

技术方法

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.04.014

不同温度下含川芎嗪 UW 液保存对异体神经再生影响的实验研究

钟 建, 阳明明, 蒋电明

(重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨不同温度对含川芎嗪 UW 液保存的大鼠异体神经再生的影响。**方法:**取 3 月龄雄性清洁级成年健康 Wistar 大鼠 60 只, 体重 200~250 g, 随机分为 A、B、C、D、E 组 5 组 ($n=12$) ; 取 3 月龄雄性清洁级成年 SD 大鼠 18 只, 体重 200~250 g, 切取双侧坐骨神经干约 15 mm, 于 4 °C、-20 °C、-80 °C 下, 用含川芎嗪的 UW 液保存 4 周后, 作为 A、B、C 组神经修复供体。D 组为新鲜异体神经移植组; E 组为新鲜自体神经移植组。术后 4、8、12 周行大体观察, 术后 12 周行电生理检测, 光镜、电镜观察神经再生情况。**结果:**术后 12 周腓肠肌湿重、电生理检测, A、E 两组优于其他组, A、E 两组结果相近, 但组间有统计学意义 ($P < 0.05$) ; 术后 12 周, A、E 组组织形态学观察结果相似。**结论:**同种异体神经在 4 °C 条件下经含川芎嗪的神经保存液保存可改善神经再生效果。

【关键词】温度; 川芎嗪; 神经移植; 再生**【中国图书分类法分类号】**R651.3; R622.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2011-10-16

Experimental study of the effects of different temperatures on the regeneration of allogeneic nerves preserved in UW solution with Tetramethylpyrazine

ZHONG Jian, YANG Mingming, JIANG Dianming

(Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective:* To investigate the effects of different temperatures on the regeneration of allogeneic nerves of rats preserved in UW solution with Tetramethylpyrazine (TMP). *Methods:* Totally 60 Wistar rats (male, weighing 200~250 g) were divided into five groups randomly (groups A, B, C, D and E, $n=12$). The sciatic nerve trunks of 18 SD rats (male, weighing 200~250 g) were incised at about 15 mm and were preserved in UW solution with TMP at different temperatures (group A: 4 °C, group B: -20 °C, group C: -80 °C) for four weeks to repair the sciatic nerve defect of SD rats. Group D was allogeneic nerve graft group and Group E was autologous nerve graft group. General observation was performed at 4, 8, 12 weeks postoperatively while electrophysiological check, light and electron microscope check were conducted at 12 weeks postoperatively. *Results:* The results of A, E groups in the electrophysiological test and gastrocnemius weight test were better than those of the other groups, however, statistical differences were observed between group A and E ($P < 0.05$). Group A and E displayed similar results in morphology at 12 weeks after the operation. *Conclusion:* The regeneration of allogeneic nerves preserved in UW solution with TMP at 4 °C can be improved.

【Key words】temperature; Tetramethylpyrazine; allogeneic nerve; regeneration

自体神经移植是治疗周围神经损伤的金标准, 却有其不利之处, 如来源有限、造成相应供区的功能障碍等^[1]。而在修复长段周围神经缺损时, 同种异体神经可作为传统自体神经移植有效的替代物^[2]。但受体对供体神经的免疫排斥反应会极大影响其移植效果。深低温冷冻保存方法较为繁琐且要求较

高, 不利于临床应用。为简化保存条件, 以期更利于临床应用, 本实验进一步探讨温度对神经再生的影响。通过建立大鼠同种异体坐骨神经移植模型, 观察经川芎嗪预处理的供体神经在不同温度下保存后的移植效果, 探讨在不同温度下经川芎嗪预处理后对异体神经移植再生的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

供体为成年健康雄性 SD 大鼠, 受体为成年健康雄性

作者介绍:钟 建(1985-), 男, 硕士,**研究方向:**周围神经损伤。**通信作者:**蒋电明, 男, 教授, Email:jdm571026@vip.163.com。**基金项目:**重庆市卫生局资助项目(编号:渝中医[2009]64号, 2009-1-10)。

Wistar 大鼠, 体重为 200~250 g(重庆医科大学实验动物中心提供)。受体大鼠随机分为 A、B、C、D、E 组, 每组 12 只, A、B、C 组分别为在 4 °C、-20 °C、-80 °C 下异体神经经川芎嗪预处理后移植组, D 组为新鲜异体神经移植组; E 组为新鲜自体神经移植组。

1.2 主要试剂及仪器

盐酸川芎嗪注射液(北京市燕京药业有限公司); UW 液(美国 Bristol-Myers squibb 公司); 二甲亚砜(Sigma 公司); 双目显微镜(日本奥林巴斯公司); 肌电图仪 HITACHI-2000(日本日立公司); 透射电镜(日本 Hitachi 公司)。

1.3 神经保存液的配制

川芎嗪溶于二甲亚砜(<0.1%)后, 加入 UW 液中, 配备成含川芎嗪浓度为 200 mg/L 的 UW 液, 即用即配。

1.4 供体神经获取方法

以 10% 水合氯醛腹腔麻醉、脱毛, 常规消毒铺巾, 取股后外侧纵行切口, 于肌间隙钝性分离, 拉钩牵开两侧肌肉, 暴露坐骨神经, 于无菌条件下距梨状肌下缘 5 mm 处游离并切取双侧坐骨神经干约 15 mm, 生理盐水冲洗后随机置入神经保存液中, 分别在 4 °C、-20 °C、-80 °C 下保存 4 周(分别为 A、B、C 组)。

1.5 建立动物模型

操作步骤同上, 暴露受体大鼠右侧坐骨神经, 于无菌条件下距梨状肌下缘 5 mm 处整齐切除大鼠部分坐骨神经, 造成 10 mm 缺损, 将保存的供体神经修成 10 mm 长, 于手术显微镜下以 11-0 尼龙线缝合神经外膜 4~6 针, D 组为切取新鲜 Wistar 大鼠坐骨神经后立即移植于 SD 大鼠神经缺损处, E 组将坐骨神经切断后立即原位移植。术后 3 d 抗生素预防感染, 各组分笼饲养。

1.6 检测指标

1.6.1 大体观察 术后 4、8、12 周观察实验动物术后肢体功能情况及足底溃疡情况, 术后 12 周取材时观察移植物的肿胀情况及与周围组织粘连情况。

1.6.2 神经电生理检测 移植术后 12 周, 每组随机取 8 只大鼠, 待麻醉后显露坐骨神经, 刺激电极放置于近端吻合口以近约 2 mm 处, 接收电极放置于远端吻合口以远约 2 mm 处, 地线放置于两电极之间的股二头肌, 测定神经动作电位潜伏期和传导速度。

1.6.3 组织学检测 术后 12 周电生理检测后, 每组随机取 8 只大鼠移植神经段, 行 HE 染色, 观察炎性细胞浸润情况及神经结构形态改变。术后 12 周电生理检测后, 每组随机取 4 只大鼠透射电镜观察再生神经超微结构。

1.6.4 胫肠肌湿重 术后 12 周, 取每组大鼠胫肠肌后立刻称重, 观察胫肠肌萎缩情况。

1.7 统计学方法

采用 SAS 9.13 软件对数据进行分析, 各组数据均符合正态性, 但是方差不齐, 因此用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)的方式描述各组数据, 采用秩和检验 wilcoxon 法并利用秩次进行 SNK 法两两比较, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大体观察

术后 4 周每组动物均出现右后肢功能障碍及患肢肿胀,

尤以 D 组肿胀为重, A 组及 E 组肿胀最轻, 患肢拖行、足趾并拢。C 组有 2 只, D 组有 4 只大鼠出现足底溃疡, 尤以 D 组溃疡面积较广; 术后 8 周 A、B、E 组动物跛行减轻, C 组跛行较前稍改善, D 组跛行无明显改变。C 组足底溃疡愈合, 溃疡处局部皮肤发红, D 组足底溃疡面积较前稍缩小; 术后 12 周 A、E 组部分恢复四足行走, B、C 组跛行明显改善, D 组跛行仍无明显改变, D 组仍部分残存足底溃疡。术后 12 周观察发现 A、E 组移植段神经与周围组织粘连较轻, 稍分离后即取出。D 组移植神经肿胀明显, 粘连严重, 不易分离。

2.2 神经电生理检测

术后 12 周, 各组动作电位潜伏期及传导速度以 E 组最高, A 组次之, E 组与 A 组间有统计学差异($P < 0.05$)。D 组最差, 与其他 4 组比较有统计学差异(见表 1)。

表 1 各组动作电位潜伏期及传导速度检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Results of conduction velocity and latent period of action period in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	神经传导速度(m/s)	潜伏期(ms)
A	9.20 \pm 0.36 [△]	1.36 \pm 0.04 [△]
B	8.03 \pm 0.15 ^{△#}	1.58 \pm 0.03 ^{△#}
C	7.93 \pm 0.42 ^{△#}	1.56 \pm 0.07 ^{△#}
D	4.93 \pm 0.40 ^{△#}	1.90 \pm 0.10 ^{△#}
E	10.10 \pm 0.70 [#]	1.23 \pm 0.06 [#]

注: [△], 各组与 E 组之间有差异; [#], 各组与 A 组之间有差异。各组神经传导速度秩和检验结果: Wald-Square = 52.446 4, $P < 0.000 1$; 各组潜伏期秩和检验结果: Wald-Square = 53.626 8, $P < 0.000 1$

2.3 胫肠肌湿重

术后 12 周称重, 以 A、E 组最高, 两组间无统计学差异, D 组最差, 与其他 4 组比较有统计学差异(见表 2)。

表 2 各组胫肠肌湿重检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Results of gastrocnemius weight in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	胫肠肌湿重(g)
A	1.26 \pm 0.06
B	1.05 \pm 0.10 ^{△#}
C	0.81 \pm 0.11 ^{△#}
D	0.66 \pm 0.07 ^{△#}
E	1.25 \pm 0.03

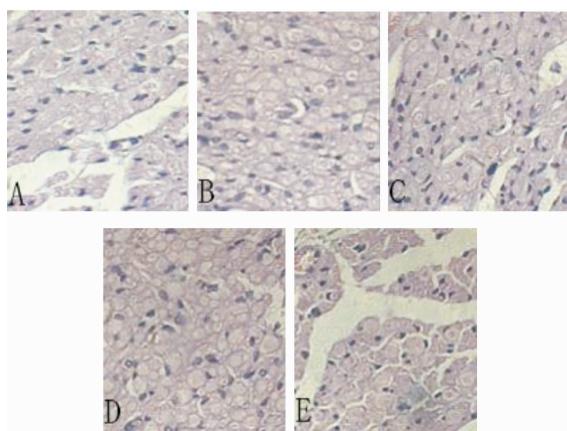
注: [△], 各组与 E 组之间有差异; [#], 各组与 A 组之间有差异。各组胫肠肌湿重秩和检验结果: Wald-Square = 51.577 6, $P < 0.000 1$

2.4 光镜观察

术后 12 周行 HE 染色光镜观察, D 组的炎症反应较重, 空泡变性极其明显。E 组炎症反应最轻, A、E 组镜下可见神经纤维排列较规则。

2.5 透射电镜观察

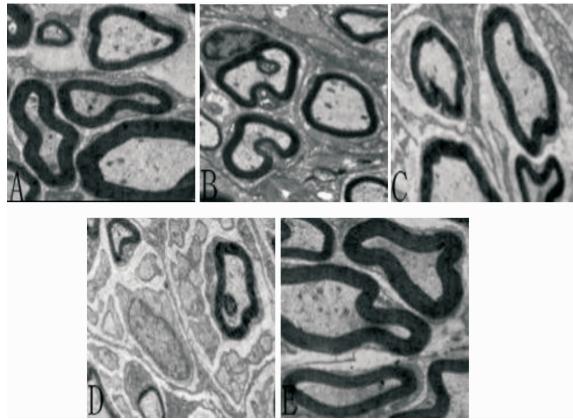
术后 12 周, A、B、E 组可见较多再生的有髓神经纤维及少许无髓神经纤维, 髓鞘完整, 呈同心圆排列, 细胞器丰富; C 组有髓神经纤维较少, 无髓神经纤维较多; D 组再生的有髓神经纤维少, 并见结缔组织结构。



A. A 组 B. B 组 C. C 组 D. D 组 E. E 组

图 1 术后 12 周各组行 HE 染色光镜观察(HE,400×)

Fig. 1 HE staining and light microscopic observation in each group at 12 weeks postoperatively(HE,400×)



A. A 组 B. B 组 C. C 组 D. D 组 E. E 组

图 2 术后 12 周各组行透射电镜观察(4 000×)

Fig. 2 Transmission electron microscopic observation in each group at 12 weeks postoperatively(4 000×)

3 讨 论

自体神经移植是治疗周围神经损伤的金标准,却有其不利之处,如造成相应供区的功能障碍等^[1]。异体神经因其含有正常神经的三维结构,有可能成为极佳的字体神经替代移植物。通过提高神经再生速率可改善神经损伤后的失神经支配变化,并有助于远期功能恢复^[3]。理想的神经保存应能有较长的保存时间及保存效果,并保存条件方便,以便于临床应用。

雪旺细胞(Schwann cells, SC)是周围神经系统的神经胶质细胞,其使相关轴突髓鞘化并提供神经营养因子,对周围神经系统的再生、发育及动态平衡至关重要^[4],且 SC 是宿主免疫排斥反应的主要作用对象。为降低异体神经免疫原性,现有冷冻保存、酒精处理、甘油处理、化学去细胞等方法^[5],但处理过程较为繁琐,不利于临床应用,且远期效果有待进一

步研究。Scarpini 等^[6]通过体内外实验已经证实,在器官和组织移植领域里,对移植器官和组织最好的保存液是 UW 液,其强大的抗氧化作用能减轻移植器官和组织的缺血性损伤^[7],故本实验选用 UW 液作为神经保存液。

为进一步提高保存神经活性,本实验在保存液中加入川芎嗪。川芎嗪是中药川芎所含的生物碱,实验发现川芎嗪可明显抑制淋巴细胞 DNA 的合成,其可能通过对过度活化的 CD4 T 淋巴细胞的直接抑制,从而抑制免疫功能^[8]。范连慧等^[9]通过实验发现川芎嗪能减少移植肾粘附分子 ICAM-1 的表达,并抑制 MHC-II 分子在移植肾内表达,改善移植肾功能。

低温冷冻过程中,细胞内冰晶形成破坏细胞器和细胞核进而导致细胞损伤,如若冷冻保存神经复温速率较慢等,冰晶再次形成可能,进一步加重神经损伤^[10],且复温过程中可能导致细胞膜渗漏,细胞水肿甚至死亡^[11],故冷冻保存方法较为繁琐且要求较高,不利于临床应用。国外有文献报道异体神经于 4 ℃ 条件下在含绿茶多酚 1 mg/ml 的 UW 液中保存 4 周,术后形态学及电生理检测与新鲜自体神经移植无明显差别^[2]。前期实验^[12]发现含川芎嗪的玻璃化液在-20 ℃ 保存大鼠周围神经 3 周对 SC 凋亡的抑制作用与在-196 ℃ 保存 3 周的效果接近。

本实验在不同温度下 UW 液中加入 TMP 对异体神经进行保存,结果显示 A 组术后粘连较轻,功能恢复良好,腓肠肌湿重、神经电生理、光镜及电镜观察情况与自体神经移植组接近而明显优于其他组。分析其原因,考虑为:①川芎嗪对异体神经具有一定免疫抑制作用,减轻炎症细胞的浸润程度,降低了异体神经的免疫排斥反应,减少 SC 细胞的凋亡,进而促进周围神经再生;②与-20 ℃、-80 ℃ 保存温度相较,4 ℃ 下保存可减少冰晶形成,减轻异体神经损伤,利于神经再生。至于温度对异体神经免疫原性等方面的影响,尚须进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Battiston B, Geuna S, Ferrero M, et al. Nerve repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair [J]. Microsurgery, 2005, 25(4): 258-267.
- [2] Ikeguchi R, Kakinoki R, Matsunoto T, et al. Successful storage of peripheral nerves using university of wisconsin solution with polyphenol [J]. Journal of Neuroscience Methods, 2007, 159(1): 57-65.
- [3] Rustemeyer J, Krajacic A, Dicke U. Histomorphological and functional impacts of postoperative motor training in rats after allograft sciatic nerve transplantation under low-dose FK506 [J]. Muscle Nerve, 2009, 39(4): 480-488.

流行病学调查

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.04.015

1997-2011 年重庆市九龙坡区麻疹流行特征分析

郑 艳,李大兴,姚 远

(重庆市九龙坡区疾病预防控制中心流病科,重庆 400039)

【摘要】目的:了解重庆市九龙坡区 1997-2011 年麻疹发病流行病学特征,为制定麻疹控制策略提供依据。**方法:**收集 1997-2011 年重庆市九龙坡区麻疹疫情资料和 2005-2011 年麻疹监测资料,进行描述流行病学分析。**结果:**1997-2011 年麻疹发病率为(0.36 ~ 20.56)/10 万,平均发病率为 3.94/10 万;4~7 月是麻疹的好发季节;发病年龄构成以 15 岁以下为主,占总报告病例数的 76.99%;监测资料提示小于 8 月龄、8 月龄至 1 岁、1~2 岁年龄组、20 岁及以上年龄组病例数分别占总病例的 32.73%、21.39%、5.15%、17.01%,无免疫史或免疫史不详病例占 91.24%。**结论:**麻疹发病向大年龄和 8 月龄内人群转移;要控制麻疹以达到消除的目标,除做好常规免疫工作以外,需要加强健康教育和流动儿童管理,开展育龄妇女麻疹疫苗接种,做好 15 岁以下儿童查漏补种,积极开展 15 岁及以上人群麻疹强化免疫。

【关键词】麻疹;流行病学;监测**【中国图书分类法分类号】**R511.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-02-23

Study on the epidemiological characteristics of measles in Jiulongpo district of Chongqing from 1997 to 2011

ZHENG Yan, LI Daxing, YAO Yuan

(Department of Epidemiology, Center for Disease Control and Prevention in Jiulongpo District of Chongqing)

【Abstract】**Objective:** To understand the epidemiological characteristics of measles in Jiulongpo district of Chongqing from 1997 to 2011 in an aim to provide references for formulating control measures. **Methods:** The epidemic data of measles from 1997 to 2011 and the monitoring data of measles from 2005 to 2011 in Jiulongpo district of Chongqing were collected and analyzed with descriptive epidemiology. **Results:** The incidence of measles from 1997 to 2011 was ranged between 0.36/100 000 and 20.56/100 000 with an average incidence of 3.98/100 000. The months between April and July were the susceptible seasons for measles. Measles was mainly occurred under the age of

作者介绍:郑 艳(1976-),女,主管医师,硕士,

研究方向:流行病防治。

基金项目:重庆市卫生局资助项目(编号:2010-2-457)。

15, accounting for 76.99%. The monitoring data revealed that the age composition ratios within 8 months, from 8 months to 1 years old, from 1 years old to 2 year-old and over 20 year-old were 32.73%, 21.39%,

用的实验研究[J].第三军医大学学报,2004,26(15):1364-1367.

Fan L H, Wu X F, Yu R J, et al. Protective effect of Ligustrazine preconditioning on transplanted rat kidney[J]. Journal of Third Military Medical University, 2004, 26(15):1364-1367.

[10] Brien F J, Harley B A, Yamtas I V, et al. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds [J]. Biomaterials, 2004, 25(6):1077-1086.

[11] Windtnt P, Morris T C, Drake M B, et al. EBMT Chronic Leukaemia Working Party Complications Subcommittee. Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation:a survey of EBMT centres [J]. Bone Marrow Transplant, 2005, 36(7):601-603.

[12] 刘建文,蒋电明,陈增刚,等.含川芎嗪的玻璃化保存液对雪旺细胞凋亡及调控基因表达影响的初步实验研究[J].重庆医科大学学报,2009,34(3):289-292.

Liu J W, Jiang D M, Chen Z G, et al. Preliminary experimental study of the effects of vitreous cryopreservation with tetramethylpyrazine on schwann's cell apoptosis and the expression of regulating gens[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2009, 34(3):289-292.

(责任编辑:关蕴良)

[4] Webber C A, Christie K J, Cheng C, et al. Schwann cells direct peripheral nerve regeneration through the Netrin-1 receptors, DCC and Unc5H2[J]. Glia, 2011, 59(10):1503-1517.

[5] 王旭异,李宝兴.同种异体神经移植的研究进展[J].实用骨科杂志,2007,13(5):282-284.

Wang X Y, Li B X. The progression of nerve allograft [J]. Journal of Practical Orthopaedics, 2007, 13(5):282-284.

[6] Scarpini E, Lisak R P, Beretta S, et al. Quantitative assessment of class II molecules in normal and pathological nerves[J]. Brain, 1990, 113(Pt 3):659-675.

[7] Belzer F O, Southard J H. Principle of solid-organ preservation by cold storage[J]. Transplant, 1988, 45(4):673-676.

[8] 王建杰,罗文哲,张 涛,等.川芎嗪对类风湿性关节炎患者 PB-MC 免疫球蛋白合成的影响[J].黑龙江医药科学,2004,27(1):4-15.

Wang J J, Luo W Z, Zhang T, et al. Effects of Ligustrazine on the synthesis of immunoglobulins in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis[J]. Heilongjiang medicine and pharmacy, 2004, 27(1):4-15.

[9] 范连慧,吴雄飞,余荣杰,等.川芎嗪预处理对大鼠移植肾保护作