

应用人工神经修复周围神经损伤的研究*

李晓光 杨朝阳 蔡青 鲁强 刘玉军 姬曼 徐群渊

首都医科大学北京神经科学研究所, 北京 100054

摘要 借助人工神经-明胶导管作载体, 连接大鼠坐骨神经 10 mm 缺损, 观察周围神经再生的规律。结果表明, 热脱水架桥处理的明胶导管组 1 个月后, 其内壁已形成毛细血管网, 2 个月后导管被分解吸收, 缺损部位神经再生完成。而用戊二醛交联组未见神经再生。手术后 2 个月和 4 个月进行铁染色、Bodian 染色及 S-100 蛋白染色, 2 个月时, 发现再生轴索已到达缺损部位的远端, 新生髓鞘已经形成。结合麦芽凝集素辣根过氧化物酶(WGA-HRP)追踪显示, 脊髓前角的运动神经元和后角的感觉神经末梢四甲基联苯胺显色法(TMB)反应呈阳性。机能检测可见诱发肌电图和大脑体性感觉诱发电位恢复。以上结果提示明胶是用来修复周围神经损伤的良好医用载体材料。

关键词 人工神经 明胶导管 热脱水处理 神经再生 大鼠坐骨神经

周围神经损伤或切除后不能直接缝合时, 临床常用自体神经进行移植, 但因取材部位易被损伤而受到限制, 因此有必要研制周围神经再生用的人工神经。本文探讨用明胶制作人工神经修复周围神经损伤的可能性。明胶的特点是生物相容性好, 在体内可被分解吸收, 几乎无抗原性。以此材料修复周围神经缺损的动物实验迄今未见报道。应用人工神经的目的是诱导神经干中枢端再生的神经轴索沿着正确的方向经导管到达神经干远端进而与末梢的靶器官重新建立联系并恢复功能。

1 材料与方法

1.1 明胶导管制作方法

将外径 1.0~1.5 mm 的医用硅胶管洗净干燥后竖直浸入质量分数 w 为 20% 的明胶溶液, 缓慢拔出, 竖直状态放置, 室温下干燥, 重复该过程直至管径达到要求。将硅胶管与明胶导管分离即得到透明的明胶导管。热脱水处理的导管(DHT)在真空干燥, 150℃, 24 h 条件下制作(含水率 64.3%)^[1]。戊二醛交联导管(GA)用 0.5% GA 溶液在 4℃, 24 h 条件下制作(含水率 65.1%)^[2]。导管用 75% 酒精浸泡消毒。

1.2 动物实验

雌性 Wister 大鼠(体重约 300 g)50 只。其中 10 只使用 GA 导管、40 只用 DHT 导管。动物麻醉用戊巴比妥(体重 0.07 mL/100 g)腹腔注射。暴露右侧坐骨神经, 制作 10 mm 缺损。将坐骨神经两断端插入导管中, 在手术显微镜下缝合两断端(图 1)。术后 1, 2, 3, 4 个月, 通过肉眼和光学显微镜观察, 并用电生理学方法对 16 只动物进行神经再生机能的评价。

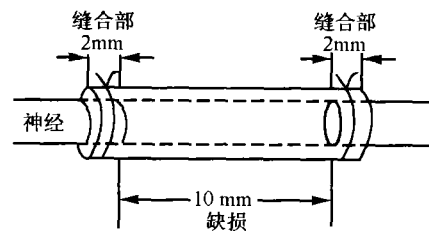


图 1 手术图解, 神经两断端插入明胶导管, 并且导管用 10-0 的尼龙线缝合。神经两断端之间的距离是 10 mm

1.3 形态学观察

1.3.1 组织学观察 在体视显微镜下观察后, 用

2002-10-18 收稿, 2002-12-31 收修改稿

* 国家重点高技术产业发展基金(1998-2444), 和国家自然科学基金(批准号: 39870191)资助项目

E-mail: lxgchina@sina.com

光学显微镜观察. 染色方法采用 Bodian 染色、铁染色^[3]和 S-100 蛋白质免疫组织化学染色. S-100 蛋白质广泛分布于少突胶质细胞、星形胶质细胞和 Schwann 细胞^[4]中, 并在其中作为周围神经的标志蛋白质.

1.3.2 WGA-HRP 逆行性追踪神经细胞及轴索染色

用生理盐水溶解制成 1% WGA-HRP 10 μ L, 从坐骨神经再生部位的末梢侧 10 mm 处注射, 并在同一只动物左侧相同部位进行注射. 饲养 2 d 后, 在戊巴比妥麻醉下, 从左心室用生理盐水及 10% 的多聚甲醛灌流, 并取出脊髓(L1~S2)和两侧的坐骨神经, 浸入 30% 的蔗糖溶液(4 $^{\circ}$ C)18 h 后制作成 60~80 μ m 的冰冻切片, 经 TMB 反应(醋酸浓度 0.2 mol/L)^[5]观察结果.

1.4 神经电生理学检测

肌肉注射氯氨酮(5 mg/100g)后, 腹腔注射戊巴比妥 [1 mg/(100 g·h)], 同时观察并记录. 将动物固定并对大脑和脊髓定位. 刺激坐骨神经记录诱发的肌电图; 刺激大脑记录感觉诱发电位. 刺激神经所用电极为白金双电极(极间距离为 5~7 mm), 刺激强度为 1~10 V, 脉冲幅度为 0.5~1.0 ms. 记录电极用直径 100 μ m 不锈钢电极.

2 结果

本实验共使用大鼠 50 只. 40 只使用 DHT 交联的明胶导管桥接坐骨神经再生. 手术后 1, 2, 3 及 4 个月进行形态学观察. 其中, 39 只有神经再生. 约 2 个月再生神经的直径接近正常. 机能检测以肌电图和大脑体感诱发电位作为指标. 16 只中, 15 只机能所有恢复. 而以 GA 交联的明胶导管组, 无神经再生.

2.1 形态和组织学

DHT 处理组手术后 1 个月用体视显微镜观察, 缺损部位神经已经再生, 但与对照组比较细, 明胶导管仍残留, 导管内壁已形成丰富的毛细血管网. 而且再生的神经表面也有毛细血管网形成(图 2(a)). 手术后 2 个月明胶导管全部溶解吸收. 再生神经的直径与正常对照组相似(图 2(b)).

WGA-HRP 逆行性追踪染色观察可见, 坐骨神经纵向切片从中枢端经过导管部位至末梢端有清晰的神经轴索走行. 而脊髓的横切片中, 脊髓前角运动神经元和后角的感觉神经末梢有 WGA-HRP 的

TMB 反应阳性物质(图 3). 2 个月时, 正常与对照侧相比运动神经元数目多, 感觉神经末梢的密度大; 4 个月时, 再生侧运动神经元数目较 2 个月时增多.

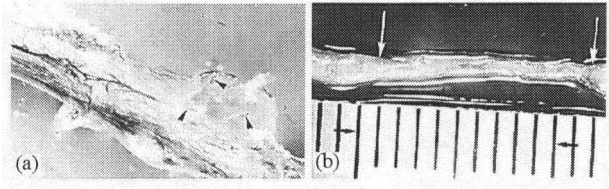


图 2

(a) 移植术后 1 个月, 管壁上有新生血管形成. (b) 移植术后 2 个月, 明胶导管完全分解吸收, 再生的神经进入缺损部位, 如箭头所示

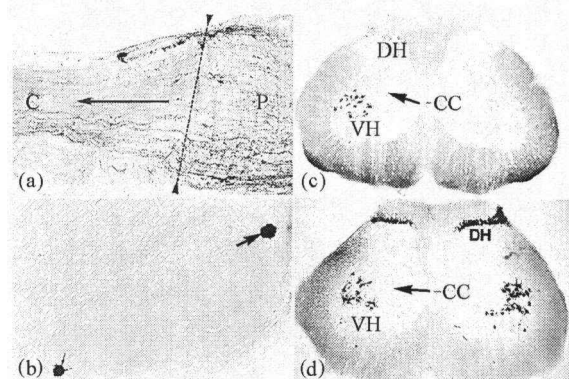


图 3 HRP 染色

(a) 手术后 3 个月, 纵向切片的坐骨神经, 用 WGA-HRP 染色. 轴突可被追踪从远侧端到近侧端. 点线所示边界线, 箭头示从远侧端到近侧端. (b) 手术后 2 个月, 脊髓背根神经节中 2 个感觉神经元被 TMB 标记染色阳性. (c) 手术后 2 个月, 脊髓的运动神经元被 WGA-HRP 染色. VH: 腹侧角的运动神经元. CC: 中央管, DH: 背侧. (d) 手术后 4 个月, 脊髓横切面(WGA-HRP 染色). TMB 阳性的前侧运动神经细胞和后侧的感觉神经末梢

将再生的坐骨神经用 Bodian 方法染色可见, 2 个月时再生的轴索达远侧端, 髓鞘已经形成. Schwann 细胞增生, 但未见 Ranvier 节. 神经纤维较正常组细, 可见许多新生的血管. 与正常组比较, Schwann 细胞和成纤维细胞数目多、呈无规律排列. 但 4 个月时, 则与正常相似(图 4).

图 5 是用铁染色法显示的再生神经的髓鞘. 4 个月后再生有髓神经标本的直径比 2 个月大, 且髓鞘也增厚.

S-100 蛋白质染色标本如图 6 所示. 2 个月时可见大量 Schwann 细胞增生, 4 个月后 Schwann 细胞数目减少且排列有序.

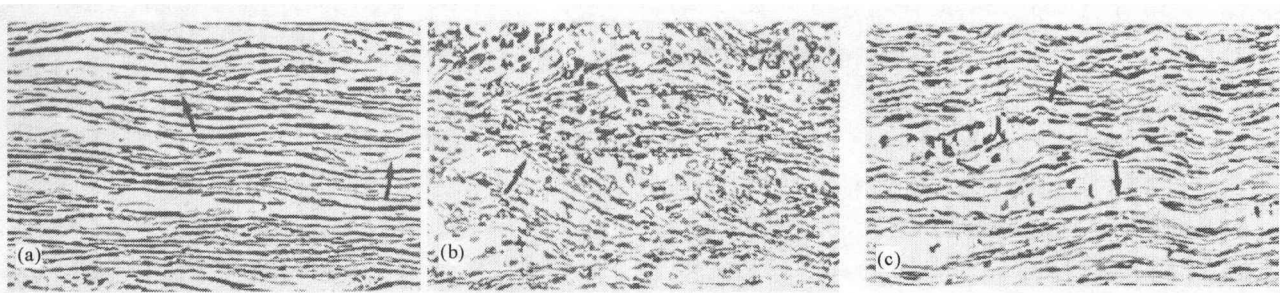


图4 Bodian 染色

(a) 正常坐骨神经. (b) 手术后2个月, 新生神经纤维排列紊乱, Schwann 氏细胞生长显著. (c) 手术后4个月与2个月和3个月相比, 神经纤维的排列趋于规律, Schwann 细胞数量减少、Schwann 细胞核平行排列

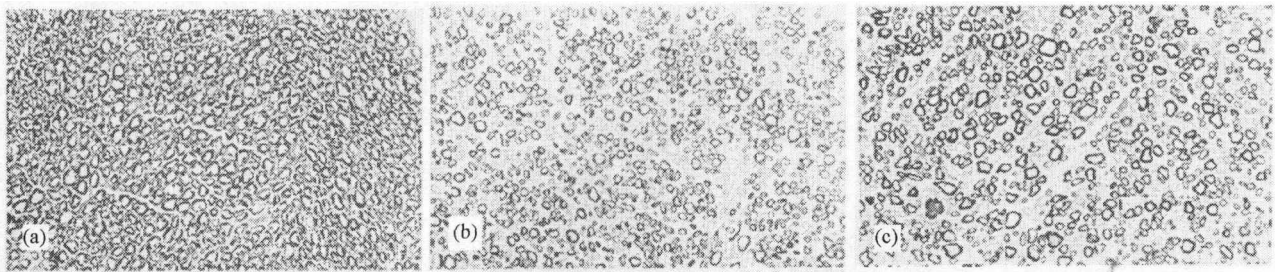


图5 银染色

(a) 正常的坐骨神经. (b) 手术后2个月, 有许多新生的髓鞘, 数量较多, 但髓鞘壁较薄. (c) 手术后4个月, 新生的髓鞘与2个月相比直径增大, 但仍比正常髓鞘薄

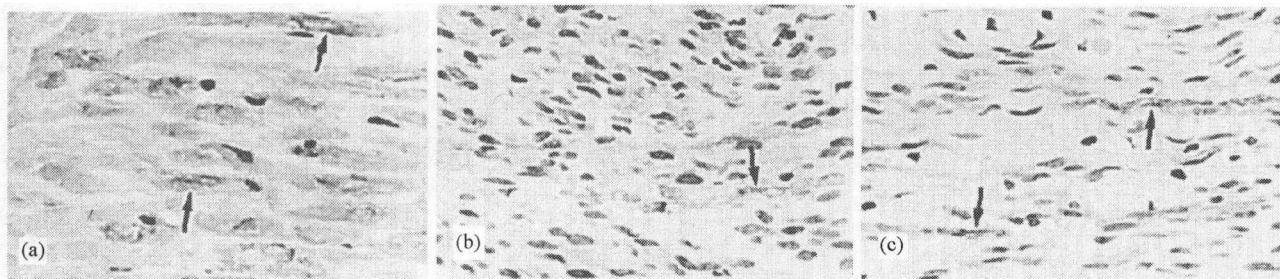


图6 S-100 蛋白质免疫组织化学染色

(a) 正常坐骨神经, 箭头所示为髓鞘. (b) 2个月后 Schwann 细胞大量增生, 排列紊乱. (c) 4个月后 Schwann 细胞数量减少, 排列有序

2.2 电生理学观察

手术后2个月, 诱发肌电图显示 M-波和 H-波, 说明再生神经的机能恢复(图7). 以1.5倍阈值的电流刺激再生侧坐骨神经时, 可以同时观察到 M-波和 H-波; 对照侧需以1.35倍阈值的电流刺激, 可以同时观察到 M-波和 H-波. 再生侧和正常侧 H-波的阈值均较 M-波低. 即感觉神经纤维的阈值低. 再生侧 M-波的潜伏时间是正常侧的2倍. 再生侧 H-波峰的潜伏时间约是正常的2倍. 再生侧的潜伏时间所以延长, 是因为再生侧神经的传导速度较正常侧慢. M-波的潜伏时间的平均值, 正常侧为 $(3.51 \pm 0.83)ms$, 再生侧为 $(7.62 \pm 1.64)ms$ ($n=8$).

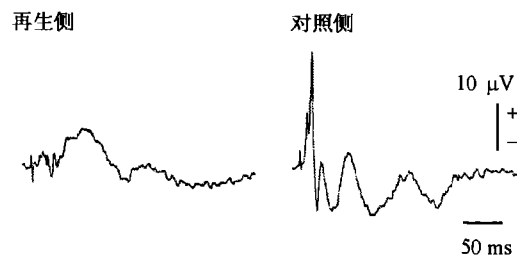


图7 诱发肌电图

左侧为再生一侧, 右侧为对照

图8是手术后2个月的标本. 刺激动物坐骨神经, 从大脑表层的皮肤记录大脑体性感诱发电位

(SEP). 左侧是刺激再生侧坐骨神经获得的 SEP, 右侧是刺激正常获得的 SEP. 再生侧的 SEP 与正常侧比较, 其波峰在刺激后 30 ms 以内出现, 快纤维成分少, 慢纤维经过最初成分的峰值潜伏时间比对照侧长. 再生侧的 SEP 与正常侧相比, 其绝对值也小. SEP 的潜伏时间, 正常侧为 (58.0 ± 11.9) ms, 再生侧为 (85.1 ± 29.6) ms ($n = 8$). 即, 再生侧是正常侧的 1.5 倍.

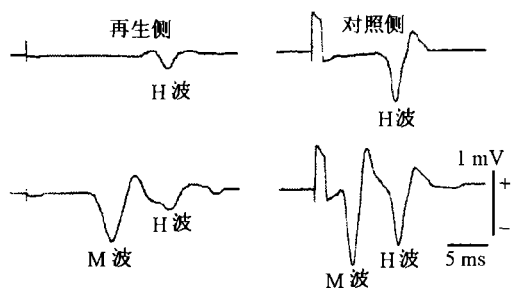


图 8 诱发筋电图

左侧是刺激再生侧坐骨神经获得的 SEP, 右侧是刺激正常获得的 SEP. 大脑体性感觉诱发电位(SEP)的潜伏时间, 再生侧是正常侧的 1.5 倍

3 讨论

本研究证明, 用热脱水架桥制作的明胶导管作为周围神经再生的载体具有良好的组织亲和性, 而 0.5% GA 架桥的明胶导管则未见神经再生. 其原因之一可能是由于架桥方法导致导管在体内分解速度的不同. 热脱水架桥制作的膜在体内 8 周即完全分解吸收, 而 0.5% GA 架桥的明胶导管, 12 周以上仍残留体内^[2]. 由于热脱水架桥的明胶导管早期即开始分解, 新生的毛细血管网可以在导管内壁形成, 组织液和营养因子等进入导管内, 为神经再生提供必需的营养. 另一方面, 0.5% GA 架桥的明胶导管在体内分解速度缓慢, 新生的血管难以形成. 今后我们将采用多种交联剂, 以控制明胶导管的含水量和分解速度, 有可能制成新型神经再生的载体, 桥接较大的周围神经缺损.

周围神经损伤后, 末梢侧靶组织分泌神经生长因子等生物活性物质诱导中枢侧的神经出芽再生, 同时, 迅速增生的 Schwann 细胞则分泌神经营养因

子和细胞外基质等聚集于损伤局部促进神经的再生. 因此, 调整局部神经再生的微环境, 对促进神经再生十分重要^[6]. 本研究使用 DHT 明胶导管组, 早期即有新生血管网形成, 2 个月时神经再生完成. 并发现神经纤维和 Schwann 细胞均有一个从大量增生、排列紊乱到细胞比例接近正常和排列有序的过程. 这是神经损伤后从发育到成熟过程中的一个自稳态调节过程.

再生侧的 M-波和 H-波与正常侧相比, 潜伏期明显延长, 其绝对值也小. 可能是再生的神经纤维一般传导速度较慢, 每根纤维传导速度的范围分散. 大脑体性感觉诱发电位的潜伏时间则再生侧比正常侧延长. 在记录刺激再生侧后的大脑体性感觉诱发电位时发现短潜时的快反应纤维成分比正常侧显著减少. 这是因为从坐骨神经到延髓后索核的轴索传导速度减慢及再生轴索的总数比正常的少所引起.

为了临床应用, 我们将调节导管在体内分解吸收的速度以适应神经再生的时间, 并将转基因细胞和参与周围神经再生相关的营养因子群体等以缓释的方式引入导管中央, 这样可能修复更长的神经缺损. 如这方面研究的进展顺利, 最终将代替临床的自体神经移植.

参 考 文 献

- Ikeda Y, et al. Gelation of hydrophobized pullulan. The 31th Meeting of Biomaterial. Osaka, Japan, 1993, 103
- Ikeda Y, et al. Change of gelation characteristics by annealing the solution of polysaccharide/water system. The 20th Seminar on Medical Macromolecule, Koto, Japan, 1991, 79
- Favaro G, et al. Peripheral nerve regeneration through bioresorbable tubular prostheses. The 17th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, 1991, 248: 1
- Moko K, et al. Studies on Schwann cells during peripheral nerve regeneration, The Learned Journal of Koto Provincial Collage (in Japanese), 1986, 95: 1039
- 杜卓民. 实验组织学技术. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 171
- Tessa Hadlock, et al. A polymerfoam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration. Tissue Engineering, 2000, 6(2): 119