

[文章编号 1000-1182(2004)01-0007-03]

基础研究 ·

氨基胍干预对创伤性面瘫大鼠外周面神经及周围组织一氧化氮合酶表达的影响

王立军¹, 周树夏², 顾晓明¹, 张 英¹

(1. 北京武警总医院 口腔科, 北京 100039; 2. 第四军医大学口腔医院 颌面外科, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的 研究诱导型一氧化氮合酶抑制剂氨基胍对创伤性面瘫大鼠外周面神经及周围组织一氧化氮合酶表达的影响。方法 通过大鼠面瘫前后腹腔内小剂量给予氨基胍, 在伤后各个时间点切取损伤面神经和软组织, 采用兔抗大鼠一氧化氮合酶(NOS)抗血清免疫组织化学 ABC 法对面神经和肌肉软组织内 NOS 表达的变化进行研究。结果 氨基胍组面神经和肌肉软组织伤后诱导型一氧化氮合酶免疫反应性明显降低。结论 氨基胍慢性干预明显抑制面神经和肌肉软组织内诱导型一氧化氮合酶的表达, 为面神经再生与组织创伤修复创造了有利条件。

[关键词] 氨基胍; 一氧化氮合酶; 面瘫; 面神经; 免疫组织化学; 大鼠

[中图分类号] R 782.4 **[文献标识码]** A

Effects of Aminoguanidine on the Expression of NOS in Facial Nerve and Surrounding Tissues of Traumatic Facial Paralysis Rats WANG Li-jun¹, ZHOU Shu-xia², GU Xiao-ming¹, ZHANG Ying¹. (1. Dept. of Stomatology, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of inducible NOS inhibitor aminoguanidine on the expression of NOS in facial nerve and surrounding tissue of traumatic facial paralysis rats. **Methods** A small dose of aminoguanidine were intraperitoneally injected into rats before and after facial paralysis. The facial nerve and surrounding tissues were cut at different time point. Immunohistochemical ABC method was used to study the changes of NOS expression in facial nerve and surrounding tissues. **Results** The inducible NOS immunoreactivity was obvious inhibited in the facial nerve and surrounding tissues in aminoguanidine group. **Conclusion** Aminoguanidine chronic treatment can obvious inhibit the inducible NOS expression in the facial nerve and surrounding tissues. Aminoguanidine can improve the regeneration of facial nerve and the recovery of traumatic tissues.

[Key words] aminoguanidine; nitric oxide synthase; facial paralysis; facial nerve; immunohistochemistry; rat

颌面部撞击造成的面神经挫伤引起的面瘫是临床救治的难点。本研究对氨基胍干预后面神经和周围肌肉软组织一氧化氮合酶表达的影响进行了观察, 旨在探讨 NO 介质途径干预对创伤性面瘫后外周面神经及周围组织功能恢复的影响^{1,2}, 以期寻求创伤性面瘫的有效治疗新线索。

1 材料和方法

1.1 动物及分组

成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠(上海 B&K 动物公司)39 只, 体重 190~250 g, 随机分为空白对照、实验对照(normal saline, NS)及实验处理 3 组, 动物数分别为 3, 18, 18 只。空白对照组动物仅用于做形态学观察; NS 组与实验处理组动物分别在伤后即刻, 伤后

6 h, 1, 3, 7, 14 d 随机取 3 只动物做观察⁴。

1.2 NO 介质途径的干预

实验处理组用氨基胍(aminoguanidine, AG)(Sigma 公司, 美国)作为诱导型一氧化氮合酶抑制剂, 按 50 mg/kg 剂量于致伤前 0.5 h 腹腔内给药, 面瘫后继续给药, 每日 2 次。实验对照组与空白对照组则给予等量的生理盐水, 直至观察结束处死为止。

1.3 面神经损伤方法

所有 SD 大鼠用戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 解剖右侧面神经显露出咬肌表面的面神经颊支与下颌支, 空白对照组随即缝合伤口做形态学观察。将实验对照及实验处理组大鼠侧卧位固定于万能固定台上, 将撞击探头接触覆盖面神经颊支与下颌支, 以质量为 4.5 kg 的撞击杆, 直径为 1.1 cm 的撞击探头, 10 m/s 撞击速度, 0.5 cm 的撞击压缩幅度进行撞击, 造成大鼠右侧面神经完全性瘫痪, 但面神经干不断裂, 随后缝合伤口。所造成的面瘫及其功能恢复以触须运动和平衡观察为指标分为完全面瘫、轻度恢

[收稿日期 2003-03-05; 修回日期 2003-10-13]

[基金项目] 全军指令性课题(96L047)

[作者简介] 王立军(1968-), 男, 河北人, 副主任医师, 博士

[通讯作者] 周树夏, Tel: 029-3374322

复、中度恢复及面瘫完全恢复⁵。

1.4 局部组织取材

以撞击区为中心,将右侧面神经颊支与下颌支仔细分离切取,长度 1.0 cm 左右,再将撞击区内咬肌切取一大块,与面神经一道放入 20%蔗糖液中过夜。对照除空白对照外,还设置正常对照,取各实验组对侧咬肌组织,处置方法与实验侧相同。

1.5 免疫组化染色

将在 20%蔗糖液中浸泡的组织进行常规免疫组化染色⁶。肌肉冰冻切片厚度约 15 μm ,面神经及肌肉和周围组织染色的一抗均选用诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、结构型一氧化氮合酶(cNOS)。

1.6 统计分析

免疫组化染色结果采用同济医科大学千屏影像工程公司研制的 HPIAS-1000 高清晰度彩色图文分析系统进行图像分析,测定平均灰度值,用第四军医大学统计教研室 SPLM1.0 软件处理,做方差分析。

2 结果

2.1 面神经免疫组化染色

3 组动物伤后 14 d 都未见面神经纤维 cNOS 阳性染色。NS 组伤后 1 d iNOS 免疫反应性表现出较强烈 iNOS 染色,且面神经纤维排列较紊乱,有粗细之分,时断时续。伤后 3 d, iNOS 免疫反应性达到高峰(图 1),伤后 7 d, iNOS 免疫反应性明显下降,伤后 14 d 已无明显的阳性纤维。AG 组伤后 1、3 d iNOS 免疫反应性也明显增强,但均比 NS 组明显减弱(图 2)。空白对照组未见 iNOS 表达。



图 1 实验对照组伤后 3 d 面神经 iNOS 阳性神经纤维分布达到高峰(箭头所指) ABC $\times 66$

Fig 1 iNOS positive nerve fibers distributed at peak (arrowhead pointed) 3 d after trauma in NS group ABC $\times 66$

2.2 肌肉软组织免疫组化染色

在创伤后的组织内, cNOS 主要分布于骨骼肌上。NS 组伤后 6 h 可见部分肌纤维呈阳性,特别是肌细胞膜阳性较强。伤后 1 d, cNOS 免疫反应性达到高峰,出现深染阳性肌纤维,间质内中性粒细胞染色较

弱。自伤后 3 d 开始, cNOS 免疫反应性明显下降,仅肌细胞膜少许阳性染色,伤后 7、14 d 时已无阳性染色。AG 组表现与 NS 组相似,空白对照组则为阴性。NS 组伤后 6 h 时,肌肉、结缔组织间已有不少 iNOS 阳性细胞浸润,其中有中性粒细胞、巨噬细胞,部分肌纤维及肌细胞膜亦可见阳性染色。伤后 1 d, iNOS 免疫反应性达到高峰,大量阳性炎细胞浸润,阳性物质充满细胞质,呈粗颗粒状,但肌纤维 iNOS 免疫反应性无明显增强(图 3)。伤后 3 d, iNOS 阳性炎细胞明显减少。伤后 7 d, 阳性炎细胞基本消失,肌纤维亦无阳性染色。伤后 14 d 则与空白对照组相同,无阳性反应。而 AG 组 iNOS 免疫反应性明显低于 NS 组(图 4)。伤后 3、7、14 d, 两组间已无明显差异,在相同时间与 NS 组相比, $P < 0.01$ 。



图 2 氨基胍组伤后 3 d 面神经 iNOS 阳性神经纤维染色明显低于实验对照组伤后 3 d (箭头所指) ABC $\times 66$

Fig 2 iNOS positive staining of nerve fibers in AG group was obviously lower than that of NS group (arrowhead pointed) 3 d after trauma ABC $\times 66$

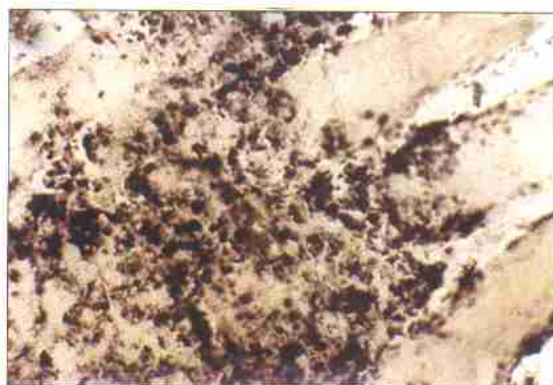


图 3 实验对照组伤后 1 d 肌肉软组织 iNOS 阳性染色达到高峰 ABC $\times 132$

Fig 3 iNOS positive staining of muscle tissues peaked 1 d after trauma in NS group ABC $\times 132$

3 讨论

本实验发现: AG 组面神经伤后的 iNOS 免疫反应性明显降低; 各组肌肉伤后呈现一定程度的 cNOS 免疫反应性,在 iNOS 免疫反应性上,AG 组明显

受抑制; 组织学发现, AG 组伤后组织间炎症反应轻, 损伤小。上述现象出现的可能原因分析如下。



图4 氨基胍组伤后 1 d 肌肉软组织 iNOS 阳性染色强度明显低于实验对照组伤后 1 d ABC $\times 132$

Fig 4 iNOS positive staining of muscle tissues in AG group was obviously lower than that of NS group 1d after trauma ABC $\times 132$

就面神经而言, 各组因面神经运动神经元(FMN)中 cNOS 不表达或极弱表达³, 外周面神经中自然无 cNOS 免疫反应性。NS 组伤后面神经有较强的 iNOS 免疫反应性, 这与同期 FMN 中 iNOS 强烈表达有关, 但外周 iNOS 阳性纤维数量亦不如 FMN 中阳性神经元多, 其原因与上面所说的 cNOS 免疫反应性一样。iNOS 在外周神经纤维中表达并释放 NO 在神经再生中有何作用还未证实, 估计与在中枢一样有神经损伤作用, 阻碍再生修复⁷。AG 组 iNOS 免疫反应性低, 这与它中枢 FMN 中 iNOS 免疫反应性低密切相关³, 中枢表达的少, 输送到外周自然也少。鉴于 iNOS 可能有神经损伤作用, AG 组 iNOS 免疫反应性低, 这对该组伤后面神经的恢复是有利的, 这与 AG 组在面神经伤后早、中期恢复较快是一致的³。

就周围软组织而言, 周围组织中 cNOS 可由一些如缺血、机械刺激等因素激活, 所以本实验中肌肉组织内的 cNOS 阳性可能是由于机械损伤和组织内微循环障碍所致, 同时 cNOS 主要表达在肌纤维膜区, 这与 Grozdanovic 等⁸的报道相符。各组 cNOS 伤后上升、下降趋势一致, 可见 cNOS 免疫反应性主要与创伤本身有关, 肌肉组织中 cNOS 表达释放的 NO 具有 10^{-12} mol/L 水平。这种水平的 NO 在组织细胞间起信息传递作用, 并可能参与一些细胞的分化和功能调节⁹, 因此应该对组织损伤修复有一定的促进作用。另一方面, 组织创伤后, 伤口内各种组织细胞被激活, 可释放多种细胞因子, 如 IL、TNF、TGF、IFN 等。这些因子可趋化多种细胞包括中性粒细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞等进入伤口组织周围, 参与损伤后的炎症反应和修复愈合过程, 而这些细胞因子是 iNOS 重要的刺激因子, 在它们的协同作用下, 多种类型的细胞可释放大量的 NO, 而组织内大量 NO 的生

成, 可能是参与组织损伤的重要因素¹⁰。另外 NO 的生成, 能够导致生成 NO 的巨噬细胞、中性粒细胞等细胞自身的凋亡, 因而又可能是调控炎症消散和炎症反应自限性的原因之一¹¹。NS 组伤后 iNOS 免疫反应性证实了上述观点。NS 组肌纤维内有 iNOS 表达, 但无明显增强。这是因为在骨骼肌中, iNOS 仅在一定条件下才被诱导表达, 且表达强度较低¹²。AG 组 iNOS 免疫反应性明显低于 NS 组, 说明 AG 抑制了 iNOS 的表达, AG 通过抑制各种炎性因子中 iNOS 表达进而抑制 NO 的释放, 从而使周围组织中炎症反应、组织损伤大为减轻, 这对于组织创伤恢复、面神经再生创造了一个有利的外部环境。

面神经损伤后的反应是一个复杂的生物过程, 远不是一个 NO 机制的问题。本研究用氨基胍进行干预, 以了解其对面瘫恢复的影响是具有重要意义的。

[参考文献]

- 1] Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthase: Roles, tolls and controls J. Cell, 1994, 78(6):915-918.
- 2] Wong FH, Ruan RS, Leong SK, et al. Compression of the facial nerve caused increased nitric oxide synthase activity in the facial motor nucleus J. Neuroscience, 1995, 67(3):697-702.
- 3] 王立军, 周树夏. 氨基胍对大鼠创伤性面瘫后面神经核一氧化氮合酶表达的影响 J. 武警医学, 2001, 12(8):457-461.
- 4] 王立军, 周树夏, 孙长凯, 等. L-精氨酸对大鼠创伤性面瘫恢复及面神经核一氧化氮合酶表达的影响 J. 第四军医大学学报, 1999, 20(6):544-548.
- 5] Jones KJ. Recovery from facial paralysis following crush injury of the facial nerve in hamsters J. Exp Neurol, 1993, 121(1):133-138.
- 6] Shu SY, Ju G, Fan LZ. The glucose oxidase-DAB nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system J. Neurosci Lett, 1988, 85(2):169-171.
- 7] Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide neurotoxicity J. J Chem Neurobiol, 1996, 10(3-4):179-190.
- 8] Grozdanovic Z, Nakos G, Dahrmann G, et al. Species-independent expression of nitric oxide synthase on the sarcolemma region of visceral and somatic striated muscle fibers J. Cell Tissue Res, 1995, 281(3):493-499.
- 9] Riancho JA, Zarrabeitia MT, Fernandez luna JL, et al. Mechanisms controlling nitric oxide synthesis in osteoblasts J. Mol Cell Endocrinol, 1995, 107(1):87-92.
- 10] 程红, 郭建生, 莫简, 等. 一氧化氮和吸入性高浓度氧与小鼠运动性骨骼肌损伤 J. 第四军医大学学报, 1996, 17(3):224-225.
- 11] Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, et al. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation programmed cell death leads to its recognition by macrophages J. J Clin Invest, 1989, 83(3):865-875.
- 12] Williams G, Becker L, Bryant D, et al. Effects of transforming growth factor-1 on nitric oxide synthesis by C2C12 skeletal myocytes J. Am J Physiol, 1996, 270(1-2):R145-R152.
- 13] Ruan RS, Leong SK, Yeoh KH. Expression of NADPH-diaphorase activity in the facial motoneurons after compression of the facial nerve in the albino rat J. Brain Res, 1994, 652(2):350-352.

(本文编辑 王 晴)