论著

文章编号:1000-5404(2006)16-1682-03

大鼠坐骨神经缺损后不同时间修复的效果比较

许愿忠,郑林丰,张建伟,王 瑞,谢乐斯,曾志成 (中南大学湘雅医学院人体解剖学与神经生物学系,长沙 410013)

提 要: 目的 比较大鼠坐骨神经缺损不同延迟时间后修复的再生效果。**方法** 大鼠右侧坐骨神经缺损分别预变性0、3、7、14和21 d后,用对侧坐骨神经桥接,术后6周分别行快蓝(Fast blue)逆行荧光示踪、胫前肌湿重称量、再生轴突数目、直径及髓鞘厚度等检测。**结果** 预变性7 d组的再生轴突数目多、直径大、髓鞘厚,明显优于其他组;3 d组与0 d组无明显差别,14 d和21 d组相对较差。**结论** 不同延迟时间后修复神经缺损可以对神经再生效果产生不同的影响,以7 d时再生效果最佳。

关键词: 神经缺损;预变性;修复;再生;大鼠

中图法分类号: R361.1;R364.3;R651.3 **文献标识码**: A

Comparing the regeneration of sciatic nerve defects repaired after different predegeneration time in rats

XU Yuan-zhong, ZHENG Lin-feng, ZHANG Jian-wei, WANG Rui, XIE Le-si, ZENG Zhi-cheng (Department of Anatomy & Neurobiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: Objective To compare the regeneration of sciatic nerve defects after different predegeneration time in rats. Methods The defects of sciatic nerve were bridged with contralateral autografts after the predegenerative time of 0, 3, 7, 14 and 21 d respectively in rats. The regenerated nerve of all groups were assessed and compared by quantifying the wet weight of tibialis anterior muscles, Fast blue fluorescence retrograde tracing, regenerated axons counting, and measuring the diameter and myelin thickness of the regenerated axons at 6 weeks after operation. Results The regenerated axons of predegenerated 7 d group showed more quantity, larger diameter and thicker myelin than the other groups. No significant differences were detected between predegenerated 0 d and 3 d group; Predegenerated 14 d and 21 d group showed poor regeneration. Conclusion The findings show there are different effects on the regeneration of nerve defects after predegeneration of different time. Seven days for predegeneration can obtain an optimal results.

Key words: nerve defects; predegeneration; repair; regeneration; rat

周围神经缺损的桥接修复问题一直以来备受学者关注,近年来很多新的桥接材料和方法更是不断出现:有研究者发现,用经过预变性处理的桥接材料修复神经缺损可以取得较好的再生效果[1,2]。经过预变性处理的桥接材料可以缩短再生启动延迟期、便于雪旺细胞形成Bungner带和促进轴突的延伸,并且研究证实预变性处理7~14 d是提高再生效果的最佳预变性时间[3,4]。需要修复周围神经损伤的患者在中国每年大约有数十万,但很多患者由于身体状况、缺损太长或是材料来源等原因无法行一期手术修复;这种未能及时修复的神经缺损在体内经过一段时间的变性后,行二期手术修复究竟会阻碍神经再生还是会产生与移植预变性桥接物相同的促进再生的效果,尚少见文献报道。因此本实验通过观察和对比大鼠坐骨神经缺损不同延迟时间后修复的再生效果,希望为探讨周围神经损伤二期修复的可能性提供实验证据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年SD大鼠31只,由中南大学湘雅医学院动物学部提供,雌雄不拘,体质量(200±20) g,用随机数字表随机分为

基金项目:湖南省卫生厅资助项目(B2003-007)
Supported by the Foundation of Public Health Department of Hunan Province (B2003-007)

作者简介:许愿忠(1978-),男,河南省商丘市人,博士研究生,助教,主要从事周围神经损伤与修复方面的研究。E-mail: prayerxu@hotmail.com

通讯作者:曾志成,电话:(0731)2650426,E-mail: zengzhicheng08@126.com

收稿日期:2005-08-02;**修回日期**:2005-10-27

右侧坐骨神经切断立即桥接组（即预变性 0 d 组）和预变性 3、7、14、21 d 后桥接组，每组 6 只动物。另取 1 只作为正常对照。

1.2　方法

1.2.1　动物模型　　2% 戊巴比妥钠经腹腔注射麻醉（40 mg/50 g），右下肢股后区中部切口，暴露并分离坐骨神经，于梨状肌下 5 mm 处切断并造成长约 6 mm 的缺损；体内预变性 0、3、7、14 和 21 d 后，原切口处再次暴露神经，修剪神经两断端使其缺损长度为 10 mm；同样方法暴露、分离左侧坐骨神经，切取长 12 mm 的无分权段神经干，倒置后“搭桥”于右侧神经缺损两断端之间，9-0 医用尼龙缝合线外膜缝合，每端 3 针，针距夹角 120°。手术步骤均在手术显微镜下完成。术后动物分笼饲养，给予抗生素预防感染，存活 6 周。

1.2.2　动物观察　　观察术后动物步态变化、溃疡发生及愈合时间、肌肉萎缩和恢复情况、肢体感觉和运动功能恢复情况。

1.2.3　快蓝逆行荧光示踪　　动物处死前 7 d，术侧坐骨神经桥接远端神经干上微量注射 2% 快蓝（Sigina 公司）1.0 μl。存活到期后过量 2% 戊巴比妥钠腹腔注射深麻动物，开胸，暴露心脏，经左心室插管入升主动脉，快速灌注生理盐水约 200 ml 冲洗血液，随后灌注含 0.5% 戊二醛和 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液（PB，pH 7.2 ~ 7.4）约 400 ml，时间持续 30 min 以上。灌注完毕立即取出双侧下肢胫前肌、L_{4-6} 背根节（dorsal root ganglion，DRG）和相应节段脊髓、桥接物远段 3 mm 长神经。DRG 和脊髓标本入 4% 多聚甲醛后固定 2 h，然后入 15% 和 30% 梯度蔗糖（0.1 mol/L PB）溶液内至标本沉底；连续冰冻切片，片厚 20 μm。裱片后 Motic 荧光显微镜下观察。

1.2.4　胫前肌湿重称量　　各组动物双侧下肢胫前肌去除结缔组织，滤纸吸干水份后用精密电子称称量。

1.2.5　半薄切片　　神经桥接物远段标本入 2.5% 戊二醛溶液内后固定 24 h，0.1 mol/L PB 漂洗 10 min × 3 次，1% 锇酸固定过夜，梯度丙酮脱水，Epon812 包埋，修块，超薄切片机做横断面 0.95 μm 切片。1% 美蓝 + 1% 硼酸溶液染色。

1.3　数据采集和统计学分析

Motic advanced 3.2 彩色病理图像分析系统下逆行示踪标本每例随机取 DRG 和脊髓切片各 10 张，100 × 镜下计数每张切片内所有轮廓清晰的标记细胞。半薄切片每例随机取 5 张切片，每张切片随机取 5 个 40 × 视野，镜下计数每个视野内的再生轴突数目、测量再生轴突直径和髓鞘厚度。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件，各组之间均数比较用单因素方差分析（ANOVA），同一组动物左右侧比较用 t 检验。

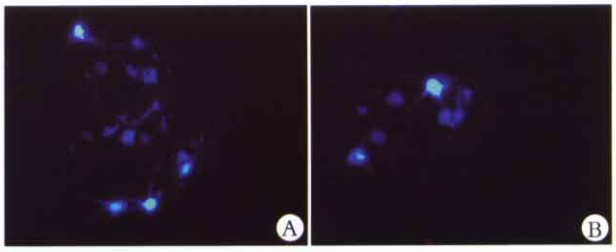
2　结果

2.1　动物观察

各组动物术后下肢立即瘫痪，术区无感染发生。双侧下肢两周时均出现溃疡，6 周时基本愈合，右侧溃疡均早于左侧。6 周时逆行示踪针刺桥接的坐骨神经干和针刺足底皮肤可引起同侧肌肉的收缩。手术显微镜下，桥接段神经粗细均匀，吻合口消失，再血管化良好。

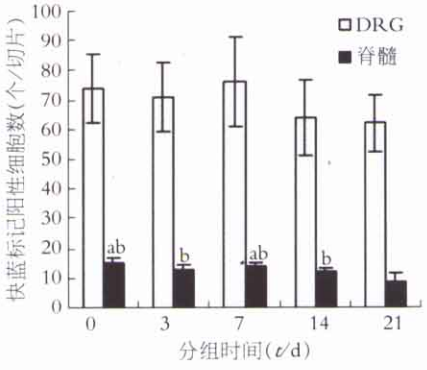
2.2　快蓝逆行荧光示踪

各组动物右侧 DRG 和脊髓前角均出现快蓝标记的阳性神经元，被标记的神经元呈现典型的圆大空形态（图 1）；DRG 内快蓝阳性神经元数目较多，轮廓清晰，各组之间无明显差别（$P > 0.05$）；脊髓前角被标记的运动神经元数目相对较少，突起明显，其中 0 d 组明显多于 14 d 和 21 d 组（$P < 0.05$），而 0、3、7 和 14 d 组又分别多于 21 d 组且差别具有统计学意义（$P < 0.05$），见图 2。



A：对照组；B：21 d 组

图 1　快蓝逆行荧光示踪结果　（快蓝 × 100）



a：$P < 0.05$，与 14 d 组比较；b：$P < 0.05$，与 21 d 组比较

图 2　DRG 和脊髓前角内快蓝标记的阳性细胞计数

2.3　胫前肌湿重称量

神经切断后双下肢胫前肌均发生萎缩；动物处死时左侧胫前肌未见恢复，右侧有不同程度恢复且相对饱满、红润。各组动物左侧失神经支配胫前肌湿重无明显差别（$P > 0.05$），右侧胫前肌湿重明显增加，与左侧相比差别均具有统计学意义（$P < 0.05$）；预变性 0、3、7 和 14 d 组的胫前肌湿重无明显差别（$P > 0.05$），均大于 21 d 组且差别具有统计学意义（$P < 0.05$），见表 1。

表 1　双侧下肢胫前肌湿重称量（$n = 6$，g）

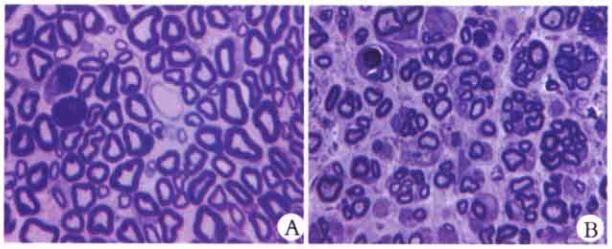
组别	对照侧	手术侧
0 d	0.1867 ± 0.0121	0.2583 ± 0.0445^{ac}
3 d	0.1717 ± 0.0147	0.2567 ± 0.0398^{ac}
7 d	0.1750 ± 0.0217	0.2600 ± 0.0167^{ac}
14 d	0.1867 ± 0.0121	0.2550 ± 0.0302^{ac}
21 d	0.1800 ± 0.0126	0.2000 ± 0.0089^{b}

a：$P < 0.05$，与 21 d 组比较；b：$P < 0.05$，c：$P < 0.01$，与对照侧比较

2.4　半薄切片神经干轴突观察

正常神经干内轴突数量多、排列整齐，直径大小均一，髓鞘厚度基本一致，轴突之间无髓鞘崩解碎片（图 3A）。各组桥接物远段标本均出现大量再生神经纤维，再生轴突呈束状分布，

可见有再生微血管形成(图3B)。各实验组中以预变性7 d组再生轴突数量最多,与其他组相比差别均具有统计学意义($P<0.05$);0 d组再生轴突数量明显多于21 d组($P<0.05$),与3 d和14 d组之间无明显差别($P>0.05$)。7 d组再生轴突直径大小相对均一,分布相对均匀,平均直径明显大于其他组($P<0.05$);0 d和3 d组之间平均轴突直径无明显差别,均明显大于14 d和21 d组($P<0.05$),14 d和21 d组之间差别无统计学意义($P>0.05$)。平均髓鞘厚度7 d组最厚,与其它组相比有统计学意义($P<0.05$);0 d组平均髓鞘厚度明显厚于14 d和21 d组($P<0.05$)。3 d和14 d组及14 d与21 d组之间差别无统计学意义($P>0.05$)。见表2。



A: 对照侧; B: 7 d组

图3 神经再生半薄切片结果 (1%美蓝+1%硼酸染色 ×1000)

表2 再生轴突数目计数和直径与髓鞘厚度测量($n=6$)

组别	轴突数目(个)	直径(μm)	髓鞘厚度(μm)
0 d	698.0±39.1[c]	4.09±0.49[bc]	0.86±0.08[bc]
3 d	671.0±80.0	3.98±0.48[bc]	0.81±0.08[c]
7 d	815.0±85.1[a]	4.63±0.29[a]	1.00±0.11[a]
14 d	654.0±114.8	3.47±0.09	0.72±0.04
21 d	582.0±108.4	3.11±0.27	0.69±0.05

a: $P<0.05$,与0、3、14、21 d组比较; b: $P<0.05$,与14 d组比较; c: $P<0.05$,与21 d组比较

3 讨论

为神经再生提供适宜的微环境可以提高再生效果。研究表明,移植经过预变性处理的桥接材料被认为是一种较为可行的提高神经再生的方法[1,2],然而神经损伤在体内经过不同时间的预变性处理后二期修复的再生效果到底如何尚少见有详细的报道。本实验结果显示:术后6周各组动物术侧萎缩的胫前肌均出现不同程度的恢复,DRG和脊髓前角均出现大量被快蓝逆行标记的阳性神经元,说明虽然经过不同时间的延迟,神经缺损在修复后均出现了再生。组织学观察结果进一步证实了大量再生轴突确实长过了桥接物段。通过对各实验组胫前肌湿重、快蓝逆行示踪和再生轴突数量、直径及髓鞘厚度等各项指标综合比较发现:再生效果以7 d组最佳;0 d和3 d组再生效果次之,两组之间无明显差别;14 d组再次之,以21 d组再生效果相对最差。

修复周围神经缺损的关键是恢复其解剖学连续性,移植预变性处理的桥接物可以提高神经再生效果,因为其再生延迟期缩短、轴突生长速度加快。李存孝等[3]研究发现预变性2周是移植的最佳时间,并且"新鲜受体床+预变性2周神经移植物"的再生起初延迟期明显比"预变性2周受体床+新鲜神经移植物"长[3]。本实验中预变性7 d组的再生效果明显好于其它组,我们认为可能是如下原因造成的:①神经损伤后两断端发生瓦勒(Wallerian)变性,髓鞘崩解,Schwann细胞分泌大量神经营养因子并且在7 d时形成了Bungner带;②神经元胞体对损伤信号应答,7 d时合成了大量轴突生长所需的物质,桥接后可以及时、迅速的启动再生过程;③预变性神经元胞体对神经再生的增强效应与因移植物变性而产生第二次轴突再生加速期相互衔接。过去认为损伤后立即修复有利于神经再生,0 d和3 d组的再生效果明显不如7 d组的主要原因可能是由于神经两断端的瓦勒变性过程时间较短,Schwann细胞分泌的神经营养因子不足,神经元胞体尚未合成足够再生需要的各种物质使其再生延迟期相对较长;而损伤后立即桥接(0 d)组由于轴浆流失相对较少,其再生效果又稍好于3 d组。体内预变性14和21 d后再行修复由于神经长时间未能恢复其解剖学连续性,可能造成了神经元胞体功能降低甚至死亡且神经断端形成了神经瘤,对桥接后的再生效果产生了非常不利的影响[4],以延迟21 d组最为明显。

综上所述,不同延迟时间后修复神经损伤对再生效果可以产生不同的影响,预变性7 d后修复可以获得较好的再生效果。这些实验结果,为我们在临床上治疗不能行一期手术修复的神经损伤患者具有指导意义。

参考文献:

[1] KREKOSKI C A, NEUBAUER D, GRAHAM J B, *et al*. Metalloproteinase-dependent predegeneration *in vitro* enhances axonal regeneration within acellular peripheral nerve grafts[J]. J Neurosci, 2002, 22(23): 10408-10415.

[2] MARCOL W, KOTULSKA K, LARYSZ-BRYSZ M, *et al*. Extracts obtained from predegenerated nerves improve functional recovery after sciatic nerve transection[J]. Microsurgery, 2005, 25(6): 486-494.

[3] 李存孝, 李稔生, 殷 琦. 预变性神经移植的时限[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(8): 983-985.

[4] 张文捷,周 跃,陈 菁,等. GDNF基因修饰的雪旺细胞对大鼠空骨神经缺损的修复作用[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(20): 1926-1829.

(编辑 陈聪连)