

· 基础研究 ·

# 周围神经移植修复大鼠陈旧性脊髓损伤的实验研究

麻文谦<sup>1</sup>, 张少成<sup>2\*</sup>, 李明<sup>2</sup>, 颜永碧<sup>2</sup>, 倪灿荣<sup>2</sup>

(1.上海市松江区中心医院骨科, 上海 201600; 2.第二军医大学附属长海医院)

**【摘要】** 目的:探讨利用自体周围神经组织游离移植修复大鼠陈旧性脊髓损伤病理机制。方法:利用改良 Allen 撞击方法建立脊髓打击损伤模型后,将大鼠分为 2 组,各 20 只。神经移植组切取后肢腓肠神经,利用显微外科技术去除神经外膜,将其修剪成小段,游离移植于脊髓损伤处,对照组不作处理。分别于术后 4、12 周,在光镜下观察脊髓损伤段及移植周围神经再生情况,并应用辣根过氧化物酶神经逆行示踪技术进行脊髓神经束的再生评价。分 3 个时点(1、2、3 个月)观察大鼠后肢运动功能恢复情况。**结果:**对照组脊髓变性,可见瘢痕和空洞,移植组术后 12 周,损伤区脊髓与周围神经融合良好,可见再生轴突,跨越损伤段脊髓,周围神经无变性。12 周时脊髓神经束的再生评价结果提示:神经移植组优于对照组,移植组大鼠后肢运动功能明显恢复。**结论:**周围神经组织游离移植修复大鼠陈旧性脊髓损伤后,存活良好并可促进大鼠脊髓结构和功能的恢复。

**【关键词】** 脊髓损伤; 移植,自体; 周围神经; 神经再生

**Experimental study of peripheral nerve grafts for repairing of chronic spinal cord injury in adult rats** MA Wen-qian\*, ZHANG Shao-cheng, LI-Ming, YAN Yong-bi, NI Can-rong. \*Department of Orthopaedics, the Songjiang Central Hospital of Shanghai, Shanghai 201600, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the pathological mechanism in the repair of chronic spinal cord injury with free grafting of autoperipheral nerve tissues in rats. **Methods:** The SD rats were used to establish SCI model with modified Allen method. The rats were divided into two groups at 12 weeks after the injury, each group had 20 rats. In the experimental group, the sural nerves were removed epineurium and transplanted into SCI lesion by using microsurgical technique; and in the control group, the rats were treated without any operation. The survival and differentiation of the grafts, and the ability of repairing host spinal cord were observed under the light microscope at the postoperative 4th and 12th week. Regeneration rates of nerve tracts in spinal cord were evaluated by using HRP tracing technique at the postoperative 4th and 12th week. The morphological changes were observed at section of spinal cord and the motor functions of both hind legs of rats were detected. **Results:** In the control group, spinal cord exhibited degeneration with cicatrices and cavitates. In the experimental group, peripheral nerve was almost survived, fused with the spinal tissue and axons could regrow into or span the place of injured spinal cord. Higher number of labeled nerve tracts in spinal cord were observed in experimental group, there was significant difference when compared with the control group. Motor function of hind legs of rats recovered significantly in the treatment group. **Conclusion:** Autoperipheral nerve graft tissues transplantation could survive and integrate with the host and have repairing effects on chronic spinal cord injury in rats.

**Key words** Spinal cord injuries; Transplantation, autologous; Peripheral nerves; Nerve regeneration

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(7): 519-521 www.zggszz.com

由外伤造成的陈旧性不全瘫仍是目前医学界需要解决的难题之一,脊髓损伤后功能重建有赖于脊髓结构的恢复。近年来采用自体或同种移植治疗陈旧性脊髓损伤的方法得到越来越多的重视并取得了一定的理论和实验支持,某些方法已过渡到临床<sup>[1]</sup>。因周围神经含有雪旺氏细胞(schwann cell, SC)和神经营养因子(nerve growth factor, NGF),可以为脊髓再生

提供所需要的微环境,用周围神经移植修复脊髓损伤是主要的方法之一。为了进一步探讨周围神经移植修复脊髓损伤的可能性,作者通过建立陈旧性脊髓损伤大鼠模型,将自体周围神经组织利用显微外科技术处理后移植于脊髓损伤区,初步探讨周围神经移植对大鼠陈旧性脊髓损伤修复的机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物及分组** 成年 SD 大鼠 40 只,体重(253.7±14.3)g,雌雄不拘。造模后分为对照组和神经移植组各 20 只,分别于术后 4、12 周处死动物。

通讯作者:张少成 E-mail:shczhang@hotmail.com

\*现单位:上海市松江区中心医院骨科 201600

1.2 实验方法

1.2.1 陈旧性脊髓损伤模型的制备 采用改良 Allen 撞击方法建立脊髓打击损伤模型。动物以 2%戊巴比妥钠按 40 mg/kg 体重麻醉后,妥善固定于工作台上,背部常规脱毛、消毒,严格按照无菌操作。以 T<sub>10</sub> 棘突为中心作背部正中切口,长约 4 cm,依次切开皮肤、皮下组织,剥离椎旁肌肉,咬除 T<sub>10</sub> 棘突和全椎板至椎弓根部,部分咬除 T<sub>9</sub>-T<sub>11</sub> 椎板扩大椎管,暴露待损伤脊髓长约 10 mm。以 T<sub>10</sub> 相对区域为损伤区,后正中血管为中心,用自制的改良 Allen 打击装置以 30 g cm f(冲击量为 10 g 重物从 3 cm 高度自由落下) 致伤能量造成大鼠中度脊髓损伤。撞击成功标准为:损伤处脊髓外观出血、水肿,大鼠尾巴出现来回摆动,双后肢呈软瘫。伤口分层缝合,动物常规饲养,每日腹腔注射青霉素,行腹部按摩挤尿。

1.2.2 周围神经植入 造模 12 周后神经移植组切取自体腓肠神经游离移植于脊髓损伤段。神经预处理方法:大鼠腓肠神经直径约 0.5~0.8 mm,可切取长度约 2.5 cm,在放大 9 倍的手术显微镜下沿神经干纵轴用备皮刀片切开神经外束膜,再用显微器械剥离神经外束膜,使之质地外观呈马尾组织,将该神经剪成 0.5 cm 小段备用。清除脊髓表面的瘢痕组织,切开脊髓段的硬膜将预处理的神经段沿脊髓纵向排列植入脊髓,将明胶海绵覆盖在脊髓表面,同时切取局部椎旁肌制成肌瓣覆盖在脊髓表面。对照组仅显露脊髓损伤段,不作神经移植。

1.3 观察指标与方法

1.3.1 光镜观察 术后 4、12 周 2 组各处死动物 5 只,以 2%戊巴比妥钠进行腹腔麻醉。动物左心室灌注固定,取出标本,甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,切片。HE 染色,光镜下观察并照相。

1.3.2 HRP 逆行示踪 移植组与对照组于术后 4、12 周各取 5 只大鼠,用 2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔麻醉,做背部后正中切口,暴露 T<sub>12</sub>-T<sub>13</sub> 节段,在损伤平面下 5 mm 处用微量加样器缓慢注入 30% HRP 0.5 μl,注射时间不少于 20 min,关闭手术窗口。待动物存活 48 h 后 2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)再度腹腔麻醉,开胸用 1%多聚甲醛-1.25%戊二醛磷酸缓冲液经右心灌注固定,取全段脊髓置于 30%的蔗糖磷酸缓冲液中,4℃过夜待其下沉。以 T<sub>6</sub>-T<sub>8</sub> 段脊髓为检测点冰冻连续切片,片厚 30 μm,行 HRP-DAB 法显色。在光镜下计数脊髓横切面上 HRP 阳性神经纤维束数目,各组各时点随机抽取 5 张切片进行阳性纤维束计数。

1.3.3 电生理及行为学评价 术后 4、8、12 周,2 组实验鼠以 2%戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉后,进行神经电生理检查。将刺激电极置于 L<sub>4</sub> 神经根出椎间孔处进行刺激,记录电极置

于 T<sub>6</sub> 神经根出椎间孔,记录 T<sub>6</sub> 脊髓电位变化(N26)。行为学评价采用 BBB(basso beattie and bresnahan)评分法,对大鼠后肢功能进行评定。

1.3.4 图像分析及数据统计处理 组织切片经 Olympus 光镜及显微图像分析系统处理,用神经组织形态分析软件计数切 HRP 标记神经纤维束数目。将计量结果进行组间方差分析。

2 结果

2.1 实验动物一般状况 脊髓损伤后即日,所有受体鼠均出现了极为典型的截瘫综合征,并伴有体温降低、肠麻痹、尿潴留、血尿、结膜出血等症状。至术后 60 d 时,有 8 只受体鼠因各种原因死亡,占移植总数的 20%。所有存活动物切口均 I 期愈合。4 只动物后肢出现溃疡,1 只动物两爪坏死脱落(死亡动物例数重新补足)。

2.2 HE 染色 单纯损伤组的动物,在脊髓损伤部位可见神经组织的退化、变性,神经元及神经纤维成分明显减少,可见小的囊性空腔及结缔组织瘢痕,脊髓损伤残端缩窄变细或者不连。在移植组术后 2 周以内,移植植物与宿主脊髓形成不同程度的融合,呈松散结合状态,两者之间可见部分胶质增生及结缔组织增生;术后 4 周,周围神经与脊髓结合紧密,移植植物与宿主脊髓形成良好的融合状态;移植术后 12 周,移植植物生长良好,移植植物已能与宿主脊髓有机地融合在一起,两者的神经纤维交互生长可构成网状连接。有多数标本显示无明显的胶质或结缔组织瘢痕阻碍两者的结合。部分切片可见移植周围神经跨越脊髓损伤区,再生的神经纤维与远端脊髓组织交织在一起。

2.3 HRP 标记脊髓神经纤维束计数 移植术后 4 周,有少量辣根过氧化物酶阳性标记物,以后逐渐增多。12 周,两组辣根过氧化物酶阳性标记物差异有统计学意义(见表 1)。

表 1 各组辣根过氧化物酶阳性标记物数目结果分析(̄x±s)

组别	鼠数	时间	
		4 周	12 周
对照组	5	4.4±1.1	41.8±7.9
移植组	5	14.8±3.5	85.6±6.1*

注:和对照组比较,\*P<0.01, F=62.037

Note: Ccompared to control group, \*P<0.01, F=62.037

2.4 电生理及行为学评价 术后 4 周各组 SEP 峰值潜伏期均无明显恢复,实验组大鼠从第 4 周开始同样条件下可引出 N26,波形清楚;对照组大鼠 SEP 从第 5 周才开始出现波形,

表 2 各组不同时期 SEP 峰潜伏期(ms)、波幅(μV)及 BBB 评分比较(̄x±s)

Tab.2 Peaks latency, amplitude of SEP and BBB score in different phases of different groups(̄x±s)

组别	大鼠数	4 周			8 周			12 周		
		潜伏期	波幅	BBB 评分	潜伏期	波幅	BBB 评分	潜伏期	波幅	BBB 评分
移植组	10	5.35±0.51	1.98±0.23	2.13±0.64	3.09±1.10	2.83±0.17	3.30±0.48	2.74±0.68*	3.01±0.15 <sup>△</sup>	7.50±0.53*
对照组	10	5.58±1.24	1.15±0.13	1.25±0.46	4.85±0.56	1.26±0.16	2.25±0.46	4.37±0.92	2.08±0.21	3.77±0.71*

注:和对照组比较,\*P<0.01, F=26.702;<sup>△</sup>P<0.01, F=107.563; \*P<0.01, F=167.538

Note: Compared to control group, \*P<0.01, F=26.702; <sup>△</sup>P<0.01, F=107.563; \*P<0.01, F=167.538

波幅数值变化不明显。术后 12 周, 2 组 SEP 峰潜伏期及波幅恢复差异有统计学意义(见表 2)。大鼠脊髓损伤以后, 双下肢的功能丧失, BBB 评分 0~1。神经移植后 4 周, 2 组大鼠的下肢肌力开始逐渐恢复, 术后 8 周实验组动物后肢功能的恢复幅度加大, 且与对照组之间差距加大; 术后 12 周, 2 组 BBB 评分差异也有统计学意义(见表 2)。

### 3 讨论

周围神经移植于脊髓损伤处的目的是对受损神经组织的急性替代, 在受损神经断端之间人为搭桥, 它可提供神经膜管导引轴突生长方向, 细胞基质能维持脊髓形状, 形成细胞间支架, 雪旺氏细胞分泌细胞因子促进生长, 诱导神经轴突再生<sup>[2]</sup>。SCI 慢性期中, 在损伤区域形成胶质瘢痕和(或)空洞及脊髓积水形成, 是影响损伤脊髓再生的重要因素之一。囊腔是液化坏死组织的囤积处, 也是脊髓受损神经纤维最集中暴露的部位, 自体周围神经移植作为良好的载体可以最直接的和受损神经接触。本研究病理结果显示: 在 SCI 慢性期, 延迟植入的周围神经不仅存活良好而且与受损脊髓神经纤维融合良好。

由于脊髓中神经元之间的联系及神经束之间的走行和联系是非常复杂而广泛的, 部分结构的恢复即可带来功能的改善<sup>[3]</sup>。本研究 HRP 逆行示踪证明自体周围神经组织移植后可为再生轴突向远端生长提供通道。电生理及行为学评价显示: 随着再生轴突的数量的增多, 大鼠后肢功能也逐渐改善。

当周围神经作为移植体由于神经干厚度较大时, 组织液

渗透及重新活动血管支配困难, 往往发生“中心性坏死”, 本实验通过显微外科技术剔除了神经外膜, 减少了与脊髓组织之间的“隔阂”, 脊髓组织可直接与神经纤维、神经膜细胞及轴浆内的各种有利神经再生和起导向作用的因子接触并发生连接。同时由于断端环境和移植技术在很大程度上影响移植术的效果<sup>[4-5]</sup>, 此种方法还有自体移植无免疫排斥反应、宿主和移植体之间易于整合、不需特殊器械、移植体不需特殊方法专门制备、来源不受限制、手术操作简单等优点易于开展基础及临床研究。

### 参考文献

- 1 张少成, 许硕贵, 马玉海, 等. 硬脊膜内松解自体周围神经植入治疗脊髓陈旧性不完全性断裂伤. 第二军医大学学报, 2004, 25(7): 803-804.
- 2 严恒林, 沈馨亚. 雪旺氏细胞与中枢神经再生. 细胞生物学杂志, 1995, 17(3): 49-52.
- 3 Fawcett J. Repair of spinal cord injuries: Where are we, where are we going? Spinal Cord, 2002, 40(12): 615-623.
- 4 Giovanini MA, Reier PJ, Eskin TA, et al. Characteristics of human fetal spinal cord grafts in the adult rat spinal cord: influences of lesion and grafting conditions. Exp Neurol, 1997, 148(2): 523-543.
- 5 Profyris C, Cheema SS, Zang D, et al. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. Neurobiol Dis, 2004, 15(3): 415-436.

(收稿日期: 2007-11-22 本文编辑: 连智华)

## · 经验交流 ·

# 腓动脉外踝上穿支皮瓣的临床应用

王顺炳, 吴发林, 倪生华, 黄建华, 陈剑锋, 单丁进

(大丰同仁骨科医院, 江苏 大丰 224100)

**关键词** 外科皮瓣; 腓动脉; 踝损伤

**Clinic application of skin flap based lateral supramalleolar branches of the peroneal artery** WANG Shun-bing, WU Fa-lin, NI Sheng-hua, HUANG Jian-hua, CHEN Jian-feng, SHAN Ding-jin. Tongren Orthopaedics Hospital, Dafeng 224100, Jiangsu, China.

**Key words** Surgical flaps; Peroneal artery; Ankle injuries

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(7): 521-522 www.zggszz.com

踝关节周围软组织缺损是一种常见损伤, 因该部解剖特点是皮肤薄、血运差、活动度小, 不适于用局部转移皮瓣, 成为临床处理的较大难题。2002 年 10 月至 2007 年 3 月应用腓动脉外踝上穿支皮瓣修复踝周及足背软组织缺损 18 例, 取得满意效果, 报告如下。

### 1 临床资料

本组 18 例, 男 13 例, 女 5 例; 年龄 18~72 岁, 平均 41 岁; 左侧 11 例, 右侧 7 例。损伤原因: 交通事故伤 12 例, 机械性损

伤 5 例, 贴骨瘢痕慢性溃疡 1 例。皮肤缺损部位: 踝关节外侧缺损 14 例, 前内侧缺损 2 例, 足背缺损 1 例, 踝关节外侧联合足背外侧缺损 1 例。手术时机: 急性创伤 16 例中, 14 例急诊手术修复, 2 例因局部污染较重, 分别于多次清创术后 3 d 和 5 d 手术; 骨折术后皮肤坏死 1 例, 择期行坏死组织切除后手术修复; 贴骨瘢痕慢性溃疡 1 例, 炎症控制后择期行瘢痕切除后手术修复。皮瓣切取面积最小 3.0 cm×4.5 cm, 最大 7.5 cm×14.5 cm。以穿支为蒂作 180°内旋转 16 例, 以降支为蒂逆行转