

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.41.009

[http://www.crter.org]

艾克热木江·木合热木, 曹鹏, 武忠炎, 王新玲, 贾民. 夹伤与冰冻损伤大鼠股神经的选择性再生[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(41):7241-7247.

## 夹伤与冰冻损伤大鼠股神经的选择性再生\*\*\*☆

艾克热木江·木合热木<sup>1,2</sup>, 曹鹏<sup>1</sup>, 武忠炎<sup>1</sup>, 王新玲<sup>1</sup>, 贾民<sup>1</sup> (<sup>1</sup>新疆医科大学附属第五医院骨科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011; <sup>2</sup>清华大学北京积水潭医院, 北京市 100035)

### 文章亮点:

- 1 目前决定神经损伤后功能恢复程度最重要的因素是再生轴突与其原有通道的准确对接。
- 2 对于周围神经损伤, 大多数项目采用锐器切割损伤的方法形成周围损伤模型, 文章的创新之处在于制备了钝性夹伤和冷冻伤的股神经损伤模型, 检测神经轴突的趋化性再生状况。
- 3 实验在采用电生理检测和神经组织学检测的同时, 创新性地应用荧光红与纯蓝标记股神经肌支和隐神经, 在观察神经再生效果的同时对神经再生的趋化性进行评价。结果提示保持神经束膜的完整性, 即使损伤范围较大也能得到轴突再生中准确对接以及损伤肢体功能的恢复。
- 4 下一步研究拟深入探讨不同损伤模型对神经损伤修复效果的差异性及其作用机制。

### 关键词:

组织构建; 神经组织构建; 外周神经损伤; 股神经损伤; 冰冻损伤; 选择性再生; 逆行标记; 动物模型; 其他基金

### 主题词:

创伤, 神经系统; 股神经; 冻伤; 神经再生; 模型, 动物

### 基金资助:

新疆医科大学科研创新基金项目(XJC2012122, XJC2012117, XJC2012123)\*\*\*

### 摘要

**背景:** 促进周围神经损伤后神经功能的恢复, 一方面要尽量加快损伤处神经轴突的再生, 另一方面需要提高近端与远端神经对接的精确度。

**目的:** 观察机械挤压伤与冰冻损伤 2 种损伤模式下周围神经损伤后神经轴突的选择性再生情况。

**方法:** 取健康 8 周龄雄性 Sprague-Dawley 大鼠 110 只, 分为 3 组, 对大鼠行股神经主干夹伤、冰冻损伤或空白对照处理。造模后分别于第 2, 3, 6, 12 周进行大体行为学检查, 另外分别用纯蓝和荧光红标记错向长入的隐神经和正确长入的股神经肌支, 逆行示踪标记运动神经元观测脊髓前角中示踪剂的分布及数目; 造模后 8 周行电生理检查, 并进行统计学分析。

**结果与结论:** 夹伤组与冰冻损伤组大鼠术侧后腿活动范围均缩小, 伸腿功能均受限, 但随着时间的延长, 功能有所恢复。股四头肌处可记录到运动诱发电位, 2 组之间差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。冰冻损伤组与夹伤组在荧光显微镜下均观察到脊髓前角红染神经元逐渐增加, 造模后不同时间点夹伤组红染神经元数目显著高于冰冻损伤组( $P < 0.05$ ), 蓝色与紫色神经元数量逐渐减少。结果提示, 保持神经束膜的完整性, 即使损伤范围较大也能得到轴突再生中准确对接以及损伤肢体功能的恢复。

## Selective regeneration of rat femoral nerve after crush injury and freeze injury

Aikeremujiang·Muheremu<sup>1,2</sup>, Cao Peng<sup>1</sup>, Wu Zhong-yan<sup>1</sup>, Wang Xin-ling<sup>1</sup>, Jia Min<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Orthopedics, the Fifth Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; <sup>2</sup>Beijing Jishuitan Hospital of Tsinghua University, Beijing 100035, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** In order to promote the recovery of nerve function after peripheral nerve injury, we should try to accelerate the regeneration of injured nerve axons on one hand, and try to improve the accuracy of proximal and distal nerve docking on the other hand.

**OBJECTIVE:** To explore the selective regeneration of nerve axons after peripheral nerve injury in models with crush injury and freeze injury.

**METHODS:** Totally 110 healthy male Sprague-Dawley rats, 8 weeks old, were selected and randomly divided into three groups. The rats received crush injury, freeze injury and normal controlled surgery on femoral nerve trunk. At 2, 3, 6 and 12 weeks after modeling, general behavioral examination was performed, and then pure blue and red fluorescence were used to label the wrong-way ingrowth saphenous nerve and correct ingrowth femoral nerve muscular branches respectively; retrograde labeling the motor neurons in order to observe the distribution and amount of tracer in spinal cord anterior horn; electrophysiological examination was performed at 8 weeks after modeling, and analyzed statistically.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Rats from both crush injury group and freeze injury group displayed decreased

艾克热木江·木合热木☆, 男, 1985 年生, 新疆维吾尔自治区托克逊县人, 维吾尔族, 清华大学积水潭医院在读博士, 医师, 主要从事周围神经损伤后再生方面的研究。  
taklimakan321@hotmail.com

通讯作者: 武忠炎, 主任医师, 新疆医科大学附属第五医院骨科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011  
wzyfah@163.com

中图分类号:R318  
文献标识码:A  
文章编号:2095-4344  
(2013)41-07241-07

收稿日期: 2013-07-24  
修回日期: 2013-08-06  
(201306022/G·C)

Aikeremujiang·Muheremu☆,  
Studying for doctorate,  
Physician, Department of  
Orthopedics, the Fifth Hospital  
Affiliated to Xinjiang Medical  
University, Urumqi 830011,  
Xinjiang Uygur Autonomous  
Region, China; Beijing Jishuitan  
Hospital of Tsinghua University,  
Beijing 100035, China  
taklimakan321@hotmail.com

Corresponding author: Wu  
Zhong-yan, Chief physician,  
Department of Orthopedics, the  
Fifth Hospital Affiliated to  
Xinjiang Medical University,  
Urumqi 830011, Xinjiang  
Uygur Autonomous Region,  
China  
wzyfah@163.com

Received: 2013-07-24  
Accepted: 2013-08-06

motion radius of hind limbs after surgery, and the stretch function was limited; but with time prolonging, the functions were recovered. The motor evoked potentials could be observed at the quadriceps, and there was no significant difference between two groups ( $P > 0.05$ ). The number of neurons stained red in the spinal cord anterior horn was increased gradually in both crush injury group and the freeze injury group under fluorescence microscope. The number of neurons stained red in the crush injury group was significantly higher than that in the freeze injury group ( $P < 0.05$ ), and the number of blue-stained and purple-stained neurons was decreased gradually. The results suggest that keeping the perineurium intact can gain accurate docking in axon regeneration and the recovery of injured limb functions, even though the damaged range is large.

**Subject headings:** trauma, nervous system; femoral nerve; frostbite; nerve regeneration; models, animal

**Funding:** Scientific Research and Innovation Fund of Xinjiang Medical University, No. XJC2012122\*, XJC2012117\*, XJC2012123\*

Aikeremujiang·Muheremu, Cao P, Wu ZY, Wang XL, Jia M. Selective regeneration of rat femoral nerve after crush injury and freeze injury. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(41):7241-7247.

## 0 引言 Introduction

周围神经损伤患者常处于其最佳劳动年龄,四肢神经的损伤引起的功能损伤会直接影响他们的工作效率<sup>[1-2]</sup>,因而经常会引起一系列社会经济影响。然而,周围神经的修复一直是外科治疗中的一大挑战。尽管在显微外科手术技术获得了很大进展,神经损伤后功能的完全恢复却没能实现。周围神经损伤后要得到满意的功能恢复,不仅要有断端神经轴突的再生,还需要再生的神经轴突准确长入其原来的神经通道,达到其原来支配的器官与组织,但是因为神经损伤后虽然再生的轴突数量可观,但轴突长入原来组织器官往往难以实现<sup>[3-4]</sup>。因此,目前决定神经损伤后功能恢复程度的最重要的因素是再生轴突与其原有通道的准确对接<sup>[5]</sup>。

文章以大鼠股神经不同的损伤模型为研究对象,在采用电生理检测和神经组织学检测的同时,分别采用新的荧光红与纯蓝标记股神经肌支和隐神经,在观察神经再生效果的同时对神经再生的趋化性进行评价。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间和地点:** 于2013年2至5月在新疆医科大学中心实验室完成。

**材料:**

大鼠神经选择性再生实验的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
CE1900 型冰冻切片机	Leica 公司, 德国
IX70 型荧光显微镜	Olympus 公司, 日本
便携式肌电图仪	Medtronic Keypoint 公司, 丹麦
MS260 型电子天平	上海电子天平厂
BH-2 型 OLYMPUS 生物显微镜	OLYMPUS 公司, 日本
Nikon 光学显微镜及照像装置	Nikon 公司, 日本;
纯蓝、红色荧光染料(Dil)	Sigma 公司, 美国

**实验动物:** 健康雄性SD大鼠110只, 8周龄, 体质量(250±10) g, 由新疆医科大学实验研究中心提供, 实验动物使用许可证号: SYXK(新)2011-0004, 清洁级。对动物处置方法经过新疆医科大学第五附属医院伦理委员会的伦理审核。

**方法:**

**动物模型制备及分组:** 大鼠采用10%水合氯醛注射液腹腔注射(3 mL/kg)麻醉后, 仰卧位, 无菌条件下取右侧腹股沟切口, 显露股神经, 据手术操作的不同, 按随机数字表法分为3组。

对照组20只大鼠, 以股神经分叉处为基点向上分离主干5 mm, 之后逐层闭合切口。

夹伤组45只大鼠, 向上分离主干5 mm, 在分离上端用显微镊夹住神经5 s, 之后松开, 逐层闭合切口。

冰冻损伤组45只大鼠, 以股神经分叉处为基点向上分离5 mm, 用浸泡液氮的棉签压住股神经主干使其冷冻变硬, 之后逐层闭合切口。

**行为学评分:** 造模后2, 3, 6, 12周采用BBB评分量表进行评定<sup>[6]</sup>。动物被置于直径2 m的平面光滑场地自由活动, 2人独立观察并记录所有大鼠后肢关节活动的数目和范围, 负重程度及前后肢协调性, 前、后爪和尾部的活动情况, 时间为4 min, 进行BBB评分, 最后取均值。

**电生理检测:** 造模后8周, 各组取出5只大鼠, 麻醉后, 取腹股沟手术切口, 显露术侧股神经主干及肌支, 行股四头肌运动诱发电位测定。刺激电极置于吻合口近侧, 记录电极刺入股四头肌。

**电刺激参数:** 1.0 mA, 0.1 ms, 1.0 Hz, 测量股四头肌诱发电位潜伏期及波幅。

**逆行示踪标记:** 造模后2, 3, 6, 12周, 夹伤组与冰冻损伤组大鼠每个时间点各取出10只, 对照组大鼠每个时间点取出5只进行逆行标记。

应用10%水合氯醛注射液, 腹腔注射(3 mL/kg)麻醉后, 仰卧位, 无菌条件下取右侧腹股沟切口, 显露股神经, 用10 μL微量进样器向一端封闭的硅胶管内分别注

射5  $\mu\text{L}$  荧光红与纯蓝, 将套管管用6号手术线缝合在股神经分叉处附近的肌肉, 将股神经肌支从进入股四头肌处切断, 将远端插入装有荧光红的管中; 窃取同样长度的隐神经, 将其插入装有纯蓝的神经套管中。逐层关闭切口, 术后常规饲养3 d。

麻醉后经心脏灌注固定。从背侧剪开椎管暴露脊髓腰段, 然后小心解剖取出与L<sub>2</sub>-L<sub>4</sub>的背根神经节相应的脊髓节段(剥除硬、软脊膜)。沿冠状线纵向冰冻切片, 片厚20  $\mu\text{m}$ 。空气干燥后, 丙三醇封固, 以荧光显微镜观察。

观察脊髓前角神经元胞体中蓝色神经元信号(提示错误长入远端感觉神经通道的运动神经轴突)与红色荧光染色的神经元信号(提示正确长入远端运动神经通道的运动神经轴突), 进行拍照记录。

**主要观察指标:** 各组大鼠分别于造模后进行大体行为学、电生理检查, 另外分别用纯蓝和荧光红标记隐神经和股神经肌支, 逆行示踪标记运动神经元观测脊髓前角中示踪剂的分布及数目。行为学评分采用BBB评分量表进行评定。

**统计学分析:** 采用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件统计脊髓前角运动神经元数目, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 的形式表示, 由对动物分组情况不知情的第五作者利用SPSS 17.0软件对第三、第四作者获得的数据进行单因素方差分析,  $P < 0.05$ 为差异显著性标准。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 纳入110只大鼠, 夹伤组造模后2, 3, 7 d各死亡1只, 冰冻损伤组造模后第2, 7天各死亡1只, 其余大鼠全部存活。

**2.2 大体行为学观察** 见表1。

表1 对照组、夹伤组、冰冻损伤组大鼠造模后不同时间点下肢 BBB 评分比较

Table 1 Basso, Beattie and Bresnahan score on hind limb function of rats in the control group, crush injury group and freeze injury group at different time points after the surgery ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	2周	3周	6周	12周
对照组	20	20	20	20	20
夹伤组	42	9.5 $\pm$ 1.5	12.4 $\pm$ 1.5	15.3 $\pm$ 2.0	18.7 $\pm$ 1.3
冰冻损伤组	43	9.4 $\pm$ 1.2	12.3 $\pm$ 2.1	14.9 $\pm$ 1.9	18.4 $\pm$ 1.6

注: 夹伤组与冰冻损伤组大鼠后肢的 BBB 评分均逐渐改善, 2组评分之间差异无显著性意义。

各组大鼠分别于造模后2, 3, 6, 12周根据BBB评

分量表进行行为学评分。

夹伤组与冰冻损伤组大鼠术侧后腿活动范围均缩小, 伸腿功能均受限。

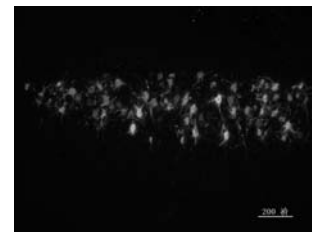
夹伤组与冰冻损伤组大鼠后肢BBB评分造模后随时间延长而增加, 夹伤组与冰冻损伤组的BBB评分显著低于对照组( $P < 0.05$ ), 夹伤组与冰冻损伤组之间各时间点BBB评分差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

**2.3 电生理检测** 术侧电极刺激吻合口近端神经, 对侧刺激相对应位置。于股四头肌处可记录到运动诱发电位。

夹伤组潜伏期为(1.78 $\pm$ 0.33) ms, 波幅(4.21 $\pm$ 0.87) mV, 对照组潜伏期(1.66 $\pm$ 0.25) ms, 波幅(5.83 $\pm$ 1.20) mV; 冰冻损伤组潜伏期(1.80 $\pm$ 0.41) ms, 波幅(4.81 $\pm$ 1.52) mV。

与对照组大鼠正常神经比较, 夹伤组与冰冻损伤组的潜伏期延长( $P < 0.05$ ), 波幅降低( $P < 0.05$ ), 但夹伤组与冰冻损伤组大鼠之间差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

**2.4 逆行示踪** 脊髓冰冻切片后, 置于荧光显微镜下, 在不同颜色的激发光下, 观察到对照组中脊髓前角仅有红色标记的运动神经元, 见图1; 而夹伤组与冰冻损伤组可同时观察到红色、蓝色以及紫色染的神经元, 见图2及表2。



注: 对照组中脊髓前角仅可见红色标记的运动神经元。

图1 对照组大鼠脊髓前角逆行示踪神经元染色情况

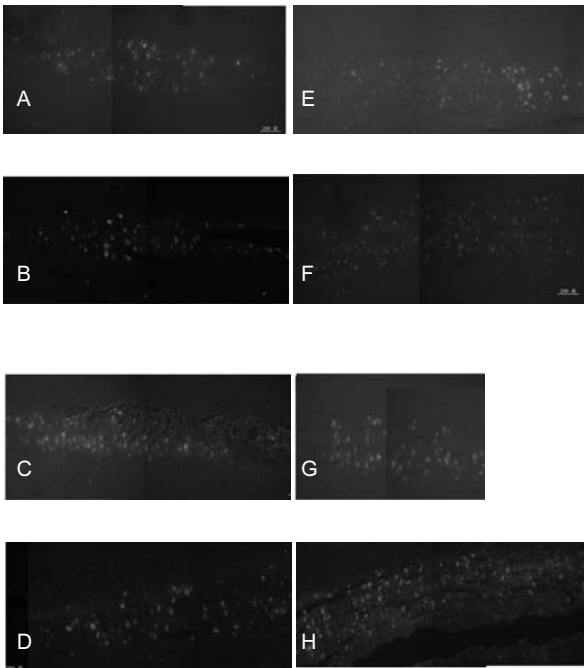
Figure 1 Staining of retrograde traced neurons in the spinal cord anterior horn of rats in the control group

夹伤组与冰冻损伤组大鼠脊髓前角蓝色与紫色染的神经元造模后随着时间的延长而逐渐减少, 而红色染的神经元随时间延长逐渐增加。

作者分别计算出表示近端再生运动神经轴突正确长入远端神经通道的红色染的神经元在所有神经元中的比例。

发现造模后3, 6, 12周, 夹伤组脊髓前角红染神经元占有神经元的比例显著高于冰冻损伤组( $P < 0.05$ ), 见表3。

制作红染神经元比例变化的线形图, 发现2组红染神经元的比例均从造模后1周到8周逐渐增加, 线形图见图3。



A, B, C, D 分别为夹伤组逆行示踪标记 2, 3, 6, 12 周的图片, E, F, G, H 分别为冰冻损伤组逆行示踪标记 2, 3, 6, 12 周的图片。

注: 结果显示, 夹伤组与冰冻损伤组可同时观察到红色、蓝色以及紫色染的神经元。夹伤组与冰冻损伤组大鼠脊髓前角蓝色与紫色染的神经元造模后随着时间的延长而逐渐减少, 而红色染的神经元随时间延长逐渐增加。

图 2 夹伤组与冰冻损伤组大鼠脊髓前角逆行示踪神经元染色情况

Figure 2 Staining of retrograde traced neurons in the spinal cord anterior horn of rats in the crush injury group and the freeze injury group

表 2 夹伤组与冰冻损伤组大鼠造模后不同时间点脊髓前角逆行示踪染色神经元数比较

Table 2 Number of retrograde traced neurons in the spinal cord anterior horn of rats in the crush injury group and the freeze injury group at different time points after modeling ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	颜色	2 周	3 周	6 周	12 周
夹伤组	红	86.4±7.2	124.6±14.9	185.4±18.2	322.7±24.2
	蓝	84.2±7.4	78.2±6.6	62.2±8.4	47.3±8.4
	紫	32.6±5.6	26.9±4.4	18.9±4.7	8.9±2.4
冰冻损伤组	红	61.2±5.2	114.2±11.8	176.5±16.3	276.4±19.6
	蓝	58.4±4.3	65.3±5.2	53.7±6.3	30.5±5.1
	紫	62.2±8.4	23.4±2.4	16.7±3.7	7.5±1.8

注: 2 组脊髓前角红染神经元数量逐渐增加, 蓝染与紫染神经元数量逐渐减少, 冰冻损伤组红色神经元数量显著低于夹伤组 ( $P < 0.05$ )。

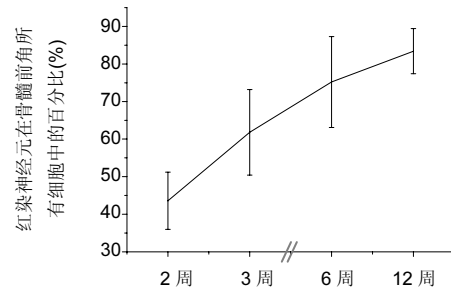
表 3 夹伤组与冰冻损伤组大鼠造模后不同时间点脊髓前角红染神经元百分比比较

Table 3 Percentage of red stained neurons in the spinal cord anterior horn of rats in the crush injury group and the freeze injury group at different time points after modeling ( $\bar{x} \pm s, n=10, \%$ )

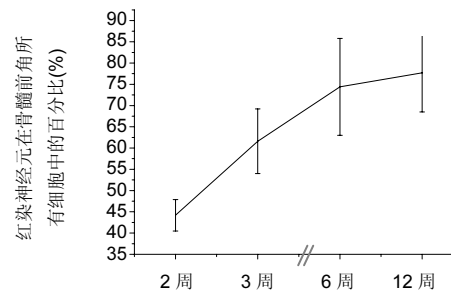
组别	2 周	3 周	6 周	12 周
夹伤组	43.6±7.6	61.8±11.4	75.2±12.1	83.4±6.0
冰冻损伤组	44.2±3.7	61.6±7.6 <sup>a</sup>	74.4±11.4 <sup>a</sup>	77.7±9.2 <sup>a</sup>

与夹伤组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

注: 2 组大鼠脊髓前角红染神经元的百分比随时间延长逐渐增高, 造模后 3, 6, 12 周, 夹伤组脊髓前角红染神经元占有神经元的比例显著高于冰冻损伤组 ( $P < 0.05$ )。



A: 夹伤组



B: 冰冻损伤

注: 2 组大鼠脊髓前角红染神经元的百分比随时间延长逐渐增高, 表明夹伤、神经冰冻损伤后近端再生的运动神经轴突正确长入远端运动神经通道的比例均逐渐增加。

图 3 夹伤组与冰冻损伤组大鼠脊髓前角红染神经元在所有细胞中的比例

Figure 3 Percentage of red stained neurons in the spinal cord anterior horn of rats in the crush injury group and the freeze injury group

### 3 讨论 Discussion

周围神经损伤之后会发生一系列病理生理变化。神

经损伤几个小时之后神经细胞、细胞核与核仁膨大(即核溶解)。这时的细胞代谢的功能是将神经递质传递到需要修复的神经轴突处。这过程包括核糖核酸的合成增加, 蛋白质成分、脂类、6-磷酸葡萄糖脱氢酶和水解酶增加等<sup>[7-9]</sup>。

周围神经损伤后冰冻损伤的病理变化包括神经内膜, 基底层以及许旺细胞的损伤。神经束膜保持完整, 但再生的神经轴突必须通过由裂解的神经内膜与许旺细胞导致的瘢痕组织。这可会引起再生神经纤维不完全的增生与再生的神经纤维不适当的长入远端感受器。夹伤的病理变化则包括除了上述损伤之外还包括神经束膜的断裂, 更有可能引起再生神经纤维不当地长入远端感受器<sup>[10-12]</sup>。

在本实验逆行标记染色神经元的技术中不难看出, 在轴突生长的前 2 周, 脊髓前角的神经元着色基本上的随机的, 而从第 3 周开始, 红染的神经元逐渐增多, 到了第 8 周的时候, 在冰冻损伤组有 80% 以上的神经元是染了红色, 而染蓝色与紫色染神经元的比例明显下降, 标志着从近端再生的运动神经轴突起初长入远端神经通道是随机的, 而到后期有越来越多的神经轴突正确地长入远端的运动神经通道内。

促进周围神经损伤后神经功能的恢复, 一方面要尽量加快损伤处神经轴突的再生, 另一方面需要提高近端与远端神经对接的精确度<sup>[13-17]</sup>。错接后导致支配皮肤的神经纤维再生至肌肉, 或者支配肌肉的神经纤维再生至皮肤, 这样都不可能恢复神经的功能<sup>[18]</sup>。目前的神经修复中常用的直接断端缝合术以及修复神经缺损的“金标准”: 自体神经移植均通过神经断端间的强制接触诱导近端神经轴突长入远端神经内膜。这种再生神经强制对接的方法会增加再生神经的错向生长, 即近端运动神经轴突长入远端感觉神经束内膜或者近端感觉神经轴突长入远端运动神经内膜。

神经趋化性再生理论提供了提高再生神经精确对接的新的方法。该理论认为神经损伤后再生的神经轴突倾向于与远端同一种性质的神经对接<sup>[19]</sup>。可以通过有效利用神经再生的趋化性再生的性质提高神经再生的精确度以进一步提高损伤后神经功能的恢复程度。Cajal 等<sup>[20]</sup>突出神经趋化性再生的时候提出趋化性再生具有组织特异性, 局部解剖学特异性, 靶器官特异性等性质。虽然目前学术界已经广泛接受了神经趋化性再生理论, 但是对其各种特性仍存在较大的争论。再生趋化性发生的机制也需要进一步研究探索。

早在 1898 年 Forssman<sup>[21]</sup>发现再生的神经纤维会通过一个小的间隙之后会特异性地与远端的神经断端对接, 他将这种现象解释为神经选择性再生 (neurotropism)。但这现象后来被 Weiss&Taylor<sup>[22-23]</sup>利用了填充有血液的自体血管 Y 型导管实验否认。他们的

实验中再生的神经在生长过程中随机地长向 Y 管两个方出口, 并没有趋向于对放有神经片段的一段。他们的实验在相当一段时间内限制了人们对神经趋化性再生与血管用来修复神经导管的热情。

到了 20 世纪八九十年代, Lundborg<sup>[24]</sup>、Politis<sup>[25-26]</sup>、Mackinnon<sup>[27]</sup>、Seckel<sup>[28]</sup>、Bruneli<sup>[29]</sup>、Brushart 等<sup>[30]</sup>通过一系列的实验不仅证明了神经选择性再生的存在, 也证实了其趋化性的性质。后来 Chiu 等<sup>[31-34]</sup>在基础研究和临床实验中证实了静脉导管修复神经损伤的有效性。

尽管神经趋化性再生理论已经被广泛接受, 但其机制尚不清楚。Politis 等<sup>[35]</sup>通过股神经分支逆行标记物染色试验发现近端再生的运动神经特异性地长入远端运动神经, 而近端再生的感觉神经则特异性地长入远端的隐神经。他们人为远端神经轴突分泌各种特殊因子特异性促进近端再生轴突的定向生长。Madison 等<sup>[36]</sup>提出神经修剪假说 (Pruning hypothesis), 既近端再生的运动神经轴突错误地长入了远端感觉神经之后会被修剪, 错误再生的轴突会萎缩退化从而提高神经再生对接的准确性。

作者这次实验中红色染神经元比例的逐渐增加也证明了修剪假说, 说明错向生长的感觉神经纤维可能会在异常的微环境中逐渐被修剪萎缩, 从而增加神经再生对接的准确性。

Hoke 等<sup>[37]</sup>提出神经趋化部分归因于许旺细胞的表现型。运动神经和感觉神经的许旺细胞有不同的表现型。它们分泌的神经营养因子也有所不同, 因此它们对神经再生的不同的调解作用。一些研究也提示再生神经轴突受到远侧神经断端分泌的神经营养因子浓度的不同的影响。

神经轴突再生的基础研究可能有助于发现新的临床治疗途径的发现。研究发现许旺细胞从远端神经断端迁移对神经的组织特异性生长具有重要意义。其中感觉神经远端的许旺细胞不仅促进近端感觉神经轴突趋向性再生, 还能促进近端运动神经轴突的趋化性再生<sup>[38-40]</sup>。

冰冻损伤的神经发生大量的许旺细胞死亡, 这是冰冻损伤后神经功能丧失的原因之一, 因此临近许旺细胞移行到损伤处也是神经修复过程中的一项重要内容。Tsubokawa 等<sup>[41]</sup>认为许旺细胞对感觉神经轴突再生作用较强, 但对运动轴突的优先促进作用微乎其微。

本实验中长段冰冻损伤后虽有许旺细胞大量的崩解死亡, 但是后来的神经荧光标记无逆行标记结果显示损伤后运动神经轴突错向隐神经生长的情况并没有夹伤组明显, 这一结果否认了 Tsubokawa 等的说法, 而是在神经束膜完整, 通道存在的情况下, 尽管起初缺乏许旺细胞的支持与引导, 仍能较准确地与远端运动神经相

接。

这可能对以后的神经缺损的修复给予一定的启示:

①神经修复的过程中神经束膜的缝合可能在神经功能恢复上更优于外膜直接缝合。②如果能正确地模仿神经的立体结构,可以利用较长的神经导管来修复缺损的神经,而同样能达到较理想的功能恢复。大体功能学检测与电生理检测的结果也显示二者功能恢复之间没有明显的区别。

在逆行标记检测中,肌支的 50%是感觉神经,因此错误地长入远端感觉神经的轴突逆向运输到脊髓前角技术的算在正确对接。他们的方法学方面可以进一步改进,或者同时利用了两种评价方式看是否会得到同一种结果,以免因为各自的实验条件和个人主观因素影响而造成的错误结论。以后的研究可以通过在术后一段时间行背根神经节离断术使股神经肌支内的感觉神经退化萎缩来消除其干扰。

对于周围神经损伤,大多数实验项目采用锐器切割损伤的方法形成周围损伤模型,文章在这方面应用了钝性夹伤和冷冻伤的损伤模型,从新的动物模型进行比较,更多研究可进一步深入探讨不同损伤模型对于神经损伤修复方面的差异性及其作用机制。

**致谢:** 特此感谢新疆医科大学动物实验室魏秦老师。

**作者贡献:** 第一、二作者负责动物造模,第三、四作者负责实验结果检测,第五作者负责数据分析,动物分组采用盲法处理。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**学术术语:** 趋化性再生-神经损伤后损伤近端长出的运动轴突选择性长入远端原本运动轴突通道,由近端长出的感觉神经轴突长入远端感觉神经通道的现象。

**作者声明:** 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Kehoe S, Zhang XF, Boyd D. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy. *Injury*. 2012;43(5):553-572.
- [2] Lin MY, Manzano G, Gupta R. Nerve allografts and conduits in peripheral nerve repair. *Hand Clin*. 2013;29(3): 331-348.
- [3] Ruitter G, Malessy M, Alaid A. Misdirection of regenerating motor axons after nerve injury and repair in the rat sciatic nerve model. *Exp Neurol*. 2011;(28): 339-350.
- [4] Kou Y, Peng J, Wu Z, et al. Small gap sleeve bridging can improve the accuracy of peripheral nerve selective regeneration. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2013. [Epub ahead of print]
- [5] Bongso A, Fong CY. The Therapeutic Potential, Challenges and Future Clinical Directions of Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. *Stem Cell Rev*. 2013;9(2):226-240.
- [6] Popovich PG, Tovar CA, Wei P, et al. A reassessment of a classic neuroprotective combination therapy for spinal cord injured rats. *Exp Neurol*. 2012;233(2):677-685.
- [7] Behera D, Behera S, Jacobs KE, et al. Bilateral peripheral neural activity observed in vivo following unilateral nerve injury. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. 2013;3(3): 282-290.
- [8] Kim JR, Oh SH, Kwon GB, et al. Acceleration of Peripheral Nerve Regeneration through Asymmetrically Porous Nerve Guide Conduit Applied with Biological/Physical Stimulation. *Tissue Eng Part A*. 2013.[Epub ahead of print]
- [9] Ring D. Symptoms and disability after major peripheral nerve injury. *Hand Clin*. 2013;29(3):421-425.
- [10] Zaverucha-do-Valle C, Gubert F, Bargas-Rega M, et al. Bone marrow mononuclear cells increase retinal ganglion cell survival and axon regeneration in the adult rat. *Cell Transplant*. 2010;20:391-406.
- [11] Allodi I, Udina E, Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog Neurobiol*. 2012;98(1):16-37.
- [12] Ryan JN, Scott L, Zin ZK, et al. Functional characterization of optimized acellular peripheral nerve graft in a rat sciatic nerve injury model. *Neurol Res*. 2011;33(6):600-608.
- [13] Ruitter G, Malessy M, Alaid A. Misdirection of regenerating motor axons after nerve injury and repair in the rat sciatic nerve model. *Exp Neurol*. 2008;211:339-350.
- [14] Eng L, Tsang S, Yasuhiko T, et al. Genetically-manipulated adult stem cells as therapeutic agents and gene delivery vehicle for wound repair and regeneration. *J Control Release*. 2012; 157(3):321-330.
- [15] Ratzka A, Baron O, Stachowiak MK, et al. Fibroblast growth factor 2 regulates dopaminergic neuron development in vivo. *J Neurochem*. 2012;122(1):94-105.
- [16] Ebert AD, Laussmann M, Wegehingel S, et al. Tec-kinase-mediated phosphorylation of fibroblast growth factor 2 is essential for unconventional secretion. *Traffic*. 2010;11: 813-826.
- [17] Ilary A, Laura CD, Eva SN, et al. FGF-2 Low Molecular Weight Selectively Promotes Neuritogenesis of Motor Neurons In Vitro. *Mol Neurobiol*. 2013;47(2): 770-781.
- [18] Madison RD, Robinson GA, Chadaram SR. The specificity of motor neurone regeneration (preferential reinnervation). *Acta Physiol*. 2007;189: 201-206.
- [19] Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg*. 2000;25(3):391-414.
- [20] Cajal RS. Experiments dealing with the transplantation of nerves and their products designed to prove especially an attractive or neurotrophic action on nerve sprouts. *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. New York, NY: Hafner Press, 1928: 329-361.

- [21] Forssman J. Ueber de Ursachen, Welche die wachstumsachtung der peripheren nervenfasern bei der regeneration bestimmen. *Beitp Pathol Anat.* 1898; 24: 55-100.
- [22] Weiss P, Taylor AC. Histiomechanical analysis of nerve reunion in the rat after tubular splicing. *Arch Surg.* 1943; 47: 419-447.
- [23] Weiss P, Taylor AC. Further experimental evidence against "neurotrophism" in nerve regeneration. *J Exp Zool.* 1944; 95: 233-257.
- [24] Lundborg G, Dablin L, Danielsen N, et al. Tissue specificity in nerve regeneration. *Scan J Plast Reconstr Surg.* 1986; 20: 279-283.
- [25] Politis MJ. Specificity in mammalian peripheral nerve regeneration at the level of the nerve trunk. *Brain Res.* 1985; 328: 271-276.
- [26] Politis MJ, Ederle K, Spencer PS. Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derived from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. *Brain Res.* 1982; 253: 1-12.
- [27] Mackinnon S, Dellon L, Lundborg G, et al. A study of neurotrophism in a primate model. *J Hand Surg.* 1986; 11A: 888-896.
- [28] Seckel BR, Chiu TH, Nyilas E, et al. Nerve regeneration through synthetic biodegradable nerve guides: regulation by the target organ. *Plast Reconstr Surg.* 1984; 74: 173-180.
- [29] Brunelli G, Fontana G, Jager C, et al. Chemotactic arrangement of axons inside and distal to a venous graft. *J Reconstr Microsurg.* 1987; 3(2): 87-93.
- [30] Brushart TME. Motor axons preferentially reinnervate motor pathways. *J Neurosci.* 1993; 13: 2730-2738.
- [31] Chiu DT, Janecka I, Krizek TJ, et al. Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration. *Surgery.* 1982; 91: 226-232.
- [32] Chiu DT, Lovelace RE, Yu LT, et al. Comparative electrophysiologic evaluation of nerve grafts and autogenous vein grafts as nerve conduits: an experimental study. *J Reconstr Microsurg.* 1988; 4(4): 303-310.
- [33] Chiu DT, Strauch B. A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3 cm or less. *Plast Reconstr Surg.* 1990; 86: 928-934.
- [34] Coughlin MD. Target organ stimulation of parasympathetic nerve growth in the developing mouse submandibular gland. *Dev Biol.* 1975; 43(1): 140-158.
- [35] Politis MJ, Spencer PS. An in vivo assay of neurotropic activity. *Brain Res.* 1983; 278(1-2): 229-231.
- [36] Madison RD, Robinson GA, Chadaram SR. The specificity of motor neurone regeneration (preferential reinnervation). *Acta Physiol.* 2007; 189: 201-206.
- [37] Hoke A, Redett R, Hameed H, et al. Schwann cells express motor and sensory phenotypes that regulate axon regeneration. *J Neurosci.* 2006; 26(38): 9646-9655.
- [38] Anjan KD, Renjitha G, Ishwar P. Current Status and Prospective Application of Stem Cell-Based Therapies for Spinal Cord Injury. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2011; 6: 93-104.
- [39] Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, et al. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011; 24(1): 59-64.
- [40] Yu W, Zhe Z, Zhiwu R, et al. Recellularized nerve allografts with differentiated mesenchymal stem cells promote peripheral nerve regeneration. *Neurosci Lett.* 2012; 514(1): 96-101.
- [41] Tsubokawa N, Maki Y, Yoshizu T, et al. Comparison of the neurotropic effects of motor and sensory Schwann cells during regeneration of peripheral nerves. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg.* 1999; 33: 379-385.