

· 论 著 ·

# 白细胞介素 1 $\beta$ 对失神经肌肉保护作用的实验研究

王全震<sup>1</sup>, 万圣祥<sup>1</sup>, 肖颖锋<sup>1</sup>, 王拥军<sup>1</sup>, 周喆刚<sup>1</sup>, 王发斌<sup>2 $\Delta$</sup> 

(1. 北京大学深圳医院手外科, 广东深圳 518036; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院手外科, 武汉 430022)

**摘要:**目的 研究白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )对失神经支配骨骼肌的作用。方法 将 36 只健康 SD 大鼠制备失神经支配腓肠肌模型,随机分成实验组和对照组,每组 18 只。A 组于腓肠肌不同的 5 个点注射 IL-1 $\beta$  0.1 mL(浓度 1 ng/mL),B 组注射同等剂量的生理盐水,术后每天注射 1 次。于术后 2、4、8 周各取 6 只大鼠处死,取右侧腓肠肌观察,测定肌湿质量维持率、肌细胞横截面积、肌肉蛋白总含量,检测运动终板,细胞凋亡等指标。结果 术后 2、4、8 周实验组的肌湿质量维持率、肌细胞截面积、肌肉蛋白含量均明显高于对照组( $P < 0.05$ )。术后 8 周两组的运动终板平均灰度值和平均光密度值差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。实验组肌细胞凋亡率明显低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 靶肌肉局部注射 IL-1 $\beta$  能减轻失神经骨骼肌形态的改变,对失神经骨骼肌和运动终板具有保护作用,能在短时间内有效延缓失神经支配骨骼肌萎缩。

**关键词:**白细胞介素 1 $\beta$ ;失神经支配;肌萎缩

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.06.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)06-0532-03

## Experiment study on protective effect of interleukin-1 $\beta$ on denervated muscle

Wang Quanzhen<sup>1</sup>, Wan Shengxiang<sup>1</sup>, Xiao Yingfeng<sup>1</sup>, Wang Yongjun<sup>1</sup>, Zhou Zhegang<sup>1</sup>, Wang Fabin<sup>2 $\Delta$</sup> 

(1. Department of Hand Surgery, Shenzhen Hospital, Peking University, Shenzhen, Guangdong 518036, China;

2. Department of Hand Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430022, China)

**Abstract: Objective** To study the protective effect of interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) on denervated skeletal muscle. **Methods** A model of denervated gastrocnemius at right lower limb was established in 36 healthy adult SD rats. The rats were randomly divided into two groups: experiment group and control group. The IL-1 $\beta$  (1 ng/mL) with 0.1 mL was directly injected into the denervated gastrocnemius of the experimental group at 5 different spots every day, and the isodose physiological saline was directly injected into the denervated gastrocnemius of the control group with the same method. On postoperative 2, 4, 8 weeks, 6 rats were taken from the two groups, the rate of muscle wet weight preservation, the cross section area of myocyte, the protein amount and the motor end-plate were checked respectively for investigating the protective effect of interleukin-1 $\beta$  on denervated skeletal muscle. **Results** On postoperative 2, 4, 8 weeks, the rate of muscle wet weight preservation, the cross section area of myocyte and the protein amount were significantly greater in the experiment group than those in the control group ( $P < 0.05$ ). On postoperative 8 weeks, the edge of motor end-plate in the experimental group was more distinct than that in the control group, and the acetylcholine esterase dyeing of motor end-plate was deeper than the control group. The percentage of apoptotic muscle cells was significantly smaller in the experiment group than that in the control group. **Conclusion** IL-1 $\beta$  can retard denervated muscle atrophy in short period.

**Key words:** interleukin-1 beta; denervated; muscle atrophy

周围神经损伤后,其所支配的骨骼肌因失去神经的营养及废用发生从生化到形态的改变,最终出现运动终板及肌肉的纤维化,失去收缩功能,最终会导致不可逆的萎缩。目前国内外学者曾用电刺激、被动活动、药物、感觉神经元植入和基因阻断肌细胞凋亡等方法,对延缓和防治失神经肌萎缩进行了诸多研究,取得了不同程度的成功。最近的研究表明,白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )对周围神经损伤后轴突再生具有促进作用,并有保护脊髓运动神经元的作用<sup>[1]</sup>。而 IL-1 $\beta$  是否能够防止和延缓失神经肌肉的萎缩尚未见有文献报道。作者的实验采用大鼠坐骨神经切断造成腓肠肌失神经支配模型,取得了较好的实验结果。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 选用健康成年 SD 大鼠 36 只,体质量 200 g 左右,雌雄不限(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供)。重组大鼠 IL-1 $\beta$ (英国 Peprotech EC 公司);FA-N/F1 系列电子分

析天平(上海精密科学仪器有限公司);HMIAS-2000 型高清晰度彩色医学图文分析系统(武汉千屏影像技术有限责任公司);2000 型 & UV-2000 型分光光度计(上海龙尼柯仪器有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 分组** 将 36 只大鼠随机分为两组,每组 18 只,对照组:靶肌肉注射生理盐水;实验组:靶肌肉注射 1 ng/mL IL-1 $\beta$ 。

**1.2.2 建立失神经支配腓肠肌模型** 用 1%异戊巴比妥钠(30 mg/kg)行腹腔内麻醉成功后,右侧臀部去毛,俯卧位固定于手术台上,1%活力碘消毒右侧臀部及腿部,铺无菌巾,严格无菌条件下手术。取纵切口,沿肌间隙分离肌肉,暴露坐骨神经。于距梨状肌下缘约 8.0 mm 处用锐刀片切断坐骨神经,在手术显微镜下远断端结扎,近断端翻转约 180°固定于附近的臀肌肌膜上,仔细止血,逐层缝合切口,皮肤表面缝一小块纱布,覆盖切口。

 $\Delta$  通讯作者, Tel:13500061859; E-mail: yuchen662@163.com.

**1.2.3 实验方法** 确定腓肠肌的位置,用微量注射器在肌腹中央刺入皮肤,通过改变方向在 5 个不同的点进行肌内注射。实验组注射 IL-1 $\beta$ (1 ng/mL),每点注射 20  $\mu$ L,总注射量为 0.1 mL,术后按上述方法每天注射。对照组按上述方法注射同等体积的生理盐水。术后腹腔注射青霉素 160 万单位/千克,连续 3 d。每笼 5~6 只群养,同一饲养条件,笼底铺以锯末,自然昼夜,温度 25  $^{\circ}$ C,自由饮水和饮食。

**1.2.4 观察指标与方法**

**1.2.4.1 肌湿重维持率的测定** 分别于术后 2、4、8 周,实验组和对照组各取 6 只大鼠,用致死剂量的 1%异戊巴比妥钠(30 mg/kg)行腹腔麻醉,麻醉成功后,在手术显微镜下仔细分离并将双侧腓肠肌股骨内外髁起点至跟骨结节止点完整取下,迅速置分析天平上准确称取肌肉湿质量。右侧除以左侧得出肌湿质量维持率。

**1.2.4.2 骨骼肌细胞横截面积的测定** 将上述右侧腓肠肌用 4%的甲醛溶液浸泡。标本在中性甲醛液中浸泡 48 h 后,取腓肠肌中段横切面及纵切面,石蜡包埋,切片,作 HE 染色,光镜下观察纵横切面肌纤维形态,并采用图像分析仪测定骨骼肌细胞的横截面积。每张切片中测量 100 个肌细胞的截面积,计算均数。

**1.2.4.3 肌肉蛋白含量测定** 用考马斯亮蓝法测定肌肉总蛋白含量:用牛标准血清蛋白配制成 0.1 mL 中含蛋白质 10、20、40、60、80  $\mu$ g 的一系列标准液,每管各加考马斯亮蓝试剂 3.0 mL,于 595 nm 波长比色,以光密度值为纵坐标,以蛋白质含量为横坐标,绘制标准曲线。取各组组织块加入等渗盐水,用匀浆仪制成 100 mg/mL 肌肉匀浆,各取 0.05 mL,加入 3.0 mL 考马斯亮蓝染液,静置 10 min 后在分光光度计上于波长 595 nm 处比色。对照标准曲线求得蛋白总量。

**1.2.4.4 运动终板的检测** 于腓肠肌中段深部切取长 10 mm、直径 4 mm 的长条肌肉,放入 10%甲醛溶液中 4  $^{\circ}$ C 固定 2 h,经生理盐水洗涤等后续处理,组织在固定后置入 30%蔗糖溶液过夜以防冰晶形成,然后恒冷箱-25  $^{\circ}$ C 切片法连续冷冻切片。厚约 5  $\mu$ m 的组织切片可立即裱贴于涂有铬矾明胶粘贴剂的载玻片上,在空气中干燥 30 min。切片行乙酰胆碱酯酶及镀银染色检测运动终板。

**1.2.4.5 检测骨骼肌细胞的凋亡率** 将从腓肠肌中段深部切取的长 10 mm,直径 4 mm 的长条肌肉石蜡块,纵切。采用 TUNEL 法检测肌细胞的凋亡率,利用图像分析系统在每张切片上随机选取 10 个视野,计数 10 个视野的阳性细胞百分率,取其平均数,计算肌细胞的凋亡率。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件包进行数据分析,实验数据用  $\bar{x}\pm s$  表示,两组结果比较采用 *t* 检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 大体观察及肌湿质量维持率** 术后第 1 周,所有大鼠右后肢活动不灵,均拖膝行走,后肢肌肉出现萎缩。第 2 周肌肉较左侧明显萎缩,对照组 2 只大鼠足部出现溃疡。第 3 周足部溃疡不愈合并加重,肌肉萎缩较第 2 周明显。第 4 周较第 3 周无明显变化。术后 2、4、8 周取材,实验组腓肠肌饱满、有弹性、光滑、色泽佳,但较正常稍差;而对照组腓肠肌明显萎缩、变薄、色泽苍白。两组肌湿质量维持率相比差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 1。

**2.2 光镜下组织学观察及骨骼肌细胞横截面积** 实验组较对照组更接近于正常肌纤维,对照组肌束间结缔组织增生明显,

并且肌纤维断裂较明显。术后 2、4、8 周,实验组腓肠肌横截面积明显大于对照组( $P<0.05$ ),见表 2、封 2 图 1。

**表 1 两组不同时间肌湿质量维持率( $\bar{x}\pm s, \%$ )**

组别	2 周	4 周	8 周
实验组	60.75 $\pm$ 4.87	47.85 $\pm$ 6.63	25.14 $\pm$ 3.67
对照组	53.66 $\pm$ 5.63	34.33 $\pm$ 7.72	21.26 $\pm$ 2.31
<i>t</i>	2.518	3.689	2.487
<i>P</i>	<0.05	<0.01	<0.05

**表 2 两组肌细胞横截面积( $\bar{x}\pm s, \mu\text{m}^2$ )**

组别	2 周	4 周	8 周
实验组	913.54 $\pm$ 30.34	775.43 $\pm$ 55.20	689.41 $\pm$ 35.53
对照组	771.46 $\pm$ 55.25	642.36 $\pm$ 22.79	632.36 $\pm$ 34.49
<i>t</i>	5.521	5.458	2.822
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.05

**2.3 肌肉蛋白含量** 术后 2、4、8 周,实验组腓肠肌蛋白含量高于对照组( $P<0.05$ ),见表 3。

**表 3 两组不同时间骨骼肌蛋白含量( $\bar{x}\pm s, \text{mg/mL}$ )**

组别	2 周	4 周	8 周
实验组	78.28 $\pm$ 6.10	64.69 $\pm$ 5.42	51.58 $\pm$ 4.75
对照组	64.32 $\pm$ 5.37	54.61 $\pm$ 4.22	45.59 $\pm$ 1.71
<i>t</i>	4.205	3.592	3.390
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01

**2.4 运动终板染色** 术后 2、4 周,实验组和对照组运动终板形态、数量及分布与正常无明显差别。术后 8 周实验组终板体积无明显变小,边缘仍清晰,乙酰胆碱酯酶染色较深。对照组终板体积变小,边缘模糊,呈毛刺状,且终板乙酰胆碱酯酶染色较浅。两组平均灰度值和平均光密度值比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 4、封 2 图 2。

**表 4 术后 8 周两组运动终板图像分析结果( $\bar{x}\pm s$ )**

组别	鼠数 (只)	平均灰度值		平均光密度值	
		银染色	Ache 染色	银染色	Ache 染色
实验组	6	45.83 $\pm$ 4.56	85.42 $\pm$ 3.85	0.75 $\pm$ 0.04	0.48 $\pm$ 0.03
对照组	6	59.98 $\pm$ 4.29	112.77 $\pm$ 6.89	0.61 $\pm$ 0.03	0.35 $\pm$ 0.03
<i>t</i>		5.534	8.492	6.465	6.927
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

**表 5 不同时间两组肌细胞凋亡率( $\bar{x}\pm s, \%$ )**

组别	2 周	4 周	8 周
实验组	11.19 $\pm$ 1.94	27.37 $\pm$ 2.38	55.47 $\pm$ 2.63
对照组	21.01 $\pm$ 2.42	55.13 $\pm$ 6.83	61.49 $\pm$ 4.15
<i>t</i>	7.76	9.39	2.03
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.05

**2.5 骨骼肌细胞的凋亡率** 各组均可见少量肌纤维细胞被特异性地标记上很强的绿色荧光,同时显示出核固缩等其他的凋

亡形态学特征。可见失神经支配的骨骼肌中存在细胞凋亡现象。正常肌肉组织检测未见凋亡细胞。术后 2、4、8 周,对照组肌细胞凋亡率高于实验组( $P < 0.05$ ),见表 5、封 2 图 3。

### 3 讨 论

目前认为失神经肌萎缩的机制主要表现为以下几个方面:(1)神经-肌肉接头处的变化及营养因子的代谢障碍;(2)进行性肌纤维萎缩;(3)肌卫星细胞减少;(4)肌细胞的程序性死亡——细胞凋亡;(5)废用因素。防止或延缓失神经肌肉萎缩的发生,为神经的再生赢得时间,对于提高周围神经损伤的疗效具有重要的意义,也受到了国内外学者的重视。但目前还没有一种特效手段能治疗失神经肌萎缩。

炎症过程在骨骼肌损伤和修复过程中发挥重要的作用<sup>[2-3]</sup>,肌肉损伤可以引起炎症反应,在这个过程中首先是中性粒细胞的浸润,接着巨噬细胞浸润。与此同时肌肉通过肌卫星细胞激活增殖和肌肉的终极分化进行修复,再生。炎症反应是一个具有众多细胞因子和调控因子参与且调控机制复杂的过程;并且炎症反应是一个具有损伤与修复双重作用的过程。所以可以通过调控使其发挥修复作用,减少损伤作用。IL-1 $\beta$ 是炎症反应过程中重要的介质之一,它是一种具有多方面生物学功能的细胞因子,能刺激细胞增殖、增生,促进其他细胞因子产生及调节代谢的多种作用,一般认为它主要具有介导特异性的免疫反应和调节免疫系统的功能。几乎各种有核细胞都能产生 IL-1 $\beta$ ,主要有单核巨噬细胞、淋巴细胞、成纤维细胞、中性粒细胞等。最近的研究发现,IL-1 $\beta$ 能促进施万细胞分泌神经生长因子(nerve growth factor,NGF),在周围神经损伤后具有促进轴突再生和保护脊髓运动神经元的作用<sup>[4]</sup>。并且还有研究表明 IL-1 $\beta$ 对体外培养及在体脊神经节感觉神经元有保护作用<sup>[5]</sup>。

本实验结果表明 IL-1 $\beta$ 对失神经后的肌肉萎缩及运动终板的变性有显著的延缓作用。可能是通过如下途径起作用:(1)IL-1 $\beta$ 抑制 Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>通道电流,使细胞离子内流减少,缓解细胞 Na<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O 潴留引起的细胞水肿和 Ca<sup>2+</sup>超载引起的细胞破坏,从而起到直接的保护作用。(2)IL-1 $\beta$ 在局部通过激活有丝分裂原激活蛋白(MAP)酶信号途径和活化 NF- $\kappa$ B 而刺激 IL-6 的产生<sup>[6]</sup>。目前的研究表明,骨骼肌是产生 IL-6 重要的场所,尤其是在体育锻炼、炎症、血灌注量不足、失神经支配及肌肉局部损伤时更为显著。研究发现,IL-6 是一种重要的多效能细胞因子,具有组织营养作用,并且可能参与组织损伤后的修复、肌肉营养不良及失神经支配后肌肉的再生过程<sup>[7]</sup>。IL-1 $\beta$ 在体内可能通过上述的两种途径使得 IL-6 产生量增加,进而发挥其对失神经支配肌肉的再生作用,延缓了肌肉的萎缩。(3)IL-1 $\beta$ 能促进施万细胞、成纤维母细胞等非神经细胞增生分泌神经生长因子(NGF)<sup>[8]</sup>,失神经支配的靶器官也产生一定量的 NGF<sup>[9]</sup>。NGF 能有效地减轻外周神经损伤后肌肉的萎缩程度,并能促进其恢复<sup>[10-11]</sup>,其中 NT-3 是神经生长因子家族中的重要一员,NT-3 mRNA 在骨骼肌、肝和肠等外周组织有高水平的表达。NT-3 可阻止轴突和运动终板退变,调节发育的神经肌肉突触的功能<sup>[12]</sup>。

作者对于肌肉内注射 IL-1 $\beta$ 能延缓肌萎缩的实验研究表明 IL-1 $\beta$ 对失神经肌肉具有保护作用。IL-1 $\beta$ 作为炎症介质的成员之一,对神经损伤后肌肉萎缩的延缓作用,为以后研究炎症介质在周围神经损伤后的作用提供了实验依据。

### 参考文献:

- [1] 翁雨雄,王发斌,洪光祥,等.白细胞介素-1 $\beta$ 对周围神经损伤后运动神经元的保护作用[J].中华实验外科杂志,2004,21(1):55-56.
- [2] James G,Tidball.Inflammatory processes in muscle injury and repair[J].Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,2005,288(12):R345-R353.
- [3] 张翔,王玉莲,邱小忠,等.炎性因子对 C2C12 细胞、MC-3T3-E1 细胞成骨、成肌相关基因表达的影响[J].广州医学院学报,2008,38(5):5-9.
- [4] 宫可同,阚世廉,鲁毅军,等.白细胞介素-1 在周围神经损伤后神经再生中的作用[J].中华手外科杂志,2003,19(2):124-126.
- [5] 洪光祥,王发斌,陈振兵,等.白细胞介素-1 $\beta$ 对体外培养及在体脊神经节感觉神经元的作用[J].中华手外科杂志,2001,17 增刊:48-50.
- [6] Luo GJ,Hershko DB,Robb BW,et al.IL-1 $\beta$  stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF- $\kappa$ B [J].Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,2003,284(5):1249-1254.
- [7] Kurek JB,Austin L,Cheema SS,et al.Up-regulation of leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 in transected sciatic nerve and muscle following denervation[J].Neuromuscul Disord,1996,6(2):105-114.
- [8] Lindholm D,Heumann R,Meyer M,et al.Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve[J].Nature,1987,330(6149):658-659.
- [9] Slack JP.Evidence for a motor nerve growth factor[J].Muscle Nerve,1983,6(4):243-249.
- [10] 于一凡,谭晓琳,孙晋民.神经生长因子与周围神经病相关性研究进展[J].中国现代医药杂志,2009,11(11):128-130.
- [11] 董红让,徐达传.外消旋聚乳酸/神经生长因子复合导管对失神经肌萎缩的早期作用[J].中国组织工程研究与临床康复,2009(21):4017-4021.
- [12] Tuszyski MH,Grill R,Jones LL,et al.NT-3 gene delivery elicits growth of chronically injured corticospinal axons and modestly improves functional deficits after chronic scar resection[J].Exp Neurol,2003,181(1):47-56.

(收稿日期:2011-06-20 修回日期:2011-11-11)