

翻转静脉桥接加碱性成纤维细胞生长因子修复面神经缺损的实验研究

张敏¹⁾, 许彪²⁾, 张立亚²⁾

(1) 云南省第一人民医院口腔矫形科, 云南昆明 650032; 2) 昆明医科大学附属口腔医院, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 探讨利用翻转静脉桥接加碱性成纤维细胞生长因子形成的再生室修复兔面神经缺损的可行性。 **方法** 手术制作兔左侧面神经下颊支 15 mm 缺损模型, 分 3 组不同方法修复: 常规静脉桥接加注生理盐水组、翻转静脉加注生理盐水组、翻转静脉加注碱性成纤维细胞生长因子组。术后 100 d 进行大体观察、神经电生理检测、组织学观察, 以评价神经再生情况。 **结果** 翻转静脉加注碱性成纤维细胞生长因子组较单纯应用翻转静脉桥接技术或常规静脉桥接加注生理盐水而言, 其神经传导速度恢复得到显著提高、组织学表现更接近正常。 **结论** 翻转静脉桥接加注碱性成纤维细胞生长因子修复周围神经缺损的效果好于单纯使用翻转静脉桥接或常规静脉桥接。

[关键词] 神经再生; 静脉; 面神经; 碱性成纤维细胞生长因子; 周围神经缺损

[中图分类号] R329.2·7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 05 - 0023 - 05

The Experimental Study on Basic Fibroblast Growth Factor Combined with Autogenous Inside-out Vein Graft for Repairing Facial Nerve Defect in Rabbits

ZHANG Min¹⁾, XU Biao²⁾, ZHANG Li - ya²⁾

(1) The 1st People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650032; 2) The Affiliated Stomatology Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of autogenous inside-out vein graft conduit combined with bFGF on peripheral nerve regeneration for repairing facial nerve defect in rabbits. **Methods** Facial nerve defect model was prepared by operation in 18 adult white rabbits. And according to different repairing methods, the rabbits were divided into three groups: group A, the facial nerve defect was bridged by autogenous standard vein graft and injection of normal saline; group B, the facial nerve defect was bridged by autogenous inside-out vein graft and injection of normal saline; group C, the facial nerve defect was bridged by autogenous inside-out vein graft and injection of bFGF. Microscopic examination and nerve conduct velocity were performed at 100th day after operation. **Results** Compared with group A (autogenous standard vein graft and injection of normal saline) and group B (autogenous inside-out vein graft and injection of normal saline), the nerve conduct velocity recovered significantly in group C (autogenous inside-out vein graft and injection of bFGF), and the histological results were almost similar to normal. **Conclusion** Bridging a defect in facial nerve with inside-out vein graft combined with bFGF has better effect than single using inside-out vein graft or standard vein graft.

[Key words] Nerve regeneration; Vein; Facial nerve; Basic fibroblast growth factor; Peripheral nerve defect

[基金项目] 云南省科技厅联合专项基金资助项目 (2007C0030R)

[作者简介] 张敏 (1974~), 女, 云南昆明市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事口腔医学科研、临床工作。

[通讯作者] 张立亚. E-mail:zhangliya2004926@sina.com

目前,修复周围神经损伤的方法总体可分为 2 大类:显微外科技术和神经导管技术.显微外科手术不仅需要精湛的手术技艺,而且会造成新的非功能或重要功能部位的神经损害,且来源有限.因此,人们着眼于使用神经导管来促进周围神经再生代替神经移植,以达到神经快速生长、功能恢复的理想目标^[1,2].如果使用人工合成材料导管虽然来源充足,但可能成为异物,即使是可吸收材料解决了成为异物的弊端,但桥接物的降解率必需与神经再生速度相协调,使应用受到限制.采用自体静脉作为桥接物比较理想,不仅数量丰富,易于取材,供区损伤小,而且管壁薄,其组织结构与神经外膜相似,有利于营养物质渗透,新的血运建立和神经再生微环境的稳定,并防止瘢痕侵入,组织相容性好^[3,4].碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是一种具有广泛生物学作用的生长因子,对多种来源于中胚层和神经外胚层的细胞的生长具有促进作用.同时, bFGF 还是一种重要的神经营养因子,有促进血管内皮细胞和多种神经细胞存活和抑制凋亡的作用^[5-7].本实验尝试将 bFGF 注入神经缺损的静脉套管内,研究其对周围神经再生的作用.

1 材料与方法

1.1 主要试剂

甲醛,无水乙醇,二甲苯,苏木精,伊红,硝酸银,氢氧化铵,硫代硫酸钠.

1.2 主要材料

11-0 医用无损伤缝线(上海元洪医疗器械厂);中国长耳白兔(昆明医科大学动物中心);云动管第(990033).

1.3 主要设备

Medlab 生物信号采集处理系统(南京美易科技有限公司).

1.4 动物分组

健康大耳白兔 18 只,雌性,体重 2.5~3.5 kg,随机分为 3 组(每组 6 只).切取左侧面神经下颊支 15 mm 神经片段分组修复. I 组:左侧常规静脉加 NS; II 组:左侧翻转静脉加 NS; III 组:左侧翻转静脉加 bFGF.

1.5 手术方法

3%的戊巴比妥钠耳缘静脉注射麻醉(30~40 mg/kg),面颊脱毛,常规消毒铺巾.取颊部斜向切口(内眦下 1 cm 斜向下颌角),长约 2.5 cm,切口.切开皮肤、皮下组织至嚼肌表面.在耳下腺浅

叶前缘向口轮匝肌方向分离暴露面神经下颊支,切取 1.5 cm,再向下后方寻找颈外静脉,结扎切取 2 cm.

将 1 把显微镊尖端自静脉段近端管口伸入管腔直至远侧管口,夹持少许远侧管口组织,用另 1 把显微镊夹持近侧管口少许组织,2 镊向相反方向缓缓牵拉,即可将静脉段之内外翻转,然后再用此翻转静脉段同轴移植于神经缺损处(II、III 组左侧),I 组左侧作为对照移植静脉无须翻转.分别将两神经断端置入静脉段两端之管腔内各 2.5 mm,并分别用 11~0 无创缝合线缝合固定 6 针.静脉外两端神经外膜各予以缝合 1 针固定,以保证恒定的神经缺损距离,使静脉段内神经 2 断端相距 1.5 cm.于远端静脉神经接合缝隙处用 4 号针头向 III 组左侧再生室内注入 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bFGF,各约 0.3 mL(试剂由中国生物研究所提供);向 I、II 组左侧再生室内注入 NS,各约 0.3 mL 使静脉管腔充盈.注入后观察 15 min,见管腔无缩小或塌陷、管腔内液体无外漏后,冲洗伤口、分层缝合.所有 3 组动物在相同饲养条件下分笼饲养,观察 100 d 后处死.

1.6 检测方法

1.6.1 神经电生理检测 保持室温 20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$,使用 MedLab 生物信号采集处理系统,检测神经传导速度.刺激信号为直流脉冲,频率 3 HZ,强度以能诱发清晰而稳定的图形为宜.将刺激电极置于近心端再生室,引导电极置远心端再生室,间距为 2 cm.

实际距离: $S=S_1 - S_2=1.5$

实际时间: $T=$ 电脑直接读出

公式计算: $\text{NCV}=S/T$

1.6.2 组织学观察 神经电生理检测完毕,取静脉桥接体中段及桥接体以远 5 mm 神经段,即刻投入 10%中性多聚甲醛固定液中,固定 24 h,制备蜡块.分别行纵、横连续半薄片. Gomori 银染.

1.7 统计学处理

神经传导速度的分析数据结果行方差检验(单因素方差分析),用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 神经电生理检测结果

正常兔面神经下颊支平均传导速度为(37.74 \pm 0.33) m/s,且组与组间无显著性差异($P > 0.05$).各组两两比较 $P < 0.01$,即 I 组与 III 组

间比较有统计学意义 ($P < 0.01$); II组与III组间、I组与II组间两两比较有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表1.

表1 3组动物左侧面神经传导速度 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The conduction speed of left facial nerve in three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	传导速度 (m/s)	95%CI (%)
I组	6	11.053 \pm 0.123*	10.925 ~ 11.182
II组	6	13.195 \pm 0.408*	12.776 ~ 13.624
III组	6	18.087 \pm 0.702*	17.350 ~ 18.824

3组间比较, * $P < 0.05$.

2.2 组织学结果

2.2.1 常规静脉加NS组 再生神经纤维生长混乱, 与结缔组织、新生血管混杂在一起, 无典型神经纤维束组织学表象, 见图1.

2.2.2 翻转静脉加NS组 再生神经纤维呈现分散的束状, 其间为结缔组织分隔, 组织学结构与正常神经纤维存在差异, 见图2、图3.

2.2.3 翻转静脉加bFGF组 再生神经纤维与血管壁已基本融合, 结构接近正常神经纤维. 再生神经干粗大, 再生轴突数目多, 有多而整齐的神束形成, 整个内部结构比较成熟, 组织学表现近似正常神经结构, 见图4、图5.

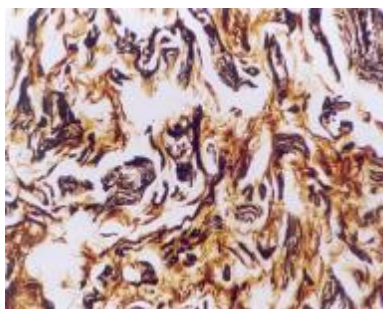


图1 常规静脉加NS组 (银染, 200 \times)

Fig. 1 Standard vein graft and injection of normal saline group (Silver staining, 200 \times)

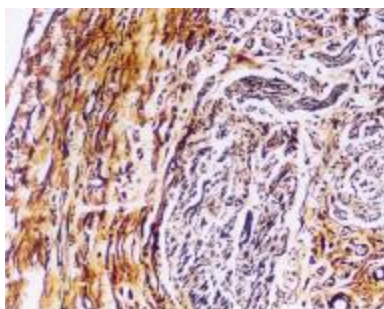


图2 翻转静脉加NS组 (银染, 横切面, 100 \times)

Fig. 2 Inside-out vein graft and injection of normal saline (Silver staining, cross section, 100 \times)

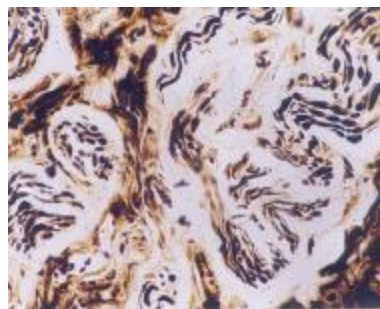


图3 翻转静脉加NS组 (银染, 纵切面, 400 \times)

Fig. 3 Inside-out vein graft and injection of normal saline10 (Silver staining, longitudinal section, 400 \times)

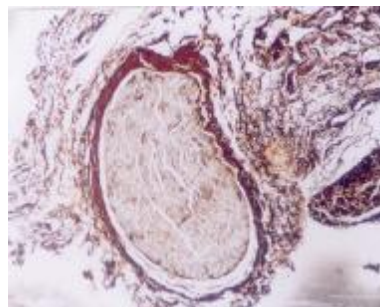


图4 翻转静脉加bFGF组 (银染, 横切面, 40 \times)

Fig. 4 Inside-out vein graft and injection of bFGF group (Silver staining, cross section, 40 \times)

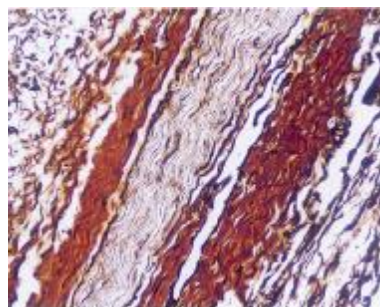


图5 翻转静脉加bFGF组 (银染, 纵切面, 100 \times)

Fig. 5 Inside-out vein graft and injection of bFGF group (Silver staining, longitudinal section, 100 \times)

3 讨论

由于采用自体神经移植修复周围神经缺损存在很多问题, 因此国内外学者均在尝试应用非神经移植材料代替自体神经移植. 周围神经损伤后如果再生的轴突误入周围的肌肉、结缔组织中, 神经就无法再生. 大量实验已经证实: 周围神经缺损后神经修复与再生需要一个综合的微环境. 这种微环境的条件主要包括: 良好的神经通道; 具有活力的雪旺氏细胞; 多种营养因子的参与; 局部有良好的血液供应. 一个好的神经再生室可为再生轴突提供一

个相对稳定的环境,防止再生神经纤维的外漏,提供神经自然随机选择、化学特异选择的间隙,提高神经再生的效率^[8]。

静脉外膜上具有较丰富的植物神经纤维网及其伴随的雪旺氏细胞^[9],且静脉具有粘弹性,这些特点能为周围神经缺损的修复再生提供较理想的微环境。雪旺氏细胞在整个神经再生中均起到重要作用。它具有:(1)吞噬作用,为神经再生通畅道路;(2)增殖迁移形成 Bungner 带,支持引导再生锥生长;(3)分泌合成多种促神经生长物质;(4)包绕有髓纤维形成髓鞘和基底膜。静脉壁的外膜还存在丰富的胶原,是重要的细胞外基质。可提供周围神经缺损再生所需要的类似基板的成分与结构^[10]。

选择内翻转静脉做为桥接体,是因为其不仅具有一般桥接导管的特点,即可引导轴突近中端再生、防止纤维组织浸润、保持轴突再生所需神经营养因子浓度;而且静脉外膜的周围有植物神经网支配,含有雪旺氏细胞及丰富胶原^[9]。静脉经过翻转,可使外膜上能诱导神经再生的活性物质进入静脉腔再生室内,直接作用于神经断端,促进神经再生。加注 bFGF 是因为 bFGF 具有促进雪旺氏细胞激活、分裂、增殖及保护损伤神经元存活、促进缺损神经轴突再生等作用。选用自体静脉作为桥接体克服了目前较为常用的自体神经移植来源有限和异体神经移植所产生的排异反应。再者,静脉翻转方法简单、容易操作。翻转后的静脉段直径与原直径相同,能够起到管状桥接体的作用。

翻转静脉加注 bFGF 修复周围神经缺损的具体作用机制表现为:(1)截取的静脉段经翻转后其静脉外膜上丰富的胶原首先为神经轴突的再生提供了类似基板的成分与结构。其上具有的某种粘附分子能有效粘附生长的轴突,其形成的空腔为轴突生长提供了一个合适的空间;(2)去神经支配的雪旺氏细胞迅速激活、分裂、增殖。加之注入的 bFGF 能进一步刺激雪旺氏细胞有丝分裂和迁移速度,新生的雪旺氏细胞重新进入神经束中残留的基膜管,形成 Bungner 带,使再生轴突沿着此带向前延伸;(3)雪旺氏细胞下调髓鞘基因,最后排列成行,并分泌表面分子引导再生纤维。与此同时,血源性巨噬细胞很快聚集到神经残端,吞噬髓鞘碎屑。在神经远端残端分子的变化包括上调神经营养素、神经细胞黏附因子、细胞活素和其它一些可溶性因子及它们相应的受体。这些生物活性物质诱导、刺激调控轴突的再生和髓鞘的形成;(4) bFGF 促进雪旺氏细胞合成 DNA 以及表达 NGF。

雪旺氏细胞通过分泌 NGF 等神经营养因子以及细胞外基质、细胞粘附因子,对再生轴突起调节作用;(5) bFGF 还可影响其它促神经再生的因子起作用,如它能维持体内黑色素细胞刺激素的浓度^[11],促进神经生长因子及神经生长因子受体的表达而促进周围神经的再生;(6) bFGF 能增加再生神经的血管密度和数量,以满足神经再生时物质代谢的需要。因翻转静脉修复神经缺损的血供恢复较早,无须经过瓦勒氏变性,故轴突再生均比单一使用金标准的神经移植在病理、组织化学方面有所改善^[12];(7)此外,注入 bFGF 后的充盈效果可克服翻转静脉桥体支架作用差,长段移植时中段塌陷致再生轴突长入此段时变细或受阻的缺点。

本实验采用翻转静脉加注 bFGF 桥接修复周围神经缺损,通过利用静脉外膜上植物神经纤维网及其所伴随的雪旺氏细胞,以及 bFGF 本身所具有的保护损伤神经元存活、促进缺损神经轴突再生等特点,更好地发挥了静脉桥接体具有的神经趋化性和营养性的作用,并克服了其支架作用差的缺点。

实验结果显示检测电生理各组均有出现;组织学检查各组神经纤维均有再生和修复,但在神经再生及修复的速度和质量上存在差异。术后 100 d 时,翻转静脉加 bFGF 修复兔面神经 15 mm 缺损的效果好于单纯使用翻转静脉桥接,而单纯使用常规静脉桥接的效果又次之。表明使用翻转静脉桥接有助于缺损神经的再生和修复,而加入 bFGF 又具有加强再生修复的协同效应。

[参考文献]

- [1] 王宗亮,史清华. 神经套管技术在修复外周神经中的应用现状及进展 [J]. 生物骨科材料与临床研究, 2007, 12 (6): 29 - 31.
- [2] 曹涌,成红兵,张沛云. 神经桥接物修复周围神经损伤的研究进展 [J]. 解剖学研究, 2000, 20 (2): 136 - 141.
- [3] TOS P, BATTISTON B, GEUNA S, et al. Tissue specificity in rat peripheral nerve regeneration through combined skeletal muscle and vein conduit grafts [J]. Microsurgery, 2000, 20 (2): 65 - 71.
- [4] MOHAMMAD J, SHENAIQ J, RABINOVSKY E, et al. Modulation of peripheral nerve regeneration: a tissue-engineering approach. The role of amnion tube nerve conduit across a 1-centimeter nerve gap [J]. Plast Reconstr Surg, 2000, 105 (2): 660 - 666.
- [5] OKADA-BAN M, THIERY J P, JOUANNEAU J. Fibroblast growth factor-2 [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2000, 32 (3): 263 - 267.

- [6] RIBATTI D, VACCA A, RUSNATI M, et al. The discovery of basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor-2 and its role in haematological malignancies [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007, 18(3-4): 327 - 334.
- [7] GROTHE C, TIMMER M. The physiological and pharmacological role of basic fibroblast growth factor in the dopaminergic nigrostriatal system [J]. *Brain Res Rev*, 2007, 54(1): 80 - 91.
- [8] WOOLFORD J, TORIUMI M. The enhancement of nerve regeneration using growth factors: brief review [J]. *J Long Term Effal Implants*, 1995, 5(1): 19.
- [9] 蔡文琴, 郑世彬. 组织学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 844 - 847.
- [10] 秦煜, 裴国献, 吴岚晓. 周围神经损伤修复模式应用基础研究的研究进展[J]. *中国临床康复*, 2002, 6(4): 572 - 573.
- [11] 龚炎培, 顾玉东. 乳鼠坐骨神经条件培养基促进周围神经再生的实验研究[J]. *中华手外科杂志*, 1996, 2: 185 - 188.
- [12] STOCKER K M, SKERMAN L, KEES S, et al. Basic FGF and TGF-beta, influence commitment to melanogenesis in neural crest-derived cells of avian embryos [J]. *Development*, 1991, 111(2): 635.

(2012-02-22 收稿)

(上接第17页)

剂量的人参皂苷 Rg3 与 IFN- α 联合使用尚未见对血吸虫病肝纤维化的增强疗效作用, 考虑可能与治疗时间短有关, 其相互协同作用也许会随着治疗时间延长而逐渐显现, 扩大实验样本量、延长疗程及加大剂量是否能增加疗效尚需进一步研究.

[参考文献]

- [1] 徐邦和, 熊衍珉, 王沁, 等. 黄芪丹参加常规护肝药治疗血吸虫病肝纤维化 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2010, 22(6): 613 - 615.
- [2] 黄海燕, 焦云桃, 艾国, 等. 安络化纤丸联合 γ -干扰素对血吸虫肝纤维化鼠 TIMP-1 及 TGF- β 1 的影响 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(1): 30 - 34.
- [3] 王伟雅, 李飞, 贾雪梅, 等. α 干扰素治疗小鼠日本血吸虫病肝纤维化实验研究 [J]. *昆明医学院学报*, 2007, 28(3): 25 - 29.
- [4] 曾瑾, 王红, 贾雪梅, 等. 人参皂苷 Rg3 抗血吸虫肝纤维化作用的实验研究 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2011, 29(2): 107 - 110.
- [5] 乌文琳, 蔡卫民, 陈名刚, 等. 日本血吸虫病肝纤维化诊断与疗效评估方案(草) [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2004, 16(3): 229 - 230.
- [6] 王庭富, 孟正木. 人参皂甙 Rg-3 对免疫功能的影响 [J]. *中国药科大学学报*, 1999, 30(2): 133 - 135.
- [7] 夏启荣, 何峰. 肝硬化的诊断与治疗 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 2.
- [8] 张仲苗, 江波, 章荣华, 等. 人参皂甙 Rg3 对小鼠免疫功能的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2004, 20(6): 4 - 6.
- [9] 周嘉鹤, 陈彦凡, 陈少贤. 参一胶囊对慢性缺氧所致肝胆脂质过氧化的影响 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2004, 14(1): 21 - 22.
- [10] GUERRET S, DESMOULIERE A, CHOSSEGROS P, et al. Long - term administration of interferon alpha in nonresponder patients with chronic hepatitis C: fol2 low - up of liver fibrosis over 5 years [J]. *J Viral Hepat*, 1999, 6(2): 125 - 133.
- [11] SAKA IDA I, NOGATOM I A, HIRONAKA K, et al. Quantitative analysis of liver fibrosis and stellate cell changes in patients with chronic hepatitis C after interferon therapy [J]. *Am J Gastroenterol*, 1999, 94(2): 489 - 496.
- [12] 饶慧英, 魏来. 干扰素对肝星状细胞活化的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(4): 440 - 442.
- [13] 黄以群, 王崇国, 周明行, 等. 干扰素 α 抗肝纤维化的作用 [J]. *中华传染病杂志*, 2002, 20(2): 94 - 96.
- [14] 黄宇琦, 王宇, 高毅, 等. α -干扰素对大鼠肝纤维化间质胶原酶基因表达的调控 [J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 8(5): 579 - 580.
- [15] 许伟华, 杨发林, 吕晓霞, 等. 干扰素 α 对肝纤维化大鼠肝星状细胞凋亡的诱导作用 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2002, 40(5): 427 - 428.

(2012-02-22 收稿)