

去抗原同种异体静脉套接修复兔面神经损伤

史志东¹, 刘明旺¹, 王琴梅², 秦忠宗¹, 郭英¹, 何海勇¹, 喻中和³
(中山大学 1. 附属第三医院神经外科, 广东 广州 510630; 2. 附属第一医院人工心实验室,
广东 广州 510080; 3. 附属第三医院动物实验中心, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】以经生物工程处理的静脉导管为支架,应用兔为动物实验对象,观察该方式修复面神经损伤的特点。【方法】54只新西兰大白兔,每只实验兔分别应用静脉导管及自体神经移植吻合修复面神经损伤,手术前行大体观察、生物机能实验系统记录神经动作电位、切片组织学检查。【结果】活体动物手术后观察,静脉导管侧胡须运动、上唇口轮匝肌运动及其运动幅度比自体神经组稍多;生物机能实验系统记录神经动作电位,术后10周和15周时静脉导管侧和自体神经侧均可引出神经动作电位,静脉导管侧的神经传导速度平均值均高于自体神经侧;术后10周,各兔再生神经组织化学染色,静脉导管侧的再生有髓神经纤维分布密集,并见分裂成熟的面神经结构,自体神经侧染色的神经纤维分布稍稀疏,再生的有髓神经结构不完全成熟。【结论】利用生物性天然静脉导管,经生物工程技术处理,克服了天然生物材料引起宿主的免疫排斥反应,比应用自体神经移植更有利于促进神经再生和功能恢复。

关键词: 生物工程; 静脉导管; 修复; 面神经损伤

中图分类号:R741 文献标识码:A 文章编号:1672-3554(2008)05-0546-04

Experiment with a Venous Conduit of Allogeneic and De-antigen Vein to Repair Rabbit Facial Nerve Injury

SHI Zhi-dong¹, LIU Ming-wang¹, WANG Qin-mei², QIN Zhong-zong¹,
GUO Ying¹, HE Hai-yong¹, YU Zhong-he³

(1. Department of Neurosurgery, The Third Affiliated Hospital; 2. Laboratory of Cardiology and Angiology, The First Affiliated Hospital, 3. Animal Laboratory, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 The repair of the facial nerve injury of rabbits was explored by using the venous conduits. 【Methods】 The facial nerve injury of fifty-four male New Zealand rabbits were treated by venous conduits and auto nerve grafts. After operations, the macroscopic observations, detections of nerve action potentials and histological evaluations on rabbits were performed. 【Results】 Macroscopic findings: The frequency and amplitude of movements of vibrissae and orbicularis oris muscle of the upper lip were improved a little in the sides of venous conduits compared with that in the sides of autografts. Electrophysiological examinations: nerve action potentials could be detected in both sides of venous conduits and autografts at 10 weeks and 15 weeks postoperatively, respectively. The mean velocity of nerve conduction in the sides of venous conduits was greater than that in the sides of autografts. Histologic examinations: at 10 weeks postoperatively, in the sides of venous conduit, regenerated myelinated nerve fibers were distributed densely with mature facial nerve structure. While in the sides of autografts, regenerated nerve fibers were distributed sparsely with immature myelinated nerve structure. 【Conclusion】 The natural venous conduit processed by bioengineering technology addresses the immunologic rejection of the host, and offered greater promotion in regard to regeneration and functional recovery of nerves compared with autologous nerve grafts.

Key words: bioengineering; venous conduit; repair; facial nerve injury

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(5): 546-549; 561]

收稿日期: 2008-03-18

基金项目: 广东省科技计划项目(2007Z3-D2031); 广州市科技计划项目(2006C13G0091)

作者简介: 史志东(1962-), 男, 辽宁鞍山人, 副教授, 硕士生导师, 课题负责人, 主要从事生物型神经外科植入、再生材料的研制, E-mail: shizhidong2@163.com

面神经损伤可并发于岩骨骨折,也可为桥脑、小脑脚肿瘤或颅底肿瘤手术引起^[1-3]。面神经是面部肌肉主要的运动神经,对维持面部在静态、动态的匀称和面部表情的产生具有重要作用。面神经损伤引起眼睑闭合不全、面肌瘫痪、萎缩,最终引起失明、面部畸形,严重影响面部美观、功能及患者的日常生活及社会活动。面神经损伤后再生是一个复杂的过程,涉及生物、生理、化学等诸多因素,人们尚未对这一过程彻底解决。近几十年来,随着显微外科技术的日趋完善,神经吻合术等修复面神经横断伤的方法达到了前所未有的精确程度,并且也包括神经损伤后通过神经移植,但仍有相当一部分面瘫病人的面神经恢复不满意,靠外科技的发展来取得完美的面神经功能恢复,余地已相当小。目前,天然生物导管已成为面神经修复的热门材料之一。本研究采用去抗原同种异体静脉套接修复兔面神经缺损。

1 材料和方法

1.1 材料

2007年5月-2007年11月,采用雄性新西兰纯种大白兔54只,体质量1.5~2.0 kg,由中山大学医学实验动物部提供,每只动物的左右双侧手术,左侧为静脉导管侧(实验组),右侧为自体神经侧(对照组);术后再按5、10和15周分为3个时间点,每个时间点解剖18只动物。

1.2 方法

1.2.1 静脉导管的制备 速眠新0.2~0.3 mL/kg肌肉注射;加入阿托品0.2 mL/kg肌肉注射维持麻醉。麻醉后,取长15 mm的面后静脉为导管原材料,经过环氧去抗原、增韧及表面修饰处理后,备套接神经断端,36℃环氧乙烷消毒12 h后备用,图1^[4]。

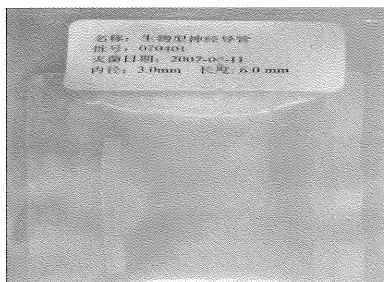


图1 已经环氧乙烷消毒的包装静脉导管

Fig.1 Packaged venous conduit sterilized by Epoxyethane

1.2.2 手术方法 静脉导管侧:①麻醉后,将动物侧卧于手术台上固定,手术区备皮、消毒、铺巾。②在面部于左眼睑缘下方1.5 cm处做横行切口,切开皮肤及皮下组织,锐性分离至嚼肌筋膜,可见面神经颊支平行于皮肤切口,走行于筋膜内。将下颊支游离出约3 cm长,于中部切除1.2 cm长的神经,制成因神经向两侧退缩而形成的1.5 cm长的神经缺损。③取已制备去抗原的静脉导管1.5 cm,显微镜下9-0无损伤针线将导管与神经断端外膜缝合2~4针,分层缝合肌肉和皮肤^[5]。自体神经移植吻合侧:采用上述方法将右侧自体面神经下颊支切断,取同一动物左侧已切取的面神经干,移植后行端端缝合作为对照。术后常规青霉素抗感染治疗3 d。术后每天肉眼观察动物饮食、触须活动及伤口愈合情况,分别在术后5、10和15周大体观察解剖修复后的面神经颊支,游离出再生室及其两端神经共约25 mm长,把周围组织清除干净,观察静脉导管外观结构变化、再生神经的形态、导管和周围肌肉组织的关系。

1.2.3 电生理检查 标本在任氏液中静置20 min后,再置于神经标本屏蔽盒内。在神经干上放置2对记录电极(R1、R1'和R2、R2'),此时屏蔽盒R1到R2的长度为距离 d ;动作电位从R1传导到R2的时间为时间 t 。启动MedLab生物信号采集处理系统,设置实验参数为:采样间隔25 μ s,放大倍数 $\times 200$,全通滤波1 kHz,主周期刺激,脉冲数1,波宽0.1 ms,延时10 ms,间隔60 ms,用70%的最大刺激强度作为刺激强度,记录神经干动作电位的幅值(A)与时程(t),按公式 $v=d/t$ 计算出动作电位传导速度(m/s)。每次实验时,将初始记录和测量到的动作电位传导速度定为动作电位传导速度的基础值(0 min),而后取出神经按实验分组分别放入任氏液和相应浓度的葡萄糖、甘露醇、山梨醇溶液中浸泡3~4 min后,置于神经标本屏蔽盒原来的位置上,连续观察60 min。

1.2.4 组织学观察 取神经桥接体连同桥接部远、近各5 mm组织,置于40 g/L的多聚甲醛溶液中固定24 h,逐级乙醇脱水,浸蜡后包埋,用LEICA切片器分别作纵切片和横断切片,片厚5 μ m。

1.2.5 统计学处理 实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用SPSS统计软件包ANOVA程序进行统计学处理。每组各时间点与其0 min的比较及每一时间点各高渗溶液组与对照组的比较采用方差分析和 q 检

验,取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 实验动物数量分析

实验共纳入雄性新西兰纯种大白兔 54 只,动物实验期内无死亡,全部实验动物纳入结果分析。

2.2 肉眼观察

术后动物两侧的面部运动均发生障碍,下唇口轮匝肌不能运动。静脉导管侧术后 5 周,54 只实验动物中,有 41 只可见较明显的口轮匝肌运动;术后 10 周,静脉导管侧见明显口轮匝肌运动,面部运动恢复良好,较多联带运动。自体神经侧术后 5 周,仅见 4 只动物术侧有下唇口轮匝肌轻微运动,术后 10 周,自体神经侧动物均见上唇口轮匝肌运动,运动幅度不及静脉导管侧,并联带运动较少。

术后 5 周,切开静脉导管侧的再生室,直观室内的神经再生情况,静脉导管已变薄,表面有菲薄的血管膜形成,导管与周围肌肉无明显粘连;切断导管见中央有细小的新生轴索通过。再生室内有明显的再生神经纤维沿再生室内壁生长,与内壁结合不牢固,质地稍韧,神经干纤细。自体神经移植段神经干表面纤维样组织形成,与周围组织轻度粘连,神经表面反应性水肿。术后 10 周:肉眼可见静脉导管侧的神经导管呈膜状结构包绕再生神经,再生神经粘连于口轮匝肌肌肉缘,用镊子可将神经和肌肉分离,且兔口轮匝肌肌肉较自体神经侧色深和粗大,纵行剖开静脉导管见再生神经与两断端神经连接,与 5 周时再生神经比较增粗,质地坚韧,中段较两端略细。自体神经侧修复再生神经干被瘢痕组织包裹,较粗大并与周围肌肉粘连,神经轮廓结构不清,两端吻合口处明显膨大。

2.3 电生理测试

10 周和 15 周时静脉导管和自体神经侧均可引出神经动作电位,静脉导管侧的神经传导速度平均值均高于自体神经侧。表 1 为以正常神经干为对照组,分别与静脉套管和自体神经吻合的电生理比较。

2.4 组织学观察结果

术后 10 周,苏木素-伊红染色,静脉导管侧再生的面神经纤维纵切,该神经主要由有髓神经纤

表 1 三组实验对象神经干动作电位传导速度的对比表

Groups	n	stem's action potential ($\bar{x} \pm s$, m/s)			
		0 min	10 min	30 min	60 min
Control	6	37.1 ± 2.2	37.4 ± 2.3	37.9 ± 1.8	38.3 ± 2.6
Venous conduit	6	33.1 ± 1.0	31.3 ± 1.2 ²⁾	25.8 ± 1.5 ^{1),3)}	19.2 ± 2.0 ^{1),3)}
Autogenous nerve	6	32.8 ± 2.7	31.1 ± 6.5	22.1 ± 4.2 ^{1),3)}	11.6 ± 3.9 ^{1),3)}

Compared with 0 min, 1) $P < 0.01$; compared with the same time point, 2) $P < 0.05$, 3) $P < 0.01$

维组成,每条神经由神经元轴突及外周的施万细胞形成的髓鞘构成。朗氏结处的结构清晰,可见一条深染的轴突穿行于中央,轴突外面的髓鞘脂类物质被溶解而呈空白区,扁平的施万细胞位于纤维的周边。朗氏结是两个施万细胞相邻处,此处无髓鞘而呈缩窄状。自体神经侧染色的神经纤维分布稍稀疏,再生的有髓神经结构不完全成熟,未见典型的有髓神经结构组织学形态(图 2)。

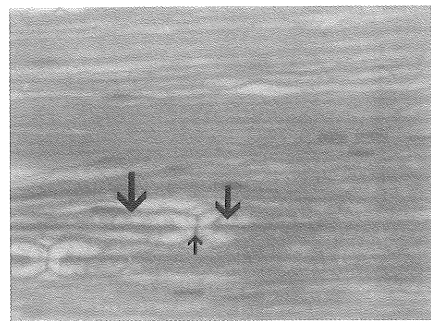


图 2 面神经管侧纵切

Fig. 2 Longitudinally split venous conduit

HE staining, with well split axon cross its center; Axon, peripheral Schwann cells and Ranvier node structure were distinct; $\times 400$

3 讨论

早期的神经修复导管应该是硅胶管,但很快人们发现硅胶材料不能自动降解,易引起组织炎症反应。在硅胶管之后,有人用可降解的人工材料,如多聚乳酸(PLA),多聚葡萄糖酸(PGA)。近年来,有许多人试图用天然生物材料,如动脉、静脉、脱钙骨管,显然天然生物材料可能优于人工材料,但这些天然生物材料的导管易引起宿主的免疫排斥反应,该反应是目前限制了天然生物材料应用的瓶颈。

有研究者等用硅胶管成功使鼠坐骨神经再生

跨越 10 mm 缺损, 新生神经传导速度达正常的 60%^[6]。刘亚瑞等将硅胶管用于兔面神经上颊支的再生修复, 其 5、10 周再生成功率分别为 67.8% 和 57.7%。但人们认为硅胶管无通透性, 虽阻止了神经断端间神经营养因子等物质外渗, 同时也阻止了外周有利神经营养的物质内渗^[7]。另有试验结果表明, 神经在半渗透性管中的生长情况优于不能渗透的硅胶管, 并且硅胶不能自动降解的易引起组织炎症反应及结缔组织反应, 易压迫神经或因缝合不牢而移位^[5]。现普遍认为, 不能降解又无通透性的硅胶导管用于大于 10 mm 的缺损时, 若无额外的神经营养因子存在时, 则不能有效使神经再生^[8]。

在硅胶管之后, 有人用可降解的人工材料用于制造神经导管, 人们希望能找到某些材料, 能在神经再生时作为人工室的导管, 如较早期 PLA, PGA 或两者之间的混合物(PLGA)^[9]。国内则对几丁质材料的神经导管用于神经修补研制较多。该材料在神经再生结束时能自动降解掉, 这些材料能根据需要随意制成各种长度、厚薄和直径的管子, 其具有适宜的通透性^[10]。近些年来, 又有许多人用生物可降解的天然材料, 如神经基地膜管、肌纤维基地膜管、动脉、静脉、脱钙骨管、人羊膜管取代硅胶管^[11-13]。许多人将移植神经反复冻融后所得到的神经基地膜管来修复神经缺损, 取得了不亚于神经移植的治疗效果。Keynes 等用变性骨骼肌桥接神经缺损, 发现神经可成功的通过骨骼肌基地膜管跨越损伤间隙, 重新支配终末器官。国内许家军等则用自体静脉套接修复大鼠面神经缺损, 经辣根过氧化物酶(HRP)逆向示踪法等的结果表明, 静脉管比神经移植更能促进面神经再生轴突的定向生长^[14,15]。显然上述的天然生物材料优于人工材料, 但这些天然生物材料易引起宿主的免疫排斥反应。

静脉导管经历了从硅胶管到可降解人工材料管, 再到天然生物可降解管的发展过程。其中天然生物材料可降解管具有适宜的通透性, 在完成引导神经的再生任务后可生物降解。而利用生物可降解管可通过将神经营养因子在导管内壁种植转基因许旺细胞等, 把神经导管修复与各种生物因素及基因工程技术结合, 克服掉天然生物材料引起宿主的免疫排斥反应, 共同促进神经再生和功能恢复^[6,14]。我们在先前成功联合研发生物型硬脑

膜修补材料的良好基础上, 应用一种高反应活性的环氧化物作动物组织的交联固定试剂, 该物质与蛋白分子形成稳定的交联键, 此方法彻底去抗原, 无毒性, 从而可能解决天然生物导管引起宿主的免疫排斥反应。

参考文献:

- [1] Nakayama K, Takakuda K, Koyama Y, et al. Enhancement of peripheral nerve regeneration using bioabsorbable polymer tubes packed with fibrin gel[J]. *Artif Organs*, 2007, 31(7):500-508.
 - [2] 史志东, 胡裕全, 谷力加, 等. 动脉灌注联合口服治疗脑胶质瘤[J]. *中山医科大学学报*, 1998, 19(3):217-219.
 - [3] 杨伟文, 陈兵, 赵革灵. 锁孔开颅术处理桥小脑角区肿瘤的研究[J]. *中华神经医学杂志*, 2005, 4(12):1228-1230.
 - [4] 史志东, 郭英, 王昆, 等. 新型人工硬脑膜和自体膜的对比实验研究[J]. *中华神经医学杂志*, 2006, 5(6):589-593.
 - [5] Lloyd BM, Luginbuhl RD, Brenner MJ, et al. Use of motor nerve material in peripheral nerve repair with conduits[J]. *Microsurgery*, 2007, 27(2):138-145.
 - [6] Ignatiadis IA, Yiannakopoulos CK, Barbitsioti AD, et al. Diverse types of epineural conduits for bridging short nerve defects. An experimental study in the rabbit[J]. *Microsurgery*, 2007, 27(2):98-104.
 - [7] Sinis N, Schaller HE, Schulte-Eversum C, et al. Nerve regeneration across a 2-cm gap in the rat median nerve using a resorbable nerve conduit filled with Schwann cells[J]. *J Neurosurg*, 2005, 103(6):1067-1076.
 - [8] Pfister BJ, Iwata A, Taylor AG, et al. Development of transplantable nervous tissue constructs comprised of stretch-grown axons[J]. *J Neurosci Methods*, 2006, 153(1):95-103.
 - [9] Mohanna PN, Terenghi G, Wiberg M. Composite PHB-GGF conduit for long nerve gap repair: a long-term evaluation[J]. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 2005, 39(3):129-137.
 - [10] Lee DY, Choi BH, Park JH, et al. Nerve regeneration with the use of a poly (l-lactide-co-glycolic acid)-coated collagen tube filled with collagen gel [J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2006, 34(1):50-56.
 - [11] Dresner HS, King TA, Clark HB, et al. Peripheral facial nerve regeneration using collagen conduit
- (下转第 561 页 to page 561)