著性差异 ($F=4.988, P=0.000$)，尤其术后 6 h 组 ($P=0.007$) 和术后 4 d 组 ($P=0.000$)。

3 讨论

本研究结果在以下方面取得一定进展：(1) 证实了成年大鼠坐骨神经横断后，远侧段华勒氏变性中，确实存在雪旺细胞凋亡现象，并初步揭示了其时相性变化特点：HE 染色片结合 S-100 染色片进行形态学分析发现，术后 2~4 d 内局部雪旺细胞核数量明显减少，术后 8 d 才明显增多，14~21 d 达到高峰，形成 Bungner 带。凋亡基因相关产物检测显示，华勒氏变性早期，凋亡促进基因 (Bax 和 Fas) 和凋亡抑制基因 (Bcl-2) 反应几乎同步，均于术后 6 h、24 h 和 3 d 形成小高峰。提示这三个时相点上有雪旺细胞凋亡高峰期存在。华勒氏变性中、晚期，这两组基因均相拮抗性、进行性表达增高，但基本上以凋亡抑制基因表达为主。提示此阶段以雪旺细胞增殖为主，也存在部分雪旺细胞凋亡。TUNEL 检测验证了上述推测。我们注意到，正常成年大鼠坐骨神经中确实极少有雪旺细胞凋亡。神经横断后，远侧段神经内分别于 6 h、24 h、2 d、4 d、21 d 时出现大量雪旺细胞凋亡核。高峰出现在华勒氏变性早期。总之，成年大鼠坐骨神经横断后，远侧段创伤性华勒氏变性早期存在雪旺细胞凋亡高峰。并且雪旺细胞凋亡的发生及凋亡相关促进基因 Bax、Fas 和抑制基因 Bcl-2 的表达均具有特定的时相性变化特点。从而为我们进一步了解和掌握周围神经创伤与修复过程中雪旺细胞的变化规律，为提高周围神经损伤的临床治疗效果提供了理论依据。(2) 发现成年大鼠坐骨神经高位横断后，对侧未损伤坐骨神经内雪旺细胞的凋亡基因活跃表达。对照组雪旺细胞在术后 3 周内，凋亡基因表达明显活跃。尤其在术后 6 h、24 h、3 d、8 d、21 d 五个时相点，凋亡抑制基因 (Bcl-2) 与凋亡促进基因 (Bax 和 Fas) 几乎同步高峰表达。术后 6 h 以内以凋亡抑制基因表达为主，4 d 后则凋亡促进基因表达占优势。究其原因，可能为：本研究采用的是大鼠坐骨神经干中上 1/3 处横断，属周围神经高位损伤范畴，势必诱发脊髓运动神经元和背根神经节感觉神经元大量凋亡^[1]，通过突触传导，同时影响、刺激脊髓对侧的运动和感觉神经元。后者通过轴浆逆行运输系统，将信号传给对照组雪旺细胞；对照组雪旺细胞在创伤极早期大量分泌凋亡抑制基因产物 Bcl-2 蛋白，通过轴浆逆行运输系统到达相应的神经元胞体，防止神经元死亡，维持其存活；对照组雪旺细胞高水平表达凋亡促进基因产物 Bax 和 Fas 蛋白，通过自分泌和旁分泌作用，促进自身新陈代谢，加速清理病损、衰老细胞，提高对环境的适应能力和生存能力。此点可以解释为什么在华勒氏变性早、中期，对照组神经束膜中出现大量炎症细胞、巨噬细胞浸润。Stoll 等^[2]认为退变的雪旺细胞产生一种巨噬细胞趋化因子，诱导血源性巨噬细胞向局部趋化集聚。

参考文献

- Ekstrom PA. Neurons and glial cells of the mouse sciatic nerve undergo apoptosis after injury in vivo and in vitro. Neuroreport, 1995, 6(7): 1029-1032.
- Stoll G, Griffin JW, Li CY, et al. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: Participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degeneration. J Neurocytol, 1989, 18: 671-683.

(收稿日期: 2003-09-18 本文编辑: 房世源)