

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

免疫抑制劑 FK506 對周圍神經功能恢復之影響

Evaluation of functional recovery after reinnervation on FK-506 treated rats

計畫編號：NSC 87-2314-B-002-032

執行期限：86年8月1日至87年7月31日

主持人：侯勝茂 國立台灣大學醫學院骨科

一、中文摘要

本研究中，以 36 隻雄性大鼠作為實驗動物，將其右後肢脛骨神經截斷再吻合，來探討免疫抑制劑 FK506 對截斷後吻合神經功能恢復之影響，以及 FK506 是否能有效促進神經軸突之再生。實驗大鼠分為實驗組 (n=18) 與對照組 (n=18)，實驗組以皮下注射方式每天投與 FK506 (劑量為 1 mg/kg body weight)，對照組則每天皮下注射等量之生理食鹽水。於術後 10 天起，利用表皮感覺神經測試及步態研究 (walking track) 測試，每 10 天測量 1 次脛骨神經感覺及運動功能恢復之情形。此外，於術後 20、40 及 60 天，各將實驗組與對照組 6 隻大鼠安樂死，取其右後肢之足底皮膚及脛骨神經，分別進行足底皮膚再生神經計數及脛骨神經再生軸突計數。研究所得結果，實驗組與對照組在表皮感覺神經測試、步態研究 (walking track) 測試、足底皮膚再生神經計數以及脛骨神經再生軸突計數上均無顯著差異。由此結果，顯示免疫抑制劑 FK506 對截斷後吻合神經功能之恢復與神經軸突之再生並無促進的作用。

關鍵詞：FK-506、神經功能

Abstract

The efficacy of immunosuppressant FK506 (Tacrolimus) in axonal regeneration and functional recovery of the reanastomosed tibial nerve was studied. Thirty-six male Wistar rats were randomly assigned into

experimental group and control group. In the experimental group, rats received daily subcutaneous injections of FK506 (1 mg/kg body weight). In the control group, an equivalent volume of saline was administered by the same route. Sensory and motor functional recovery was assessed by skin pinch test and walking track analysis at 10-day intervals from 10 days postoperatively. On day 20, 40, and 60, 6 rats of each group were sacrificed. Skin of the foodpads and the tibial nerves of the hindlimbs were fixed and sampled for skin nerve count and axon count respectively. Statistically, results of the pinch test, walking track analysis, skin nerve count and axon count between the experimental group and control group were not significantly different. Based on the results in this study, FK506 at the dosage of 1mg/kg/day did not enhance tibial nerve regeneration and functional recovery in a cut and reanastomosis model in the rat.

Keywords: Research Project, Report Style, National Science Council

二、緣由與目的

如何藉由肢體移植的方法來治療肢體缺損病患一直是外科醫師欲尋求的答案。由於外科技術的進步及免疫抑制劑的發展，肢體移植已不再是夢想。肢體移植過程中因牽涉大量且多種組織，故需要精確地重建其正常的解剖位置與生理，才可望於移植後重新恢復功能。在眾多決定移植肢體功能恢復

之因子中，神經功能之恢復佔了極重要之地位。當肢體神經功能喪失時，肢體之感覺便會消失；且肢體肌肉由於無法接受神經刺激產生運動，導致肌肉萎縮。所以當神經功能無法恢復時，便會影響整個肢體的感覺及運動功能。假若能讓移植後肢體快速恢復功能，減短神經功能恢復時間，對移植後肢體功能之重建必定有極大的幫助¹⁰。

新一代免疫抑制劑 FK506 (Tacrolimus) 具有與 cyclosporine 相似之作用機制^{23,26-28}，皆可選擇性地抑制 T-cell 之增殖作用^{6,12}。和 cyclosporine 相比較，FK506 之作用強度為 cyclosporine 的 10~100 倍¹⁷，且所產生之副作用較 cyclosporine 小⁵。分別以 FK506 及 cyclosporine 投與各種器官移植病患^{7,15}（肺臟¹⁴、心臟³⁰、肝臟²¹、腎臟⁴、胰臟以及腸道²²），結果顯示 FK506 不論是在控制排斥反應或是回復排斥反應上之效果皆優於 cyclosporine；此結果尤其在腸道移植病患更為顯著¹¹，亦有人使用於異體神經移植³。

除了顯著的免疫抑制效果外，近期的研究報告指出，FK506 對神經系統有保護作用並可縮短神經功能恢復時間^{8,18}。FK506 會和體內之 FK506-binding protein (FKBP) 結合形成 FK506/FKBP complex，抑制 calcineurin (calcium/calmodulin dependent phosphatase) 之作用，使 nitric oxide synthase (calcineurin 之受質) 因磷酸化之增加而降低分解活性，致

nitric oxide 產生減少，阻止因 glutamate 作用於 N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors 所誘起之神經細胞毒害作用，達到神經細胞保護作用²⁹。此外，當 calcineurin 作用受抑制時，一種存在於神經突起，和神經軸突生長有關之蛋白質 GAP-43（亦為 calcineurin 之受質）含量有提高之現象²⁰。依據目前研究推測，神經軸突再生速度加快應該和 GAP-43 蛋白質含量上升有關。

截至目前為止，有關研究 FK506 對神經系統影響之報告仍採 cell culture model^{24,25} 或 nerve crush model³。1995 年 Gold 觀察到 FK506 投與壓傷後之坐骨神經可有效縮短神經功能恢復時間。FK506 對神經軸突再生能力有促進之效果⁸。Gold 將 Sprague - Dawley 品系大鼠之坐骨神經以珠寶商鑷子夾傷，而後投與 FK506 (1 mg/kg) 並觀察神經軸突再生之情形。結果發現 FK506 可加快神經軸突再生之速度。但實際上在進行肢體移植或再植時，神經卻是完全截斷的，故我們無法確實得知，在 cell culture 或 nerve crush model 所觀察到之 FK506 對神經系統之影響，會同樣發生在截斷後吻合之神經。而且若在異體肢體移植，FK506 必須長期使用，我們也希望能探討長期使用 FK506 之影響。

我們希望在這個研究中，利用組織學的檢查以及實際功能的恢復來探討 FK506 對截斷後吻合神經

之影響，以及 FK506 是否能有效促進神經軸突之再生。如果 FK506 加快神經軸突再生速度之作用能在截斷後吻合神經研究模式(cut model)證實，無異是對肢體移植或再植之臨床應用有極大的價值。

三、研究方法

一、分組

將 36 隻雄性 Wistar 品系大鼠分成 2 組，即實驗組及對照組，每組各 18 隻。實驗組以皮下注射方式每天投與 FK506 (劑量為 1mg/kg body weight)，對照組則每天皮下注射等量之生理食鹽水 (如下表所示)。

	FK506	生理食鹽水
實驗組	+	-
對照組	-	+

二、顯微手術：截斷並再吻合脛骨神經(tibia n.)

將大鼠以腹腔注射 sodium pentobarbital (劑量為 65mg/kg body weight) 方式麻醉，動物採側臥姿式，在大腿外側做倒 L 字型切開皮膚，並予以鈍剝使露出 biceps femoralis m.。將 biceps femoralis m.於脛骨上之腱膜切開至膝關節處，並繼續向骨盆方向切開，而後將 biceps femoralis m.翻開，可見坐骨神經(sciatic nerve)及其分支(脛骨神經(tibial nerve)，腓骨神經(peroneal nerve)及腓腸神經(sural nerve))。將脛骨神經暴露出來後，於距離脛骨神經進入肌肉處 5mm 處，先以 10-0 nylon sutures 於脛骨神經之 epineurium 做 mattress suture，但暫不打結，而後將脛骨神經以顯

微直剪在 suture 間做銳利的截斷。截斷脛骨神經後，將原先做好之 mattress suture 打結，於 mattress suture 對側另作 epineurium 的間斷吻合；於吻合時須注意保持最小的張力。神經吻合完畢後，以 4-0 nylon sutures 將肌肉及皮膚縫合。

三、術後臨床觀察

術後每天記錄大鼠之臨床狀況，並於術後 10 天起，每 10 天測量 1 次脛骨神經感覺及運動功能恢復之情形。脛骨神經之功能恢復乃利用表皮感覺神經測試及步態研究(walking track)測試。

1. 表皮感覺神經測試

選定肢體中僅有 tibial n.分佈的表皮區域(Wiesenfeld-Hallin, 1988)，以小止血鉗採兩段式夾緊測試；即先輕夾住該處皮膚，待動物安靜後再夾緊，如此可避免因動物緊張而引起偽陽反應且不會夾到表皮之下的組織。若受到刺激之肢體有回縮反應或動物發出聲音為(+)，反應不明顯為(±)，無反應為(-)。Tibial n. 之測試區域為足底(突出肉墊以外區域)。

2. 步態研究(Walking track)

以壓克力板做成長、寬、高為 42X8.2X15 公分之走道。走道盡頭為一黑暗盒子，走道上方以強烈燈光照射。於測試前先讓每隻受測鼠試走數次以熟悉走道，而後將長、寬為 28X8.2 公分之白色影印紙置於走道中，將受測鼠之左右後肢分別抹上綠、紅顏料後開始測試。

每次測試完畢後，基於清楚

(clarity)與完整性(completeness)的原則，選擇3組足印，用電子式游標尺分別測量左右後肢之3個變量，分別為：(1)足印長度(print length, PL)；(2)第一趾最前端中央至第五趾前端中央之距離(toe spread, TS)；(3)第二趾最前端中央至第四趾前端中央之距離(intermediary toe spread, IT)。

由實驗肢(E)及正常肢(N)之三組數據(EPL, ETS, EIT, NPL, NTS, NIT)計算出三個因數，分別為：(1) Print length factor (PLF) = (EPL-NPL) / NPL (2) Toe spread factor (TSF) = (ETS-NTS) / NTS (3) Intermediary toe spread factor (ITF) = (EIT-NIT) / NIT。將這些因數代入 Bain-Mackinnon-Hunter (BMH) 公式(Bain et al., 1989), 求得坐骨神經功能指數 (sciatic function index, SFI), 脛神經功能指數 (tibial function index, TFI), 腓神經功能指數 (peroneal function index, PFI)。指數 0 為最佳, 負值越大表功能越差, -100 時為最差。

BMH 公式如下：

$$SFI = -38.3(PLF) + 109.5(TSF) + 13.3(ITF) - 8.8$$

$$TFI = -37.2(PLF) + 104.4(TSF) + 45.6(ITF) - 8.8$$

$$PFI = 179.4(PLF) + 80.3(TSF) - 13.4$$

四、足底皮膚再生神經計數

大鼠足底(突出肉墊以外區域)皮膚為 tibial n. 分佈區域, 於大鼠犧牲後, 將此區域之皮膚取下, 經固定後製成冷凍切片, 再以免疫化學染色法染出再生之神經並計數, 比較實驗組

與對照組之差異。

1. 足底皮膚採樣與固定

大鼠於預定之時間(如下表所示)以 Sodium pentobarbital 安樂死, 將其右後肢足底皮膚取下, 置於 periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定液中(Mclean and Nakane, 1974) 固定 25 小時, 固定完畢後置於 TBS 緩衝溶液中, 保存於 4 冰箱。

	術後 20 天	術後 40 天	術後 60 天
實驗組	6 隻	6 隻	6 隻
對照組	6 隻	6 隻	6 隻

2. 冷凍切片製作

將 TBS 緩衝溶液中之皮膚取出, 於足底中央區域取一長 5mm、寬 1.5mm 之皮膚, 包埋於 OCT media 中, 然後置入事先已放入液態氮中降溫之 isopentane 內冷凍, 並保存於 -20 冰箱中, 待進行免疫化學染色前再切成 30 μ m 厚的切片。

3. 免疫化學染色 (Immunochemical staining)

將切好之冷凍切片, 依下列流程圖進行免疫化學染色, 以染出足底皮膚之再生神經。(反應中加入之試劑量以蓋滿組織為原則)。

TBS 洗 2 次

加入 3% H₂O₂
30 分鐘

TBS 洗 3 次, 每次 5 分鐘

加入 10% normal goat serum 及
0.1% Triton-X
30 分鐘

加入 primary antibody PGP 9.5、

2 % normal goat serum 及 0.02 % Triton-X
overnight, 4
TBS 洗 5 次，每次 5 分鐘

加入 secondary antibody、
2 % normal goat serum 及 0.01 % Triton-X
120 分鐘
TBS 洗 5 次，每次 5 分鐘

加入 streptavidin peroxidase
60 分鐘
TBS 洗 5 次，每次 5 分鐘

加入 SG chromogen 呈色
5 分鐘
加入蒸餾水以終止反應

染色完之皮膚組織，再放入嗜伊紅染劑(Eosin)中 30 秒，而後以清水沖洗掉多餘之染劑以做背景之對比染色，封片後進行鏡檢計數。

4. 再生神經計數

以接目鏡上具有網狀方格圖（縱軸與橫軸各 20 條等距格線）之光學顯微鏡，於 400 倍視野下，計算以免疫化學染色法染色之足底皮膚切片中，表皮及真皮層之再生神經與方格圖格線交叉點重疊數目，再除以切片中表皮及真皮層所佔之面積，得到每單位面積下再生神經與格線交叉點重疊之數目。面積之計算方式，乃利用方格圖，計算表皮及真皮層所涵蓋格線交叉點的數目作為面積的量。每單位面積約等於 0.09 mm^2 (Greene et al., 1990, Rieder et al., 1993)。

五、脛骨神經再生軸突計數

1. 神經採樣與固定

大鼠於預定之時間（如下表

所示）以腹腔注射 Sodium pentobarbital 方式安樂死，將其右後肢之脛骨神經，於吻合處前後各 5 mm 處剪斷，取下長約 1 cm 之脛骨神經，置於 periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定液中(Mclean and Nakane, 1974) 固定 25 小時，固定完畢後置於 TBS 緩衝溶液中，保存於 4 冰箱。

	術後 20 天	術後 40 天	術後 60 天
實驗組	6 隻	6 隻	6 隻
對照組	6 隻	6 隻	6 隻

2. 神經組織厚切片製作

取出 TBS 緩衝溶液中之脛骨神經，依下列步驟製作厚切片。

3. 再生軸突計數

以接目鏡上具有網狀方格圖（縱軸與橫軸各 4 條等距格線，共 9 格）之光學顯微鏡，於 1000 倍視野下，計算脛骨神經厚切片中，每一格內再生軸突之數目，再將 9 格所得之結果平均得到每格之軸突數目。

四、結果

一、表皮感覺神經測試

實驗組與對照組之足底表皮感覺神經測試結果分析發現，無論是在第 10、20、30、40、50 或 60 天，實驗組與對照組兩組間之表皮感覺神經測試結果均無顯著差異($p>0.05$)。

接著再以獨立樣本 t 值測驗法來對實驗組與對照組在不同時間點之結果進行分析。分析發現，在實驗組內，第 10 天與第 60 天之間、第 50 天與第 60 天之間其表皮感覺神經測試結果有極顯著差異($p<0.01$)；第 10 天與第 40 天之間其表皮感覺神經測試結果則有顯著差異($p<0.05$)，而於其他各天數之表皮感覺神經測試結果之間則無顯著差異($p>0.05$)。對照組內，第 10 天與第 50 天之間、第 10 天與第 60 天之間其表皮感覺神經測試結果有極顯著差異($p<0.01$)；第 50 天與第 60 天之間其表皮感覺神經測試結果則有顯著差異($p<0.05$)，而於其他各天數之表皮感覺神經測試結果之間則無顯著差異($p>0.05$)。

二、步態研究

實驗組與對照組之神經功能指數結果利用獨立樣本 t 值測驗法，對實驗組與對照組之坐骨神經功能指數(SFI)、脛骨神經功能指數(TFI)及腓骨神經功能指數(PFI)進行分析。分析發現，在坐骨神經功能指數(SFI)方面，第 10、20、30、40 及 60 天，實驗組與對照組兩組間之坐骨神經功能指數結果均無顯著差異(其 p 值分別為 $p_{10 \text{ days}}=0.17$, $p_{20 \text{ days}}=0.87$, $p_{30 \text{ days}}=1.38$, $p_{40 \text{ days}}=0.48$, $p_{60 \text{ days}}=0.90$)，而在第 50 天，實驗組(-44.48 ± 8.66)與對照組(-27.89 ± 13.25)兩組間之坐骨神經功能指數結果則有顯著差異($p=0.045$)。脛骨神經功能指數(TFI)方面，第 10、20、30、

40 及 60 天，實驗組與對照組兩組間之脛骨神經功能指數結果均無顯著差異(其 p 值分別為 $p_{10 \text{ days}}=0.12$, $p_{20 \text{ days}}=0.83$, $p_{30 \text{ days}}=0.63$, $p_{40 \text{ days}}=0.73$, $p_{60 \text{ days}}=0.32$)，而在第 50 天，實驗組(-51.89 ± 10.28)與對照組(-30.92 ± 14.73)兩組間之脛骨神經功能指數結果則有顯著差異($p=0.028$)。最後在腓骨神經功能指數(PFI)方面，第 10 及 20 天，實驗組(-0.98 ± 23.86 ; 2.82 ± 14.58)與對照組(-16.97 ± 19.88 ; -17.93 ± 15.19)兩組間之腓骨神經功能指數結果分別有顯著及極顯著差異($p_{10 \text{ days}}=0.033$, $p_{20 \text{ days}}=0.000157$)，在第 30、40、50 及 60 天，實驗組與對照組兩組間之腓骨神經功能指數結果則均無顯著差異(其 p 值分別為, $p_{30 \text{ days}}=0.17$, $p_{40 \text{ days}}=0.86$, $p_{50 \text{ days}}=0.37$, $p_{60 \text{ days}}=0.84$)。

接著再以獨立樣本 t 值測驗法，來對實驗組與對照組組內不同時間點之神經功能指數進行分析。

分析發現，實驗組內，在坐骨神經功能指數(SFI)方面，只有第 10 天之結果與第 20 天之結果有極顯著差異($p=0.0028$)，其他天數各坐骨神經功能指數結果之間，皆無顯著差異($p>0.05$)。脛骨神經功能指數(TFI)方面，第 10 天與第 20 天之間、第 10 天與第 30 天之間其脛骨神經功能指數結果有極顯著差異($p=0.0026$ 及 $p=0.0001$)；第 10 天與第 50 天之間、第 10 天與第 60 天之間其脛骨神經功能指數結果則有顯著差異($p=0.035$ 及 $p=0.012$)，而於其他各天數之脛骨神經功能指數結果之間則無顯著差異($p>0.05$)。腓骨神經功能指數(PFI)方面，各天數之腓骨神經功能指數結果之間皆無顯著差異($p>0.05$)。

在對照組內，坐骨神經功能指數(SFI)方面，各天數之坐骨神經功能指數結果之間皆無顯著差異($p>0.05$)。脛骨神經功能指數(TFI)方面，第 10 天與

第40天之間 第10天與第50天之間、第10天與第60天之間，其脛骨神經功能指數結果皆有極顯著差異($p=0.0010$ 、 $p=0.0002$ 及 $p=0.0048$)；其他各天數之脛骨神經功能指數結果之間則無顯著差異($p>0.05$)。腓骨神經功能指數(PFI)方面，第10天與第30天之間、第10天與第50天之間，第10天與第60天之間，其腓骨神經功能指數結果有顯著差異($p=0.0419$ 、 $p=0.0234$ 及 $p=0.0205$)，第20天與第30天之間、第10天與第40天之間，其腓骨神經功能指數結果皆有極顯著差異($p=0.0088$ 及 $p=0.0042$)，他各天數之腓骨神經功能指數結果之間則無顯著差異($p>0.05$)。

三、足底再生神經計數

實驗組與對照組之足底再生神經計數結果以獨立樣本 t 值測驗法來對實驗組與對照組之足底再生神經計數結果進行分析。分析結果發現，實驗組與對照組無論是在第20、40或60天，其兩組間足底再生神經計數結果並無顯著差異(p 值分別為 $p_{20\text{ days}}=0.62$ ， $p_{60\text{ days}}=0.41$ ， $p_{60\text{ days}}=0.27$)。

接著再以獨立樣本 t 值測驗法來對實驗組與對照組在不同時間點之足底再生神經計數結果進行分析。分析結果發現，於實驗組內，第20天所測得之結果(9.7 ± 3.09)與第40天所測得之結果(18.5 ± 3.74)之間有顯著差異($p=0.015$)，第20天所測得之結果(9.7 ± 3.09)與第60天(18.7 ± 1.15)所測得之結果之間有極顯著差異($p=0.004$)。而在對照組方面，於對照組內，第20天所測得之結果(10.6 ± 2.08)與第40天(16.4 ± 3.97)及第60天(21.8 ± 5.80)所測得之結果之間分別具有顯著差異($p=0.015$ 及 $p=0.014$)。

四、脛骨神經再生軸突計數

脛骨神經再生軸突計數之結果以獨立樣本 t 值測驗法來對實驗組與對照組之脛骨神經再生軸突計數結果進行分析。分析發現，無論是在第20、40或60天，實驗組與對照組兩組間之脛骨神經再生軸突計數結果均無顯著差異(其 p 值分別為 $p_{20\text{ days}}=0.37$ ， $p_{40\text{ days}}=0.34$ ， $p_{60\text{ days}}=0.41$)。接著再以獨立樣本 t 值測驗法，來對實驗組與對照組組內不同時間點之再生軸突計數結果進行分析。分析結果發現，於實驗組內，第20天(11.7 ± 3.28)之結果與第40天(18.1 ± 3.64)及第60天(26.2 ± 4.53)之結果之間分別有極顯著差異($p=0.000746$ 及 $p=0.004006$)，在對照組方面，於對照組內，第20天之結果與第40天之結果之間沒有顯著差異($p=0.32$)，第20天之結果(13.3 ± 2.28)與第60天之結果(23.8 ± 4.16)之間則有極顯著差異($p=0.00091$)。

五、討論

一、神經截斷與再吻合模式

成年哺乳類之周圍神經多數具有再生能力，於神經受傷後，假若神經細胞沒有死亡，則最早於受傷後24小時將開始神經細胞之再生反應(Brook and Seckel, 1990, Frisen, 1997)。目前周圍神經受傷與再生的研究，仍以大鼠(rat)為最佳的實驗模式，主要的原因，是由於大鼠的周圍神經在組織學上與人類組織幾乎無法分辨，且容易飼養管理與操作(Bain et al., 1988, Brown et al., 1989)。

以大鼠為實驗動物進行周圍神經再生反應的眾多研究中，其採用之神經多為坐骨神經，而於本研究中，不採用坐骨神經(sciatic nerve)而採用脛骨神經(tibial nerve)的原因有三個：第一，坐骨神經其下有三分支(脛骨神經，腓骨神經(peroneal nerve)及腓腸神經(sural nerve))，此三支之神經分佈控制區有重疊部位亦有獨立部位(Wiesenfeld-Hallin, 1988)，假若採用坐骨神

經做為截斷再吻合對象，則對於神經受損後，FK506 對神經再生及功能恢復之影響的觀察，會較易受到其他因素干擾；採用脛骨神經可排除較多的干擾因素。第二，若將坐骨神經截斷再吻合，手術後開始由於大鼠下半肢體喪失神經供應，故於復原過程中容易出現自殘肢體現象，會影響神經功能恢復之評估；採用脛骨神經，肢體於手術後仍有部分神經供應，較不會出現自殘現象。本研究中之 36 隻大鼠，於手術後均無出現自殘肢體現象。第三，採用脛骨神經，於神經形態學分析時較方便，且其所得結果可與其他神經功能恢復評估方法之結果相互比較，了解各結果之間的相關性與一致性。

手術當中剝離神經周圍的結締組織時，最好不要損傷術區內之血管，以免血塊存在神經吻合面之間，因而干擾神經再生之進行。同時也應避免損傷神經外鞘膜(epineurial sheath)上之微血管，以免因而影響神經之血流供應。使用顯微直剪剪斷脛骨神經時，刀面應與神經垂直並迅速俐落地將神經剪斷，才可得到較平整的切面以利神經吻合。

理想的神經吻合術，應是神經雙斷端能整齊對合，中間不必用線綁，可減少疤痕組織(Scar)形成。神經雙斷端要對齊，可利用神經外鞘膜上的微血管來做神經走向之定位。本研究中，在脛骨神經截斷前，先以縫線對脛骨神經之神經外膜做 mattress suture，待神經剪斷後再將 mattress suture 打結，如此可更進一步確保神經雙斷端能整齊對合。於吻合時，須注意保持最小的張力，以免過大的張力干擾再生軸突的生長方向。手術後之大鼠，最好飼養於鋪有動物墊料的透明塑膠飼養籠中，如此可避免大鼠未恢復的右後肢陷入鐵籠縫隙中造成傷害，因而影響功能恢復之評估。此外，透明塑膠飼養籠有利於觀察實驗大鼠術後恢復之情形。

二、表皮感覺神經功能測試

大鼠右後肢之足底表皮感覺功能恢復情形，不論是在實驗組或對照組，於術後 20 天即開始有個體出現對止血鉗之捏夾有痛覺反應，但大多數的大鼠至術後 60 天才對止血鉗之捏夾有痛覺反應。由實驗組與對照組足底表皮感覺神經測試結果的統計分析來看，表皮感覺功能恢復的情形在實驗組與對照組之間並無顯著差異。

一般而言，感覺神經恢復較運動神經恢復快，故感覺功能恢復的評估十分重要。多數感覺神經末梢分佈於皮膚之上皮層，不同神經其所分佈的範圍各有不同，但各神經分佈區之邊緣卻會有互相重疊的區域，故如欲測定某特定神經的功能，則必須採用單獨由此神經分佈的區域進行測試(Bailey and Kitchell, 1987)。

目前評估感覺功能的恢復，主要是靠觀察實驗動物(大鼠)於受到痛刺激後，有無保護性的收縮來決定(Koning et al., 1986, Bailey et al., 1987, Benhaim et al., 1993)，但由於受測試動物緊張的心理狀態會影響結果，觀察的方法較不客觀，故應該配合其他方法來評估感覺功能之恢復。

本實驗在受測試皮膚”平面”上不會有重疊現象，但在”立體”上，即皮膚深部組織，因受其他神經供應，所以稍夾重即有偽陽性反應出現，夾太少只能夾到角化上皮，出現偽陰性反應。是否有更好、更準確的感覺神經測試法，值得探討。

三、步態研究

由實驗組與對照組之神經功能指數統計結果來看，在坐骨神經功能指數、脛骨神經功能指數及腓骨神經功能指數上，實驗組與對照組之神經功能恢復情形並無顯著差異。

步態研究是目前用來評估大鼠下肢運動功能恢復較為客觀準確的方法，本研究

中所得之步態研究結果恰可與前人之結果相互比較，再次重新檢測此法之客觀性與準確性。

1982年 De Medinaceli et al.以大鼠為實驗動物，將其正常與異常的腳印作比較，計算歸納出 sciatic function index (SFI) 公式，用此 SFI 來研究坐骨神經損傷的程度(De Medinaceli et al. 1982)。於 1988 年，Bain et al. 發表另一套公式，包括 sciatic function index (SFI)，tibial function index (TFI)及 peroneal function index (PFI)，總稱為 Bain-Mackinnon-Hunter(BMH) index，不但可評估坐骨神經損傷的程度，亦可評估脛骨神經與腓骨神經功能恢復的情況(Bain et al., 1988)。

本研究採用 BMH 公式所計算出的三個神經功能指數，不論是實驗組或對照組，其坐骨神經功能指數(SFI)及脛骨神經功能指數(PFI)都有隨時間改善的傾向，而腓骨神經功能指數(PFI)則無規律；腓骨神經功能指數之結果與 BMH 公式之發展理論有不符之處。

1988 年，Bain et al.利用大鼠為實驗動物，分組後分別將大鼠的坐骨神經、脛骨神經或腓骨神經截斷，而後測量不同組大鼠之步態。結果發現，當坐骨神經截斷時，其實驗肢踝關節的背曲度(ankle dorsalflexion)會變大、足印長度(print length)會變長而趾間寬度(toe spread)會縮小；當脛骨神經截斷時，其實驗肢踝關節的背曲度(ankle dorsalflexion)會變大、足印長度(print length)會變長而趾間寬度(toe spread)會縮小；而於腓骨神經截斷時，其實驗肢踝關節的背曲度(ankle dorsalflexion)會變小、足印長度(print length)會變短而趾間寬度(toe spread)會縮小。而後 Bain et al.將各組之足印計算出各種數值，以 multiple linear regression analysis 統計方法計算出 BMH 公式，用以評估大鼠下肢遭受神經傷害時之受傷程度及判斷受傷神經為何。其指數以 0 為最佳，代表實驗肢與對側正常肢完全一樣功能，-100 為最差，代表完全失去功能

(Bain et al., 1988)。

依據 Bain et al. 1988 年所發表之結果（即上述之結果）推論，本研究中大鼠所截斷之神經為脛骨神經，而由於脛骨神經為坐骨神經之分支，故其坐骨神經功能指數與脛骨神經功能指數數值應都會受影響而小於“0”；實際上，本研究之坐骨神經功能指數與脛骨神經功能指數結果的確符合 Bain et al.的理論。而在脛骨神經功能指數方面，依據 Bain et al. 的結果推論，當只有脛骨神經受傷時，腓骨神經功能指數數值應接近“0”，顯示腓骨神經沒有遭受傷害；但於本研究中，不論是實驗組或對照組，其腓骨神經功能指數皆呈現極不規律之分佈，此結果與 Bain et al.的結論不同。

腓骨神經功能指數之計算會受足印長度(print length)及趾間寬度(toe spread)影響，而足印長度依據 Bain et al.的研究結果顯示會同時受坐骨神經、脛骨神經及腓骨神經影響；所以即使腓骨神經與坐骨神經都沒有受損，一旦脛骨神經受損，則足印長度會變長，因而使腓骨神經功能指數受到影響。由本研究所得之結果顯示，假若欲以腓骨神經功能指數評估腓骨神經的功能，必須要先排除脛骨神經的影響，否則無法得到正確的結果；以 BMH 公式來評估腓骨神經功能的方法仍有待進一步的修正。

四、足底皮膚再生神經計數

由實驗組與對照組之足底皮膚再生神經計數統計結果來看，足底皮膚再生神經數，在實驗組與對照組之間皆無顯著差異。

足底皮膚固定時，採用 periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP)固定液而不採用其他固定液，乃是為了做足底皮膚之免疫化學染色之故。傳統的固定液（如 glutaraldehyde）會與組織中的蛋白質發生強烈的交互作用，通常因而破壞蛋白質抗

原，使得免疫化學染色的結果不佳。PLP 固定液中含有 periodate、lysine 及 paraformaldehyde，其中 periodate 與 lysine 的作用對象為碳水化合物而非蛋白質，故不會影響蛋白性抗原；而 paraformaldehyde 雖會對蛋白質與脂質產生作用，但因作用強度不強，仍能保留組織中多數之蛋白質抗原；所以使用 PLP 作為固定液，可使皮膚組織免疫化學染色的效果較好(Mclean and Nakane, 1974)。

免疫化學染色所採用之初級抗體(primary antibody) PGP 9.5，是用來對抗神經軸突標記物質(axonal marker) protein gene product 9.5 (PGP)。PGP 富含於神經組織，無論是無髓鞘化(unmyelinated)或髓鞘化(myelinated)神經，皆有 PGP 之存在。

大鼠足底皮膚組織，於進行免疫化學染色染出再生神經後，置於光學顯微鏡下觀察，在術後 40 及 60 天採樣之足底皮膚，無論是對照組或實驗組，其真皮層與表皮層皆可見再生之神經，而於術後 20 天採樣之皮膚組織，無論是對照組或實驗組，其表皮層與真皮層再生之神經數明顯的較 40 天與 60 天者少。由此可知大鼠足底皮膚神經再生數目有隨時間增加的趨勢。

五、脛骨神經再生軸突計數

由實驗組與對照組之脛骨神經再生軸突計數統計結果來看，脛骨神經再生軸突數，在實驗組與對照組之間皆無顯著差異。

將脛骨神經組織之厚切片置於光學顯微鏡下觀察，可見不同直徑大小之再生神經軸突的分佈並不一致。於神經組織橫切面中央之軸突，其直徑較大，而位於神經邊緣的軸突直徑則較小。此情形於實驗組及對照組皆相同。從統計結果來看，無論是實驗組或對照組，其組內 20、40 及 60 天所得的再生軸突數彼此之間有顯著差異，代表軸突再生數目隨時間之增加而有

上升的趨勢。

將足底表皮感覺神經測試結果及神經功能指數結果與足底皮膚再生神經計數及脛骨神經再生軸突計數結果相互對照比較，發現本研究中脛骨神經之功能恢復結果與神經軸突再生之結果一致，實驗組與對照組之間無法顯現顯著的差異。

周圍神經軸突是型態學上最常用來評估神經再生的部位。評估的方式有許多種，例如計算再生軸突的數目(axonal numbers)、直徑大小及髓鞘厚度(myelin thickness)。無論是何種評估方式，一般而言皆能提供合理且良好的訊息，反應出軸突再生的情形(Cabaud et al., 1980)。

六、FK506 對周圍神經軸突再生與功能恢復之影響

1994 年 Lyons 將 FK506 加於以 NGF(nerve growth factor)處理過之 PC12 pheochromocytoma cell culture 中，發現 FK506 可促進 PC12 cells 神經突之生長(Lyons et al., 1994)。1995 年 Gold 將 Sprague-Dawley 品系大鼠之坐骨神經以珠寶商鑷子夾傷，而後投與 FK506 (1 mg/kg) 並觀察神經軸突再生之情形。結果發現 FK506 可縮短神經功能恢復時間，對神經軸突再生有促進之效果(Gold et al., 1995)。由 Lyons et al. (1994)與 Bain et al.(1995)的研究結果，我們知道 FK506 除了極佳的免疫抑制效果外，可能也同時具有促進神經再生與神經功能恢復的作用。但實際上在進行肢體移植或再植時，神經卻是完全截斷再接的，故我們無法確實得知，在細胞培養模式或神經壓傷模式所觀察到之 FK506 對神經系統之影響，會同樣發生在截斷後吻合之神經。故本實驗中，採用同於 Gold et al.(1994)所用 FK506 劑

量(1 mg/kg body weight)及投藥方式(皮下注射), 探討 FK506 對截斷後吻合神經再生的影響。結果綜合本研究在表皮神經功能測試、步態研究、足底再生神經計數及脛骨神經再生軸突計數所得到的結果, FK506 對於大鼠截斷後再吻合神經之功能恢復與軸突再生並無促進的作用。

1943 年, Seddon 將神經損傷分為 3 種種類。第一種稱為 neurapraxia, 是神經損傷種類中最輕微者, 意指神經遭受壓縮損傷 (compression lesion), 其神經構造之傷害最大僅止於壓傷區域的髓鞘 (myelin sheath) 但無伴隨瓦勒氏變性 (Wallerian degeneration), neurapraxia 最快可於 3 至 6 個星期內復原。第二種稱為 axonotmesis, 意指神經遭受壓傷損傷 (crush injury), 軸突完整性遭到破壞且伴隨瓦勒氏變性發生, 但其神經纖維內膜 (endoneurium)、神經周膜 (perineurium) 及神經外膜 (epineurium) 依然完整, 增殖的許旺氏細胞可沿著完好的神經內膜管 (endoneurial tube) 生長, 形成連續性之管狀構造, 引導再生軸突之進入完成神經再生。當神經遭受此類傷害時, 其功能恢復之預後一般而言頗為良好。第三種稱為 neurotmesis, 是神經損傷種類中最嚴重者, 意指神經結構完全遭受破壞, 無論是神經軸突、神經纖維內膜、神經周膜或是神經外膜, 其連續性及完整性完全消失, 再生軸突必須跨越受傷區域, 進入神經遠端之 basal lamina tube 才能完成再生作用。此類神經傷害之功能恢復預後通常較差 (Bora et al., 1982, Omer, 1982, Castaldo and Ochoa, 1984)。

周圍神經在遭遇壓傷損傷 (crush lesion) 時, 其神經軸突外之 basal lamina tubes 的完整性並不會遭到破壞, 近端再生的軸突可沿著完整的 basal lamina tubes 順利再生進入遠端之目標器官, 不必跨越神經截斷時所產生之 "no-man's-land", 所以有較大的機會完成神經的再生, 恢復神經功能。而於截斷之神經, 其 basal lamina tubes 的完整性已失去, 軸突截斷處有 "no-man's-land" 的存在, 近端再生軸突要完成軸突的再生, 除了必須跨越 "no-man's-land" 障礙, 還必須能夠成功進入遠端的 basal lamina tubes, 才能繼續軸突的再生作用到達目標器官; 故神經截斷時, 由於軸突再生的阻礙較多, 其神經再生成功的機會自然較壓傷損傷時要小。

由本實驗所得的結果, 得知 FK506 在截斷後再吻合神經模式並無促進神經再生與神經功能恢復的作用, 此結論與 Gold et al. 研究所得之結果不符。造成此種差異的原因, 即有可能是因為所用之研究模式不同所造成。要瞭解是否是因為研究模式所造成的結果差異, 必須再次以脛骨神經重複 Gold et al. 之神經壓傷模式實驗, 假若 FK506 在脛骨神經壓傷模式同樣無法有促進神經再生的作用, 則 FK506 促神經軸突再生作用的理論將受到質疑。相反地, 假若 FK506 在脛骨神經壓傷模式有促進神經再生的作用, 則造成本次實驗結果 (FK506 無法促進截斷後再吻合脛骨神經再生) 的原因, 有可能是因為近端再生軸突欲跨越 "no-man's-land" 之難度遠大於 FK506 促進神經再生的好處, 因而遮蓋了 FK506 促進神經再生的效果。

雖然目前許多研究結果都指出 FK506 對於神經軸突再生有促進作用(Lons et al., 1994, Gold et al., 1994, Gold et al., 1995, Wang et al., 1997), 但亦有研究與本研究之結果相同, 指出 FK506 對於神經再生並無促進效果(Chang et al., 1995)。綜合眾多的研究結果, 無法統一指出 FK506 對周圍神經再生的影響是促進抑或減少; 且若 FK506 具促進神經軸突再生的能力, 其真正的作用機制又為何。

六、參考文獻

1. 侯勝茂、葉力森。顯微外科學。台北, 藝軒: 1991;213。
2. 葉力森 功能性複合組織移植於大鼠模式之研究。國立台灣大學獸醫學研究所博士論文。1995。
3. Allpress SJ, Pollock M. Morphological and functional effects of triiodothyronine on regeneration peripheral nerve. *Exp Neurol* 1986;91:382-391.
4. Bailes JE, Cozzens JW, Hudson AR. Laser-assisted nerve repair in primates. *J Neurosurg* 1989;71:266-272.
5. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989;83:129-138.
6. Benhaim P, Anthony JP, Lin LY, McCalmont TH, Mathes SJ. A long-term study of allogeneic rat hindlimb transplants immunosuppressed with RS-61443. *Transplantation* 1993;56:911-917.
7. Bora FW Jr, Osterman AL. Compression neuropathy. *Clin Orthop* 1982;163:20-32.
8. Bratton BR, Kline DG, Coleman W. Experimental interfascicular nerve grafting. *J Neurosurg* 1979;51:323-332.
9. Brooke R, Seckel MD. Enhancement of peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve* 1990;13:785-800.
10. Brown CJ, Evans PJ, Mackinnon SE. Inter- and intraobserver reliability of walking-track analysis used to assess sciatic nerve function in rats. *Microsurgery* 1991;12:76-79.
11. Brown CJ, Mackinnon SE, Evans PJ, Bain JR, Makino AP, Hunter DA, Hare GM. Self-evaluation of walking track measurement using a sciatic function index. *Microsurgery* 1989;10:226-235.
12. Cabaud HE, Rodkey WG, McCarroll HR Jr. Peripheral nerve injuries: Studies in higher non-human primates. *J Hand Surg* 1980;5:201-206.
13. Cameron AM, Steiner JP, Roskams AJ, Ali SM, Ronnett GV, Snyder SH. Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca^{2+} Flux. *Cell* 1995;83:463-472.
14. Cameron AM, Steiner JP, Sabatini DM, Kaplin AI, Walensky LD, Snyder SH. Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates calcium flux. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1784-1788.
15. Castaldo JE, Ochoa JL. Mechanical injury of peripheral nerves. Fine structure and dysfunction. *Clin Plast Surg* 1984;11:9-16.
16. Chang HY, Takei K, Sydor AM, Born T, Rusnak F, Jay DG. Asymmetric retraction of growth cone filopodia

- following focal inactivation of calcineurin. *Nature* 1995;376:686-690.
17. Connolly JL, Seeley PJ, Greene LA. Regulation of growth cone morphology by nerve growth factor: a comparative study by scanning electron microscopy. *J Neurosci Res* 1985;13:183-198.
 18. De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 1982;77:634-643.
 19. De Medinaceli L, Seaber AV. Experimental nerve reconnection: importance of initial repair. *Microsurgery* 1989;10:56-70.
 20. Foehring RC, Sybert GW, Munson JB. Properties of self-reinnervated motor units of medial gastrocnemius of cat. Axotomized motoneurons and the time course of recovery. *J Neurophysiol* 1986;55:947-965.
 21. Gibby WA, Koerber HR, Horch KW. A quantitative evaluation of suture and tubulization nerve techniques. *J Neurosurg* 1983;58:574-579.
 22. Gold BG, Katoh K, Storm-Dickerson T. The immunosuppressant FK506 increase the rate of axonal regeneration in rat sciatic nerve. *J Neurosci* 1995;15:7509-7516.
 23. Gold BG. FK506 and the role of immunophilins in nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 1997;15:285-306.
 24. Goto T, Kino T, Hatanaka H, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. FK506: historical perspectives. *Transplant Proc* 1991;23:2716-2717.
 25. Grabb WC, Bement SL, Koepke GH, Green RA. Comparison of methods of peripheral nerve suturing in monkeys. *Plast Reconstr Surg* 1970;46:31-38.
 26. Grafstein B, McQuarrie JG. Role of the nerve cell body in axonal regeneration, in Cotman CW(ed): *Neuronal Plasticity*. New York, Raven Press, 1987pp 155-196.
 27. Greene AS, Lombard JH, Cowley AW Jr, Hansen-Smith FM. Microvessel changes in hypertension measured by *Griffonia simplicifolia* I lectin. *Hypertension* 1990;15:779-783.
 28. High KP. The antimicrobial activities of cyclosporine, FK506, and rapamycin. *Transplantation* 1994;57:1689-1700.
 29. Horowitz SH. Therapeutic strategies in promoting peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve* 1989;12:314-322.
 30. Ishii DN. Relationship of insulin-like growth factor II gene expression in muscle to synaptogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2898-2902.
 31. Jenq CB, Coggeshall RE. Numbers of regenerating axons in parent and tributary peripheral nerves in the rat. *Brain Res* 1985;61:43-48.
 32. Jusko WJ. Analysis of tacrolimus (FK506) in relation to therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 1995;17:596-601.
 33. Kilmer SL, Carlsen RC. Forskolin activation of adenylate cyclase in vivo stimulates nerve regeneration. *Nature* 1984;307:455-457.
 34. Kino T, Goto T. Discovery of FK-506 and update. *Ann NY Acad Sci* 1993;685:13-21.
 35. Kobayashi J, Mackinnon SE, Watanabe O, Ball DJ, Gu XM, Hunter DA, Kuzon WM. The effect of duration of muscle denervation on functional recovery in the

- rat model. *Muscle Nerve* 1997;12:858-866.
36. Lindholm D, Hengerer B, Zafra F, Thoenen H. Transforming growth factor- β 1 stimulates expression of nerve growth factor in the rat CNS. *Neuro Report* 1990;1:9-12.
 37. Liu J. FK506 and cyclosporine, molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunol Today* 1992;14:290-295.
 38. Lyons WE, Gorge EB, Dawson TM, Steiner JP, Snyder SH. Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3191-3195.
 39. Lyons WE, Steiner JP, Snyder SH, Dawson TM. Neuronal regeneration enhances the expression of the immunophilin FKBP-12. *J Neurosci* 1995;15:2985-2994.
 40. Madison R, da Silva CF, Dikkes P, Chiu TH, Sidman RL. Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin-containing gel. *Exp Neurol* 1985;88:767-772
 41. Maragh H, Hawn R, Gould JD, Terzis JK. Is laser nerve repair comparable to microsuture coaptation? *J Reconstr Microsurg* 1988;4:189-195.
 42. McLean IW, Nakane PK. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative: a new fixative for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1974;22:1077-1083.
 43. Morris RE. Mechanism of action of new immunosuppressive drugs. *Ther Drug Monit* 1995;17:564-569.
 44. Nishihira S, McCaffrey TV. Repair of motor nerve defects: comparison of suture and fibrin adhesive techniques. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1989;100:17-21.
 45. Omer GE Jr. Results of untreated peripheral nerve injuries. *Clin Orthop* 1982;163:15-19.
 46. Orgel MG, O'Brien WJ, Murray HM. Pulsing electromagnetic field therapy in nerve regeneration: an experimental study in the cat. *Plast Reconstr Surg* 1984;73:173-183.
 47. Parsons WH, Sigal NH, Wyvratt MJ. FK-506 -- A novel immunosuppressant. *Ann NY Acad Sci* 1993;685:22-36.
 48. Pleasure D, Bora FW Jr, Lane J, Prockop D. Regeneration after nerve transection: Effect of inhibition of collagen synthesis. *Exp Neurol* 1974;45:72-78.
 49. Rosen JM, Pham HN, Hentz VR. Fascicular tubulization: a comparison of experimental nerve repair techniques in the cat. *Ann Plast Surg* 1989;22:467-478.
 50. Skene JH, Jacobson RD, Snipes GJ, McGuire CB, Norden JJ, Freeman JA. A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membrane. *Science* 1986;233:783-786.
 51. Terris DJ, Fee WE Jr. Current issue in nerve repair. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119:725-731.
 52. Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanism. *Ther Drug Monit* 1995;17:584-591.
 53. Varon S, Adler R. Trophic and specifying factors directed to neuronal cells. *Adv Cell Neurobiol* 1981;2:115-163.

54. Vita G, Dattola R, Girlanda P, Oteri G, Li Presti F, Messina C. Effects of steroid hormones on muscle reinnervation after nerve crush in rabbit. *Exp Neurol* 1983;80:279-287.
55. Wallemacq PE, Reding R. FK506 (Tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biochemical, and analytical aspects. *Transplantation* 1993;39:2219-2228.
56. Wang MS, Zeleny-Pooley M, Gold BG. Comparative dose-dependency study of FK506 and cyclosporin A on the rate of axonal regeneration in rat sciatic nerve. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282:1084-1093.
57. Wang T, Donahoe PK, Zervos AS. Specific interaction of type I receptors of the TGF β family with the immunophilin FKBP-12. *Science* 1994;265:674-676.
58. Wang T, Li B, Danielson PD, Rockwell S, Lechleider RJ, Martin J, Manganaro T, Donahoe Pk. The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF β family type I receptors. *Cell* 1996;86:435-444.
59. Whitnall MH, Grafstein B. Perikaryal routing of newly synthesized proteins in regenerating neurons: Quantitative electron microscopic autoradiography. *Brain Res* 1982;239:41-56.
60. Wiesenfeld-Hallin Z. Partially overlapping territories of nerves to hindlimb foot skin demonstrated by plasma extravasation to antidromic C-fiber stimulation in the rat. *Neurosci Lett* 1988;84:261-265.
61. Williams LR, Varon S. Modification of fibrin matrix formation in situ enhances nerve regeneration in silicone chambers. *J Comp Neurol* 1985;231:209-220.
62. Yeh LS, Gregory CR, Griffey SM, Lecouter RA, Hou SM, Morris RE. Combination leflunomide and cyclosporine prevents rejection of functional whole limb allografts in the rat. *Transplantation* 1997;64:919-922.

[1]