

·基础研究·

分米波对神经损伤后运动终板再生的影响

田德虎¹ 李照明² 张 奇¹ 张英泽^{1,4} 刘宽芝³ 于昆仑¹ 韩金豹¹ 韩久卉¹

摘要 目的:探讨分米波对神经损伤吻合术后肌肉运动终板(MEP)再生的影响。方法:大鼠坐骨神经离断后行 9-0 无损伤线吻合,术后实验组行分米波局部辐射,每周 5 次,分别于术后第 4 周、8 周、12 周观察运动终板显微结构的变化及乙酰胆碱酯酶(AchE)含量的变化。结果:各时间点实验组大鼠腓肠肌运动终板再生和 AchE 含量明显高于对照组。结论:周围神经损伤后,局部应用分米波辐射可明显促进终板再生和提高 AchE 含量,从而促进运动功能的恢复。

关键词 分米波;周围神经损伤;运动终板;乙酰胆碱酯酶

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-11-0976-03

The influence of decimeter wave on the regeneration of motor end plate after nerve injury/TIAN Dehu, LI Ximing, ZHANG Qi, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(11): 976—978

Abstract Objective: To approach the influence of decimeter wave on muscle motor end plate (MEP) regeneration and anastomosis after nerve injury. **Method:** After the rat's sciatic nerve mutilation, 9—0 surgical thread was used to anastomose the nerve. The rats in experiment group were given local decimeter wave irradiation, five times a week. Then the changes of microstructure of MEP and the content of AchE were observed at 4th, 8th and 12th week. **Result:** At different time points the regeneration of rat's gastrocnemius muscle MEP and the contents of AchE were better than that in control group. **Conclusion:** Local decimeter wave irradiation could obviously promote the regeneration of MEP and enhance the content of AchE after peripheral nerve injury.

Author's address Dept. of Orthopaedics, The Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050011

Key words decimeter wave; peripheral nerve injury; motor end plate; acetylcholinesterase

周围神经损伤是骨科常见、多发病。近几十年来对促进神经再生的研究较多,对失神经后运动终板的研究较少,而再生运动神经的功能恢复最终要靠运动终板的再生与重建,终板的功能状态反映肌肉的功能状态^[1]。有研究报道^[2-8],一些物理因子,如电刺激、微波等能促进周围神经再生,本课题组在前期探讨分米波促周围神经再生的基础上,构建大鼠坐骨神经损伤模型,修复后对其局部进行分米波辐射,通过终板特染、AchE 特染观察终板显微结构及 AchE 含量的变化,探讨分米波对周围神经损伤后神经修复与终板再生的作用机制,为临床推广应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组与手术方法

本实验选用相同条件下喂养的成年健康 SD 大鼠(河北医科大学动物实验中心提供)60 只,雄性,体重 200—250g。随机编号标记后分成 A 组(实验组)和 B 组(对照组),每组 30 只。于同一动物饲养室适应性饲养 1 周。术前 8h 禁食水,10%水合氯醛(300mg/kg)腹腔注射麻醉,取俯卧、后腿伸直位固定于手术台上,常规备皮、消毒、铺巾。于右侧大腿后部

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,在 8 倍手术显微镜下以 9—0 无损伤线将神经两断端吻合,关闭肌间隙,缝合皮肤,术毕。本实验所有手术均由实验者一人在同一助手协助下完成。

1.2 术后处理

术后每日换药 1 次,术后 7d 切口拆线。动物术后继续 A 组和 B 组分笼饲养,任其活动。A 组于术后第 1 天至术后 12 周取俯卧、双腿伸直位固定于实验台上,右侧大腿后正中行分米波辐射。分米波治疗仪采用国产 TMA-A 型双频微热疗机,频率 915MHz,功率 5W,辐射距离 10cm,1 次/天,10min/次,每周连续 5d,休息 2d。B 组于 A 组治疗同时逐一在微热疗机旁固定于同型实验台,进行 10min 空白对照。

1.3 观察指标及检测方法

1 河北医科大学第三医院骨科,石家庄,050011

2 石家庄市第一医院骨科

3 河北医科大学第三医院内分泌科

4 通讯作者

作者简介:田德虎,男,主任医师

收稿日期:2008-07-16

1.3.1 运动终板的氯化金染色: 术后第 4、8、12 周取腓肠肌的上 1/3 切成厚 3mm 的肌组织小块, 用氯化金特染固定液固定, 变半透明后由滤纸吸干水分放入 1% 氯化金液内 15—60min, 待组织成金黄色后再放入 20% 甲酸溶液内过夜, 第 2 天放入甘油、酒精液混合液中保存, 取小块肌组织挑拨并用甘油压片, 光镜下观察神经-终板, 并行图像分析。

1.3.2 终板 AchE 染色: 术后第 4、8、12 周取腓肠肌中段肌组织行冰冻切片厚 5 μ m, 水洗后, Karnovsky 作用液染 30min (0—4℃), 0.44M 蔗糖洗, Dab 作用 2min (0—4℃), 再次 0.44M 蔗糖洗, 45℃ 温风吹干, 液体石蜡封片。光镜下观察运动终板 AchE 呈棕色, 行光密度测定, 并进行统计学分析。

1.4 统计学分析

所有数据均采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学处理。所得数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 数据间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 运动终板的显微结构改变

术后第 4 周: A 组和 B 组镜下运动终板均出现退变, 终板染色变浅, 轴索终末分支减少, 终板核减少, 肌浆淡染, 部分终板边缘皱缩, 中央出现空泡样淡染区, 两组均可见再生运动终板, 肌纤维间可见少许再生神经, 见图 1—2。术后第 8 周: A 组和 B 组镜下均可见再生运动终板。A 组运动终板数量增加, 染色较深, 轴索终末分枝、终板核增多, 肌浆染色增深, 终板边缘较平整, 形态多呈“哑铃”状, 少部分呈“爪样”或“菊花”, 肌纤维间可见再生丰富的神经。B 组运动终板数量增加不明显, 染色较淡, 轴索终末分支、终板核增多不明显, 肌浆淡染, 终板边缘部分仍有皱缩, 形态多呈不规则状, 见图 3—4。术后 12 周: A 组运动终板形态与着色接近正常, 体积完整呈椭圆或卵圆形, 轴索终末形成众多细支盘绕在肌纤维上, 可见较多终板核, 局部肌浆浓聚, 运动终板在着色、数量上与正常组无明显差别, 形态多呈“爪样”或“菊花”样。B 组运动终板数量少, 着色较深, 体积多不完整, 轴索终末形成相对少, 终板核少, 肌浆浓染, 终板形态部分呈“哑铃”、“爪样”或“菊花”, 见图 5—6。

2.2 乙酰胆碱酶含量

术后第 4 周: A 组和 B 组运动终板数量少, 边缘模糊, AchE 染色相对浅, 只有残迹可见, 有的甚至呈阴性, 可能与部分运动终板崩解变性有关。两组运动终板的光密度变化无显著性意义 ($P>0.05$), 见表 1。

术后第 8 周: A 组运动终板数量增加明显, AchE 染色较术后 4 周有所增强。B 组变化不明显。两组运动终板的光密度变化有显著性意义 ($P<0.05$), 见表 1。术后第 12 周: A 组运动终板数量明显增加, 运动终板边缘清晰并加粗, 终板 AchE 染色深。B 组运动终板数量较术后 8 周有所增加, ACHE 染色较深。两组运动终板的光密度变化有显著性意义 ($P<0.01$), 见表 1。

表 1 两组术后运动终板 AchE 光密度比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	第 4 周	第 8 周	第 12 周
实验组	0.10 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.04
对照组	0.09 $\pm$ 0.04	0.10 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.05
<i>P</i>	>0.05	<0.05	<0.01



图 1 术后 4 周 A 组腓肠肌运动终板的变化 (氯化金染色 $\times 400$)



图 2 术后 4 周 B 组腓肠肌运动终板的变化 (氯化金染色 $\times 400$)



图 3 术后 8 周 A 组腓肠肌运动终板的变化 (氯化金染色 $\times 400$)



图 4 术后 8 周 B 组腓肠肌运动终板的变化 (氯化金染色 $\times 400$)



图 5 术后 12 周 A 组腓肠肌运动终板的变化 (氯化金染色 $\times 400$)



图 6 术后 12 周 B 组腓肠肌运动终板的变化 (氯化金染色 $\times 400$)

3 讨论

运动终板是运动神经末梢与肌纤维膜形成突触的效应器结构, 其正常结构与功能的维持有赖于与神经元的完整联系。神经损伤后运动终板出现退变, 终板染色变浅, 数量减少, 部分终板边缘皱缩, 出现空泡样淡染区, 随时间延长退变明显, 轴突终末分支溃变, 终板减少甚至消失, 显示模糊的轮廓, AchE 染色浅, 有的只有残迹可见^[9]。有研究发现, 乙酰胆碱 (Ach) 主要来源于运动神经元胞体, 通过轴突快速运输到达神经终末, AchE 活性的强弱反映运动神经元的功能状态。运动终板结构的改变与 AchE 的活性和含量有决定性的关系, 神经损伤后神经远端轴突发生 Waller 变性, 导致运动终板 AchE 活性下降,

终板结构发生改变。神经再生时,运动终板 AchE 活性和终板结构恢复正常^[10]。本实验结果显示,神经损伤术后 4 周实验组和对照组镜下运动终板开始出现退变,终板染色变浅,对照组退变较实验组反应重,差别不太明显。AchE 含量减少,两组光密度分析虽无显著性意义($P>0.05$),实验组的含量高于对照组。说明神经损伤早期分米波的应用可以减轻局部充血、水肿,增加局部血循环,抑制炎症反应,减轻神经周围粘连、卡压,进一步改善神经缺血、缺氧,为神经再生提供良好的微环境,利于神经的修复与再生,减轻了 AchE 含量的减少,进而延缓了运动终板的退变。术后 8 周随着分米波的辐射,实验组运动终板数量增加,染色较深,AchE 含量较对照组增多。至术后 12 周实验组终板几乎接近正常,AchE 含量继续增多。而对照组术后 8 周终板随着损伤神经逐渐再生而退变减轻,至第 12 周部分恢复,即单位面积内的数量仍较少,AchE 含量也较低。实验研究表明,分米波辐射早期终板结构的退变、AchE 减少均轻于对照组,而且后期终板再生结构的改变和 AchE 含量的提高明显高于对照组。本实验终板的变化可能与瓦勒氏变性、AchE 含量,神经生长因子(NGF)含量及雪旺氏细胞增殖过程有关。瓦勒氏变性一旦发生,早期 AchE 含量和活性下降,受损部位即会提供适宜的细胞与细胞、细胞与基质及营养因子的微环境以满足神经轴突生长的需要^[11]。NGF 可以促进轴突的再生恢复,轴突再生后,运动终板的结构和功能也逐渐恢复^[12]。雪旺氏细胞是周围神经系统的胶质细胞,周围神经受损时,反应性的分裂增殖,形成 Bungner 带,为轴突再生提供通道;同时雪旺氏细胞分泌数种神经营养因子,防止受损神经元死亡,促进轴突再生;雪旺氏细胞还分泌细胞外基质成分和细胞黏附分子等,为轴突提供良好的再生环境,支持和引导再生的轴突重新支配靶组织^[13]。前期研究表明分米波可以提高再生神经中 S-100 蛋白和 NGF 的表达水平,促进雪旺氏细胞增殖,加速损伤神经轴突再生及再髓鞘化、再生神经结构成熟,从而促进神经再生和功能恢复。本实验结果提示分米波的应用促进了损伤神经的修复和再生,减缓了运动终板的退变,同时分米波促进雪旺氏细胞增殖,提高 NGF 的水平和 AchE 含量,进一步促进了运动终板的再生,这种变化随着

分米波应用时间的延长越来越明显,这就为神经的修复手术争取了时间,进而更有利于神经的再生和运动功能恢复。

4 结论

神经损伤后,局部应用分米波可以促进神经轴突再生,使胆碱能神经递质乙酰胆碱合成和释放作用增强,并使 AchE 的活性增高,减轻终板变性的程度,促进运动终板再生、重新神经再支配,延缓肌肉萎缩,为神经功能恢复奠定了基础。其对运动终板超微结构变化的影响仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 张庆民,关骅.脊髓及周围神经损伤后神经肌肉运动终板的病理改变[J]. 中国康复理论与实践,2004,10(11):680—681.
- [2] 米立新,王彦香,张仲,等.经皮电神经刺激对周围神经再生的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志,2003,25(4):209—211.
- [3] 朱西娥,杨彩哲,吴石白,等.毫米波照射穴位治疗糖尿病周围神经病变的临床观察[J]. 空军总医院学报,2000,16(3):178—178.
- [4] 于淑芬,佟俐,刘淑芳,等.调制中频脉冲电促进周围神经功能恢复的研究[J]. 中华理疗杂志,1997,20(1):35—37.
- [5] 尹爱莉,祝玮.应用正弦调制中频电疗及微波治疗 DPN[J]. 辽宁实用糖尿病杂志,2003,11(1):27—28.
- [6] Inoue M, Hojo T, Yano T, et al. The effects of electroacupuncture on peripheral nerve regeneration in rats[J]. Acupunct Med,2003,21(1-2):9—17.
- [7] Chen YS, Hu CL, Hsieh CL, et al. Effects of percutaneous electrical stimulation on peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers [J]. J Biomed Mater Res,2001,57 (4): 541—549.
- [8] Lazar DA, Curra FP, Mohr B, et al. Acceleration of recovery after injury to the peripheral nervous system using ultrasound and other therapeutic modalities [J]. Neurosurg Clin N Am, 2001,12(2): 353—357.
- [9] 王瑜,李 兵,肖传国.大鼠脊神经损伤后所支配骨骼肌及其运动终板的退变[J]. 中国康复医学杂志,2006,21(10):871—873.
- [10] 殷琦,陆玉朴,胡蕴玉,等.肌肉失神经后运动终板早晚期退变的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志,1995,9:35—37.
- [11] Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration[J]. Annual reviews in Neuroscience, 1990,13(1):43—60.
- [12] 王占友,石玉秀,张开,等.神经生长因子对神经损伤后运动终板再生影响的研究 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,1999,8(2): 197—200.
- [13] Guest JD, Rao A, Olson L, et al. The ability of human Schwann-cell grafts to promote regeneration in the transected nude spinal cord[J]. Exp Neurol, 1997,148(2):502—522.