

· 基础研究 ·

不同冷冻时间对异体神经移植后生理特性的影响

张 勇,陈德龙,陈小龙,曾希银,聂春福
(遂宁市第一人民医院骨科,四川 629000)

摘要:目的 观察超深低温(-196℃)条件下不同冷冻时间对异体神经移植后生理特性的影响。方法 将 80 只雌性 Wistar 大鼠随机分为取材组(20 只),对照组(A 组:新鲜自体神经移植组;B 组:新鲜异体神经移植组,每组 10 只)和实验组(按取材神经冷冻保存 3、6、9、12 周后移植分为 C、D、E、F 组,每组 10 只)。术后做大体、光镜、电镜观察,神经电生理测试。结果 移植 9 周后,大体、光镜、电镜结果显示:B 组生理特性影响最大,A 组最小,C、D、E、F 组次之;电生理结果显示:A 与 B、A 与 E、A 与 F 之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 异体神经移植后的生理特性和冷冻时间存在依从关系。

关键词:低温保存;异体神经;冷冻;移植;生理特性;大鼠,Wistar

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.29.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)29-3521-03

Effects of different conserve time on physiological characteristics of allograft nerve transplantation

Zhang Yong, Chen Delong, Chen Xiaolong, Zeng Xiyin, Nie Chunfu

(Department of Orthopedics, the First People's Hospital of Suining City, Suining, Sichuan 629000, China)

Abstract: Objective To observe the effect of different conserve time in ultra deep cryopreservation(-196℃) on physiological characteristics of allograft nerve transplantation. **Methods** A total of 80 female Wistar rats were divide into three groups by random principle; derived group which 20 rats were sacrificed to get both sides of femoral nerves; control groups which each group had 10 rats include group A for fresh autologous nerve transplantation, group B for fresh allograft nerve transplantation; experiment groups which each group had 10 rats including groups C, D, E, F that transplanted after femoral nerves conserve in the -196℃ for 3, 6, 9, 12 weeks respectively, and the results of exterior appearance, light microscope, electron microscope were observed and electrophysiological test was conducted after transplantation. **Results** After 9 weeks transplantation; the physiological characteristics of group B was most affected, followed by group C, D, E, F, group A was with minimal impact; the result of electrophysiological test showed that groups A&B, A&E, A&F had significant difference($P < 0.05$). **Conclusion** The physiological characteristics of allograft nerve transplantation relate to the freezing time.

Key words: cryopreservation; allograft nerve; freezing; transplantation; physiological characteristics; rate, Wistar

异体神经是临床上修复长段主要神经缺损重要的研究材料。但它最大弊端是免疫排斥^[1],从而影响神经移植后的生理特性。在这方面国内外学者做了大量的基础研究^[2-8]。研究普遍认为:降低异体神经移植免疫排斥的较好方法是超深低温(-196℃)冷冻保存。那么,究竟保存多长时间才能使移植后的生理特性最佳呢?目前最长研究时间为 3 周,更长的时间有待进一步探索。本研究的目的是观察超深低温条件下不同冷冻时间对异体神经移植后生理特性的影响。

1 材料与方

1.1 主要实验试剂和器械 甘油(纯度大于 99.0%,泸州生物试剂公司);水合氯醛(纯度大于 98.0%,泸州生物试剂公司);电镜(JEM-1400,日本电子株式会社);光镜(Olympus Bx50,苏州易微光学公司);显微手术镜(XTS-4A,江苏镇江中天光学仪器公司);电生理实验系统(BL-420F,成都生物设备有限公司)。

1.2 实验动物及分组 80 只雌性 Wistar 大鼠(重庆医科大学动物实验中心提供),质量(280±30)g。取材组 20 只,其余 60 只按随机原则分为对照组(A 组:新鲜自体神经移植组;B 组:新鲜异体神经移植组,每组 10 只)和实验组(按取材组神经在-196℃条件下保存 3、6、9、12 周后移植分为 C、D、E、F 组,每组 10 只。)

1.3 方法

1.3.1 取材 用水合氯醛将 Wistar 大鼠麻醉后,暴露双侧的坐骨神经,切取神经于 1.0 cm,总计 40 根。将取下的神经分 4 组每组 10 根放于 50%甘油的 EP 管中,而后在超深低温条件下按不同冷冻时间进行保存。

1.3.2 神经移植 A 组:坐骨神经取下后立即原位移植于自体;B 组:坐骨神经取下后立即两两交叉移植;C、D、E、F 组分别在坐骨神经冷冻保存相应时间后,在常温下(25℃)用生理盐水复温,按随机原则进行移植。所有组别术后均不用药物处理。

1.3.3 观察指标 术后间隔一定时间观察移植侧肢体的情况;术后 3、6、9 周做神经电生理检测,术后第 9 周做光镜、电镜观察。

1.4 统计学处理 结果用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间采用 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大体观察 A 组术后第 3 天大鼠足部轻微肿胀糜烂,术后 1 周趋于稳定,术后 3 周肿胀糜烂渐消,移植段表面散在少许毛细血管分布,和周围组织无粘连。术后 6 周肿胀糜烂基本消除,移植段神经表面分布大量毛细血管。术后 9 周肿胀糜烂

完全消除,移植段神经表面已形成网状毛细血管。B 组术后第 3 天足部肿胀糜烂便很明显,术后 1 周足趾便开始散在性脱落,术后 3 周肿胀糜烂范围加大,程度加深,移植段神经和周围组织黏连重,神经表面毛细血管稀少。术后 6 周趋于稳定,移植段神经与周围组织黏连很严重,神经表面只可见少量毛细血管。术后 9 周糜烂基本修复,移植段神经近远端被纤维组织包裹,难以分离,神经表面毛细血管依旧稀少。D、C 组很接近,稍逊于 A 组,明显优于 B 组。E、F 组的效果优于 B 组,逊于 A、

C、D 组;E 组的效果稍好于 F 组。

2.2 神经电生理 动作电位峰值、神经传导速度统计分析:移植 3 周、6 周后:A 组与 B、C、D、E、F 组之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。移植 9 周后,A 组和 B、E、F 组之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$);A 组与 C、D 组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$);C、D 组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),这说明坐骨神经组冷冻保存 3 周、6 周后移植,9 周后的电生理特性近似于 A 组,见表 1、2。

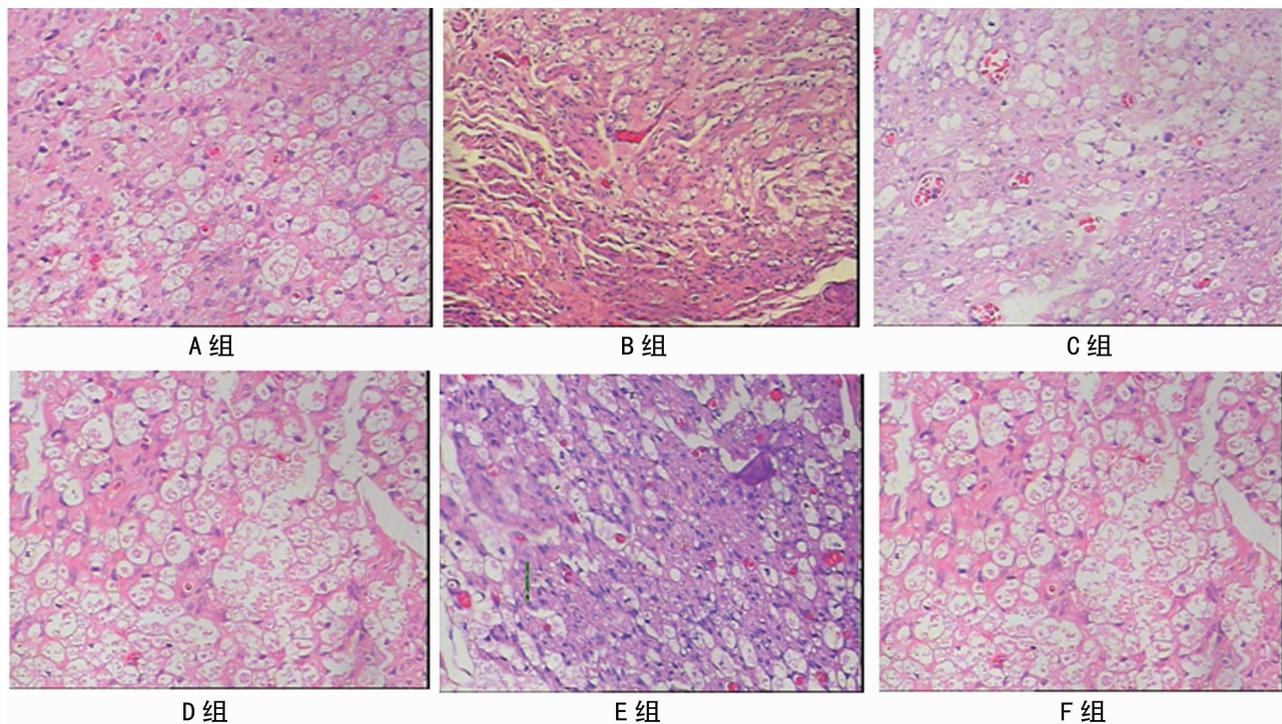


图 1 术后 9 周各组光镜结果($\times 200$)

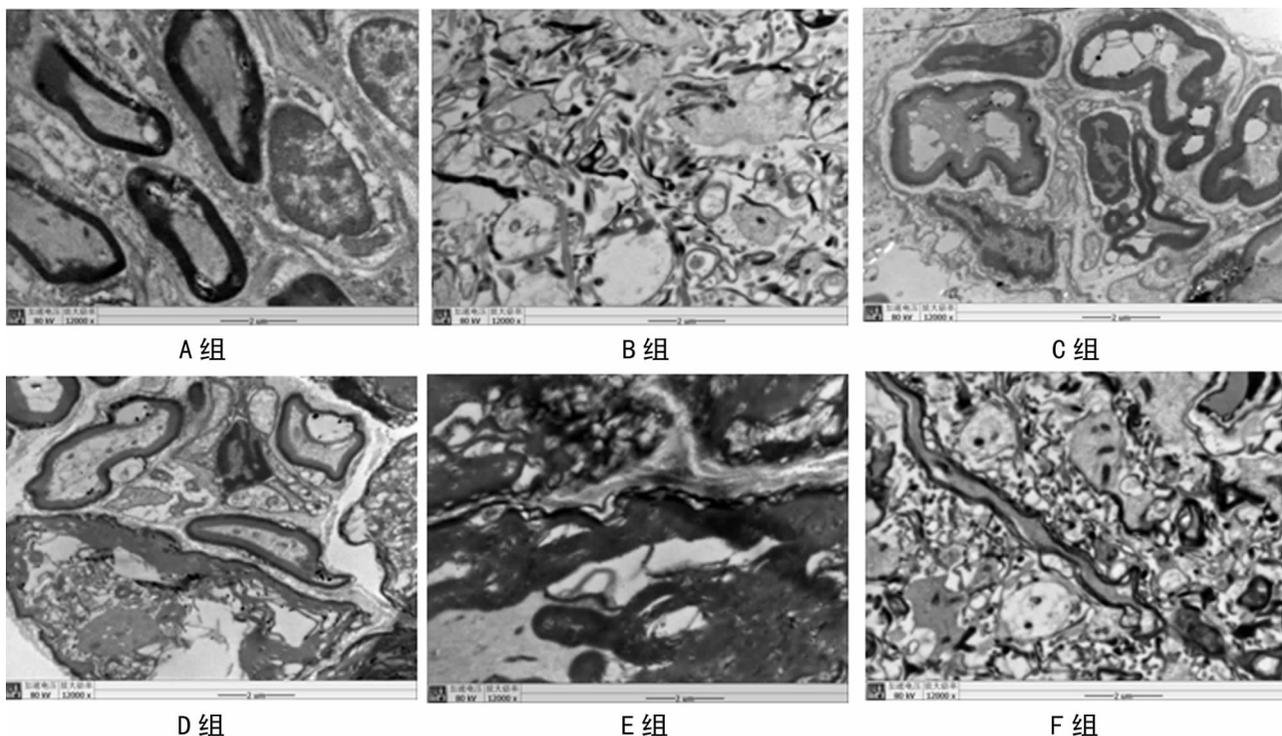


图 2 术后 9 周各组电镜结果($\times 12\ 000$)

2.3 光镜观察 各组别术后 9 周取移植神经中段做半薄切片 HE 染色观察,结果见图 1。A 组:少量轴突肿胀和空泡变性,轴突密度高,施万细胞大小均一增生明显,极其少量的淋巴细胞浸润,新生毛细血管大量生成;B 组:空泡变性明显,大部分轴突水肿,施万细胞大小不一散在增生,淋巴细胞大范围、高密度浸润,少量新生毛细血管;C、D 组无明显差别,整体效果接近于 A 组;E 组差于 A、C、D 组,优于 B、F 组,F 组优于 B 组。

表 1 术后 3、6、9 周各组别动作电位峰值
($\bar{x} \pm s, n=5, mV$)

组别	3 周	6 周	9 周
A 组	8.15±0.43	8.93±0.69	9.02±0.78
B 组	4.97±0.18	5.29±0.82	5.80±0.32 ^a
C 组	7.01±0.39	8.13±0.12	8.89±0.69
D 组	7.23±0.46	8.21±0.57	8.92±0.44
E 组	6.03±0.61	7.17±0.72	7.57±0.52 ^a
F 组	5.91±0.82	6.81±0.59	7.19±0.39 ^a

^a: $P < 0.05$, 与 A 组比较。

表 2 术后 3、6、9 周各组别神经传导速度
($mV, \bar{x} \pm s, n=5$)

组别	3 周	6 周	9 周
A 组	10.24±0.42	12.44±0.17	12.57±0.67
B 组	5.22±0.38	5.87±0.41	6.81±0.36 ^a
C 组	7.69±0.89	9.15±0.38	12.03±0.42
D 组	7.93±0.32	9.37±0.22	12.21±0.39
E 组	5.96±0.46	7.29±0.42	9.12±0.73 ^a
F 组	5.68±0.89	7.08±0.56	9.01±0.64 ^a

^a: $P < 0.05$, 与 A 组比较。

2.4 电镜观察 各组别术后 9 周取移植神经中段做超薄切片电镜观察,结果见图 2。A 组:髓鞘外形光滑,发育成熟,有髓或无髓神经纤维大量再生,施万细胞轴浆均匀、丰富,呈旺盛状,效果最好。B 组:难见神经纤维、施万细胞、轴突再生,紊乱的结缔组织多见,效果最差。C、D 组差别不大但稍逊于 A 组。E、F 组明显差于 A、C、D 组。

3 讨 论

3.1 自体神经移植后生理特性差别的主要原因 通过本实验可以看出:自体神经移植后生理特性是明显优于异体神经的。造成其差别的主要原因是免疫排斥的影响。免疫排斥是机体对移植物(异体细胞、组织或器官)通过特异性免疫应答使其遭受破坏的过程。一般是指移植术后,受者可识别移植物抗原并产生应答,移植物中免疫细胞也可识别受者抗原组织并产生应答。在同种异体移植中,排斥反应有两种基本类型:宿主抗移植物反应(HVGR)和移植物抗宿主反应(GVHR)。免疫排斥反应过程既有细胞介导的又有的抗体介导。异体神经移植后的免疫排斥,主要组织相容性复合体(MHC)起了主要作用^[9-10],它存在于施万细胞,是主要的抗原成分。此外,神经基底膜管的完整性也会影响神经的再生修复后的生理特性,因为它是神经固有基质框架。因此,最大限度地去除施万细胞抗原性并保留基底膜管的完整性是优化异体神经移植后生理

特性的必要条件。

3.2 冷冻处理法对异体神经移植后生理特性的影响 异体神经经超深低温冷冻处理后,主要抗原成分被最大限度清除,而且对神经基底膜管的完整性损伤较小,最大程度降低了异体神经移植的免疫排斥性,使异体神经移植后的生理特性得到优化^[11-12]。这种兼顾二者的特性使其比化学法^[13]、放射辐照法^[14]、川芎嗪处理法^[15]、绿茶多酚处理法^[16]、免疫抑制法^[17]显得更胜一筹。通过本实验可以看出:冷冻法异体神经处理后,其移植免疫后的生理特性可以得到不同程度的改善,再生效果优于新鲜异体神经移植。

3.3 不同冷冻时间对异体神经移植后生理特性的影响 冷冻法处理异体神经后,虽然可以改善移植后的生理特性,但若保存时间过短,难以清除施万细胞的抗原成分,排斥反应仍然强烈,生理特性难以达到最佳状态;反之过长,冰晶会对基底膜管造成机械性和渗透性损伤^[18],也将影响移植后的生理特性。由此可知,异体神经冷冻保存存在一个最佳时间。有研究表明,冷冻保存时间低于 3 周,异体神经移植后效果明显逊于新鲜自体神经移植^[19]。从本实验可以看出,冷冻保存时间太长,如 9、12 周后的移植效果也是明显次于新鲜自体神经移植的,而保存 3 周、6 周后的移植效果却和新鲜自体神经移植很接近。由此可知:异体神经移植后的生理特性与冷冻时间存在依存关系。不过,3 周到 6 周之间的冷冻移植效果尚未明确,仍需进一步的探索。

冷冻时间的长短对异体神经移植后的生理特性起了极大的影响作用,找到最佳的保存时间显得尤为重要。最佳的保存时间不仅可以使异体神经移植后的生理特性达到最优状态,更能使移植后的恢复效果达到最佳,是极有临床实用价值和发展前景的。

参考文献:

[1] Moore AM, Macewan M, Santosa KB, et al. Acellular nerve allografts in peripheral nerve regeneration: A comparative study[J]. Muscle Nerve, 2011, 44(2): 221-234.

[2] Wang G, Lu S, Kuang Z, et al. Experimental study on promotion of neurotropic reinnervation with chemically extracted acellular nerve allograft [J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2010, 24(11): 1288-1292.

[3] 唐圆, 刘湘华, 刘丹, 等. 以组织工程建构技术修复周围神经损伤的难点[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(7): 1295-1304.

[4] Tang X, Xue C, Wang Y, et al. Bridging peripheral nerve defects with a tissue engineered nerve graft composed of an in vitro cultured nerve equivalent and a silk fibroin-based scaffold[J]. Biomaterials, 2012, 33(15): 3860-3867.

[5] 马英华, 宋有鑫, 胡大为, 等. 冷冻保存后不同长度异体神经移植的实验研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2011, 19(13): 1137-1139.

[6] 郭义柱, 王岩, 刘相成, 等. 同种异体神经移植治疗锐性臂丛神经缺损 5 例临床研究[J]. 军医进修学院学报, 2011, 32(4): 317-318.

[7] Rustemeyer J, van de Wal R, Keipert C, (下转第 3526 页)

理横切面积/肌重比率较高,而速度型的肌肉则肌纤维长/生理横切面积比率较高^[10]。本研究证实:颞肌前、中、后 3 部分的 PCS 比较前部与后部差异有统计学意义($P < 0.05$),中部与前、后部差异无统计学意义。前部肌的 PCS/WMW 也高于中、后部($P < 0.01$),这与 Van Eijden 等^[8]的研究结果是部分相符的。颞肌前部属高张力型肌,颞肌中、后部 MFBL 较长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其 CFL/PCS 相比较,前部与后部差异有统计学意义($P = 0.01$),中部与前部差异无统计学意义,后部较前部高,说明后部肌较前部肌的收缩速度快,但产生的张力小。

胡志奇等^[9]研究表明颞肌中束由颞肌后动脉、神经支配,支配动脉、神经在颞弓上缘 1~2 cm 处分出二级分支,因此将颞肌中束再分为具有独立结构的两束是可行而不影响其功能的。本研究颞肌中束的 PCS 是(396.59 ± 110.05) mm^2 ,与 Van Eijden 等^[8]按前后方向作均等的 6 个部分进行测量研究的中间两束 439 mm^2 相较,约为后者的 90%,考虑为黄色人种与白色人种之间的差异。应用时中束可以再分为两束,每束约 198 mm^2 ,仍大于 5 条提上唇口角表情肌的合力^[11],但临床经验证实供肌转位或移植到受区后会发生不同程度的萎缩,致使肌力下降,从而力量趋近。也有学者研究了将颞肌从矢状面劈开,形成逆行肌瓣,用于修复跨越头面部中线的组织缺损的解剖学基础,将颞肌的应用解剖进一步深化,提供了新的思路,相信在未来的修复重建外科中颞肌将起到更重要的作用。

参考文献:

[1] Burggasser G, Happak W, Gruber H, et al. The temporalis; blood supply and innervation[J]. *Plas Reconstr Surg*, 2002, 109(6):1862-1869.

(上接第 3523 页)

et al. Administration of low-dose FK 506 accelerates histomorphometric regeneration and functional outcomes after allograft nerve repair in a rat model[J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2010, 38(2):134-140.

[8] Giusti G, Willems WF, Kremer T, et al. Return of motor function after segmental nerve loss in a rat model: comparison of autogenous nerve graft, collagen conduit, and processed allograft (AxoGen)[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2012, 4(5):410-417.

[9] 杨小华, 韩金豹, 张沉冰, 等. 同种异体神经复合体修复兔周围神经缺损[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(34):6315-6318.

[10] 李晓峰, 赵劲民, 秦义武, 等. 三种不同方法制备去细胞神经支架的比[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(47):8817-8820.

[11] Szykaruk M, Kemp SW, Wood MD, et al. Experimental and clinical evidence for use of decellularized nerve allografts in peripheral nerve gap reconstruction[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2013, 19(1):83-96.

[12] Brooks DN, Weber RV, Chao JD, et al. Processed nerve allografts for peripheral nerve reconstruction: A multi-center study of utilization and outcomes in sensory, mixed, and motor nerve reconstructions[J]. *Micro Surg*,

[2] Kadri PA, Al-Mefty O. The anatomical basis for surgical preservation of temporal muscle[J]. *J Neurosurg*, 2004, 100(3):517-522.

[3] Hwang K, Cho HJ, Chung IH. Innervation of the temporalis muscle for selective electrical denervation[J]. *J Craniofac Surg*, 2004, 15(2):352-357.

[4] 李志义, 李名扬, 薛黔, 等. 人三角肌各亚部的构筑研究[J]. *解剖学报*, 1994, 25(4):337-340.

[5] Van Eijden TM, Korfage JA, Brugman P. Architecture of the human jaw-closing and jaw-opening muscles[J]. *Anat Rec*, 1997, 248(3):464-474.

[6] 田玉旺, 李丽, 李琳, 等. 双氧水快速氧化法在 Mallory 磷钨酸-苏木素染色中的应用[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2006, 15(1):108-109.

[7] Mendez J, Keyes A. Density and composition of mammalian muscle[J]. *Metabolism*, 1960, 9(2):184.

[8] van Eijden TM, Koolstra JH, Brugman P. Three-dimensional structure of the human temporalis muscle[J]. *Anat Rec*, 1996, 246(4):565-572.

[9] 胡志奇, 齐向东. 颞肌血管神经束修复晚期面瘫的局部显微解剖研究[J]. *中华显微外科杂志*, 2002, 25(1):49-51.

[10] Williams PL. 格式解剖学[M]. 38 版. 杨琳, 高英茂, 译. 沈阳:辽宁教育出版社, 1999:783.

[11] 王量, 胡志奇, 赵卫东, 等. 面中部表情肌的临床解剖学研究[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2009, 27(3):263-266.

(收稿日期:2013-06-08 修回日期:2013-08-26)

2012, 32(1):1-14.

[13] 赵喆, 王玉, 彭江, 等. 化学去细胞异体神经周围复合 BMSCs 生物蛋白胶复合物促周围神经缺损修复[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2011, 25(4):488-493.

[14] 王然芸, 郭永明, 郭义. 周围神经再生和修复的研究进展[J]. *天津中医药*, 2011, 28(3):260-261.

[15] 钟建, 阳明明, 蒋电明. 不同温度下含川芎嗪 UW 液保存对异体神经再生影响的实验研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2012, 37(4):341-344.

[16] 周胜虎, 甄平, 高明暄, 等. 辐照和绿茶多酚处理同种异体神经移植体的实验研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2012, (20):1882-1885.

[17] 宋仁纲, 张震宇. FK506 对异体神经移植的促神经再生作用研究进展[J]. *中国矫形外科杂志*, 2011, 19(22):1883-1886.

[18] Ray WZ, Kale SS, Kasukurthi R, et al. Effect of cold nerve allograft preservation on antigen presentation and rejection[J]. *J Neurosurg*, 2011, 114(1):256-262.

[19] 王秋根, 项耀均, 崔义, 等. 不同温度和时间保存异体神经移植后对鼠轴突再生的影响[J]. *第二军医大学学报*, 1998, 19(1):67-70.

(收稿日期:2013-05-13 修回日期:2013-06-30)