

[文章编号] 1000-1182(2009)01-0075-04

几丁聚糖—胶原再生室和双桥接技术修复兔面神经缺损的实验研究

屈振宇^{1,2} 杨聪¹ 王卫红¹ 许彪¹

(1.昆明医学院附属口腔医院 口腔颌面外科, 云南 昆明 650031;

2.大连市口腔医院 口腔外科, 辽宁 大连 116021)

[摘要] 目的 探讨利用双桥接技术和几丁聚糖—胶原再生室修复兔面神经长段缺损的可行性。方法 将实验用30只健康中国大耳白兔随机分成3组, 分别为双桥接组(组)、原位神经吻合组(组)、正常空白对照组(组)。手术制作兔右侧面神经下颊支15 mm缺损模型, 采用双桥接和原位神经吻合进行修复。术后12周进行大体观察、神经电生理检测、组织学观察、图像分析, 以评价神经修复情况。结果 12周时, 组几丁聚糖—胶原再生室吸收明显, 且无异物反应, 能抑制周围纤维结缔组织形成, 可为神经再生提供良好的微环境。组吻合口处膨大, 周围有瘢痕样组织包绕。组神经肌肉功能恢复良好, 神经传导速度(NCV)和复合肌肉动作电位振幅(M波)检测结果经统计学分析显示与组相似($P>0.05$), 但仍未恢复至正常水平($P<0.01$)。结论 双桥接技术修复长段神经缺损方法简单、效果肯定。几丁聚糖—胶原再生室生物相容性良好, 适于体内植入修复神经缺损。

[关键词] 神经再生; 双桥接技术; 几丁聚糖—胶原再生室

[中图分类号] R628 **[文献标识码]** A

The experimental study of double-bridging facial nerve defect in rabbits by chitosan-collagen chambers QU Zhen-yu^{1,2}, YANG Cong¹, WANG Wei-hong¹, XU Biao¹. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Kunming Medical University, Kunming 650031, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Dalian Stomatological Hospital, Dalian 116021, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the feasibility of repairing the long defects in rabbits by double-bridging technique and chitosan-collagen chambers. **Methods** Thirty Chinese rabbits were divided into three groups randomly. 15 mm defects in right facial nerve of rabbits were repaired in three groups: double-bridging(group), nerve auto-grafts (group), and normal control (group). General observation, electrophysiological study, histological study and image analysis were performed 12 weeks postoperatively. All results were used to evaluate the nerve regeneration. **Results** Chitosan-collagen chambers were obviously degraded 12 weeks postoperatively and there was no foreign body reaction at this stage. They also restrain the formation of neuroma and provided a good microcircumambience for nerve regeneration. The recovery of nerve regeneration were good in group . The nerve conduction velocity (NCV) and compound muscle action potential(CMAP) of regenerated nerve were analyzed, which showed that there was no significant difference between the group and group ($P>0.05$), but they all did not recover to normal level($P<0.01$). **Conclusion** Double-bridging technique is a simple method for treatment of long nerve defect and its effect is certain. Chitosan-collage chambers is suitable to implant into body in order to repair a nerve defect with excellent biocompatibility.

[Key words] nerve regeneration; double-bridging technique; chitosan-collagen chamber

面神经损伤的修复方法总体可分为两大类, 即显微外科技术和神经导管技术。虽然这两种技术方

法在修复损伤神经方面都取得了不同程度的进步, 但在神经再生质量方面仍需进一步提高^[1-2]。当代的显微外科手术不仅需要精细的手术器械, 而且需要精湛的手术技艺。当代的神经导管技术不仅需要昂贵的高分子生物合成材料, 而且需要细胞培养及种植技能, 这些在一般级别的口腔颌面外科很难开

[收稿日期] 2008-03-03; [修回日期] 2008-06-16

[基金项目] 云南省自然科学基金资助项目(2006C0002R)

[作者简介] 屈振宇(1976-), 男, 河北人, 主治医师, 硕士

[通讯作者] 许彪, Tel: 13808756107

展^[3]。研究显示,由中国首创并发展的几丁质·几丁聚糖神经再生室修复周围神经缺损获得成功^[4]。基于上述研究结果和实际问题,本实验使用几丁聚糖—胶原再生室,利用双桥接技术修复兔面神经损伤,旨在降低手术难度及再生室造价的同时,寻找一种适于广大基层医生应用的简单、有效修复长段神经缺损的手术方法。

1 材料和方法

1.1 几丁聚糖—胶原导管的制备

分别将几丁聚糖和 型胶原用2%醋酸溶液配制成1%的溶液,按1:2的比例将几丁聚糖和胶原溶液混合,静置于2~10℃数小时以排气泡。将此混合液浇于水平旋转的钢模上,用热风干燥。反复浇制成长1.5 cm、内径1.2~1.6 mm、壁厚0.1~0.2 mm的神经导管。然后,浸泡于75%乙醇和0.1%甲醛混合溶液中过夜,使两者交联。导管取出后用75%乙醇再浸洗1周,每日更换乙醇,脱去甲醛。浸泡于75%乙醇中保存备用,使用前24 h以生理盐水反复漂洗除去乙醇。

1.2 动物分组

选取健康中国大耳白兔(昆明医学院动物中心提供,云动管第99033号)30只,雌雄不限,体重1.8~2.2 kg。随机分成3组,分别为双桥接组(组)、原位神经吻合组(组)、正常空白对照组(组)。

1.3 手术方法

使用3%戊巴比妥钠耳缘静脉注射麻醉(30~40 mg/kg),右面颊面横切口,切开皮肤、皮下组织至咀嚼肌表面,寻找并暴露面神经下颊支,切取15 mm神经片段。在组,切取两个5 mm长的几丁聚糖—胶原导管,利用常规神经导管桥接固定技术,分别距导管口1.0~1.5 mm处,将长段神经片段外膜缝在导管上,固定1针,形成“双节棍”桥接预备体(图1)。同法固定缺损神经的近、远两个断端,保持再生室内断端间隙2~3 mm。围绕导管外周缝合固定1针,防止脱落。在组,将切取的神经片段在10倍手术显微镜下行神经外膜原位吻合术。在组,解剖出下颊支后,1-0手术缝线打松结标记,不做其他处理。将3组动物冲洗伤口后分层缝合。相同饲养条件下分笼饲养,观察12周后处死动物。

1.4 观察检测方法

1.4.1 大体观察 30只动物于术后12周再次全麻,手术寻找并暴露修复的神经段。观察神经再生情况、几丁聚糖—胶原导管吸收情况、周围组织粘连情况

1.4.2 神经电生理检测 大体标本观察完毕后,保持室温20~25℃,使用MedLab生物信号采集处理系统,在神经缺损修复区近、远端检测神经传导速度(nerve conduction velocity, NCV)和复合肌肉动作电位振幅(M波),在右侧口角下唇的口轮匝肌0.5 cm深处接收。

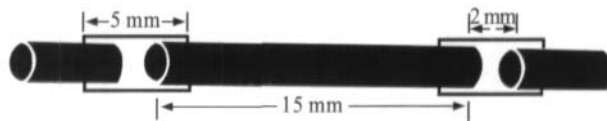


图1 双桥接模型

Fig 1 The model double-bridging technique

1.4.3 组织学观察 神经电生理检测完毕后立即取材,固定24 h,制备蜡块。组近、远端再生室内再生神经0.5 cm和组近、远端吻合口处神经0.5 cm及组中段神经1 cm行连续半薄切片。部分切片行常规HE染色,部分切片行Gomori银染。

1.4.4 图像分析 随机选定Gomori银染切片,用Mais-2000图像分析系统进行处理。实际测量时,在电子显微镜下放大400倍,每张切片随机选取两个视野进行计数。测量近、远端再生轴突数、再生轴突截面积、再生神经截面积,根据公式:轴突再生率=远端再生轴突数/近端再生轴突数×100%;再生轴突成熟度=再生轴突截面积/再生神经截面积×100%,计算轴突再生率和再生轴突成熟度。

1.5 统计学分析

采用SPSS 11.0统计软件对各组数据进行方差分析(one way ANOVA)。

2 结果

2.1 大体观察结果

组导管表面覆盖一层薄的血管膜,导管与周围组织无明显粘连。剥离且提起整段神经,管内两断端神经无脱落,再生神经已能承受相当拉力。几丁聚糖—胶原导管虽已明显吸收变薄,但仍能保持原形不被压扁,切开导管,可见再生神经稍细于两端,吻合口处平滑,无明显膨大(图2)。组可见吻合口处呈球形膨大,周围有明显瘢痕样组织包绕(图3)。

2.2 神经电生理检测结果

、组NCV的测定结果分别为(13.11±1.49)、(12.64±1.11)、(35.43±1.06) m/s。、组复合肌肉动作电位振幅(M波)测定结果分别为(1.50±0.62)、(1.89±0.90)、(6.04±1.72) mV。和组NCV和复合肌肉动作电位振幅(M波)两两比较差异均无统计学意义($P>0.05$),但在12周时二者仍低于组,且差异有统计学意义($P<0.01$)

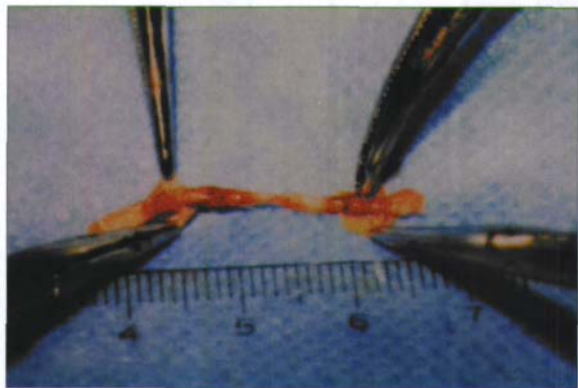


图2 I组离体标本图
Fig 2 Double-bridging sample of group I

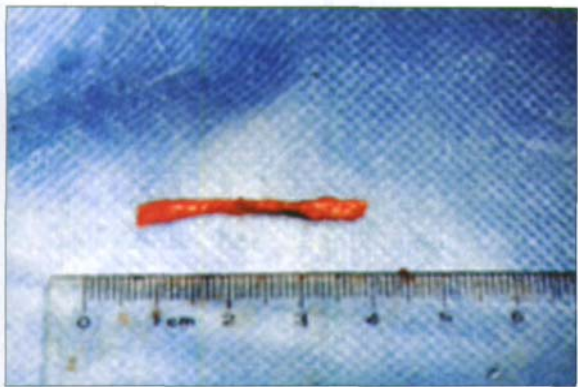


图3 II组离体标本图
Fig 3 Nerve autografts sample of group II

2.3 组织学观察结果

HE染色后低倍镜观察可见，I组大量再生神经纤维，但排列不整齐，束膜形成不完整(图4)，纵切面可见再生神经纤维排列呈波浪形，整齐通过导管，管内无明显纤维结缔组织侵入。II组神经纤维排列较整齐，但间质松散，结缔组织增生明显(图5)。III组神经纤维排列整齐，间质紧密，神经外膜、束膜均完整。Gomori银染高倍镜观察可见，与I组相比，II组再生神经细小，直径明显大小不等，髓鞘薄且不连续；III组再生神经排列较紧密，直径大小基本相等，但仍不规则，与束膜间隙较大。

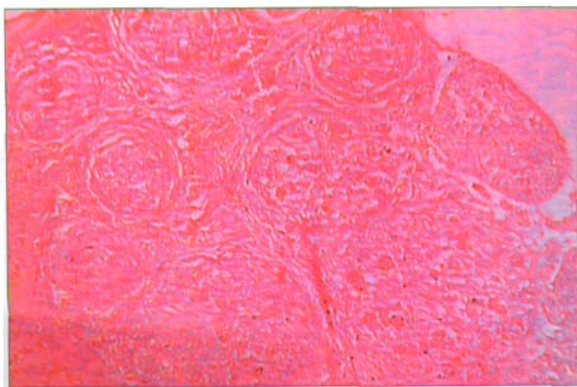


图4 I组再生神经横切面的观察结果 HE ×10
Fig 4 Group I histological transverse section result HE ×10

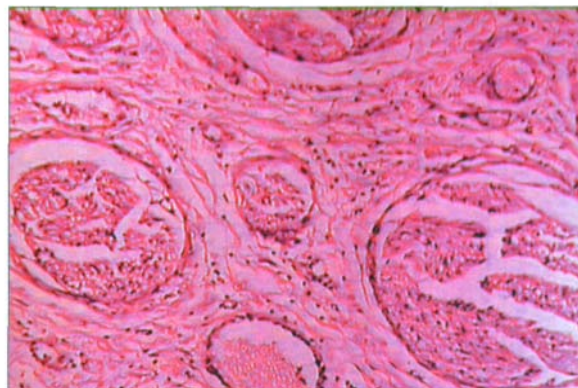


图5 II组再生神经横切面的观察结果 HE ×10
Fig 5 Group II histological transverse section result HE ×10

2.4 图像分析结果

I、II组轴突再生率分别为 $(76.41 \pm 2.87)\%$ 、 $(79.83 \pm 6.35)\%$ 。经统计学分析显示，组间方差齐($F=0.05$)，二者之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

再生轴突成熟度的测定结果见表1。在近端，II组再生轴突成熟度大于I组，二者间差异有统计学意义($P<0.05$)；III组接近II组，二者比较差异无统计学意义($P>0.05$)。在远端，I、II组两两比较差异无统计学意义($P>0.05$)，III组明显高于I、II组，差异有统计学意义($P<0.05$)。同一组间对应近、远两个断端有髓神经面积恢复率相比较，差异均有统计学意义($P<0.01$)。

表1 再生轴突成熟度的测定结果($\%$ ， $n=32$ ， $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The maturity degree of myelinated axon
($\%$ ， $n=32$ ， $\bar{x} \pm s$)

组别	再生轴突成熟度		
	近端	远端	中间
I	56.90 ± 5.62	46.15 ± 7.82	—
II	65.32 ± 2.36	50.95 ± 1.11	—
III	—	—	66.74 ± 8.31

3 讨论

3.1 双桥接技术

由于双桥接技术临床上手术条件和手术技能千差万别，很难满足显微外科修复外周神经损伤的两大手术原则，致使术后功能恢复不尽人意^[5]。以神经趋化性学说为理论基础的神经再生室技术发展至今也有120多年的历史，人们选择不同的材料制成导管，使用不同的方法改善再生内环境来提高神经修复的质量，但仍存在一些问题：首先，不添加任何促神经再生物质的中空惰性导管可桥接缺损的距离短、质量差、临床应用价值不大，只能作为一种研究工具使用^[2]；其次，填塞了各种促神经再生物质的生物活性导管修复损伤神经仍属于一种“暗

箱操作”，它们之间复杂的分子及细胞机制仍不很清楚；最后，虽然神经组织工程学发展很快，但常用的聚乙醇酸(polyglycolic acid, PGA)、聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)、聚乳酸/乙醇酸共聚物(poly-lactic-co-glycolic acid, PLGA)导管造价极高，而且，无论是管内填塞激活状态的神经膜细胞还是填塞线性排列的磁性凝胶修复缺损神经均为动物实验阶段^[6-7]。

在本实验中提出“双桥接技术”，旨在降低手术难度的同时，发展一种简单、有效的修复神经缺损的方法，适用于广大基层医生的应用。同时，也可把双桥接模型作为一种研究工具，分别探讨缺损神经近、远两个断端也就是靶器官和神经元胞体在神经再生过程中的作用。

本研究发现如下。1)双桥接技术容易满足显微外科修复外周神经损伤的两大手术原则，即无损伤和无张力原则。双桥接模型的手术操作空间更大、对神经损伤更小。它分别在4个位置缝1针，而神经吻合修复需要在两个位置最少缝3针。双桥接模型两个再生室长度总和为10 mm，即使在截取神经长度不理想的情况下，也足以提供无张力条件。2)双桥接技术修复神经缺损效果明显，无论是神经电生理检测、组织学观察，还是图像分析结果，均与组相似，而且在临床操作方面比经典的神经吻合修复更具一定的优越性，即使在供体神经取材不利的情况下，如长度不足、直径相异时，双桥接技术均能更容易修复神经缺损。利用神经趋化性的选择性再生，比标记区分神经束的缝合方式更简单、更有效。

3.2 关于几丁聚糖—胶原再生室

中国科研工作者于1992年应用几丁质制成神经再生室来修复周围神经缺损，并获得成功。通过对材料界面上的氨基进行乙酰化或乙酐化可控制其降解速度，几丁质脱乙酰基得到几丁聚糖，由几丁聚糖制成的神经再生室比几丁质再生室更具韧性，同样有良好的促神经再生作用。主要因为几丁质、几丁聚糖有良好的细胞相容性和组织相容性，其组织液能促神经膜细胞生长、分裂，它还有促血管内皮细胞生长，抑制成纤维细胞生长的特性，无论是动物实验还是临床应用都能有效的防止神经瘤的形成^[8]。胶原是细胞外基质的主要成分，在神经再生过程中参与基质桥的形成，同时促进细胞的生长和分化，利于轴突爬行延伸^[9]。

在本实验中，使用性能优越的几丁聚糖—胶原复合导管，可同时兼顾几丁聚糖和胶原的优点，修复兔的面神经缺损。本研究发现，无论是大体标本

观察，还是HE及Gomori银染切片观察，在防止周围组织粘连、瘢痕形成和神经瘤形成方面均优于组，与其他研究结果相同^[10]。大体标本观察结果显示，几丁聚糖—胶原再生室有良好的组织相容性，无一例异物肉芽肿形成。12周时降解吸收，但仍可保持足够的强度，为轴突再生提供良好的通道作用。此外，几丁质、几丁聚糖来源广泛，价格便宜，几丁聚糖—胶原再生室制作工艺相对简单，可按需要制成任意口径及长度，有足够的韧性，手术缝合时不易撕裂，消毒保存方法简单廉价。

[参考文献]

- [1] Dahlin LB, Lundborg G. Use of tubes in peripheral nerve repair [J]. *Neurosurg Clin N Am*, 2001, 12(2) 341-352.
- [2] Lundborg G, Hansson HA. Nerve regeneration through preformed pseudosynovial tubes. A preliminary report of a new experimental model for studying the regeneration and reorganization capacity of peripheral nerve tissue[J]. *J Hand Surg*, 1980, 5(1) 35-38.
- [3] Evans GR, Brandt K, Katz S, et al. Bioactive poly(L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(3) 841-848.
- [4] 苟三怀, 侯春林, 臧鸿声, 等. 几丁质桥接周围神经缺损的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 1993, 7(3) :169-171.
GOU San-huai, HOU Chun-lin, ZANG Hong-sheng, et al. Experimental study of bridging the gap of the peripheral nerve with chitin in rats[J]. *Chin J Reparative Reconstructive Surgery*, 1993, 7(3) :169-171.
- [5] Shen ZL, Berger A, Hiermer R, et al. A Schwann cell-seeded intrinsic framework and its satisfactory biocompatibility for a bioartificial nerve graft[J]. *Microsurgery*, 2001, 21(1) 6-11.
- [6] Matsumoto K, Ohnishi K, Kiyotani T, et al. Peripheral nerve regeneration across an 80 mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: A histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves[J]. *Brain Res*, 2000, 868(2) 315-328.
- [7] Hashimoto T, Suzuki Y, Kitada M, et al. Peripheral nerve regeneration through alginate gel: Analysis of early outgrowth and late increase in diameter of regenerating axons[J]. *Exp Brain Res*, 2002, 146(3) 356-368.
- [8] 侯春林, 顾其胜. 几丁质与医学[M]. 上海: 上海人民出版社, 2001: 1-20.
HOU Chun-lin, GU Qi-sheng. Chitin and medicine[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2001: 1-20.
- [9] Matsumoto K, Nakamura T, Shimizu Y, et al. A novel surgical material made from collagen with high mechanical strength: A collagen sandwich membrane[J]. *ASAIO J*, 1999, 45(4) 288-292.
- [10] 魏欣, 劳杰, 顾玉东. 几丁质胶原复合膜促进周围神经再生的实验研究[J]. *上海医学*, 2001, 24(9) 534.
WEI Xin, LAO Jie, GU Yu-dong. Chitolsan-collagen film enhance peripheral nerve regeneration: An experiment research[J]. *Shanghai Medical J*, 2001, 24(9) 534.