维普资讯 http://www.cqvip.com

中国局解手术学杂志 2003年第12卷第1期
Chin J Regional Anat & Operative Surg, 2003, Vol.12, No.1

血浆冷存的异体神经移植对神经再生影响的实验研究

石 强* 任明奎* 尚宇阳* 王春渤* 辛畅泰* 杨晓霞** 李晓军***

【摘 要】 目的 用经动物血浆处理后冷存的异体神经移植体，缝接神经缺损，提高神经再生。方法 用15只兔左、右肢正中神经30条，分别切除2.5 cm为实验材料，动物分两组：A组15条神经用经受体动物血浆浸泡冷冻处理的异体神经移植为实验组，B组15条神经只经冷冻处理的异体神经缝接，术后不同时间，采用光、电镜组织学，图像分析仪测定，神经外周粘连定量测定和电生理指标等观察。结果 (1)A组再生神经纤维在数量上和直径上均明显较B组的多而粗($p<0.03$)；(2)A组神经缝合段的结缔组织增生和与其外周组织粘连程度均较B组轻($p<0.01$)。结论 经受体血浆处理后冷存的异体神经移植体，有提高神经再生的作用。

【关键词】 周围神经；血浆冷冻；异体神经移植；兔

Experimental study of the effect of pre-freezing treatment with immersed heterogenous transplant in recipient blood plasma on regeneration of allogenic nerve graft *Shi Qiang, Ren Mingkui, Shang Yuyang, et al. Department of Handsurgery, Central Hospital of Shenyang, Shenyang* 110024

【Abstract】 **Objective** To study the effect of pre-freezing treatment with immersed heterogenous transplant in recipient blood plasma on regeneration of allogenic nerve graft. **Methods** A total of 30 left and right median nerves were excised by 2.5 cm, and the excised nerves were anastomosed with hetero-median nerve. Animals were divided into two groups. In group A 15 median nerves were injured. All the excised nerves were immersed in receptor blood plasma for 20 minutes, then were only stored in −196℃ liquid nitrogen for 21 days; after the excised nerves recovered to room temperature. In group B 15 median nerves were injured, all the excised nerves were only stored in −196℃ liquid nitrogen for 21 days; after the excised nerves recovered to room temperature. In the different time after operation, microscopic observation, Luzex-F image pattern analysis instrument determination, quantitative determination of adherent amount around nerve and electro-physiological index examination were analysed. **Results** (1) The myelinated nerve fiber in neural transplant segment and the distal segment of A group were more and thicker than the B group in both number and diameter($p<0.05$). (2) Proximal suture region of A group was less adhesion to peripheral tissue than B group ($P<0.01$). **Conclusion** Heterogenous transplant in recipient animal plasma is ability to accelerate the neuron regeneration.

【Key words】 Peripheral nerve; Blood plasma freezing; Nerve allograft; Rabbit

异体神经移植的研究，虽不断有新的进展，但是迄今依然未能取代自体神经而用于临床，究其原因固其很多，本文认为受体动物对异体神经移植体的免疫排斥反应和结缔组织增生快于神经再生，可能是其中一个重要的因素。为此，本实验试图将异体神经移植体经受体血浆冷冻前处理后再移植，从而可能会推迟排斥反应和抑制结缔组织增生干扰神经再生的目的。材料与方法

一、动物与分组

从中国医科大学动物饲养中心选购的雌、雄兼有的体重2500～3000 g健康的大耳白兔15只。用其左、右肢各15条正中神经总共30条，分别切除2.5 cm，用切下来的异体正中神经缝接，同体左、右肢神经互为实验和对照作为实验材料。实验分为两组，A组左肢15条正中神经缺损处，均用经受体动物血浆浸泡20 min、−196℃液氮冷存21 d，室温下复温的异体正中神经缝接为实验组，B组右肢15条正中神经缺损处只用−196℃液氮冷存21 d室温下复温的异体正中神经缝接为对照组。

二、观察指标

分别取术后56 d、90 d和180 d左、右前肢正中神经移植部位和屈腕肌等，进行不同指标观察：

1.病理组织学观察：将术后不同时间切取的神经移植部位的一部分材料，分成神经近段(正常神经部位)，神经远段(再生神经部位)，神经移植段和神经远、近缝合段等5个部分，并常规制成H.E、Mallory染色连续切片，锇酸髓鞘染色切片标本，另一部分材料用2.5%戊二醛二甲砷酸钠缓冲液固定，1%锇酸后固定，环

* 作者单位：110024 沈阳市中心医院手外科
** 沈阳医学院病理解剖教研室
*** 辽中县人民医院外科

维普资讯 http://www.cqvip.com

氧树脂包埋,铀、铅双重染色制成电镜切片标本。主要观察神经纤维和结缔组织的结构和数量上的差异。

2.Luzex－F图像分析仪测定:在神经近段(正常神经部位)和神经远段(神经再生部位)的锇酸髓鞘染色横断面(有髓神经纤维被染成大小不等的圆圈状)标本上,各数左上、左下、右上、右下和中央各5个视野的有髓神经纤维数量和密度,再求出同一平均面积的有髓神经纤维数量,最后进行统计学方差分析。

3.神经远、近端缝合段外周粘连定量测定:按照汤锦波等方法[8],定量测定术后56 d A与B两组神经远、近端缝合段外周粘连程度的差异。

4.电生理指标测试:用Keypoint肌电图诱发电位仪测定术后180 d A组与B组正中神经支配的屈腕肌的潜伏期及波幅,以对比A与B两组神经传导速度与有效神经纤维数量的差异。

结　果

一、组织学及超微结构观察

1.显微镜下观察:在术后180 d各组锇酸髓鞘染色切片上,可见A组神经移植段和神经远段的有髓神经纤维,在数量上和直径上均明显较B组的多而粗(图1,2),A组神经移植段神经纤维间的结缔组织明显少于B组,特别是在Mallory染色标本上更为明显,A组神经远、近端缝合段的结缔组织增生明显少于B组(图3,4)。

2.透射电镜观察:在透射电镜切片上,虽然都能看到有髓与无髓神经纤维存在,但A组神经远段的有髓神经纤维明显较B组的髓鞘厚,板层清楚且染色较深等不同,表明A组的神经纤维再生发育程度明显优于B组(图5,6)。

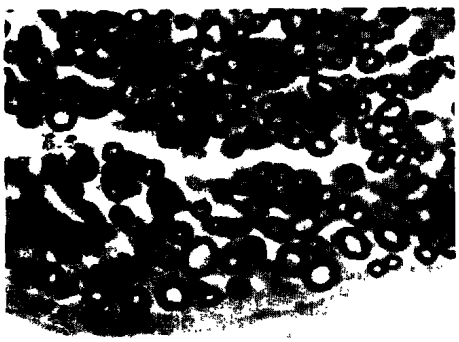


图1　术后180 d A组神经远段
(OSO4染色×200)

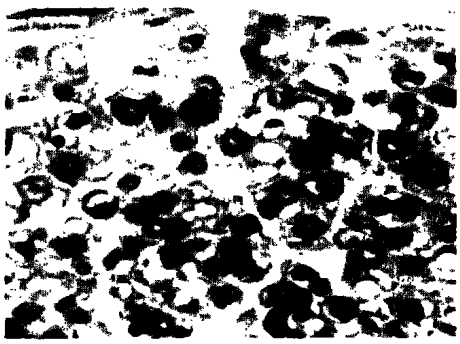


图2　术后180 d B组神经远段
(OSO4染色×200)



图3　术后90 d A组神经近段缝合段
(Mallory染色×200)



图4　术后90 d B组神经近段缝合段
(Mallory染色×200)



图5　术后180 d A组神经远段
(TEM ×8000)



图6　术后180 d B组神经远段
(TEM×8000)

二、Luzex-F图像分析仪测定

术后90 d,A与B两组神经远与近段的有髓神经纤维数量比例是:A组为5.5:1.0,B组的比例为8.4:1.0,表明A组的神经再生有髓神经纤维数量明显多

维普资讯 http://www.cqvip.com

于B组($p<0.05$),存在明显差异。术后180 d两组再生有髓神经纤维差异见表1。

表1 术后180 d的有髓神经纤维数量测定($\bar{x}\pm s$,条)

组别	神经数	神经近段	神经远段
A组	6	683±176	311±65
B组	6	776±147	207±66

注:两组比较,$P<0.05$

从表1显示,经受体动物血浆冷存的异体神经移植段的A组,其再生有髓神经纤维数量明显优于B组,存在显著差异($p<0.05$),表明经受体动物血浆浸泡处理后冷冻的异体神经移植体,有提高神经再生作用。

三、神经外周组织粘连定量测定

表2 术后56 d神经近端缝合段与外周结缔组织粘连定量测定

组别	神经数	轻(%)	中(%)	重(%)
A组	6	3(50)	2(33.4)	1(16.7)
B组	6	0	1(16.7)	5(83.3)

注:两组比较,$p<0.01$

由表2显示,用经受体动物血浆浸泡处理后冷冻的异体神经移植明显较只冷冻的神经外周粘连程度轻,其结果有显著差异($p<0.01$)。

四、电生理指标:

表3 术后180 d屈腕肌肌电的测定

组别	动物数	潜伏期	波幅
A	6	$2.5133\pm0.7737^{*}$	$14.5500\pm4.1644^{\triangle}$
B	6	4.3350 ± 0.5395	8.6283 ± 3.3675

注:两组比较,$^{*}p<0.001$,$^{\triangle}p<0.05$

由表3显示,B组的潜伏期较A组明显延长,具有显著差异($p<0.001$),表明经受体动物血浆浸泡处理后冷冻的异体神经移植体神经传导明显较只经冷冻的快。(2)B组波幅较A组低,差异显著($p<0.05$),表明A组有髓神经纤维较B组的多,证明A组神经功能恢复明显优于B组。

讨 论

大量异体神经移植研究,虽不断取得新进展,迄今依然由于异体神经移植体被免疫排斥反应而引起的结缔组织增生所替代,神经再受阻而失败,尚未能替代自体神经而用于临床[1-4],究其原因很多,本文认为免疫排斥反应引起结缔组织增生快于神经再生,可能是其中一个重要因素,为此试图在经动物受体血浆浸泡和冷冻前处理的异体神经移植体[5],缝接神经缺损处,期望能推延受体对神经移植体的免疫排斥反应和结缔组织增生的干扰,从而达到提高神再生的目的。本实验证明:(1)用受体血浆浸泡20 min,-196 ℃液氮冷存21 d的同种异体神经移植体,缝接正中神经的A组明显较只用-196℃液氮冷存21 d神经移植体的B组再生神经纤维多,具有显著意义[6]($p<0.05$)。(2)A组正中神经支配的屈腕肌潜伏期和波幅均分别明显较B组的短($p<0.001$)和高($p<0.05$)。(3)A组神经移植段神经纤维间的和神经远、近端缝合段神经纤维间的结缔组织含量及其与外周结缔组织粘连程度,均明显较B组的少而轻($p<0.01$)。由此作者提出经受体动物血浆浸泡,液氮冷存和室温下复温的同种异体神经移植体,修复神经损伤,有明显促进神经再生(形态和功能)的作用。这可能与推迟或减轻结缔组织增生,有利于雪旺氏细胞形成Büngner's带有关。受体血浆冷冻前处理的异体神经移植体,可能具有降低其抗原性,又有推迟受体的免疫排斥反应的作用,从而减少结缔组织增生的干扰。受体血浆对神经再生的作用机理,尚有待进一步深入研究和探讨。

参 考 文 献

1. Singh R, Vriesendrop HM, Mechelse K, et al. Nerve allografts and histocompatibility in dogs. J Neurosurg, 1977,47:737.
2. Bain JR. The peripheral nerve allograft: an assessment of regeneration across nerve allografts in rats immunosuppressed with cyclosporina. Plast Reconstr Surg, 1988,82:1052.
3. Comtet JJ, Revillard JP, Margonari J. Nerve allografts. In: Touraine J, Trageer J, eds. Transplantation and clinical immunology. Vol 8. New York: Excerpta Medical, 1981.161.
4. 王勇, 刘兴炎, 葛宝丰, 等. 同种异体神经移植实验研究初步报告. 中华显微外科杂志, 1995,18(1):281.
5. 郑桂芬, 辛畅泰, 安贵林. 受体血浆冷存异体神经桥接神经缺损的形态学研究. 中华手外科杂志, 2000,16(2):123.
6. 王秋根, 应明. 不同温度和时间保存异体神经移植后病理变化. 中华骨科杂志, 1995,15:736-738.
7. Ansselin AD, Pollard JD. Immunopathological factors in peripheral nerve allograft rejection: quantification of lymphocyte complex expression. J Neurol Sci, 1990,76:75.
8. Tang Jinbo, Ishii Seihi, Vsai Masami. Surgical management of the tendon sheath at different repair stages. Chin med J, 1990, 1023: 259.

(收稿日期:2003-01-21)