

冷冻干燥辐照灭菌家兔的坐骨神经 同种移植的实验研究

杨志远 孙世荃 刘赫臣

(中国辐射防护研究院, 太原)

摘要 利用冷冻干燥辐照灭菌的家兔坐骨神经进行同种移植, 结果看到大约 76% 的动物手术后 3 个月有较好的形态学(光镜、电镜)和电生理学恢复。神经移植体内神经鞘管的保存、鞘管内 Schwann 细胞的再建和免疫排斥反应的抑制, 是同种神经移植获得成功的关键。

关键词 神经移植, 组织库, 辐照灭菌, 家兔坐骨神经

神经移植作为神经再生的桥梁可用于创伤、肿瘤和麻风等引起的周围神经缺损的修复。周围神经自体移植已经用了一个世纪, 为了改进其应用中的局限性, 需要开展异体移植。尽管有过一些同种周围神经移植成功的报道, 但组织段的消毒和保存方法的不经济, 以及应用时需要较长时间使用免疫抑制剂, 使临床广泛应用受到限制。60 年代初 Campbell^[1], Marmor^[2]等报道, 通过照射不但可使异体神经组织彻底灭菌消毒, 并可减少其抗原性, 这一发现后来为一些学者证实并逐步用于临床^[3-4]。近年来国际原子能机构(IAEA)提倡推广应用辐照消毒技术处理异体组织并建立相应的组织库。国内尚未见到有关神经组织库以及相应的实验研究和临床研究的报道, 为此本文开展了该项研究工作, 进行了技术和理论上的探索。

材料和 方法

(1) 移植神经组织段的制备及移植手术 取一段 50—70 mm 长的家兔坐骨神经干, 用英国产品 SB₁ 型真空冷冻干燥机进行干燥。首先将神经组织段置于干燥架上, 放冰箱内预冻。开动冷冻干燥机, 当冷冻室温度达 -40℃, 干燥室温度达 -30℃ 时, 将干燥架及神经组织段放入干燥室内进行冷冻干燥, 约经 4 h, 当真空度达 1.33 Pa 时, 表明冷冻干燥程序完成, 关闭真空系统, 放气取样, 将神经组织段样品立即封存于双层塑料袋中。再经 ⁶⁰Co γ 射线 25 kGy 剂量照射, 在室温下保存备用。移植前将制备好的神经组织段置生理盐水中浸泡 3—4 h, 使之复原。Urethan 麻醉下暴露家兔坐骨神经股部中段, 切除 10 mm, 植入复原后的坐骨神经, 两端做神经外衣缝合。共观察 17 只雄性家兔。

(2) 电生理学检查 描记诱发肌肉动作电位。(1) 直接刺激法: 在神经切除之前和移植经一定时间后进行组织学取材的当天, 使用直接刺激法。麻醉下暴露神经干, 对于尚未切断的正常神经将刺激电极置于神经干上, 对于移植后的神经将电极置于宿主神经的近心端。电刺激为方形波, 时程 0.03 ms 和 0.3 ms(用于检查慢波), 电压 100 V。记录电极为单极同心圆针形电极, 插

本研究得到国际原子能机构(IAEA)部分资助

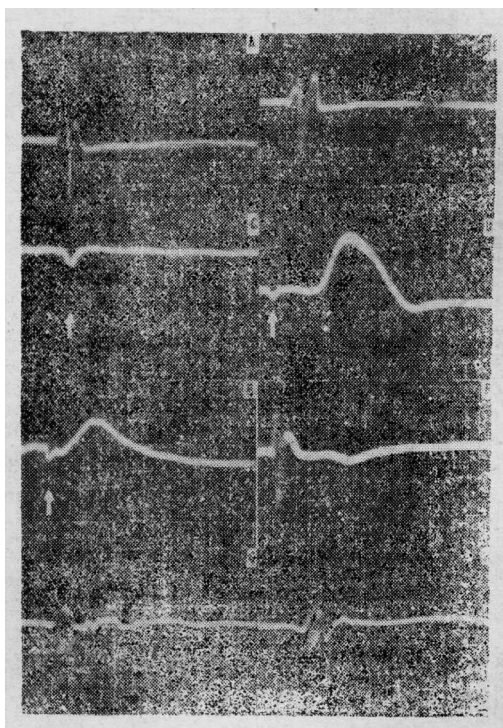


Fig 1. Photographs of evoked muscle action potential of gastrocnemius of rabbit, before resection and after implantation of nerve graft

A and B: normal (before resection); C: after resection D to F: good recovery, slow wave (D, E) and rapid wave (F) in 21 and 83 days after implantation, respectively; G, moderate recovery, 82 days after operation. H: bad recovery, 80 days after operation; B, D, E are the results of indirect method, others are the results of direct method; Stimulating duration: C to E 0.3 ms, others 0.03 ms; ↑ mark: show stimulating mark; Scale: abscissa 20 ms; ordinate 1 mV

不规则的波幅低于 1 mV 的诱发电位(见图 1 H)。

2. 组织学和电镜检查

(1) 移植后 15 d 植入的神经内有血管和间叶细胞长入,神经纤维被残存神经鞘管所取代。这些神经鞘管在横切面上呈囊泡状,有浓染边缘。囊泡(鞘管)空虚或含淡染退变碎屑,周边有新生的 Schwann 细胞(见图 2 A)。残存神经鞘管在引导 Schwann 细胞柱和再生轴索向末梢端定向中有重要作用。有散在的巨噬细胞,无明显的炎症反应。电镜下可以看到退变的泡状结构,完整的和塌陷的神经鞘管框架和含有空泡的巨噬细胞。在植入神经的近侧端有不规则伸延的再生轴索芽状突起,覆以少数几层新生髓鞘的致密板和 Schwann 细胞胞浆(见图 2 B)。

(2) 移植后 25 d 植入神经段内的囊泡状神经鞘管呈泡沫状并相互聚集,有散在巨噬细胞和成纤维细胞束侵入。

入腓肠肌肌腹。调整针形电极的方向和深度,以使在示波器上获得最大波幅的动作电位,然后示波照相记录。(2) 间接刺激法:于手术后定期在完整的实验动物身上进行。刺激电极插入臀部肌肉间接刺激宿主坐骨神经近心端而不暴露神经。诱发电位的描记方法同上。

手术后 15、25、65、80 和 100 d,切取植入的神经段和宿主坐骨神经远心端(距离缺损约 5 mm 处)进行组织学和电镜检查。

结 果

1. 电生理学检查

手术前的正常神经利用直接刺激法可以获得峰形光滑的三相波,波幅 3—6 mV,时程 15—20 ms。间接刺激法也获得三相波,但形状不同,波幅较低,为 1—3 mV,时程 15—20 ms(见图 1 A、B)。

手术后诱发电位消失(见图 1 C),21—100 d 后有不同程度的恢复。恢复良好的实验例约占 23%。于手术后 21 d 用间接刺激法检查,可见低波幅慢动作电位出现,时程增加到 40—80 ms,波幅下降至 2—4 mV(见图 1 D)。用直接刺激法检查,可见类似的慢波出现,仅其潜伏期较短(见图 1 E)。60—80 d 后快波恢复,波幅可以达到正常值的下限(见图 1 F)。恢复中等者占 53% 左右。动作电位慢波于 4 周后出现,快波亦出现较晚,手术 80 d 后波幅仍低于正常值的下限(见图 1 G)。恢复不良者占 23%,4 周后诱发电位无任何恢复迹象,80 d 后才出现

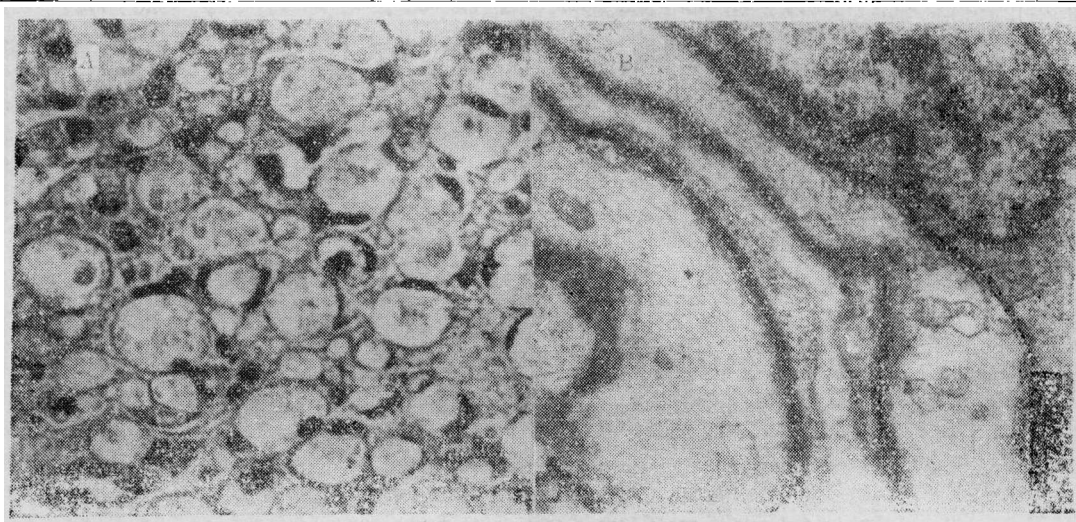


Fig 2. 15 days after operation

(A) The implanted nerve graft, remained neurilemmal tubes look like vacuoles surrounded by nucleus of newborn Schwann cells, cross section. HE stain, $\times 320$

(B) Proximal end of implanted nerve graft, sprouts of two regenerated axons covered with thin layer of newborn myelin sheath next to the cytoplasm of Schwann cell and its nucleus. EM, $\times 9400$

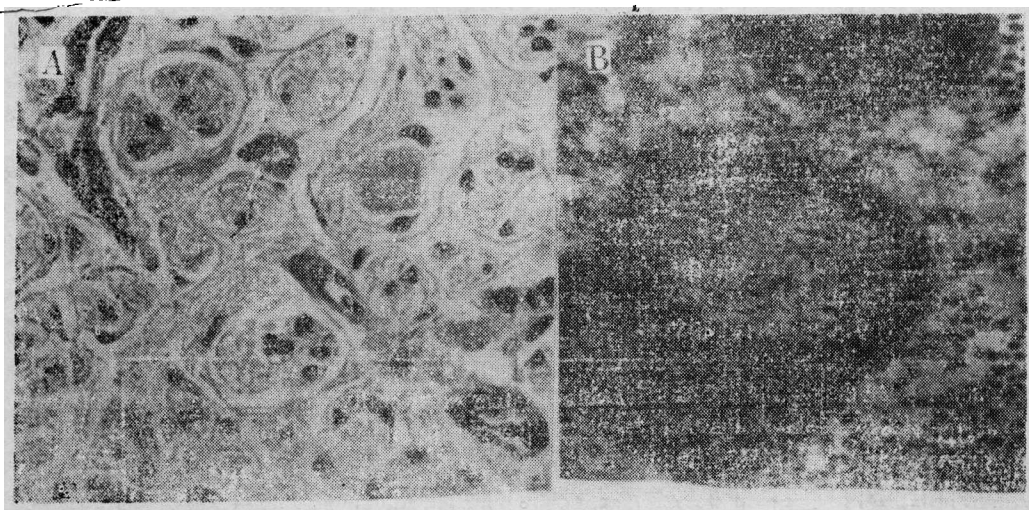


Fig 3. 65 days after operation

(A) Implanted nerve graft, neurilemmal tubes containing Schwann cells and newborn myelin sheath with reticular structure, several tubes are wrapped together by fibroblasts and collagen fibers, cross section. HE stain, $\times 320$

(B) Implanted nerve graft, myelinated fiber and unmyelinated fibers are enveloped in cytoplasm of Schwann cells. EM, $\times 18000$

(3) 移植后 65 d 植入神经段在神经鞘管中有筛网状结构(髓鞘前身), 伴有 1 个或多个深染 Schwann 细胞胞核。常见几个鞘管聚集在一起被梭形纤维细胞和薄层胶原纤维所环绕, 无纤维瘢痕形成(见图 3 A)。电镜检查植入神经段和宿主坐骨神经远心段可以看到有髓神经纤维, 髓鞘的成熟程度亦即其髓鞘厚度或致密板层数有所不同。髓鞘外方有被覆以致密基底板的 Schwann 细胞胞浆包裹(见图 3 B)。附近有胶原纤维和被 Schwann 细胞胞浆包裹的无髓神经纤维

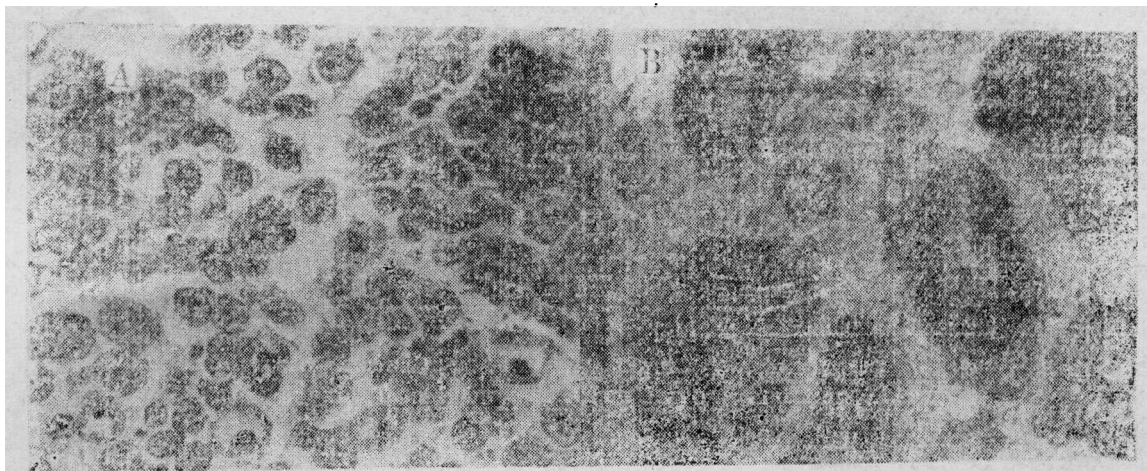


Fig 4. 100 days after operation

(A) Implanted nerve graft, cross section of myelinated nerve fibers with normal appearance. HE stain, $\times 320$

(B) Myelinated and unmyelinated nerve fibers interspaced by collagen fibrils, a nucleus of schwann cell and a fibroblast. EM, $\times 6700$

轴索。另见散在的巨噬细胞，含有退变的板层状结构。

(4) 移植后 80 和 100 d 植入神经段内的神经纤维在光镜下外观正常(见图 4 A)。电镜下髓鞘厚度正常(见图 4 B)。

讨 论

通过电生理学和组织学研究，从本文获得的证据表明，经冷冻干燥复合辐照灭菌处理的同种异体神经组织段，在外周神经移植过程中，为神经再生起到良好的搭桥作用。在移植手术后第 15 d 时，在电镜下于植入神经段近侧端见到神经轴芽的顶端及引导它们生长的 Schwann 细胞。表明寄主神经近心段神经轴芽正在生长，并已达到与植入神经段交界的缝合区。在同一移植神经的植入神经组织段远侧端，未见神经轴芽，却可见到完整的神经鞘管，它是细胞外成份。因为神经损伤后 Schwann 细胞和神经纤维都已消失，而它仍然保持完整。已经死亡的经过处理异体神经组织段在神经移植中之所以能起到搭桥作用，神经鞘管起了关键作用。它为增生的 Schwann 细胞和神经轴突提供了一个通道，先进入神经鞘段 Schwann 细胞沿鞘管，排列成行，形成 Bungner 氏带，然后引导近心段神经轴芽生长达远心段^[5]。神经再生定向生长的原因，目前已了解是由神经轴芽的趋化性所致^[6]。

刺激周围神经干诱发其所支配肌肉动作电位，是检查神经肌肉机能状态的一种客观的方法。电刺激神经干后引起其支配肌肉出现的动作电位为 M 波，是直接刺激神经的应答，它表明其支配神经的完整性。因而本文在移植手术后刺激坐骨神经近心段，在腓肠肌上记录到诱发动作电位，是神经再生的可靠证据。有作者^[7]研究再生神经纤维的诱发动作电位幅值后提出，动作电位大小同记录点轴突数目有关。该作者观察到，术后随时间延长，神经纤维直径增粗，数量增多，测得的再生神经纤维动作电位幅值亦增加。但是，在容积导体(体液)中引导电极与肌纤维的距离可明显影响动作电位的波形和幅值。有资料证明^[8]，引导电极距兴奋的骨骼肌纤维越近，则引导之动作电位幅值越大，波峰越明显；反之，越远则动作电位幅值越小，时程加宽，波峰越低。尽管本文在引导肌肉动作电位时，针电极要经反复探查，尽量找到最接近兴奋肌纤维的位置才进行记录，

以缩小记录电极位置引起的误差, 动作电位幅值也仅有粗略地定量评价神经纤维再生的价值, 而在移植神经支配的肌肉上引导出诱发动作电位, 定性地证明神经纤维再生的价值是明确和肯定的。

异体组织移植后, 一般经 7—15 d 便出现免疫排斥反应而使移植失败。这种免疫反应最直接的表现是植入神经组织周围的炎症反应。经冷冻干燥并辐照处理的异体神经组织段, 植入寄主神经, 在术后 15 d 及以后时间进行的组织学检查中, 未见明显的炎症反应, 与报道^[9]结果相一致。表明用冷冻干燥和辐照复合处理方法来降低移植组织段的抗原性, 是战胜免疫排斥作用一种可取的途径。

神经组织段在 -30°C 温度下迅速冷冻然后真空干燥, 这就使神经鞘管结构基本完整地保存下来。进一步将冷冻干燥的神经组织段密封在双层塑料袋中, 经 ^{60}Co γ 射线 25 kGy 照射, 在降低其抗原性的同时还得以彻底灭菌, 因而在室温下可保存 2—3 年, 便于在组织库中以及一般医疗单位中保存。需要时将其取出, 于消毒过的生理溶液中浸泡数小时后即可使用。这样处理的神经组织段其韧性及抗拉性比新鲜神经组织更强。这些特点很适合缝合手术的需要。综上所述, 冷冻干燥和辐照消毒的神经组织段, 在外周神经移植中有很好的实用价值, 尤其对战时急需和应付意外事故更具明显的优越性。

参 考 文 献

- [1] J. B. Campbell et al., J. Trauma., 3, 303(1963).
- [2] L., Marmor, J. Bone Joint Sug., 46, 389(1964).
- [3] J. G. Mcleod et al., Brain., 98, 203(1975).
- [4] L., Marmor, Clin. Neurosurg., 17, 126(1970).
- [5] 刘湘梅, 神经生长的生物学与病理学, 北京, 科学出版社, 1985, 194—198 页。
- [6] H. M. Liu, Exp. Neurol., 66, 123(1979).
- [7] G. David et al., Surg. Gyned. Obstet., 127, 1239(1968).
- [8] 刘磊等, 神经肌电图原理, 北京, 科学出版社, 1983, 107 页。
- [9] J. D. Pollard et al, In "Radiation Sterilization-Irradiated Tissues and Their Potential Clinical Use", edited by G. O. Phillips et al., The North Wales Institute, Clwyd. U. K., 1978, 61—93.
(稿件收到日期: 1990 年 8 月 8 日)

EXPERIMENTAL STUDY ON LYOPHLIZED IRRADIATION STERILIZED NERVE ALLOGRAFTS IN RABBITS

Yang Zhiyuan, Sun Shiquan and Liu Hechen

(China Institute for Radiation Protection, Taiyuan)

ABSTRACT Lyophilized irradiation sterilized nerve grafts in rabbits were used in allogeneic nerve transplantation. The result show that about 76% of experimental rabbits had fairly well morphologic (microscopic and electron microscopic) and electrophysiological recovery 3 month after operation. Preservation of neurilemmal tubes in nerve grafts, repopulation of Schwann cells in this tube and suppression of immune rejection are the key points in allogeneic nerve transplantation.

KEYWORDS Nerve transplantation, Tissue bank, Irradiation sterilization, Sciatic nerve of rabbit