

·基础研究·

兔骨骼肌运动点与运动终板的形态学研究及临床意义

毛雅君^{1,2} 励建安^{1,3} 李冰¹ 刘守国¹ 朱杰¹

摘要

目的:探索运动点的本质是终末神经纤维密集区,还是运动终板密集区,给化学神经阻断技术的定位方法提供理论依据。

方法:成年新西兰兔9只,靶肌肉为双侧肱二头肌及双侧腓绳肌。每块肌肉选择2个研究点,共计72个点分为3组:小神经密集区(N组):通过最小电刺激引起最大收缩的部位;运动终板密集区(P组):肌电图显示终板电活动最活跃的部位;非密集区对照组(C组):以最强电流诱发最弱靶肌肉收缩,且连接肌电图后未出现终板电活动的部位;在以上部位注入染料定位。分别记录三组的电刺激强度。通过苏木精-伊红染色和乙酰胆碱酯酶染色,应用图文报告分析软件观察运动终板及神经纤维数量,将3组数据进行统计学分析。

结果:电刺激强度比较:C组最大(0.73 ± 0.05)mA,P组次之(0.39 ± 0.04)mA,N组最小(0.10 ± 0.01)mA,3组间两两比较均有显著差异($P < 0.01$)。神经纤维数量比较:N组最多,P组次之,C组最少。N组与P组之间的差异不显著($P > 0.05$),但N组与C组,P组与C组之间差异显著($P < 0.01$)。运动终板数量比较:P组最多,N组次之,C组最少,3组间两两比较差异均有显著性($P < 0.05$)。

结论:终末神经纤维密集区和运动终板密集区十分接近,但是“运动点”概念不同。临床上可以使用电刺激技术作为肉毒毒素肌肉注射的定位技术。

关键词 神经阻滞;运动点;运动终板;终末神经纤维

中图分类号:R442.6,R614.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2011)-11-1014-06

Morphological study and clinical significance of skeletal muscle's motor end plates and motor points in rabbits/MAO Yajun, LI Jian'an, LI Bing, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2011,26(11): 1014-1019

Abstract

Objective: To characterize the morphology of motor points, i.e. whether they are compact district of nerve fiber or motor end-plate, and therefore to provide rationale for the localization methods during nerve blocking.

Method: Nine New Zealand rabbits were used for the study. The musculus biceps brachii and hamstring bilaterally were selected as target muscles for injection. A total of 72 target points were divided into three groups: compact district of nerve fibers(Group N), where the maximal contraction was induced with minimal electric stimulus; compact district of motor-end plates(Group P), where the end-plate potential was most significant in electromyogram (EMG) monitoring; and a non-compact district control point (Group C), where the weakest contraction of target muscle was induced with maximal electric stimulus, and no end-plate potential was observed in EMG monitoring. All these points were marked by injection of dye during monitoring. The intensities of currents by which the maximal contractions of target muscles were induced were recorded respectively for the three groups, and the amount of motor end-plates and nerve fibers were analyzed and counted with HE (hemotoxylin and eosin) staining and AchE (acetylcholinesterase) staining respectively.

Result: Statistically significant difference ($P < 0.01$) was found by comparison of electric stimulus intensities among

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.11.006

1 南京医科大学第一附属医院康复医学科,南京,210029; 2 武警浙江省总队杭州医院康复医学科; 3 通讯作者
作者简介:毛雅君,女,硕士,主治医师; 收稿日期:2011-03-04

these three groups: the current of highest intensity current (0.73 ± 0.05)mA was used in Group C, followed by Group P with the current of average intensity(0.39 ± 0.04)mA, and the the current of lowest intensity(0.10 ± 0.01) mA was used in Group N. Both Group N and P had significantly larger number of nerve fibers than that in Group C ($P < 0.01$), however, no significant difference between Group N and P ($P > 0.05$) with respect to the amount of nerve fibers. Finally, significantly larger number of motor-end plates was found in Group P than that in Group N and C($P < 0.05$).

Conclusion: Distinction characteristics of two types of “motor points” were found in the compact districts of nerve fibers and motor end-plates respectively. However, these two types of “motor points” were geographically associated with each other and therefore the technique of electric stimulus should be employed for the localization during neurolysis with botulinum toxin.

Author's address The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210029

Key word nerve block; motor point; motor-end plate; terminal nerve fiber

骨骼肌痉挛是上运动神经元损伤后,脊髓中枢兴奋性神经递质过度释放而出现的速度依赖性肌张力增高和肌肉过度活跃^[1],常见于脑卒中、脑外伤、脊髓损伤、脑瘫等患者。神经阻滞是国际上常用的系统性和局灶性痉挛的治疗方法^[2],包括神经溶解技术(neurolysis)和化学神经阻断技术(chemodeneration)。神经溶解技术是指在神经干或者肌肉“运动点”注射酚或酒精,使周围神经纤维变性,导致神经传递速度降低,用于治疗肌肉痉挛^[3]。而化学神经阻断技术是将肉毒毒素注射到肌肉“运动点”来阻断神经终板乙酰胆碱的释放^[4]。

这两种神经阻滞方法的实际临床效果受到很多技术因素的影响,如注射部位的选择、定位技术的准确性、阻滞剂的剂量和浓度、注射技术、注射后阻滞剂的扩散范围,以及和组织的接触时间等^[5-6]。

定位技术的准确性是神经阻滞能否充分发挥作用的关键因素之一。神经溶解技术和化学神经阻断技术是完全不同的作用机制,但是均采用同样的“运动点”的概念。运动点的本质是指终末神经密集区,还是指神经-肌肉接头(运动终板)密集区,目前国内尚无研究证实。这个问题的阐明,有助于明确运动点的概念,并确定运动点定位的方法。

运动点定位方式众多,超声、电刺激器以及肌电图等在运动点的定位中被广泛应用。本研究采用电刺激和肌电图的方式进行研究,探讨运动点的解剖和生理本质,为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 研究动物:健康成年普通级新西兰兔9只,雌雄不限,体重(2.5 ± 0.5)kg,由江苏省农业科学院畜牧兽医研究所提供。饲养于12h昼夜循环、无限量供应水和食物的动物设备中。实验方案遵循美国NIH公布的实验动物使用指南(NIH Publication No. 85—23,1996修订版),并经江苏省人民医院伦理委员会批准。靶肌肉为双侧前肢肱二头肌及双侧后肢腓绳肌。

1.1.2 分组:将生物染色剂(碳黑墨汁,北京化学试剂公司生产;亚甲蓝,江苏济州制药有限公司生产)分别注射到三种研究部位,即:①小神经密集区观察组(N组):拟以最低电流诱发最强靶肌肉收缩部位作为小神经密集区;②运动终板密集区观察组(P组):拟以寻找出现终板电活动的部位作为运动终板密集区;③非密集区对照组(C组),拟以小神经和运动终板均不密集的区域作为非密集区。由于兔的肌肉体积限制,每个肢体肌肉只选择上述三个研究部位的两种进行注射。每组共计24个注射点。研究分组方式见表1。

1.2 试验器材

1.2.1 外周神经电刺激器及刺激针:外周神经电刺激器(SY-708A,江苏苏云医疗器材有限公司),输出方波脉冲直流电,波宽0.2ms,刺激频率2Hz,由刺激仪主体、连接导线、电极片和探测笔组成。外周神经丛刺激针(0.4*41TWLB,江苏苏云医疗器材有限公司),由带绝缘层针管(针尖部分导电)、针座、连接导线和延长管等组成。电刺激器包括体表模式和体内

表1 研究分组方式

	动物编号 A,B,C				动物编号 D,E,F				动物编号 G,H,I			
	左前	右前	左后	右后	左前	右前	左后	右后	左前	右前	左后	右后
N组	√	√	√	√					√	√	√	√
P组					√	√	√	√	√	√	√	√
C组	√	√	√	√	√	√	√	√				

注:左前=左肱二头肌,左后=左腓绳肌,右前=右肱二头肌,右后=右腓绳肌

模式。体表模式是采用笔状表面探测电极,初步确定运动点或神经干的体表投影位置。体内模式是采用一次性外周神经丛刺激针在运动点或神经干的体表投影位置穿刺进入体内,再施加预定初始强度的电刺激,观察到靶肌肉的收缩活动后,逐步降低电刺激强度,并达到预定的靶强度,以确认针尖已经在预定的运动点或神经干部位。

1.2.2 三维定位仪:三维定位仪(江苏苏云医疗器材有限公司),由底座、纵轴、操作臂组成。操作臂可进行上下、左右、前后的移动,操作臂可通过粗调、微调移动,最大移动范围80cm,调级精度0.1mm。操作臂在垂直方向上可进行360°旋转,水平方向上也可进行180°旋转,并任意锁定位置。垂直操作臂上可连接注射用针电极。

1.3 实验方法

1.3.1 靶肌肉注射:采用3%戊巴比妥钠(30mg/kg体重)耳缘静脉注射麻醉,将兔四肢固定在操作台。肢体相应部位剃毛,根据肌肉体表投影区并结合表面电极定位后确定穿刺部位穿刺进入肌肉,逐渐调节外周神经电刺激器的电流强度,记录达到预定实验目标的电流强度,在同一肌肉的两个实验点分别注射入美蓝和墨汁,作为该实验点的物理标记。注射针在退出时,沿途注入微量染色剂,以表明退出路径,作为组织学分析的定位参照。实验标记:①N组:采用脉冲电刺激。定位方法:将注射用针电极经皮穿刺进入肌肉,施加电流,调整到最小电流诱发最强靶肌肉收缩部位作为小神经密集区。记录当时最小刺激强度,然后注射20μl染色剂。②P组:采用肌电图,插入注射用针电极,寻找出现终板电活动的部位作为运动终板^[7],切换到电刺激模式,调节到用最小刺激引起最强肌肉收缩的电流,并记录该电流,然后注射20μl染色剂。③C组:采用上述方法,确定以最强电流诱发最弱靶肌肉收缩,且连接肌电图后有肌电信号,但未出现终板电活动的部位为对照

点,然后注射20μl染色剂。

1.3.2 取材:在肌电图终板电位记录完成后,动物立即静脉注入空气处死取材。处死后的动物立即解剖取得双侧肱二头肌及双侧腓绳肌,以着色最明显的部位为中心取材,长度约0.8cm,投入甲醛固定1h。

1.3.3 切片:将标本在中间部位切开,选择单数切片送检标本继续放置在10%的甲醛中浸泡至24h,经系列梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡后常规石蜡包埋,制作成8μm切片,行常规苏木精-伊红染色,最后用99%酒精及无水酒精进行分化和充分脱水,二甲苯透明和中性树胶封固。选择双数切片行乙酰胆碱酯酶染色^[8]:在4℃、10%的甲醛中固定1h后,用PBS反复冲洗后行OCT包埋,冰冻切片8μm厚,贴于涂有白胶的玻片上,自然晾干后,放于4℃的Karnovsky-Roots 孵育液中孵育24h。孵化完毕后,双蒸水冲洗,甘油明胶封片。Karnovsky-Roots 孵育液的配制方法^[9]:碘化乙酰硫代胆碱12.5mg;0.1mol/L磷酸二氢钠7ml;0.1mol/L磷酸氢二钠9ml;0.1mol/L柠檬酸钠1ml;30mmol/L硫酸铜2.5ml;5mmol/L铁氰化钾2.5ml;双蒸水2ml。

1.3.4 图像分析:经苏木精-伊红染色的神经细胞的细胞核呈蓝黑色,胞浆呈淡红色。经乙酰胆碱酯酶染色的运动终板呈黄棕色或深棕色。每张切片在光镜观察下,在视野内有运动神经或运动终板的地方选取3个高倍视野(10×40)(Nikon Eclipse 80i相差显微镜),以彩色摄影仪(Nikon公司,DS-Fi1 CCD摄影仪)摄取并输入计算机保存,应用图文报告分析软件(HPIAS-1000高清晰彩色病理图文报告分析系统,华中科技大学同济医院清屏影像公司),计算选取视野内的单位面积内神经纤维数目或运动终板的数量,取其平均值为每个标本的神经纤维数目或运动终板的数量。

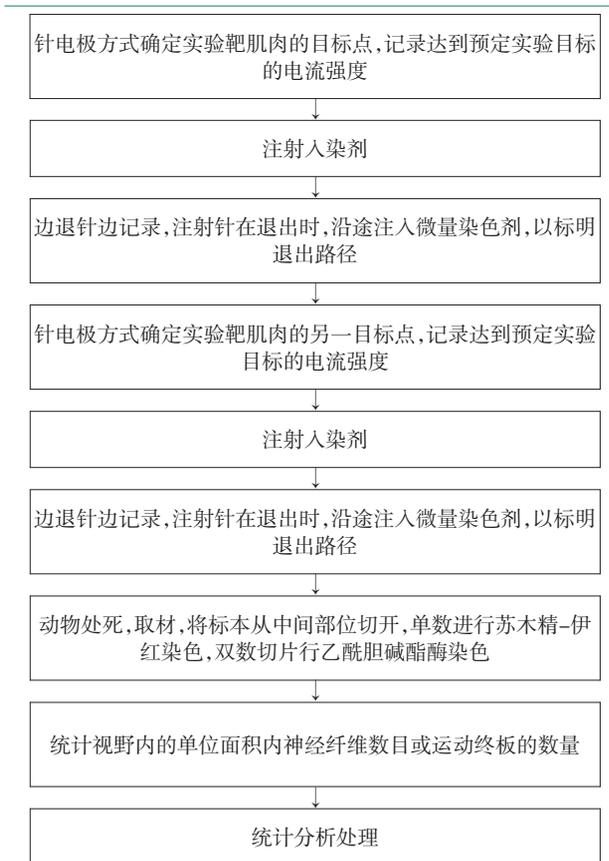
1.4 实验流程图及统计学分析

见图1。结果用均数±标准误表示,用SPSS11.0统计软件检验数据呈正态分布且方差齐,行单因素方差分析,组间两两比较采用q检验,P<0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 电刺激强度

图1 试验流程图



电刺激强度C组最大(0.73 ± 0.05)mA, P组次之(0.39 ± 0.04)mA, N组最小(0.10 ± 0.01)mA, 三组间两两比较均有显著差异($P < 0.01$)。

2.2 神经纤维数量

神经纤维数量N组最多, 32.14 ± 7.02 (根/视野); P组次之, 28.00 ± 6.11 (根/视野); C组最少, 16.52 ± 3.55 (根/视野)。N组与P组之间的差异不显著($q=1.55, P > 0.05$), 但N组与C组, P组与C组之间差异显著(N-C: $q=5.93, P < 0.01$; P-C: $q=5.93, P < 0.01$) (表2)。

2.3 运动终板数量

运动终板数量P组最多, 5.03 ± 0.25 (个/视野); N组次之, 3.98 ± 0.40 (个/视野); C组最少, 1.65 ± 0.19 (个/视野)。三组间两两比较均有显著差异(N-P: $q=3.73, P < 0.05$; N-C: $q=8.46, P < 0.01$; P-C: $q=12.30, P < 0.01$) (表2)。

3 讨论

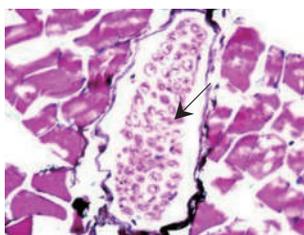
3.1 研究背景

神经溶解术的基本机制是使周围神经纤维变性、脱鞘, 肌肉细胞发生蛋白变性, 导致神经传递速度降低, 神经冲动减弱, 牵张反射减弱, 从而用于治疗肌肉痉挛或过度活跃^[3]。Rushworth^[10]于1960年最早提出运动点的概念, 并采用注射用针电极(针体外层绝缘, 针尖导电), 施加脉冲电刺激(方波波宽0.1ms, 频率1Hz), 强度逐渐增加至2—5mA, 直至出现靶肌肉收缩, 然后逐渐调节针头位置并逐步降低刺激强度, 选择以最低电流诱发最强肌肉收缩的部位作为注射点。这种确定运动点的方法一直未受到质疑, 并延续使用至今^[11-12]。依据神经阻滞作用机

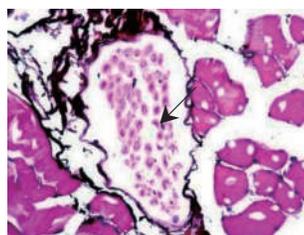
表2 各组小神经密度和运动终板密度比较

	N组	P组	C组	显著性检验(q值)		
				N-P	N-C	P-C
小神经密度(根/视野)	32.14 ± 7.02	28.00 ± 6.11	16.52 ± 3.55	$1.55(P > 0.05)$	$5.93(P < 0.01)$	$4.39(P < 0.01)$
运动终板密度(个/视野)	3.98 ± 0.40	5.03 ± 0.25	1.65 ± 0.19	$3.73(P < 0.05)$	$8.46(P < 0.01)$	$12.30(P < 0.01)$

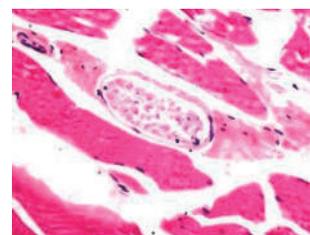
图2 三组神经染色比较



小神经密集区



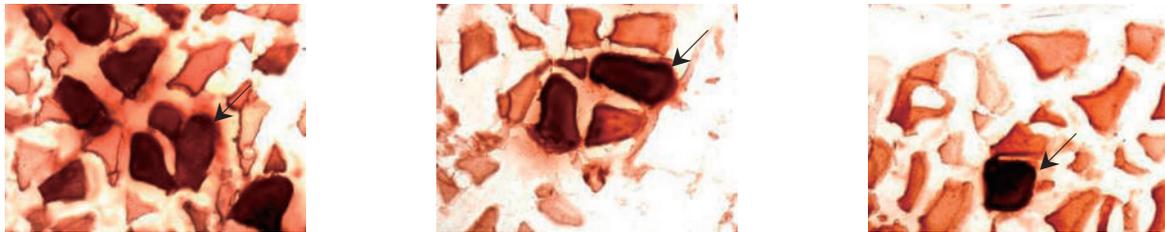
运动终板密集区



非神经密集区

神经细胞的细胞核呈蓝黑色, 胞浆呈淡红色, 箭头所表示的部位为神经纤维。

图3 三组运动终板染色比较



小神经密集区

运动终板密集区

非神经密集区

运动终板呈黄棕色或深棕色,箭头所表示的部位为运动终板。

制可以推断,运动点是指终末小神经纤维密集的地方。

化学神经阻断技术于20世纪80年代末进入临床^[4],该技术主要使用的药物肉毒毒素通过防止神经末梢突触前膜内乙酰胆碱的释放而阻滞神经肌肉接头处(neuromuscular junction, NMJ)神经冲动传递^[4]。Kaji等^[14]在使用肉毒毒素治疗下肢肌痉挛时,借助电刺激的方式将药物注入局部肌肉的“运动点”,取得了良好的疗效。然而从逻辑上肉毒毒素作用的“运动点”应该是运动终板密集的区域,而不是终末小神经密集的区域。目前尚无研究证实运动点的解剖生理本质。如果运动点与运动终板距离很远,则肉毒毒素注射应该采用肌电图定位,而不是电刺激定位。但是如果两者距离很近,肉毒毒素的弥散距离可以覆盖其距离,那么电刺激和肌电图的定位价值就是相等的。而电刺激操作简便、靶肌肉定位明确的优点,将确立其在肉毒毒素注射时注射定位的价值。为此这一问题的阐明将有十分明确的临床价值,也将澄清运动点概念上的分歧。

3.2 两种概念“运动点”和对照点的运动终板及神经纤维数量的比较

本研究首先通过应用电刺激技术拟定用最小刺激引起最大收缩的点为“运动点”,记录引起最强收缩的最小电刺激强度,并通过染色,观察该“运动点”的运动终板及神经纤维数量。其次通过应用肌电图拟定观察到终板电活动(包括终板噪声和终板负电位)的部位即运动终板所在部位为“运动点”,记录引起最强收缩的最小电刺激强度,通过染色,观察该“运动点”的运动终板及神经纤维数量。再次确定以最强电流诱发最弱靶肌肉收缩,且连接肌电图后未出现终板电活动的部位为对照点,记录引起最强收

缩的最小电刺激强度,通过染色,观察该对照点的运动终板及神经纤维数量。并将三组数据进行统计学分析,观察两种概念的“运动点”之间在刺激强度与运动终板数量、神经纤维数量上的差别,同时与对照点进行比较。

本组实验结果显示,终末神经纤维密集区和运动终板密集区的终末神经密度无显著差异,清楚地表明这两个区域十分接近,因此,神经溶解技术的运动点部位在临床上可以视为肉毒毒素注射所需的运动终板密集部位。按照本研究的结果,在临床上可以使用电刺激技术作为肉毒毒素运动点的定位技术。在注射定位时,采用肌电图寻找出现运动终板电位的点当然是金标准。但是肌电图寻找定位法比较难以鉴别深部肌肉,例如拇长屈肌等。且所需要的设备相对昂贵,技术要求也比较高。而电刺激方式更加容易通过靶肌肉收缩现象,直接确定针尖位置,并通过电流大小的调节,确定运动点的部位。电刺激器价格低廉,操作简便,对于神经阻滞的推广应用无疑有明显的价值。必要时可以将两种方法结合使用,即采用电刺激技术先找到运动点,再切换为肌电图模式,更加精确地确定运动终板部位(肌电图仪都具有肌电和电刺激两种功能)。因此在临床上将两种技术结合使用是可行的。

3.3 研究局限性

本研究对神经阻滞中骨骼肌运动点与运动神经终板进行了初步研究,首次从形态学和电生理学的角度,揭示了运动点的本质为终末小神经密集区而非运动终板密集区,同时也提示运动终板密集区与终末小神经密集区十分接近。但两者之间到底距离有多远,是否在药物有效浓度扩散范围内,有必要做进一步研究。

4 结论

终末神经纤维密集区和运动终板密集区是不同的“运动点”概念,但是两个区域十分接近,在临床上可以使用电刺激技术作为肉毒毒素注射的定位技术。

参考文献

- [1] 励建安 主编.康复医学[M].第2版.北京:科学出版社,2008.276—277.
- [2] Gormley ME Jr. Management of spasticity in children: Part 1: chemical denervation[J]. J Head Trauma Rehabil, 1999,14(1): 97—99.
- [3] 励建安,黄澎.神经溶解技术在康复治疗中的应用[J]. 中国临床康复,2002,6(18):2670—2671.
- [4] 中国康复医学会.肉毒毒素治疗成人肢体肌痉挛中国指南(2010)[J].中国康复医学杂志,2010,25(6):595—619.
- [5] 朱杰,励建安,刘守国,等.兔胫神经阻滞中乙醇扩散的影响因素[J]. 中国康复医学杂志,2009,24(8):707—710.
- [6] 刘守国,励建安,朱杰,等.神经阻滞的注射针定位中电刺激强度与针尖-神经干距离及针尖斜面方向关系的实验研究[J]. 中国康复医学杂志,2009,24(11):981—984.
- [7] 张凯莉,徐建光. 临床应用神经肌电图诊疗技术[M]. 第1版.上海:复旦大学出版社,2004.28.
- [8] 吴煜农,邱蔚六,张志愿,等.颈神经丛的组织化学研究[J].口腔医学,2004,24(3):137—139.
- [9] Karuman PM, Soo KC. Motor innervation of the trapezius muscle:a histochemical study[J]. Head Neck, 1996,18(3):254—258.
- [10] Rushworth G. Spasticity and rigidity: an experimental study and review[J]. J Neurol Neurosurg Psychiat, 1960, 23(5):99—118.
- [11] Elovic EP, Esquenazi A, Alter KE, et al. Chemodenervation and nerve blocks in the diagnosis and management of spasticity and muscle overactivity[J]. PMR, 2009,1(9):842—851.
- [12] Kocabas H, Salli A, Demir AH, et al. Comparison of phenol and alcohol neurolysis of tibial nerve motor branches to the gastrocnemius muscle for treatment of spastic foot after stroke:a randomized controlled pilot study[J]. Eur J Phys Rehabil Med, 2010, 46(1):5—10.
- [13] Kaji R, Osako Y, Suyama K, et al. Botulinum toxin type A in post-stroke lower limb spasticity:a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial[J]. J Neurol,2010, 257(8): 1330—1337.
- [13] Zhang JX,Hu W, Liu Z. Recent advances in treatment of glial scar induced inhibition of nerve regeneration[J]. 浙江大学学报,2009, 38(6): 639—643.
- [14] 于春雷,张弘,王种昊,等. 脊髓损伤后受损组织胶质纤维酸性蛋白表达上调的信号传导机制[J]. 中华实验外科杂志,2007, 24(11):1365—1365.
- [15] 张秦宏.电针对大鼠急性脊髓损伤后胶质纤维酸性蛋白表达影响的实验研究[D]. 黑龙江中医药大学,2008,1—2.
- [16] Dreyfus CF, Dai X, Lercher LD,et al. Expression of neurotrophins in the adult spinal cord in vivo[J]. J Neurosci Res, 1999, 56(1): 1—7.
- [17] Lundborg G, Dahlin L.Trophism, tropism, and specificity in nerve regeneration[J]. Reconstr Microsurg,1994, 10(5): 345—54.
- [18] Kliot M, Smith GM. Astrocyte-polymer implants promote regeneration of dorsal root fibers into the adult mammalian spinal cord [J]. Exp Neurol,1990, 109(1): 57—69.

(上接第1013页)

Nat Rev Neurosci,2004, 5(2): 146—156.

- [13] Zhang JX,Hu W, Liu Z. Recent advances in treatment of glial scar induced inhibition of nerve regeneration[J]. 浙江大学学报,2009, 38(6): 639—643.
- [14] 于春雷,张弘,王种昊,等. 脊髓损伤后受损组织胶质纤维酸性蛋白表达上调的信号传导机制[J]. 中华实验外科杂志,2007, 24(11):1365—1365.
- [15] 张秦宏.电针对大鼠急性脊髓损伤后胶质纤维酸性蛋白表达影响的实验研究[D]. 黑龙江中医药大学,2008,1—2.
- [16] Dreyfus CF, Dai X, Lercher LD,et al. Expression of neurotrophins in the adult spinal cord in vivo[J]. J Neurosci Res, 1999, 56(1): 1—7.
- [17] Lundborg G, Dahlin L.Trophism, tropism, and specificity in nerve regeneration[J]. Reconstr Microsurg,1994, 10(5): 345—54.
- [18] Kliot M, Smith GM. Astrocyte-polymer implants promote regeneration of dorsal root fibers into the adult mammalian spinal cord [J]. Exp Neurol,1990, 109(1): 57—69.