

大鼠失神经支配后外源性 NGF 对骨质疏松的影响

戴寿荣 高润

【摘要】 目的 观察失神经支配后外源性 NGF(神经生长因子)对大鼠体重、血钙及骨结构的影响,进而说明 NGF 在神经源性骨质疏松康复中的意义。方法 雄性 SD 大鼠随机分为对照组和失神经组,失神经组大鼠切断股骨神经造成失神经支配模型,然后分为失神经支配组和失神经支配注射 NGF 组,30 d 后称重、取血、处死动物取股骨进行骨组织计量学检查。结果 失神经支配大鼠注射 NGF 后,体重、骨小梁量与未注射组相比具有明显增加,提示局部予以 NGF 治疗可明显减轻失神经支配后大鼠骨质疏松的程度,并可增加因失神经导致的体重减轻,而各组的血钙磷浓度无明显改变。结论 说明神经性骨质疏松的发生并非源自钙磷流失,而是由骨小梁的结构改变所致,同时外源性 NGF 在神经性瘫痪后骨质疏松的康复中具有积极意义。

【关键词】 失神经支配;骨小梁;NGF;骨质疏松

Effect of nerve growth factor on osteoporosis in denervated rats DAI Shourong and GAO Run. Naval Medical Research Institute, Shanghai 200433, China

【Abstract】 Objective To study the effect of nerve growth factor(NGF) on body weight, blood calcium level and bone histomorphometry in denervated rats, thereby providing a therapeutic method for recovery of neuropathic paralysis. **Methods** SD male rats were divided into control group and denervated group, The denervated group underwent neurotomy on bilateral sciatic nerves and then randomly divided into denervated control group and NGF injection group. The body weight and blood calcium level were measured and the bone morphometry was done by dual energy absorptiometry after the NGF injection group was injected with NGF for 30 days. **Results** At the end of the experiments, the weight and the microstructure of bone trabeculae in denervated control group were changed significantly, whereas those in the NGF injection group were significantly increased. **Conclusions** The neuropathic osteoporosis results from changes in microstructure of bone, not from decrease in calcium. NGF therapy can prevent the osteoporosis, indicating that NGF therapy is very important for recovery of neuropathic paralysis.

【Key words】 Denervation; Bone morphometry; Nerve growth factor; Osteoporosis

神经性疾病所致瘫痪后骨质疏松的发生率较高,目前尚无治疗和预防神经性所致瘫痪后发生骨质疏松的有效方法。研究神经性瘫痪的治疗和预防有助于预防骨质疏松的发生,从而有效降低骨折的发生率。

大鼠的神经分布及其支配肌群与人近似,建立大鼠失神经支配模型能较好地反映出人类在神经性瘫痪后的病理过程。近年来国内外有关大鼠失神经支配对骨组织学改变的研究主要集中探讨失神经支配后因废用性肌肉萎缩引起骨代谢变化的机制^[1]。

本研究通过对大鼠失神经支配后,早期给予外源性 NGF,观察失神经支配大鼠的体重、血钙及骨小梁形态计量的变化,以说明 NGF 对大鼠失神经模型骨质疏松发生的影响。

材料和方法

1. 材料

10 w 龄 SD 雄性大鼠 24 只,体重 220 ~ 250 g(上海必凯实验动物有限公司提供);NGF 注射液 2 U/ml(第二军医大学神经生物学教研室提供);德国 Leica 2155 型硬组织切片机;Norland XR-36 型骨密度测量仪;不脱钙计算机图象处理分析系统(上海第九人民医院骨科提供);MMC(甲基丙烯酸甲脂、化学纯),

DBP(邻苯二甲酸二丁脂、分析纯), BPO(过氧化苯甲酰、化学纯), 实验其它所用试剂均为市售分析纯。

2. 方法

(1) 动物手术及给药: 大鼠随机分为3组, 正常组、失神经支配组和失神经支配 NGF 注射组。将失神经支配组和失神经支配 NGF 注射组大鼠以3%戊巴比妥钠麻醉, 4肢固定, 无菌条件下先于俯卧位行两侧后肢股外侧切口, 于股骨粗隆水平切断坐骨神经, 缝合切口; 再置大鼠于仰卧位, 正中纵切口, 于腹骨韧带水平切断大鼠两侧股神经, 缝合切口。正常组进行同法操作, 但不切断神经。失神经支配 NGF 注射组大鼠于两侧腓肠肌处分别注射 NGF 0.2 ml, 每d 1次, 失神经支配组注射等量生理盐水, 正常组自由活动, 30d后取材。

(2) 大鼠称重后处死, 取血, 离心取上清, 使用日立 7170 全自动生化分析仪测血钙浓度。

(3) 取材与包埋: 取左侧胫腓骨, 去除肌肉及肌腱, 取胫骨近端 1/3, 以生理盐水洗净后, 置于 50%、70%、95%、100% 乙醇各浸泡 24 h 脱水。取脱水骨置于二甲苯中透明 2~4 h 后, 按如下方法进行骨不脱钙包埋: ① 常温下浸入 MMC + DBP (75% + 25%

Vol) 液中, 浸透 3~5 d。② 常温下浸入 MMC + DBP (75% + 25% Vol) 100 ml + BPO 2.5 g 液中, 浸透 5~7 d。③ 恒温箱中 (33~35 °C) 浸入 MMC + DBP (75% + 25% Vol) 100 ml + BPO 2.5 g 液中, 浸透 15~20 d。

(4) 不脱钙骨切片及骨形态学检测: 将上述包埋块在进行砂轮修整后, 使用硬组织切片机切厚 3 μm 切片用作组织形态学测量。切片用不脱钙计算机图象分析系统计算骨小梁密度、骨小梁平均连接点数、游离末端数等。

结 果

1. 大鼠失神经支配及给予 NGF 后体重、血钙磷的变化: 失神经支配后主要表现为肌肉废用性萎缩, 从而引起骨质疏松。本实验可见, 大鼠失神经支配后失神经肢肌肉明显萎缩, 且体重明显减轻; 而经 NGF 处理后大鼠的肌肉萎缩有不同程度的减轻, 体重减轻不明显。血钙浓度是骨钙流失的重要指标, 本实验结果表明, 失神经支配并未造成骨钙的流失, 见表 1。

2. 大鼠失神经支配及给予 NGF 后骨小梁组织形态计量的变化, 骨小梁组织形态计量结果见表 2。

表 1 大鼠失神经支配及给予 NGF 后体重、血钙磷的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数(只)	剂量(U/kg)	实验前体重(g)	实验后体重(g)	血钙(mg/dl)	血磷(mg/dl)
正常对照组	8	—	245 ± 25	350 ± 25	11.06 ± 1.2	5.64 ± 0.41
失神经支配	8	—	240 ± 23	270 ± 25	10.75 ± 0.9	6.05 ± 0.63
失神经支配后 NGF 注射组	8	1.6	255 ± 22	310 ± 22*	10.96 ± 0.8	5.34 ± 0.56

注: 与失神经支配组相比 * P < 0.05

表 2 NGF 大鼠失神经支配后骨小梁组织形态计量变化的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数(只)	剂量(U/kg)	骨小梁连接点数(个/mm ²)	游离末端数(个/mm ²)	骨小梁体积密度(Vv(%))	骨小梁平均宽度 MTH(nm)
正常对照组	8	—	14.28 ± 2.7	12.88 ± 3.0	44.8 ± 7.68	46.4 ± 3.6
失神经支配组	8	—	2.17 ± 0.81	18.97 ± 2.45	24.3 ± 8.26	19.3 ± 3.7
失神经支配后 NGF 注射组	8	1.6	6.79 ± 1.53**	16.5 ± 11.54**	28.3 ± 11.3**	22.4 ± 2.6*

注: 与失神经支配组比较 * P < 0.05, ** P < 0.01

由表 2 可以看出, 大鼠失神经支配后局部注射 NGF 对骨小梁平均宽度影响显著, 与失神经支配组比较 P < 0.05, 对骨小梁体积密度、骨小梁连接点数、游离末端数影响非常显著, 与失神经支配组比较 P < 0.01。

讨 论

骨的形成和成长与肌肉和神经有着密切关系, 一般认为骨力学强度约 80% 由骨量决定, 但近年的研究表明, 骨量降低时, 并不一定发生骨折, 相反有些骨量正常或骨密度极高的的疾病, 如石骨症, 却有骨折发生。因而认为, 骨量不能完全反映出骨强度;

骨强度除了与骨量有关外,还与骨内部结构有关。对松质骨而言,骨小梁构筑方式的改变,将更能说明骨强度的质变。Hahn^[2]认为,松质骨的稳定性不仅取决于其骨量的高低,还取决于其三维构筑以及骨小梁间的连接性,对骨小梁连接点和游离末端数测量更能说明骨小梁结构的稳定性。本实验结果亦表明,大鼠失神经支配后,血液钙磷浓度并无明显改变,而反映骨结构的骨小梁形态却有明显的改变,此结果与以上论述相符。

NGF作为一个经典的靶源性神经营养因子,其主要功能是维持交感与感觉神经元的存活与发育,同时对促进神经递质的合成也具有重要作用^[4]。NGF影响骨代谢的研究尚不足10年,有关这方面的研究较少。目前已被证实成骨细胞存在NGF的低亲和力受体(LNGFR),内源性和外源性NGF可与LNGFR结合,达到细胞间信息传递的作用,从而使成骨细胞发生磷酸化,成骨能力增强;另外,NGF在骨组织中对1,25(OH)₂D₃摄取起调节作用。体外研究表明,当成骨细胞培养基中加入1,25(OH)₂D₃可使骨细胞表达NGF^[5],反之NGF可能调节骨组织对1,25(OH)₂D₃的摄取,促进成骨,减轻骨质疏松。王子明等^[6]的实验表明,大鼠注射NGF后都可引起神经功能的改变,无论局部还是全身用药,只要能够达到损伤部位,就有一定的治疗作用。

本实验研究表明,大鼠失神经支配后体重增长慢,失神经肢肌肉严重萎缩,骨小梁连接点数显著下

降,游离末端数显著增加,说明失神经后肌肉营养不足,导致骨营养下降;骨小梁结构稳定性差,小梁排列不符合力学要求,其结果必然导致骨结构强度的明显下降。而局部给以NGF治疗后,肌肉萎缩程度明显减轻,大鼠的骨小梁平均宽度、体积密度、连接点数均较失神经支配组大鼠有明显增加,游离末端数也明显下降(见表1),说明NGF治疗能明显改善失神经支配所致的骨结构的改变,减少骨量的丢失。这可能与NGF的神经营养作用和神经调节作用有关,对神经性瘫痪病人预防骨质疏松的发生具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 徐建广,顾玉东. 缺血对失神经支配骨骼肌萎缩影响的研究. 中华手外科杂志,1999,15(3):175-177.
- 2 Hahn M, Vogel M, Pompesius-kempa M. Trabecular bone pattern factor: a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. Bone, 1992,13(4):327-330.
- 3 Zeng QQ, Jee WS, Bigornia AE et al. Time responses of cancellus and cortical bones to sciatic neurectomy in growing female rats. Bone, 1996,19(1):13-21.
- 4 Sinson G, Voddi M, McIntosh TK et al. Combine fetal neural transplantation and nerve growth factor infusion effects on neurological outcome following fluid percussion brain injury in the rat. J Neurosurg, 1996,84(4):655-662.
- 5 姚建华. 神经生长因子对骨折愈合影响的研究进展. 中国矫形外科杂志,2000,7(10):996-998.
- 6 王子明,杨恒文,李芳,等. 神经生长因子对大鼠坐骨神经半切损伤后的作用观察. 第三军医大学学报,2000,22(22):42-48.

(收稿日期:2004-01-08)

(上接第422页)

细胞的活性和功能,这应是淫羊藿总黄酮抗骨质疏松作用的一个重要机制。

参 考 文 献

- 1 Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, et al. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. Am J Clin Nutr, 2000,72(3):679.
- 2 马慧萍,贾正平,谢景文,等. 淫羊藿总黄酮的提取分离工艺研究. 华西药理学杂志,2002,17(1):1-6.
- 3 马慧萍,贾正平,葛欣,等. 淫羊藿总黄酮抗大鼠实验性骨质疏松作用研究. 华西药理学杂志,2002,17(3):163-167.
- 4 马慧萍,贾正平,白孟海,等. 淫羊藿总黄酮对大鼠实验性骨质疏松生化学指标的影响. 中国药理学通报,2003,19(2):187-189.
- 5 陈克明,葛宝丰,刘兴炎,等. 大鼠骨髓基质细胞体外走向诱导成骨. 兰州大学学报,2000,39(1):69-73.
- 6 席越,王戈平,黄啸原,等主编. 骨组织病理解剖学技术. 北京:人民卫生出版社,1997:60.

- 7 Cheng SL, Yang JW, Rifas L, et al. Differentiation of human marrow osteogenic stromal cells in vitro: Induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. Endocrinology, 1994,134:277-285.
- 8 Yamamoto N, Furuya K, Handa K. Progressive development of the osteoblast phenotype during differentiation of osteoprogenitor cells derived from fetal rat calvaria: model for *in vitro* bone formation. Biol. Pharm. Bull, 2002,25:509-515.
- 9 Jaiswal N, Hayneworth SE, Caplan AI, et al. Osteogenic differentiation of purified culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. J Cellular Biochem, 1998,295-312.
- 10 宋纯理,党更町. 髓腔内脂肪细胞与骨质疏松. 中国骨质疏松杂志,2002;8(3):266-269.
- 11 Erben RG, Scutt AM, Miao D, et al. Short-term treatment of rats with high dose, 25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates bone formation and increases the number of Osteoblast precursor cells in bone marrow. Endocrinology, 1997,138:4629-4635.
- 12 马涛,崔燎,吴铁,等. 老年大鼠含淫羊藿血清对成骨细胞的增殖与分化的影响. 中国骨质疏松杂志,2002;8(1):55-60.

(收稿日期:2004-01-10)