

大鼠腓总神经端侧吻合于胫神经再生神经的逆行追踪

魏佑震¹, 顾小兵², 张凤鸣¹, 逢小红¹, 巩念明¹, 孙丰刚¹

(1. 泰山医学院解剖学教研室//脑研究室, 山东 泰安 271000;

2. 东莞大朗医院手外科, 广东 东莞 523770)

摘要:【目的】研究大鼠腓总神经被切断端侧吻合于胫神经后,再生的腓总神经纤维的来源。【方法】将大鼠腓总神经切断,将其远端与胫神经施行端侧吻合,存活24个月后,再次手术暴露并将HRP(辣根过氧化物酶)注入远段腓总神经干内,72h后取大鼠脊髓L₃₋₆节段和L₄、L₅脊神经节冰冻切片,用四甲基联苯胺显色显示神经细胞;并取腓总神经远段、腓总神经近段中部行电镜观察神经纤维超微结构,正常腓总神经作对照。【结果】模型鼠远段腓总神经再生神经纤维清晰、明显,神经纤维略细;脊髓L₃₋₆节段双侧灰质前角和双侧L₄、L₅脊神经节均见到蓝染细胞,均以手术侧为少,腓总神经近段与正常腓总神经比较无差异、未见华勒变迹象。【结论】断裂腓总神经端侧吻合于胫神经,再生神经纤维不支持因腓总神经近段溃变轴突退缩形成生长锥引导所致,来源于胫神经可能性大。

关键词: 外周神经; 神经再生; 端侧吻合; HRP; 辣根过氧化物酶

中图分类号: R651.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2008)06-0720-04

Tracing of Regenerating Axons in Peroneal Nerve Neuroorrhaphy to Tibial Nerve in Rats

WEI You-zhen¹, GU Xiao-bing², ZHANG Feng-ming¹, PANG Xiao-hong¹,

GONG Nian-ming¹, SUN Feng-gang¹

(1. Division of Brain Research // Department of Anatomy, Taishan Medical College, Tai'an 271000, China;

2. Department of Hand Surgery, Dalang Hospital, Dongguan 523770, China)

Abstract: 【Objective】 This study was conducted to explore the origin of the regenerating axons which grow into peroneal nerve after end-to-side neuroorrhaphy to tibial nerve. 【Methods】 The right peroneal nerve of Wistar rats was resected, and the distal nerve stumps were sutured to the epineurium windows, opened by removing the epineurial sheath on the intact tibial nerve trunk. Twenty-four months after surgery, HRP was injected into peroneal nerve trunks of both sides. At 72 h after injection, the distal segment of peroneal nerves, and the middle section of proximal peroneal nerve segment were removed and superthin section were observed by electronic microscopy. The spinal cord L₃₋₆ and spinal ganglions L₄, L₅ were cut 40 μm, 30 μm respectively and stained by TMB method. 【Results】 There were correspondent regenerating axons in the distal peroneal nerve segment, no signs of Wallerian degeneration were found in proximal peroneal segment, meanwhile in both anterior horns of spinal cord L₃₋₆ and L₄, L₅ spinal ganglions of both sides, a numerous of neurons were found stained blue, in spite of a fewer in operate one. 【Conclusion】 The regenerating of nerve fibers in sutured peroneal nerve end-to-side to tibial nerve is not based on the degeneration of proximal peroneal nerve, and suggesting that the regenerating axons may be not derived from the growth cone of the injured peroneal nerve.

Key words: peripheral nerve; regenerating axons; end-to-side; HRP

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(6): 720-723]

收稿日期: 2008-02-17

基金项目: 山东省自然科学基金(Q99C17); 山东省教育厅科技计划项目(J99K64)

作者简介: 魏佑震(1964-), 男, 山东莱芜人, 硕士, 教授, 硕士生导师, 通讯作者, E-mail: wei-youzhen@163.com

经过十余年的探索^[1-9],神经端侧吻合研究取得了显著进展,主要结果显示:神经可以再生^[10-11]、神经外膜开窗有利于神经再生、神经外膜移除不影响供神经的结构和功能等^[12];但目前,神经端侧吻合后再生神经的来源、途径、机理等尚不完全清楚,有人^[13]用大鼠腓总神经端侧吻合于胫神经实验,在分析神经侧芽来源时,认为存在再生神经纤维是因腓总神经近段溃变轴突退缩形成生长锥并受引导所致的可能性。那么,近段腓总神经是否在实验中发生华勒变就显得十分重要。

1 材料和方法

1.1 材料

Wistar 大鼠,购自山东大学实验动物中心。5只,雄性,体质量 180 ~ 220 g,龄约 2 个月;HRP: Sigma 公司产品;透射电镜:日本电子, JEM-1200EX。

1.2 方法

1.2.1 模型制作 10 g/L 戊巴比妥钠麻醉,于右股后部切口,暴露胫神经和腓总神经,将腓总神经切断,后在胫神经干上相应部位开一直径约 1 mm 的外膜窗,用 10-0 无创伤丝线将腓总神经远端缝合于胫神经干的外膜窗上,近端包埋缝合于邻近肌肉内,术式如图 1;左侧坐骨神经及其分支不作处理作为正常侧自身对照。术后常规饲养 24 个月。

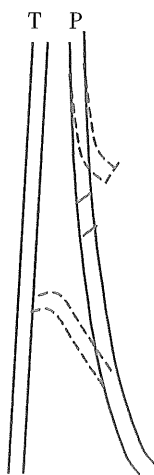


图 1 大鼠右侧腓总神经(P)远端端侧吻合与胫神经(T)干,近端埋于附近肌肉

Fig.1 The distal stumps of right peroneal nerve(P) were sutured to the tibial nerve(T) trunk, the proximal sutured to the near muscle

1.2.2 形态学检测 俟期,手术切开暴露双侧坐骨神经,目测手术侧神经吻合及神经再生状况,后在双侧远段腓总神经靠远处用血管钳钳夹,于夹伤处神经干内注射 30% HRP 10 μ L;缝合切口,存活 72 h 后,麻醉下经心灌注 10 g/L 多聚甲醛加 12.5 mL/L 戊二醛 300 ~ 400 mL 固定。切取正常侧腓总神经、手术侧腓总神经远段、手术侧腓总神经近段中部,经后固定,超薄切片,铅铀双染色,电镜观察。截取脊髓 L₃₋₆ 节段,摘取双侧 L₄、L₅ 脊神经节,分别于 200 g/L 蔗糖过夜,行冰冻切片,脊髓片厚 40 μ m,神经节片厚 30 μ m,连续裱片,用四甲基联苯胺(TMB)染色。

2 结果

2.1 大体观察结果

手术侧腓总神经远端与胫神经的吻合口处,连接吻合良好,吻合口上下胫神经、腓总神经各段色泽、质地、神经表面血管分布等与正常侧比较未见明显差异,吻合口处可见少许膨大,与周围组织有粘连,远段腓总神经比较正常对照侧稍细。

2.2 超微形态学结果

电镜下,正常侧腓总神经有髓神经纤维轴突直径较粗、均匀,髓鞘较厚,轴突内神经原纤维、线粒体清晰可辨,髓鞘排列规则、紧密;施万细胞胞膜完整、边界清晰,胞浆均匀,细胞器规则,胞核圆或椭圆或半月形,核膜光滑,核质均匀;神经纤维之间神经原纤维排列整齐、均匀;无髓神经纤维也排列整齐、结构规则。手术侧近段中部腓总神经内,神经纤维直径、轴突直径、髓鞘形态、髓鞘厚度、髓鞘结构层次、神经纤维密度、神经纤维分布等与正常侧腓总神经比较未见显著差异,未发现华勒氏变迹象(图 2A)。手术侧远段腓总神经内,可见再生发育较为良好的大量神经纤维,结构清晰,层次分明;但再生神经纤维粗细略显不均,均较正常侧神经纤维为细;髓鞘较薄(图 2B)。

2.3 TMB 染色结果

正常对照侧大鼠腓总神经内注射 HRP 后,同侧 L₄、L₅ 脊神经节可见蓝染标记细胞(图 3A);手术侧 L₄、L₅ 脊神经节也见到部分蓝染标记细胞,数量与对侧比较为少,细胞体积稍显大(图 3B);脊髓 L₃₋₆ 节段双侧灰质前角均见到蓝染标记细胞,正常对照侧神经元染色细胞较多,大致沿前

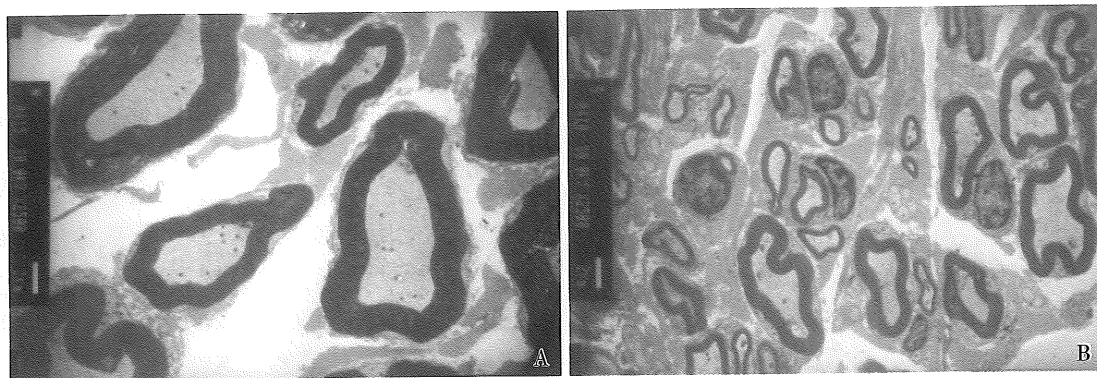


图 2 手术侧腓总神经超微结构

Fig.2 The ultrastructure of operated peroneal nerve

A: The ultrastructure of middle section of proximal segment of operated peroneal nerve, no signs of Wallerian degeneration were found, $\times 2\,500$; B: The ultrastructure of regenerating fibers in distal segment of sutured peroneal nerve, $\times 2\,500$

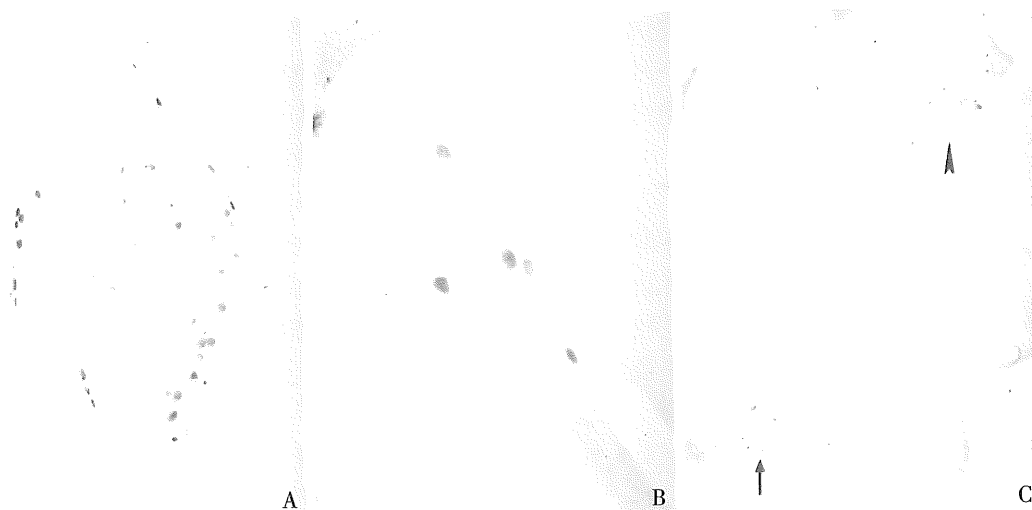


图 3 HRP 示踪染色结果

Fig.3 The HRP tracing results, stained by TMB method

A: The spinal ganglia L_4, L_5 of normal control side, stained by TMB method, $\times 10$; B: The spinal ganglia L_4, L_5 of operated side, stained by TMB method, $\times 10$; C: The neurons stained in spinal cord L_{3-6} , arrowhead indicate normal control side, arrow indicate operated side, $\times 10$

角灰质与白质交界处呈单线排列,手术侧染色显示的神经元较少,较为靠近前角中心排列(图 3C)。

3 讨 论

本实验模型大鼠神经端侧吻合后,经 24 个月的修复,利用 HRP 神经逆行追踪技术,将 HRP 注射到远段腓总神经,结果在同侧脊髓相应节段灰质前角内、同侧 L_4, L_5 脊神经节内均见到蓝染标记细胞;远段腓总神经的断面电镜超微结构显示,除却神经纤维稍细以外,神经超微结构已经正常,说明远段腓总神经确实与神经元包括脊髓前角运动

细胞和脊神经节感觉细胞建立了神经细胞自然结构的完整性、连续性。

多数研究表明将损伤神经远端缝合到邻近正常神经的侧方进行神经端侧吻合,再生神经来源于吻合口处供体神经的侧支发芽,并获得功能恢复,推测再生机制可能与神经营养因子、雪旺细胞和细胞外基质等有关^[14]。神经切断伤后近端只是 1-2 节郎飞节范围发生华勒变,本实验电镜观测表明,旷置包埋的近段腓总神经中部没有见到发生华勒变的迹象,推测应该不会发生退缩到坐骨神经主干内形成生长锥,并进而引导再生长入远段腓总神经的情况。因此,在本实验的条件下,远

段腓总神经再生经近段腓总神经诱导的可能性不大。再生长入到远段腓总神经的神经纤维最大可能来源于胫神经的侧枝出芽,至于其是否由误伤供体神经所致、以及在实验中确保避免误伤供体神经,具有继续研究的价值。

由于手术侧 HRP 逆行追踪到的脊髓前角运动神经元的数量有限,每一个切面上仅有 1~4 个细胞,很难找出或界定其排列规律,因此,利用胫神经、腓总神经各自运动神经元在脊髓前角内的定位依据来判断腓总神经内再生神经的来源风险较大。荧光双标是一个好方法^[15],有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Zhao JZ, Chen ZW, Chen TY. Nerve regeneration after terminolateral neurotaphy: Experimental study in rats [J]. *J Reconstr Microsurg*, 1997, 13(1): 31-37.
- [2] 徐清贵,洪光祥,王发斌,等.神经端侧吻合法防治失神经肌肉萎缩的实验研究[J]. *中华手外科杂志*, 1999, 15(1): 42-44.
- [3] 朱庆棠,朱家恺,劳镇国,等.神经端侧吻合后侧枝再生的形态学研究[J]. *中华显微外科杂志*, 1999, 22(2): 117-119.
- [4] 范启申,王拥军,周祥吉,等.逆行追踪神经端侧缝合后侧枝生长的神经元胞体实验研究[J]. *中华显微外科杂志*, 2000, 23(3): 200-201.
- [5] Yamauchi T, Maeda M, Tamai S, et al. Collateral sprouting mechanism after end-to-side nerve repair in the rat [J]. *Med Electron Microsc*, 2000, 33(3): 151-156.
- [6] 陈振兵,洪光祥,王发斌,等.神经端侧吻合术与侧侧吻合术对神经干损伤后功能恢复作用的比较[J]. *中华实验外科杂志*, 2001, 18(2): 136-137.
- [7] 魏佑震,孙雪生,朱涛,等.大鼠腓总神经“π”式桥接于胫神经再生神经的电生理溯源[J]. *中华显微外科杂志*, 2003, 26(4): 285-286.
- [8] Tiangco DA, Papakonstantinou KC, Mullinax KA, et al. IGF-I and end-to-side nerve repair: a dose-response study [J]. *J Reconstr Microsurg*, 2001, 17(4): 247-256.
- [9] 张辉宇,于春波,孙雪生,等.大鼠腓总神经“π”式桥接于胫神经再生的原配连接[J]. *中华显微外科杂志*, 2007, 30(2): 125-128.
- [10] 汪华侨,庞水发,李光武,等.靶肌肉注射碱性生成纤维细胞生长因子对坐骨神经损伤再生及功能恢复的影响[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2003, 24(S1): 34-37.
- [11] 谢富康,郑敏.坐骨神经源性因子对培养中成年青蛙背根书神经元的作用 [J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(2): 92-95.
- [12] Liu K, Chen LE, Seaber AV, et al. Motor functional and morphological findings following end-to-side neurotaphy in the rat model [J]. *J Orthop Res*, 1999, 17(2): 293-300.
- [13] 易西南,李昌琪,吴松,等.周围神经端侧吻合再生纤维来源的实验研究 [J]. *中国临床解剖学杂志*, 2001, 19(3): 252-253.
- [14] 宋海峰,刘强,吴斗.端侧缝合修复周围神经损伤研究进展[J]. *国际骨科学杂志*, 2006, 27(2): 98-100.
- [15] 陈琳,彭峰,沙轲,等.端侧缝合后神经再生方式的实验研究[J]. *中华手外科杂志*, 2005, 21(5): 301-303.

(编辑 徐杰)

(上接第 719 页 from page 719)

- 2005, 25(6): 635-638.
- [5] 丘瑞香,贺敬波,蓝军,等.中药复方心脉通胶囊的抗心肌缺血疗效与机制[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2001, 22(1): 57-60.
- [6] Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 70(2): 181-190.
- [7] 邓美海,区庆嘉,刘超,等.主动脉转流对内脏缺血再灌注损伤的影响 [J]. *中山医科大学学报*, 1999, 20(4): 267-271.
- [8] Comhair SA, Erzurum SC. The regulation and role of extracellular glutathione peroxidase [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(1-2): 72-79.
- [9] 陈玉石. 黄芪对超氧阴离子自由基的清除作用[J]. *数理医药学杂志*, 1998, 11(1): 61.
- [10] 凌洪锋,苏丹,曹洋. 黄芪多糖抗氧化作用研究 [J]. *医学理论与实践*, 2005, 18(8): 872-874.
- [11] 高卫真,康毅,娄建石,等. 黄芪苷 IV 对心肌细胞氧化损伤的保护作用[J]. *中国心血管杂志*, 2005, 10(3): 166-169.
- [12] 张少丹,裴林,丁春华,等. 黄芪干预缺血缺氧性脑损伤幼鼠脑组织一氧化氮及丙二醛含量的变化 [J]. *中国临床康复*, 2005, 9(37): 185-187.
- [13] 陈建,吴卫真,余毅. 黄芪对肾缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2000, 21(4): 211-212.

(编辑 刘清海)