

大鼠坐骨神经切断后足底皮肤血流灌注变化研究

沈钟一¹, 顾天文¹, 胡文^{2*}

(¹南通大学医学院, ²江苏省神经再生重点实验室, 江苏 南通 226001)

[摘要] 目的:了解周围神经损伤后患区皮肤血流灌注的动态变化及其与神经传导功能和轴突溃变状况之间的关系。方法:建立大鼠坐骨神经切断模型,应用激光多普勒血流灌注成像动态分析足底血流变化,分别采用腓肠肌复合肌动作电位(CMAP)检测和免疫组织化学染色分析损伤远侧神经传导功能变化和轴突溃变情况。结果:坐骨神经切断后相应足底皮肤血流灌注急剧增高,高灌注状态在损伤后 3 d 内恢复到接近正常;神经切断后 24 h 刺激损伤远侧段神经记录的腓肠肌 CMAP 波幅减小 95% 以上;损伤后 4 d 远侧神经段内绝大部分轴突已溃变清除。结论:大鼠神经切断后患区皮肤血流呈高灌注状态且在损伤后 3 d 内逐渐恢复到正常水平,这种高灌注状态可能不依赖于远侧段神经冲动传导功能的保持,但与轴突溃变状态相关。

[关键词] 周围神经;神经切断伤;皮肤血流灌注;神经传导;瓦勒变性;大鼠

[中图分类号] R338.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)06-779-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130612

Time-lapse LDPI analysis of skin territory following sciatic nerve transection in rats

Shen Zhongyi¹, Gu Tianwen¹, Hu Wen^{2*}

(¹School of Medicine, ²Jiangsu Key Laboratory of Neuroregeneration, Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** This study was performed to figure out how dermal blood flow changed in skin territory following peripheral nerve injury, and to determine whether this change correlated to alteration of excitability/conductivity or axonal degeneration of the nerve distal to injury. **Methods:** Skin blood flow was monitored by time-lapse laser Doppler perfusion imaging (LDPI) in a rat model of sciatic nerve transection injury. Meanwhile, compound muscle action potentials (CMAPs) were recorded in gastrocnemius muscle by applying electrical stimuli to the nerve distal to injury, and the distal nerve was immunostained for neurofilament-200 and S-100 protein. **Results:** Sciatic nerve transection led to an immediate and robust increase of blood perfusion, which recovered to normal extent in 3 days post-injury, in the ipsilateral hind paw. In 24 h after injury, CMAP amplitude reduced more than 95% in gastrocnemius muscle upon stimulating the nerve distal to injury. However, the majority of axons were seen to degenerate in the distal nerve after 4 days. **Conclusion:** Blood perfusion increase in skin territory, resulted from the sciatic nerve transection, was gradually recovered to normal in 3 days post-injury. Although there seemed a correlation between dermal perfusion increase and axonal degeneration, the maintenance of axonal excitability in the distal nerve did not necessarily correlate to increase of skin blood perfusion.

[Key words] peripheral nerves; nerve transection injury; dermal blood perfusion; nerve excitability; wallerian degeneration; rats

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(6): 779-783]

作为一种常见临床病症,周围神经损伤除造成患者受损神经支配区运动、感觉功能障碍外,还会出现患区植物神经功能障碍,表现为患区皮肤汗腺、皮

脂腺分泌功能障碍,皮肤干燥、粗糙、无光泽^[1]。周围神经损伤后的另一个突出症状是患区对冷异常敏感,患者正常皮肤能耐受的冷刺激会引起患区皮肤疼痛不适,影响患者生活质量,其机制不明,据推测可能与患区皮肤血管运动调节功能失常有关^[2]。临床研究显示,人上肢神经完全断裂损伤后患区皮肤呈低血流灌注状态^[3]。作为研究神经损伤后血管运动调节变化的动物模型,大鼠坐骨神经损伤后出现

[基金项目] 国家自然科学基金(81100939);江苏省高校“青蓝工程”项目;江苏省高校大学生实践创新训练计划项目(2011-848)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: hoo@ntu.edu.cn

足部血流灌注水平急剧增高^[4],这一现象似乎与上述临床观察结果不一致。那么,大鼠神经损伤后患区皮肤血流灌注的动态变化如何?受哪些因素影响?这些问题是探讨神经损伤后患区皮肤血管运动调节变化需要回答的问题,但迄今未见相关报道。鉴于此,本研究采用大鼠坐骨神经切断模型,应用激光多普勒血流灌注成像(LDPI)技术分析损伤后足部血流灌注的动态变化,并采用电生理学方法和免疫组织化学染色等分析损伤远侧段神经传导功能变化和溃变情况,初步探讨大鼠神经缺损后患区皮肤基础血流灌注变化规律。

1 材料和方法

1.1 材料

实验选用 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 21 只,体重 180~200 g,由南通大学实验动物中心提供,动物实验与实验动物福利保护符合有关规定。

小鼠抗 neurofilament-200 (NF-200) 单克隆抗体、兔抗 S-100 多克隆抗体、FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 和 TRITC 标记的羊抗兔 IgG (Sigma 公司,美国)。正常羊血清和 poly-L-lysine(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 神经手术

大鼠以复合麻醉剂(4.25% W/V 水合氯醛、2.12% W/V 硫酸镁、0.886% W/V 戊巴比妥钠、14.25% V/V 乙醇、33.8% V/V 丙二醇)腹腔注射麻醉(剂量 2.5 ml/kg 体重)。麻醉成功后,按右侧卧位置于手术台上,剪净左股后外侧鼠毛,常规消毒铺洞巾。在大腿后外侧沿股骨方向纵行切开皮肤,沿肌间隙钝性分离暴露左侧坐骨神经,在坐骨切迹远侧 5 mm 处切断坐骨神经,以 5/0 尼龙线分别结扎两侧断端,并将近侧神经断端埋植于股二头肌中,防止再生神经纤维长入远侧神经内。大鼠分 3 组,分别用于 LDPI 检测($n=6$)、电生理学检测($n=6$)和免疫组织化学染色分析($n=9$)。

1.2.2 LDPI 检测

对于 LDPI 检测的 6 只大鼠,从当天(术后 15 min)开始,每天采用 PeriScan PIM 3 激光多普勒血流灌注成像系统(Perimed AB 公司,意大利)测定双后肢基础血流灌注水平。检测在(25.0 ± 0.5)℃、相对湿度 60%左右的环境条件下进行。大鼠麻醉成功后,俯卧于专用绿色软垫上,使其双后足底朝上且左右对称,激光发射/探测器距鼠足 23 cm 左右。扫描参

数设定为:扫描模式 single scan,分辨率 low,范围 60 ± 25。在灰度图上划定整个足为感兴趣区域,软件自动算出相应区域灌注值,以灌注单位表示。

1.2.3 电生理学检测

对于电生理学检测的 6 只大鼠,于切断神经前及神经损伤后 0.5、24、48、72 h,采用 Keypoint 便携式肌电图仪(Dantec 公司,丹麦)进行电生理学检测,刺激损伤远侧坐骨神经记录腓肠肌复合肌动作电位(CMAP),分析损伤远侧神经的传导功能。麻醉下重新暴露坐骨神经,双极同芯针电极插入术侧腓肠肌肌腹中部,用双极钩电极刺激损伤远侧坐骨神经,记录腓肠肌 CMAP。刺激强度为 0.5 mA,术后 48、72 h 分别增加到 1 mA 和 5 mA。同时测定健侧(右侧)神经电生理情况,作为正常神经对照。

1.2.4 免疫组织化学染色

术后 1、4、9 d(各 3 只大鼠),动物深度麻醉,常规经心脏依次灌注生理盐水和 4%多聚甲醛后,切取远侧神经段,浸入 4%多聚甲醛溶液中 4℃后固定过夜,取健侧坐骨神经作为正常神经对照。标本依次浸入 10%、20%、30%梯度蔗糖溶液中脱水,恒冷冻纵切,片厚 10 μm,贴于预涂 10% poly-L-lysine 的载玻片上,室温干燥后进行抗 NF-200 和抗 S-100 免疫荧光双标染色。免疫组织化学染色采用常规间接法,第一抗体用小鼠抗 NF-200 和兔抗 S-100(终浓度均为 1:400),第二抗体用 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 和 TRITC 标记的羊抗兔 IgG(终浓度均为 1:200),抗体孵育采用 4℃过夜。染色后,用激光扫描共聚焦显微镜(Leica 公司,德国)观察并扫描成像。

1.3 统计学方法

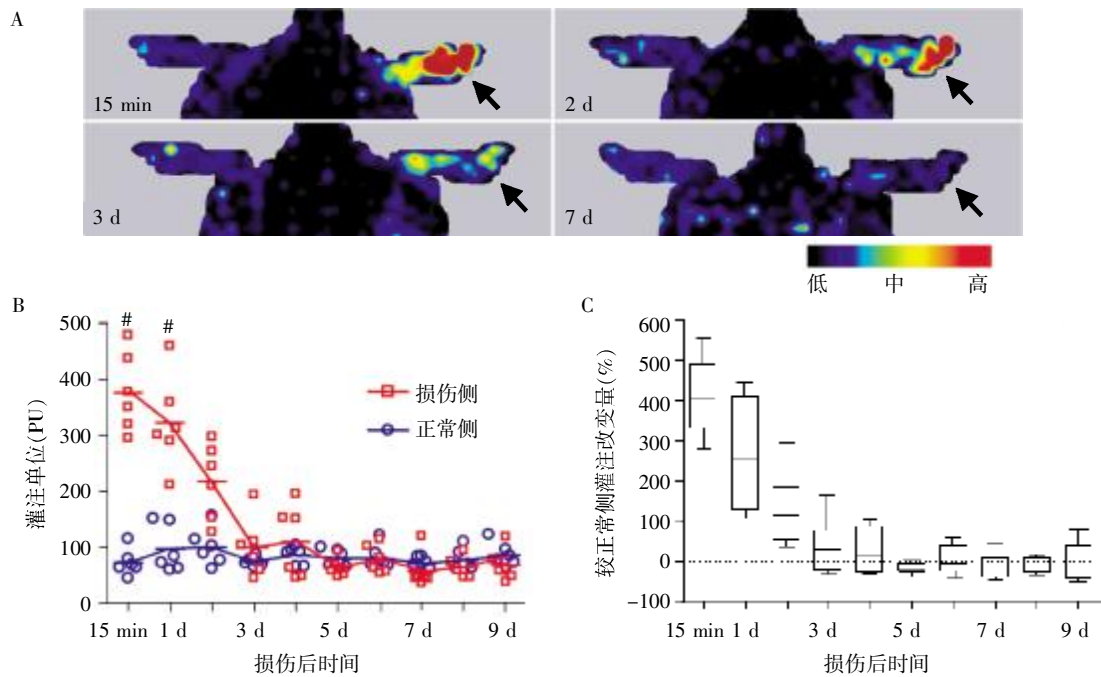
采用 GraphPad Prism 4.0 统计分析软件进行数据分析。血流灌注检测数据采用方差分析结合 Bonferroni 两两比较,不同时间点电生理学检测数据采用单因素方差分析结合 Student-Neuman-Keuls 两两比较。 $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 足底血流灌注变化

坐骨神经切断术后每天进行 LDPI 检测,分析大鼠足部基础血流灌注变化,结果显示,术后 15 min 足部血流灌注显著增高,平均增高到正常侧的 5 倍左右,术后 3 d 内迅速下降,术后 3 d(即第 4 天)恢复到接近正常(与正常侧相比 $P > 0.05$),此后在历时 9 d 的观察期一直处于正常水平(图 1)。

2.2 远侧神经传导功能变化



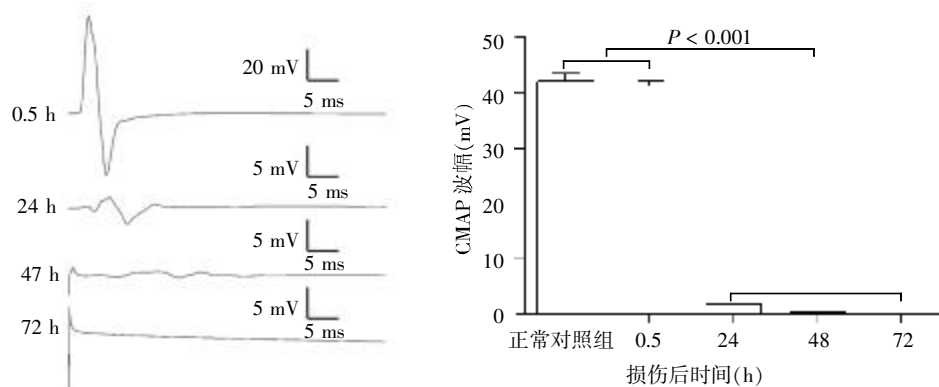
A: 术后不同时间的代表性灌注图(箭头所指为损伤侧);B: 双侧足血流灌注量比较,与正常侧相比,* $P < 0.001$;C: 术侧与正常侧相比血流灌注变化百分比。

图 1 激光多普勒血流灌注成像检测大鼠坐骨神经切断后足部血流变化

Figure 1 Blood perfusion change in hind paws after sciatic nerve transection as assessed by laser Doppler perfusion imaging

于大鼠坐骨神经切断术后不同时间刺激远侧段神经记录腓肠肌 CMAP, 结果显示术后 30 min CMAP 与正常侧相比无明显变化;术后 24 h 虽然还

能记录到 CMAP, 但波幅甚小, 仅为正常侧的 4% 左右, 且潜伏期明显延长; 术后第 3 天开始刺激远侧神经无法再引出 CMAP (图 2)。



A: 术后不同时间的代表性 CMAP 曲线;B: CMAP 波幅比较。

图 2 大鼠坐骨神经切断后远侧段神经电生理传导检测

Figure 2 Compound muscle action potentials (CMAPs) recorded by stimulating the nerve distal to injury after sciatic nerve transection

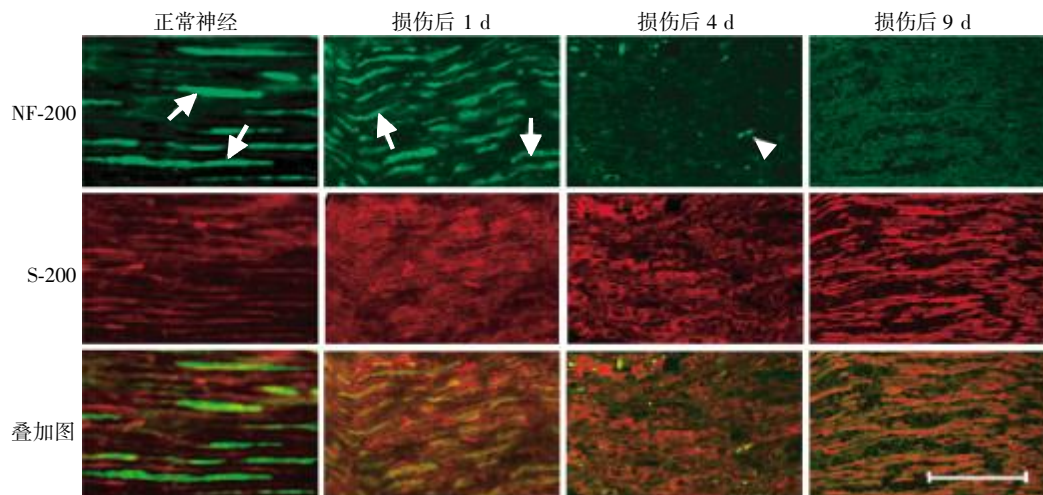
2.3 远侧神经的变性

免疫荧光组织化学染色结果显示, 术后 1 d, 损伤远侧神经内见丰富的 NF-200 染色阳性轴突, 但其连续性欠佳; 术后 4 d 时轴突将近完全变性, 仅见少量残存的变性轴突(图 3)。术后 9 d, 损伤远侧神经内可见大量增生的 S-100 阳性施旺细胞, 但未见

任何 NF-200 染色阳性结构(图 3)。

3 讨论

局部皮肤血管运动调节(舒张/收缩)具有重要的生理意义, 有利于恒温动物调节体表和肢端血流量来维持机体核心温度的恒定, 还有利于防止严寒



有尾箭头示轴突,无尾箭头示残存的轴突。Bar=60 μm 。

图3 大鼠坐骨神经切断后不同时间远侧段神经抗NF-200和抗S-100免疫荧光双标染色

Figure 3 Immunohistochemical staining for neurofilament-200 and S-100 showing axonal degeneration of the nerve distal to transection after injury

条件下肢体的冻伤^[5-7]。皮肤微血管调节的机制之一是神经调节,参与的神经纤维包括分布于皮肤中的C传入纤维和交感神经节后纤维^[7-8],前者可释放降钙素基因相关肽、P物质、神经激肽A等,而交感纤维可释放去甲肾上腺素、神经肽Y等神经递质和调质^[5]。降钙素基因相关肽、P物质是介导神经性炎症的主要神经肽,前者可致血管扩张,后者导致血管通透性增高进而引起渗出和组织水肿^[9]。交感纤维释放的去甲肾上腺素、神经肽Y等可导致皮肤血管收缩^[5]。本研究通过激光多普勒血流灌注成像显示,大鼠坐骨神经切断后足部皮肤基础灌注急剧增加,这一血管扩张效应可能与损伤远侧段神经中C传入纤维释放舒血管性神经肽以及交感紧张性丧失有关^[5]。神经切断后患区皮肤基础血流高灌注状态维持时间较短,损伤后3 d时基本恢复正常,这可能与远侧段C传入纤维内贮存的神肽耗竭或者纤维变性有关。

有研究显示人周围神经损伤后远侧段神经纤维兴奋性可维持数天^[10],而本研究通过刺激损伤远侧神经记录腓肠肌CMAP反映远侧残存神经的电生理传导功能,结果显示损伤远侧段神经纤维的兴奋性和传导性在1 d内迅速减退,术后24 h CMAP波幅降低95%以上,术后48 h腓肠肌CMAP已无法引出,这与文献报道相似^[11]。Moldovan等^[12]研究表明,小鼠神经损伤后远侧段运动神经纤维在溃变之前兴奋性即出现进行性下降,兴奋性维持时间不到1 d。本研究结果表明大鼠坐骨神经切断后,患区皮肤血流高灌注状态较远侧段神经电生理活性的

维持时间长,提示患区皮肤局部血管扩张可能不完全依赖于受损神经轴突内舒血管性神经肽的主动释放。

本研究表明,大鼠坐骨神经切断1 d时远侧神经NF-200染色轴突连续性欠佳,损伤后4 d远侧段神经轴突大部分溃变清除,仅残存少量轴突碎片,损伤后9 d溃变轴突已全部清除,这与文献报道相似^[13-14]。最近有学者认为,周围神经损伤后远侧段瓦勒变性是机体应对神经损伤的一种固有免疫机制,而C纤维就是将神经、免疫和炎症联系起来的一种途径^[9,15]。本实验结果提示神经切断后患区皮肤血管扩张可能与损伤远侧段轴突的完整性有关,这有待于采用瓦勒变性延迟的转基因动物如C57BL/Wlds小鼠^[16]、表达Ube4b/Nmnat1嵌合基因的大鼠^[17]来进一步研究探讨。

综上所述,本研究结果表明,大鼠神经切断后患区皮肤血流呈高灌注状态且在损伤后3 d内逐渐恢复到正常水平,这种高灌注状态可能不依赖于远侧段神经冲动传导功能的保持,但与轴突溃变状态相关。本研究为探讨周围神经损伤后患区皮肤血管运动调节变化及其影响因素提供了科学依据。

致谢:感谢顾晓松教授对本研究的指导,王亚先老师协助完成电生理学检测,在此谨表衷心感谢。

[参考文献]

- [1] Gu J, Hu W, Deng A, et al. Surgical repair of a 30 mm long human median nerve defect in the distal forearm by implantation of a chitosan-PGA nerve guidance conduit [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012, 6(2): 163-168

- [2] Lundborg G, Rosen B, Dahlin L, et al. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm; a 5-year follow-up[J]. *J Hand Surg*, 2004, 29(2): 100-107
- [3] 顾晨, 胡文, 邓爱东, 等. 成人腕部正中神经断裂后靶皮肤血流灌注的初步研究[J]. *南通大学学报: 医学版*, 2012, 32(3): 177-179
- [4] Hu W, Yang M, Chang J, et al. Laser doppler perfusion imaging of skin territory to reflect autonomic functional recovery following sciatic nerve autografting repair in rats [J]. *Microsurgery*, 2012, 32(2): 136-143
- [5] Charkoudian N. Skin blood flow in adult human thermoregulation; how it works, when it does not, and why [J]. *Mayo Clin Proc*, 2003, 78(5): 603-612
- [6] Kusters FJ, Walbeehm ET, Niehof SP. Neural influence on cold induced vasodilatation using a new set-up for bilateral measurement in the rat hind limb [J]. *J Neurosci Methods*, 2010, 193(1): 100-105
- [7] Wasner G, Schattschneider J, Heckmann K, et al. Vascular abnormalities in reflex sympathetic dystrophy (CRPS I): mechanisms and diagnostic value [J]. *Brain*, 2001, 124(Pt 3): 587-599
- [8] Hornyak ME, Naver HK, Rydenhag B, et al. Sympathetic activity influences the vascular axon reflex in the skin [J]. *Acta Physiol Scand*, 1990, 139(1): 77-84
- [9] Chiu IM, von Hehn CA, Woolf CJ. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology [J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15(8): 1063-1067
- [10] Chaudhry V, Cornblath DR. Wallerian degeneration in human nerves; serial electrophysiological studies [J]. *Muscle Nerve*, 1992, 15(6): 687-693
- [11] Bendszus M, Wessig C, Solymosi L, et al. MRI of peripheral nerve degeneration and regeneration; correlation with electrophysiology and histology [J]. *Exp Neurol*, 2004, 188(1): 171-177
- [12] Moldovan M, Alvarez S, Krarup C. Motor axon excitability during Wallerian degeneration [J]. *Brain*, 2009, 132(Pt 2): 511-523
- [13] Hashimoto T, Suzuki Y, Kitada M, et al. Peripheral nerve regeneration through alginate gel; analysis of early outgrowth and late increase in diameter of regenerating axons [J]. *Exp Brain Res*, 2002, 146(3): 356-368
- [14] Pan YA, Misgeld T, Lichtman JW, et al. Effects of neurotoxic and neuroprotective agents on peripheral nerve regeneration assayed by time-lapse imaging in vivo [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(36): 11479-11488
- [15] Rotshenker S. Wallerian degeneration; the innate-immune response to traumatic nerve injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8: 109
- [16] Mi W, Beirowski B, Gillingwater TH, et al. The slow Wallerian degeneration gene, WldS, inhibits axonal spheroid pathology in gracile axonal dystrophy mice [J]. *Brain*, 2005, 128(Pt 2): 405-416
- [17] Adalbert R, Gillingwater TH, Haley JE, et al. A rat model of slow Wallerian degeneration (WldS) with improved preservation of neuromuscular synapses [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 21(1): 271-277

[收稿日期] 2013-03-17

欢迎投稿 欢迎订阅