

# 芦丁对丙烯酰胺致大鼠坐骨神经髓鞘损伤的保护作用

白艳娴 贾会 张桐 罗宇悠 张春梅 罗利 马宇昕 刘靖\*

(广东药科大学生命科学与生物制药学院人体解剖学教研室, 广州 510006)

**[摘要]** **目的** 通过观察芦丁(Rut)对丙烯酰胺(ACR)染毒大鼠坐骨神经髓鞘结构、髓鞘碱性蛋白(MBP)及髓鞘相关糖蛋白(MAG)表达的变化,探讨 Rut 对 ACR 致大鼠坐骨神经髓鞘损伤的保护作用。**方法** 成年 SD 雄性大鼠 36 只,随机分为 4 组:对照组(control,给予 ddH<sub>2</sub>O)、20 mg/kg ACR 染毒组(ACR)、100 mg/kg Rut 预保护 ACR 染毒组(R1+ACR)、200 mg/kg Rut 预保护 ACR 染毒组(R2+ACR),每组 9 只,灌胃 21 d 后取材。后肢间距测量评估各组大鼠后支撑力的变化;HE 染色和透射电子显微镜观察大鼠坐骨神经髓鞘结构的变化;免疫组织化学和 Western blotting 检测 MBP 和 MAG 表达量的变化。**结果** 后肢间距测量显示,与 control 组相比,ACR 组大鼠后肢间距随染毒时间延长而增加( $P<0.05$ ),而给予 Rut 预处理后,R1+ACR 和 R2+ACR 组的后肢间距明显低于 ACR 组;HE 染色显示,ACR 染毒后,神经纤维排列紊乱,髓鞘出现肿胀的现象,而 R2+ACR 组神经纤维排列有序,髓鞘肿胀减轻。透射电子显微镜结果显示,ACR 组髓鞘出现肿胀和松解,板层间出现空泡,部分轴突空泡样变性;与 ACR 组相比,R2+ACR 组髓鞘松解情况改善,空泡样变性不明显,髓鞘板层及轴突中仅有少量的空泡。免疫组织化学和 Western blotting 检测结果显示,与 control 组相比,ACR 组坐骨神经 MBP 和 MAG 的表达量均明显减少( $P<0.01$ ),与 ACR 组相比,R1+ACR 组及 R2+ACR 组 MBP 和 MAG 的表达量增加( $P<0.05$ )。**结论** 芦丁对 ACR 致大鼠坐骨神经髓鞘损伤具有保护作用,其保护作用可能与 Rut 改善 ACR 引起的坐骨神经髓鞘蛋白 MBP 和 MAG 表达减少有关。

**[关键词]** 丙烯酰胺;芦丁;坐骨神经;髓鞘碱性蛋白;髓鞘相关糖蛋白;免疫组织化学;免疫印迹法;大鼠

**[中图分类号]** R338.7 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.16098/j.issn.0529-1356.2022.02.005

## Protective effect of rutin on myelin sheath injury in the sciatic nerve of rats induced by acrylamide

BAI Yan-xian, JIA Hui, ZHANG Tong, LUO Yu-you, ZHANG Chun-mei, LUO Li, MA Yu-xin, LIU Jing\*

(Department of Anatomy, College of Life Sciences and Biopharmaceuticals, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of rutin (Rut) on sciatic nerve myelin injury induced by acrylamide (ACR), and to observe the changes of myelin structure, myelin basic protein (MBP) and myelin associated glycoprotein (MAG) in rats exposed to ACR. **Methods** Thirty-six adult male SD rats were randomly divided into 4 groups: control group (ddH<sub>2</sub>O), 20 mg/kg ACR exposure group (ACR), 100 mg/kg Rut pre-protection ACR exposure group (R1+ACR), 200 mg/kg Rut pre-protection ACR exposure group (R2+ACR), 9 rats in each group, and were given gastric gavage for 21 days. HE staining and transmission electron microscopy were used to observe the changes of the sciatic nerve myelin sheath structure, immunohistochemistry and Western blotting were used to detect the changes in the expression of MBP and MAG in each group of rats. **Results** Hind limb distance measurement showed that compared with the control group, the hind limb distance of rats in the ACR group increased with the prolonged exposure time ( $P<0.05$ ). After pre-protection with Rut, the hind limb distance of the R1+ACR and R2+ACR groups was significantly lower than that in the ACR group. HE staining showed that after ACR was infected, nerve fibers were disordered and myelin swelling appeared, while in R2+ACR group, nerve fibers were orderly and myelin swelling was reduced. Transmission electron microscopy

**[收稿日期]** 2021-07-13 **[修回日期]** 2021-08-09

**[基金项目]** 广东省科技计划项目(2016A020225007)

**[作者简介]** 白艳娴(1989—),女(汉族),广东省清远市人,在读硕士研究生。

\* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)

E-mail:liulq1227@163.com Tel: (020)39352189

showed that the myelin in ACR group was swollen and loosened, vacuoles were found in the interlamellar area, and some axons had vacuolar degeneration. Compared with the ACR group, the laxity of myelin in the R2+ACR group was improved and vacuolar degeneration was not obvious, and only a few vacuoles were found in the myelin lamina and axons. Immunohistochemistry and Western blotting results showed that the expression levels of MBP and MAG in the ACR group decreased significantly compared with the control group ( $P<0.01$ ), compared with ACR group, the expression levels of MBP and MAG in R1+ACR group and R2+ACR group increased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Rut has a protective effect on myelin sheath in the sciatic nerve of rats induced by acrylamide, which may be related to the inhibition of Rut on the decreased expression of MBP and MAG in the sciatic nerve induced by ACR.

[ **Key words** ] Acrylamide; Rutin; Sciatic nerve; Myelin basic protein; Myelin associated glycoprotein; Immunohistochemistry; Western blotting; Rat

丙烯酰胺 (acrylamide, ACR) 是一种水溶性乙烯基单体, 主要用于聚丙烯酰胺的合成, 被广泛应用于工业 (如污水处理、矿石加工、造纸等) 和科研实验室电泳凝胶制备等领域<sup>[1]</sup>。ACR 暴露可以导致人类及实验动物中枢和周围神经系统损伤, 其毒性症状主要表现为周围神经毒性, 如骨骼肌无力、共济失调等运动功能障碍<sup>[2,3]</sup>。

坐骨神经是人类及动物最粗大的周围神经, 对管理和支配下肢肌肉的运动起重要作用<sup>[4]</sup>。研究发现, 坐骨神经是 ACR 周围神经毒性的重点靶点, 其病理学特征主要表现为轴突变性、髓鞘损伤以及髓鞘相关蛋白的减少<sup>[5]</sup>。因此, 探索有效的神经保护药物, 对于预防和治疗 ACR 所致的神经毒性作用具有重要意义。研究显示, 氧化应激是 ACR 诱导神经毒性的重要机制之一<sup>[6]</sup>。芦丁 (rutin, Rut), 又名芸香苷, 具有抗氧化及神经保护等药理活性<sup>[7]</sup>。Yaşar 等<sup>[8]</sup>发现, Rut 对顺铂诱导的周围神经毒性有保护作用, 其机制可能与 Rut 提高谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平, 降低活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量等有关。还有研究表明, Rut 可以防止 ACR 暴露大鼠体重下降并抑制脑组织中 ROS 和 MDA 的产生, 从而发挥神经保护作用<sup>[9]</sup>。但 Rut 对 ACR 诱导的周围神经损伤是否有保护作用鲜见报道。因此, 本实验以 ACR 染毒大鼠坐骨神经作为研究对象, 通过 HE 染色和透射电子显微镜观察 Rut 对 ACR 染毒大鼠坐骨神经髓鞘结构的影响, 通过免疫组织化学和 Western blotting 检测髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP) 和髓鞘相关糖蛋白 (myelin associated glycoprotein, MAG) 表达的影响, 探讨 Rut 对 ACR 致大鼠坐骨神经髓鞘损伤的保护作用, 为 Rut 预防和治疗 ACR 诱导的周围神经毒性可能的机制提供实验依据。

## 材料和方法

### 1. 材料

SPF 级成年雄性 SD 大鼠 36 只, 体重为 300 ~

350 g, 购于广东省医学实验动物中心, 动物许可证编号: SYXK (粤) 2017-0125。动物饲养过程遵循动物福利原则, 所有实验步骤及操作均符合广东药科大学实验动物伦理委员会的伦理要求, 伦理编号为: SPF2017200。ACR 购于 Sigma 公司; Rut (>99%) 购于 Chroma Dex 公司; 兔抗大鼠 MBP 单克隆抗体 (ab65988)、兔抗大鼠 GAPDH 多克隆抗体 (ab75810) 均购于 Abcam 公司; 兔抗大鼠 MAG 多克隆抗体 (GTX11454) 购于 Gene Tex 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购于 EarthOx 公司。BCA 蛋白定量试剂盒购于 BestBio 公司, 山羊血清购于 Boster 公司。

### 2. 方法

2.1 动物分组及给药: 根据以往研究表明, Rut 产生神经保护作用的最明显浓度为剂量为 200 mg/kg<sup>[9]</sup>, 结合本课题组前期研究确定 Rut 和 ACR 的给药剂量、周期与给药方式<sup>[5]</sup>。36 只大鼠随机分为 4 组, 每组 9 只: 对照组 (control, 0.5% CMC-Na+ddH<sub>2</sub>O)、ACR 染毒组 (0.5% CMC-Na+20 mg/kg ACR)、R1+ACR 组 (100 mg/kg Rut+20 mg/kg ACR)、R2+ACR 组 (200 mg/kg Rut+20 mg/kg ACR)。Rut 用 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 配制<sup>[10]</sup>, 每日上午灌胃 0.5% CMC-Na 或 Rut, 下午灌胃 ddH<sub>2</sub>O 或 ACR, 灌胃体积均为 5 ml/kg, 连续灌胃 21 d, 第 22 天取材。

2.2 取材: 每组随机选取 6 只大鼠麻醉后断头处死, 在冰上快速分离坐骨神经, 分别用于透射电子显微镜观察及 Western blotting 检测。每组剩余 3 只大鼠, 用于坐骨神经形态学观察。以 4% 水合氯醛 (10 ml/kg) 腹腔注射麻醉, 暴露胸腔, 用生理盐水进行心脏灌注, 再以含 4% 多聚甲醛的 PBS 灌注固定。将大鼠俯卧位固定于手术台, 从其股骨往外旁开 0.5 cm 处切开, 充分暴露坐骨神经并结扎剪断, 多聚甲醛固定 48 h 后进行组织脱水和石蜡包埋等处理, 最后制成厚度为 5 μm 的石蜡切片。

2.3 HE 染色: 将石蜡切片脱蜡至水, 苏木精染色 4 min, 冲水 20 min; 伊红染色 2 min, 冲水 20 min; 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片后晾干, 于

光学显微镜 (ZEISS 公司) 下观察。

2.4 透射电子显微镜检测:每组取 3 只大鼠用 4 % 水合氯醛 (10 ml/kg) 腹腔注射麻醉后,迅速分离坐骨神经并于冰上修剪成 1 mm×1mm×1 mm 的立方体,转入含 2.5 % 戊二醛溶液内固定,放置 4 ℃ 过夜。次日,用 1.5 % 锇酸固定 3 h 后,依次进行梯度脱水,丙酮置换,浸渍,包埋及切片,最后采用重金属铀染色 10 min 并于透射电子显微镜 (HITACHI 集团) 下观察。

2.5 免疫组织化学检测:将石蜡切片脱蜡至水,置 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液中微波修复 15 min,待其冷却后放入 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS 溶液中 30 min, Triton-X 破膜,滴加山羊血清 37 ℃ 烘箱内封闭 30 min, 倾去封闭液后,加入兔抗大鼠 MBP 抗体 (1:100)、兔抗大鼠 MAG 抗体 (1:500) 4 ℃ 孵育过夜。次日,复温后 PBS 缓慢冲洗 3 次 (5 min/次),再滴加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1:500) 37 ℃ 烘箱内孵育 40 min。DAB 显色,苏木精复染 2 min,梯度脱水,中性树脂封片。光学显微镜 (ZEISS 公司) 下观察并摄片。

2.6 Western blotting 检测:每组取 3 只大鼠,上述方法麻醉后断头处死,分离坐骨神经,加入含 0.01 mol/L 苯甲基磺酰氟的蛋白裂解液,待组织充分匀浆后,在 12 000 r/min、4 ℃ 下离心 15 min,取上清液,用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。依次进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,加入兔抗大鼠 MBP 抗体 (1:1000)、兔抗大鼠 MAG 抗体 (1:1500) 后 4 ℃ 孵育过夜。然后滴加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1:10 000) 孵育 1 h 后,TBS-T 在摇床上洗涤 20 min,共 3 次。ECL 化学发光成像系统成像,利用 Image J 1.6.0 软件分析条带灰度值,以目标蛋白灰度值与 GAPDH 灰度值的比值代表蛋白的最终表达量。

3. 统计学处理

采用 Graphpad prism 7.0 统计学软件进行分析。免疫组织化学和 Western blotting 结果采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),所有数据采用均值±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

结    果

1. Rut 对 ACR 染毒大鼠行为学的影响

后肢间距测量试验常用于评估大鼠的后支撑力。结果显示,给药第 7 天,各组大鼠间的后肢间距无明显差异;给药第 14 天,与 control 组相比,ACR 组大鼠后肢间距明显增加 ( $P<0.05$ ),R1+ACR 的后肢间距亦有增加 ( $P<0.05$ ),而 R2+ACR 组大鼠后肢间距差异无显著性;给药 21 d,ACR 组后肢间距明显大于对照组、R1+ACR 和 R2+ACR 组 ( $P<0.05$ ,表 1)。

表 1 丙烯酰胺染毒对各组大鼠步态评分的影响 ( $n=9, \bar{x}\pm s$ )  
Table 1 Effects of acrylamide exposure on hind limb distance of rats in each group ( $n=9, \bar{x}\pm s$ )

组别 groups	给药后不同时间点 (d) time after administration (days)		
	7	14	21
control	9.22±0.69	8.17±0.23	8.11±0.98
ACR	8.94±0.10	12.5±0.71 <sup>*##</sup>	15.33±0.58 <sup>*##</sup>
R1+ACR	9.68±0.52	11.2±0.57 <sup>*</sup>	11.77±0.81 <sup>*#</sup>
R2+ACR	8.59±0.83	9.31±0.60	9.67±0.58

与对照组相比,  $*P<0.05$ ; 与 R1+ACR 组相比,  $#P<0.05$ ; 与 R2+ACR 组相比,  $+P<0.05$   
Compared with the control group,  $*P<0.05$ ; Compared with the R1+ACR group,  $#P<0.05$ ; Compared with the R2+ACR group,  $+P<0.05$

2. Rut 对 ACR 染毒大鼠坐骨神经髓鞘结构的影响

HE 染色结果显示 (图 1A), control 组坐骨神经的神经纤维结构完整,分布均匀,排列整齐有序,髓鞘紧密围绕着轴突; ACR 染毒后,神经纤维排列紊乱,髓鞘出现肿胀的现象、排列密集; R2+ACR 组神经纤维排列有序,髓鞘肿胀减轻。坐骨神经横断面超微结构显示 (图 1B), control 组有髓神经纤维髓鞘板层结构致密均匀、排列规则。ACR 组髓鞘出现肿胀和松解,板层间出现空泡 (箭头),可见髓鞘脱失,部分轴突空泡样变性 (星号)。与 ACR 组相比, R2+ACR 组髓鞘松解情况改善,空泡样变性不明显,髓鞘板层及轴突中仅有少量的空泡。

2. 免疫组织化学法检测坐骨神经 MBP 的表达情况

免疫组织化学结果显示, control 组 MBP 的阳性表达物位于轴突周围呈棕黄色,呈卵圆形,髓鞘结构清晰,髓鞘厚,染色深 (图 2A)。与 control 组相比, ACR 组 MBP 的阳性表达明显减少 ( $P<0.01$ ); 与 ACR 组相比, R1+ACR 组与 R2+ACR 组 MBP 的阳性表达均明显增加 ( $P<0.01$ , 图 2B~2E)。

3. 免疫组织化学法检测坐骨神经 MAG 的表达情况

免疫组织化学结果显示, MAG 的阳性表达物与 MBP 的阳性表达物相似,呈棕色近似圆形,围绕轴突表达于坐骨神经髓鞘上 (图 3A)。与 control 组相比, ACR 组 MAG 的阳性表达显著减少 ( $P<0.01$ ); 与 ACR 组相比, R1+ACR 组 MAG 的阳性表达明显增加 ( $P<0.05$ ), R2+ACR 组的阳性表达也显著增加 ( $P<0.01$ , 图 3B~3E)。

4. Western blotting 检测坐骨神经 MBP 和 MAG 蛋白表达情况

MBP 和 MAG 条带分析结果显示 (图 4), 与 control 组相比, ACR 组坐骨神经 MBP 和 MAG 的蛋白表达量均显著减少 ( $P<0.01$ ); 与 ACR 组相比, R2+ACR 组 MBP 和 MAG 的蛋白表达量明显增加 ( $P<0.05$ )。



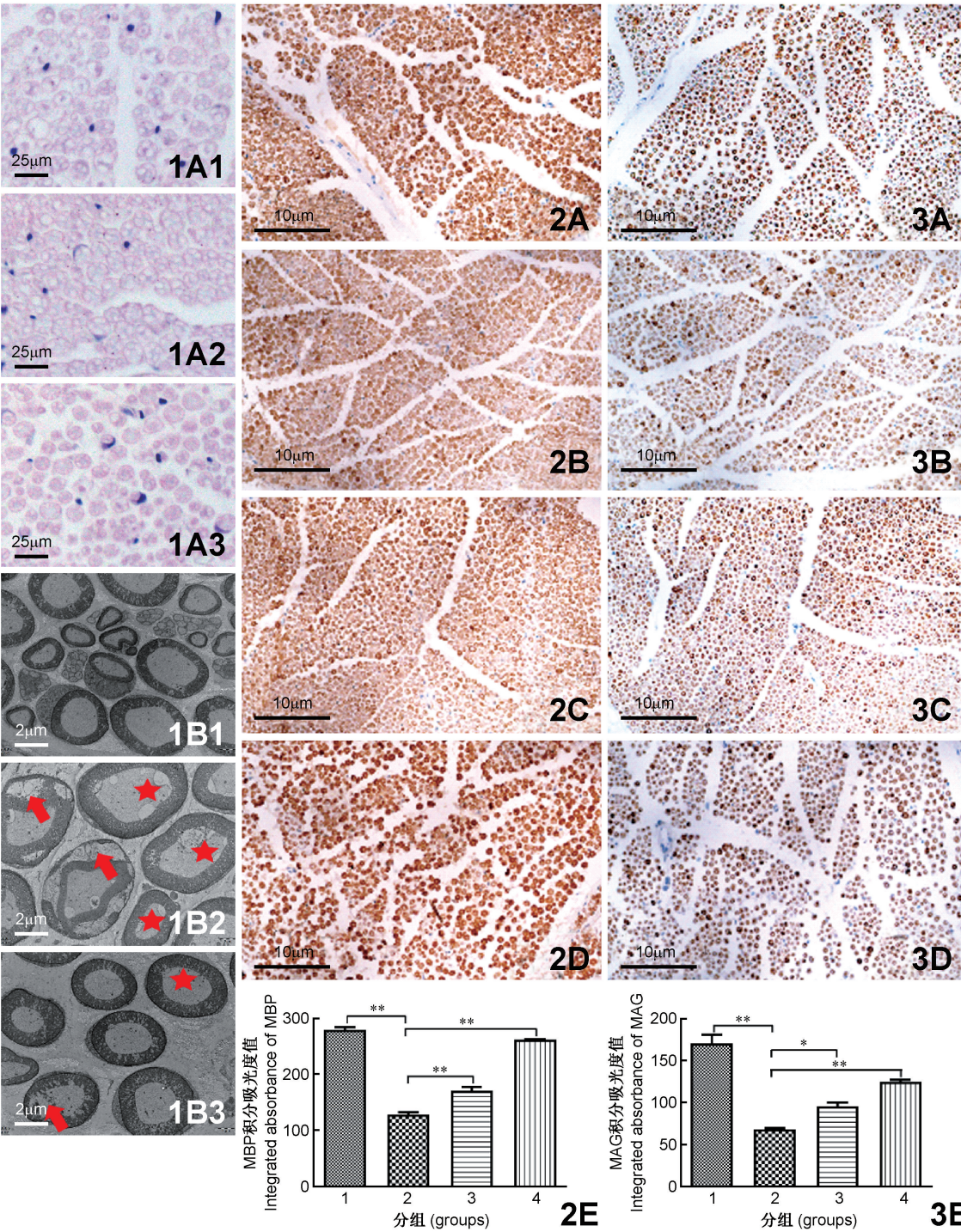


图1 Rut 抑制了 ACR 致大鼠坐骨神经髓鞘结构的变化

A. HE 染色,标尺示 25  $\mu\text{m}$ ; ACR 组大鼠坐骨神经神经纤维排列紊乱,髓鞘出现肿胀的现象,而经 Rut 预保护后,R2+ACR 组神经纤维排列有序,髓鞘肿胀减轻; B. 透射电子显微镜检测,标尺示 2  $\mu\text{m}$ ; ACR 组髓鞘出现松散,板层间出现空泡(箭头)部分轴突空泡样变性(星号);与 ACR 组相比,R2+ACR 组髓鞘松散情况改善,空泡样变性不明显; A1、B1. 对照组; A2、B2. ACR 组; A3、B3. R2+ACR 组

图2 各组大鼠坐骨神经 MBP 阳性表达

A~D. 免疫组织化学染色,标尺示 10  $\mu\text{m}$ ; A. Control 组; B. ACR 组; C. R1+ACR 组; D. R2+ACR 组; E. MBP 阳性表达统计分析图; 1. Control 组; 2. ACR 组; 3. R1+ACR 组; 4. R2+ACR 组; 与 control 组相比,ACR 组 MBP 的阳性表达明显减少; 与 ACR 组相比,R1+ACR 与 R2+ACR 组 MBP 的阳性表达均明显增加; \*\*  $P<0.01$

图3 各组大鼠坐骨神经 MAG 阳性表达

A~D. 免疫组织化学染色,标尺示 10  $\mu\text{m}$ ; A. Control 组; B. ACR 组; C. R1+ACR 组; D. R2+ACR 组; E. MAG 阳性表达统计分析图; 1. Control 组; 2. ACR 组; 3. R1+ACR 组; 4. R2+ACR 组; 与 control 组相比,ACR 组 MAG 的阳性表达显著减少; 与 ACR 组相比,R1+ACR 组与 R2+ACR 组 MAG 的阳性表达均明显增加, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$

Fig.1 Rut inhibited the changes of sciatic nerve myelin structure induced by ACR in rats

A, Representative images of HE stained sections, Bar=25  $\mu\text{m}$ ; In the ACR group, nerve fibers were disordered and myelin swelling appeared, while in



R2+ACR group, nerve fibers were orderly and myelin swelling was reduced after Rut treatment; B, Transmission electron microscopy, Bar=2 μm;; In the ACR group,the myelin sheath was loosened,vacuoles (arrows) appeared between the laminas,and some axons were vacuolated (asterisks), the laxity of myelin in the R2+ACR group was improved and vacuolar degeneration was not obvious; A1, B1, control group; A2, B2, ACR group; A3, B3, R2+ACR group

Fig.2 MBP expression in each group

A-D, Immunohistochemical staining, Bar=10 μm; A, Control group; B, ACR group; C, R1+ACR group; D, R2+ACR group; E, The statistical analysis of the MBP positive expression; 1, Control group; 2, ACR group; 3, R1+ACR group; 4, R2+ACR group; Compared with the control group,the positive expression of MBP in the ACR group was significantly reduced; Compared with the ACR group, the positive expression of MBP in the R1+ACR group and R2+ACR group increased significantly; \*\*  $P<0.01$

Fig.3 MAG expression in each group

A-D, Immunohistochemical staining, Bar=10 μm; A, Control group; B, ACR group; C, ACR+ R1 group; D, R2 +ACR group; E, The statistical analysis of the MAG positive expression; 1, Control group; 2, ACR group; 3, ACR+R1 group; 4, R2+ACR group; Compared with the control group,the positive expression of MAG in the ACR group was significantly reduced; Compared with the ACR group,the positive expression of MAG in the R1+ACR group and the R2+ACR group increased significantly; \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$

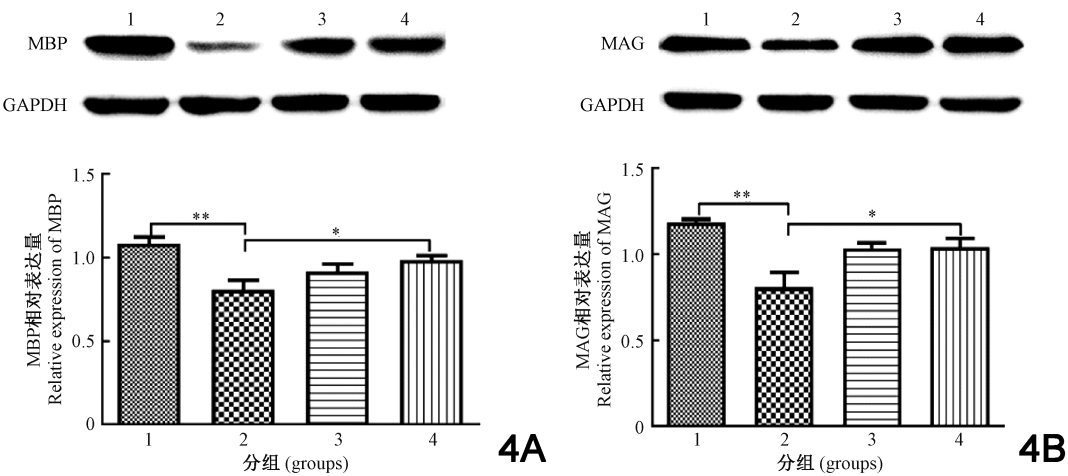


图4 Western blotting 检测各组大鼠坐骨神经 MBP 和 MAG 蛋白的表达  
A. MBP 蛋白表达变化情况; B. MAG 蛋白表达变化情况;1. Control 组; 2. ACR 组;3. R1+ACR 组;4. R2+ACR 组;与 Control 组相比,ACR 组坐骨神经 MBP 和 MAG 的蛋白表达量均显著减少 ( $P<0.01$ ); 与 ACR 组相比,R2+ACR 组 MBP 和 MAG 的蛋白表达量均明显增加; \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$

Fig.4 Western blotting was used to detect the protein expression of MBP and MAG in sciatic nerve of rats in each group  
A, Changes of MBP protein expression; B,Change of MAG protein expression;1, Control group; 2, ACR group; 3, R1+ACR group; 4, R2+ACR group;Compared with the control group,the expression levels of MBP and MAG in the ACR group decreased significantly; Compared with the ACR group, the protein expressions of MBP and MAG in R2+ACR group increased significantly; \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$

讨 论

ACR 是一种广泛存在的神经毒素,不仅普遍存在于环境中,而且碳水化合物(咖啡、马铃薯等)经高温(>120 ℃)处理时,还原糖和天门冬氨酸可发生美拉德反应产生 ACR<sup>[11]</sup>。众多研究证实,ACR 对动物和人类的神经毒性作用主要表现为中枢和周围神经系统的损伤,且以周围神经毒性症状为主,表现为步态异常,骨骼肌无力,手脚麻木及皮肤异常等<sup>[3,12]</sup>。本研究结果显示,ACR 染毒后大鼠后肢间距明显增加,提示大鼠的后支撑力变小,大鼠运动能力可能受损;而经过 Rut 预先给药,ACR 组后肢间距明显大于对照组、R1+ACR 和 R2+ACR 组,提示 Rut 可改善 ACR 染毒大鼠的运动状态。行为学结

果初步表明,Rut 可能对 ACR 诱导的周围神经毒性有拮抗作用。

神经末梢是 ACR 作用的主要位点,ACR 暴露可导致神经纤维末梢及轴突肿胀,髓鞘脱失及髓鞘蛋白表达减少<sup>[13,14]</sup>。有研究表明,ACR 导致轴突聚集大量的神经丝,并随着中毒的加深,轴突变性加剧了髓鞘解离,最终导致神经纤维的完全破坏或崩解,其中毒机制可能是 ACR 抑制了轴突运输,造成能量代谢紊乱和钙超载等<sup>[2]</sup>。还有研究显示,通过调查职业性暴露于 ACR 的工人,发现他们的尺神经传导速度减慢和复合动作电位波幅降低,可能与 ACR 使轴突变性,导致继发性髓鞘脱失有关<sup>[15]</sup>。HE 染色结果显示,control 组坐骨神经的神经纤维结构完整,分布均匀,排列整齐有序,髓鞘紧密围绕着轴突。

ACR 染毒后,神经纤维排列紊乱,髓鞘出现肿胀的现象,排列密集。但与 ACR 组相比,R2+ACR 组神经纤维排列有序,髓鞘肿胀减轻。进一步通过透射电子显微镜观察发现,ACR 组髓鞘出现肿胀和松解,板层间出现空泡,可见髓鞘脱失,部分轴突空泡样变性。而经 Rut 干预后,髓鞘松解情况改善,空泡样变性不明显,髓鞘板层及轴突中仅有少量的空泡,提示 Rut 可以改善 ACR 致大鼠坐骨神经结构的损伤。HE 染色及透射电子显微镜结果说明,Rut 对 ACR 染毒大鼠坐骨神经的髓鞘损伤可能有保护作用。

在周围神经系统,髓鞘是由施万细胞胞膜围绕轴突形成的同心圆状结构,对轴突有营养和支持的功能,并能够提高轴突信息传导速度<sup>[16]</sup>。MBP 是髓鞘含量最丰富的蛋白之一,约占总蛋白的 1/3,对髓鞘的形成与功能的稳定起重要作用<sup>[17]</sup>。研究表明,MBP 含量与髓鞘的厚度成正相关,是髓鞘损伤的特异性指标<sup>[18,19]</sup>。MAG 是一种跨膜蛋白,定位于髓鞘的最里层,与轴突直接接触,对髓鞘和轴突的直径有正向调节和维持髓鞘结构完整性的作用,同时能抑制轴突过度 and 异常的生长<sup>[20]</sup>。Tomita 等<sup>[21]</sup>使用较低浓度的 MAG 局部应用于坐骨神经横断的大鼠模型中,发现显著减少了体内受损后外周轴突的分支,并促进肌肉同步运动等功能的恢复。还有研究显示,MBP 和 MAG 能共同维持髓鞘的完整性,大鼠坐骨神经挤压损伤后,阿魏酸可以通过促进施万细胞增殖和分化,上调 MAG 和 MBP 的表达水平使髓鞘的合成加速,促进损伤后周围神经的再生<sup>[22]</sup>。本研究结果显示,ACR 染毒后坐骨神经 MBP 和 MAG 表达量均减少,提示 ACR 染毒后坐骨神经髓鞘的受损可能与 MBP 和 MAG 表达减少有关。

据报道,胸腺醌可以通过抗氧化和抗凋亡途径,降低 MDA 水平及提高 GSH 水平,增加 MBP 的表达对 ACR 诱导的大鼠坐骨神经损伤发挥保护作用<sup>[23]</sup>。还有研究发现,百草枯可以诱导小鼠四肢肌力明显下降,腿部退缩反射潜伏期降低等运动缺陷,可能与其诱导氧化应激,导致脂质过氧化和蛋白质羰基化增加,使坐骨神经髓鞘结构紊乱和髓鞘蛋白聚集有关<sup>[24]</sup>。这些研究表明,氧化应激参与了髓鞘损伤的过程,与髓鞘的损伤密切相关。芦丁是一种天然的黄酮类化合物,具有抗炎、抗氧化及神经保护等多种药理活性<sup>[7]</sup>。研究发现,银纳米粒子暴露可以导致神经元脱髓鞘、变性和空泡化改变,经 Rut 治疗后,能够改善神经元的氧化状态,纠正神经递质失衡,从而减轻银纳米粒子诱导的髓鞘损伤<sup>[25]</sup>。还有研究表明,Rut 可以降低糖尿病大鼠模型的血糖水平,恢复坐骨神经的传导速度,其机制可能与 Rut 减

轻氧化应激,减少线粒体 ROS 的产生和抑制炎症细胞因子的表达有关<sup>[26]</sup>。Thabet 等<sup>[27]</sup>认为,Rut 还可以通过调节 MDA 及 ROS 的水平,增加组织中抗氧化分子核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Nrf2)的表达,从而减轻氧化应激,对 ACR 和  $\gamma$  辐射诱导的大鼠神经损伤有保护作用。本研究免疫组织化学和 Western blotting 结果显示,ACR 使大鼠坐骨神经髓鞘蛋白 MBP 和 MAG 表达减少,而给予 Rut 后,MBP 和 MAG 的表达增加,提示 Rut 对 ACR 染毒大鼠坐骨神经髓鞘有保护作用,其保护作用可能与 Rut 抑制了 ACR 诱导的髓鞘蛋白 MBP 和 MAG 的表达减少有关。氧化应激可能是 Rut 对 ACR 染毒大鼠坐骨神经髓鞘损伤发挥保护作用的重要原因之一,其具体的机制仍需进一步深入研究。

参 考 文 献

[ 1 ] Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review [ J ]. J Agric Food Chem, 2003, 51(16):4504-4526.

[ 2 ] Erkekoglu P, Baydar T. Acrylamide neurotoxicity [ J ]. Nutr Neurosci, 2014, 17(2):49-57.

[ 3 ] Kjuus H, Goffeng LO, Heier MS, et al. Effects on the peripheral nervous system of tunnel workers exposed to acrylamide and N-methylolacrylamide [ J ]. Scand J Work Environ Health, 2004, 30(1):21-29.

[ 4 ] Poutoglidou F, Piagkou M, Totlis T, et al. Sciatic nerve variants and the piriformis muscle: a systematic review and meta-analysis [ J ]. Cureus, 2020, 12(11):e11531.

[ 5 ] Gu ZT, Jia H, Liu J, et al. Effects of acrylamide on the expression of MBP and MAG in sciatic nerve of rats [ J ]. Chinese Journal of Neuroanatomy, 2019, 35(1):29-34. (in Chinese)

古梓婷,贾会,刘靖,等.丙烯酰胺染毒对大鼠坐骨神经 MBP 和 MAG 表达的影响 [ J ]. 神经解剖学杂志,2019,35(1):29-34.

[ 6 ] Tabeshpour J, Mehri S, Abnous K, et al. Role of oxidative stress, MAPKinase and apoptosis pathways in the protective effects of thymoquinone against acrylamide-induced central nervous system toxicity in rat [ J ]. Neurochem Res, 2020, 45(2):254-267.

[ 7 ] Budzynska B, Faggio C, Kruk-Slomka M, et al. Rutin as neuroprotective agent: from bench to bedside [ J ]. Curr Med Chem, 2019, 26(27):5152-5164.

[ 8 ] Yaşar H, Ersoy A, Cimen FK, et al. Peripheral neurotoxic effects of cisplatin on rats and treatment with rutin [ J ]. Adv Clin Exp Med, 2019, 28(11):1537-1543.

[ 9 ] Motamedshariaty VS, Amel Farzad S, Nassiri-Asl M, et al. Effects of rutin on acrylamide-induced neurotoxicity [ J ]. Daru, 2014, 22(1):27.

[ 10 ] Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni SK. Protective effect of rutin, a polyphenolic flavonoid against haloperidol-induced orofacial dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes [ J ]. Fundam Clin Pharmacol, 2007, 21(5):521-529.

[ 11 ] Koszucka A, Nowak A. Thermal processing food-related toxicants: a review [ J ]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2019, 59(22):3579-3596.



- [12] Bin-Jumah M, Abdel-Fattah AM, Saied EM, et al. Acrylamide-induced peripheral neuropathy: manifestations, mechanisms, and potential treatment modalities [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2021, 28(11):13031-13046.
- [13] Ahmad Bainmahfouz FR, Ali SS, Al-Shali RA, et al. Vitamin E and 5-amino salicylic acid ameliorates acrylamide-induced peripheral neuropathy by inhibiting caspase-3 and inducible nitric oxide synthase immunoexpression [J]. *J Chem Neuroanat*, 2021, 113:101935.
- [14] Lopachin RM, Gavin T. Acrylamide-induced nerve terminal damage: relevance to neurotoxic and neurodegenerative mechanisms [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(15):5994-6003.
- [15] Kjuus H, Goffeng LO, Heier MS, et al. Effects on the peripheral nervous system of tunnel workers exposed to acrylamide and N-methylolacrylamide [J]. *Scand J Work Environ Health*, 2004, 30(1):21-29.
- [16] Ronzano R, Thetiot M, Lubetzki C, et al. Myelin plasticity and repair: neuro-glial choir sets the tuning. *front cell neurosci* [J]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14:42.
- [17] Gould RM, Oakley T, Goldstone JV, et al. Myelin sheaths are formed with proteins that originated in vertebrate lineages [J]. *Neuron Glia Biol*, 2008, 4(2):137-152.
- [18] Shen D, Zhang Q, Gao X, et al. Age-related changes in myelin morphology, electrophysiological property and myelin-associated protein expression of mouse sciatic nerves [J]. *Neurosci Lett*, 2011, 502(3):162-167.
- [19] Zhang Q, Song W, Zhao B, et al. Quercetin attenuates diabetic peripheral neuropathy by correcting mitochondrial abnormality via activation of AMPK/PGC-1 $\alpha$  pathway in vivo and in vitro [J]. *Front Neurosci*, 2021, 15:636172.
- [20] Pronker MF, Lemstra S, Snijder J, et al. Structural basis of myelin-associated glycoprotein adhesion and signalling [J]. *Nat Commun*, 2016, 7:13584.
- [21] Tomita K, Kubo T, Matsuda K, et al. Myelin-associated glycoprotein reduces axonal branching and enhances functional recovery after sciatic nerve transection in rats [J]. *Glia*, 2007, 55(14):1498-1507.
- [22] Zhu X, Li K, Guo X, et al. Schwann cell proliferation and differentiation that is induced by ferulic acid through MEK1/ERK1/2 signalling promotes peripheral nerve remyelination following crush injury in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(3):1915-1921.
- [23] Tabeshpour J, Mehri S, Abnous K, et al. Neuroprotective effects of thymoquinone in acrylamide-induced peripheral nervous system toxicity through MAPKinase and apoptosis pathways in rat [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(5):1101-1112.
- [24] Hichor M, Sampathkumar NK, Montanaro J, et al. Paraquat induces peripheral myelin disruption and locomotor defects: crosstalk with LXR and Wnt pathways [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27(3):168-183.
- [25] Ahmed MM, Hussein MMA. Neurotoxic effects of silver nanoparticles and the protective role of rutin [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90:731-739.
- [26] Mittal R, Kumar A, Singh DP, et al. Ameliorative potential of rutin in combination with nimesulide in STZ model of diabetic neuropathy: targeting Nrf2/HO-1/NF- $\kappa$ B and COX signalling pathway [J]. *Inflammopharmacology*, 2018, 26(3):755-768.
- [27] Thabet NM, Moustafa EM. Protective effect of rutin against brain injury induced by acrylamide or gamma radiation; role of PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$ /NRF-2 signalling pathway [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2018, 124(2):185-193.

(编辑 张立克)