DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.041
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

文章编号:1000-5404(2002)03-0591-03

论著

大鼠坐骨神经损伤后再生过程结构形态三维重建研究

陈 菁[1],楚燕飞[2],朱 刚[2],李兵仓[1],吴国萍[1],黄 宏[1],陈志强[1] (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所第六研究室,重庆 400042;[2]附属西南医院神经外科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨大鼠坐骨神经损伤后再生过程结构形态三维重建的方法,三维重现再生神经通过损伤界面和吻合口的过程及规律。方法 用硅胶管桥接60只大鼠左侧坐骨神经长6 mm缺损,术后3、7、15、30、60、90 d取坐骨神经远近端各1 cm,石蜡包埋,连续切片,HE、硝酸银-luxol快蓝染色,显微摄像输入微机后进行图像配准、二维综合处理,最终在SGI三维图形工作站上完成三维重建和显示。结果 三维图像显示新生神经纤维与正常神经纤维相比有郎飞氏结尚未形成、排列紊乱、髓鞘较薄、轴索较细、神经膜管形成等差异,胶原纤维大量增生阻碍了新生神经纤维的生长。结论 利用计算机图像重建技术,采用三维图像的形式对外周神经再生过程和再生规律进行可视化研究,是一种有效的方法。

关键词:周围神经;神经再生;三维重建
中图法分类号:R364.33;R651.3 文献标识码:A

Three-D reconstruction for morphology of regenerating sciatic nerve in rats

CHEN Jing, CHU Yan-fei, ZHU Gang, LI Bing-cang, WU Guo-ping, HUANG Hong, CHEN Zhi-qiang (Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To explore the method for 3-D reconstruction of morphological structure of regenerated sciatic nerve of rats after injury in order to tridimensionally depict the process and rule of damaged nerve regenerating across the lesion interface and anastomosing. **Methods** A total of 60 Wistar rats were divided randomly into 6 groups. The sciatic nerve was transected by 6 mm and then repaired with silicone tube. The sciatic nerve pieces of 1 cm long in the close and remote ends were cut 3, 7, 15, 30, 60, and 90 d respectively after injury, then embedded with paraffin, serially sliced, dyed with HE and silver-nitrate fast blue. The images of slices were taken by micro-photograph system and inputted into computer by which the image matching and 2-D integrate processing was completed. The 3-D reconstruction and display was accomplished in SGI workstation. **Results** Compared with normal nerve fibers, some difference in the neonatal nerve fiber was showed by the 3-D images. Ranvier nodes were not formed and in turbulence. Myelin sheath and axis-cylinder were much thin. No neurolemmal tube was found. **Conclusion** It is a practical method to study the visualization of peripheral nerve regeneration with 3-D images by means of computer 3-D reconstruction technique.

Key words: peripheral nerve; regeneration; 3-D reconstruction

计算机三维重建技术应用于形态学研究始于20世纪70年代[1],国内始于20世纪80年代中期[2]。三维重建技术在阐明生物体组织结构与生理功能之间的关系以及在形态学、比较解剖学等领域中有着重要的意义。到目前为止连续切片的计算机三维重建,多数是针对肉眼观察到的实体,如脑、颅骨、脏器等,显微生物组织图像的三维重建还是一个新课题。尤其在周围神经形态功能研究方面,尚局限于二维资料形式。本研究利用计算机三维重建技术,对大鼠再生坐骨神经纤维各组织结构的形态特点及规律,尤其是再生神经通过吻合口界面的详细过程进行研究,并从不同的视角对重建结构的形态、空间位置及相邻关系进行观察,旨在为揭示坐骨神经损伤后神经纤维的再生规律及其与神经功能恢复的关系提供实验依据。

基金项目:国家重点创伤基础研究发展规则资助项目("973"项目)(G1999054206)
作者简介:陈 菁(1968-),女,广东省兴宁市人,助理研究员,主要从事生物医学图像研究,发表论文6篇,电话:(023)68757436
收稿日期:2001-07-05;修回日期:2001-12-29

1 材料与方法

1.1 标本制备

模型制作:Wistar雌性成年大鼠(大坪医院实验动物中心提供)60只,体重225~250 g,用随机数字表法分为3、7、15、30、60、90 d组(每组10只),1%戊巴比妥钠(30~40 mg/kg)腹腔麻醉,左下肢背侧纵向切口,游离坐骨神经,距离梨状肌下缘5 mm处将坐骨神经锐性切断,并切除5 mm神经,坐骨神经两断端分别套入1 cm长的硅胶管(内径1.6 mm、外径2.4 mm)中,在10倍手术显微镜下用8-0无创缝合针线将神经外膜与硅胶管分别缝合固定一针,两神经断端相距6 mm。

标本制备:术后3、7、15、30、60、90 d将大鼠经4%多聚甲醛灌注固定后取伤侧硅胶管远、近端1 cm的坐骨神经,对侧坐骨神经作为正常对照,4%多聚甲醛固定12~24 h,显微镜下剪去硅胶管后将伤侧切成2 mm长的小段,自制玻璃微电极(直径为10 μm)分别行纵向和横向穿孔,石蜡包埋,连续切片,HE、硝酸银-luxol快蓝染色,Olympus显微镜下观察。

1.2 硬件系统

本实验采用由Olympus显微镜、CCD摄像头和图像采集卡组成的显微摄像系统对原始切片图像进行采集和数字化。照

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

片图像所用输入设备为 Genius 扫描仪。微机终端为 Inter PC，主机采用 SGI 工作站，微处理器：R5 000 SC，主频：180 MHz；内存 64 MB，硬盘 4 G，19 寸彩色显示器，1 280×1 024 分辨率，刷新频率 75 Hz；UNIX 操作系统。显微摄像系统（或扫描仪）与 PC 机相连，完成原始图像采集和图像的数字化。PC 机对数字图像进行重建前的预处理，并通过网络与 SGI 工作站相连，将处理后的数字图像传输至 SGI 工作站进行三维重建和显示。整个硬件系统的构成见图 1。

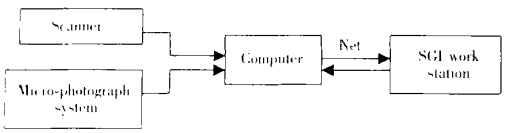


图 1 三维重建流程图

Fig 1 Flow chart of the 3-D reconstruction system

1.3 图像采集及数字化

将载玻片置于 Olympus 显微镜的载物台上，用固定于显微镜的 CCD 摄像头对放大 200 倍的切片图像进行摄像并传至图像采集卡完成数字化，每一个切片图像作为一个数据文件存盘。或将照片置于扫描仪的平台上，经灰度扫描、A/D 转换成为数字图像，存入微机硬盘。微机中的图像数据文件通过网络传输至 SGI 工作站硬盘上。

1.4 图像数据预处理

其目的是将一组连续切片图像处理成适合重建的一组图像数据，包括根据定位信息配准每幅原始图像、对每张图像的二维综合处理以及图像文件格式的转化。

无论是切片或其它方法获得的二维图像，在制作与采集过程中不可避免地产生位移、旋转等变化，因此对某一待重建对象的一组连续二维数字图像，首先需解决各幅图像之间的配准[3]，即对于一幅二维图像寻求一种（或一系列）空间变换，使它与相邻图像上的对应点达到空间上的一致。本实验采用外部定位点法[4]，用自制的直径为 10μm 的玻璃微电极在坐骨神经上留下 3 个定位基准孔作为定位点，然后通过平移、旋转变换对齐定位点即完成了连续切片图像之间的配准。

经过位置配准后的图像尚需进行二维综合处理。首先对图像进行亮度和对比度调整，图像增强，边缘锐化等，以使图像更加清晰，对需重建的结构更易识别。在此基础上，对拟重建的结构进行边界提取和图像分割，同时舍弃无关的图像信息。

上述图像配准和二维综合处理均在微机上完成，随后图像数据通过网络传输至 SGI 工作站，转换成重建软件规定的图像格式以便后续处理。

1.5 三维重建算法

采用体元模型法[5]，即以单个小立方体作为三维图像的基本单元的一种重建方法来完成从二维切片图像输入到三维模型的建立。该方法能够描述复杂的、密度渐变的物体，适合于对坐骨神经三维结构的重建。重建结果通过三维显示技术进行观察。

1.6 三维显示

三维显示是利用计算机表现出三维的景物。它涉及的内容有利用画法几何的透视原理把三维景物显示在屏幕上，采用投影技术消除不可见的表面，合理地使用光照模型增加景物的真实感，以及表现景物的连续运动（旋转和平移）。

上述算法采用 C 语言编程，在 SGI 三维图像工作站上运行。

2 结果

经原始图像的数字转换、图像配准、二维处理、三维重建，在 SGI 工作站上重建了大鼠正常坐骨神经纤维和新生坐骨神经纤维的立体图像，包括髓鞘、轴索、神经膜管、雪旺氏细胞、郎飞氏结等，见图 2～4。重建的结构可在三维空间绕任意轴旋转任意角度，或以不同的速度连续旋转。通过从不同的视角对各结构的形态、空间位置及相邻关系进行观察，初步揭示新生神经纤维与正常神经纤维在立体图像上的差异，以上结果表明利用该方法对神经再生过程进行重建是可行的。

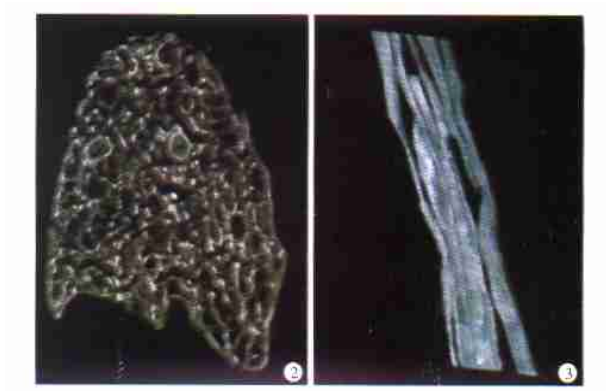


图 2 伤后 15 d 远侧端坐骨神经发生华勒变性，雪旺细胞增殖形成神经膜管

Fig 2 Wallerian's degeneration occurs at the remote end of sciatic nerve and neurolmmal tube is forming with the proliferation of Schwann cells

图 3 伤后 3 月新生神经纤维立体图像显示其郎飞结尚未形成、排列紊乱、髓鞘厚薄不均、轴索较细

Fig 3 Three-D image of neonatal nervous fibers shows that Ranvier nodes have not formed yet and in turbulence, myelin sheath and axis-cylinder are much thin 3 month after injury

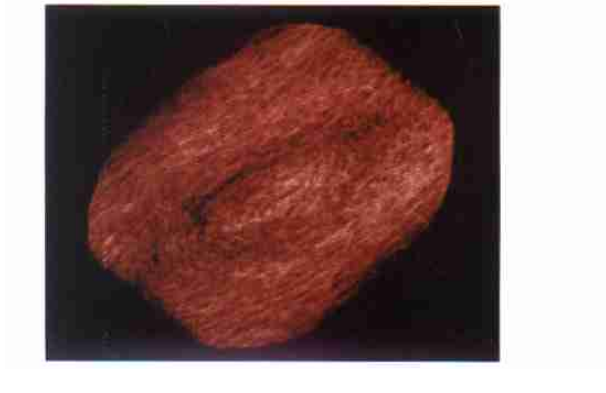


图 4 坐骨神经损伤后三月胶原纤维大量增生形成纤维瘤阻碍新生神经纤维生长

Fig 4 Growth of neonatal nerve fiber is interforenced by inoms which is formed with a mass of proliferated collagen fibers

3 讨论

随着计算机图像分析技术的发展，医学图像不仅为

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

临床医生提供了大量信息, 而且为解剖学、病理学、组织学等基础学科提供了新的研究手段[6]。但采用三维图像的形式对神经再生的特点及规律、尤其是再生神经通过吻合口界面的详细过程进行研究, 不仅能解决神经再生在时间、数量上的计量问题, 更重要的是可使这些参数可视化、具体化和永久化。除具有上述优点外, 还可反映组织的立体结构, 如可显像目视和确定诸如再生神经与正常神经的结构界限; 了解有髓神经纤维和无髓神经纤维等成分间的相互关系; 正确判断神经错误支配。因此, 本研究利用计算机图像重建技术, 采用三维图像的形式对外周神经再生过程和再生规律进行可视化研究, 无疑具有重要的理论意义和实际意义。

周围神经损伤是导致肢体功能残废的重要原因, 历来是临床和基础研究的重点。从已有的研究来看, 国内外对于再生神经的观察, 普遍是经 HE、氨银、甲苯胺蓝以及免疫组化对神经某些结构染色后进行平面观察[7], 这显然不能观察到再生神经纤维的空间结构关系、难以准确描述神经再生过程。由于客观因素所限, 本实验尚未重建出坐骨神经再生过程中的某些特殊结构的三维图像。但根据已重建出的部分三维图像, 能发现新生神经纤维与正常神经纤维相比有郎飞结尚未形成、排列紊乱、髓鞘较薄、轴索较细、神经膜管形成等差异。此外, 我们还发现坐骨神经伤后 90 d 胶原纤维大量增生阻碍了新生神经纤维的生长, 这也可能是周围神经损伤后功能恢复不全的原因之一。

连续切片的计算机三维重建多数是针对肉眼可观察到的实体如脑、颅骨、心脏等。本研究所涉及的大鼠坐骨神经的三维结构重建则属于显微生物组织图像的三维重建。这是一个较新的课题, 目前相关的报道较少[8]。显微结构的重建存在一些固有困难, 如切片量大、制片条件一致性要求高、原则上不允许掉片、漏片等, 而定位问题则是三维重建中的共同难题, 目前主要有以下几种方法: ①利用细针、激光或微电极穿孔, 一般穿 2～3 个基准孔作为定位点, 以实现切片对位。②根据对生物组织解剖学的先验知识进行判别[9]。③把标本块所要切的面用修块机修平或用刀切平, 侧面修成平面[10]。由于切面平行, 因此在进行图像输入时就可以对图像进行定位。本实验采用微电极穿孔的方法, 主要基于以下考虑: 方法②虽简单易行, 但需要丰富的解剖学知识, 且主观性较强。如使用方法③, 则在所需要的视野内也可能看不到切面的边缘。本实验采用直径为 10 μm 的自制玻璃微电极在切成 2 mm 长的大鼠坐骨神经上穿孔, 可确保基准孔在镜下 100 倍以上清晰可辨, 对组织结构破坏较小, 不影响重建结果。但该方法也存在一定局限, 即在进行三维重建时, 需要的是极少的一部分, 因此在高倍放大的情况下, 穿的孔可能在观察的视野之外。这个问题目前还没有很好的解决办法, 有待进一步完善。

参考文献:

[1] Stephens P R. Three-dimensional reconstructions of cavity using plastic sheet and modelling clay[J]. J Microscope, 1979, 115(2): 175.

[2] 许鹿希. 电子计算机立体重建、展示和分析猕猴丘脑团[J]. 解剖学通报, 1984, 7(1): 1.

[3] 罗述谦 综述. 医学图像配准技术[J]. 国外医学: 生物医学工程分册, 1999, 22(1): 1—7.

[4] Otten E, van Iecuwen J L. A 3-D reconstruction package from serial section images[J]. Eur J Cell Biol, 1989, 48(25): 73.

[5] Udapa J K. Interactive segmentation and boundary surface formation for 3D digital images[J]. Computer Graph Imag Proc, 1982, 18(15): 213.

[6] 王大东 综述. 病理组织三维重建的研究进展[J]. 国外医学: 生物医学工程分册, 1997, 20(5): 288—291.

[7] Immune respone and neurotrophic factor interaction in peripheral nerve transplants[J]. Gulati AK. Acta Haematol, 1998, 99(3): 171—174.

[8] 张　玮, 李　衫. 生物组织连续切片图像的计算机三维重建研究的进展[J]. 生物医学工程学杂志, 1999, 16(3): 377—381.

[9] 张景强, 叶巧真, 赖德锦, 等. 小白鼠肾脏线粒体三维结构的重构[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1990, 129(3): 73.

[10] 张显全, 李自双, 杨　力, 等. 肝血窦连续切片的计算机三维重建[J]. 生物医学工程杂志, 1997, 14(2): 195.

(编辑　薛国文)

(上接 590 页)

表 3　某军校 1999-2001 年地方入伍新学员视力低下比较

年份	受检人数	视力正常人数(%)	视力低下人数(%)
1999	226	177(78.32)	49(21.68)
2000	208	142(68.27)	66(31.73)
2001	258	148(57.36)	110(42.64)
合计	682	467(68.48)	225(31.52)

3　讨论

目前, 军队院校招收录取地方应届高中毕业生, 一般需通过两次体检, 以第 2 次军检更为严格。但连续几年, 我校报到的新生中仍有不合格者, 高考从第 1 次体检到入学报到, 不过 2、3 个月时间, 且都不是急性病, 究其原因我们认为主要与某些体检工作人员责任心不强, 技术水平低, 采用的检测设备落后有关。从不合格中看, 其 3 项主要原因与部分地区高考体检专业受限主要原因相近[1]。其中肝炎 2001 年未发现 1 例, 我们认为是同现在中小学生大量进行乙肝疫苗接种有关, 在询问今年报到的新学员中, 已有 78%的人进行过接种。在被发现的胸部疾患者中, 以结核多见(3 例), 究其原因整个自然环境因素变化、吸烟人群增多且低龄化, 以及全球结核病的第 3 次回升等因素有关。视力低下者呈逐年增多趋势, 表明我国中小学"对视力低下的防治不仅未见成效, 反而逐年上升"[2]。其中缘由与当今中小学生大量接触电脑, 以及学习时采光不足有相当大的关系。加强军检力度, 提高检查人员素质, 确保国防后备人才质量, 更将刻不容缓。

关键词: 体格检查; 体检资料; 入伍新生
中图法分类号: R194.3　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 师　焕. 北京市东城区 1985-1997 年高招体检结果分析[J]. 中国学校卫生, 2000, 21(6): 197—198.

[2] 曹若湘. 1995 年北京市中小学生体质状况综合分析[J]. 中国公共卫生, 2000, 16(6): 516.

(编辑　张大春)

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