

补阳还五汤促进大鼠腓总神经再生的实验研究

梅晓云^{1*}, 周岚¹, 吴灏昕¹, 孙华林², 谢辉¹, 赵宗波²

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046; 2. 南通大学江苏省神经再生重点实验室, 江苏 南通 226001)

[摘要] 目的: 研究补阳还五汤(BYHWD)促进大鼠夹伤腓总神经再生的作用。方法: 雄性 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 随机分为 6 组: BYHWD 高、中、低剂量组(剂量分别为 25.92, 12.96, 6.48 g 生药/kg)、弥可保组(剂量为 625 μg/kg)、模型组、假手术组。采用大鼠腓总神经 5 mm 夹伤模型后, 每日 ig 给药。术后 18 d 行电生理检测, 测定复合肌动作电位; 组织形态学分析, 测定再生有髓神经纤维数、髓鞘厚度, 观察 BYHWD 对大鼠夹伤腓总神经的再生作用。结果: 与模型组比, BYHWD 高、中剂量组复合肌动作电位波幅、再生有髓神经纤维计数、髓鞘厚度均显著增高, 有显著性差异。结论: BYHWD 有利于轴突生长和髓鞘形成, 可以促进大鼠夹伤神经再生。

[关键词] 周围神经再生; 补阳还五汤; 腓总神经; 复合肌动作电位; 组织形态学

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0114-04

The Experimental Study on Regeneration of Rat Common Peroneal Nerve Promoted by Buyang Huanwu Decoction

MEI Xiao-yun^{1*}, ZHOU Lan¹, WU Hao-xin¹, SUN Hua-lin², XIE Hui¹, ZHAO Zong-bo²

(1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Key Laboratory of Neuroregeneration, Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] Objective: To study the repairing effects of Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) on rat common peroneal nerve after peripheral nerve injury. **Method:** Common peroneal nerve injury induced by clamp was established for sixty Sprague-Dawley rats, then they were randomly divided into 6 groups for daily intragastric administration of drugs: BYHWD high-dose (25.92 g/kg), BYHWD medium-dose (12.96 g/kg), BYHWD low-dose (6.48 g/kg), mecobalamin (625 μg/kg) as the positive control, normal saline for model group and normal saline for the sham operation group. The drug administration lasted for 18 days. Electrophysiology was performed 18 days after operation to determine the compound muscle action potentials (CMAPs). The number of regenerated myelinated nerve fibers, thickness of myelin sheath and cross sectional area of tibial muscle were evaluated by histomorphology. **Result:** Amplitude of CMAP, the number of regenerated myelinated nerve fibers and thickness of myelin sheath in BYHWD high-dose and medium-dose group were all increased significantly compared with the model group. **Conclusion:** BYHWD contributes to axon growth and myelination reformation, thus promotes peripheral nerve regeneration in rats.

[Key words] peripheral nerve regeneration; Buyang Huanwu Decoction; common peroneal nerve; the compound muscle action potentials; histomorphology

[收稿日期] 2010-01-06(008)

[基金项目] 国家自然科学基金(30873228)

[通讯作者] * 梅晓云, Tel: (025) 85811575; E-mail:

xiaoyun663399@163.com

周围神经损伤后再生是一个涉及多因素的复杂过程。在显微外科技术如此发达的今天, 尽管人们已经尽可能地恢复神经的连续性, 但神经再生的质量和速度以及靶器官功能的恢复仍不令人满意。如何从不同角度促进神经再生, 提高神经损伤后的治

疗效果,仍然是众多医者孜孜探索的重点。药物治疗是周围神经重建连续性后临床治疗的重要手段。中药及其提取物来源广泛,价格低廉,临床应用历史悠久,作用机制多靶点,有着不可轻视的作用。中药复方补阳还五汤促进周围神经损伤修复的文献报导也日益增多^[1-2]。在此,我们采用大鼠腓总神经夹伤模型,分别从复合肌动作电位、再生有髓神经纤维数量、髓鞘厚度方面,进一步评价其对神经损伤的修复作用,以期为临床治疗周围神经损伤提供一定的依据。

1 材料与方

1.1 动物及分组 本实验选用清洁级雄性 SD 大鼠 60 只,体重 200 g 左右,由南通大学实验动物中心提供,生产合格证编号 SCXK(苏)2008-0010;饲养合格证编号 SYXK(苏)2007-0021。动物随机分为 6 组:补阳还五汤高剂量组(25.92 g 生药/kg);补阳还五汤中剂量组(12.96 g 生药/kg);补阳还五汤低剂量组(6.48 g 生药/kg);弥可保组(阳性对照组,625 μg/kg)、模型组(生理盐水组);假手术组。全部动物均经适应性喂养 1 周以上无异常后开始正式实验。

1.2 仪器 荧光正置显微镜:德国 LEICA 公司;REPORTER 肌电图仪:意大利 ESAOTE BIOMEDICA 公司;JEMS-100 透射电镜:日本 JEOL 公司;RM2145 切片机:德国 LEICA 公司。

1.3 药品

1.3.1 补阳还五汤浸膏制备 补阳还五汤由黄芪 120 g,当归 6 g,芍药 6 g,地龙 3 g,川芎 3 g,红花 3 g,桃仁 3 g 组成。煎煮、提取、浓缩,使生药浓度为 4 g 生药/g 浸膏,浸膏比重为 3.64 g/mL,此后放入 4℃ 冰箱中保存备用。由南京中医药大学药学院制剂室制备。

1.3.2 弥可保液配制 甲钴胺片(弥可保),500 μg/片,卫材(中国)药业有限公司制造(批号 H20030812)。溶解于双蒸水中,配制成混悬液,浓度为 62.5 μg/mL。锡纸包装,避光放置,现用现配。

1.4 大鼠腓总神经夹伤模型制备 动物称重,以复合麻醉剂麻醉,消毒备皮。取左股后正中作 1.5 cm 切口,游离并充分暴露坐骨神经股部;向下行腓总神经钳夹术,以 14 cm 止血钳,上全齿钳夹腓总神经 3 次,10 s/次,每次间隔 10 s;挤压损伤的宽度为 5 mm;损伤远端以 9-0 无损伤缝合线作一标记,逐层

缝合手术切口。全部模型由同一人,同手法操作。保持损伤程度的均一性。造模后第 2 天开始 ig 给药,18 d 后取材。

1.5 复合肌动作电位的检测 术后 18 d,麻醉状态下分离大鼠腓总神经,按 Suzuki^[3]的方法使用 REPORTER 肌电图仪记录复合肌动作电位(compound muscle action potentials, CMAPs)。方法如下:将记录电极刺入胫前肌肌腹中点处,干扰电极置于膝部皮肤,依次将刺激电极置于腓总神经夹伤段近、远侧,刺激腓总神经,分两通道记录 CMAPs,测量 CMAP 振幅。

1.6 形态学观察和计量分析 经电生理学方法检测之后,每组随机取 3 只大鼠用 1% 多聚甲醛和 1.25% 戊二醛混合液灌注,取夹伤远端 3 mm 处腓总神经 1 mm,戊二醛-锇酸双重固定,半薄切片定位甲苯胺蓝染色,光镜下观察。采用 Leica QWin 分析软件,计数有髓神经纤维数;超薄切片在透射电镜下观察,每个标本随机取 10 个视野(5 000 倍),采用 Leica QWin 分析软件测量髓鞘厚度。

其余大鼠均用 4% 多聚甲醛灌注,取夹伤远端 3 mm 处腓总神经 5 mm,同时假手术组在相应部位取同样长度的腓总神经作为正常对照。经后固定、脱水、切片(厚 10 μm),采用改良的神经三色染色法^[4]染色,光镜下观察各组再生神经的组织形态学变化。

1.7 统计学处理 所有指标采用 SPSS 15.0 统计软件进行单因素方差分析。结果以($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 BYHWD 对夹伤腓总神经 CMAP 振幅的影响

术后 18 d 动物灌注取材之前,所有动物在麻醉下暴露腓总神经进行电生理学检测。与假手术组相比,模型组、BYHWD 组、弥可保组大鼠术侧腓总神经近、远侧端 CMAP 波幅均明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,BYHWD 高、中剂量组和弥可保组 CMAP 波幅显著增高($P < 0.01$)。低、中、高 BYHWD 剂量组 CMAP 波幅存在明显的量效关系,而 BYHWD 高剂量组和弥可保组间无显著性差异($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 BYHWD 对再生神经有髓神经纤维计数、髓鞘厚度的影响

术后 18 d,假手术组腓总神经横切面神经三色染显示有髓神经纤维密集且排列规则整齐,胶原纤维少;而在手术侧,各组大鼠腓总神经夹伤远端横切面中可见大量增生的施万细胞和血管,

其中 BYHWD 3 个剂量组和弥可保组再生神经中有较多的有髓神经纤维,髓鞘形态较为规则,神经纤维多集结成大小不等的束状,分布比较均匀;而模型组有髓神经纤维明显减少,着色不均,神经纤维之间的结缔组织增生明显,组织结构相对紊乱。

表 1 BYHWD 对损伤神经 CMAP 波幅的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	复合肌动作电位 /mV	
		近侧端	远侧端
模型	—	1.59 ± 0.45	1.71 ± 0.33
BYHWD	6.48	2.19 ± 0.37	2.26 ± 0.30
BYHWD	12.96	2.95 ± 0.43 ¹⁾	3.13 ± 0.24 ¹⁾
BYHWD	25.92	4.94 ± 0.53 ¹⁾	5.24 ± 0.68 ¹⁾
弥可保	6.25 × 10 ⁻⁴	4.49 ± 0.87 ¹⁾	4.86 ± 0.64 ¹⁾
假手术	—	8.63 ± 0.73 ¹⁾	9.22 ± 0.66 ¹⁾

注:与模型组比较,¹⁾ $P < 0.01$

正常腓总神经有髓神经纤维成熟,髓鞘厚,排列致密。BYHWD 组和弥可保组腓总神经夹伤远端再生神经组织中可见较成熟的、排列较致密的有髓纤维,髓鞘较厚;模型组腓总神经夹伤远端再生的有髓神经纤维排列稀疏紊乱,髓鞘较薄,板层结构紊乱,成熟度欠佳,见图 1。

与假手术组相比,模型组、BYHWD 组、弥可保组大鼠术侧腓总神经夹伤远端再生有髓神经纤维计数、髓鞘厚度均明显降低 ($P < 0.01$);与模型组比较, BYHWD 高、中剂量组和弥可保组再生有髓神经纤维计数、髓鞘厚度显著增高 ($P < 0.01$);且低、中、高剂量 BYHWD 组有髓神经纤维计数、髓鞘厚度存在明显的量效关系,而 BYHWD 高剂量组和弥可保组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。见表 2。

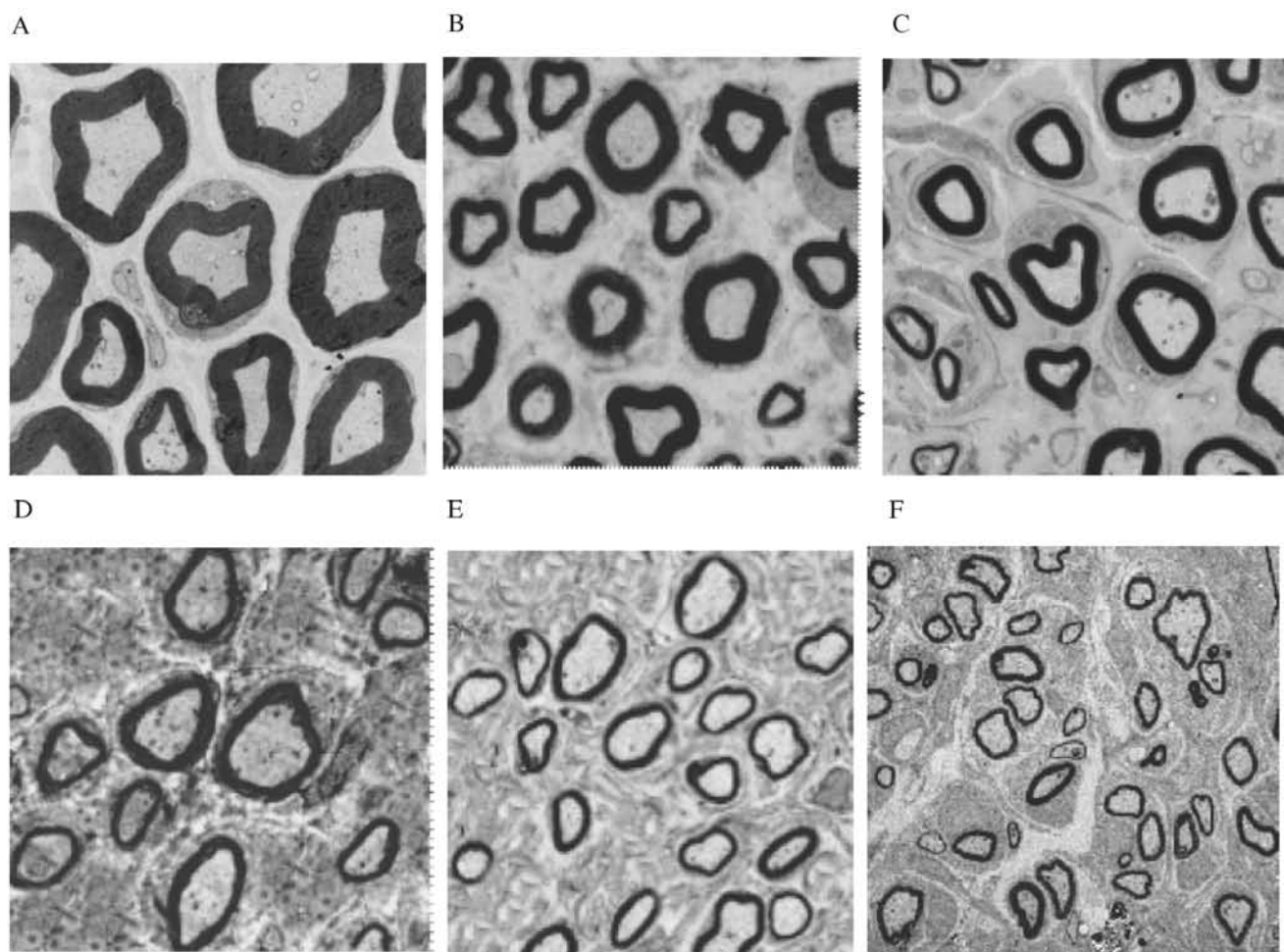


图 1 术后 18 d 腓总神经夹伤远端再生神经横切(标尺示 5 μm) A. 假手术组; B. BYHWD 高剂量组; C. 弥可保组; D. BYHWD 中剂量组; E. BYHWD 低剂量组; F. 模型组

表 2 BYHWD 对夹伤腓总神经远端再生有髓神经纤维计数及髓鞘厚度的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	再生有髓神经	髓鞘厚度
		纤维计数 / 个	/ μm
模型	—	1 015 ± 75	0.53 ± 0.06
BYHWD	6.48	1 122 ± 130	0.61 ± 0.07
BYHWD	12.96	1 285 ± 127 ¹⁾	0.68 ± 0.08 ¹⁾
BYHWD	25.92	1 413 ± 82 ¹⁾	0.81 ± 0.07 ¹⁾
弥可保	6.25 × 10 ⁻⁴	1 321 ± 91 ¹⁾	0.77 ± 0.08 ¹⁾
假手术	—	2 036 ± 126 ¹⁾	1.72 ± 0.08 ¹⁾

注:与模型组比较,¹⁾ $P < 0.01$

3 讨论

补阳还五汤对神经再生的作用:本研究采用大鼠腓总神经夹伤模型,通过神经电生理检测、形态学观察与计数分析,观察 BYHWD 对周围神经损伤修复的促进作用。电生理学方法测定的是神经肌肉复合动作电位,而动作电位的振幅与支配靶肌的神经纤维数量有关。在神经再生的进展过程中,动作电位振幅随着再生神经纤维数量的增多而增高,反之,再生神经纤维数量少或再生神经纤维弥散于束

间结缔组织中, 振幅就低^[5]。周围神经损伤后, 损伤处再生轴突的数量与厚度能直接反映神经再生的修复程度^[6]。因此, 本研究直接测定 CMAP 振幅, 计数再生轴突数量与测量再生髓鞘厚度来评价神经修复情况。实验结果表明: BYHUD 能显著提高复合肌动作电位的波幅, 增加再生有髓神经纤维数量和髓鞘厚度, 促进轴突生长和髓鞘再生。综上所述, BYHUD 具有显著的促进损伤神经再生和神经功能恢复的作用。

补阳还五汤促进神经再生的机理探讨: 补阳还五汤由清代名医王清任所创, 始见于《医林改错》, 由黄芪、赤芍、当归、地龙、川芎、桃仁和红花组成, 临床广泛用于坐骨神经痛、多发性神经炎、糖尿病周围神经病变以及冠心病、脑卒中等病症, 疗效显著。近年来多次报道^[1-2] 其在促进损伤神经再生修复方面, 也有独特的效果。

周围神经损伤后, 肢体出现功能障碍, 肌肉萎缩, 感觉消失, 相当于中医的经络损伤, 属于传统医学中的“痿证”范畴^[7]。神经损伤后首先局部出现气滞血瘀, 经络气血循行障碍; 继而由于无法保证损伤局部正常的营养供应, 导致局部组织失去濡养。因此, 周围神经损伤的病机为气血亏虚, 血脉瘀滞。治疗上采用益气活血法, 以补求通, 疏通经脉, 通利气血, 逐步恢复损伤神经的再通。

补阳还五汤治疗周围神经损伤, 符合《素问·痿论篇》提出的“治痿独取阳明”的基本治则。方中重用生黄芪, 大补脾胃之元气, 令气旺血行, 瘀去络通; 配伍当归养血, 气血双补, 起到营养神经的作用。另外, 方中辅以川芎、赤芍、桃仁、红花以活血行气, 同时当归也善于活血, 具有化瘀而不伤血之妙。再佐以地龙通经活络, 促进经络气血的流通。本方的配伍特点是大量补气药与少量活血药相配, 使气旺则血行, 活血而不伤正, 共奏补气活血通络之效, 因而能促进损伤局部血液循环, 改善神经营养, 促进周围神经轴突再生和神经传导功能恢复。现代研究也表明^[8-10] 补阳还五汤能改善血液流变性, 抑制血小

板聚集, 减少微血栓发生, 促进毛细血管的生长, 改善损伤处神经的微循环, 促进氧和能量代谢, 使神经组织得到较多的血液和氧气, 补阳还五汤促进周围神经损伤后的再生, 体现了中医药多靶点、多途径的疗效优势。关于其作用的机理, 我们还将进一步研究。

[参考文献]

- [1] 徐绍东. 补阳还五汤药浴对大鼠周围神经损伤再生影响的实验研究[J]. 福建中医学院学报, 2008, 18(4): 40.
- [2] 石杜鹃, 凌丽, 薛金伟. 补阳还五汤药浴对大鼠周围神经损伤再生影响的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(5): 1066.
- [3] Suzuki Y, Tanihara M, Ohnishi K, Suzuki K, Endo K, Nishimura Y. Cat peripheral nerve regeneration across 50 mm gap repaired with a novel nerve guide composed of freeze-dried alginate gel. *Neurosci Lett*, 1999, 259(2): 75.
- [4] 王晓东, 顾晓松, 张沛云, 等. 三色染色法和免疫细胞化学法显示培养的神经轴索和雪旺细胞[J]. 神经解剖学杂志, 2000, 16(3): 231.
- [5] 卢祖能主编. 实用肌电图学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 205.
- [6] 何振辉, 姚珍松, 劳镇国, 等. 补气通络方对大鼠坐骨神经轴突再生的影响[J]. 中国骨伤, 2002, 15(8): 468.
- [7] 王衍全. 中医筋伤学[M]. 人民军医出版社, 2006: 210.
- [8] 朱传武, 彭康, 佟丽, 等. 补阳还五汤对中风后遗症气虚血瘀大鼠病证模型血常规及血液流变性的影响[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(4): 706.
- [9] 卢永康, 彭康, 朱传武, 等. 补阳还五汤对中风后遗症“气虚血瘀”大鼠模型能量代谢的影响[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(11): 2280.
- [10] 张继平, 李长龄, 张玉萍, 等. 补阳还五汤对血小板活化因子诱导的家血小板聚集的影响[J]. 中国中医药科技, 2003, 7(1): 16.