

· 基础研究 ·

复合物理因子促大鼠周围神经再生的效果*

田德虎¹ 赵 民^{2,5} 王利民² 张英泽³ 赵 峰⁴ 李高峰¹ 于昆仑¹

摘要 目的: 观察复合物理因子促神经再生的应用效果。方法: 选用成年健康雄性 SD 大鼠 60 只, 建立神经再生室模型后随机分成 A 组(电刺激组)、B 组(分米波组)、C 组(复合因子组)和 D 组(对照组), 每组 15 只, 进行实验。分别于术后 1、2、4、8、12 周, 进行大体、光镜、电镜、轴突图像分析、免疫组织化学和电生理检测。结果: C 组大体、光、电镜观察、轴突图像分析与电生理检测指标明显优于其他各组。结论: 分米波及电刺激均能明显地促进周围神经再生, 两种物理因子同时使用具有协同作用。

关键词 电刺激; 分米波; 物理因子; 神经再生

中图分类号: R493, R454, R651.3 文献标识码: A 文章编号: 1001-1242(2007)-02-0100-03

Effect of enhancing peripheral nerve regeneration with combined physical factors/TIAN Dehu, ZHAO Min, WANG Limin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(2): 100—102

Abstract Objective: To study the effect of combined physical factors on enhancing nerve regeneration. **Method:** Sixty Sprague-Dawley rats (200—250g) were randomly divided into 4 groups after making a nerve regeneration chamber model. In group A, treated with electric stimulation; In group B, decimeter wave; In group C, combined above physical factors; In group D, no physical treatment. The effects were evaluated by anatomical observation, light and electron microscope observation, SFI and electrophysiological assessment. **Result:** Nerve regeneration in group C was the best ($P < 0.05$). **Conclusion:** Single physical factor (decimeter wave or electric stimulation) could improve nerve regeneration. Combined physical factors had synergism in enhancing nerve regeneration.

Author's address Department of Hand Surgery, The Third Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050051

Key words electric stimulation; decimeter wave; physical factors; nerve regeneration

微波、电刺激等物理因子可促进神经修复与再生, 但以往的实验多为单因子治疗。本实验是对受损神经采用分米波照射及经皮电刺激复合物理因子进行治疗, 通过大体、光镜、电镜观察、轴突图像分析、免疫组织化学、电生理检测、探讨复合物理因子对周围神经损伤后神经修复与再生的作用机制, 以期指导临床。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选用健康 SD 大鼠 (河北医科大学动物实验中心提供) 60 只, 体重 200—250g。随机分成 A 组(电刺激组)、B 组(分米波组)、C 组(复合因子组)和 D 组(对照组), 每组 15 只。

1.2 动物模制备

1%戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔注射麻醉, 取俯卧位, 于左侧大腿后部正中切口, 分离股二头肌和半腱肌、半膜肌之间的肌间隙, 显露坐骨神经, 在梨状肌下缘 10mm 处将神经切断, 两断端任其回缩。在 8 倍手术显微镜下以 9—0 无创线将神经两断端分别套

入长 10mm、内径 1.5mm 的硅胶管中, 形成神经再生室, 神经两断端相距 6mm。

1.3 实验方法

于术后第 1d 至术后 12 周, 实验动物麻醉后, 取俯卧、双腿伸直位固定于实验台上。A 组采用国产 DXZ-1 多形波治疗机, 对左侧坐骨神经进行电刺激。刺激电极按坐骨神经损伤部位体表投影放置, 正、负电极距离为 20mm, 负极置远端。刺激参数为: 频率为 2Hz, 波长为 0.5ms, 刺激强度为 2mA。1 次/天, 10min/次, 每周连续 5d, 休息 2d。B 组采用国产 TMA-A 型双频微热疗机对左侧大腿后正中行分米波辐射。频率 915MHz, 功率 5W, 辐射距离 10cm, 1 次/d, 10min/次, 每周连续 5d, 休息 2d。C 组先后分别用 B 组和 A 组方法治疗, 各 10min, 1 次/d, 每周连

* 基金项目: 河北省科技厅攻关课题(03276163)

1 河北医科大学第三医院手外科, 石家庄市, 050051

2 北京市顺义区医院骨科

3 河北医科大学第三医院急救中心

4 河北医科大学第一医院骨科

5 通讯作者: 赵民(北京市顺义区医院骨科)

作者简介: 田德虎, 男, 主任医师, 教授, 医学博士, 硕士生导师

收稿日期: 2006-06-22

续 5d, 休息 2d。D 组不做任何治疗, 为空白对照组。

1.4 观测指标及检测方法

1.4.1 大体及光镜观察: 分别于术后 1、2、4、8、12 周, 每组随机选取 1 只大鼠, 暴露桥接神经处, 肉眼观察神经再生及神经周围粘连情况。在吻合口远端 5mm 处切取 3mm 长神经段留作标本, 10% 中性福尔马林固定标本, HE 染色及镀银染色, 观察再生神经结构。

1.4.2 电镜观察: 于术后 12 周每组随机选取 1 只大鼠, 在吻合口远端 2mm 处切取 3mm 长神经段。3% 戊二醛溶液固定标本, 环氧树脂包埋, 超薄切片, 透射电镜观察神经纤维再生情况。

1.4.3 免疫组织化学检测: 于术后 8 周取材, 标本(采用上述光镜观察所用的同一标本)制成 5 μ m 的石蜡切片。常规 SP 法染色, 光学显微镜下观察切片中 S-100 蛋白在神经组织中的表达情况。

1.4.4 电生理检测: 于术后 12 周, 对每组所剩 10 只大鼠使用 DISA1500 型肌电诱发电位仪进行复合肌肉动作电位检测。

1.4.5 轴突图像分析: 采用电脑图像分析处理系统, 对术后 12 周每组所剩 10 只大鼠按照上述方法在吻合口远端 5mm 处切取 3mm 长神经段, 3% 戊二醛溶液固定标本, 环氧树脂包埋, 超薄切片, 镀银染色, 计数有髓神经纤维数目、轴突直径及髓鞘厚度, 每个视野测定 200—400 根神经纤维。

1.5 统计学分析

所有数据均采用 SPSS11.0 统计软件进行统计学处理。所得数据均以均数 $\pm$ 标准差表示, 数据间比较采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 大体观察

术后 1 周, A、B、C、D 各组大鼠皮下组织和神经周围组织均充血、水肿, B、C 组较轻, 神经周围无粘连或少许薄膜粘连。术后 2 周, A、B、C、D 各组神经周围组织充血、水肿均明显减轻, B、C 组神经周围多为薄膜或较疏松的粘连, A、D 组神经周围广泛疏松粘连, 钝性易分离。A、B、C 组硅胶管内两神经断端

已被再生神经桥接起来, 其表面非常光滑, 中间稍细, 两端略粗, D 组两断端间仍有距离。术后 4 周, A、B、C、D 各组神经周围组织充血、水肿基本消退。B、C 组神经周围多为较疏松的粘连, 而 A、D 组神经周围广泛致密的粘连, 钝性不易分离。A、B、C、D 各组硅胶管内均有再生神经干通过, 再生组织光滑。术后 8 周, A、B、C、D 各组神经周围组织无充血、水肿, 神经周围粘连情况与术后 4 周基本相同, 再生神经干较术后 4 周时明显增粗。术后 12 周, B、C 组神经表面光滑, 多为少许薄膜粘连, 偶有无粘连, A、D 组神经周围粘连较术后 4 周、8 周时明显疏松, 钝性可分离。A、B、C、D 各组再生神经较术后 8 周时明显增粗, 与近段神经干直径几乎接近。

2.2 光镜观察

术后 8 周, A、B、C、D 各组再生神经干内部结构已比较成熟, 束状结构明显, 有大量再生轴突和髓鞘。其中 A、B、C 组再生神经纤维密集, 分布均匀, 轴突较为粗大, 髓鞘厚, 而 D 组神经纤维排列较稀疏, 分布不均匀, 且轴突相对较细, 髓鞘薄。

2.3 电镜观察

术后 12 周, A、B、C 组有髓神经纤维再生显著, 排列规则, 束状结构明显, 髓鞘明显增厚, 明暗板层结构清晰, 轴突直径较大。D 组髓鞘大小不一, 结构欠成熟(见图 1—4)。

2.4 免疫组织化学检测

术后 4 周, A、B、C 组远侧段的主要特征为许多类纤维和长型细胞形成的细胞索带, 缺乏正常的神经膜细胞, 有少量 S-100 蛋白表达; D 组未成熟神经膜细胞中 S-100 蛋白表达明显少于上述三组。

2.5 轴突图像分析

术后 12 周 A、B、C 组再生神经远段有髓神经纤维直径、髓鞘厚度及横截面有髓神经纤维数目均大于 D 组(方差分析)(见表 1)。

2.6 术后 12 周电生理检测结果

A、B、C、D 各组均能引出肌肉收缩及复合肌肉动作电位。但 A、B、C 组与 D 组比较, 潜伏期短、神经传导速度快及波幅高, 差异有显著性意义(方差分析)(见表 2)。

图 1 术后 12 周电刺激组
电镜图片 $\times 20K$

图 2 术后 12 周分米波组
电镜图片 $\times 20K$

图 3 术后 12 周复合因子组
电镜图片 $\times 20K$

图 4 术后 12 周对照组
电镜图片 $\times 20K$

表 1 术后 12 周各组轴突图像分析结果的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	轴突数目(个)	轴突直径(μm)	髓鞘厚度(μm)
A 组	2714.40 $\pm$ 38.10	2.58 $\pm$ 0.05	1.15 $\pm$ 0.01
B 组	2704.70 $\pm$ 44.34 ^①	2.57 $\pm$ 0.06 ^①	1.18 $\pm$ 0.01
C 组	3897.10 $\pm$ 144.95 ^{②③}	3.64 $\pm$ 0.09 ^{②③}	1.61 $\pm$ 0.03 ^{②③}
D 组	2016.30 $\pm$ 57.11 ^{②③④}	1.60 $\pm$ 0.06 ^{②③④}	0.84 $\pm$ 0.03 ^{②③④}

与 A 组比较^① $P>0.05$,^② $P<0.05$;与 B 组比较^③ $P<0.05$;与 C 组比较^④ $P<0.05$

表 2 术后 12 周各组神经传导速度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	潜伏期(ms)	神经传导速度(m/s)	波幅(mV)
A 组	2.44 $\pm$ 0.16	35.40 $\pm$ 0.75	4.97 $\pm$ 0.16
B 组	2.46 $\pm$ 0.49 ^①	36.00 $\pm$ 0.68 ^①	4.95 $\pm$ 0.07 ^①
C 组	1.74 $\pm$ 0.44 ^{②③}	45.30 $\pm$ 1.41 ^{②③}	6.53 $\pm$ 0.07 ^{②③}
D 组	3.45 $\pm$ 0.46 ^{②③④}	20.70 $\pm$ 1.14 ^{②③④}	3.90 $\pm$ 0.07 ^{②③④}

与 A 组比较^① $P>0.05$,^② $P<0.05$;与 B 组比较^③ $P<0.05$;与 C 组比较^④ $P<0.05$

3 讨论

周围神经再生微环境的改变可促进神经纤维再生速度,加速神经功能恢复,其中物理疗法可改善损伤部位的局部微循环的流速,可增进和刺激创伤的恢复进程。物理疗法的选用包括红外、紫外线照射、磁电刺激、激光照射、频谱仪照射、超声波治疗等^[1]。

周围神经损伤后损伤局部充血、水肿,与周围组织形成广泛而致密的粘连,导致在损伤的基础上又形成卡压;而卡压又会加重神经充血、水肿,使再生神经缺血、缺氧,这一恶性循环阻碍了神经再生。分米波能够抑制损伤后的炎症反应、改善损伤局部的血液循环、加强损伤局部的营养代谢减少瘢痕形成、减轻损伤神经术后粘连^[2-3]。本实验结果显示,术后 1、2、4、8、12 周不同时段 B、C 两组坐骨神经粘连程度均低于 A、D 两组,这充分说明分米波能有效抑制损伤后的炎症反应、改善损伤局部血液循环、减少瘢痕形成、减轻损伤神经粘连,利于神经再生。电刺激疗法有助于组织再生,其促进周围神经再生也得到大量动物实验和临床试验的证实^[4-5]。

在周围神经系统中如检测到 S-100 蛋白表达水平升高,则提示该处神经膜细胞增殖活跃,间接说明该措施有利于神经再生。本实验 8 周免疫组化检查 A、B、C 组 S-100 蛋白表达水平均高 D 组,以 C 组表达最多。S-100 蛋白的出现预示着神经膜细胞的成

熟和神经再生的表现,也是神经功能恢复过程的基础^[6]。

周围神经损伤后神经修复与再生过程即损伤近段神经轴突长入远段神经的过程。因此,再生神经中轴突的数目及成熟程度可反应损伤神经的再生情况。本实验 1、2、4 周光镜检查,12 周镀银染色光镜检查神经轴突记数及电镜检查结果,从形态上看,C 组无论是在炎症细胞浸润程度、神经再生轴突数目及直径、髓鞘出现时间及成熟程度上均优于其他三组,A、B 两组则无明显差别,但优于 D 组($P<0.05$)。周围神经损伤修复治疗后,其所支配器官功能的恢复程度是验证神经再生质量最客观的标准。该实验电生理检测结果显示 12 周时 C 组坐骨神经传导速度最快,A、B 两组次之,D 组最慢($P<0.05$)。

本实验结果以复合物理因子组效果最好,推测可能与以下几方面有关:①利用分米波的温热效应,促进局部血液循环,抑制瘢痕粘连,为神经修复提供良好的微环境,同时分米波也有促进髓鞘形成和促进局部神经营养因子的合成及释放作用。②远端负极电刺激则加速了神经膜细胞的游走、爬行及生长发育,相应神经膜细胞分泌的促神经生长因子增多,并且电场对轴突的结构蛋白、微丝、微管有趋向作用。③分米波、电刺激两种物理因子的复合应用,其促进周围神经再生的作用是一种叠加及整合。

参考文献

- [1] 雷季良,赵靖,杨立元,等. 物理疗法促进周围神经损伤的修复与再生[J]. 局解手术学杂志,2003,12(3):184—187.
- [2] 田德虎,张英泽,米立新,等.分米波在周围神经损伤后 S-100 蛋白表达变化中作用的实验研究[J].中国康复医学杂志,2004,19(4):269—271.
- [3] 田德虎,郭明珂,米立新,等. 分米波防治屈肌腱粘连机制的实验研究[J]. 中华物理医学与康复杂志,2003,25(11): 646—649.
- [4] 白玉龙,胡永善,林伟平,等. 经颅磁电刺激促进周围神经再生的组织学研究[J]. 中国康复医学杂志,2002,17(6):347—349.
- [5] 白玉龙,胡永善,林伟平,等. 经颅磁电刺激和局部电刺激促进周围神经再生的比较研究[J]. 中国康复医学杂志,2003,18(2): 88—90.
- [6] 张殿英,姜保国,傅忠国,等. 周围神经损伤后 S-100 蛋白的分布和变化研究[J]. 中国矫形外科杂志,2002,9(4): 348—351.