

## · 基础研究 ·

## FK506 缓释剂促进周围神经再生纤维电生理功能恢复的实验研究

李强<sup>1</sup>, 申屠刚<sup>1</sup>, 伍亚民<sup>2</sup>, 李骥<sup>1</sup>, 王刚<sup>1</sup>

(1. 解放军第 98 医院全军创伤骨科中心 浙江 湖州 313000; 2. 第三军医大学创伤外科研究所)

**【摘要】** 目的:探讨 FK506 缓释剂促进周围神经再生的效果。方法:2008 年 3 月至 9 月,选取 32 只 SD 大鼠,雌雄不拘,体重 200~250 g,1%戊巴比妥钠(30 mg/kg 体重)腹腔内注射麻醉。取股后斜切口,暴露右侧坐骨神经,10 倍显微镜下游离坐骨神经,并在梨状肌出口下方 5 mm 处将坐骨神经切除约 8 mm,任其回缩,造成 10 mm 缺损,用梭形双通道桥接管桥接坐骨神经 10 mm 缺损,根据梭形管的两支管内加入的药物不同将动物随机均分为 A 组(两支管内均加入几丁糖凝胶)和 B 组[一侧支管内注入几丁糖加生理盐水(B1 组);另一侧支管内注入几丁糖加 FK506(B2 组)]。每组 16 只,于术后 8、12 周对再生神经的组织病理学进行观察,并对术后 12 周的再生神经行皮层感觉诱发电位(CSEP)、复合肌肉动作电位(CMAP)及神经传导速度(CV)进行测定。结果:术后 8、12 周,A 组两支管内再生神经纤维组织病理形态无明显差异,电生理功能检测无统计学意义;B 组注入 FK506 侧(B2 组)再生纤维粗细均匀,排列整齐,明显优于对照侧(B1 组);术后 12 周,B2 组较 B1 组的 CSEP、CMAP 的潜伏期短,而振幅高,传导速度快。两者有统计学差异( $P < 0.01$ )。结论:FK506 可明显促进周围神经再生纤维电生理功能恢复,为周围神经损伤免疫抑制剂提供理论依据。

**【关键词】** 周围神经; 电生理学; 免疫法

DOI:10.3969/j.issn.1003-0034.2010.11.014

**Experimental study of electrophysiologic effects of regenerative nerve fibres affected by control releasing FK506** LI Qiang\*, SHEN Tu-gang, WU Ya-min, LI Ji, WANG Gang. \*Center of Micro-Orthopaedics of Nanjing Military, 98th Hospital, Hu Zhou 313000, Zhejiang, China

**ABSTRACT Objective:** To discuss the electrophysiologic effects of regenerative nerve fibres affected by control releasing of FK506. **Methods:** From Mar. to Sep. in 2008, the body weigh of 32 Sprague-Dawley rats which was 200 to 250 g, anesthesia was performed with an intraperitoneal injection of 30 mg/kg 1% continal. The sciatic nerve was transected in each rat by the excision of a 10 mm gap just proximal to the trifurcation of the nerve. The 10 mm gap of sciatic nerve had been bridged with the new double channel nerve conduit of fusiform shape, which were randomly divided into two groups basing on the different drug in the channel, each group contained 16 animals. In group A, 100  $\mu$ l of chitin for medical use was injected into the conduit, in group B the two branches of the conduit respectively contained 100  $\mu$ l of the chitin and 10  $\mu$ l FK506 (group B2) or physiologic saline (group B1). At 8 and 12 week after operation, the morphology in regenerative nerve and electrophysiologic effects by detect compound muscle active potential (CMAP) and cortical somatosensory evoked potential (CSEP) were evaluated. **Results:** There were not significant differences of the regenerative nerve fibres between two channels in group A, but in group B2, the number of the regenerative fibres was much more than that in group B1. The latency of CMAP and CSEP in group B2 was shorter than that in group B1. But its amplitude was higher. There were highly significant difference between the groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The electrophysiologic effects of regenerative nerve fibres can be significantly promoted by FK506, which provide theory base for immunosuppressive treatment of peripheral nerve.

**KEYWORDS** Peripheral nerves; Electrophysiology; Immunization

Zhongguo Gushang/China J Orthop Trauma, 2010, 23(11): 841-844 www.zggszz.com

周围神经由于存在血-神经屏障,能够阻止淋巴细胞和抗体进入神经组织实质内,且没有主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)类抗原表达和抗原递呈细胞的存在,多年来

一直被认为是免疫豁免区。但近年来国内外的研究表明,神经损伤后同样存在一系列免疫反应,这些反应影响了神经的再生和功能恢复,因此应用免疫抑制剂促进周围神经再生的治疗策略已逐渐成为研究的热点。FK506 由于免疫抑制作用强,不良反应小,具有极大的临床应用前景而倍受关注。2008 年 3 月

至 9 月,我们利用相关实验探讨局部缓释 FK506 促进周围神经再生纤维电生理功能恢复的效果。

## 1 材料与方法

**1.1 动物模型与分组** 选取健康成年清洁级 SD 大鼠 32 只,雌雄不拘,体重 200~250 g,平均 225 g,第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所动物中心提供。1%戊巴比妥钠(30 mg/kg 体重)腹腔内注射麻醉。侧卧位,剃毛、消毒后,取股后斜切口,暴露右侧坐骨神经,10 倍显微镜下游离坐骨神经,并在梨状肌出口下方 5 mm 处将坐骨神经切除约 8 mm,任其回缩,造成 10 mm 缺损,用消毒好的梭形双通道桥接管桥接缺损段<sup>[1]</sup>,用 10-0 无损伤显微缝合线将神经远、近断端与桥接管缝合固定 2 针,缝合方法采用两定点套接法:分别在神经干周径 180°两相对位置各缝合 1 针,使得再生神经断端套入桥接管内,并距桥接管的分叉处约 1 mm。根据梭形管的两支管内加入的药物不同将动物随机分为两组,每组 16 只动物:A 组,桥接管的两支管内仅加入医用几丁糖凝胶 100  $\mu$ l(上海其胜生物制剂有限公司);B 组,向两支管内注入医用几丁糖凝胶 100  $\mu$ l 后,一侧支管内注入 10  $\mu$ l FK506(B1 组,K506 为 1 mg/ $\mu$ l,美国 Sigma 公司);另一侧支管内注入 10  $\mu$ l 生理盐水(B2 组),将桥接管置于适宜的位置,排除扭转现象,用 0-0 丝线套在两支管外,并缝合固定在邻近的软组织上,防止大鼠麻醉清醒后,活动下肢致桥接管移位和扭转。逐层缝合股后肌肉及皮肤切口,按常规标准统一分笼饲养。

## 1.2 观察指标与方法

**1.2.1 大体观察** 于术后 8、12 周分别取 A、B 组各 4 只动物,观察梭形双通道桥接管有无移位、变形、塌陷及裂开,并初步观察 2 支管内再生神经的粗细、色泽、质地和弹性等。

**1.2.2 电生理功能测定** ①主要仪器:澳大利亚 ADI 公司生产的 Powerlab/16SP 诱发电位仪,日本 NARISHIGE 生产的 ST-7 大鼠立体定位仪。②检测方法:术后 12 周,A、B 组分别取 8 只动物,用 1%的戊巴比妥钠进行腹腔注射麻醉(40 mg/kg),将受检测大鼠用日本 NARISHIGE 生产的 ST-7 大鼠立体定位仪固定,手术侧腿部剪毛、消毒皮肤后,切开臀大肌,剖开桥接管,显露坐骨神经。切开头颅后部皮肤,剥离骨膜,用牙科钻在与坐骨神经损伤侧的对侧皮层中央后回感觉区相对应的冠状缝后 3 mm,矢状缝旁开 1 mm 处钻一盲孔(注意避免打穿硬脑膜,以防损伤皮层),保持实验室内安静,温度为 30  $^{\circ}$ C,分别检测复合肌肉动作电位(compound muscle active potential, CMAP)和皮层感觉诱发电位(cortical so-

matosensory evoked potential, CSEP)。③CMAP 的刺激条件和记录方法:刺激电极为自制的双极电极,间距约 1 mm,阳极为红色,阴极为黄色;记录电极为两根黑色的银针电极,直接插入同侧小腿后方的腓肠肌内,深度约 5 mm。刺激参数:采用单方波刺激,频率 4 Hz,波宽为 0.2 ms,强度 0.1 mA,刺激延时 5 ms,叠加 100 次,信号经前置放大器放大 10 万倍,用 ADI 公司配套的 Scope 软件记录和分析。依次刺激和记录再生神经的近、远端,每点记录 4 次。读出两刺激点的潜伏期和波幅值,根据两刺激点的潜伏期差值和两刺激点的距离可计算出神经传导速度。④CSEP 刺激条件和记录方法:记录完 CMAP 后,拔出 2 根银针电极,将银球电极通过立体定位仪置于颅顶部的盲孔内作为记录电极,将参考电极置于颞旁皮下组织,并切开大鼠背侧皮肤约 1 cm,将另一参考电极插于刺激和记录点中间的脊柱椎旁肌内。刺激电极为双极银针保护电极,间距 1 mm,依次置于再生神经头尾端实施电刺激,刺激参数为单方波,频率 4 Hz,波宽为 0.2 ms,强度 0.1 mA,刺激延时 5 ms,记录信号经计算机平均叠加 100 次,并经前置放大器放大 10 万倍,用 ADI 公司配套的 Scope 软件记录和分析。依次记录两支管内再生神经,每个点记录 4 次峰潜时和波幅。

**1.2.3 病理学观察** 术后 8、12 周电生理检测完毕后的每组 8 只动物麻醉、固定后,剪开胸腔,左心室主动脉插管,剪开右心耳。快速灌入生理盐水 150~200 ml,待流出液体清亮后,灌注 40 g/L 多聚甲醛约 200 ml。固定 2 h 后取再生神经,放入 40 g/L 多聚甲醛中继续固定。然后将标本常规脱水、透明、浸蜡、包埋后行石蜡切片,片厚 10  $\mu$ m,HE 染色、Holmes 氏银染观察再生神经外膜的厚度,神经纤维的排列、走行等。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 11.0 统计软件包进行统计学处理。各组数据均以( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间差异采用 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 一般观察** 术后 8 周,A、B 组桥接管无移位变形,管内医用几丁糖凝胶已降解,至术后 12 周,桥接管无裂口、变形、变薄、变色、移位和塌陷。A 组两管内再生神经外观无明显差异。B2 组再生纤维较对照侧(B1 组)明显粗大,呈淡黄色,质韧,弹性佳。

**2.2 病理学观察** 术后 8、12 周 HE 染色示 A 组两支管内再生纤维排列紊乱,布有较多的炎性细胞,B1 组神经纤维与 A 组两支管内再生纤维相似;而 B2 组再生神经纤维排列整齐,粗细均匀,走行一致(见图 1),Holmes 银染也观察到 B1 组神经纤维排列紊

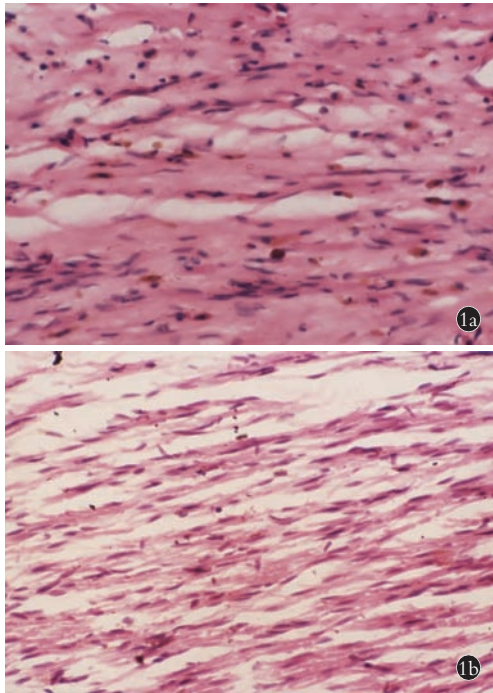


图 1 术后 12 周 B 组再生神经 HE 染色( $\times 400$ ) 1a、1b.分别为 B1、B2 组

Fig.1 HE staining of regenerative nerve at 12 weeks after operation ( $\times 400$ ) 1a. Group B1 1b. Group B2

乱;而 B2 组再生神经纤维排列整齐,粗细均匀,走行一致(见图 2)。

**2.3 电生理功能检测** 术后 12 周 A 组和 B1 组的 CSEP、CMAP 的峰潜时均大于 B2 组,而波幅高于 B2 组,两者差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),B1 组和 B2 组再生神经的传导速度分别为  $(15.62 \pm 1.23)$  m/s、 $(27.95 \pm 3.05)$  m/s,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。刺激再生神经近侧端的电生理检测结果见表 1。

**3 讨论**

**3.1 周围神经免疫抑制治疗的理论基础** 周围神经损伤后治疗的瓶颈是其再生速度慢,特别是高位的神经损伤,待其以  $1 \text{ mm/d}$  速度生长至效应器前,各种感觉小体和运动终板已纤维化,因此如何提高周围神经再生速度是目前亟待解决的难题,研究表明各类神经营养因子均可提高周围神经再生速度和质量<sup>[2-3]</sup>,但由于其来源有限,价格昂贵,至今难以在

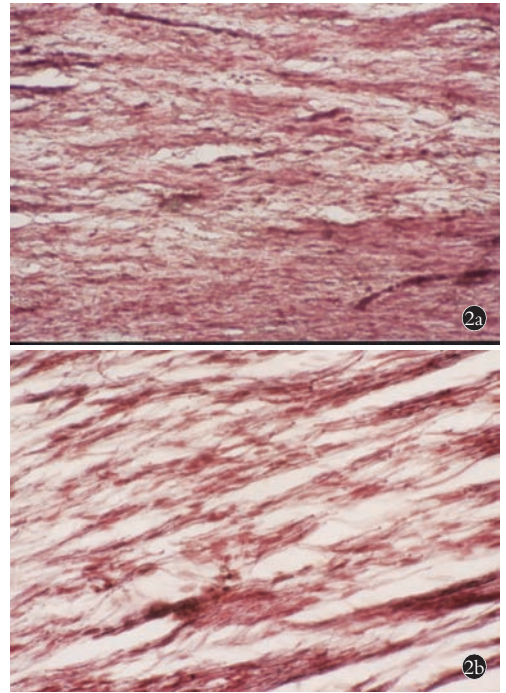


图 2 术后 12 周 B 组再生神经 Holmes 银染( $\times 400$ ) 2a、2b.分别为 B1、B2 组

Fig.2 Holmes silver staining of regenerative nerve at 12 weeks after operation ( $\times 400$ ) 2a. Group B1 2b. Group B2

临床被广泛应用。因此,研究能广泛用于临床的促周围再生的治疗药物显得尤为重要。传统观点认为周围神经由于存在血-神经屏障,能够阻止淋巴细胞和抗体进入神经组织实质内,且没有主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 类抗原表达和抗原递呈细胞的存在,多年来一直被认为是免疫豁免区。但近年来国内外的研究表明,神经损伤后同样存在一系列免疫反应,这些反应影响了神经的再生和功能恢复<sup>[4]</sup>,因此应用免疫抑制剂促进周围神经再生的治疗策略已逐渐成为研究的热点。

**3.2 FK506 促进周围神经再生的作用机制**

FK506 的商品名为 tacrolimus,1984 年 3 月,首先在日本的筑波地区由一株放线菌 (Streptomyces tsukubaensis NO.993 株)分离得到。其药理作用是抑制 T 淋巴细胞的活化;FK506 与 T 细胞浆中的受体-免疫亲和素 (FKBP) 结合成复合物,进而与钙调磷酸

表 1 各组大鼠术后 12 周神经传导速度与 CSEP、CMAP 波峰潜时和波幅的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Change of nerve conduction velocity, peek latency and wave amplitude of CMAP or CSEP at 12 weeks after operation ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数	CSEP		CMAP		传导速度 CV(m/s)
		峰潜时(ms)	波幅( $\mu\text{v}$ )	峰潜时(ms)	波幅( $\mu\text{v}$ )	
A 组	8	51.22 $\pm$ 3.36	5.17 $\pm$ 0.99	8.85 $\pm$ 1.23	190.62 $\pm$ 33.30	17.12 $\pm$ 2.67
B1 组	8	55.67 $\pm$ 4.83	4.54 $\pm$ 1.35	10.23 $\pm$ 0.97	182.60 $\pm$ 33.20	15.62 $\pm$ 1.23
B2 组	8	29.33 $\pm$ 2.65**	18.56 $\pm$ 2.86**	5.53 $\pm$ 0.34**	628.45 $\pm$ 40.20**	27.95 $\pm$ 3.05**

注:与 A 组比较,\* $t=3.680, P < 0.01$ ;与 B1 组比较,# $t=3.520, P < 0.01$

Note:Compared with group A,\* $t=3.680, P < 0.01$ ; Compared with group B1,# $t=3.520, P < 0.01$

酶结合并抑制其活性,阻碍底物-转录因子的脱磷酸化,使 IL-2 的转录受到抑制,从而阻断了 Ca<sup>2+</sup>依赖性 T 淋巴细胞活化途径,从而抑制了由抗原诱导的 T 淋巴细胞产生的细胞免疫及 T 淋巴细胞介导的体液免疫。因此 FK506 促进周围神经再生的主要机制是通过抑制神经损伤后所诱导的免疫反应,为神经再生创造一个较为适宜的微环境,给轴突的再生开辟道路<sup>[5-6]</sup>,FK506 的活性较 CyA 强 10~100 倍,在临床主要用于异体神经的移植,未能广泛用于治疗单纯性的周围神经损伤,原因是①全身应用仍可能存在机会感染和致瘤性。②对单纯性的周围神经损伤的患者进行全身免疫抑制治疗,临床医师与患者均难以接受<sup>[7]</sup>。因此选择 FK506 局部缓释不仅可增强治疗效果,更主要的是可减少全身用药的并发症。

**3.3 几丁糖缓释 FK506 促进周围神经再生的优越性** 几丁糖具有良好的组织相容性和可降解性,不仅能在 3 周内有效地缓释各类 NTFs,而且其本身也能一定程度上促进周围神经再生<sup>[2,8]</sup>。因此,用几丁糖缓释 FK506,局部作用于周围神经,不仅可减少全身应用 FK506 引起的不良反应,而且可同时发挥 FK506 和几丁糖促进周围神经再生的协同作用,此外,几丁糖还具有一定的抗感染作用,还可有效的防止 FK506 可能导致的机会感染。本研究观察 B 组 FK506 侧再生神经明显粗大,呈淡黄色,质韧,弹性佳。HE 染色及 Holmes 氏银染均显示 FK506 侧再生纤维排列整齐,神经外膜薄,再生纤维粗细均匀,排

列及走行一致。从组织形态上证实了 FK506 对周围神经再生的促进作用。而电生理功能检测也进一步观察到 FK506 侧再生纤维 CSEPT 和 CMAP 的潜伏期短,而振幅高,传导速度快,两者差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),进一步从电生理功能上证实了 FK506 对周围神经再生的促进作用,这为临床应用 FK506 促进周围神经再生提供了理论依据。

**参考文献**

[1] 李强,伍亚民,李民,等. NGF 与 CNTF 促进大鼠坐骨神经再生的协同作用研究[J].中国骨伤,2007,20(4):220-223.  
 [2] 李强,伍亚民,李民,等. NGF 与 CNTF 促进周围神经电生理功能恢复的协同作用研究.中华物理医学与康复杂志[J].2006,28(3):145-148.  
 [3] 李强,李民,伍亚民. 物理因子影响周围神经再生的研究概况[J].中华物理医学与康复,2003,25(3):186-188.  
 [4] 王光林,裴福兴,杨志明.周围神经损伤后 HLA-DR 抗原的表达[J].中华手外科杂志,1996,12(3):170.  
 [5] Udina E,Ceballos D,Gold BG, et al. FK506 enhances reinnervation by regeneration and by collateral sprouting of peripheral nerve fibers[J]. Exp Neurol,2003,183(1):220-231.  
 [6] Sobol JB,Lowe III JB,Yang RK, et al.Effects of delaying FK506 administration on neuroregeneration in a rodent model[J]. J Reconstr Microsurg,2003,19(2):113-118.  
 [7] 陈国奋,顾立强,裴国献. 免疫抑制状态下的周围神经再生[J].中国修复重建外科杂志,2002,6(2):139-141.  
 [8] 程赛宇,阮怀珍,吴喜贵,等. 大鼠坐骨神经损伤后几丁糖在神经再生修复中作用的研究[J]. 第三军医大学学报,26(20):1834-1837.

(收稿日期:2010-07-06 本文编辑:王宏)

**《中国骨伤》杂志 2011 年重点专题征稿通知**

《中国骨伤》杂志 2011 年专题策划工作已经开始,以下是 2011 年拟刊出的重点专题,欢迎广大读者和作者踊跃投稿。

1. 动态稳定系统在退行性脊椎疾病中的应用
2. 人工椎间盘置换术的应用价值分析
3. 脊柱微创疗法与非融合技术
4. 胸腰段爆裂骨折椎弓根内固定有关椎体融合的相关问题
5. 关节置换术后感染的早期诊断和处理
6. 髌膝人工关节翻修技术的临床探讨
7. 关节镜治疗在小关节的应用
8. 四肢骨折合并大面积软组织缺损的治疗方法
9. 陈旧性髌臼骨折的重建与功能恢复
10. 骨缺损与植骨形式的选择
11. 复杂关节内骨折的远期疗效临床病例对照研究
12. 骨质疏松性骨折的早期诊断与治疗
13. 脊柱转移性肿瘤的诊断与治疗
14. 中医药在骨肿瘤治疗中的应用
15. 手法治疗在脊柱、关节和创伤疾病中的应用和机理探讨
16. 关节置换术后的康复

《中国骨伤》杂志社