

夏天无对坐骨神经损伤小鼠损伤区微环境的影响

钱长晖， 郑雪花[#]， 何才姑， 江 澍， 黄玉梅， 朱燕珍， 严晓丹
(福建中医药大学中西医结合学院, 福建 福州 350008)

摘要：目的 研究夏天无 *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. 对坐骨神经损伤小鼠损伤区微环境的影响。**方法** 30 只小鼠随机均分为模型组、夏天无组、假手术组，Masson 染色检测损伤区胶原纤维、炎性细胞、神经纤维分布，免疫荧光染色检测层黏连蛋白 (LN)、施万细胞标记物 S-100、小 G 蛋白 Rac1 表达及轴突再生情况，HE 染色检测神经功能恢复情况。**结果** 与模型组比较，夏天无组胶原纤维、炎性细胞减少，神经纤维有序，LN、Rac1、S-100 表达，再生轴突数量，腓肠肌纤维横截面积和腓肠肌质量显著增加 ($P < 0.05$)。**结论** 夏天无可通过减少胶原纤维生成和炎症细胞浸润，增加 LN、Rac1、S-100 表达，改善坐骨神经损伤小鼠损伤区微环境来促进轴突再生和神经功能恢复。

关键词：夏天无；坐骨神经损伤；损伤区；微环境

中图分类号：R285.5 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2018)08-1687-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.08.004

Effects of *Corydalis decumbens* on the microenvironment of area with sciatic nerve injury in mice

QIAN Chang-hui, ZHENG Xue-hua[#], HE Cai-gu, JIANG Shu, HUANG Yu-mei, ZHU Yan-zhen, YAN Xiao-dan
(College of Integrated Traditional and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350008, China)

ABSTRACT: AIM To study the effects of *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. on the microenvironment of area with sciatic nerve injury in mice. **METHODS** Thirty mice randomly and equally divided into model group, *C. decumbens* group and sham operation group and had the distributions of collagen fibers, inflammatory cells and nerve fibers in injured area detected by Masson staining, the expressions of laminin (LN), Schwann cell marker S-100, small G protein Rac1 and condition of axon regeneration detected by immunofluorescence staining, and the condition of nerve function recovery detected by HE staining. **RESULTS** Decreased collagen fibers and inflammatory cells, more ordered nerve fibers, more significantly increased expressions of LN, Rac1, S-100, the number of regenerating axons, gastrocnemius muscle fibers in cross section area, and weight of gastrocnemius muscle ($P < 0.05$) were observed in the *C. decumbens* group when in comparison to the model group. **CONCLUSION** *C. decumbens* can improve the microenvironment of area with sciatic nerve injury in mice by decreasing collagen fiber generation and inflammatory cell infiltration, increasing LN, Rac1, S-100 expressions, and promoting axon regeneration and nerve function recovery.

KEY WORDS: *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers.; sciatic nerve injury; injured area; microenvironment

夏天无 *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. 对神经损伤具有止痛、消肿等作用^[1]，目前相关研究主要关注其对脑缺血、脑梗死等中枢神经系统病变的治疗^[2-3]，但尚无周围神经损伤后其治疗机制的报道。大量研究认为，周围神经损伤后损伤区域微环境的改善是治疗关键，尽早进行结构重建、修

收稿日期：2018-02-11
作者简介：钱长晖（1976—），男，博士，讲师，从事中成药治疗周围神经损伤的基础性研究。Tel：(0591) 22861606，E-mail：chanqian168@163.com
[#]共同第一作者：郑雪花（1978—），女，实验师，从事中西医结合防治代谢综合症研究。Tel：(0591) 22861151，E-mail：xuehua233@tom.com

复能促进神经轴突再生及功能恢复^[46]，而夏天无能否通过改善坐骨神经损伤后的损伤区域微环境而发挥作用尚不明确。

课题组前期发现，夏天无注射液可促进坐骨神经损伤区的整合素 $\beta 1$ 蛋白水平表达^[7]。由于损伤区微环境复杂精细，不仅包括细胞外基质变化，如胶原纤维、层黏连蛋白（LN）含有量等，也包括与神经再生密切相关的施万细胞功能状态改变，这些因素都会影响轴突再生和神经功能恢复程度^[8-9]。本实验结合前期研究结果，制作 ICR 小鼠坐骨神经夹伤模型，检测损伤区域内胶原纤维、LN、施万细胞标记物 S-100，小 G 蛋白 Rac1 等表达，考察夏天无是否可改善损伤区的微环境，从而促进轴突再生和神经功能恢复。

1 材料

夏天无注射液（江西天施康中药股份有限公司，批号 14050902）。兔抗神经丝蛋白（NF）、兔抗 Rac1 多克隆抗体（英国 Abcam 公司）；兔抗 LN 多克隆抗体（美国 Sigma-Aldrich 公司）；小鼠抗 S-100 多克隆抗体（美国 Chemicon 公司）；防荧光淬灭剂（美国 Vector 公司）；Alexa488 荧光标记驴抗兔二抗、Alexa 568 荧光标记驴抗小鼠二抗（美国 Life Technologies 公司）。CM1900 恒温箱冰冻切片机、DMI 4000B 荧光显微镜（德国 Leica 公司）。清洁级 ICR 雌性小鼠 30 只，体质量 20 ~ 25 g，由福建中医药大学实验动物中心提供，动物许可证号 SCXK（闽）2012-0001。

2 方法

2.1 分组 小鼠行双侧坐骨神经夹伤手术后，随机分为夏天无组（10 只，腹腔注射夏天无注射液）和模型组（10 只，腹腔注射 0.9% 生理盐水），另设假手术组（10 只，腹腔注射 0.9% 生理盐水）。各组小鼠每 2 d 注射 1 次，每次 0.2 mL/只。

2.2 模型制备 小鼠腹腔注射 1% 三溴乙醇麻醉后，于股骨中段后外侧行斜切，沿股二头肌间隙钝性分离并暴露坐骨神经，以梨状肌下缘 3 mm 处为起点，显微血管夹分别夹持双侧坐骨神经 1 min，再依次缝合肌肉和皮肤以封闭切口，术后小鼠分笼单独饲养，供给充足食物和水，3 d 内每天注射青霉素 0.1 mL/次以防止伤口感染；假手术组小鼠双侧坐骨神经仅暴露，未作其他处理。各组小鼠均于术后第 15 天处死取材。

2.3 组织取材 小鼠腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉后，取仰卧位，开胸暴露心脏，先用 0.9% 生理盐

水灌注冲洗，再以 4% 多聚甲醛灌注固定，最后截取双侧坐骨神经（从夹伤区域近端 1 mm 取至远侧末端）和腓肠肌，于 4% 多聚甲醛中固定。腓肠肌去除结缔组织后称定质量，再截取短肌中段作石蜡切片，行横切，厚度为 4 μm ；坐骨神经用梯度蔗糖溶液沉降处理后作冰冻切片，行纵切，厚度为 10 μm 。各组织标本均衬贴于防脱载玻片上保存备用。

2.4 苏木精-伊红（HE）染色 取腓肠肌短肌中段标本，行 HE 染色以观察腓肠肌的肌纤维横截面积变化。标本经脱蜡后，通过苏木精染色 3 min，梯度乙醇脱水至 95% 乙醇，再浸入乙醇伊红中染色 1 min，无水乙醇脱水 3 min，二甲苯透明 1 min，中性树脂封片，镜检。

2.5 Masson 染色 取坐骨神经标本，依次经过苏木精染色 3 min，丽春红酸性品红染色 2 min，磷钼酸染色 2 min，苯胺蓝染色 2 min 后，乙醇梯度脱水，二甲苯透明 2 min，中性树脂封固，镜检。

2.6 免疫荧光染色 取坐骨神经切片，磷酸盐缓冲液冲洗后 1% Triton 破膜 1 h，5% 牛血清蛋白（BSA）封闭 0.5 h，分别加入 5% BSA 稀释的抗 LN、Rac1、S-100 或 NF 一抗孵育，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜，再加入相应二抗孵育 2 h，4，6-二脒基-2-苯基吡啶（DAPI）染核 2 min，防荧光淬灭剂封片，于荧光显微镜下观察并拍照。

2.7 指标检测

2.7.1 腓肠肌横截面积 每个标本拍摄 6 个视野，通过 Image Pro Plus 6.0 软件计算腓肠肌纤维面积，每个视野计数 30 个细胞，取平均值。

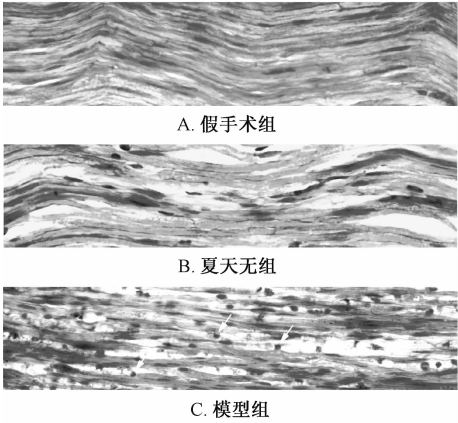
2.7.2 LN、S-100、Rac1 蛋白表达水平 每个标本以损伤区中点为中轴的 300 μm $\times$ 150 μm 作为测量区域，通过 Image Pro Plus 6.0 软件测量区域内单位面积（1 μm^2 ）LN、S-100、Rac1 光密度。

2.7.3 NF 蛋白表达水平 每组拍摄坐骨神经标本全长，通过 Image Pro Plus 6.0 软件分析坐骨神经内单位面积（1 μm^2 ）的 NF 光密度。

2.8 统计学分析 通过 Photoshop 7.0 软件处理图片，Image Pro Plus 6.0 软件分析荧光平均光密度，SPSS 20.0 软件处理数据。计量资料以（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Masson 染色 图 1 显示，假手术组的神经轴突密集，粗细均匀，呈有序排列，其周边的神经胶



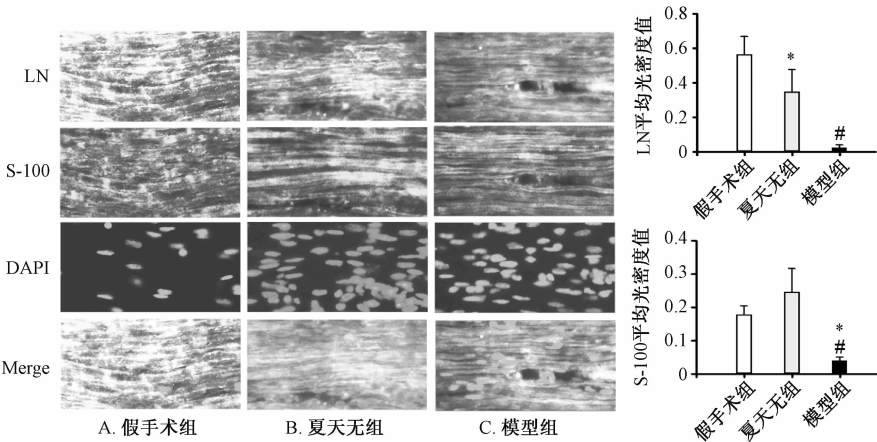
注：箭头指示处为炎性细胞

图 1 坐骨神经损伤区微环境变化 (×400)

Fig. 1 Microenvironment changes of injured sciatic nerve area (×400)

质细胞的细胞核呈椭圆形，紧贴神经纤维排列，胶原纤维成分较少；夏天无组损伤区域可见神经轴突排列稍紊乱，但其周边神经胶质细胞排列相对有序，纤维成分并不明显；模型组神经轴突较少、较细，大量胶原纤维成分分布于损伤区域，纤维之间可见大量圆形的炎性细胞浸润。

3.2 免疫荧光染色（LN、S-100 蛋白表达水平） 图2 显示，假手术组 LN 表达在神经轴突和施万细胞的周边区域，S-100 大多表达在施万细胞胞质和胞膜，在包绕轴突的髓鞘上呈节段有序排列；夏天无组 LN 阳性表达减少，但仍明显多于模型组，S-100 阳性表达也明显更强；夏天无组、模型组 LN、S-100 蛋白表达具有显著性差异 ($P < 0.05$)。



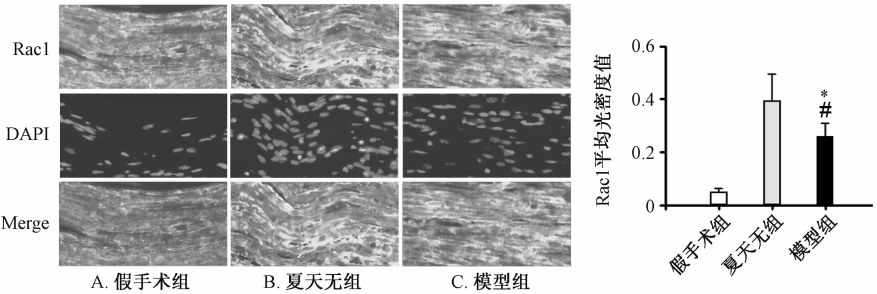
注：与假手术组比较，* $P < 0.05$ ；与夏天无组比较，# $P < 0.05$

图 2 坐骨神经损伤区 LN、S-100 表达 (×400)

Fig. 2 LN, S-100 expressions in injured sciatic nerve area (×400)

3.3 免疫荧光染色（Rac1 蛋白表达水平） 图 3 显示，假手术组 Rac1 蛋白阳性表达较弱，而在损伤后增强；夏天无组其阳性表达明显增加，主要分

布在施万细胞的胞质；模型组其阳性表达显著弱于夏天无组 ($P < 0.05$)。



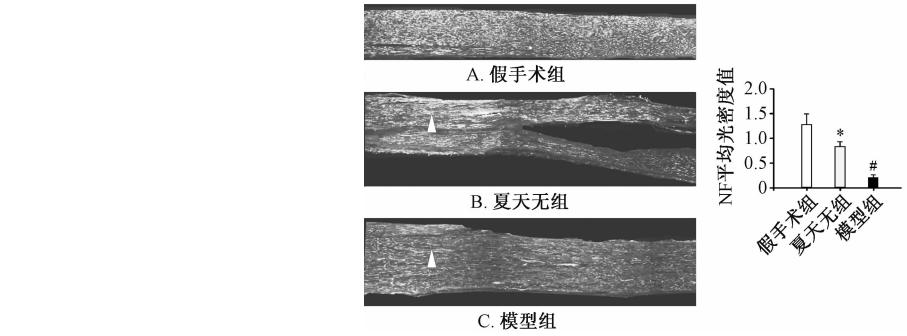
注：与假手术组比较，* $P < 0.05$ ；与夏天无组比较，# $P < 0.05$

图 3 坐骨神经损伤区 Rac1 表达 (×400)

Fig. 3 Rac1 expression in injured sciatic nerve area (×400)

3.4 免疫荧光染色（坐骨神经轴突再生） 图 4 显示，假手术组坐骨神经轴突直径均一、分布均匀，在神经损伤后轴突发生肿胀、溃变、消失等现象，继而近侧轴突末端生长，越过损伤区，进入远侧端，重新与靶器官构建联系。在术后第 15 天，

夏天无组、模型组都能观察到再生轴突越过损伤区，进入损伤远侧端，甚至抵达末端，并且前一组抵达损伤远侧末端的再生轴突密度更明显，提示夏天无具有良好的轴突再生作用；2 组间 NF 蛋白表达具有显著性差异（ $P<0.05$ ）。



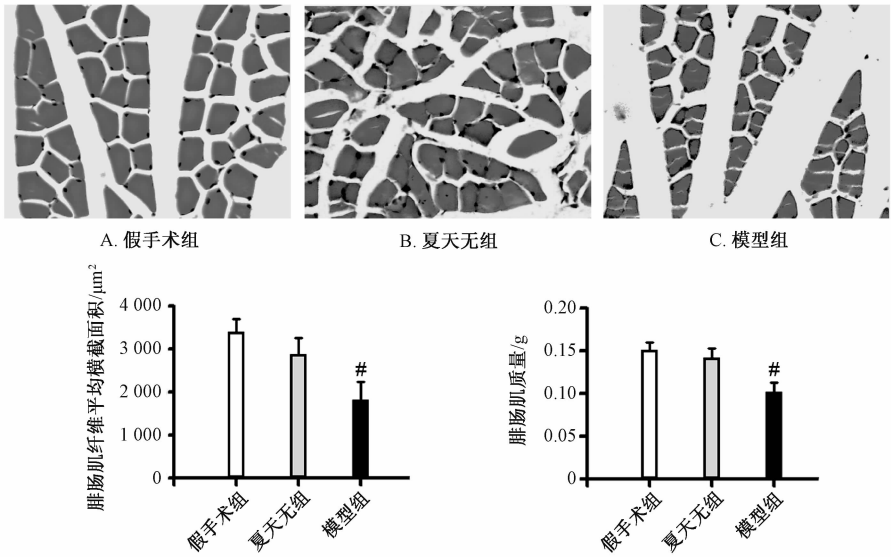
注：三角形指示处为损伤区。与假手术组比较，* $P<0.05$ ；与夏天无组比较，# $P<0.05$

图 4 坐骨神经轴突 NF 表达（ $\times 100$ ）

Fig. 4 NF expression in sciatic nerve axons（ $\times 100$ ）

3.5 HE 染色和肌肉质量量检测 图 5 显示，夏天无、假手术组腓肠肌纤维横截面积差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）；模型组、夏天无组腓肠肌纤维平均横截面积差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。同时，夏天无组腓肠肌质量增加，接近假手术组（ $P>$

0.05）；与模型组比较，两组质量差异均有统计学意义（ $P<0.05$ ），表明夏天无组靶器官（腓肠肌）可能因为重新获得更多的神经纤维支配，肌肉不再明显萎缩，组织结构逐渐恢复。



注：与夏天无组比较，# $P<0.05$

图 5 腓肠肌萎缩评价（ $\times 200$ ）

Fig. 5 Evaluation of gastrocnemius muscle atrophy（ $\times 200$ ）

4 讨论

夏天无注射液在临床上用于治疗神经损伤疾病，有着活血、通络、消除神经肿胀等功效，本实验将分析它在坐骨神经损伤治疗中是否能改善损伤区微环境，从而促进神经轴突再生和功能恢复。

Masson 染色结果发现，夏天无组损伤区胶原纤维少于模型组，纤维之间夹杂的炎性细胞浸润减少，神经纤维周边结构相对有序化，表明损伤区结构得到改善，有利于神经纤维穿行，进入远侧端，并与靶器官取得联系，重新获得神经功能恢复。免

疫荧光染色结果发现，与模型组比较，夏天无组 LN 蛋白表达水平在损伤区增强，LN 是非胶原糖蛋白，其表达量增多反映了细胞黏附能力增强，有利于细胞生长、迁移和分化。

文献 [10-11] 报道，LN 表达依赖于施万细胞增殖，其浓度梯度引导神经生长和施万细胞迁移方向。由于施万细胞功能状态是微环境的重要组成部分，故本实验也检测其标记物 S-100 的表达，它多见于成熟施万细胞，其损伤将导致细胞去分化，刺激其增殖、成熟，形成 Bungner 带，引导和促进神经轴突再生，故 S-100 表达增强也反映了神经再生微环境的改善^[12]。

本实验发现，损伤区 Rac1 蛋白水平表达增加。它隶属于小 G 蛋白，是调节细胞骨架重构的重要枢纽，其增加能影响施万细胞生长、成髓鞘，促进神经损伤修复^[13]。目前认为，整合素 $\beta 1$ -Rac1 形成的信号通路，以及整合素 $\beta 1$ 和 LN 之间的相互作用都能增强细胞和细胞外基质之间的黏附性，促进神经损伤修复^[11,14-15]。

综上所述，夏天无能改善坐骨神经损伤后的损伤区，重塑适宜神经轴突再生的环境，促进轴突再生和神经功能恢复。

参考文献：

[1] 周巧霞, 顾振纶. 夏天无的实验研究和临床应用进展[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(3): 4-6, 10.

[2] 徐祖才, 张莎莎, 梁 涛, 等. 夏天无调控 TNF- α 参与大鼠缺血再灌注脑损伤的神经保护作用研究[J]. 免疫学杂志, 2016, 32(7): 641-644.

[3] 旷明丽, 余丽梅, 张 骏, 等. 夏天无注射液对脑缺血再灌注大鼠海马 Ang-2 和 VEGF mRNA 表达的影响[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2216-2219.

[4] Santos D, González-Pérez F, Giudetti G, *et al.* Preferential

enhancement of sensory and motor axon regeneration by combining extracellular matrix components with neurotrophic factors [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 18(1): 65.

[5] 叶华隆, 张少成, 刘 芳. 周围神经损伤后的再生微环境以及瘢痕形成[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2017, 13(2): 109-112.

[6] Allodi I, Udina E, Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level [J]. *Prog Neurobiol*, 2012, 98(1): 16-37.

[7] 钱长晖, 何才姑, 黄玉梅, 等. 夏天无注射液对大鼠坐骨神经损伤后的整合素 $\beta 1$ 表达的影响[J]. 福建中医学院学报, 2010, 20(1): 29-30.

[8] Ness J K, Snyder K M, Tapinos N. Lck tyrosine kinase mediates $\beta 1$ -integrin signalling to regulate Schwann cell migration and myelination[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1912.

[9] Madduri S, Gander B. Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration [J]. *J Peripher Nerv Syst*, 2010, 15(2): 93-103.

[10] Urbanski M M, Kingsbury L, Moussouros D, *et al.* Myelinating glia differentiation is regulated by extracellular matrix elasticity[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33751.

[11] 陈 雪, 王雪松, 李 奕, 等. 整合素- $\beta 1$ 在层黏连蛋白促进施万细胞合成细胞外基质过程中的作用[J]. 解剖学报, 2011, 42(4): 465-469.

[12] Wang Y, Li W Y, Jia H, *et al.* KLF7-transfected Schwann cell graft transplantation promotes sciatic nerve regeneration [J]. *Neuroscience*, 2017, 340: 319-332.

[13] Guo L, Moon C, Niehaus K, *et al.* Rac1 controls Schwann cell myelination through cAMP and NF2/merlin [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(48): 17251-17261.

[14] Takizawa M, Arimori T, Taniguchi Y, *et al.* Mechanistic basis for the recognition of laminin-511 by $\alpha 6 \beta 1$ integrin [J]. *Sci Adv*, 2017, 3(9): e1701497.

[15] Zhang Z H, Yu B, Gu Y, *et al.* Fibroblast-derived tenascin-C promotes Schwann cell migration through $\beta 1$ -integrin dependent pathway during peripheral nerve regeneration[J]. *Glia*, 2016, 64(3): 374-385.