

· 基础研究 ·

大鼠臂丛神经损伤后脊髓运动神经元再生轴突的路径

郑玲玲¹ 肖波¹

摘要

目的:观察臂丛神经不同损伤后脊髓前角运动神经元再生轴突的路径选择,探讨运动功能恢复与再生的关系。

方法:选用 60 只健康成年雄性 SD 大鼠,随机分为 5 组:根性切断组、根性挫伤组、干性切断组、干性挫伤组和对照组。术后 2 个月进行 Grooming 实验,检测其患肢运动功能的恢复。肌皮神经肌支或皮支注射荧光金逆行追踪标记,3 天后取脊髓 C5-7 节段标本,计数再生脊髓运动神经元数。

结果:各组肌支标记的神经元数均远多于皮支。运动功能恢复 4 级以上百分比,根性切断组(0%)<根性挫伤组(17%)<干性切断组(50%)<干性挫伤组(75%)<对照组(100%)。

结论:臂丛神经损伤后脊髓前角运动神经元再生轴突的路径为肌支路径。不同损伤后功能恢复的程度不同,其与再生轴突的路径及再生轴突的数量有关。

关键词 肌皮神经;运动神经元;再生

中图分类号:R743.3,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2011)-02-0120-04

The pathway of regenerative spinal motoneurons after brachial plexus injury in rats/ZHENG Lingling,XIAO Bo//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(2): 120-123

Abstract

Objective: To observe the pathway of regenerative axons of spinal motoneurons following differently injury of brachial plexus and to investigate the correlation of the pathway of regenerative axons and the recovery of motor function.

Method: A total of sixty adult male SD rats were randomly divided into five groups: nerve root cut group (rct), nerve root crush group (rch), neural stem cut group (sct), neural stem crush group (sch) and the control group. Two months later, the functional recovery was evaluated by using grooming test. Fluorogold labeled regenerative motoneurons retrogradely when injected into the motor or sensory branch of musculocutaneous nerve. Three days later, the C5-7 spinal cord were harvested and then the regenerative motoneurons were numbered.

Result: The regenerative motoneurons reinnervated motor branch were much more than that sensory branch in all five groups. With the functional recovery, the percentage of above grading 4 in the four injured groups rct, rch, sch, sct is 0, 17%, 50%, 75%, respectively.

Conclusion: Regenerative axons of spinal motoneurons reinnervate the motor branch after BPI. The extent of motor functional recovery is different after different injuries, and it is correlated with the pathway and the numbers of regenerative axons.

Author's address The Second Hospital of Jingmen, Hubei Province, 448000

Key word musculocutaneous nerve; motoneuron; regeneration

臂丛神经损伤是发病率很高的疾病,往往造成上肢功能的缺失,尤其是根性损伤。周围神经损伤后

虽有较强的再生能力,但功能的恢复往往不理想。神经损伤后再生运动轴突路径的选择对功能恢复起决

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.02.007

1 荆门市第二人民医院病理科,湖北省荆门市,448000

作者简介:郑玲玲,女,硕士研究生,住院医师;收稿日期:2010-08-23

定性作用^[1]。目前大多研究指出,周围神经损伤后其运动神经元再生轴突趋向于优先再支配肌支,即优先肌支再支配 (preferential motor reinnervation, PMR)^[2-4]。但是也有一些学者在实验中观察到运动神经元再生时优先支配到皮神经支^[5],提出了对PMR的质疑。本实验旨在通过对大鼠肌皮神经的肌支和皮支的荧光标记,探讨大鼠臂丛神经损伤后脊髓运动神经元再生的路径选择,进一步探讨周围神经再生时PMR的发生及其与运动功能恢复的关系。

1 材料与方 法

1.1 试验动物与试剂

1.1.1 试验动物:选用健康成年雄性SD大鼠60只(南方医科大学实验动物中心提供),体重250—300g,随机分成根性切断组、根性挫伤组、干性切断组、干性挫伤组及对照组5组,每组又根据荧光金标记肌皮神经的肌支或皮支的不同各分为两小组,每小组6只大鼠。

1.1.2 试剂:荧光金购自Denver USA公司。

1.2 实验方法

1.2.1 造模:将大鼠用盐酸胺碘酮与氯丙嗪1:1混合液(0.2ml/100g体重)腹腔注射麻醉后固定于手术台上,选择右侧为实验侧,术野脱毛消毒。根性损伤时沿C4棘突至T2棘突作后正中切口,显露并咬除C4—T2右侧半椎板,暴露脊髓右侧半以及C5—T1脊神经根,剪开硬脊膜,显微镜直视下撕脱C5、C7、C8、T1神经根前根,并切除上述脊神经前根远断端约5mm,弃之使其不能接触,而后根性挫伤组用无齿显微镊钳夹C6神经根前根约30s,而根性切断组以显微剪剪断C6神经根前根后立即11/0的丝线行两断端缝合。干性损伤组取右侧锁骨下横切口切开皮肤,暴露臂丛神经,剥离出肌皮神经,而后干性挫伤组采用显微镊钳夹肌皮神经30s,干性切断组切断此神经并在外科手术显微镜下用11/0线行断端吻合;对照组中只显露臂丛神经,不造成损伤。术后逐层缝合切口,将大鼠分笼饲养。

1.2.2 追踪标记:造模成功后各组大鼠分笼饲养8周。在处死前3天行荧光金逆行追踪标记。采用上述麻醉剂腹腔注射麻醉,仰卧位固定于手术台上,肌皮神经肌支标记组于右前肢腋窝处,皮支(前臂外侧皮

神经)标记组于右前肢肘窝处,脱毛消毒,手术显微镜下操作。依次剪开皮肤、肌肉层,暴露并游离出肌皮神经的肌支或皮支。用套接于微量注射器的微波管缓慢注射少许(约0.1 μ l)荧光金染料,后用无齿镊钳夹其注射部位约30s,防止染料向远端渗漏。清理术野,关闭并清洁伤口。

1.2.3 取材:荧光标记后3天,将大鼠麻醉,打开胸腔,于左心室插管至升主动脉,右心房切开放血,灌注生理盐水100ml冲洗,而后灌注含4%多聚甲醛的磷酸缓冲液(0.1mol/L, pH 7.4)500ml固定。取脊髓C5—7节段后固定,然后置于30%的蔗糖液中过夜。行恒冷箱冰冻切片,片厚30 μ m,收集保存。

1.2.4 贴片及计数:将收集的各组切片裱于涂有铬矾明胶的载玻片上,避光,空气干燥,甘油封片,置于荧光显微镜下观察,计数标记神经元数。

1.2.5 Grooming 实验:采用Bertelli等^[6-7]方法,观察大鼠屈肘运动恢复程度,了解大鼠肌皮神经的恢复情况。功能等级分5级,达到3级者为恢复良,4级或以上为优。

1.3 统计学分析

采用SPSS13.0统计包,t检验, χ^2 分析, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

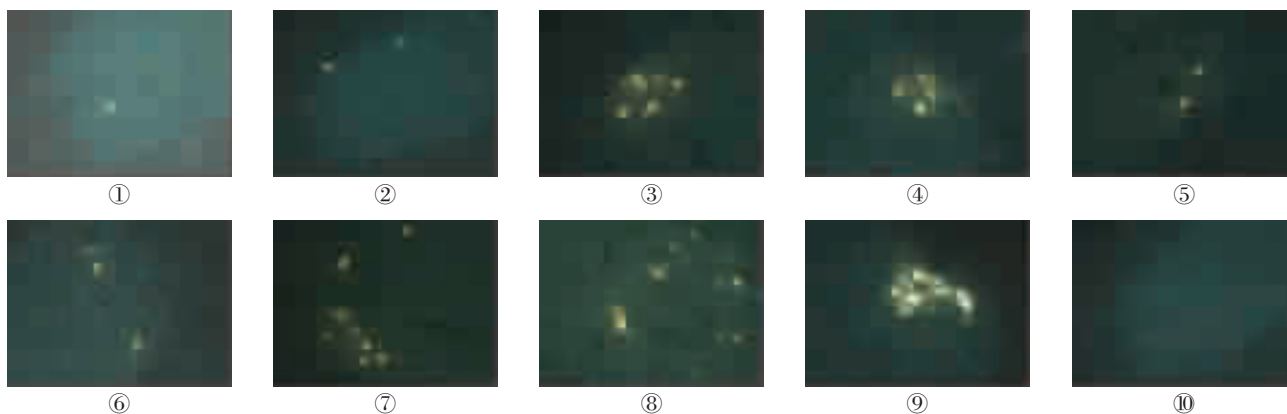
2.1 各种损伤后肌支及皮支分别标记的神经元数

荧光金逆行追踪标记的神经元多见于脊髓前角后外侧核(图1),各组中肌支标记的神经元数都远多于皮支,差异均有显著性意义(表1, $P<0.01$)。根性挫伤组与根性切断组、干性挫伤组与干性切断组、干性挫伤组与根性挫伤组、干性切断组与根性切断组间肌支标记的神经元数均有显著性差异($P<0.01$)。干性切断组与对照组肌支标记的神经元数差异无显著性意义($P>0.05$),余三组与对照组间肌支标记的神经元数均有显著性差异($P<0.01$)。

2.2 Grooming 实验结果

术后两个月各组大鼠功能恢复等级见表2。其中4级以上百分比,根性切断组(0%)<根性挫伤组(17%)<干性切断组(50%)<干性挫伤组(75%)<对照组(100%),差异均有显著性($P<0.01$)。

图 1 脊髓 C6 节段中的某一横断面的荧光阳性神经元



注:①②③④分别为根性挫伤组和根性切断组皮支及肌支标记的神经元(x200); ⑤⑥⑦⑧分别为干性挫伤组和干性切断组皮支及肌支标记的神经元(x200); ⑨⑩为对照组肌支及皮支标记的神经元(x200)

表 1 各组标记的运动神经元数

	根性挫伤组	根性切断组	干性挫伤组	干性切断组	对照组
皮支	12±5	14±4	48±5	162±45	0
肌支	355±75	272±48	533±45	609±21	633±38

表 2 术后两个月各组的恢复情况

组别	鼠数 (只)	Grooming 实验分级						4 级以上 百分比(%)
		5 级	4 级	3 级	2 级	1 级	0 级	
根性挫伤组	12	0	2	5	5	0	0	17
根性切断组	12	0	0	6	5	1	0	0
干性挫伤组	12	3	5	4	0	0	0	75
干性切断组	12	1	5	6	0	0	0	50
对照组	12	12	0	0	0	0	0	100

3 讨论

3.1 神经损伤后运动神经元再生轴突的路径

周围神经损伤后具有较强的再生能力,只要有存活神经元,其再生就可能发生。神经回植术在一定程度上促进了再生。植回的神经可恢复神经元与周围神经之间的连续性,为再生的轴突提供最完善的桥接体;大量增殖的雪旺氏细胞合成与分泌神经营养因子及细胞外基质,提供了良好的神经再生微环境^[8]。我们的实验在四种不同损伤后也都重建了神经的连续性,从结果中可以看到各损伤组都标记到一定的脊髓运动神经元,说明各组均成功地发生了再生。

虽然再生不良可由于神经元的丢失、再生能力的丧失及合适的感觉再支配丧失等因素引起,但最主要原因是再生的运动轴突错误支配靶组织。神经

受损再生时,首先是近侧断端生长锥的出现,沿不同方向延伸并形成几个分支。而这些分支并不都生长进入到其原来的靶组织,其中有些分支沿其原来的路径生长,而另外的一些却生长进入不适合的路径。同一个原始轴突所发出的不同突起可以选择这两种不同路径到达其靶组织,说明了路径的选择并不是由轴突自主决定的,它依赖于轴突与外来因子的相互作用^[9]。在对股神经损伤动物模型的研究^[9]也显示,神经损伤后,当其所支配的肌肉靶组织不存在,而所支配的皮肤靶组织还存在时,皮支就成为了主要的运动神经元再生轴突的路径选择。保持与肌肉的接触,就会导致肌支的优先再支配。这些都说明了 PMR 不是运动神经元的内在性质,路径中的周围环境,包括营养性因子、导向因子等对运动神经元轴突的营养支持或导向作用对 PMR 的发生起着很重要的作用^[10-12]。

基于再生轴突有选择性再支配肌支或皮支的两种可能性,我们通过荧光金标记肌皮神经的肌支及皮支来探讨脊髓运动神经元再生轴突的路径。结果显示各实验组中肌支标记的神经元数均远多于皮支。不管是根性损伤,还是干性损伤,也不管是挫伤还是切断伤,脊髓运动神经元的再生轴突均优先支配肌支。这说明了不同的损伤形式及部位可能对再生轴突路径的选择都没有影响。只要损伤后能重新建立神经的连续性或神经与脊髓间的连接,从而就恢复了脊髓前角神经元与周围神经之间的连续性,

为再生的轴突提供最完善的桥接体;周围神经和靶肌肉组织中产生的大量神经营养因子及导向因子,为再生运动轴突的生长提供了良好的微环境,并引导其定向生长,支配其原靶肌肉组织。

3.2 运动功能的恢复

周围神经损伤后,功能的恢复有赖于成功的再生,而周围神经损伤后成功的再生必须通过3个步骤:①神经元胞体存活并能够轴突再生;②再生轴突能成功通过神经损伤处或吻合处;③再生的轴突与靶器官重建突触联系。

我们的实验结果显示,在各种不同损伤后8周,各组动物均有不同程度的功能恢复,说明各组均有成功的轴突再生,再生的轴突与靶肌肉组织也成功地重建了突触联系。其中根性损伤组与干性损伤组相比,根性损伤后运动功能的恢复是有限的,这可能是由大量的神经元的死亡以及成功再支配到靶组织的再生轴突的有限性造成的,较慢的轴突再生速率和较长的再生距离造成了明显的远侧断端神经和靶组织的萎缩,远侧断端的萎缩阻碍了再生,而靶组织的萎缩又阻碍了功能的恢复。而根性挫伤组较根性切断组功能恢复稍好,这与挫伤组中肌支标记的神经元数稍多是一致的。除了再生的神经元较多外,挫伤保留了神经外膜的连续性,损伤后再生轴突延伸支配其原来的靶组织的准确率也较高,因此能恢复更好的功能。在干性挫伤组与干性切断组间,虽然切断组较挫伤组肌支标记到更多的神经元,但是功能恢复却较挫伤组差,原因可能是:①由于肌肉再支配是一个缓慢的过程,可能在8周时再生的轴突还没有完全延伸达到靶肌肉组织。②由荧光金标记到的所有再生的神经元,虽然都已成功通过损伤处再生到达远端,但是再生的轴突并不一定都与靶器官重建了功能性的突触联系。在胚胎发育过程中运动神经元与其所支配的运动终板间建立了特异性的功能联系,一个运动终板对应一个神经元的轴突末梢,排除了其他神经元的支配。成年动物在去神经支配时,运动神经元恢复到胚胎的或未分化的状态,但是仍然保持着部分对原来靶肌肉组织的特异性。Chan等^[14]研究显示,周围神经损伤后几个轴突末梢同时支配同一个运动终板,尽管此时有一些运动终板无神经支配。还有研究显示损伤再生时突

触减少^[15],这些都说明功能的恢复并非与再生纤维的数量成简单的正比例关系。我们实验中干性切断组与对照组的肌支标记的神经元数无明显差异,但功能恢复却未能达到正常,同样也说明了这个问题。

参考文献

- [1] Romansky RK. Axonal misdirection as contributing factor to aberrant reinnervation of muscles after facial nerve suture in cats[J]. *Arch Physiol Biochem*, 2003, 111(3):273—283.
- [2] Redett R, Jari R, Crawford T, et al. Peripheral pathways regulate motoneuron collateral dynamics [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(41): 9406—9412.
- [3] Witzel C, Rohde C, Brushart TM. Pathway sampling by regenerating peripheral axons [J]. *J Comp Neurol*, 2005, 485(3): 183—190.
- [4] Brushart TM. Preferential reinnervation of motor nerves by regenerating motor axons[J]. *J Neurosci*, 1988, 8(3): 1026—1031.
- [5] Robinson GA, Madison RD. Manipulations of the mouse femoral nerve influence the accuracy of pathway reinnervation by motor neurons[J]. *Exp Neurol*, 2005, 192(1): 39—45.
- [6] Bertelli JA, Mira JC. Behavioral evaluating methods in the objective clinical assessment of motor function after experimental brachial plexus reconstruction in the rat[J]. *J Neurosci Methods*, 1993, 46(3): 203—208.
- [7] 郑玲玲,吴建中,支晔. 臂丛神经损伤对热休克蛋白和神经型一氧化氮合成酶表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(8): 729—731.
- [8] 柳明忠,张文明,朱维钦. 臂丛根性撕脱伤后脊髓水平神经修复的研究进展[J]. *福建医药杂志*, 2005, 27(6): 172—174.
- [9] Madison RD, Robinson GA, Chadaram SR. The specificity of motor neurone regeneration (preferential reinnervation) [J]. *Acta Physiol*, 2007, 189(2): 201—206.
- [10] Robinson GA, Madison RD. Motor neurons can preferentially reinnervate cutaneous pathways [J]. *Exp Neurol*, 2004, 190(2): 407—413.
- [11] 张立新,佟晓杰,贾桦. 超短波对大鼠周围神经缺损修复后神经再生的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2009, 24(8): 695—698.
- [12] 张义龙,田德虎,张英泽. 综合措施治疗周围神经损伤的疗效观察[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(11): 1001—1003.
- [13] 田德虎,李熙明,张奇. 分米波对神经损伤后运动终板再生的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(11): 976—978.
- [14] Chan YM, Yick LK, Yip HK, et al. Inhibition of caspases promotes long-term survival and reinnervation by axotomized spinal motoneurons of denervated muscle in newborn rats[J]. *Exp Neurol*, 2003, 181(2): 190—203.
- [15] Rhrich-Haddout F, Kassar-Duchossoy L, Bauchet L. Alpha-motoneurons of the injured cervical spinal cord of the adult rat can reinnervate the biceps brachii muscle by regenerating axons through peripheral nerve bridges: combined ultrastructural and retrograde axonal tracing study [J]. *J Neurosci Res*, 2001, 64(5): 476—486.