

钳夹压力法建立大鼠坐骨神经损伤模型的研究*

王启文¹ 宋春莉² 沈梅^{1,3,4} 叶冬梅¹ 李莎¹ 丛林¹

摘要

目的:建立钳夹压力可量化的坐骨神经损伤模型。

方法:将30只SD大鼠随机分成5组,每组6只,根据不同钳夹压力将大鼠分为1N组、2N组、4N组、8N组和16N组。手术暴露坐骨神经,采用止血钳钳夹大鼠的坐骨神经,同时用薄膜型压力传感器测量钳夹压力。用肌电图诱发电位仪分别测量钳夹前及钳夹30min后大鼠的坐骨神经复合肌肉动作电位(CMAP),并测定钳夹后第2天各压力组大鼠的坐骨神经功能指数(SFI),并观察神经纤维组织HE染色变化。

结果:压力1N组、2N组、4N组、8N组和16N组钳夹后与钳夹前的坐骨神经CMAP比较,其潜伏期均明显延长($P<0.05$),MNCV均显著下降($P<0.01$),MNCV下降值分别占各自正常对照组的25%、51%、69%、67%、94%;各压力组近端波幅均显著下降($P<0.05$),分别下降16%、34%、68%、74%、89%。各压力组SFI均显著增大($P<0.01$)。组织形态学观察表明神经纤维组织随压力增高出现形态改变。

结论:钳夹压力法建立大鼠坐骨神经1N钳夹压力造成坐骨神经中度损伤模型,压力2—16N造成重度损伤模型。

关键词 坐骨神经损伤;薄膜型压力传感器;钳夹压力;运动神经传导速度;坐骨神经功能指数

中图分类号:R745,R49 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2020)-02-0135-06

Establishment of sciatic nerve injury model of rat by clamp pressure/WANG Qiwen, SONG Chunli, SHEN Mei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2020, 35(2): 135—140

Abstract

Objective: To explore a model of sciatic nerve injury of rat with quantifiable clamp pressure.

Method: Thirty SD rats were randomly divided into 5 groups (1N, 2N, 4N, 8N and 16N), 6 in each group. The sciatic nerve was exposed surgically and clamped by hemostat. The pressure of the clamp was measured by a membrane type pressure sensor. Before and 30 minutes after clamp, the composite muscle action potential (CMAP) was recorded. The amplitude and latency of CMAP and motor nerve conduction velocity (MNCV) were measured. The sciatic nerve function index (SFI) was measured on the 2nd day after clamping. Histological study on sciatic nerve injury was also performed.

Result: There was significant delay in the latency($P<0.05$) and decrease in the motor nerve conduction velocity in the 1N, 2N, 4N, 8N and 16N group after the clamp ($P<0.01$), which decreased by 25%、51%、69%、67%、94%, respectively. The proximal amplitude of CMAP after clamp was also decreased dramatically in each pressure group ($P<0.05$), and the decline values accounted for 16%、34%、68%、74%、89%. The SFI in each pressure group increased in different degree ($P<0.01$). Histomorphological results showed that the greater the pressure, the more disordered the arrangement of nerve fibers.

Conclusion: The clamp pressure may be a promising method for establishing a model of sciatic nerve injury of rat. The 1N clamp force causes a moderate injury, and a severe injury model is caused by a pressure of 2-16N.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2020.02.002

*基金项目:大连市医学科学研究计划项目(1711095);国家自然科学基金青年基金项目(81601982)

1 大连大学附属中山医院,辽宁省大连市,116001; 2 大连医科大学附属第一医院; 3 深圳市龙华区人民医院; 4 通讯作者

第一作者简介:王启文,女,硕士研究生; 收稿日期:2018-08-08

Author's address Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Liaoning, Dalian, 116001

Key word sciatic nerve injury; membrane pressure sensor; clamp pressure; motor nerve conduction velocity; sciatic nerve function index

周围神经损伤的康复一直是研究热点^[1],而在研究中成功建立周围神经(一般为坐骨神经)损伤的动物模型是研究必备环节。既往研究采用止血钳^[2]、微动脉夹^[3]、无齿微血管钳^[4]等钳夹坐骨神经,少有研究对钳夹力度及坐骨神经损伤程度进行量化,而建模方法间的差异将影响不同研究结果间的比较^[5]、研究结果的重复及深入研究的开展。本实验通过拟采用RPM薄膜型压力传感器精确采集止血钳钳口的压力,实现对大鼠坐骨神经损伤程度的控制,以制作标准化损伤模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康成年雄性SPF级SD大鼠30只,体重300—400g,由大连医科大学实验动物中心提供。随机分成压力1N组、2N组、4N组、8N组和16N组,每组6只。购进后常规饲养,观察1周无异常后进行实验。

1.2 动物模型准备与压力测量

依照参考文献[3],操作成年雄性SD大鼠,10%水合氯醛腹腔注射麻醉,麻醉后俯卧位固定于手术台上,常规备皮,消毒。在一侧大腿上段后外侧处斜切开皮肤约3.0cm,用止血钳钝性分离半膜肌及股二头肌,暴露大鼠右后肢坐骨神经。检测复合肌肉动作电位(compound muscle action potential, CMAP),记录正常坐骨神经电生理参数。距坐骨结节6—8mm处用止血钳钳夹神经。根据分组给予相应的钳夹力度,根据文献^[6]将压力传感薄膜置于止血钳与坐骨神经之间,根据压力读数控制钳夹力度。每次钳夹时间均持续10s,钳夹范围为钳与坐骨神经接触面积长约0.2cm。

1.3 坐骨神经电生理检测

钳夹前及钳夹后30min,分别测量坐骨神经CMAP。采用Synergy 10导肌电图诱发电位仪(牛津公司,英国)。刺激时限0.2 ms,刺激强度10—50mV,带通0.1—100Hz,扫描速度1000ms/D。灵敏度0.1—2.0mV/D。将刺激的同芯针电极放在钳夹的坐骨神经损伤点的远侧端,记录电极插在同一侧

小腿的腓肠肌肌腹上,地线针电极插在鼠背皮肤上,给予超强刺激后记录一个CMAP及潜伏期T₁;然后在钳夹坐骨神经损伤点的近侧端放置刺激的同芯针电极,记录电极和地线同上,给予超强刺激后记录另一个复合肌肉动作电位CMAP及潜伏期T₂。用套管固定坐骨神经近远侧端两刺激铜芯针电极,其间距ΔS为1.2cm。计算两个刺激电极间的距离ΔS与两个潜伏期之差的比值,为坐骨神经的神经传导速度(motor nerve conduction velocity, MNCV),即 $MNCV = \Delta S / (T_2 - T_1)^{[7]}$ 。

1.4 坐骨神经功能指数测定

于术后第2d进行足迹实验。自制大鼠足行走箱,长50cm,宽15cm,受试鼠双足蘸染料,选择爬行过程中留下的4—5个足印,选实验侧(E)及正常侧(N)清晰的足印测量3个变量:①足印长度(print length, PL),即足印的最长距离;②足趾宽度(toe width, TW),即第一趾到第五趾连线距离;③中间足趾距离(inter toe distance, IT),即第二趾到第四趾连线距离。将上述3个变量带入Bain公式计算坐骨神经功能指数(sciatic nerve function index, SFI), $SFI = -38.3(EPL - NPL)/NPL + 109.5(ETW - NTW)/NTW + 13.3(EIT - NIT)/NIT - 8.8$ 。SFI=0为正常, -100为完全损伤。SFI百分率%=各SD大鼠SFI值/各自钳夹前SFI值×100%^[8]。SFI百分率越大,则损伤越严重。

1.5 病理学检查

待测完大鼠坐骨神经功能指数后,沿原手术路径取其损伤部位神经,长度约1cm,经4%多聚甲醛完全浸泡、固定后,进行各级酒精脱水与透明,随后浸蜡与包埋、切片,做纵切片,片厚约5μm。之后再经二甲苯脱蜡、各级乙醇脱水,最后行HE染色,光镜下观察^[9]。

1.6 统计学分析

采用SPSS 20.0统计软件进行统计分析,数据以均数±标准差表示。所有数据经检验均呈正态分布且方差齐。组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用post hoc test检验,组内比较采用配对t检

验,以 $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 大鼠坐骨神经 CMAP

如图1中A(1N组)、B(2N组)、C(4N组)、D(8N组)和E(16N组)所示,钳夹前,远、近端的CMAP,其各压力组 CMAP潜伏期、波幅、MNCV基本一致;钳夹后,远端潜伏期和波幅与钳夹前比较基本无变化,其近端的潜伏期随压力增大有延长趋势,近端波幅和MNCV与压力变化相反。

2.1.1 大鼠坐骨神经 CMAP潜伏期:各组坐骨神经潜伏期结果如表1,各压力组钳夹前远、近端潜伏期比较无显著性差异($P>0.05$);各组钳夹后远端潜伏期无显著下降($P>0.05$),而近端潜伏期均显著下降($P<0.05$),且钳夹后近端潜伏期组间比较差异有显著性($P<0.05$),但8N和4N组钳夹后近端潜伏期差异无显著性($P>0.05$)。

2.1.2 坐骨神经传导速度:表2示压力1N组、2N组、4N组、8N组和16N组,组间钳夹前神经传导速度(MNCV)均无显著性差异($P>0.05$)。各组钳夹后

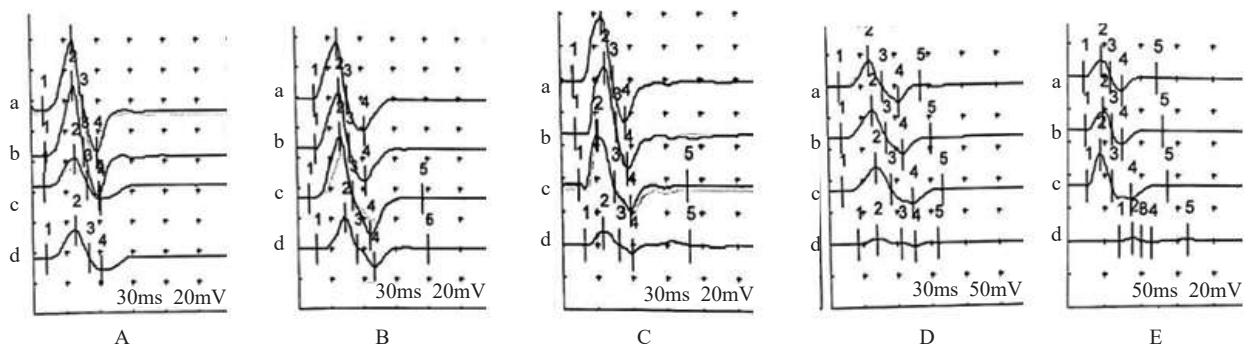
MNCV均显著下降($P<0.01$),且钳夹后MNCV组间比较差异有显著性($P<0.05$),但4N和8N组钳夹后MNCV差异不显著($P>0.05$)。MNCV钳夹前后下降值分别占各自正常对照组的25%、51%、69%、67%、94%。

2.1.3 大鼠坐骨神经 CMAP波幅:表3显示各压力组的钳夹前远端、近端波幅无显著性差异($P>0.05$)。各压力组钳夹后远端波幅无显著性下降($P>0.05$),近端波幅均显著下降($P<0.01$),且钳夹后近端波幅组间比较有显著性差异($P<0.05$),但4N和8N组钳夹后近端波幅差异不显著($P>0.05$)。各组钳夹后近端压力下降值分别占各自正常对照组的16%、34%、68%、74%、89%。钳夹后近端波幅随钳夹压力增加呈递减趋势。

2.2 大鼠坐骨神经功能指数

如表4所示各压力组钳夹后较钳夹前坐骨神经功能指数均显著增加($P<0.01$),钳夹前各压力组SFI均无显著性差异($P>0.05$),钳夹后1N组SFI变化最小($P<0.01$);2N组、4N组和8N组增加无显著性差异($P>0.05$);16N组SFI增加最显著($P<0.01$)。根据

图1 大鼠坐骨神经复合肌肉动作电位(CMAP)



注:A、B、C、D和E分别为压力1N、2N、4N、8N和16N组大鼠坐骨神经 CMAP。a、b分别为钳夹前钳夹远端、近端坐骨神经的 CMAP,c、d分别为钳夹后钳夹远端、近端坐骨神经的 CMAP。

表1 各压力组与各自正常对照组的钳夹前后 CMAP潜伏期 ($\bar{x}\pm s$, n=6)

压力(N)	远端潜伏期(ms)			近端潜伏期(ms)		
	钳夹前	钳夹后	P值	钳夹前	钳夹后	P值
1	1.13±0.15	1.29±0.13	0.15	1.35±0.17	1.60±0.10	0.04
2	1.16±0.26	1.27±0.11	0.37	1.38±0.24	1.76±0.11 ^①	0.01
4	1.16±0.11	1.28±0.08	0.08	1.38±0.12	1.98±0.19 ^{②③}	0.00
8	1.17±0.14	1.29±0.22	0.16	1.39±0.15	1.99±0.17 ^{②③}	0.00
16	1.17±0.21	1.25±0.22	0.47	1.39±0.21	5.97±1.61 ^{②④⑤⑥}	0.00
P值	0.95	0.98		0.97	0.00	

注:与1N组比较,① $P<0.05$, ② $P<0.01$;与2N组比较,③ $P<0.05$, ④ $P<0.01$;与4N组比较,⑤ $P<0.01$;与8N组比较,⑥ $P<0.01$ 。

表2 各压力组与各自正常对照组的运动神经传导速度 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

压力(N)	钳夹前MNCV (m/s)	钳夹后MNCV (m/s)	下降比值	P值
1	54.20±7.07	39.41±6.25	25%	0.02
2	54.08±6.59	25.98±6.57 ^①	51%	0.00
4	56.23±6.38	17.93±4.04 ^{①②}	69%	0.00
8	56.95±4.95	18.87±8.11 ^{①②}	67%	0.00
16	54.60±5.50	2.88±1.31 ^{①③④⑤}	94%	0.00
P值	0.89	0.00		

注:与1N组比较,① $P<0.01$;与2N组比较,② $P<0.05$,③ $P<0.01$;与4N组比较,④ $P<0.01$;与8N组比较,⑤ $P<0.01$ 。

表3 各压力组与各自正常对照组的钳夹前后复合肌肉动作电位(CMAP)波幅($\bar{x}\pm s, n=6, mV$)

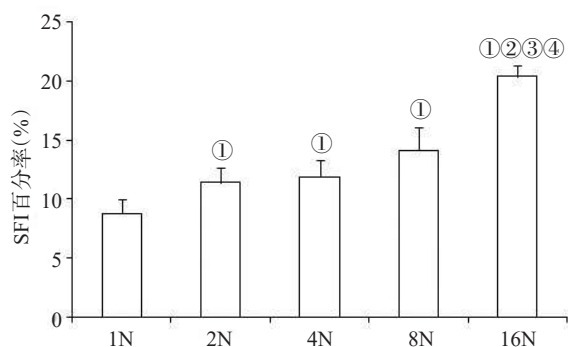
压力(N)	远端波幅			近端波幅		
	钳夹前	钳夹后	P值	钳夹前	钳夹后	比值 P值
1	56.96±4.58	54.76±4.61	0.24	57.31±5.42	45.12±4.66	16% 0.01
2	52.42±4.46	51.33±5.72	0.31	52.40±6.95	32.27±7.14 ^①	34% 0.01
4	53.30±5.35	51.15±5.06	0.49	53.15±5.21	16.95±4.44 ^{①②}	68% 0.00
8	54.10±5.39	50.65±6.43	0.33	54.88±4.82	14.48±5.04 ^{①②}	74% 0.00
16	53.17±6.08	51.43±5.90	0.66	52.16±4.83	5.41±2.50 ^{①②③④}	89% 0.00
P值	0.60	0.71		0.47	0.00	

注:与1N组比较,① $P<0.01$;与2N组比较,② $P<0.01$;与4N组比较,③ $P<0.01$;与8N组比较,④ $P<0.01$ 。

表4 各压力组与各自正常对照组的坐骨神经功能指数 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

压力(N)	钳夹前SFI	钳夹后SFI	P值
1	-4.34±5.92	-38.18±6.48	0.00
2	-4.97±8.11	-56.62±8.67 ^①	0.00
4	-5.22±7.78	-62.07±7.71 ^①	0.00
8	-4.68±6.40	-66.03±9.28 ^①	0.00
16	-3.90±7.99	-79.42±8.75 ^{①②③④}	0.00
P值	0.99	0.00	

注:与1N组比较,① $P<0.01$;与2N组比较,② $P<0.01$;与4N组比较,③ $P<0.01$;与8N组比较,④ $P<0.01$ 。

图2 坐骨神经功能指数百分率

注:与1N组比较,① $P<0.01$;与2N组比较,② $P<0.01$;与4N组比较,③ $P<0.01$;与8N组比较,④ $P<0.01$ 。

图2示可观察到SFI百分率随压力增加而增大,提示1N组损伤最轻微,16N组损伤最重。2N、4N和8N组SFI百分率都逐渐增加但组间比较无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 坐骨神经损伤的病理学改变

如图3光镜下观察,正常侧的神经纤维排列密集、整齐,切面形态和大小较一致,轴浆均匀红染;1N组钳夹部位的坐骨神经纤维密集性下降,排列尚整齐轴浆红染欠均匀;2N组整体排列序列性较差,

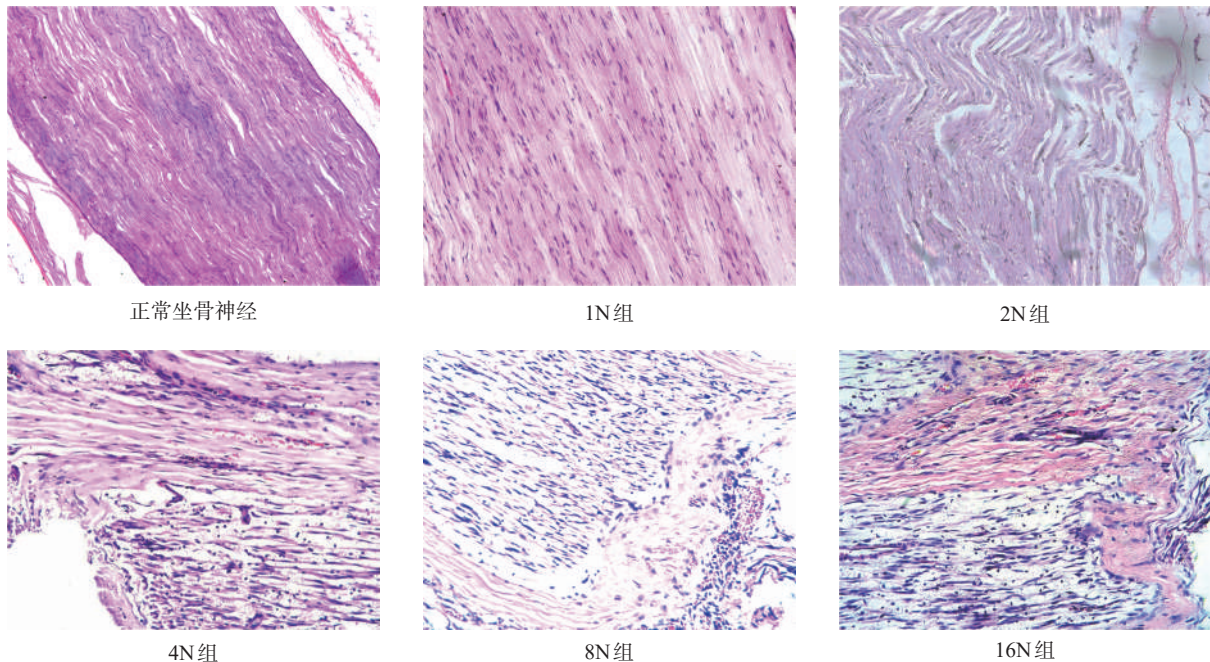
神经元排列松散,轴索水肿、部分髓鞘崩解,炎症细胞浸润;4N和8N组神经纤维排列混乱,轴索断裂,髓鞘崩解明显,炎性细胞浸润较明显;16N组神经纤维排列杂乱无序,神经元轴突断裂,髓鞘崩解较完全,雪旺细胞核增多,炎性细胞浸润明显。

3 讨论

目前国内常见的动物坐骨神经损伤模型为距坐骨结节6—8mm处用同一把长止血钳尖端或微动脉夹钳夹神经10s,压强为21.95 kPa,神经挫压长度为2mm,认为造成Seddon II度损伤。Seddon损伤分级是骨科和神经外科常用的神经损伤分级标准^[10],但损伤的病理学和电生理改变难以用肉眼判断,使得用钳夹神经压力大小控制损伤程度的方法难以实施。本实验通过薄膜型压力传感器实时获取钳夹压力数据,从而使建立动物模型的方法量化,使模型神经损伤的程度可控。薄膜型压力传感器经过FSR压力传感器、1121分压器和数据采集设备精确地采集医用止血钳钳口的压力信号后,通过虚拟的仪器软件Lab-VIEW在PC机中显示压力信号的动态变化,从而采集压力数据,可以精确地测量止血钳或微动脉夹的钳夹压力^[6]。通过联合肌电诱发电位仪测

图3 坐骨神经损伤不同压力组的HE染色光镜观察

(HE染色,×200)



量的神经电生理指标如潜伏期、波幅以及神经传导速度等可对不同压力下钳夹的神经损伤程度进行分级。从小压力开始钳夹,钳夹过程中根据其CMAP变化来选择神经钳夹的压力,直至CMAP难以检测,最终选择的压力值有1N、2N、4N、8N和16N。

神经电生理检测是一种定性、定位和定量评定周围神经损伤及其功能恢复的客观方法^[11-12],而坐骨神经功能指数从行为学的角度对周围神经功能进行评估,能反映下肢肌力以及下肢各肌肉的协调功能。有研究表明坐骨神经功能指数与神经电生理存在显著相关性^[13],因此结合坐骨神经功能指数指标对进一步明确周围神经损伤程度的分级有重要意义。而病理学诊断又可从组织形态学角度来辅助证实神经损伤的程度^[14],其中周围神经损伤的病理学基础为轴突脱髓鞘和轴索损伤。运动神经脱髓鞘可导致潜伏期延长、神经传导速度减慢及传导阻滞^[15],参照汤晓芙《临床肌电图学》制定的标准^[16],运动、感觉传导速度低于正常均值2.5个标准差为异常,波幅则低于50%为异常;运动传导速度减慢10%为轻度损伤,减慢25%为中度损伤,减慢45%为严重损伤,传导速度引不出为完全损伤^[17]。轴索病变主要表现为动作电位的波幅明显下降(>50%),且传导速度正

常或轻度减慢(<50%),同时可见纤颤电位和正锐波等失神经电位^[18]。而脱髓鞘改变主要为传导速度明显减慢,波幅正常或轻度下降。

本实验压力1N组传导速度中度下降且波幅下降程度轻(≤25%),提示为中度损伤,且其HE染色显示神经纤维密集性下降,排列尚整齐,轴浆红染欠均匀。压力2N组、4N组和8N组的运动神经传导速度下降>50%且下降比重依次递增,结合三组坐骨神经功能指数百分率均增加,认为均存在重度损伤。而压力2N组的CMAP波幅轻度降低(<50%),HE染色表现为神经元排列松散,轴索水肿、部分髓鞘崩解,则提示主要存在髓鞘损伤;压力4N组、8N组中近端波幅明显下降且程度均>50%,提示均存在轴突损伤和脱髓鞘改变,同时病理HE染色示神经纤维排列混乱,轴索断裂,髓鞘崩解明显与其相符。而本试验4N组和8N组钳夹后的CMAP波幅、潜伏期和运动神经传导速度差异不明显($P>0.05$),可能由于两组神经损伤均较严重,在电生理检测指标上观察无太大差别。压力16N组运动神经传导速度和近端波幅明显下降且均>50%,SFI百分率增加最明显,病理切片HE染色提示存在轴突损伤和脱髓鞘改变,且几乎达到完全性损伤程度。值得说明的是,从电

生理学指标检测的2N组、4N组、8N组和16N组鼠都为重度损伤,但各组间仍有递增的趋势,而病理学HE染色结果也恰好说明了各组间组织损伤存在明显差异。

在今后的研究中可进一步对坐骨神经压力细化分组,以精确和完善周围神经损伤程度的Seddon分级。既往研究中坐骨神经损伤模型的制作,由于缺乏力学、量化指标,在实际操作过程中难以把握损伤程度,造成损伤程度的不一致性,影响了研究的可靠性。本研究的创新性在于通过采用RPM薄膜型压力传感器精确采集止血钳钳口的压力,结合电生理学、行为学和组织形态学检测结果^[19-20],标准化钳夹工具对坐骨神经造成的损伤程度,为大鼠坐骨神经损伤模型建立提供依据。进而为科研工作者探索周围神经损伤的修复再生机制等提供有力工具。

参考文献

- [1] 何旭, 张元信, 屈志刚, 等. 周围神经损伤与再生的研究进展[J]. 山西医药杂志(下半月刊), 2013, 42(4):397—400.
- [2] 王维, 苑秀华, 王中莉, 等. 坐骨神经损伤模型大鼠神经传导速度及损伤运动神经元内生长相关蛋白43表达与磁刺激干预[J]. 中国组织工程研究, 2011, 15(46):8617—8620.
- [3] 李巍巍, 苑秀华, 张立新, 等. 超短波对大鼠坐骨神经损伤后神经传导速度及其损伤运动神经元内VEGF表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2010, 16(8):744—747.
- [4] 于敏, 李承鑫, 车世钦, 等. 高频电治疗对周围神经损伤家兔超微结构的研究[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(11):9—12.
- [5] 王艳, 王茜. 周围神经损伤动物模型的研究进展[J]. 中国康复理论与实践, 2014(6):537—539.
- [6] 涂湖南. 医用止血钳钳口压力测量方法研究[J]. 计量与测试技术, 2016, 43(9):23—24.
- [7] Hajimoradi M, Fazilati M, Gharib-Naseri MK, et al. Gallic acid and exercise training improve motor function, nerve conduction velocity but not pain sense reflex after experimental sciatic nerve crush in male rats [J]. Avicenna J Phytomed, 2015, 5(4):288—297.
- [8] 沈洪妹, 朱玉忠, 潘浣璐, 等. 牛膝多肽对局灶性脑缺血大鼠坐骨神经功能指数的影响[J]. 南通大学学报(医学版), 2012, 32(1):10—12.
- [9] 吴文骏. 兔坐骨神经卡压伤的MR扩散张量成像定量评价与病理对照研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2016.
- [10] Chhabra A, Ahlawat S, Belzberg A, et al. Peripheral nerve injury grading simplified on MR neurography: As referenced to Seddon and Sunderland classifications [J]. Indian J Radiol Imaging, 2014, 24(3):217—224.
- [11] Impastato KA and Friedrich JB. Interpretation of electromyography and nerve conduction studies [J]. Carpal Tunnel Syndrome and Related Median Neuropathies, 2017, 7(4): 59—67.
- [12] Nisargandha M, Parwe SD. Basic concept of nerve conduction velocity and electromyography basic concept of neurophysiology basic concept of nerve conduction velocity and electromyography[M]. Riga Latvia: Scholars Press, 2016.
- [13] 金华, 郝克强. 荷瘤后小鼠坐骨神经指数与神经传导速度的相关性[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2014(5):365—367.
- [14] Emir A, Kalkan Y, Bostan H. Histopathological effects of intramuscular metamizole sodium on rat sciatic nerve[J]. Iran J Basic Med Sci, 2016, 19(8):829—836.
- [15] Kane NM, Oware A. Nerve conduction and electromyography studies [J]. J Neurol, 2012, 259(7):1502—1508.
- [16] 汤晓芙. 临床肌电图学[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学出版社, 1995.
- [17] 陈奕奕. 肌电图在周围神经损伤诊断中的应用价值[J]. 中外医疗, 2012, 31(14):182—182.
- [18] 黄晓琳. 康复医学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- [19] 韩东伟. 推拿对坐骨神经损伤大鼠行为学和形态学的影响[D]. 北京: 北京中医药大学, 2008.
- [20] Domkundwar S, Autkar G, Khadilkar SV, et al. Ultrasound and EMG-NCV study (electromyography and nerve conduction velocity) correlation in diagnosis of nerve pathologies [J]. J Ultrasound, 2017, 20(2):111—122.