

• 基础研究 •

己丁糖处理神经吻合口促进神经再生的实验研究

俞广¹, 韩萌², 王继芳¹, 郝立波¹, 王晋东¹, 陈华¹, 李永滨¹

(1. 中国人民解放军总医院骨科, 北京 100853; 2. 河北医科大学第三医院)

【摘要】 目的: 神经离断伤经显微手术修复后, 神经吻合口粘连常可阻碍神经再生。本研究利用己丁糖防止粘连的作用并与其他方法进行对比, 探索促进神经再生的办法。方法: 将 48 只兔随机分为 4 组: 己丁糖组、强的松龙组、静脉包裹组及单纯缝合组。将兔的胫神经切断后吻合, 吻合口分别用己丁糖、强的松龙处理、静脉包裹及不作处理。于术后 2、4、10、16 周行肉眼观察及光镜检查, 第 16 周行电镜、电生理检查及作轴突图像分析。结果: 己丁糖在瘢痕床上的使用可有效防止瘢痕对修复段神经的压迫、粘连和固定, 强的松龙也有防止神经粘连的作用, 二者优于静脉包裹和单纯缝合组。经统计学处理, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。结论: 术中使用时己丁糖、强的松龙处理神经吻合口, 能有效地防止周围神经粘连, 促进周围神经再生, 最大限度地恢复周围神经的功能。

【关键词】 己糖类; 吻合术, 外科; 周围神经; 神经再生

Comparison of chitosan and other therapeutic methods in improving nerve regeneration after nerve anastomosis YU Guang^{*}, HAN Meng, WANG Jifang, HAO Libo, WANG Jindong, CHEN Hua, LI Yongbin Department of Orthopaedics, the General Hospital of PLA, Beijing 100853 China

ABSTRACT Objective Nerve adhesion can interfere peripheral nerve regeneration after repair operation. In the present study chitosan was used to inhibit nerve adhesion and its effects were compared with other therapeutic methods so as to find the best way to improve peripheral nerve regeneration. **Methods** Forty-eight New Zealand rabbits were divided into 4 groups randomly: chitosan group, dehydrocortisol group, vein package group, and simple suture group. After tibial nerves of the rabbits were cut and inoculated, the inoculated areas were treated with local injection of chitosan and dehydrocortisol, wrap of local vein and simple suture in the rabbits of above four groups respectively. At 2nd, 4th, 10th and 16th weeks after operation, the observation with naked-eye and light microscope were performed. At 16th week, electron microscope and electrophysiological examination, as well as image analysis of regeneration axons were performed. **Results** The chitosan used in the scar tissue effectively prevented the repaired nerves from pressing, adhering and fixing by the scar formed during the repairing process. Dehydrocortisol was also effective to prevent the adhesion. The effects of the treatment with chitosan and dehydrocortisol were better than those of other groups treated with wrap of vein and simple suture ($P < 0.01$). **Conclusion** During nerve inoculating operation, the use of chitosan and dehydrocortisol is effective to prevent nerve adhesion, improve peripheral nerve regeneration, and recover nervous function maximally.

Key words Hexoses; Anastomosis, surgical; Peripheral nerves; Nerve regeneration

周围神经离断经显微手术修复后, 能否顺利再生仍是临床上的难题。周围神经损伤后的再生受很多因素影响, 如手术缝合的质量、神经营养分子等。吻合口处的微环境及局部的瘢痕形成是其中主要的因素之一。周围神经修复时所处的组织床不同, 对神经再生的影响也不同。己丁糖 (chitosan), 是己丁质脱乙酰基后的产物, 无毒性、无刺激性、无免疫原性、

无热源性, 不溶血, 无致突变作用, 组织相容性好, 可吸收降解。具有抑菌、促进上皮细胞生长、抑制细胞生长、抑制成纤维细胞生长、防粘连等功能。为此设计了本实验模型进行研究, 为临床应用己丁糖防止神经粘连、促进神经再生提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 实验动物 随机取 48 只 6 月龄新西兰大白兔, 体重为 2.5~3kg, 随机分为 4 组, 每组 12 只, 分为己丁糖组、强的

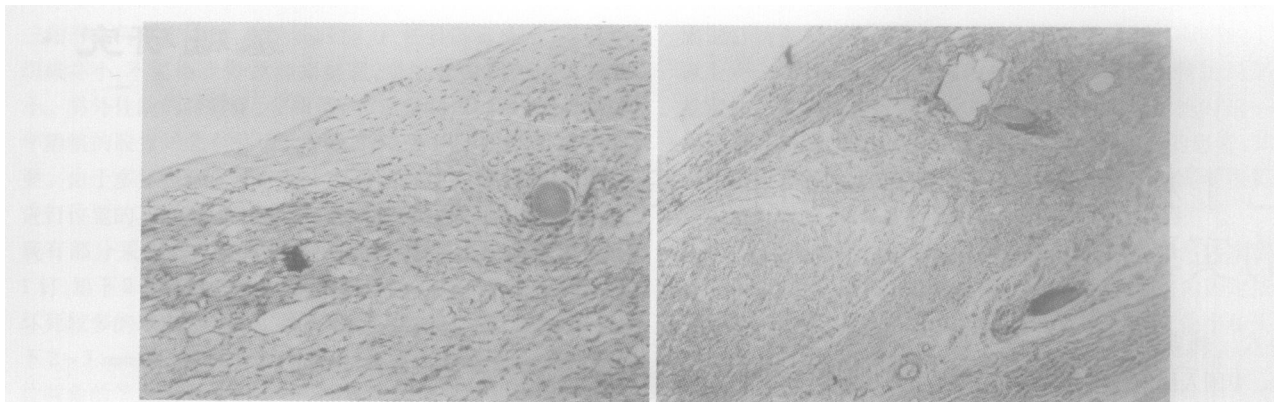


图 1 己丁糖组术后 16周观察结果,己丁糖已吸收,神经恢复良好,与周围无粘连(HE染色 × 125) 图 2 强的松龙组术后 16周观察结果,神经恢复良好,与周围无粘连(HE染色 × 125)

Fig 1 Chitosan has been absorbed and nerve was regenerated well without adhesion 16 weeks after operation(HE × 125) Fig 2 The nerve of rabbits in dehydrocortisol group regenerated well without adhesion 16 weeks after operation(HE × 125)

松龙组、静脉组及单纯缝合组,并按时间分为 4 个亚组,每组 3 只。

1.2 手术方法 采用 25% 乌拉坦 (4 ml/kg) 静脉麻醉,显露兔的双侧坐骨神经,并在胫骨外髌上方 1 cm 处切断胫神经,双侧作同样处理。在手术显微镜下,将胫神经用 9-0 无创线作端端吻合,共缝合外膜 6 针,将吻合口周围肌肉作适当损伤以形成瘢痕。然后: ①己丁糖组:在吻合口周围涂抹 0.5 ml 己丁糖。②强的松龙组:在吻合口周围注射 0.5 ml 强的松龙。③静脉组:取 1 段兔颈外静脉,长约 2 cm,分为 2 段,分别套在双侧胫神经上,两端各固定 1 针。④单纯缝合组:直接吻合后放入肌间隙,吻合口不作特殊处理。

1.3 检测项目 于术后 2, 4, 10, 16 周用肉眼观察足底溃疡及愈合情况、神经吻合口的粘连程度。取各时间段神经吻合口上下 5 mm 1 段神经,光镜观察再生神经通过吻合口情况及结缔组织增生情况。取吻合口近远端各 2 mm 长神经,用加拿大 M atton-IP8 伪彩色图像分析行轴突数目分析。对于 16 周组,用丹麦产 D ISA-1500 型诱发电位仪检测其神经传导速度、诱发电位波幅及潜伏期,以及在透射电镜下观察其超微结构特征。

1.4 统计学处理 实验数据采用 SPSS11.0 软件包,并使用 OneWay-ANOVA 对 4 组的神经传导速度诱发电位波幅及有髓神经再生率进行统计学处理。

2 结果

2.1 大体观察 术后 2 周左右,白兔患趾红肿、溃疡、糜烂,4 周足趾脱落。单纯缝合组及静脉包裹组至术后 16 周足底溃疡仍未完全愈合,己丁糖组和强的松龙组 10 周开始愈合,至 16 周完全愈合。

单纯缝合组修复段神经 2 周时为瘢痕组织包裹压迫固定,4, 10 周时粘连加重,神经无活动度。静脉包裹组修复段神经 2 周时与周围界限清楚,4, 10, 16 周时与周围粘连固定,无活动度。己丁糖组及强的松龙组各时间段有少量细丝样粘连,神经活动不受限。4 周时己丁糖及强的松龙组均有少量残留,10 周时全部吸收。

2.2 组织学检查 神经吻合口纵切片观察,己丁糖、强的松

龙组,短期内有残留,时间较长组段完全吸收,神经与周围组织分界较清楚,周围结缔组织侵入不多,神经外膜光滑,以上 3 组再生纤维通过吻合口较直,神经内无明显结缔组织增生(图 1, 2)。

单纯缝合组神经外膜较厚,吻合口处结缔组织增生明显,侵入并压迫神经造成吻合口部位较窄,导致神经再生纤维通过障碍。静脉包裹组神经外膜与分界短期内基本清楚,但长期组有静脉壁坏死的表现,吻合口周围有较多结缔组织增生,压迫吻合口。

2.3 电生理检测结果 静脉组及单纯缝合组的神经传导速度、潜伏期的恢复程度数值低于己丁糖、强的松龙组 ($P < 0.01$); 诱发电位波幅恢复率 4 组无统计学差异,见表 1。

2.4 轴突图像分析处理结果 术后 16 周,各组恢复段神经吻合口远近端半薄切片均作电脑图像分析,以正常神经横截面有髓纤维神经纤维数为基数,求出远端神经有髓纤维再生率(表 2)。单纯缝合组及静脉组与其他 2 组比较有髓纤维再生率较低 ($P < 0.01$)。

2.5 透射电镜观察结果 16 周时吻合口远端单纯缝合组有髓纤维髓鞘较薄,轴突直径较细,但 4 组神经远端轴突及髓鞘均较成熟,髓鞘呈同心圆板层样排列,雪旺氏细胞增生明显,胞膜清楚,胞浆内富含线粒体,且可见大量再生无髓纤维。

表 1 神经电生理各组测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of results of neuro-electrophysiological examination among four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	神经数	神经传导速度 (m/s)	诱发电位波幅 (μv)	潜伏期
单纯缝合组	6	76.2 ± 3.7	33.3 ± 6.3	25.6 ± 3.2
静脉组	6	77.5 ± 10.3	35.5 ± 8.7	24.7 ± 4.9
己丁糖组	6	85.4 ± 8.2	45.4 ± 5.1*	14.3 ± 3.6*
强的松龙组	6	86.8 ± 5.3	45.2 ± 6.7*	14.1 ± 2.8*

注:和单纯缝合组及静脉组比较,* $P < 0.01$ $F = 12.653$; ** $P < 0.01$, $F = 15.916$

Note As compared with simple suture and vein groups * $P < 0.01$, $F = 12.653$ ** $P < 0.01$, $F = 15.916$

表 2 各组组织学研究结果分析 ($\bar{x} \pm s$)
Tab 2 Results of histological investigation among four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	神经数	有髓纤维再生率
单纯缝合组	6	71.2 ± 12.9
静脉组	6	73.4 ± 9.7
己丁糖组	6	90.1 ± 7.4*
强的松龙组	6	91.2 ± 4.7

注: 和静脉组及单纯缝合组比较, * $P < 0.01$, $F = 18.773$

Note: As compared with simple suture and vein groups $P < 0.01$, $F = 18.773$

3 讨论

3.1 影响周围神经再生的因素 神经断裂后, 断裂处远、近端神经纤维均将出现 Waller 变性。周围神经损伤后的再生是一个很复杂的生物学、细胞学过程, 影响这一过程的因素很多, 其中吻合口处微循环的情况、瘢痕的形成、周围组织床血运是主要的影响因素之一。瘢痕组织早期可以阻碍神经轴芽向远端延伸, 晚期又会压迫神经吻合口, 妨碍神经功能的恢复。

3.2 己丁糖的选择依据及特征 我们的实验证实己丁糖可减轻神经周围的瘢痕增生。预防作用的基础至少有以下几方面: ①作为半液体物质, 能在硬膜外形成 1 层立体保护层, 阻断胶原纤维的来源, 促进组织生理性愈合, 防止瘢痕的形成。②止血作用。创面渗血是术后粘连的重要原因, 液态的己丁糖也有止血作用, 有人发现己丁糖对血小板有激发作用^[1]。③生物屏障作用。己丁糖作为一种天然高分子化合物, 在体内可吸收, 但吸收时间比其他隔离物长, 可停留 3 周以上, 作为生物屏障可有效地防止粘连。Kirsch 等^[2]将外源性营养因子与桥接导管联合应用可以促进神经再生, 填充了过度表达高分子纤维生长因子 2 (FGF-2) 雪旺细胞的硅胶管可修复大鼠坐骨神经 15 mm 的缺损。同源异体的雪旺细胞与海藻酸盐一起填充于聚羟基丁酸导管内可以增加轴突再生的距离^[3-4], 证明了神经生长因子对神经再生的促进作用。己丁

糖将神经吻合口与周围组织隔开, 从而其管腔能维持吻合口局部内源性神经因子的浓度, 起到类似于神经再生室的作用, 促进周围神经的再生。

3.3 防止周围神经粘连方法的对比与分析 从电生理、光镜、电镜、轴突图像分析结果看, 单纯缝合组恢复最差, 证明瘢痕对神经再生确有不利的不良影响, 静脉组可发生静脉壁在失去营养后, 发生坏死纤维化, 导致瘢痕粘连加重。

姜保国等^[5]用几丁质生物套管小间隙套接修复大鼠周围神经损伤有较好的效果。刘强等^[6]将 SD 大鼠实验组注射 0.5 ml 得宝松, 发现得宝松对神经损伤后的恢复有一定的促进作用。强的松龙防止损伤后周围神经系统中的结构蛋白发生免疫反应, 促进周围神经再生。

从实验结果看, 己丁糖、强的松龙 2 种处理方法均可有效地防止神经粘连, 促进神经再生, 效果优于静脉及单纯缝合组。并且己丁糖有优于强的松龙的效果。静脉组不能有效地防止周围神经粘连。

参考文献

- 1 Sugamori T, Iwase H, Maeda M, et al. Local hemostatic effects of microcrystalline partially deacetylated chitin hydrochloride. *J Biomed Mater Res* 2000; 49(2): 225-232
- 2 Kirsch M, Terheggen U, Hofmann DH. Clialy neurotrophic factor is an early lesion induced retrograde signal for axotomized facial motoneurons. *J Mol Cell Neurosci* 2003; 24(1): 130-138
- 3 Timmer M, Robben S, Muller-Ostemeier F, et al. Axonal regeneration across long gaps in silicon chambers filled with Schwann cells overexpressing high molecular weight FGF-2. *J Cell Transplant* 2003; 12(3): 265-277.
- 4 Mosahabi A, Fuller P, Woberg M, et al. Effect of allogeneic Schwann cell transplantation on peripheral nerve regeneration. *J Exp Neurol* 2002; 173(2): 213-223.
- 5 姜保国, 李剑. 替代神经外膜缝合-小间隙套接法修复周围神经损伤. *中国矫形外科杂志*, 2003, 11(8), 544-546.
- 6 刘强, 陈德松, 方有生, 等. 得宝松对周围神经损伤后功能恢复影响的实验研究. *中国矫形外科杂志*, 2003, 11(10): 692-693.

(收稿日期: 2005-10-21 本文编辑: 连智华)