

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.34.007

## 逆行吻合神经法重建皮瓣感觉功能的实验研究

余晓军<sup>1</sup>,陈雪松<sup>1</sup>,徐永清<sup>2</sup>,王晓凤<sup>1</sup>,吉丽<sup>1</sup>,刘亚<sup>1</sup>

(1. 中国人民解放军第五十九中心医院创伤显微外科,云南开远 661699;

2. 中国人民解放军昆明总医院全军骨科中心,昆明 650000)

**[摘要]** **目的** 探讨逆行吻合神经法重建皮瓣感觉的可行性。**方法** 选择豚鼠 100 只,随机分为 4 组:逆行吻合神经组(A 组,30 只)、顺行吻合神经组(B 组,30 只)、未吻合神经组(C 组,30 只)及正常组(D 组,10 只)。分别在 A、B、C 组各豚鼠左后肢切取隐神经营养血管皮瓣,A 组在皮瓣近远端切断隐神经,皮瓣远端隐神经与近断端近侧吻合;B 组在皮瓣近端切断隐神经再予以吻合;C 组切除一长约 1.5 cm 皮瓣近端隐神经。A、B、C 组在术后第 1、2、3 月末前 2 周切开皮缘并向中心游离,原位缝合皮肤。术后 1、2、3 个月各组任选 10 只豚鼠,A、B、C 组原位切取皮瓣,1 个月时,D 组直接切取皮瓣,离体皮瓣行抗神经丝抗体免疫组化法检测,观察皮瓣内原神经纤维及神经末梢再生情况。**结果** A 组与 B 组相似,术后 1 个月,神经吻合远侧可见再生神经纤维,密度较 D 组低,术后 2 个月,皮瓣内整段神经可见再生神经纤维,并以神经为中心,真皮层形成神经网丛,表皮下形成游离神经末梢及毛囊感受器,术后 3 个月,上述再生神经组织与 D 组皮肤神经组织密度相仿。C 组全程未见神经纤维再生。**结论** 逆行吻合神经法通过中央途径机制,能使皮瓣恢复良好感觉。

**[关键词]** 逆行吻合神经;皮瓣;感觉重建;实验研究**[中图法分类号]** R628**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)34-4349-05**Experimental study on retrograde nerve anastomosis for reconstructing flap sensory function**YU Xiaojun<sup>1</sup>, CHEN Xuesong<sup>1</sup>, XU Yongqing<sup>2</sup>, WANG Xiaofeng<sup>1</sup>, JI Li<sup>1</sup>, LIU Ya<sup>1</sup>

(1. Department of Traumatic Microsurgery, 59 Central Hospital of PLA, Kaiyuan,

Yunnan 661699, China; 2. Orthopedic Center of PLA, Kunming General

Hospital of PLA, Kunming, Yunnan 650000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the feasibility of retrograde nerve anastomosis for reconstructing flap sensory function. **Methods** A total of 100 guinea pigs were selected and randomly divided into 4 groups: retrograde nerve anastomosis group (group A,  $n=30$ ), anterograde nerve anastomosis group (group B,  $n=30$ ), non-anastomotic nerve group (group C,  $n=30$ ) and normal group (group D,  $n=10$ ). Saphenous neurocutaneous vascular flaps were cut off from the left hind limbs of guinea pigs in the group A, B and C. For group A, the saphenous nerve at proximal and distal flap was cut off, and the distal saphenous nerve of the flap was anastomosed to that of the proximal side; for group B, the saphenous nerve at proximal end of the flap was disconnected and then anastomosis was carried out; for group C, a section of saphenous nerve at proximal end of the flap with length of about 1.5 cm was cut off. For group A, B and C, the skin edge was cut and dissociated towards the center, and then the skin was sutured in situ at 2 weeks of the end of postoperative 1, 2 and 3 months. At the end of 1, 2 and 3 months after surgery, 10 guinea pigs were randomly selected from each group respectively. For group A, B and C, the flaps were cut in situ. For group D, the flaps were cut directly at the end of the first month. The immunohistochemistry was used to detect anti-neurofilament antibodies in the isolated flaps for observing the regeneration situation of original nerve fibers and nerve endings inside the flaps. **Results** The group A was similar to the group B. In the first month after surgery, the regenerated nerve fibers could be seen at the distal side of the neural anastomosis, and the density was lower than that in the group D. In 2 months after surgery, the regenerated nerve fibers could be seen in the whole section of nerve inside the flap. Meanwhile, the nerve served as the center, the nerve net plexus was formed in dermis layer, and the free nerve endings and hair follicle receptors were formed underneath the epidermis. In 3 months after surgery, the density of the above-mentioned regenerated nerve tissues was similar to that of skin nervous tissue in the group D. The nerve fiber regeneration was not seen during the whole process in the group C. **Conclusion** Retrograde nerve anastomosis could make the flaps recover good sense via central channel mechanism.

**[Keywords]** retrograde nerve anastomosis; flap; sensory reconstruction; experimental study

临床及基础研究证明,重建皮瓣感觉具有重要意义<sup>[1-3]</sup>,可明显减少破溃及感染等远期并发症,增加皮瓣耐磨性<sup>[4]</sup>。因其与未重建感觉皮瓣相比,除了通过外周途径机制,还通过中央途径机制恢复皮瓣感觉<sup>[5]</sup>。目前临床中重建皮瓣感觉方法有神经植入法及神经吻合法,后者其实为顺行吻合皮瓣原近端皮神经重建皮瓣感觉的方法,因为少有逆行吻合皮瓣远端皮神经重建皮瓣感觉的报道。随着显微外科的发展及“追求正常”的理念的推广,很多皮瓣,如游离的远端蒂的小腿后外侧皮神经营养血管皮瓣等,难以采用顺行吻合神经法重建皮瓣感觉,而逆行吻合神经法则很容易。但其能否像前者一样恢复皮瓣良好感觉?为此,本研究建立了该重建皮瓣感觉方法的动物模型,并利用抗 NF 抗体免疫组化法,在光镜下观察皮瓣感觉神经末梢再生情况,从组织形态学上观察该方法的疗效,为进一步推广临床应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

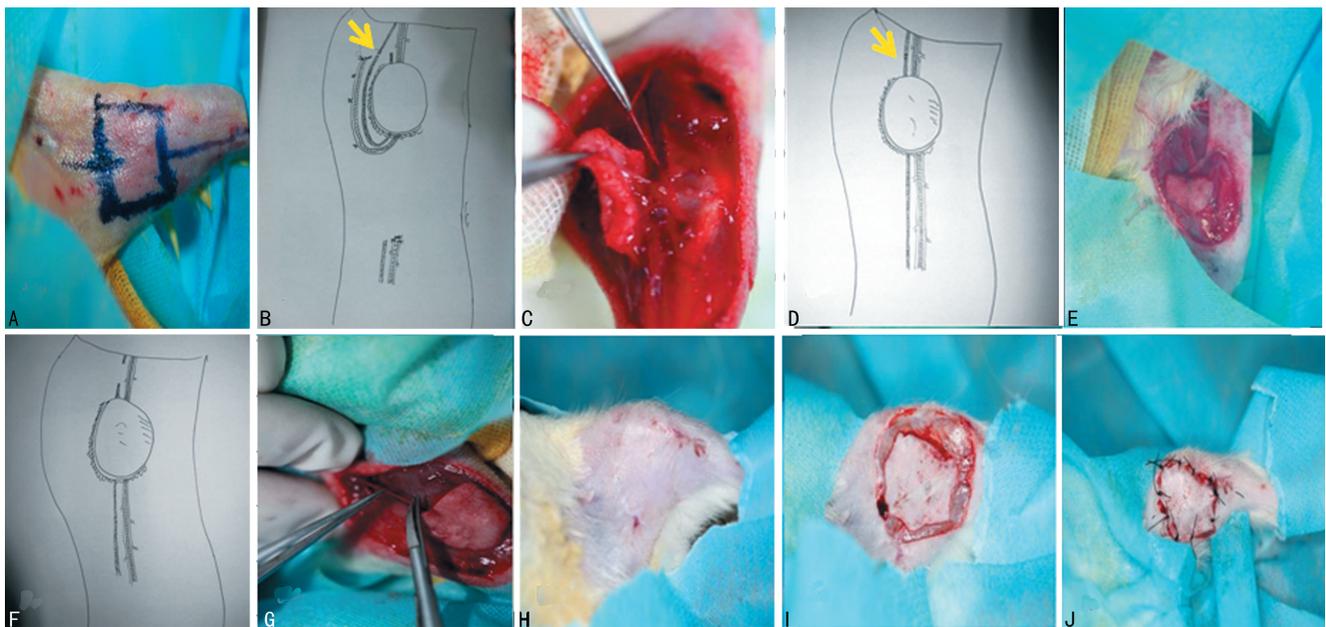
**1.1 实验动物及主要试剂、仪器** 健康豚鼠 100 只,雌雄不限,体质量为 280~320 g,由昆明医科大学动物实验中心提供。苯巴比妥钠(福建省闽东九捷迅药业有限公司);4%多聚甲醛(苏州泽科生物技术有限公司);蔗糖(Sigma 公司,美国);明胶(东莞市新成明胶有限公司);0.01 mmol/L PBS(磷酸盐缓冲液)溶液(福州迈新生物技术开发有限公司);TritonX-100 溶液(Sigma 公司,美国);抗神经丝鼠单克隆抗体(福州迈新生物技术开发有限公司);抗鼠抗体(福州迈新生物技术开发有限公司);卵白素溶液(Sigma 公司,美国);DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司)。显微器械(宁波市成和显微器械厂);显微镜(宁波市成和显微

器械厂);冰冻切片机 Leica1950(北京中仪光科科技发展有限公司);载玻片(福州迈新生物技术开发有限公司);冰箱(青岛海尔集团公司);光学显微镜(上海富莱光学科技有限公司)。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 实验动物分组** 将 100 只豚鼠按手术时对皮瓣神经处理方式,分为 A 组(逆行吻合神经组)、B 组(顺行吻合神经组)、C 组(无神经组)、D 组(正常组)4 组,A、B、C 组各随机挑选 30 只豚鼠,D 组 10 只。A 组采用逆行吻合皮瓣内神经重建皮瓣感觉;B 组采用顺行吻合皮瓣内神经重建皮瓣感觉;C 组切除皮瓣近端长约 1.5 cm 神经;D 组直接切取皮瓣行抗神经丝抗体免疫组织化学法检查。

**1.2.2 皮瓣设计与制作** 用苯巴比妥钠(100 mg/kg)麻醉成功后,剔除豚鼠乳头以远左后肢毛发,聚维酮碘消毒,铺无菌巾。以后肢内侧中点为蒂部,隐神经走行形为轴线,设计一大小约 2.0 cm×2.0 cm 隐神经营养血管皮瓣(图 1A)。按设计线切开皮肤,从四周向轴线及蒂部深筋膜层切取皮瓣,显微镜下分离,勿损伤隐神经伴行动静脉穿向皮瓣内的分支,最后皮瓣仅与近端蒂部相连。A 组在皮瓣以远的轴线上,做一长约 2.2 cm 切口,游离出隐神经及伴行血管 2.2 cm,在其远端离断,血管用 9-0 显微缝合线予以结扎。然后在蒂部游离出隐神经,予以离断,将远端隐神经旋转 180 度,通过皮瓣与蒂部隐神经近端用 10-0 显微缝合线,端端吻合(图 1B、C)。皮瓣远侧端所带神经与受区神经吻合的方式称为逆行吻合。B 组皮瓣在蒂部游离出隐神经,并予以离断,然后用 10-0 显微缝合线,端端吻合(图 1D、E)。皮瓣近侧端所带神经与



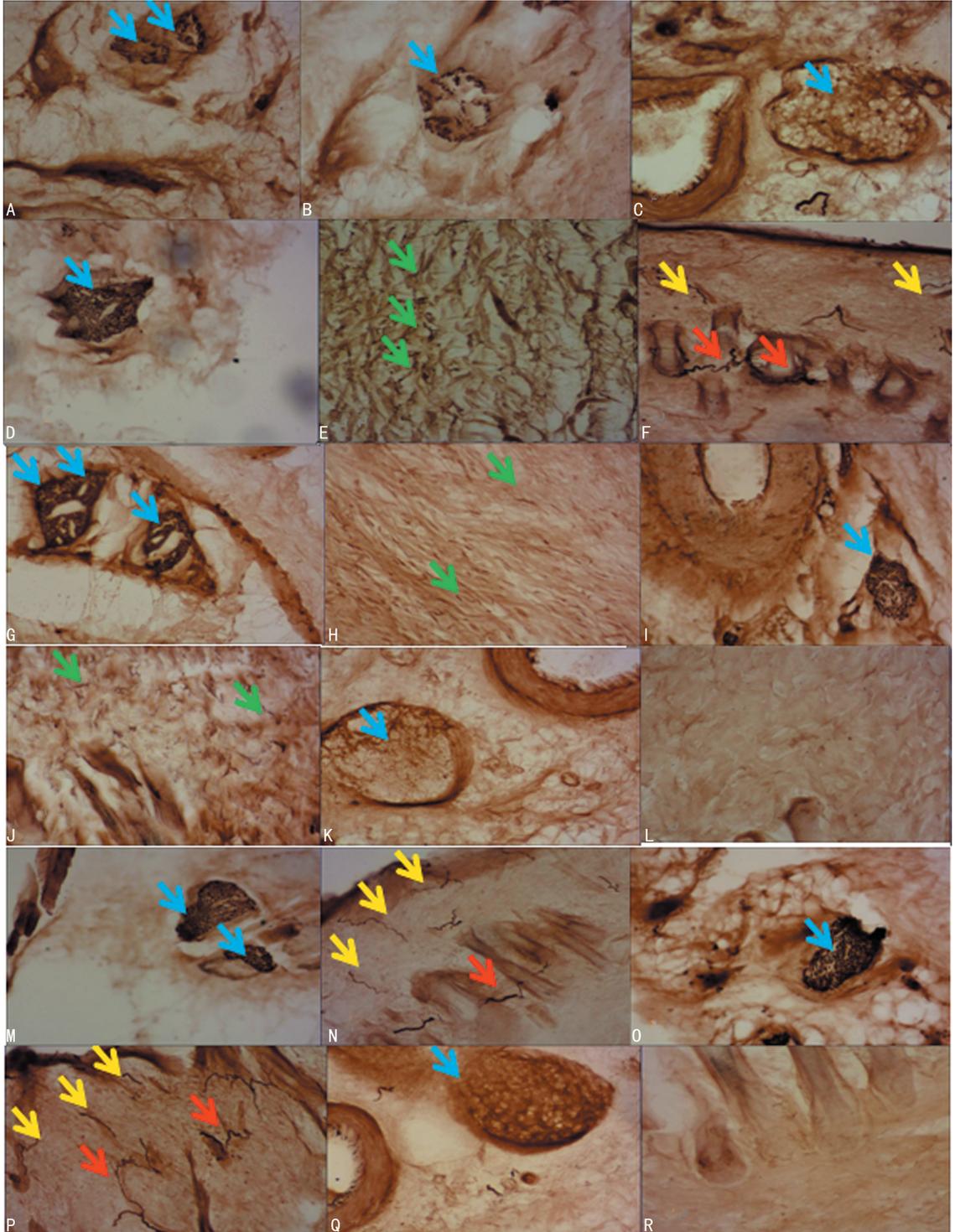
A:皮瓣设计;B、C:A组方法;D、E:B组方法;F、G:C组方法;H、I、J:将愈合良好的A、B、C组皮瓣沿原切口切开至肌层后,缝合切口;黄色箭头:神经吻合处

图1 实验中所用手术方法

受区神经吻合的方式称为顺行吻合。C 组皮瓣在蒂部游离出一长约 1.5 cm 隐神经,并予以切除(图 1F、G)。D 组为直接切取皮瓣行免疫组化检查。为避免术后吻合神经端端裂开,A、B 组用石膏固定术肢。术后 3 d,每天腹腔注射一次青霉素(10 万 U)预防感染治疗。为避免外周途径的长入,分别在术后第 1、2、3

个月末前 2 周,在 A、B、C 组各选取 10 只豚鼠,消毒铺单,将 A、B、C 组皮瓣沿原切口切开至肌层后,缝合切口(图 1H、I、J)。术后处理同前。然后在术后第 1、2、3 个月末,将各组皮瓣原位游离,行抗神经丝抗体免疫组织化学检查。

1.3 观测指标



A~C: A 组、B 组及 C 组 1 个月时神经再生情况;D~F: D 组神经分布情况;G~L: A 组、B 组及 C 组 2 个月时神经再生情况;M~R: A 组、B 组及 C 组 3 个月时神经再生情况;蓝色箭头:神经干内再生神经;绿色箭头:真皮层形成的神经网丛;红色箭头:毛囊感受器;黄色箭头:表皮层内形成的游离神经末梢

图 2 各组感觉末梢术后 1、2、3 个月形态学观察结果

**1.3.1 大体观察** 麻醉后保暖,观察呼吸及苏醒状况。手术后观察豚鼠精神及饮食情况,观察固定肢体石膏是否松动,皮瓣循环是否良好,缝合口是否出现感染等征象。

**1.3.2 感觉末梢形态学观察** 有毛动物肢体皮瓣感觉恢复的客观指标,主要取决于游离神经末梢与毛囊感受器(超微结构)再生的数量,与数量成正比。在观察有毛动物皮肤超微结构的方法中,主要有免疫组化法和改良 Biedschowsky 银染法,本研究选择抗神经丝抗体免疫组化法+光镜观察豚鼠各种重建感觉方法的皮瓣的感觉末梢形态学观察。具体方法步骤如下:(1)离体皮瓣立即放入 4%多聚甲醛中固定 12 h(4℃);(2)浸入 20%蔗糖溶液 8~12 h 脱水处理(4℃);(3)样本做 50 微米厚冰冻切片,并保持每个样本切取量的总长度为 200 mm,载玻片预先用 1:100 的明胶液做防脱片处理;(4)0.01 mmol/L PBS 液筒洗切片;为增加膜通透性,室温下 0.3% TritonX-100 溶液孵育 0.5 h;(5)用 1:4 000 抗 NF 单克隆抗体 4℃孵育 3 d;(6)1:150 抗鼠抗体室温 6 h;(7)用 DAB 加强染色法显色;(8)光镜下观察感觉末梢再生情况,阳性神经纤维呈藏蓝色束状或丝状结构,背景呈淡棕色或棕色。

## 2 结 果

**2.1 大体观察情况** 所有豚鼠麻醉后经保暖,均顺利苏醒,术后第 2 日正常饮食,精神状况好,所有豚鼠均成活。C 组 1 只豚鼠皮瓣发生完全坏死,考虑无穿支血管进入皮瓣所致;B 组 1 只豚鼠皮瓣发生感染,周缘出现坏死;其余豚鼠皮瓣均成活,未发生感染及坏死。A、B 组豚鼠石膏未出现松动断裂,固定有效。

### 2.2 光镜下各组皮瓣内感觉末梢形态学观察结果

**2.2.1 术后 1 个月** A 组:逆行吻合神经反折段已有神经纤维再生,但未达到皮瓣内原有神经近侧端,皮瓣内神经末梢溃变,神经周围未见神经再生现象(图 2A)。B 组:皮瓣内原有新生神经纤维长入,神经周围未见显著神经再生现象,表皮内未见游离神经末梢及毛囊感受器形成(图 2B)。C 组:皮瓣原有神经纤维及神经末梢部分溃变,无再生神经纤维形成,神经末梢密度较正常降低(图 2C)。D 组:皮瓣神经干内神经纤维分布均匀,皮瓣真皮层可见大量神经网丛,表皮层可见游离神经末梢及毛囊感受器存在(图 2D、E、F)。

**2.2.2 术后 2 个月** A 组:皮瓣内原有及反折段神经均有新生神经纤维长入,密度较正常稍低,并以神经为中心,真皮层可见神经网丛,表皮下可见游离神经末梢,密度未达正常,皮瓣周缘未见神经再生现象(图 2G、H)。B 组:皮瓣内原有新生神经纤维密度较术后 1 个月时明显增加,神经周围真皮层神经网丛形成,表皮可见游离神经末梢,密度未达正常,皮瓣周缘

未见神经再生现象(图 2I、J)。C 组:皮瓣原有神经纤维及神经末梢完全溃变,无再生神经纤维形成,神经末梢密度较正常明显降低(图 2K、L)。

**2.2.3 术后 3 个月** A 组:皮瓣内原有及反折段神经新生神经纤维完全长入,横切面神经纤维密度接近正常,除神经周围外,皮瓣周缘真皮层可见神经网丛,表皮下可见游离神经末梢及毛囊感受器,密度与正常相仿(图 2M、N)。B 组:皮瓣内原有新生神经纤维密度接近正常,皮瓣周围亦可见真皮层神经网丛形成,表皮可见游离神经末梢及毛囊感受器,密度与正常相仿(图 2O、P)。C 组:皮瓣原有神经纤维及神经末梢完全溃变,无新生神经纤维再生,神经末梢密度极低,与其他组结果有明显区别(图 2Q、R)。

## 3 讨 论

**3.1 建模背景** 2001 年柴益民等<sup>[6]</sup>将穿支皮瓣与皮神经营养血管皮瓣原理结合,提出了动脉穿支蒂皮神经营养血管皮瓣的概念。该类皮瓣质地适中,不损伤主干血管,皮瓣内所带皮神经为重建感觉创造条件。临床中在修复感觉恢复要求高的手足部创面时得到大量运用<sup>[7-13]</sup>。本研究采用腓动脉穿支蒂小腿后外侧皮神经营养血管皮瓣游离移植修复手足部创面时,为更能遵循“受区修复重建好,供区破坏损失少,成活可靠,操作简单易行”的皮瓣设计原则,本研究多选择小腿中下段穿支,并向近端设计皮瓣,争取供区直接缝合或少植皮,减少供区植皮的并发症。此时,要重建皮瓣感觉,因皮瓣近端皮神经与穿支血管方向相反,距离远,不利于顺行吻合,临床中,选择了逆行吻合法,通过随访,亦取得了良好疗效。但查阅文献,缺乏逆行吻合神经法重建皮瓣感觉的基础研究方面的证据。

**3.2 临床意义** 本实验通过建立逆行吻合神经组、顺行吻合神经组、不吻合神经组及正常皮肤组的动物模型,再采用抗神经丝抗体免疫组化法,光镜下比较各组结果发现:(1)采用逆行吻合神经法与顺行吻合神经法重建皮瓣感觉,最终均能形成与人类皮肤感觉神经末梢相似的游离末梢及毛囊感受器,皮瓣有效重建感觉,并以中央途径的机制恢复;(2)实验中排除外周途径机制恢复感觉的影响后发现,不管是通过逆行吻合神经法还是顺行吻合神经法,重建皮瓣感觉的效果均优于不吻合神经的皮瓣感觉恢复效果。证明了逆行吻合神经法重建皮瓣感觉的可行性,弥补了基础研究的理论基础,可为后期进行相关研究提供理论依据。更重要的是,为临床应用提供了指导意见:本实验表明,神经纤维不像肢体粗大浅静脉,存在某种阻碍逆行传导的因素,而像电线,不管从那端通电,都可以传输轴浆流,到达终末感受器,形成有效感觉。因此对于临床中需重建感觉的皮瓣,如临床使用较多的

蒂部设计在皮瓣远端的腓动脉穿支小腿后外侧皮神经营养血管皮瓣,因解剖原因及美观要求,难以采用顺行吻合神经法重建皮瓣感觉,有上述结论,可以果断选择逆行吻合神经法重建皮瓣感觉,去避开解剖限制及达到美观要求。临床中,经常遇到受区所需皮瓣修复的面积大,通过单一吻合神经难以让皮瓣所有区域获得感觉恢复,为减少术后并发症,应将皮瓣内皮神经走形部分设计在关键区,如易受压及受摩擦的区域;为尽量扩大感觉恢复面积,应将皮瓣内皮神经走形部分设计在受区缺乏神经分布的区域,离皮神经支配部位较远的皮瓣部分设计在神经分布丰富的区域。对于临床中皮瓣难通过外周途径机制获得感觉,如皮瓣较大较厚,创基缺乏神经<sup>[14]</sup>,而受区又需较好感觉恢复情况下,选择逆行或顺行吻合皮瓣内神经至关重要,应作为术前计划的重要部分。

**3.3 建模要点** (1)选择建模动物时,应以性情温和,便于术后观察皮瓣,神经有合适直径,便于术中吻合,保证手术效果为原则。豚鼠满足上诉条件,且价格适中,所以我们选择其为建模动物,大白鼠及小白鼠因性情差及个体小而不适合。(2)切取豚鼠隐神经营养血管皮瓣时,术中探查见后肢上 1/2 段隐神经伴行血管穿支少或缺如,设计皮瓣时蒂部应该选择在后肢中段以远,以确保皮瓣循环。(3)豚鼠行走过程中,随着关节的位移,神经吻合口可能发生断裂,影响手术疗效,因此,固定术肢关节对确保手术效果至关重要。(4)切取样本行抗神经丝抗体免疫组化法检查前 2 周,切开原皮瓣周缘具有必要性,因为对于豚鼠厚度较薄面积较小的皮瓣,本身通过外周途径亦可恢复良好感觉恢复<sup>[15]</sup>。术前 2 周切开皮缘,可减少外周途径产生的影响。

**3.4 存在不足** 本实验仅做到定性分析,未行定量及统计学分析,无法确定逆行吻合法与顺行吻合法孰优孰劣,无法确定它们重建的结果与正常皮肤的差异大小。且神经末梢形态学评价方法单一,降低了可信度。下一步,将采用多种对神经末梢形态学评价方法,并增加对其功能性的研究,定量分析其可行性。

## 参考文献

[1] 王加利,赵春霞,陈仲华.吻合神经的游离髂骨皮瓣修复足跟部复合组织缺损[J].中华显微外科杂志,2014,37

(1):35-38.

- [2] LYKOU DIS E G, SERETIS K, LYKISSAS M G. Free sensate medial plantar flap for contralateral plantar forefoot reconstruction with flap reinnervation using end-to-side neurotomy: a case report and literature review [J]. *Microsurgery*, 2013, 33(3): 227-231.
- [3] 陈立科,吴波,陈四华,等.股前外侧皮瓣皮神经吻合对手背软组织缺损感觉重建的效果[J].中国康复理论与实践,2015,7(21):845-848.
- [4] 章鸣,郭翱,刘升辉,等.皮瓣修复足跟部软组织缺损疗效的研究[J].中华显微外科杂志,2009,32(6):458-460.
- [5] 侯春林,顾玉东.皮瓣外科学[M].上海:上海科学技术出版社,2006:232.
- [6] 柴益民,林崇正,陈彦,等.腓动脉终末穿支蒂的非常神经营养血管皮瓣的临床应用[J].中华显微外科杂志,2001,24(3):167-169.
- [7] 陈雪松,肖茂明,王元山,等.高位穿支蒂腓肠神经营养血管皮瓣修复足踝部软组织缺损[J].中国骨与关节损伤杂志,2009,24(6):504-506.
- [8] 朱新红,吴水培,俞立新,等.带股外侧皮神经的股前外侧皮瓣修复手足皮肤缺损[J].中国骨与关节损伤杂志,2009,24(6):557-558.
- [9] 崔红旺,李中锋,王达利,等.带感觉支指背筋膜逆行岛状皮瓣修复手指皮肤缺损[J].中华损伤与修复杂志,2009,4(3):312-316.
- [10] 柴益民,林崇正,邱勋永,等.带皮穿支血管的皮神经营养血管皮瓣的临床应用[J].中华整形外科杂志,2006,22(1):34-37.
- [11] 侯晓进,唐光伟,杨晓荣,等.重建感觉的指动脉终末背侧支皮瓣修复指端软组织缺损[J].中国骨与关节损伤杂志,2015,30(3):324-325.
- [12] 李泽龙,黄宾,蔡习炜,等.优选皮瓣修复足跟部负重区并重建感觉功能[J].创伤外科杂志,2016,18(9):541-544.
- [13] 季相禄,齐峰,田峰,等.吻合神经的交腿腓肠神经小隐静脉营养血管筋膜皮瓣修复前足底大面积皮肤缺损[J].中国骨与关节损伤杂志,2017,32(4):441-442.
- [14] SAKURABA M, MIYAMOTO S, KIMATA Y, et al. Recent advances in reconstructive surgery: head and neck reconstruction [J]. *Int Clin Oncol*, 2013, 18(4): 561-565.
- [15] 刘芳,常增林.失神经皮瓣移植术后感觉神经再生的研究[J].中国现代医学杂志,2002,12(7):28-31.

(收稿日期:2018-06-16 修回日期:2018-10-21)