文章编号:1000-5404(2006)16-1723-03

技术方法

周围神经再生的特异性动物模型研究

易西南[1],郑林丰[2],张建伟[2],罗学港[2],许愚忠[2] ([1]海南医学院人体解剖学教研室,海口 571101;[2]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 为研究周围神经感觉神经或运动神经再生特异性提供一种较理想的动物模型。**方法** SD大鼠随机分为实验组和假手术组。实验组动物被撕脱一侧腰交感干和切除2~5腰神经(lumbar nerve 2~5,L_2~L_5)后根,取出第2骶神经(sacral nerve 2,S2)前根一段转移至术侧大腿皮下保存;术后2周行乙酰胆碱酯酶组织化学染色分析及"Y"形管实验,即分别切断实验组动物术侧隐神经和股神经,假手术组动物一侧的坐骨神经,近端分别插入"Y"形管的近端,10 mm长的自体隐神经远端片段和S2前根片段分别插入两远端,再存活4周,比较"Y"形管内两远端管再生轴突数量。**结果** 去交感的隐神经乙酰胆碱酯酶染色基本呈阴性,去后根的股神经肌支无改变;去交感的隐神经纤维优先长入远端性感觉管,股神经肌支优先长入远端性运动管。**结论** 本模型可以获得单纯的感觉或运动纤维,结合"Y"形管实验对感觉和运动纤维再生的特异性研究可能获得更准确的结果。

对周围神经再生的感觉和运动特异性的认识存在争议。作者认为缺乏理想的纯感觉和纯运动神经再生模型是导致争议的主要原因[1-5],本研究旨在探索一种新的可以用于周围神经感觉和运动纤维特异性研究的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年SD大鼠36只,雌雄不限,体质量(200±20)g(中南大学湘雅医学院实验动物学部提供)。采用2%戊巴比妥钠(40 mg/kg体质量)腹腔注射麻醉。

1.2 纯感觉和纯运动神经的动物模型的制备

动物被随机分为实验组($n=24$)和假手术组($n=12$),采用去交感成份的隐神经作为纯感觉神经,具体方法是:经腹直肌纵切口,暴露腹腔,于主动脉前方切开后腹膜,暴露主动脉及左侧腰大肌,近主动脉旁分离腰大肌,在手术显微镜下(上海光学仪器厂)暴露腰丛及交感干,保护好腰丛,在左肾动脉上方约5 mm处(相当于第12胸椎体下缘水平)切断交感干,向下轻轻撕脱,并向下清理各椎间孔附近软组织,以保证各交通支均已撕脱,缝合后腹膜及腹壁各层。假手术组至分离腰大肌为止。采用去后根的股神经肌支作为纯运动神经,具体方法为:上述动物转取俯卧位,行椎骨序数定位后,于第12胸神经到L6水平作后正中纵切口,剥离棘突及椎板附着软组织后,咬除椎板暴露椎管,剪开硬脊膜及蛛网膜后,暴露马尾,在手术显微镜下放大15倍,用玻璃弯钩轻轻提起左侧后根并稍向左侧分离,即可见后根连着脊神经节,判断无误后,将L1~L6后根切除一段,长约5 mm。并取S2前根一段,长约10 mm,埋至左侧大腿皮下备用。缝合脊柱附近筋膜以封闭椎管,最后缝合皮肤。假手术组至暴露马尾为止。存活2周后,每组6只被用于乙酰胆碱酯酶组化染色,6只被用于"Y"形管实验。

1.3 "Y"形管实验

实验组被分为纯感觉组(A组)、纯运动组(B组)两亚组,假手术对照组为C组。分别切断术侧隐神经、股神经肌支和坐骨神经,其近端连同部分软组织插入内径为2 mm的"Y"形硅胶管近端口内,"Y"形管两远端分别置入10 mm长的同侧隐神经远端组织块和预埋入股内侧的自体S2前根,远近两端组织间距5 mm,用骨蜡将神经与"Y"形管的3个端口密封固定。术后再存活4周。

1.4 灌注取材

2%戊巴比妥钠深度麻醉,开胸,经左心室插管至升主动脉,以温生理盐水100~150 ml快速灌注冲洗血液,待血液冲洗干净后再用含4%多聚甲醛的0.1 mol/L的磷酸缓冲液(pH 7.2~7.4)300~400 ml灌注,先快后慢,灌注时间不少于30 min。乙酰胆碱酯酶组化染色的动物取连同周围软组织的双侧股神经、隐神经及坐骨神经。"Y"形管桥接动物取出"Y形管"两远端管内再生神经。

1.5 乙酰胆碱脂酶组化染色

组织取材后,恒冷切片机切片,切片厚8 μm。采用Karnovskey-Roots法[6]进行染色,切片自然干燥后入孵育液,37度恒温孵育2 h,蒸馏水洗,封片,普通光镜下观察。

1.6 "Y"形管两远端管内再生轴突计数

"Y"形管两远端管内再生神经标本常规超薄切片(片厚0.95 μm),1%美蓝+1%硼酸溶液染色。每个标本随机取5张切片,每张切片随机取3个视野,在放大400倍下计数每一视野的有髓纤维数目。

1.7 统计学方法

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.0统计软件包处理,同一"Y"形管两远端间的比较用t检验。

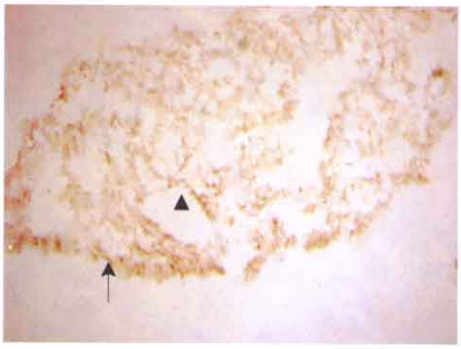
2 结果

2.1 乙酰胆碱酯酶组化染色

骨骼肌和交感神经纤维乙酰胆碱酯酶组化染色呈强阳性(金黄色,图1),躯体运动纤维呈阳性(黄色),感觉纤维呈阴性(不着色,图1)。正常隐神经及假手术组隐神经干中均含强阳性纤维,并呈成束分布,交感干撕脱组的隐神经阳性纤维基本消失。正常及假手术组股神经肌支部分纤维呈阳性,后根切断

基金项目:海南省自然科学基金资助项目(2004-80439)
Supported by the National Natural Science Foundation of Hainan Province (2004-80439)
作者简介:易西南(1962-),男,湖南省醴陵市人,博士,教授,主要从事周围神经损伤与修复方面的研究,发表论文30余篇。电话:(0898)68126468, E-mail:yixinan2000@yahoo.com.cn
通讯作者:罗学港,电话:13508485450
收稿日期:2005-09-27;修回日期:2006-03-23

后，阳性纤维的分布无改变。

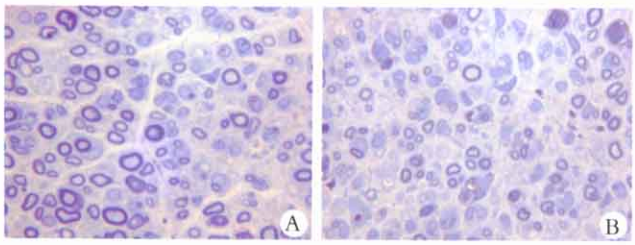


↑：金黄色泻阳性纤维；▲：阴性纤维

图1　坐骨神经乙酰胆碱酯酶组织化学　（乙酰胆碱酯酶组织化学染色×200）

2.2　"Y"形管两远端管内再生轴突计数

术后4周时，已有轴突长入两远端管内的神经组织，高倍镜下见长入的轴突主要为无髓和薄髓纤维，直径细小，不成束，雪旺氏细胞（schwann cell，SC）呈增生象，细胞核大而明显（图2）。实验组A组感觉内膜管远端纤维（图2A）及B组运动内膜管远端纤维直径较粗，髓鞘较厚。计数各组两远端长入"Y"形管远端轴突，A组感觉远端（948±91）个，运动远端（688±80）个，感觉远端数目多于运动远端数目，差异有显著性（$P<0.05$）；B组感觉远端（558±73）个，运动远端（931±93），运动远端多于感觉远端，差别有统计学意义（$P<0.05$）；C组感觉远端（786±95），运动远端772±82两远端比较无统计学意义（$P>0.05$）。



A：纯感觉组（A组）感觉内膜管远端，B：纯感觉组（A组）运动内膜管远端

图2　术后4周，"Y"形管远端再生神经组织，半薄切片　（美蓝×1 000）

3　讨论

3.1　现有周围神经再生特异性研究模型的缺陷

再生轴突的生长具有组织特异性，解剖学特异性，感觉和运动特异性[1,2]。对感觉和运动特异性的认识存在争议[1~3,5]。Brushart认为再生轴突向远端生长是随机的，但长入到运动内膜管的运动轴突能存活，而长入到感觉内膜管的运动轴突会夭折，并称此现象为"选择性运动神经再生"，感觉性轴突不具有这种选择性生长特性[2]。但是，Marki等[1]观察到感觉轴突优先长入远端感觉神经干，认为感觉性轴突较运动轴突更具有选择性生长特性。作者认为造成上述争议的原因，应归结于二者都未能设计好模型[1,2]。Brushart等[2,3]用切断的股神经肌支（当作运动神经）近端插入"Y"形管的近端口，两远端口分别插入股四头肌支和隐神经（当作感觉神经），用辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）逆行示踪法计数脊髓运动细胞数，发现运动纤维容易长入远端的肌支，而不容易长入到隐神经。作者认为此模型存在两大明显缺陷：一是用此模型不能考察感觉纤维的再生特异性；二是由于远端股四头肌支存在有50%～60%感觉纤维，无法排除长入到这些感觉纤维内膜管的再生运动纤维的存在。Marki等[1]设计了用L5前根作为纯运动支，隐神经作为纯感觉支，将二者分别插入Y形管的近端，将1 cm长的前根片段或隐神经片段分别置入Y形管的两远端，远近端留有5 mm间隙，6周后比较两远端管再生纤维的数量，发现L5前根和隐神经再生轴突都容易长入远端的隐神经内膜管，而不容易长入远端亦有研究者观察到感觉轴突优先长入远端感觉神经干。此模型的缺陷是近、远端的隐神经都含有交感纤维成份，既不能排除再生的交感纤维的影响，也不能排除远端交感神经内膜管对感觉纤维和运动纤维再生诱导的影响。

3.2　理想的感觉和运动再生特异性研究模型

SC在引导周围神经再生中发挥着重要作用[1]。有研究认为，运动和感觉神经的SC可能存在着不同的生物学行为，如果感觉和运动特异性存在的话，SC很可能起重要作用[1,5]。理想的感觉和运动再生特异性研究模型应该是近端神经干只含有单一的感觉纤维或运动纤维，而"Y"形管的两远端应该分别置入感觉和运动内膜管或SC，这样才可以精确考查两种SC对不同性质的轴突的诱导作用。事实上，活体中没有任何一条周围神经是纯运动或是纯感觉神经，同时也不容易获取单纯的运动SC或感觉SC。因而为此方面的研究带来困难。

3.3　本模型的优势与不足

本模型采用剔除了交感成份的隐神经近端作为纯感觉纤维，切除了相应后根的股神经肌支近端作为纯运动纤维，分别插入"Y"形管的近端。通过乙酰胆碱酯酶组化染色证明可以达到这一目的。但是，手术过程复杂，动物死亡率高。用变性的脊神经前根片段代替运动SC插入"Y"形管的一个远端，在理论上是可行的，但是要转移保存自体神经片段，并维持其华勒氏变性过程有一定困难，本研究采用转移埋植到大腿皮下的方法来处理，结果显示有一定的可行性。因为在去交感成份后2周，存在于隐神经中的与交感纤维有关的SC经历了溃变后的增生和转化，绝大多数SC可能已经失去了原有的生物学特性甚至转变成为了纤维细胞，对再生轴突的影响可能减小，所以用去交感成份的隐神经片段可以代替感觉SC插入"Y"形管的另一远端，但有必要进一步就此方面进性深入研究。

关键词：神经再生；组织特异性；动物模型

中图法分类号：R-322；R338　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] MAKI Y. Specificity in peripheral nerve regeneration: a discussion of the issues and the research[J]. J Orthop Sci, 2002, 7(5): 594-600.

[2] BRUSHART T M, GERBER J, KESSENS P, *et al*. Contributions of pathway and neuron to preferential motor reinnervation[J]. J Neurosci, 1998, 18(21): 8674-8681.

[3] ROBINSON G A, MADISON R D. Preferential motor reinnervation in the mouse: comparison of femoral nerve repair using a fibrin sealant or suture[J]. Muscle Nerve, 2003, 28(2): 227-231.

[4] TSUBOKAWA N, MAKI Y, YOSHIZU T, *et al*. Comparison of the neurotropic effects of motor and sensory Schwann cells during regeneration of peripheral nerves[J]. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, 1999, 33(4): 379-385.

[5] SULAIMAN O A, MIDHA R, MUNRO C A, *et al*. Chronic Schwann cell denervation and the presence of a sensory nerve reduce motor axonal regeneration[J]. Exp Neurol, 2002, 176(2): 342-354.

[6] KARNOVSKY M J, ROOTS L. A "Direct-Coloring" thiocholine method for cholinesterases[J]. J Histochem Cytochem, 1964, 12: 219-221.

（编辑 栾 嘉）

文章编号：1000-5404(2006)16-1725-01

个案与短篇

69例哮喘患儿管理计划落实情况与病情控制分析

苏华平 （天门市第一人民医院儿科，天门 431700）

1 资料与方法

为探讨儿童哮喘管理计划落实情况与哮喘控制的判断，对我院1999年8月至2004年3月诊治的哮喘儿童进行回顾性总结。对有完整资料的69例患儿在管理计划的实施与病情控制上进行比较分析。69例患儿均符合儿童哮喘诊断标准[1]。男性43例，女性26例；年龄3.5-13岁，其中3.5-6岁41例，7-13岁28例。

69例分为管理组36例，非管理组33例。非管理组不规范吸入皮质类固醇(ICS)及支气管扩张剂等。管理组严格按GINA方案[1]执行。

临床判断：根据全国儿科哮喘协作组儿童哮喘防治常规随访6-18个月，治疗及观察期间症状消失无复发者为近期控制；1年内发作不超过3次为显效；治疗及观察期间症状减轻，发作次数≥3次/年，≤6次/年为有效；>6次/年且治疗前后喘息无明显变化者为无效[2]。PEFR占预计值的百分数(%)：每有被测患儿均能正确掌握峰流速仪(PML美国，型号232-6000)的使用方法，重复3次，取其最高值作为本次PEFR，与既往最佳PEFR进行比较，求出本次PEFR占预计值的百分数。

2 结果

管理组有效率为52.8%(19例)，非管理组为45.5%(15例)，二组间有极显著性差异($\chi^2=22.72$，$P<0.01$)。近期控制率两组分别为47.2%(17例)，6.1%(2例)($\chi^2=14.62$，$P<0.01$)有显著性差异。显效率两组分别为33.3%(12例)，9.1%(3例)($\chi^2=5.95$，$P<0.05$)有显著性差异。PEFR监测肺功能正常率两组比较有极显著性差异($\chi^2=32.31$，$P<0.01$)。见表1。

表1 两组PEFR占预计值的百分数比较(%)

组别	n	PEFR占预计值百分数(%)		
		≥80	80-60	<60
管理组	36	29(80.8)	6(16.7)	1(2.8)
非管理组	33	4(12.1)	25(69.7)	6(18.2)

作者简介：苏华平(1965-)，男，副主任医师，主要从事儿科呼吸方面的研究，电话：0728-5237441。

收稿日期：2005-12-21，修回日期：2006-04-05

3 讨论

支气管哮喘是一种慢性肺部疾病，其特点表现为气道慢性炎症、气管痉挛和气道反应性增加。哮喘治疗目的是尽可能的减轻哮喘发作症状，减少发作次数，预防不可逆气道阻塞发生，维持正常或接近正常肺功能。吸入皮质类固醇(ICS)治疗哮喘已得到了公认。随着哮喘管理计划的推广执行，哮喘患儿的临床症状及肺功能得到了很好的改善。本研究执行哮喘管理计划的患儿无论从临床控制还是肺功能改善远高于非管理组。虽然非管理组哮喘患儿使用吸入ICS，但因没能坚持长期、持续、规范、个体化的哮喘治疗原则及管理计划，往往疗效并不满意。在本地区不能坚持执行管理计划的原因较多，主要有患儿家长对哮喘知识认知不足，幼儿吸入治疗依从性差，作息学习监管不力，担心药物副作用，对医生不信任，经济情况较差等。但对哮喘知识认知不足是坚持管理计划的主要障碍，多数家长无症状不予以治疗而治疗后症状缓解即减量或停药，认为哮喘会随着小儿年龄增长而逐渐减轻并自然缓解。本研究中非管理组有2例近期控制，3例显效，4例肺功能正常，患儿可能暂时缓解或已自然缓解，但大多数患儿仍发病频繁，说明不规范的治疗对大多数哮喘患儿是不能自然缓解的。蔡晓红等[3]经多年观察后也报道，哮喘患儿自然缓解占29.18%，大多数哮喘患儿不能自行缓解。所以加强对患儿家长哮喘知识的宣教，将哮喘患儿纳入规范的管理计划是目前控制哮喘最有效的方法。

关键词：哮喘；儿童；病情控制

中图法分类号：R725.602.25 文献标识码：B

参考文献：

[1] 胡亚美，易著文. 儿科学[M]. 第6版. 北京：人民卫生出版社，2004：196-197.

[2] 全国儿科哮喘协作组. 儿童哮喘防治常规(试行)(三)[J]. 中华儿科杂志，1998，36(12)：747-751.

[3] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗及教育相管理方案)(二)[J]. 中华结核和呼吸杂志，2003，26(3)：132-138.

[4] 蔡晓红，姜昌荣，罗运春，等. 儿童哮喘预后相关因素的研究[J]. 实用儿科临床杂志，2002，17(6)：641-642.

（编辑 汪勃俭）