微环境对周围神经损伤端－侧移位缝合术后神经再生的影响*

梅远东[1]，祝 伟[1]，顾 晨[1**]，顾玉东[2]
（1. 常熟市第二人民医院 手足外科，江苏 常熟 215500；2. 复旦大学附属华山医院 手外科，上海 200040）

［摘 要］**目的：**探讨微环境对周围神经损伤端－侧移位缝合术后神经功能的影响。**方法：**选取 SD 大鼠 120 只，随机分为假手术组（组 A）、右侧肌皮神经离断后端－侧缝合至尺神经组（组 B）、右侧离断神经端－侧缝合后局部植入神经营养因子组（组 C）、右侧离断神经端－侧缝合后局部植入激活态雪旺细胞组（组 D）以及右侧离断神经端－侧缝合后局部植入神经干细胞组（组 E）；于手术后第 1、2、4、8 周时观察各组大鼠患肢肌力恢复情况，采用梳洗试验以及肱二头肌湿重观察和评价各组大鼠的屈肘功能；分别于术后第 1、2、4、8 周时检测各组大鼠右侧肌皮神经复合动作电位传导速度（NCV）及右侧肱二头肌复合动作电位（CMAP），术后第 8 周荧光显微镜观察各组大鼠新生神经轴突数。**结果：**各组大鼠手术切口均一期愈合，无红肿及溃疡发生；梳洗试验显示 2 周时各组梳洗试验患肢屈肘活动较差，第 4 和第 8 周时组 C、D、E 屈肘活动有好转；术后组 C、D、E 肱二头肌湿重重于组 B，但比组 A 轻（$P<0.05$）；术后组 C、D、E 肌皮 NCV 快于组 B，但比组 A 慢（$P<0.05$）；各实验组肱二头肌 CMAP 波幅较组 A 低，组 C、D、E 较组 B 高（$P<0.05$）；术后第 8 周的神经纤维轴突计数证实组 C、D、E 新生神经纤维轴突数少于组 A，但多于组 B（$P<0.05$）。**结论：**神经端－侧移位是治疗周围神经损伤的有效方法，局部植入神经生长因子、激活态雪旺细胞、神经干细胞均可促进端－侧缝合后神经再生。

［关键词］神经外科手术；缝合技术；神经营养因子；雪旺细胞；神经干细胞
［中图分类号］R612；R745.1 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2016）12-1435-05
DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.12.015

Microenvironment on Nerve Regeneration in Peripheral Nerve Injury after Nerve End to Side Anastomosis

MEI Yuandong[1], ZHU Wei[1], GU Chen[1], GU Yudong[2]
（*1. Department of Hand and Foot Surgery, the Second People's Hospital of Changshu, Changshu 215500, Jiangsu, China;*
2. Department of Hand Surgery, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China）

［**Abstract**］**Objective**: To explore the effect of microenvironment on nerve regeneration in peripheral nerve injury after end to side anastomosis. **Methods**: 120 SD rats were divided into sham operation group (group A), after transection of the right musculocutaneous nerve, end to side anastomosis to the ulnar nerve group (group B), transection of the right musculocutaneous nerve, end to side anastomosis and local implantation of neurotrophic factor group (group C), transection of the right musculocutaneous nerve, end to side anastomosis and local implantation of activated Schwann cells group (group D), transection of the right musculocutaneous nerve, end to side anastomosis and local implantation of neural stem cells group (group E); 1, 2, 4, 8 weeks after operation, the muscle force recovery condition of affected side limb was observed, and the recovery of elbow flexion function was observed and evaluated by using grooming test, and musculocutaneous nerve conduction velocity (NCV) and muscle compound action potential (CMAP) were detected; Nerve fiber axon number was were observed by fluorescence microscopy in 8 weeks after end to side anastomosis. **Results**: All the operative incision

*［基金项目］上海市周围神经显微外科重点实验室开放课题
**通信作者 E-mail：guchen6673@126.com
网络出版时间：2016－12－15 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20161215.1534.028.html

were healed by first intension without swollen and ulcer. Grooming test showed that elbow flexion function in groups B, C, D,E was relatively bad in 2 weeks after operation, and in 4, 8weeks, the fuction in groups C, D, E improved. NCV, CMAP, biceps wet weight and nerve fiber axon number in groups C, D and E were superior to group B($P<0.05$), but worse than group A($P<0.05$). There was no significant difference between groups C, D and E($P>0.05$). **Conclusion**: End-to-side anastomosis is an effective method for treating peripheral nerve injury. Locally implanting nerve growth factor, Schwann cells, neural stem cell could facilitate the nerve regeneration.

[**Key words**] neurosurgery operation; suture techniques; neurotrophic factor; Schwann cells; neural stem cell

周围神经损伤在临床上是较为常见的一种损伤,尤其是暴力因素较大而造成神经长段缺损,或者在较高平面的神经损伤,通常无法直接修复,致使损伤部位以远肢体的感觉功能丧失、运动与植物功能障碍,造成终身残疾,严重影响患者的工作和生活。为克服周围神经损伤引起的神经功能障碍,已经有较多的手术等治疗方法,其中损伤神经端-侧缝合自 1901 年首次报道用于面神经断端与副神经侧面缝合治疗面瘫后,多年鲜有相关报道[1]。对于神经端-侧缝合是否等效于或近似于端-端缝合,实验结果是否意味着有效的临床治疗效果,不论在临床实践或者实验研究领域仍有着广泛的争论。2012 年 Haninec 等[2]采用端-侧吻合法用腋神经修复臂丛损伤,提示损伤神经与自体神经移植效果相当。本研究在建立神经损伤动物模型的基础上,采用损伤神经端-侧缝合组,或局部植入神经生长因子、激活态雪旺细胞和神经干细胞,通过形态学观察、神经电生理和免疫组织化学等方法进行对比,寻找有效的促进神经端-侧缝合后损伤神经再生的微环境,为临床治疗高平面周围神经损伤及长段神经缺损提供参考。

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组

选用 SD 大鼠 120 只,雌雄不限,体重(250 ± 15)g,由南通大学动物实验中心提供[合格证号 SCXK(苏)2014-0001],常规喂养。随机分为假手术组(组 A)、肌皮神经切断后端侧缝合至尺神经组(组 B)、局部植入神经生长因子组(组 C)、局部植入激活态雪旺细胞组(组 D)以及局部植入神经干细胞组(组 E),共 5 组,每组 24 只。

1.2　实验试剂

鼠神经生长因子 9 000 U(0.018 mg/支),等渗盐水 90 mL,溶解配置成 0.2 mg/L 溶液备用,10^5/mL 雪旺细胞及 5×10^6/mL 神经干细胞均由厦门北大之路生物工程有限公司提供。

1.3　实验方法

实验动物以 1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后,取右侧上肢内侧纵形切口,暴露肌皮神经、尺神经,分别将肌皮神经和尺神经解剖至外、内侧束起始处,自距起始段 1.5 mm 处切除尺神经外膜(开窗),肌皮神经自起始段切断,断侧缝合至尺神经外膜开窗处,以 12-0 缝线缝合 3 针,术后立即分别于组 C、D、E 端侧缝合处注入 0.2 mg/L 神经生长因子、10^5/mL 雪旺细胞以及 5×10^6/mL 神经干细胞各 1 mL,假手术组仅暴露肌皮神经与尺神经,切口内放置青霉素钠粉末预防感染,以 5-0 缝线逐层缝合切口,常规饲养至 1、2、4、8 周分批处死。

1.4　观察指标

1.4.1　行为学观察　自术后开始每周观察各组大鼠患侧肢体的肌力恢复情况。将冰水滴于大鼠头颅顶部皮肤偏实验侧,大鼠反射性抬高患肢、屈肘抓挠头顶皮肤,完成梳洗动作。通过观察大鼠梳洗实验,评价各组大鼠的屈肘功能恢复情况。

1.4.2　电生理及组织学观察　术后 1、2、4、8 周通过肌电图检测肌皮神经复合动作电位的传导速度(nerve conductive velocity,NCV)和肱二头肌复合动作电位(compound muscle action potential,CMAP)。术后 1、2、4、8 周,室温下麻醉各组大鼠后称重,取右侧上肢内侧纵形切口再次暴露肌皮神经,用玻璃分针小心分离神经旁增生的结缔组织;完全游离肌皮神经后,测 CMAP。CMAP 测定方法如下,按 Suzuki[3]的方法将记录电极刺入靶肌肱二头肌肌腹中点处,前上方 45°角刺入 0.2 cm,干扰电极置于分离开的皮肤上,依次将刺激电极置于肌皮神经断侧缝合口的远侧和近侧,电击刺激神经,分两次分别记录 CMAP,测量其波幅。由两次刺激潜伏期的

长短 A(mm)和两次刺激位点的距离 B(ms),A/B 可以得到 NCV。通过使用荧光显微镜观察端侧缝合后神经冰冻切片,计数新生神经纤维轴突数量、直径。冰冻切片在磷酸盐缓冲盐水中漂洗 3 次,每次 10 min。加封闭液,放入湿盒内置于 37 ℃恒温箱内 1 h。倾去封闭液,不洗。直接加入小鼠抗 NF 单克隆抗体(Sigma 公司),4 ℃孵育24 h。荧光封片液封片,荧光显微镜观察。术后称量实验侧肱二头肌湿重,评价不同时间点各组大鼠神经纤维的再生情况以及肱二头肌恢复情况。

1.5　统计学分析

形态计量分析的数据均采用 SPSS.22 统计学软件对实验数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA),$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　患肢活动情况

术后 1 周各组大鼠手术切口均愈合良好,无明显感染,梳洗试验显示各大鼠患肢均有不同程度活动受限;2 周时各组梳洗试验患肢屈肘活动较差,第 4 周、第 8 周时组 C、D、E 屈肘活动有好转。

2.2　神经电生理

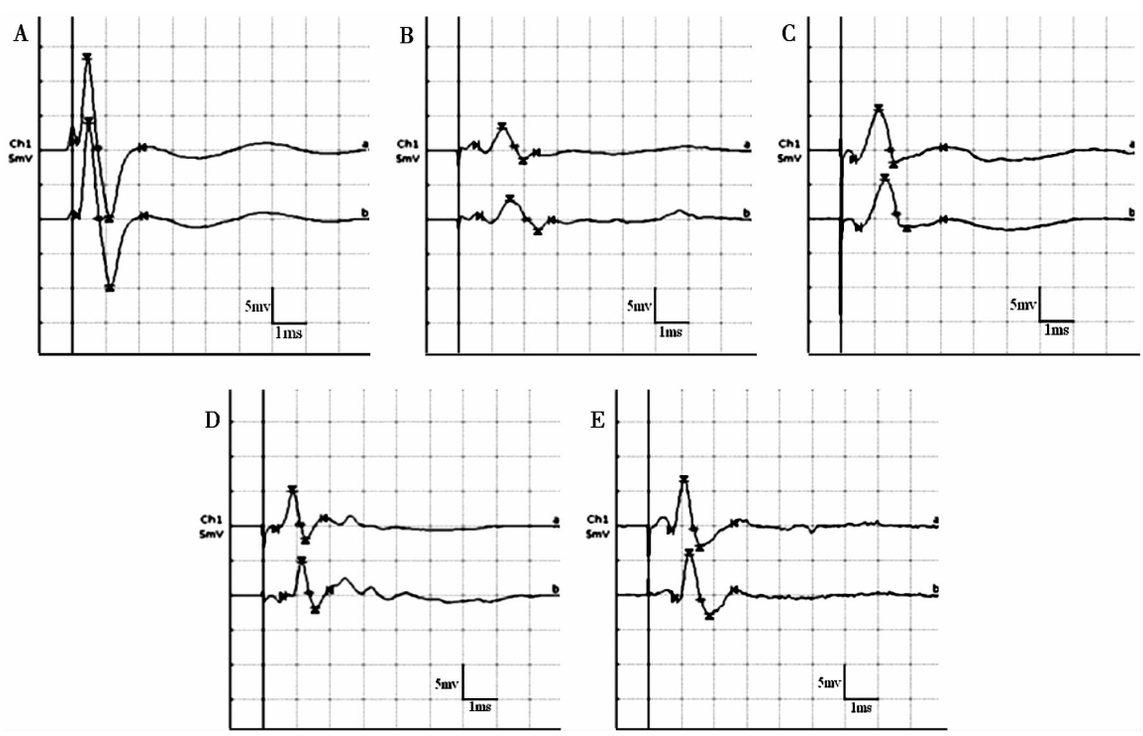
术后第 1、2、4、8 周,组 C、D、E 肌皮 NCV 快于组 B($P<0.05$),但比组 A 慢($P<0.05$),组 C、D、E 间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。各实验组肱二头肌 CMAP 波幅较组 A 低($P<0.05$),组 C、D、E 较组 B 高($P<0.05$)。组 C、D、E 间差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 1。

表 1　各组大鼠肌皮神经 NCV(m/s,$\bar{x}\pm s$,$n=6$)

Tab. 1　NCV of musculocutaneus nerve of rats in each group

组别	术后 1 周	术后 2 周	术后 4 周	术后 8 周
组 A	24.65 ± 0.14	23.98 ± 0.12	25.03 ± 0.13	24.85 ± 0.11
组 B	3.87 ± 0.14[(1)]	4.17 ± 0.12[(1)]	7.28 ± 0.13[(1)]	10.46 ± 0.16[(1)]
组 C	4.99 ± 0.15[(1)(2)(3)]	5.49 ± 0.22[(1)(2)(3)]	8.71 ± 0.19[(1)(2)(3)]	12.15 ± 0.28[(1)(2)(3)]
组 D	4.71 ± 0.24[(1)(2)(3)]	5.54 ± 0.17[(1)(2)(3)]	8.64 ± 0.22[(1)(2)(3)]	11.93 ± 0.24[(1)(2)(3)]
组 E	4.98 ± 0.11[(1)(2)(3)]	5.43 ± 0.12[(1)(2)(3)]	8.76 ± 0.25[(1)(2)(3)]	12.24 ± 0.21[(1)(2)(3)]

[(1)] 与同时点组 A 比较,$P<0.05$;[(2)] 与组 B 比较,$P<0.05$;[(3)] 组 C、D、E 两两比较,$P>0.05$



注:A、B、C、D、E 分别对应组 A、组 B、组 C、组 D、组 E 的 CMAP 波形,图中 a 为缝合口近端 CMAP 波形,b 为远端波形

图 1　术后 8 周各组肱二头肌 CMAP

Fig. 1　The CMAP of biceps in each group at 8 weeks after surgery

2.3 肱二头肌湿重

术后 8 周，肉眼可见各组大鼠肱二头肌均有不同程度萎缩，组 B 萎缩较为明显，组 C、D、E 术侧肌肉相对柔软红润。术后第 1、2、4、8 周，组 C、D、E 肱二头肌湿重重于组 B（$P<0.05$），但比组 A 组轻（$P<0.05$），组 C、D、E 间差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表 2。

表 2　各组大鼠肱二头肌湿重（$\bar{x}\pm s, n=6$）

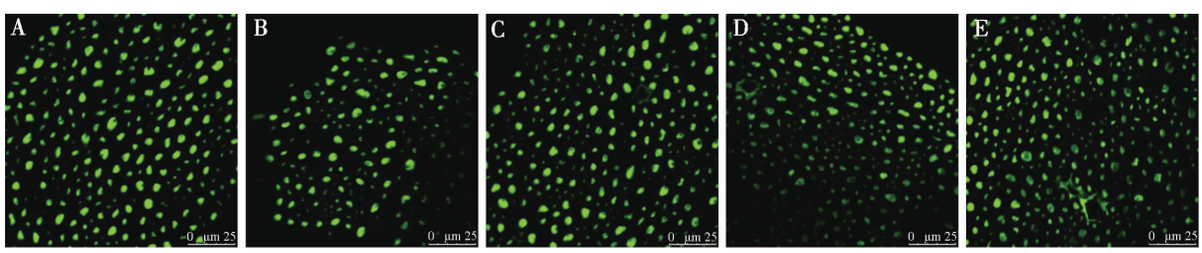
Tab. 2　Thewet weight of biceps of rats in each group

组别	术后肱二头肌湿重(g)			
	1 周	2 周	4 周	8 周
组 A	2.84 ± 0.12	2.86 ± 0.13	2.91 ± 0.16	2.87 ± 0.14
组 B	0.64 ± 0.04$^{(1)}$	0.72 ± 0.07$^{(1)}$	1.06 ± 0.15$^{(1)}$	1.14 ± 0.19$^{(1)}$
组 C	0.81 ± 0.03$^{(1)(2)(3)}$	0.89 ± 0.07$^{(1)(2)(3)}$	1.34 ± 0.12$^{(1)(2)(3)}$	1.55 ± 0.13$^{(1)(2)(3)}$
组 D	0.79 ± 0.01$^{(1)(2)(3)}$	0.97 ± 0.05$^{(1)(2)(3)}$	1.27 ± 0.09$^{(1)(2)(3)}$	1.69 ± 0.18$^{(1)(2)(3)}$
组 E	0.76 ± 0.05$^{(1)(2)(3)}$	0.92 ± 0.04$^{(1)(2)(3)}$	1.38 ± 0.11$^{(1)(2)(3)}$	1.53 ± 0.91$^{(1)(2)(3)}$

$^{(1)}$ 与同时点组 A 比较，$P<0.05$；$^{(2)}$ 与组 B 比较，$P<0.05$；$^{(3)}$ 组 C、D、E 两两比较，$P>0.05$

2.4 新生神经纤维轴突数量

术后 8 周，各组大鼠肌皮神经端－侧缝合处远端免疫组织化学染色显示，组 C、D、E 大鼠新生神经纤维轴突密集，而组 B 轴突分布较为稀疏。组 C、D、E 新生神经纤维轴突数少于组 A（$P<0.05$），但多于组 B（$P<0.05$），组 C、D、E 间差异无统计学意义（$P>0.05$）。见图 2。



注：图中 A、B、C、D、E 分别对应组 A、组 B、组 C、组 D、组 E，图中绿点为神经纤维轴突

图 2　假手术组尺神经纤维轴突数量与各实验组端－侧缝合后新生神经纤维轴突数量

Fig. 2　Nerve fiber axon number of rats in group A and in group B, C, D, E after end-to-side anastomosis

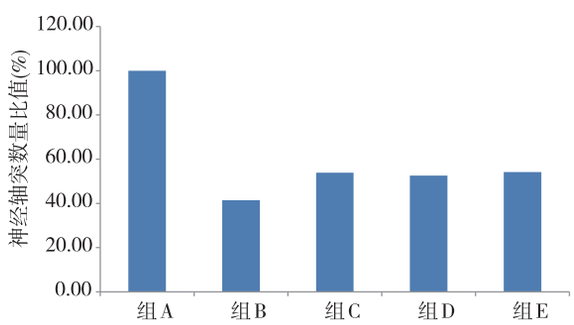


图 3　组 B、C、D、E 端侧缝合后神经轴突数量与组 A 神经轴突数量的比值

Fig. 3　The ratio of axon amount in group B, C, D, E and group A after end-to-side anastomosis

3　讨论

周围神经损伤是由于周围神经主干或者其分支受到创伤，导致受损神经支配的相应区域的运动、感觉及自主神经功能障碍的临床综合征，在临床上是较为常见的损伤，周围神经损伤的治疗在临床上是特别棘手的问题[4-5]，尤其是暴力因素造成的神经长段缺损，或者在较高平面的神经损伤，通常导致无法直接修复。这类神经损伤往往采用自体神经移植、人工神经桥接移植修复，但人体可供移植的神经有限，且对供体神经有一定损伤，人工神经移植物在作用机制及移植时机上仍存较大争议，且价格较昂贵。周围神经损伤的治疗是临床上的难题，神经横断后，及时用显微外科手术技术进

行断端吻合是可以取得一定的效果,但是神经功能的恢复还不够理想[6-7]。在20世纪90年代初,有学者提出仅靠提高手术技术很难取得突破性的进展。近年来对神经营养因子类物质促神经再生的研究较多,如神经生长因子可支持神经细胞的发育、促进神经元存活、促进轴突再生、刺激周围神经细胞的生长和分化以及诱导神经纤维定向生长等[8-9]。Fansa等[10]将体外培养的雪旺细胞桥接鼠坐骨神经缺损,显著促进了神经再生。Torgoe等[11]检测出雪旺细胞能使周围神经轴突再生速度加快4倍。

本实验采用损伤肌皮神经端－侧缝合至尺神经的SD大鼠动物模型,在缝合处局部注射神经生长因子,雪旺细胞以及神经干细胞的方法,通过行为学、神经电生理学、免疫组织化学等指标观察神经再生效果。从表1可见:神经传导速度在1、2、4、8周时各实验组均慢于假手术组,各实验组组间无明显差异,实验组比单纯缝合组神经传导速度快,说明局部植入神经生长因子,激活态雪旺细胞及神经干细胞对神经再生有一定促进作用。与第1周时相比,第4周时各实验组神经传导速度有一定的恢复,第8周时明显恢复,但均慢于假手术组。由此可见将大鼠肌皮神经端－侧缝合至尺神经的方法对神经再生有一定效果,但本实验未与端－端缝合相比较,端－侧缝合效果是否等同于端－端缝合须进一步研究,曹学诚等[12]通过检测乙酞胆碱转移酶活性的实验,认为端－侧缝合与端－端缝合相比,神经再生能力约为后者的76%～80%,是正常的55%～70%。表2肱二头肌复合动作电位结果与表1相似,各实验组肱二头肌复合动作电位波幅均低于假手术组,各实验组组间无明显差异,各实验组肱二头肌复合动作电位波幅比单纯缝合组高,进一步说明局部植入神经生长因子,激活态雪旺细胞及神经干细胞对神经再生有一定促进作用。与第1周时相比,第4周时有一定恢复,第8周时明显恢复,但肱二头肌复合动作电位波幅均低于假手术组。本实验中神经营养因子、激活态雪旺细胞及神经干细胞浓度变化对端－侧缝合后神经再生的影响未作研究,尚须进一步实验研究不同浓度对端－侧缝合后神经再生的作用。有研究表明提高神经生长因子浓度可促进轴突再生,而浓度>800 ng/L时则出现抑制作用[13]。

综上所述,神经端－侧移位是治疗周围神经损伤的有效方法。局部植入神经生长因子、激活态雪旺细胞、神经干细胞均可促进端－侧缝合后神经再生,但三者对促进端－侧缝合后神经再生的作用无明显差异。

4　参考文献

[1] 芮晶,劳杰. 端侧吻合修复周围神经损伤的研究进展[J]. 中华显微外科杂志, 2012(3):259－261.

[2] Haninec P, Kaiser R. The end-to-sideneurorrhaphy in axillary nerve reconstruction in patients with brachial plexus palsy[J]. PlastReconstrSurg, 2012(5):882－883.

[3] Suzuki Y, Tanihara M, Ohnishi K, et al. Cat peripheral nerve regeneration across 50mm gap repaired with a novel nerve guidecomposed of freeze dried alglnategel[J]. NeuroseiLett, 1999(2): 75－78.

[4] 王光临,杨志明,林卫,等组织工程化人工神经修复周围神经缺损的实验研究[J]. 中华手外科杂志, 2002(3):134－137.

[5] 顾玉东. 周围神经缺损的基本概念与治疗原则[J]. 中华手外科杂志, 2002(3):129－130.

[6] Anna JW, Grażzyna W, Ewelina Ł. Transactivation of epidermal growth factor receptor in vascular and renal systems in rats with experimental hyperleptinemia: Role in leptin-induced hypertension[J]. Biochemical Pharmacology, 2008(8):1623－1638.

[7] Denis V, Carine A. Transforming growth factor-β signalling in brain disorders[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2006(1－2): 121－128.

[8] Sun JQ, Zhou WH. Ischemia induced neural stem cell proliferation and differentiation in neonatal rat involved vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta pathways [J]. Brain and Development, 2010(3): 191－200.

[9] D'Ambrosi N, Murra B, Cavaliere F, et al. Interaction between ATP and nerve growth factor signaling in the survival and neuritic outgrowth from PC12 cells[J]. Neuroscience, 2001(3):527－534.

[10] Fansa H, Keilhoff G, Forster G, et al. A cellularmusclewith Schwann cell imp lantation: an alternative biologic nerve conduit[J]. J reconstrMicrosurg, 1999(7): 531－537.

[11] Torgoe K. Stimulation and inhibition mechanisms in peripheral nerve regeneration [J]. KaibogaknZasshi, 1999(3):363－371.

[12] 曹学成,蔡锦方. 周围神经端侧吻合后乙酰胆碱转移酶变化. 中华显微外科杂志, 1999(3):204－206.

[13] Jin J, Limburg S, Joshi SK, et al. Peripheral nerve repair in rats using composite hydrogel-filled aligned nanofiber conduits with incorporasted nerve growth factor[J]. Tissue Eng Part A, 2013(19－20):2138－2146.

(2016-10-22 收稿,2016-11-29 修回)
中文编辑: 刘　平; 英文编辑: 周　凌