

## 丙烯酰胺抑制大鼠肌注 A 型肉毒毒素后的神经芽生

蔡华英\*, 胡兴越, 蒋 红

(浙江大学附属邵逸夫医院神经内科, 浙江 杭州 310016)

**摘要:** **目的** 观察丙烯酰胺是否能抑制肉毒毒素肌注后的神经芽生,以延长其治疗肌肉过强活动疾病的疗效。**方法** SD 大鼠随机分为肉正常对照组、丙烯酰胺组、肉毒毒素组和毒毒素+丙烯酰胺组。每只大鼠右肢腓肠肌分别肌肉注射 A 型肉毒毒素 5 U 或生理盐水 1 次(0.2 mL),肌注后 d 3, 6, 9, 12, 15, 18 及 21 分别 ip 3% 丙烯酰胺或生理盐水,每次 0.1 mL。肌肉注射肉毒毒素后 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 及 12 周的 8 个时间点评定大鼠右后肢肌力,观察单纤维肌电图和形态学计数神经纤维。**结果** 肉毒毒素组右后肢肌力下降,单纤维肌电图纤维密度测定和病理形态神经纤维计数结果均显示 A 型肉毒毒素肌肉注射后神经芽生现象;单纤维肌电图动作电位平均连续差结果提示出现神经肌肉接头传导异常,12 周可基本恢复正常。加用丙烯酰胺可延缓芽生高峰的时间和抑制芽生程度,并延缓神经肌肉接头功能的恢复。**结论** 应用丙烯酰胺可抑制 A 型肉毒毒素局部注射后神经芽生,延迟肌力恢复。**关键词:** 肉毒杆菌毒素, A 型; 丙烯酰胺; 神经芽生; 肌电描记术; 神经纤维; 神经肌肉接头

中图分类号: R971.8

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2006)02-0125-06

A 型肉毒毒素(botulinum toxin type A)是肉毒梭菌产生的外毒素之一,作为锌肽内切酶作用于突触相关蛋白-25,阻碍乙酰胆碱通过突触裂与突触后膜受体结合,神经肌肉接头传导受阻<sup>[1]</sup>。运用这一机制,局部注射 A 型肉毒毒素成为肌肉过强活动疾

病(如局灶性肌张力障碍)的一种安全、简便和有效的治疗方法<sup>[2]</sup>。但这种治疗方法面临一个难题,即一般在 3~4 个月后肌肉过强活动复发。复发的原因在于神经肌肉接头传导功能恢复,其机制主要是神经芽生,重建神经肌肉接头<sup>[3,4]</sup>。

丙烯酰胺(acrylamide)是引起逆死性神经病变的经典神经毒物。其病理变化符合轴索变性,银染和胆碱酯酶双重染色法发现中毒早期运动神经末梢肿胀,以最末个郎飞结最明显,随着中毒进展,肿胀向近端发展<sup>[5]</sup>。联合这两种药物,丙烯酰胺是否能抑制 A 型肉毒毒素肌肉注射后神经芽生,这在国内外尚未见报道。

本研究采用大鼠右侧腓肠肌局部注射 A 型肉毒毒素制作局部神经芽生模型<sup>[6]</sup>,观察丙烯酰胺对 A 型肉毒毒素肌肉注射后神经芽生的影响,测定神经芽生的病理和电生理情况,以探讨丙烯酰胺抑制神经芽生的可能性,为解决 A 型肉毒毒素肌肉注射后出现神经芽生的难题进行初步尝试。

### 1 材料和方法

#### 1.1 药品和仪器

A 型肉毒毒素注射液,卫生部兰州生物制品研究所生产〔(97)卫药准字(兰)S-01 号〕;丙烯酰胺购自江苏永华化学有限公司。其余试剂均为市售分析纯产品。冰冻切片机为德国莱卡公司 Cryocut 1800 型;显微镜为日本 Olympus 公司 CH30 型;肌电图为丹麦丹迪公司 Keypoint 型,刺激和记录电极均购自丹麦丹迪公司。图文分析仪组成:万能显微镜(德国莱卡公司, Olympus BH-Z 型);彩色摄影仪(Nikon 公司, JVC1381 型);HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文报告分析系统(华中科技大学同济医学院清屏影像公司)。显微摄像仪组成:显微镜(德国莱卡公司, DMR 型);数码摄像机(Nikon 公司, 1200 万像素, DXM 型);ACT-1 显微摄影软件(上海千欣仪器有限公司)。

收稿日期: 2005-06-30 接受日期: 2005-12-30

基金项目: 浙江省卫生厅基金资助项目(491030-W10011)

作者简介: 蔡华英(1977-),女,浙江省嵊州人,医学硕士,主要从事运动障碍疾病临床和基础研究。

\* 联系作者 E-mail: caihuaying@sohu.com Tel: (0571)86006136

## 1.2 动物模型制备及处理

成年健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 130 只, 体重 160 ~ 200 g (清洁度 II 级, 由浙江省医学科学院动物中心提供)。采用随机数字表将大鼠分为 4 组: 正常对照组 10 只, 丙烯酰胺组, 肉毒毒素组及肉毒毒素 + 丙烯酰胺组每组 40 只。除正常对照组外, 给药组常规 PVP-I 消毒后, 每只大鼠右肢腓肠肌分别肌肉注射 A 型肉毒毒素 5 U 或生理盐水 1 次 (0.2 mL), 肌肉注射后 d 3, 6, 9, 12, 15, 18 和 21 分别 ip 3% 丙烯酰胺或生理盐水, 每次 0.1 mL, 共 7 次。丙烯酰胺染毒累积剂量 21 mg, 按体重计算累积剂量范围为 105 ~ 131 mg·kg<sup>-1</sup>。肉毒毒素 + 丙烯酰胺组, 肉毒毒素组和丙烯酰胺组于腓肠肌局部注射肉毒毒素或生理盐水后 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 和 12 周的 8 个时间点随机取 5 只大鼠评定右后肢肌力、检查电生理和形态计数神经纤维。正常对照组未行任何处理, 直接进行上述测定。实验测定采用单盲法。

## 1.3 肌力评分

按 Longa 等<sup>[7]</sup>法对右后肢肌力进行评分: 无神经系统缺损症状为 0 分; 不能完全伸展右侧后肢为 1 分; 转圈为 2 分; 行走时向右侧倾斜为 3 分; 不能自发行走或意识昏迷为 4 分。

## 1.4 单纤维肌电图检查

单纤维肌电图是检测神经肌肉接头的一个敏感指标, 记录一个运动单位内不同肌纤维及其运动终板的电活动, 测量参数有两个: 颤抖 [由平均连续差 (mean consecutive difference, MCD) 表示] 和纤维密度 (电极直径在 300 μm 范围内收集到的单纤维电位的个数)。动作电位 MCD 增加表示神经肌肉接头传递受累; 纤维密度增加表示有神经再支配<sup>[8]</sup>。

大鼠 50 g·L<sup>-1</sup> 硫喷妥钠 (75 mg·kg<sup>-1</sup> ip) 麻醉后固定于实验台, 右后肢去毛, 暴露腓窝, PVP-I 消毒后, 用肌电图仪作电生理检查。刺激同芯圆针电极插入坐骨神经支配腓肠肌分支附近; 记录单纤维针电极插入腓肠肌肌腹, 不断移动针电极直至找到符合条件的单纤维动作电位 (单纤维动作电位的判断标准: 峰-峰幅大于 200 μm; 正峰到负峰的峰-峰时间小于 300 μs; 连续时的波形稳定)<sup>[9]</sup>, 给予频率为 10 Hz, 刺激强度为 4 mA 的电刺激, 稳定连续放电 100 次, 在每只大鼠腓肠肌不同位置收集 6 个单纤维肌电图, 由计算机自动贮存和分析该电位的动作电位 MCD 和肌纤维密度。

## 1.5 病理观察

电生理检查后解剖取得右侧腓肠肌, 行厚度为 20 μm 的冰冻切片, 切片行 Gros-Bielschowsky 银染法<sup>[10]</sup>。每组每个时间点 5 只大鼠, 每只大鼠 2 张切片, 每张切片在光镜下随机选取 1 个低倍视野 (×10), 以 JVC 彩色摄影仪摄取并输入计算机保存, 应用图文报告分析软件 (HPIAS-1000 高清晰彩色病理图文报告分析系统), 计算选取视野内的单位面积内神经纤维数目。同时应用显微摄影仪摄影病理所见。

## 1.6 统计学方法

结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS11.0 统计软件行 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 肉毒毒素与丙烯酰胺联用对肌力的影响

正常对照组肌力为 0。单给丙烯酰胺对肌力无明显影响 (与正常对照组比,  $P > 0.05$ )。肌肉注射 A 型肉毒毒素后 1 周, 大鼠均出现右后肢无力, 但肉毒毒素组于第 6 周开始恢复, 12 周恢复至正常组水平 ( $P > 0.05$ ); 而肉毒毒素 + 丙烯酰胺组于第 8 ~ 10 周开始恢复, 12 周仍未恢复至正常, 说明加用丙烯酰胺延缓了肌力恢复 (表 1)。

### 2.2 肉毒毒素与丙烯酰胺联用对腓肠肌单纤维肌电图的影响

#### 2.2.1 纤维密度

正常对照的纤维密度为  $2.2 \pm 0.4$ 。丙烯酰胺组纤维密度与正常对照组比较无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。图 1 和表 2 结果显示, 肉毒毒素组纤维密度 12 周内均有增加, 4 ~ 6 周达高峰, 提示出现神经芽生。肉毒毒素加用丙烯酰胺后, 纤维密度增加的程度明显降低, 芽生的高峰时间延迟到 8 ~ 10 周, 最大峰值  $4.6 \pm 0.8$  明显低于单给肉毒毒素组的最大峰值  $5.6 \pm 0.7$  ( $P < 0.01$ ), 说明丙烯酰胺抑制了肉毒毒素肌肉注射后的神经芽生程度。

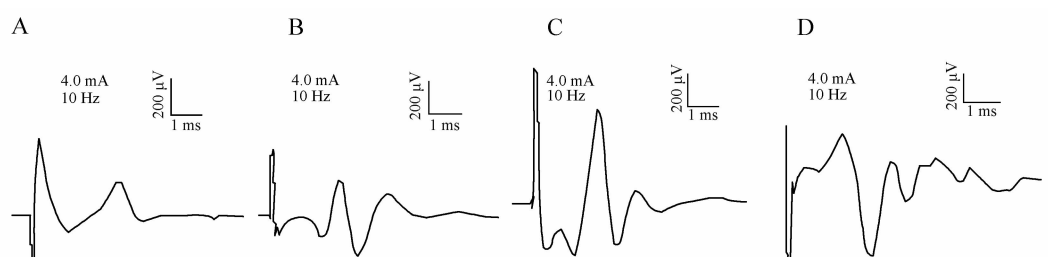
#### 2.2.2 动作电位平均连续差

正常对照组的动作单位 MCD 为  $(33 \pm 4) \mu s$ 。图 1 和表 3 结果显示, 单给丙烯酰胺对动作电位 MCD 无明显影响 (与正常对照组比较,  $P > 0.05$ ); 肌肉注射 A 型肉毒毒素后动作电位 MCD 延长, 提示神经肌肉接头传导异常; 但肉毒毒素组在 3 ~ 6 周延长最明显, 8 ~ 10 周有所改善, 12 周基本恢复正常 (与正常对照组比较,  $P > 0.05$ ); 而肉毒毒素 + 丙

**Tab 1. Effects of botulinum toxin type A (BTXA) and acrylamide (Acr) on muscular power of rats**

Group	Score of muscular power							
	1	2	3	4	6	8	10	12( week)
BTXA	2.4 ± 0.9 **	3.0 ± 0.0 **	3.0 ± 0.0 **	3.0 ± 0.0 **	2.2 ± 0.5 **	1.6 ± 0.6 **	1.2 ± 0.5 **	0.2 ± 0.5
Acr	0	0	0	0	0	0	0	0
BTXA + Acr	2.4 ± 0.9 **	3.0 ± 0.0 **	3.0 ± 0.0 **	3.0 ± 0.0 ** #	3.0 ± 0.0 ** #	2.8 ± 0.5 ** ##	2.2 ± 0.5 ** ##	1.6 ± 0.6 ** ##

Rats were given im into right gastrocnemius signal dose of BTXA 5 U or normal saline (NS) 0.2 mL, then ip 3% Acr or NS 0.1 mL at d 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 21 after BTXA injection. Muscular power was scored at different time after BTXA injection as described by Longa, *et al*<sup>[7]</sup>.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with normal group (without treatment, score of muscular power was 0,  $n = 10$ ); #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with BTXA group.



**Fig 1. Single fiber action potential of gastrocnemius of rats.** Fiber density in Fig A was 2, which was recorded in Acr group at 1 week after injection with BTXA. Fiber density in Fig B, C and D was 3, 4 and 5, respectively, which was recorded in BTXA group at 2, 3 and 4 weeks, respectively, after injection with BTXA. The fiber density increased and mean consecutive difference (MCD) significantly prolonged, which suggests neuromuscular block occur during nerve terminal sprouting.

**Tab 2. Effects of botulinum toxin type A and acrylamide on gastrocnemius fiber density of rats**

Group	Fiber density							
	1	2	3	4	6	8	10	12( week)
BTXA	2.5 ± 0.5 **	4.0 ± 0.7 **	4.9 ± 0.9 **	5.6 ± 0.7 **	5.0 ± 0.7 **	4.2 ± 0.8 **	3.6 ± 0.7 **	3.2 ± 0.8 **
Acr	2.4 ± 0.5	2.2 ± 0.4	2.4 ± 0.5	2.3 ± 0.5	2.3 ± 0.5	2.3 ± 0.5	2.2 ± 0.4	2.3 ± 0.6
BTXA + Acr	2.3 ± 0.5	2.3 ± 0.5 ** #	2.5 ± 0.5 ** ##	2.6 ± 0.5 ** ##	3.8 ± 0.4 ** ##	4.6 ± 0.8 **	4.1 ± 0.7 ** #	3.7 ± 0.7 ** #

See legend of Tab 1 for rat treatments. Fiber density was measured at different time after BTXA injection.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 30$  (5 rats in one group, 6 points in one rat). \*\*  $P < 0.01$ , compared with normal group ( $2.2 \pm 0.4$ ,  $n = 30$ ); #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with BTXA group.

**Tab 3. Effects of botulinum toxin type A and acrylamide on gastrocnemius single fiber action potential mean consecutive difference of rats**

Group	Mean consecutive difference/μs							
	1	2	3	4	6	8	10	12( week)
BTXA	40 ± 9 **	51 ± 10 **	56 ± 9 **	57 ± 8 **	58 ± 7 **	51 ± 6 **	44 ± 8 **	36 ± 7
Acr	31 ± 5	32 ± 4	31 ± 3	35 ± 3	34 ± 4	33 ± 5	32 ± 4	31 ± 4
BTXA + Acr	42 ± 7 **	51 ± 8 **	57 ± 9 **	55 ± 9 **	58 ± 9 **	59 ± 9 ** ##	50 ± 6 ** ##	43 ± 6 ** ##

See legend of Tab 1 for rat treatments. Mean consecutive difference was measured at given time after injection with BTXA or saline into right gastrocnemius.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 30$  (5 rats in one group, 6 points in one rat). \*\*  $P < 0.01$ , compared with normal group [ $(33 \pm 4)$  μs,  $n = 30$ ]; ##  $P < 0.01$ , compared with BTXA group.

烯酰胺组在 8~12 周各个时间点的 MCD 相应值均比肉毒毒素组明显延长,说明加用丙烯酰胺延迟神经肌肉接头功能恢复。

### 2.3 肉毒毒素与丙烯酰胺联用对腓肠肌神经纤维计数的影响

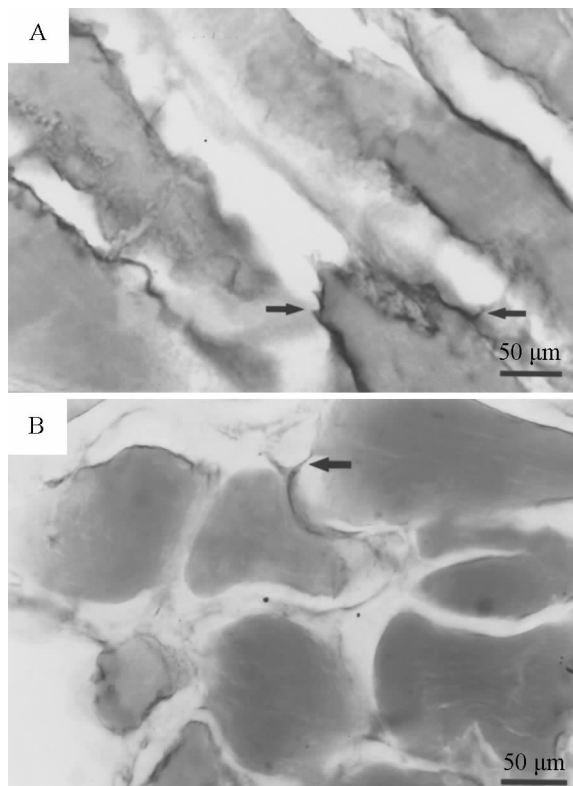
图 2 结果显示,肌肉注射 A 型肉毒毒素后逐渐出现神经芽生,2~3 周可见细而短的芽生神经从轴

突末端发出,随时间延长芽生神经变长,并向邻近肌肉延伸。正常对照组右侧腓肠肌的神经纤维计数为每平方米为  $(5.52 \pm 0.09) \times 10^8$ 。丙烯酰胺组纤维密度与正常对照组比无显著差异 ( $P > 0.05$ )。肉毒毒素组神经纤维数目第 2~12 周均有增加,4~6 周最为明显;肉毒毒素加用丙烯酰胺后,神经纤维增加的程度明显降低,芽生的高峰时间延后到 8~10 周,最大峰值每平方米为  $(10.65 \pm 0.32) \times 10^8$ ,明显低于单给肉毒毒素组的最大峰值每平方米为  $(14.33 \pm 0.45) \times 10^8$  (表 4),说明丙烯酰胺抑制了肉毒毒素肌肉注射后的神经芽生程度。

### 3 讨论

神经芽生有很多评价指标,本研究采用病理和电生理两个指标评价神经芽生。病理采用 Gros-Bieschowsky 银染法显示神经纤维,再结合图文分析软件计数。这种病理计数方法在国内外研究应用较广泛<sup>[3,6]</sup>。电生理采用单纤维肌电图,这是检测神经肌肉接头的一个敏感指标,表明一个运动单位内不同肌纤维及其运动终板的电活动。其测量参数包括颤抖和纤维密度。颤抖反映神经肌肉接头功能,用动作电位 MCD 表示,MCD 增加表示功能受累。纤维密度主要反映同一运动单位肌纤维局部分布情况,侧枝芽生可以重建运动单位,使运动单位内肌纤维增加,表现纤维密度增加。本研究采用病理计数和纤维密度观察神经纤维数目变化,采用肌力评估和动作电位 MCD 代表神经肌肉接头功能<sup>[8]</sup>。

本研究结果表明,A 型肉毒毒素肌肉注射后出现神经肌肉接头传递受累,但于 12 周左右恢复,在恢复过程中出现神经芽生现象和神经肌肉接头功能重塑现象。这与 Santafe 等<sup>[11]</sup>的报道基本一致。加用丙烯酰胺后神经芽生速度和幅度减慢,重建神经



**Fig 2. Light micrographs of nerve fiber after injection of botulinum toxin type A.** A: two to three weeks post-injection of BTXA. It showed several short and thin sprouting from nerve terminal. B: four weeks after injection of BTXA. The sprouts were longer and extended into muscle. Sprouts were indicated by arrows (Gros-Bieschowsky's silver impregnation method<sup>[10]</sup>).

**Tab 4. Effects of botulinum toxin type A and acrylamide on nerve fiber number of rat gastrocnemius**

Group	Nerve fiber number $\times 10^{-8}$ per square meter							
	1	2	3	4	6	8	10	12 (week)
BTXA	$5.67 \pm 0.27$	$8.58 \pm 0.33^{**}$	$11.67 \pm 0.37^{**}$	$14.33 \pm 0.45^{**}$	$14.01 \pm 0.047^{**}$	$12.62 \pm 0.42^{**}$	$10.84 \pm 0.23^{**}$	$8.58 \pm 0.13^{**}$
Acr	$5.58 \pm 0.13$	$5.56 \pm 0.12$	$5.57 \pm 0.12$	$5.53 \pm 0.07$	$5.65 \pm 0.28$	$5.50 \pm 0.09$	$5.48 \pm 0.15$	$5.53 \pm 0.11$
BTXA + Acr	$5.58 \pm 0.12$	$5.62 \pm 0.17^{##}$	$6.84 \pm 0.33^{##}$	$8.54 \pm 0.14^{##}$	$9.72 \pm 0.31^{##}$	$10.41 \pm 0.26^{##}$	$10.65 \pm 0.32^{**}$	$8.47 \pm 0.62^{**}$

See legend of Tab 1 for rat treatments. Nerve fiber number was measured at given time after injection with BTXA or saline into right gastrocnemius.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$  (5 rats in one group, 2 slides each rat, 1 visual field in 1 slide).  $^{**} P < 0.01$ , compared with normal group  $[(5.52 \pm 0.09) \times 10^8$  per square meter,  $n = 10$ ];  $^{##} P < 0.01$ , compared with BTXA group.

肌肉接头延缓。国内外尚未出现合用这两种药物的报道。目前对 A 型肉毒毒素研究较清楚。该毒素可以引起暂时性神经肌肉传导障碍,功能恢复的机制主要是神经芽生,重建神经肌肉接头。神经芽生可从终末分支的郎飞氏结发出,也可以从神经轴突末端接近运动终板的无髓部位发出,并向失神经运动终板区域延伸,最终成熟为该范围的神经肌肉接头<sup>[11,12]</sup>。而丙烯酰胺是经典神经毒物,引起由远及近的轴索肿胀、变性。据报道,丙烯酰胺损害周围神经的机制可能包括抑制轴浆运输、抑制糖代谢相关酶从而抑制能量代谢和钙超载等<sup>[13~16]</sup>。作者推测这些因素可能导致神经轴突末端能量和原料缺乏,使神经芽生受阻,从而抑制了 A 型肉毒毒素肌肉注射后神经芽生和神经肌肉接头重塑。确切机制尚需进一步研究。

本研究所用剂量范围的丙烯酰胺抑制了局部注射 A 型肉毒毒素的腓肠肌处的神经芽生,但没有影响正常肌肉的神经肌肉接头功能,没有出现神经功能受损的表现(如后肢无力、行走无力)和神经损伤后的神经再生现象。这可能与丙烯酰胺剂量和神经中毒敏感不同有关。据报道,丙烯酰胺中毒与毒物累积剂量有关:SD 大鼠染毒累积剂量达  $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  出现轴浆运输减慢,  $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  出现神经传导速度减慢,  $225 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  出现神经症状(后肢无力等)<sup>[17,18]</sup>。而本研究染毒剂量为  $105 \sim 131 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。其次周围神经中毒敏感性有差异。文献报道,无论实验动物还是人类均以下肢症状最重,这是因为粗大有髓纤维最易受累。周围神经以坐骨神经最敏感,其中又以腓肠肌肌梭内的神经最早出现轴索变性,可能与坐骨神经蓄积量比其他部位高有关<sup>[19]</sup>。

本研究结果表明,丙烯酰胺有抑制 A 型肉毒毒素肌肉注射后神经芽生的作用,不失为延长 A 型肉毒毒素疗效时间的一种探索,为解决 A 型肉毒毒素肌肉注射后出现神经芽生的问题提供一种思路和基础研究的积累,是否有临床意义需要进一步研究。另外丙烯酰胺有潜在的神经毒性、遗传毒性和致癌性问题,故尚需进一步探索注射部位和最佳剂量及其全身毒副作用。

#### 4 参考文献:

- [1] Blasi J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, De Camilli P, et al. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25 [J]. *Nature*, 1993, **365**(6442):160–163.
- [2] Wang YC, Tang XF. Botulinum toxin and it's clinical use[J]. *Chin J Neuroimmunol Neurol* (中国神经免疫学和神经病学杂志), 1996, **3**(2):124–127.
- [3] Brin MF. Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxicity, and immunology[J]. *Muscle Nerve*, 1997, **6**(Suppl):S146–S168.
- [4] Juzans P, Comella JX, Molgo J, Faille L, Angaut-Petit D. Nerve terminal sprouting in botulinum type-A treated mouse levator auris longus muscle [J]. *Neuromuscul Disord*, 1996, **6**(3):177–185.
- [5] He F. Occupational toxic neuropathies – an update[J]. *Scand J Work Environ Health*, 1985, **11**(5):321–330.
- [6] Pestronk A, Drachman DB. Motor nerve outgrowth: reduced capacity for sprouting in the terminals of longer axons[J]. *Brain Res*, 1988, **463**(2):218–222.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, **20**(1):84–91.
- [8] Lu ZN, Wang ZZ. Single fiber electromyography and other technology evaluating motor unit[A]. In: Lu ZN, Zeng QX, Li CY, eds. *Practical Electromyography* (实用肌电图) [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2000. 580–585.
- [9] Lu ZN, Wang ZZ. Single fiber electromyography and other technology evaluating motor unit[A]. In: Lu ZN, Zeng QX, Li CY, eds. *Practical Electromyography* (实用肌电图) [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2000. 579.
- [10] Angaut-Petit D, Molgo J, Comella JX, Faille L, Tabti N. Terminal sprouting in mouse neuromuscular junctions poisoned with botulinum type A toxin: morphological and electrophysiological features [J]. *Neuroscience*, 1990, **37**(3):799–808.
- [11] Santafe MM, Urbano FJ, Lanuza MA, Uchitel OD. Multiple types of calcium channels mediate transmitter release during functional recovery of botulinum toxin type A-poisoned mouse motor nerve terminals[J]. *Neuroscience*, 2000, **95**(1):227–234.
- [12] Meunier FA, Schiavo G, Molgo J. Botulinum neurotoxins: from paralysis to recovery of functional neuromuscular transmission [J]. *J Physiol Paris*, 2002, **96**(1–2):105–113.
- [13] Miller MS, Miller MJ, Burks TF, Sipes IG. Altered retrograde axonal transport of nerve growth factor after sin-

- gle and repeated doses of acrylamide in the rat[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1983, **69**(1):96–101.
- [14] Sickles DW, Stone JD, Friedman MA. Fast axonal transport: a site of acrylamide neurotoxicity[J]? *Neurotoxicology*, 2002, **23**(2):223–251.
- [15] Costa LG, Deng H, Calleman CJ, Bergmark E. Evaluation of the neurotoxicity of glycidamide, an epoxide metabolite of acrylamide: behavioral, neurochemical and morphological studies[J]. *Toxicology*, 1995, **98**(1–3):151–161.
- [16] Hao QY, Han MF, Rao ML. Effect of acrylamide on the ions in nerve tissue of 6J mouse[J]. *Chin J Ind Med* (中国工业医学杂志), 2000, **13**(5):265–267.
- [17] Dong XM, He FS. Research of nerve biochemistry in rats poisoned with acrylamide[J]. *Foreign Med Sci Section Hygiene* (国外医学卫生学分册), 1990, **17**(2):78–80.
- [18] Li G, Zhang SL, He FS. Research of nerve electrophysiology in rats poisoned with acrylamide[J]. *J Hyg Res* (卫生研究), 1989, **18**(6):4–6.
- [19] Dong XM, Jiao XY, He FS. Research of nerve pathology in rats poisoned with acrylamide[J]. *J Hyg Res* (卫生研究), 1989, **18**(5):44–48.

## Acrylamide inhibits terminal sprouting triggered by botulinum toxin type A in rats

CAI Hua-Ying\*, HU Xing-Yue, JIANG Hong

(Department of Neurology, Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

**Abstract: AIM** To evaluate if acrylamide can inhibit nerve terminal sprouting to prolong the muscle relaxation effect of botulinum toxin type A (BTXA). **METHODS** SD rats were divided randomly into normal, acrylamide, BTXA and BTXA + acrylamide groups. Right gastrocnemius of the rats was injected im BTXA 5 U in BTXA + acrylamide and BTXA groups and normal saline (NS, 0.2 mL) in acrylamide group. At d 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 21 after injection of BTXA or NS, 3% acrylamide or NS (0.1 mL) was injected ip, respectively. At 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 and 12 weeks after im BTXA or NS, muscular power of right lower limb was scored by the method of Longa, *et al*, the fiber density and action potential mean consecutive difference of right gastrocnemius were examined by single fiber electromyogram, and the morphologic nerve fiber analysis was carried out. **RESULTS** After im BTXA, muscular power of right lower limb decreased; increased fiber

density and morphologic nerve fiber analysis revealed terminal sprouting; and prolonged mean consecutive difference revealed abnormal function of neuromuscular junction; which almost recovered in 12 weeks after injection of BTXA. Acrylamide inhibited the nerve terminal sprouting number, postponed the peak time of nerve terminal sprouting, and delayed recovery of neuromuscular junction function. **CONCLUSION** Acrylamide inhibits both the terminal sprouting and the functional recovery of neuromuscular junction.

**Key words:** botulinum toxin type A; acrylamide; nerve terminal sprouting; electromyography; nerve fibers; neuromuscular junction

**Foundation item:** The project supported by Health Bureau of Zhejiang Province(491030-W10011)

\* Corresponding author.

(本文编辑 董立春)