

经皮电刺激对大鼠周围神经端侧吻合效果的影响

孙 乾, 曹群华, 祝 伟, 梅远东, 顾 晨

(常熟市第二人民医院手足外科, 江苏 常熟 215500)

【摘要】 目的 观察和探索经皮电刺激促进神经端侧吻合后神经再生的效果及其临床价值。**方法** 选取雄性 SD 大鼠 32 只, 随机分为正常对照组(A 组), 肌皮神经损伤后端端吻合至尺神经组(B 组), 肌皮神经损伤后端侧吻合至尺神经组(C 组), 肌皮神经损伤后端侧吻合至尺神经 + 术后经皮电刺激组(D 组)。观察各组大鼠患侧肢体的肌力恢复情况以及神经纤维的再生情况。**结果** C 组和 D 组大鼠振幅、传导速度低于 A 组, 潜伏期高于 A 组; 而 D 组大鼠振幅、传导速度低于 C 组, 潜伏期高于 C 组; B、C、D 三组大鼠肱二头肌湿重比以及肌纤维横截面积均低于 A 组, 且 C 组肌肉恢复最差; B、C、D 三组大鼠 NF-200 表达明显低于 A 组, D 组 NF-200 表达明显强于 C 组, 但仍显著少于 B 组, 差异均具有显著性($P < 0.05$)。电镜检查显示 B 组神经纤维髓鞘成熟, C 组以无髓神经纤维为主, 髓鞘成熟度差。D 组髓鞘增生情况较 C 组好转, 但仍有部分无髓神经纤维存在。**结论** 神经端侧吻合术后经皮电刺激能有效促进神经轴突再生以及延缓靶肌的失神经萎缩, 尽管较之神经端端吻合存在差距, 仍不失为临床修复周围神经损伤的有效方法之一。

【关键词】 电刺激; 端侧缝合; 神经

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 12-0073-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.12.013

Promoting effect of percutaneous electrical stimulation on nerve regeneration after end-to-side neurorrhaphy in rats

SUN Qian, CAO Qun-hua, ZHU Wei, MEI Yuan-dong, GU Chen

(Department of Hand and Foot Surgery, the Second People's Hospital of Changshou City, Changshu 215500, China)

【Abstract】 Objective To observe and explore the effect and clinical value of percutaneous electrical stimulation on nerve regeneration after end-to-side neurorrhaphy in rats. **Methods** Thirty-two SPF male S-D rats were randomly divided into four groups ($n = 8$): group A, the normal control group; group B, with end to end neurorrhaphy of musculocutaneous nerve injury matched to the ulnar nerve; group C, with end to side neurorrhaphy of musculocutaneous nerve injury matched to the ulnar group; and group D, with end to side neurorrhaphy of musculocutaneous nerve injury matched to the ulnar nerve plus postoperative transcutaneous electrical stimulation (30 min per day for 6 weeks). Electromyography, postoperational nerve conduction velocity, the histological and ultrastructural changes of the nerve fibers were examined, and NF-200 expression in frozen sections was observed using immunohistological staining, to assess the recovery of muscle strength of the diseased side limb and the neuroregeneration in the rats after treatment. **Results** The amplitude and conduction velocity of the groups C and D were lower than that of the group A, the latency was higher than that of the group A, while the amplitude and conduction velocity of the group D were lower than that of the group C,

and the latency was higher than that of the group C. The wet weight ratio of the biceps brachii muscle and the cross-sectional area of muscle fibers in the groups B, C and D were lower than those in the group A, and the recovery of muscle in the group C was the worst. The expression of NF-200 in the rats of groups B, C and D was significantly lower than that in the group A, and the expression of NF-200 in the group D was significantly higher than that in the group C, but still significantly less than that in the group B ($P < 0.05$). Electron microscopy showed mature myelinated fibers in the group B, whereas unmyelinated fibers were the main component and the myelin sheath was poorly developed in the group C. The myelin regeneration in the group D was better than that in the group C, but still some unmyelinated nerve fibers were seen. **Conclusions** The percutaneous electrical stimulation can effectively promote nerve axonal regeneration and can delay the atrophy of the target muscle after end-to-side neurorrhaphy. Though there is difference compared with the end-to-end neurorrhaphy, the end-to-side neurorrhaphy is still an effective method in clinical repair of peripheral nerve injury.

【Key words】 Rat; Peripheral nerve injury; End to side neurorrhaphy; End to end neurorrhaphy; Neuroregeneration; Electrical stimulation; Histology; Electron microscopy

周围神经长距离缺损一直是周围神经修复再生研究领域的难题,其中因暴力等因素导致的神经长段缺损通常无法直接缝合修复^[1]。临床上主要利用神经组织移植或神经移位术作为修复这类长距离损伤的主要手段,但实际上可供选择的移植神经或动力神经来源十分有限^[2]。尤其高平面周围神经损伤,由于受损神经近端难以利用,而神经再生距离较长、靶器官较远,使得直接修复无法完成,移位修复效果亦受到影响;为克服这种较为严重的损伤状况,临床上进行了各种尝试,其中神经端侧缝合是较早进入人们视线的一种术式^[3]。神经端侧吻合作为一种可行的治疗方法,其临床疗效一直存在争议,目前相关研究的进展相对主要局限于具体手术方式的改进。经皮肌电刺激可以让肌肉有节律地收缩,维持其正常活动,防止因长期失用导致的废用性萎缩;为受损神经的修复再生,以及传导功能的恢复提供宝贵时间和有利条件,上述观点已被不少临床研究所证实^[4,5]。通过神经端侧吻合术后经皮电刺激方法,提高神经端侧吻合术后神经的侧枝芽生,同时延缓失神经肌肉的萎缩,从而提升了神经端侧吻合修复神经损伤的手术疗效,并与神经端端吻合效果进行对比。观察和探讨经皮电刺激是否能有效提高神经端侧吻合的实际修复效果,为临床治疗长距离周围神经缺损特别是高平面周围神经损伤提供更多的参考和依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级雄性 SD 大鼠 32 只,体重(250 ± 15)g,7 周,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2012-0002]。所有大鼠在南通大学动物实验

中心[SYXK(苏)2007-0021]动物房常规喂养,随机分为 A 组(正常对照组),B 组(肌皮神经损伤后端端吻合至尺神经组),C 组(肌皮神经损伤后端侧吻合至尺神经组),D 组(肌皮神经损伤后端侧吻合至尺神经+术后经皮电刺激组),每组 8 只。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂和仪器

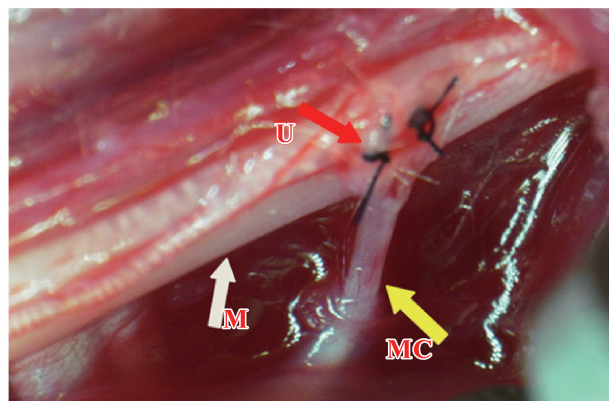
神经丝蛋白 200(NF200)抗体(武汉博士德生物工程有限公司,BM0100);耀洋康达 KT-90 A 型神经肌肉电刺激仪(北京耀洋康达医疗仪器有限公司,京食药监械(准)字 2014 第 2260208 号);海鲨 NDI-094C 型海神肌电图诱发电位仪(上海海神医疗电子仪器有限公司,粤食药监械(准)字 2011 第 2210110 号);宁波成和显微器械一套(宁波市成和显微器械厂);Philips CM-120 透射电镜(荷兰飞利浦公司);二甲苯、无水乙醇、95%、85%、75%乙醇、磷酸盐缓冲液(PBS)、苏木素伊红染色液等试剂(南京化学试剂一厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 手术方法

C 组与 D 组使用 10% 水合氯醛作为麻醉剂进行腹腔注射。动物深度麻醉后取右上肢纵形切口,充分游离和暴露尺神经、肌皮神经,钝性分离胸大肌、胸小肌,进一步解剖尺神经、肌皮神经至外、内侧束起始处;随后切除离起始段约 1.5 mm 处的尺神经外膜,同时切断肌皮神经起始段,并将其与尺神经外膜进行缝合,以 12-0 缝线缝合 3 针;伤口内撒入青霉素钠粉末用以预防感染,最后以 5-0 缝线常规逐层缝合关闭伤口(见图 1)。A 组完成神经游离显露后即关闭创面,作为实验假手术对照组。B 组将肌皮神经与尺神经进行端端吻合,其余操作与

C 组与 D 组相同。术后 1 周, D 组大鼠右侧上肢用 KT-90 A 神经肌肉电刺激仪(频率为 2 Hz, 波长 0.3 ms, 电流峰值 6~8 mA)给予经皮电刺激; 阳极置于右颈处, 阴极置于肱二头肌腹远端, 刺激部位预先备皮脱毛, 电极外敷导电糊后紧贴皮肤固定。成功进行经皮电刺激标准: 电刺激时右上肢出现明显二头肌收缩, 但动物无躁动及皮肤灼伤。经皮电刺激每日进行 1 次, 每次 30 min, 持续 6 周, 动物常规饲养至 13 周处死。



注: U: 尺神经; M: 正中神经; MC: 肌皮神经。

图 1 手术示意图

Note. U: Ulnar nerve; M: Median nerve; MC: Musculocutaneous nerve.

Fig. 1 Sketch map of the surgical operation

1.3.2 行为学评估及大体观察

术后每周观察各组大鼠患侧肢体肌力恢复情况。通过在大鼠头顶部皮肤手术侧滴加冰水, 观察大鼠是否出现反射性屈肘、抬高患肢和抓挠头顶等梳洗动作, 据此评估大鼠的屈肘功能恢复情况。另外, 通过二次手术肉眼大体观察吻合神经以及肱二头肌外观和形态。

1.3.3 电生理及组织学观察

术后通过肌电图检测肌皮神经传导速度(nerve conductive velocity, NCV)和肌复合动作电位(compound muscle action potentials, CMAPs)进行电生理学评估。术后 13 周, 室温下成功腹腔麻醉大鼠并称重, 术区常规备皮、消毒和铺巾。再次打开右上肢内侧纵形切口暴露肌皮神经, 小心分离神经旁增生黏连的结缔组织, 充分游离神经后, 进行复合肌动作电位的测定: 按 Suzuki 法把记录电极前上方 45° 插入靶肌肱二头肌中点 0.2 cm 深, 干扰电极放在分离皮肤上, 依次把电极放于肌皮神经断端吻合口远侧和近侧, 电击两次, 记录 CMAPs, 测量波幅。测量两次电极

刺激位置之间的距离 A(mm)及潜伏期差值 B(ms), A/B 即可以得到神经传导速度, 单位为 m/s。刺激参数: 频率 1.1 Hz, 波宽 0.2 ms, 刺激强度: 3.0 mA。

利用免疫组织化学染色观察神经组织结构, 抗神经丝蛋白-200(NF-200)染色特异性标记神经轴突以分析新生神经纤维再生轴突情况, NF-200 的阳性信号的多少反映再生神经轴突的数量。

分离完整的肱二头肌, 分析天平上称量其湿重, 湿重比 = (实验侧肌湿重/对侧肌湿重) × 100%。

取肱二头肌肌腹中部常规甲醛固定后行石蜡包埋切片, HE 染色后用数字图像分析法计算肱二头肌肌纤维横截面积, 评价各组大鼠神经纤维的再生情况以及肱二头肌萎缩和神经重支配状况。

取吻合口远端 2 mm 处神经组织标本, 常规戊二醛固定、脱水、树脂包埋、超薄切片、锇酸染色后利用透射电镜进行超微结构的观察。观察神经髓鞘再生成熟情况。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析, 实验数据以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 数据采用单因素(ANOVA)方差比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 行为学以及大体观察观察

各组大鼠术后切口愈合良好, 未发生感染, 各组大鼠梳洗试验患肢出现不同程度的活动受限; 2 周时大鼠患肢屈肘活动较差; 第 8 周时 B 组、C、D 出现好转。所有神经吻合口处均无神经瘤产生, 周缘无明显疤痕增生卡压等情况。C 组大鼠在第二次手术时可发现吻合口远端神经明显变细, 肱二头肌萎缩比较明显。B 组与 D 组神经大体无明显区别, 肱二头肌较 A 组轻度萎缩。

2.2 神经电生理

术后肌皮神经振幅、潜伏期、传导速度结果见表 1, C 组和 D 组大鼠振幅、传导速度低于 A 组, 潜伏期高于 A 组; 而 D 组大鼠振幅、传导速度低于 C 组, 潜伏期高于 C 组, 差异有显著性($P < 0.05$)。

2.3 肱二头肌湿重比及肌纤维横截面积

各组大鼠肱二头肌湿重比结果见表 2, 肌纤维横截面积结果见表 3, HE 染色结果见图 2。从结果以及图像中可见 B、C、D 三组大鼠肱二头肌湿重比以及肌纤维横截面积均低于 A 组, 且 C 组肌肉恢复最差, 差异有显著性($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠肌皮神经振幅、潜伏期、神经传导速度($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab.1 The amplitude, latency and nerve conduction velocity of the musculocutaneous nerve in the rats of each group			
组别 Groups	振幅/ mV Amplitude	潜伏期/ms Latency period	传导速度/m/s Conduction velocity
A	16.88 ± 3.13	0.91 ± 0.29	21.65 ± 2.14
B	14.04 ± 2.78	1.06 ± 0.34	19.02 ± 1.98
C	8.60 ± 2.21 *	1.48 ± 0.37 *	10.37 ± 1.78 *
D	11.35 ± 3.49 *#	1.19 ± 0.41 *#	14.85 ± 2.19 *#

注:与 A 组比较, * $P < 0.05$;与 C 组比较, # $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the group A, * $P < 0.05$. Compared with the group C, # $P < 0.05$.

表 2 各组大鼠肱二头肌肌湿重比($\bar{x} \pm s, n = 8, \%$)

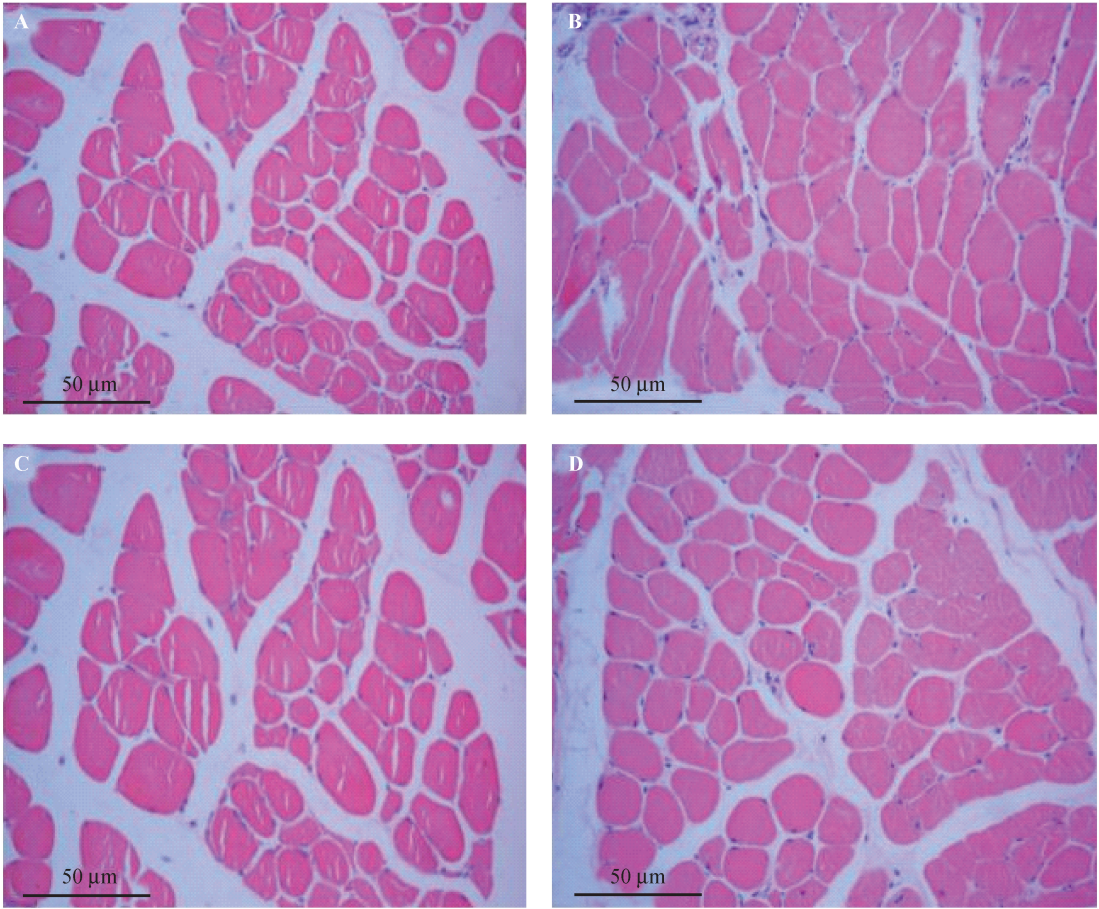
Tab.2 Wet weight ratio of biceps brachii muscle of the rats in each group	
组别 Groups	湿重比 Wet weight ratio
A	98.65 ± 3.70
B	88.27 ± 5.38 *#
C	72.34 ± 5.19 *
D	84.85 ± 4.36 *#

注:与 A 组比较, * $P < 0.05$;与 C 组比较, # $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the group A, * $P < 0.05$. Compared with the group C, # $P < 0.05$.

表 3 各组大鼠肱二头肌肌纤维横截面积($\bar{x} \pm s, n = 8, \mu\text{m}^2$)

Tab.3 Transverse sectional area of biceps brachii muscle fibers in the rats of each group	
组别 Groups	肌纤维横截面积 Cross-sectional area of muscle fibers
A	1254.46 ± 198.21
B	1078.79 ± 201.93 *#
C	874.29 ± 154.40 *
D	989.48 ± 179.40 *#

注:与 A 组比较, * $P < 0.05$;与 C 组比较, # $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the group A, * $P < 0.05$. Compared with the group C, # $P < 0.05$.



注: A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组。

图 2 肌纤维横截面积(HE × 200)

Note. A: group A. B: group B. C: group C. D: group D.

Fig.2 Cross-sectional area of muscle fibers. HE staining

2.4 新生神经纤维轴突增生情况

D 组 NF-200 阳性面积高于 C 组,但仍明显低于 B 组,见表 4。从表中可看出,D 组 NF-200 表达明显强于 C 组,但仍显著少于 B 组,经皮电刺激虽然能显著提高端侧吻合后神经轴突再生能力,但仍与传统的端端吻合有明显差距。

表 4 各组大鼠肌皮神经 NF-200 染色阳性的面积百分比 ($\bar{x} \pm s, n = 8, \%$)

Tab.4 Ratios of NF-200 positive staining in the musculocutaneous nerve fibers of rats in each group

组别 Groups	阳性面积 Positive area
A	6.39 ± 1.31
B	17.43 ± 1.62 **
C	8.47 ± 2.71 *
D	10.85 ± 1.79 **▲

注:与 A 组比较, * $P < 0.05$; 与 C 组比较, # $P < 0.05$; 与 B 组比较, ▲ $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the group A, * $P < 0.05$. Compared with the group C, # $P < 0.05$. Compared with the group B, ▲ $P < 0.05$.

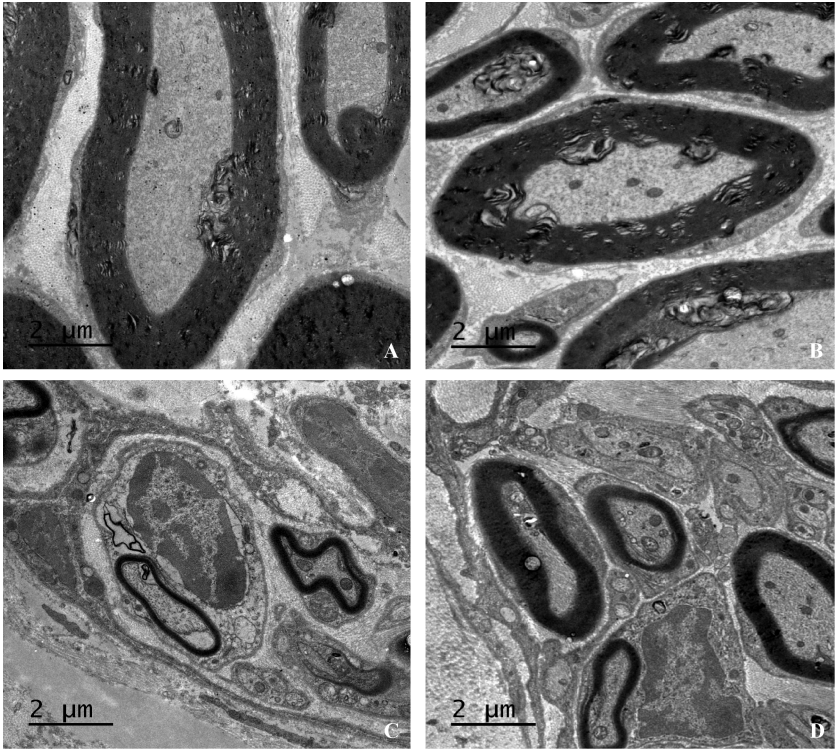
2.5 电镜结果

电镜检查显示 B 组神经轴突结构发育良好,神经中丝、微管与线粒体较丰富,神经纤维髓鞘成熟; C 组雪旺细胞增生活跃,可见到新生的轴突及其散

在分布、薄而不整的髓鞘,部分髓鞘形成同心圆板层结构;D 组有明显的神经束结构,髓鞘厚度接近正常。电镜检查显示 B 组神经纤维髓鞘成熟,C 组以无髓神经纤维为主,髓鞘成熟度差。D 组髓鞘增生情况较 C 组好转,但仍有部分无髓神经纤维存在。

3 讨论

神经端侧吻合给临床修复长段周围神经缺损尤其高位神经损伤提供了一个可能的解决方法,但是神经端侧缝合和端端缝合修复结果是否等效,实验结果是否代表临床治疗效果,仍存在广泛的争论^[6,7]。研究表明,端侧缝合可以达到端端缝合神经再生能力的约 76% ~ 80%,为正常的 55% ~ 70%^[8,9]。另一些实验结果却恰恰相反,神经端侧吻合后侧枝萌出神经纤维数量极少^[10,11]。结果显示,神经端侧吻合术后,主干神经确有侧枝萌出通过吻合口长入肌皮神经,但与神经端端吻合相比有明显差距。神经丝蛋白(NF)是构成神经细胞轴突中间丝的蛋白质,常作为轴突特异性标志之一,主要由 NF-L、NF-M、NL-H 三种特定的蛋白亚基组装而成,为神经纤维提供弹性防止断裂^[12]。NF-200



注:A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组。

图 3 电镜检查结果(×6000)

Note. A: group A. B: group B. C: group C. D: group D.

Fig.3 Ultrastructural changes of the nerve fibers

表达水平可间接反映神经轴突损伤再生程度;其表达越强,表示神经纤维越多,说明神经再生良好^[13,14]。实验结果表明,B 组 NF-200 表达明显强于 C 组,其结果有显著性差异,证明端端吻合术后神经轴突的恢复效果明显优于端侧吻合,这与之前的一些报道相一致。通过电镜进行再生神经组织的超微结构观察,可以看出 C 组神经髓鞘结构不完整,神经纤维髓鞘成熟度差,见部分无髓神经纤维。组织学的差距相应反应到实际生理功能,导致 C 组电生理指标也与 B 组有明显差距。综合所有观察指标,神经端侧吻合术后确有神经侧枝萌出,但实际的效果仍与端端吻合存在一定差距。

多年来,国内外学者通过大量的研究,已经证实了电刺激的促进神经再生作用^[15]。研究采用更容易在临床中实践应用的经皮电刺激方法,通过组织学以及电生理等技术手段检测,结果显示经皮电刺激能有效促进端侧吻合后侧枝神经萌出,促进侧枝神经萌出后的髓鞘成熟,但其与神经端端吻合的再生结果相比仍有一定差距。同时,经皮电刺激能显著缓解肌肉的失神经性萎缩,经皮电刺激组术后的肱二头肌组织学指标与端端吻合组无明显差异,证实经皮电刺激在防止失神经性肌肉萎缩方面作用较大,从而为神经对于靶肌的再支配创造有利条件。因此,提高神经端侧吻合的实际临床修复效果,侧重点在于努力提高神经侧枝萌出数量,提高侧枝萌出后神经纤维髓鞘的成熟度;可以考虑经皮电刺激的基础上,通过改善神经吻合技术、改善局部神经再生微环境等途径进一步提高神经端侧吻合后侧枝萌出的效率,配合电刺激对靶肌萎缩的保护作用,不失为一个有价值的临床周围神经损伤修复的选择。

参考文献:

- [1] 孙宇楠, 李二平, 董世芬, 等. 实验性糖尿病周围神经病变大鼠模型的步态行为分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(12): 14-19.
- [2] 华飞, 陈冬萍. 经皮电刺激在周围神经损伤中的临床应用 [J]. 现代实用医学, 2014, 26(2): 169-170.
- [3] Alrashdan MS, Park JC, Sung MA, et al. Thirty minutes of low intensity electrical stimulation promotes nerve regeneration after sciatic nerve crush injury in a rat model [J]. Acta Neurol Belg, 2010, 110(2): 168-179.
- [4] 邱海胜, 林嘉豪, 缪道一, 等. 经皮电刺激促进腓总神经损伤后神经再生的临床研究 [J]. 浙江创伤外科, 2012, 17(1): 16-18.
- [5] 贾英伟, 段王平, 梁炳生, 等. 不同吻合面积影响神经端侧吻合修复效果的实验研究 [J]. 实用骨科杂志, 2013, 19(5): 429-431.
- [6] 贾英伟, 韦健, 梁炳生, 等. 外束膜开窗影响神经端侧吻合修复效果的实验研究 [J]. 山西医科大学学报, 2013, 44(6): 439-442.
- [7] 王煜, 闵祥辉, 张勤, 等. 骨髓间充质干细胞对大鼠周围神经端侧吻合后神经再生的影响 [J]. 中国医学工程, 2014, 22(12): 5-6.
- [8] Goheen-Robillard B, Myckatyn TM, Mackinnon SE, et al. End-to-side neurorrhaphy and lateral axonal sprouting in a long graft rat model [J]. Laryngoscope, 2002, 112(5): 899-905.
- [9] Cederna PS, Kalliaianen LK, Urbanchek MG, et al. "Donor" muscle structure and function after end-to-side neurorrhaphy [J]. Plast Reconstr Surg, 2001, 107(3): 789-796.
- [10] 王瑜, 陈小刚, 李兵, 等. 利用端侧神经吻合方法建立人工体神经-内脏神经反射弧的实验研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(3): 19-22.
- [11] 董传江, 谢宗兰, 张路生, 等. 内脏神经-体神经端侧吻合与端端吻合修复膀胱功能的比较 [J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(6): 1461-1463.
- [12] 王一兵, 何剪太, 冯永强, 等. 蛋白基因产物 9.5 与神经丝蛋白标记瘢痕神经效果的比较 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2010, 28(3): 327-329.
- [13] 杨立民, 李秀华, 张基仁, 等. 吻合口位置对周围神经端侧吻合术后神经再生的影响 [J]. 山东医药, 2011, 51(26): 26-28.
- [14] Cavalcante Miranda de Assis CD, Martins Lima Ê, Teixeira Goes B, et al. The parameters of transcutaneous electrical nerve stimulation are critical to its regenerative effects when applied just after a sciatic crush lesion in mice [J]. Biomed Res Int 2015, 2014(7): 1-8.
- [15] Maciel FO, Viterbo F, Chinaque Lde F, et al. Effect of electrical stimulation of the cranial tibial muscle after end-to-side neurorrhaphy of the peroneal nerve in rats [J]. Acta Cir Bras, 2013, 28(1): 39-47.

[收稿日期]2017-04-07