DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.20.016
第26卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 20
1834 2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)20-1835-04

大鼠坐骨神经损伤后几丁质在神经再生修复中作用的研究

程赛宇,阮怀珍,吴喜贵,张金海 (第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨几丁质(chitin)在坐骨神经损伤后促进神经功能恢复中的作用。方法 实验动物采用完全随机分组法分为对照(SAL)组和实验(chitin)组,采用硅胶管套接大鼠切断的坐骨神经,硅胶管内给予生理盐水(SAL)或chitin溶液,分别于术后30或90 d,应用电生理检测、HRP逆行示踪方法及轴突图像分析方法来检测损伤的神经在电传导、轴浆运输及髓鞘再生等方面的恢复情况。结果 术后30和90 d:① chitin组损伤侧下肢复合肌肉动作电位(CMAP)的潜伏期(LTP)分别为1.79 ms和1.29 ms;神经传导速度分别为16.00 m/s和22.00 m/s;波幅分别为8.17 mV和12.42 mV。②chitin组伤侧L5节段脊髓前角HRP阳性细胞百分率分别增加了24.00%和72.90%。③chitin组损伤侧的神经纤维数目分别为2 691个/mm^{2}和3 502个/mm^2;神经髓鞘厚度分别增加了0.91 μm和1.55 μm。结论 几丁质对周围神经损伤后的神经再生及修复具有积极的促进作用。

关键词:几丁质;外周神经;损伤;再生
中图法分类号:R322.8;R651.3;R977.7 文献标识码:A

Chitin enhances neural reconstruction after sciatic nerve injury in rats

CHENG Sai-yu, RUAN Huai-zhen, WU Xi-gui, ZHANG Jin-hai (Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of chitin on the functional recovery after sciatic nerve axotomy. **Methods** Upon silicone-tubulization of the transected sciatic nerve in the adult rats, either 0.9% saline or 1% chitin solution was injected into the silicone chamber. The status of functional recovery of the injured sciatic nerve was observed by electrophysiological analysis, hydrogen-peroxide oxidoreductase (HRP) retrograde trace method, and axon morphometric analysis at 30 and 90 d respectively after sciatic nerve transection. **Results** ① Chitin shortened the latent period of CMAP by 1.79 ms and 1.29 ms, promoted the nerve conduction velocity by 16.00 m/s and 22.00 m/s, enhanced the amplitude by 8.17 mv and 12.42 mv, respectively, at 30 and 90 d after sciatic nerve transection ($P<0.01$). ② Chitin increased the HRP positive cells in the lateral nucleus of spinal anterior horn by 24.00% and 72.90%, respectively, at 30 and 90 d after sciatic nerve transection ($P<0.01$). ③ The number of nerve fibers increased by 2 691/mm^2 and 3 502/mm^2; the thickness of myelin increased by 0.91 μm and 1.55 μm, respectively at the same days ($P<0.01$). **Conclusion** Chitin is capable of promoting the functional recovery after peripheral nerve injury.

Key words: chitin; peripheral nerve; injury; functional recovery

近年来,随着交通事故和创伤的逐年上升,由此引起的神经损伤日益增多,尤其是外周运动神经的损伤,其特点为致残率高,给家庭和社会带来极大的危害及负担,而神经损伤后的再生与修复问题一直是困扰着神经科学的一大难题。虽然外科修复神经的技术已达到很高的水平,但损伤神经的功能修复效果仍不满意[1]。目前应用组织工程学原理和技术方法研制组织工程化人工神经,修复周围神经缺损,是一种全新的研究。本研究应用具有良好组织相容性和生物降解性的几丁质(chitin)作为神经修复的基质来治疗损伤的坐骨神经,以探索外周神经损伤后chitin对神经元的促修复作用,为外周神经损伤的治疗探索新的理论基础。

1 材料和方法

1.1 Chitin溶液

精制chitin粉末(Sigma公司提供)溶解于LiCl(7%)和Me2N,AC混合液中,制成1%的chitin溶液。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054206) Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China "973" Projects) (G1999054206)
作者简介:程赛宇(1975-),男,云南省昆明市人,博士研究生,助教,主要从事神经损伤、修复方面的研究。电话:(023)68752232, E-mail: csy711@163.com
通信作者:阮怀珍,电话:(023)68752233, E-mail: hzruan61@yahoo.com
收稿日期:2003-10-22;修回日期:2004-09-14

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2　动物模型及实验分组

SD 大鼠 60 只, 雌雄不拘(第三军医大学实验动物中心提供), 体质量 150～220 g, 采用完全随机设计试验, 将动物等分为 4 组: 生理盐水(normal saline, SAL) 30、90 d 组和几丁质(chitin) 30、90 d 组, 每组 15 只。动物的一侧坐骨神经不进行手术作为正常对照侧, 另一侧作为手术侧。以 1% 戊巴比妥钠(30～40 mg/kg)腹腔麻醉, 左下肢背侧部纵向切口, 暴露股二头肌, 经肌间钝性分离, 游离坐骨神经, 切除距梨状肌下缘 3 mm 以下长约 2 mm 的坐骨神经, 用 9-0 无创缝线套接神经断端入 8 mm 长的硅胶管(外径 2 mm, 内径 1 mm)中, 神经断端间距 5 mm。术中依不同组别动物, 用微量注射器分别将生理盐水、1% chitin 溶液 25 μl 注入硅胶管内神经断端间。

1.3　观察指标

1.3.1　电生理检测　　分别于术后 30 d 和 90 d 用 Viking Ⅳ型肌电诱发电位仪(nicolet, USA)检测各组正常侧和损伤侧坐骨神经传导速度(nerve conduction velocity, CV)、复合肌肉动作电位(compound muscle active potential, CMAP)的潜伏期(latent period, LAT)和波幅(amplitude, AMP)。

1.3.2　CB-HRP 逆行示踪[2]　　分别于术后 30 d 和 90 d, 将 15 μl 30%CB-HRP(R Z＞ 3.0, 上海丽珠东风生物技术有限公司提供)溶液多点注入两组大鼠双下肢的腓肠肌中, 存活 72 h 后, 以 1%戊巴比妥钠腹腔麻醉, 4% 多聚甲醛经心灌注固定, 取脊髓 L4～6 节段存于 30% 蔗糖甲醛液 4 ℃过夜。冰冻连续切片, 6 片为 1 组, 每组取 1 片, 经 HRP-TMB 孵育成色, 贴片后光镜下计数各组正常侧和损伤侧被标记的脊髓前角阳性细胞数目, 计算出阳性百分率。

1.3.3　轴突图像分析　　分别于术后 30 和 90 d, 各组地位以 1%戊巴比妥钠腹腔麻醉后取损伤侧坐骨神经吻合口远端 2 mm 处的 2 mm 长的神经段, 浸入 0.5%四氧化锇溶液进行髓鞘染色 24 h。石蜡包埋切片, 片厚 5～7 μm, 贴片、脱蜡、封片后用计算机图像分析系统(IBAS-Ⅰ＋Ⅱ型, 德国)进行图像分析, 同一批染色的切片, 根据染色的灰度定下同一标准, 然后由计算机自动计算有髓神经纤维数目、直径和髓鞘厚度。

1.4　统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, SPSS10.0 统计软件进行两样本 t 检验、析因试验方差分析。

2　结果

2.1　电生理检测

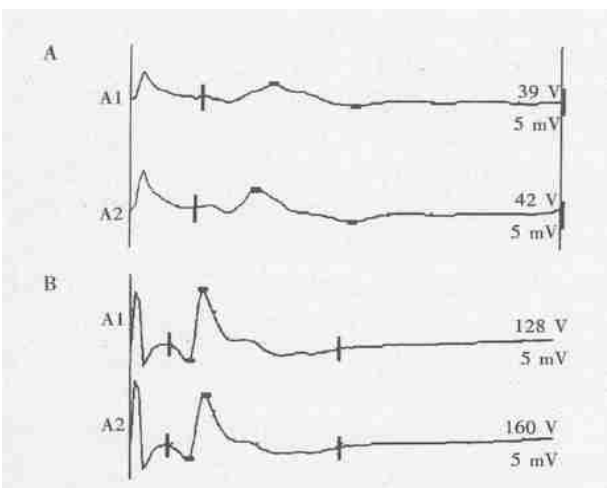
术后 30 和 90 d 经肌电诱发电位仪所测得的各组数据及经 t 检验结果见表 1。在这两个时间点上与对照组比较, 实验组的潜伏期、神经传导速度和波幅等指标均优于对照组, 统计学分析有显著差别, 说明实验组神经电生理功能较对照组有显著的恢复(图 1A、B 两图中的"A1、A2"各为 2 次重复测试所得波形)。

表 1　神经电生理检测结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Data of CMAP in the two groups ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	LAT(ms)		CV(m/s)		AMP(mV)	
		30 d	90 d	30 d	90 d	30 d	90 d
SAL	15	2.33±0.19	1.83±0.15	9.33±2.91	16.58±2.02	4.33±1.97	6.83±1.57
Chitin	15	1.79±0.10 **	1.29±0.16 **	16.00±3.39 **	22.00±2.04 **	8.17±2.34 **	12.42±1.89 **
		F_G=264.669	P=0.000	F_G=108.955	P=0.000	F_G=121.312	P=0.000
		F_T=226.911	P=0.000	F_T=130.880	P=0.000	F_T=62.157	P=0.000

**: $P<0.01$, *vs* SAL



A: SAL group; B: OECs group

图 1　术后 90 d 大鼠损伤侧下肢 CAMP 波形图

Fig 1　CAMP oscillogra of the injuredle legs of rats in both groups at 90 d after section

2.2　CB-HRP 逆行神经示踪

术后 30、90 d, 行 HRP-TMB 示踪染色。阳性反应示脊髓前角神经元胞体呈黑色沉淀, 神经细胞的突起也清晰可见。实验组与对照组比较, 阳性细胞数目较多, 胞体较大, 突起较长。标记的阳性神经元数目、百分比及经 χ^2 检验结果见表 2。从中不难看出实验组坐骨神经的修复明显优于对照组(图 2)。

2.3　神经纤维数目和髓鞘厚度

坐骨神经经娥酸染色后髓鞘清晰显示。髓鞘及脂肪细胞呈黑色, 轴索、朗飞氏结呈空状, 雪旺氏细胞核着色不明显。从形态上观察, 手术侧神经纤维髓鞘与对照侧存在着明显差异。术后 30 d, 手术侧神经纤维数量明显少于对照侧, 神经纤维直径小于对照侧, 髓鞘厚度较薄, 形态较不规则, 排列稀疏。术后 90 d, 手术侧神经纤维数量较 30 d 时增加, 神经纤维直径增粗, 髓鞘厚度也有所增粗, 形态较规则, 排列更为紧密。经过测量、计算并经 t 检验结果见表 3、4。从中可以看出实验各组的各个数据均优于对照组。即表明实验组坐骨神经神经元轴突及髓鞘再生情况优于对照组(图 3)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

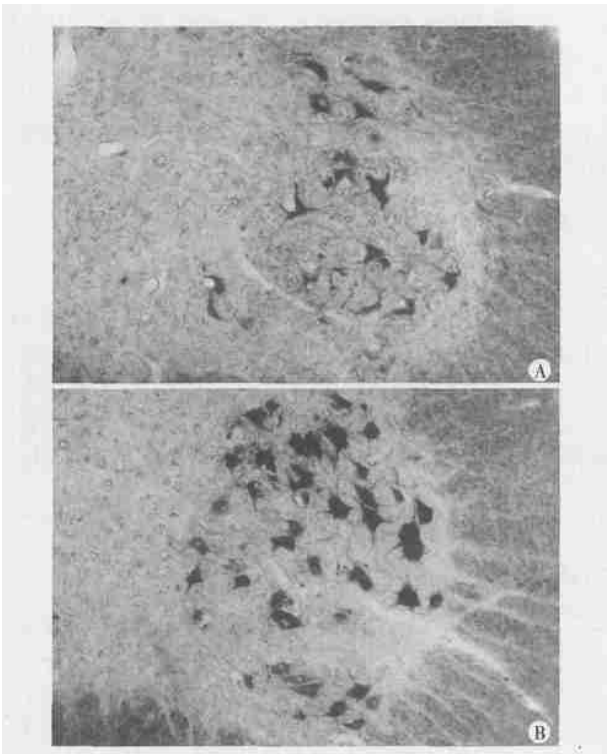
表 2 脊髓前角 HRP 阳性细胞百分比 ($\bar{x}\pm s$)%

Tab 2 Percentage of HRP positive cells in the lateral nucleus of spinal anterior horn ($\bar{x}\pm s$)%

Group	n	30 d	90 d
SAL	15	11.58±1.67	48.63±2.51
Chitin	15	24.00±2.14**	72.90±1.47**

F_G=32 407.122, P=0.000; F_d=102 290.78, P=0.000;

**: $P<0.01$, *vs* SAL



A: Injured side in SAL group; B: Injured side in Chitin group

图 2 坐骨神经损伤后 90 d 脊髓 L5 节段 HRP 逆行示踪 (HRP-TMB 染色× 100)

Fig 2 HRP positive cells in lateral nucleus of spinal anterior horn at 90 d after sciatic nerve transection (HRP-TMB staining× 100)

表 3 术后 30 d 各组坐骨神经横断面神经纤维数目及髓鞘厚度 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Number of regenerated nerve fibers and thickness of myelin sheath at 30 d after sciatic nerve transection ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Density(n/mm^2)	Diameter(μm)	Thickness(μm)
SAL	15	1 659±245.17	2.48±0.25	0.51±0.16
Chitin	15	2 691±370.43**	3.95±0.31**	0.91±0.35**
t		10.657	16.915	4.763
P		0.000	0.000	0.000

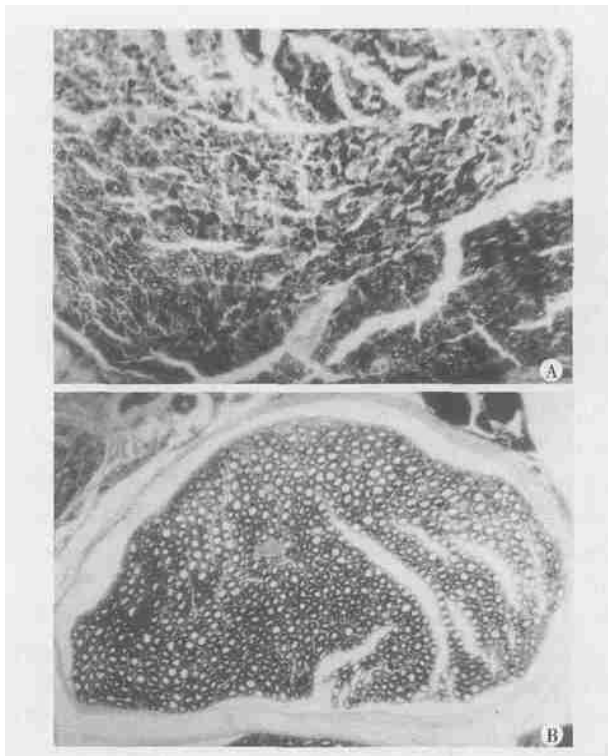
**: $P<0.01$, *vs* SAL

表 4 术后 90 d 各组坐骨神经横断面神经纤维数目及髓鞘厚度 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Number of regenerated nerve fibers and thickness of myelin sheath at 90 d after sciatic nerve transection ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Density(n/mm^2)	Diameter(μm)	Thickness(μm)
SAL	15	2 195±324.91	3.85±0.34	0.93±0.38
Chitin	15	3 502±303.77**	5.70±0.29**	1.55±0.31**
t		13.502	18.971	5.794
P		0.000	0.000	0.000

**: $P<0.01$, *vs* SAL



A: Injured nerve in SAL group; B: Injured nerve in Chitin group

图 3 坐骨神经损伤后 90 d 远端神经横切面 (锇酸染色× 100)

Fig 3 Transverse section of distal sciatic nerve at 90 d after sciatic nerve transection (Osmate staining× 100)

3 讨论

采用电生理、轴突形态学及轴浆逆行运输等指标基本能较全面的评价损伤神经功能恢复的情况。电生理检测可观察神经电传导功能恢复的情况。神经横断面轴突的形态学检测可观察坐骨神经损伤引起轴突溃变后轴突再生以及成髓鞘过程的情况，也是评价神经再生的重要指标。此外，HRP 酶标记法也被广泛应用于追踪神经以研究神经通路，HRP 酶能被多种功能的神经末梢摄取、运输，并在神经胞体中积聚；其运输主要与神经纤维中的微管密切相关。因此，一旦神经纤维失去其连续性，HRP 就无法从远端运送到近端并聚积在胞体中。CB-HRP 标记的脊髓前角运动神经元计数可反映再生的初级运动神经元轴突已跨越了损伤部位到达了靶器官并形成了功能联系。

几丁质是近年来在国际上颇为引起轰动的一种特殊物质，是目前发现的自然界中惟一带正电荷的可食性的动物纤维素——含有氨基多糖的高分子化合物[3,4]。研究表明，几丁质无毒性、无刺激性、无免疫原性、不溶血，Anes 实验阴性，同时还可促进平滑肌细胞再生和抑制成纤维细胞生长[5,6]。几丁质植入体内

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

后, 吸引单核细胞将自身吞噬, 逐渐被机体吸收[7]。几丁质除了具备一般医用材料的性能外, 还具备了作为周围神经修复用的组织工程材料的三点要求[7]。因此几丁质在人工皮肤、骨修复材料、手术缝线和抗凝血材料等方面广泛应用。其在神经损伤修复中的作用也成为探索的热点。

与其它一些促神经生长物质相比, 几丁质最显著的特点在于能抑制成纤维细胞的生长, 防止瘢痕形成[6,8]。同时几丁质良好的组织相容性及其可吸收性、无免疫原性等都是极为有利的特性。而研究已经证实, 影响神经再生的主要原因之一就是瘢痕组织阻碍了近端神经向远端生长的过程。外周神经损伤后局部给予 chitin, 作为基质可作用于受损的神经, 减轻胞体逆行性变, 并提供良好的环境, 使神经再生的物质供给得到保证。同时, 几丁质作为神经再生的基质发挥作用。有研究显示 chitin 对面神经缺损有明显的促再生作用[9,10]。我们先前的工作也已证实, chitin 在大鼠坐骨神经损伤后对脊髓神经元具有一定的保护作用[11]。

我们采用适度长度的硅胶管套接损伤的神经能提高神经再生的准确性或趋向性, 有利于神经的再生。我们观察到在此动物模型上给以 chitin 能促进神经电传导的恢复, 神经元胞体逆行轴浆运输的恢复以及促进坐骨神经纤维髓鞘的形成。这些结果说明, 几丁质能有效的促进损伤的坐骨神经的功能恢复, 这种作用有赖于几丁质的多种生物特性。我们的实验结果对探索治疗神经损伤的更新的方法和途径具有一定的启示作用。

参考文献:

[1] Fu S Y, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration[J]. Mol Neurobiol, 1997, 14(1-2): 67-116.

[2] 杜卓民编译. 神经解剖学传导通路追踪法[M]. 北京: 科学出版社, 1987. 139-142.

[3] 陈耀华. 人类第 6 生命要素-甲壳素(几丁质、几丁聚糖)科学[J]. 锦州医学院学报, 1999, 20(5): 48-53.

[4] 侯春林, 顾其胜. 几丁质与医学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001. 1-6.

[5] Suh J K, Matthew H W. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review[J]. Biomaterials, 2000, 21(24): 2589-2598.

[6] Cho Y W, Cho Y N, Chung S H, *et al*. Warter-soluble chitin as a wound healing accelerator[J]. Biomaterials, 1999, 20(22): 2139-2145.

[7] Hirano, Tanaka Y, Hasegawa M, *et al*. Effect of sulfated derivatives of chitesan on some blood coagulant factors[J]. Carbohydr Res, 1985, 137: 205-215.

[8] Haipeng G, Yinghui Z, Jianchun L, *et al*. Studies on nerve cell affinity of chitosan-derived materials[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 52(2): 285-295.

[9] 陶泽璋, 黄孝文, 华清泉, 等. 几丁质再生室修复面神经缺损的实验研究[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 1999, 5(3): 160-162.

[10] 黄孝文, 陶泽璋, 崔永华, 等. 甲壳素导管引导面神经再生的研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2003, 19(1): 26-27.

[11] 程赛宇, 阮怀珍, 张金海, 等. 几丁质在大鼠坐骨神经损伤早期修复作用的研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(9): 1017-1019.

(编辑　汪勤俭)

(上接 1833 页)

表 1　CT 穿刺片质量分析对照表

质量	CT 扫描例数	构成比(%)	CT 透视例数	构成比(%)
优	75	85.0	67	75.0
良	11	12.0	15	17.0
中	3	3.0	6	7.0
差	0	0.0	1	1.0
合计	89	100.0	89	100.0

3　讨论

胸部常规的 Spirl 扫描的时间和距离较长, 层厚和螺距都教大, 一般在 8~10 mm 左右, 对病灶的显示常常不能达到穿刺的要求; 而高分辨率扫描虽然层厚很薄, 可以显示一些病灶的精细结构, 但易受呼吸影响, 往往大部分穿刺病员都很难作到20 s 以上的良好闭气[2]。我们根据穿刺的具体特点和要求, 将层厚设定在 3~5 mm, 一次扫描的时间一般在 8~15 s 之间, 扫描的螺距时间在亚秒内(0.75 s); 所扫描的图像用软组织窗显示, 窗中心设为 40, 窗宽为 350。通过与穿刺操作者交流, 确认扫描图像清晰, 完全达到穿刺的需要。通过对激光相机打印后的图像进行分析, 其图像都达到了很好的水平。

提高 CT 透视的质量有三方面的意义: ①良好的透视图像质量可以使穿刺者更容易的进行穿刺并取得标本; ②可以缩短穿刺时间, 达到了减轻病员痛苦和减少操作者和病员辐射剂量的作用; ③能够减少穿刺的术后并发症及穿刺时的危险。透视条件设置一般根据病员的胖瘦设为低剂量体部(Low dose body)或超低剂量体部(Xlow dose body), 这样可以达到在保证图像质量的条件下大大降低辐射剂量, 更好的保护穿刺、操作者与病员。透视窗值的准确设置是保证透视图像质量的关键, 我们通过分析与总结, 将窗中心设定在 40 不变, 在 800~1 800 之间调节窗宽, 可以最快、最良好的显示穿刺针与病灶及周围各组织。

穿刺活检结果的准确性是由是否能够取得病灶中有效组织及有效组织数量决定, CT 扫描和透视对病灶位置、范围和病灶与穿刺针相互位置显示的清晰与准确, 可以全面提高穿刺活检的一次成功率, 减少重复穿刺和穿刺结果的误差。

关键词: CT; 扫描技术; 穿刺活检
中图法分类号: R814.42　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 张雪哲, 卢　延. CT、MR 介入放射学[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 23, 30.

[2] Rolfs A, Schuller I, Finckh U, *et al*. PCR: clinical diagnostics and research[M]. NewYork: Sringer Verlag, 1995. 86-96.

(编辑　汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net