

葛根素对面运动神经元的营养保护作用

苏莉莎, 冯俊, 杜经纬, 方雪

(川北医学院第二临床医学院南充市中心医院 耳鼻咽喉科, 四川 南充 637000)

[摘要] 目的: 探讨葛根素对面运动神经元的营养保护作用。方法: 将健康成年雌性去势 SD 大鼠分为葛根素组和生理盐水组, 切断右侧面神经主干复制周围性面瘫模型, 术后第3、第7及第15天分别取含神经核的脑组织块, 采用HE染色和Tunel法检测右面神经核区面运动神经元数量及形态的变化。结果: 术后第15天, 葛根素组右侧正常面运动神经元数目较生理盐水组多, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 生理盐水组的凋亡指数为 $(29.14 \pm 1.35)\%$, 葛根素组的凋亡指数为 $(24.57 \pm 2.23)\%$, 葛根素组凋亡指数比生理盐水组低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 葛根素对面运动神经元具有营养保护作用, 可能促进面运动神经元再生。

[关键词] 葛根素; 植物雌激素; 面神经; 面运动神经元; 周围性面瘫; 凋亡

[中图分类号] R969.4; R741.02 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2013)06-0632-03

Nutrition and Protection Effects of Puerarin on Facial Motor Neuron

SU Lisha, FENG Jun, DU Jingwei, FANG Xue

(Department of otorhinolaryngology, the Second Clinical Medical Institute of North Sichuan Medical College, Nanchong central hospital, Nanchong 637000, Sichuan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the nutrition and protection effect of puerarin on facial motor neuron. **Methods:** Dividing female adult ovariectomized SD rats into puerarin group and normal saline group, then we cut the right facial nerve of rats to let it to be peripheral facial paralysis model. During the 3rd day, 7th day, 15th day after operation, we observed the form and quantity changes of the right facial motor neuron. **Results:** During the 15th day after operation, apoptotic index of normal saline group was $(29.14 \pm 1.35)\%$, and the puerarin group was $(24.57 \pm 2.23)\%$, apoptosis rate of puerarin group was lower. **Conclusions:** Puerarin can protect and enrich facial motor neuron, it may promote regeneration of facial nerve.

[Key words] puerarin; phytoestrogen; facial nerve; facial motor neuron; peripheral facial paralysis; apoptosis

在传统的周围性面瘫治疗过程中,经常遇到手术修复面神经后神经功能恢复不理想的情况。随着神经科学的迅速发展,发现外周神经损伤后,可利用神经营养因子使运动神经元成功再生^[1]。本实验将葛根素注射液作为神经营养液用于周围性面瘫动物模型上,探讨葛根素对面运动神经元的营养保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验对象及分组

健康成年雌性去势 SD 大鼠 42 只,体重 220 ~

250 g,随机分成葛根素组及生理盐水组,每组 21 只。葛根素组:葛根素注射液 200 mg/(kg·d)腹腔注射(每只大鼠每天注射葛根素注射液约 1 mL),葛根素注射液规格为 2 mL:100 mg;生理盐水组:每只大鼠每天腹腔注射生理盐水 1 mL。两组大鼠再随机各分成 3 组,每组 7 只,分别于术后第3、第7及第15天取样。

1.2 复制动物模型

各组去势雌性 SD 大鼠用 10% 乌拉坦(1 g/kg)腹腔注射麻醉后,对大鼠首先进行去势处理(切除双侧卵巢),随后处理右侧面神经,复制周围性面瘫模型。模型复制方法:将大鼠右侧耳后脱

毛, 安尔碘消毒局部皮肤, 右耳下做一弧形小切口, 分离皮下组织后暴露右侧茎乳孔外的面神经主干, 于茎乳孔下 5 mm 将其切断, 并于远侧神经干切除 5 mm 防止再生, 止血, 缝合伤口。周围性面瘫模型复制成功后, 可见动物术侧触须立即失去拂动能力, 并向尾侧垂下, 瞬目反射迟钝, 闭眼幅度变弱甚至不能诱发。术后各组动物分笼饲养。

1.3 取样

分别在术后第 3、第 7 及第 15 天按照包新民著《大鼠脑立体定位图谱》标准进行面神经核取样。用 10% 乌拉坦 (1 g/kg) 大鼠腹腔注射后, 迅速打开胸腔暴露心脏, 经左心室快速灌注肝素生理盐水 (25 u/mL) 50 mL, 接着推注 4% 多聚甲醛 - PB 液 (0.1 mol/L, pH = 7.4) 300 mL 进行固定, 先快后慢, 20 min 内完成, 直至肝脏褪色变硬, 大鼠四肢变硬立即开颅取脑, 取含面神经核的厚 2~3 mm 冠状面脑组织块, 浸入 4% 的多聚甲醛后固定 6~24 h 后, 石蜡包埋、切片, HE 染色和 Tunel 法检测。

1.4 观察方法与指标

采用 HE 染色和 Tunel 法检测右面神经核区面运动神经元形态及数量的变化。正常面运动神经元计数方法: 高倍视野下 (400×) 随机取 5 个视野, 计数正常面运动神经元总数, 取平均数。面运动神经元凋亡指数和面运动神经元总数计算方法:

在高倍视野下随机取 5 个视野, 分别计数凋亡运动神经元和面运动神经元总数, 取平均数; 凋亡指数 = 凋亡面运动神经元总数 / 计数面运动神经元总数 × 100%。

1.5 统计学处理

统计软件 SPSS11.5 处理数据, 采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 提示差异有统计学意义。

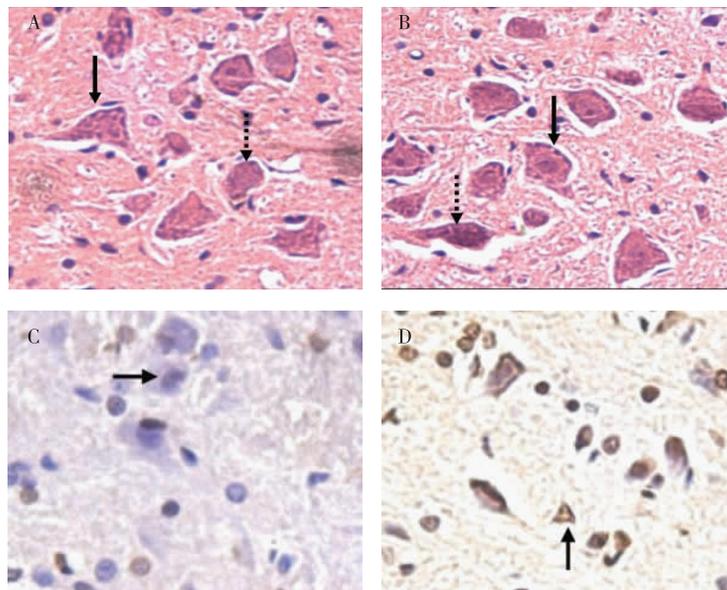
2 结果

2.1 行为学观察结果

术前大鼠触须向前竖立起并有节律地拂动; 术后大鼠术侧触须立即失去拂动能力, 并向尾侧垂下, 瞬目反射迟钝, 闭眼幅度变弱甚至不能诱发。

2.2 HE 染色结果

面神经损伤后第 3 天, 两组术侧面运动神经元与正常面运动神经元形态无明显差别; 面神经损伤后第 7 天, 两组术侧部分变性神经元细胞肿胀, 核形态基本正常; 面神经损伤后第 15 天, 术侧面运动神经元变性显著, 胞浆崩溃, 染色变浅, 核仁不清、碎裂。术后第 3 天和第 7 天, 两组术侧正常面运动神经元数量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 术后第 15 天, 两组术侧正常面运动神经元数量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 1。



注: A、C 为葛根素组, B、D 为生理盐水组; 图 A、B 为 HE 染色, 实线箭头所指为正常面神经运动神经元, 虚线箭头所指为变性面运动神经元; 图 C、D 为 Tunel 染色, 箭头所指为 Tunel 染色阳性的面运动神经元

图 1 右侧面神经损伤后大鼠术侧脑组织面神经运动神经元 (损伤后第 15 天, ×400)

Fig. 1 Motor neuron of facial nerve in brain tissue on the operation site after right facial nerve injury

表1 比较面神经损伤后两组术侧面神经核区正常运动神经元数(个/HP)

Tab.1 Comparison of normal motor neuron number in facial nerve nucleus on the rat operation site of the two groups after facial nerve injury

右侧面神经损伤后	生理盐水组	葛根素组	P
第3天	6.71 ± 1.11	7.29 ± 1.11	0.35
第7天	6.29 ± 1.11	5.85 ± 1.35	0.48
第15天	1.71 ± 0.76	3.43 ± 1.27 ⁽¹⁾	0.008

⁽¹⁾与生理盐水组比较, $P < 0.05$

2.3 Tunel 法结果

术后第7天,面神经核区可见部分 Tunel 标记神经元,胞核呈棕黄色,核固缩呈圆形或不规则形;高倍镜下可见染色质深染聚集成块或碎裂,核边聚等符合凋亡细胞形态变化。术后第15天,术侧面神经核区出现较多 Tunel 阳性细胞,面运动神经元变性、凋亡程度达到高峰。术后第7和第15天,生理盐水组和葛根素组凋亡指数比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图1和表2。

表2 面神经损伤后,两组术侧面神经核区面运动神经元凋亡指数的比较

Tab.2 Comparison of apoptotic indexes of motor neuron in facial nerve nucleus on the rat operation site of the two groups after facial nerve injury

右侧面神经损伤后	生理盐水组	葛根素组	P
第3天	-	-	-
第7天	24.00 ± 3.06	18.00 ± 1.29 ⁽¹⁾	0.00
第15天	29.14 ± 1.35	24.57 ± 2.23 ⁽¹⁾	0.00

⁽¹⁾与生理盐水组比较, $P < 0.05$

3 讨论

雌激素具有重要的神经营养和保护作用,可以增加神经生长因子及其受体的表达,还具有抗氧化、抗炎等作用,可以保护神经元^[2]。但雌激素可诱发乳腺癌、子宫内膜癌,从而限制了其在临床中的应用^[3]。植物雌激素是一类植物来源的,具有雌激素活性的非甾族杂环多酚类天然化合物,活性较雌二醇低,具有预防和抑制乳腺癌、前列腺癌、子宫内膜癌等肿瘤的作用^[4]。葛根素属于植物雌激素中的异黄酮类,较易获得,目前已用于临床。体外实验显示葛根素可以通过抑制神经细胞自由基的产生而阻止细胞凋亡,还可在脑缺血后增加内源性神经生长因

子的表达而发挥神经保护作用^[5-6]。

本实验采用雌性大鼠去势模型,该模型为一种良好的雌激素缺乏动物模型,常用于面神经运动神经元的研究^[7]。本实验中 Tunel 法显示,面神经截断术后第15天两组大鼠术侧面运动神经元达到凋亡高峰,这与相关文献报道相符^[8]。随着运动神经损伤时间的延长,运动神经的再生能力会越来越差,这可能是外周神经损伤后功能恢复不良的重要因素之一^[9]。上述研究提示对重度的运动神经损伤,临床修复应争取在2周内进行。

模型大鼠在注射葛根素后 HE 染色结果显示术后第15天,术侧面神经核区正常面运动神经元数量明显多于注射生理盐水的模型大鼠;术后第7天和第15天,注射葛根素的模型大鼠术侧面运动神经元的凋亡指数较注射生理盐水的低,这可能是由于葛根素可以减少面运动神经元的凋亡或者可以诱导神经干细胞分化为面运动神经元,减轻创伤性神经毒素的损害,对面运动神经元有保护作用,可能有促进面神经再生的作用。

4 参考文献

- [1] 刘悦,李培华,刘稳,等. 大鼠面神经压榨对面神经元 CNTF 表达的影响[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2013(1):20-23.
- [2] 胡佳丽,高霄飞. 雌激素的神经保护机制[J]. 医学综述, 2011(15):2253-2256.
- [3] 蔡艳琳. 雌激素的利与弊[J]. 中国疗养医学, 2011(11):1014-1015.
- [4] 魏华波,马海蓉,王振华. 植物雌激素抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 食品科学, 2011(1):274-277.
- [5] 颜秀娟. 葛根素对大鼠局灶性脑缺血再灌注的保护作用[J]. 科技视界, 2013(1):163.
- [6] 韩江全,李均,李官成,等. 葛根素对脑缺血大鼠神经元凋亡及脑源性神经营养因子的影响[J]. 西部医学, 2009(11):1844-1846.
- [7] 李长天,吴国泰,王雅莉,等. 葛根素对去卵巢大鼠学习记忆能力和海马结构的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2012(5):36-38.
- [8] Liu W, Gao ZQ, Shen P, et al. Facial paralysis induced by herpes simplex virus type 1 and the study of facial neurons apoptosis in mice[J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology, 2011(9):742-746.
- [9] 陈保国,黄渭清. 脑源性生长因子与神经损伤的修复及再生[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010(15):2805-2809.

(2013-08-16 收稿,2013-10-16 修回)

中文编辑:文箐颖;英文编辑:Walid Bin Hosain