

外源性碱性成纤维细胞生长因子诱导下自体静脉桥接修复面神经缺损

张敏¹⁾, 许彪²⁾, 江勋³⁾, 张立亚²⁾

(1) 云南省第一人民医院 / 昆明理工大学附属昆华医院 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; 3) 云天口腔诊所, 云南 昆明 650031)

[摘要] **目的** 探讨面神经缺损后, 经自体静脉桥接修复, 并在外源性碱性成纤维细胞生长因子诱导下, 神经再生所受到的影响. **方法** 面神经缺损模型采用大耳白兔加以建立. 随机分为实验组和对照组. 实验组经人造兔面神经缺损, 采用其自体静脉桥接, 然后在桥接体内注入碱性成纤维细胞生长因子; 对照组经人造兔面神经缺损, 采用其自体静脉桥接, 然后在桥接体内注入生理盐水. 于术后 100 d 将 2 组兔处死, 并对修复的兔面神经进行电生理检测, 进而进行组织学观察, 以达到对缺损神经再生情况进行评价的目的. **结果** 神经再生及修复表现在 2 组实验动物均有存在, 知识在程度上显现出不同. 电生理检测显示, 实验组神经传导的速度更快; 而组织学检查则显示, 实验组无论是再生神经纤维数量还是质量上, 均要优于对照组. **结论** 采用外源性碱性成纤维细胞生长因子诱导下自体静脉桥接修复面神经缺损对缺损面神经的再生、修复具有促进作用.

[关键词] 碱性成纤维细胞生长因子; 静脉桥接; 神经缺损; 神经再生

[中图分类号] R651.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 07 - 0025 - 05

The Vein Graft Technique of the Facial Nerve Regeneration Combined with the Induce of Basic Fibroblast Growth Factor

ZHANG Min¹⁾, XU Biao²⁾, JIANG Xun³⁾, ZHANG Li - ya²⁾,

(1) Department of Orthodontics, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650032;
2) The Affiliated Stomatology Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650031; 3) Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of the vein graft technique combined with the basic fibroblast growth factor (bFGF) on peripheral nerve regeneration. **Methods:** 12 adult white rabbits were selected and divided into two groups. The facial nerve on the left side of rabbits was served and bridged with the autogenous standard of vein graft. 0.3ml bFGF solution (0.75 $\mu\text{g/mL}$) was injected into the vein graft conduit in the experimental group, while the same amount of saline solution was used in the control group. Microscopic examination and detection of nerve conduct velocity were performed at 100 th day after the operation. **Results** At 100th day nerve regeneration in the vein graft combined with bFGF showed there were superior functional results of faster conduction velocities ($P < 0.05$) and distinct histological results compared with the control group. **Conclusion** The vein graft technique combined with bFGF can induce the facial nerve to regenerate.

[Key words] Basic fibroblast growth factor; Vein graft; Nerve defect; Nerve regeneration

在临床上, 面神经缺损越来越多见, 引发原因多为损伤及肿瘤等所致. 因面神经缺损引发的面瘫, 不但会引发患者较为严重的功能障碍, 而且还会对患者造成精神心理方面的压力. 所以, 近

年来越来越多的医学家开始将如何面神经缺损的修复作为研究的重点.

在面神经缺损修复的诸多方法中, 运用显微外科技术进行神经移植的治疗方法为临床所常用. 不

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81260145); 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

过自体神经移植存在的供体部位的损伤和来源不足等缺陷在一定程度上阻碍了其更广泛的应用。目前较为常见的解决办法是取材那些较次要而且细小的皮神经来修复具有较重要功能意义的神经,但这种解决方法对修复粗大神经的损失造成了困难,并且修复后的神经功能的恢复也无法令人满意。因此人们积极开展了神经修复的研究,例如用乙交酯共聚物、脱水交联明胶等材料制成管状物,或用自体静脉作为导管为受损神经的修复提供生长空间。除此以外,在神经生长和修复中还需要多种营养物质的参与。研究发现,碱性成纤维细胞生长因子(basic fibro blast growth factor, bFGF)是一种多肽类生长因子,生物学作用广泛。比如它通过对有丝分裂所起到的促进作用,可以促进来源于中胚层和外胚层的多种细胞的生长。此外,研究还发现碱性成纤维细胞生长因子还是一种非常重要的神经营养因子,它不仅能够抑制凋亡,还可以促进血管内皮细胞和多种神经细胞存活^[1-3]。笔者在用自体静脉导管修复大耳白兔面神经缺损的同时,加入外源性碱性成纤维细胞生长因子,观察面神经再生的情况,为临床面神经损伤的治疗进行一些探索。

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。

1.2 主要材料

11-0 医用无损伤缝线(上海元洪医疗器械厂)。

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

选取健康大耳白兔 12 只(昆明医科大学实验动物中心),雌性,体重 2.5~3.5 kg,随机分为实验组和对照组(每组 6 只)。分别切取其左侧面神经的下颊支神经片段,长度 15 mm,分组进行修复。一组使用静脉桥接加注生理盐水,二组使用静脉桥接加注 bFGF。

1.5 手术方法

采用 3% 的戊巴比妥钠(30~40 mg/kg)对兔施行耳缘静脉注射麻醉。先对兔的面颊人工脱毛,常规进行消毒铺巾。自兔内眦下 1 cm 斜向下颌角取颊部斜方向切口,长度约 25 mm(图 1)。切开皮肤,分离皮下组织达嚼肌表面。自耳下腺浅叶前缘向兔口轮匝肌方向分离至暴露面神经的下颊支,

切取其 15 mm 长度。再向下后方寻找颈外静脉,结扎颈外静脉,切取其 20 mm 长度,见图 2。



图 1 术区及切口

Fig. 1 The operation area and incision

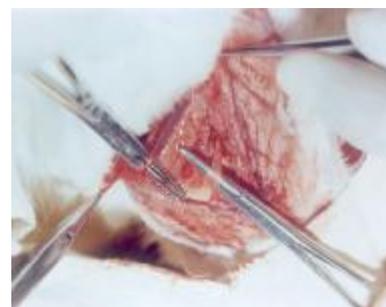


图 2 兔面神经下颊支及颈外静脉

Fig. 2 The buccal branch of the facial nerve and the external jugular vein of rabbit

把两神经断端分别插入静脉段管腔内,插入长约 2.5 mm,用 11-0 无创伤缝线对其进行 4 点缝合固定(图 3)。保证神经缺损距离恒定于 15 mm。于静脉神经接合缝隙处向实验组左侧静脉的再生室内注入 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 bFGF,约 0.3 mL(试剂由中国生物研究所提供),见图 4;同时,再向对照组左侧再生室内注入生理盐水(NS),约 0.3 毫升,并使静脉管腔充盈与神经断径相当。注入后对其观察 15 min(图 5),确定桥接静脉管腔无缩小或塌陷、管腔内液体无外漏后,将伤口以生理盐水冲洗干净,并分层缝合。

所有的动物均在相同饲养条件下分笼饲养,观察 100 d,然后处死。

1.6 观察检测方法

1.6.1 神经电生理检测 12 只动物手术后 100 d 再次行麻醉,切口,暴露修复的神经段。实验室的温度控制在 20~25 摄氏度,选用 MedLab 生物信号采集处理系统,分别检测实验组与对照组修复神经传导速度。将刺激信号选定为直流脉冲、频率 3HZ、强度以能诱发清晰而稳定的图形为宜。把刺激电极放置于实验模型近心端的再生室,将引导电极放置于其远心端的再生室,两电极间

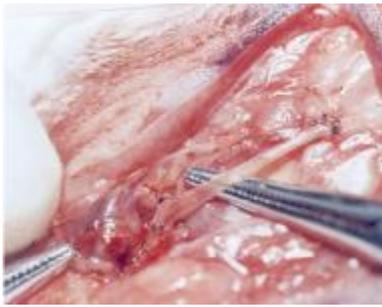


图 3 静脉片段与神经两断桥接

Fig. 3 Bridging the defected nerve with the external jugular vein



图 4 静脉桥接体内注入 bFGF/NS

Fig. 4 Injecting the bFGF/NS into the vein



图 5 充盈的静脉桥接体观察 15 分钟

Fig. 5 Observation on the vein for 15 minutes after injection

距为 20 mm.

1.6.2 组织学观察 取静脉桥接体中段和桥接体以远 5 mm 的神经段, 即刻投入 10% 的中性多聚甲醛固定液中, 固定 24 h, 制备成蜡块, 切片, 常规 HE 染色.

1.7 统计学分析

对神经传导速度的分析数据结果进行方差检验 (单因素方差分析), 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示.

2 结果

2.1 大体观察结果

2.1.1 常规静脉加 NS 组 桥接体的周围组织发

现有明显的瘢痕形成, 粘连严重, 桥接体空虚而且狭细, 两端套接处则稍显膨大, 表面较少有血管与面神经段相连 (图 6).

2.1.2 常规静脉加 bFGF 组 桥接体周围组织未见明显瘢痕形成, 桥接体被再生的神经充盈但欠缺饱满, 中远部则略变细, 两端套接处未见明显膨大, 表面可见血管与两神经段相连, 色泽和神经干略有差异 (图 7).

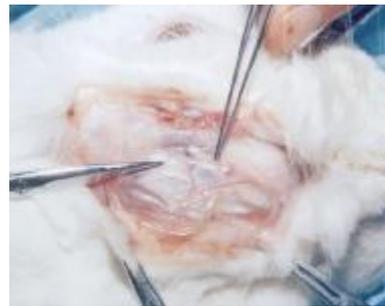


图 6 常规静脉加注 NS

Fig. 6 Standard vein graft with injection of the NS



图 7 常规静脉加注 bFGF

Fig. 7 Standard vein graft with injection of the bFGF

2.2 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 ± 0.33) m/s, 并且组和组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$).

图形介绍: 电流经神经束膜外体液传导至引导电极是产生伪迹的原因, 而且其速度非常快, 所以我们把他作为刺激的起始时间. 刺激电位经神经传导至第一引导电极则产生了波峰. 刺激电位经神经传导至第二引导电极就会形成波谷. 通常不考虑波谷, 因为它是一复合波, 见图 8 及表 1.

2.3 组织学结果

2.3.1 静脉加 NS 组 再生的神经纤维和结缔组织、新生血管混杂在一起, 生长混乱, 典型神经纤维束组织学表象不可见 (图 9).

2.3.2 静脉加 bFGF 组 再生的神经纤维被结缔组织分隔, 呈现出分散的束状 (图 10、图 11).

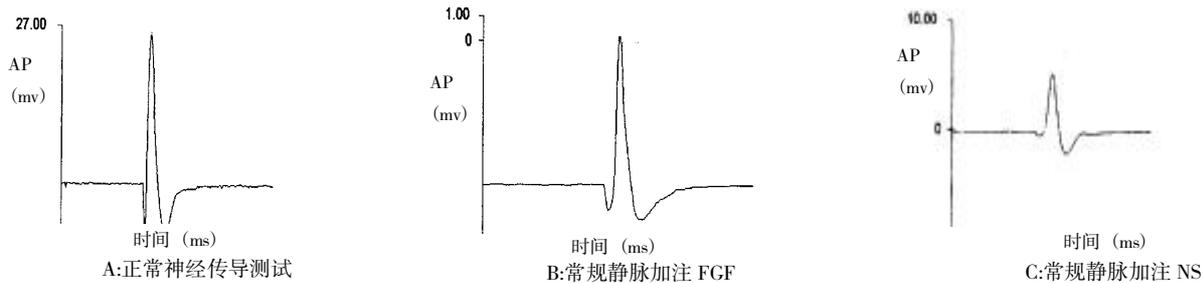


图 8 神经电生理检测结果

Fig. 8 Results of neurophysiological test

表 1 左侧神经传导速度检测 ($\bar{x} \pm s$)

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

组别	n	传导速度 (m/s)	95%CI
I 组	6	11.053 ± 0.123*	10.925 ~ 11.182
II 组	6	13.467 ± 0.385	13.062 ~ 13.87

与 II 组比较, * $P < 0.05$.

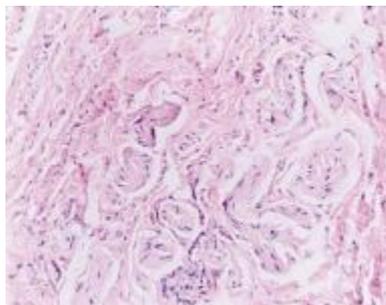


图 9 静脉加 NS 组 (HE 染色, 100×)

Fig. 9 Standard vein graft with injection of normal saline group (HE 染色, 100×)

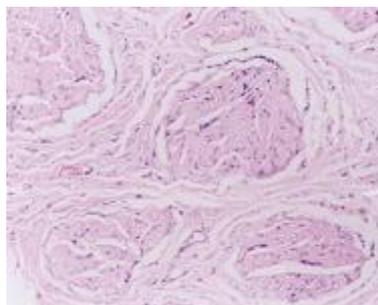


图 10 静脉加 bFGF 组 (HE 染色, 横切面, 200×)

Fig. 10 Standard vein graft with injection of the bFGF (HE, cross section, 200×)

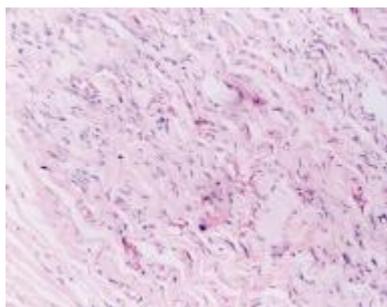


图 11 静脉加 bFGF 组 (HE 染色, 纵切面, 200×)

Fig. 11 Standard vein graft with injection of the bFGF (HE, longitudinal section, 200×)

3 讨论

自体神经移植是目前临床上治疗周围神经损伤较常采用的一种方法, 且临床效果确实。但其缺点也是显而易见的。第一来源比较困难, 在满足临床的需求上有欠缺; 第二是该方法存在着较多的并发症, 比如常会造成供区的神经支配区域出现感觉麻

木和运动障碍等。因此, 寻找一种理想的替代材料显得尤为迫切。采用静脉等非神经组织桥接周围神经缺损已为许多实验所证实, 其能够在一定的缺损长度内引导神经的再生^[4,5]。

在众多替代材料中, 自体静脉因其来源广泛、取材容易、对供区影响小、组织相容性佳等优势, 成为较常选用替代材料。但是它同自体神经移植存在着同样的问题, 因仅能够部分恢复神经功能, 为提升其修复神经缺损的治疗效果仍需做大量的研究工作^[6,7]。

周围神经再生的成功与否有赖于一个适宜神经再生的微环境, 以便使轴突能够沿着所植入的神经移植体生长至远端神经。Fawcett 等^[8]学者认为, 只有具备如下特征, 才能够成为修复周围神经缺损的理想桥接体。第一再生的轴突要能够长入桥体, 并且可以顺沿生长到达桥体远端; 第二再生轴突要达到成熟, 即要具备正常神经的直径、髓鞘化和传导动作电位; 第三是再生的轴突不得有抗原性; 四是再生的轴突必须能够快速获得供其

营养的良好的血液循环;最后一点,桥接体内的再生轴突的排列一定要有序,只有此才能确保其准确地到达相应的靶组织、靶器官。

除此之外,罗永湘等^[9]多位学者也通过实验证实,周围神经切断后因其相应的运动神经元本身受到了伤害,导致了临床中显现的运动功能恢复欠佳。此发现的实际意义在于外科医生在处理周围神经缺损的时候,因神经干损伤造成神经元胞体的损伤应与修复神经干的连续性同等重视甚至更甚。

bFGF作为一种细胞的刺激剂不断为研究所发现,它有促进细胞有丝分裂的作用,还能促进神经干细胞的增殖和分化。参与调节细胞的生长发育和组织损伤后的修复。大量实验均已证实:bFGF在体外对损伤的神经元的存活均具有很明显的保护作用^[10],而且周围神经纤维的再生有赖于神经元胞体的存活。这些都为周围神经纤维的再生提供了“源”上的保证。

研究还发现bFGF通过结合周围神经再生轴突上存在的一些bFGF受体,经由细胞内信号传导途径,使其间的各种活化分子得以激活,进而使其所具有的神经趋化作用得以发挥,因而对再生轴突生长的方向起到了引导作用。通过此作用帮助其生长速度加快,还可以再生神经纤维的数量得以增加。在满足神经再生时物质代谢的需要方面,bFGF所具备的增加再生神经血管的密度和数量,使其得以很好实现。研究发现在促进其它促神经再生的因子起作用方面,bFGF亦可施加影响。比如它可以对体内黑色素细胞刺激素的浓度起到维持的作用^[11],并通过促进神经生长因子及神经生长因子受体的表达来对周围神经的再生起到促进作用。bFGF还对周围神经轴突的生长有促进作用^[12],外源性应用bFGF能够提高再生轴突的长度、密度、直径以及髓鞘形成的质量^[13]。而且,对于翻转静脉桥体支架作用差的缺点,可以通过注入bFGF后的充盈效果得到很好的改善,从而解决了长段移植时常由于中远段塌陷而导致再生轴突长入此段时变细或受阻的临床难点。

在遇到周围神经损伤的时候,判断神经再生效果的关键是看其功能是否恢复。神经传导性被认为是周围神经的基本功能,而且神经干电活动的传导速度则能够直接反映出神经的传导性。周围神经在离断以后,神经传导性就会消失,所以神经传导功能被作为判断神经是否损伤和修复的一项可靠的指标。本研究两组大耳白兔术后100d的电生理检测结果表明实验组的神经传导速度比对照组有提高,差异有显著性。组织学结果也表

明实验组的再生神经数量较多,而且排列更为有顺序,更加接近正常神经组织的束状排列。提示我们使用静脉桥接修复大耳白兔面神经缺损时,加入外源性的bFGF能促进面神经缺损的再生和修复。

应用外源性碱性成纤维细胞生长因子诱导下自体静脉桥接修复面神经缺损为神经轴突再生提供所需的营养因子和较好的微环境,同时还可以被降解吸收。本项实验经过大体观察、组织学及神经电生理检测,显现出应用外源性碱性成纤维细胞生长因子诱导加自体静脉桥接修复面神经缺损能促进神经的再生,还可恢复神经传导的功能,所以该方法具有一定的临床研究及应用的價值。

[参考文献]

- [1] OKADA-BAN M, THIERY J P, JOUANNEAU J. Fibroblast growth factor-2.Int[J]. J Biochem Cell Biol,2000,32(3):263-267.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] DEVAUCHELLE B, BADET L, LENGELE B, et al. First human face allograft: early report [J]. Lancet,2006,368(9531):203-209.
- [5] TAKUSHIMA A, HARI K, ASATO H, et al. Neurovascular free -muscle transfer for the treatment of established facial paralysis following ablative surgery in the parotid region [J]. Plast Reconstr Surg,2004,113:1563-1572.
- [6] 朱国臣,肖大江,吴四海,等. 兔化学去细胞神经桥接大鼠面神经缺损 [J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科,2007,14(11):627-629.
- [7] HAASE S C, ROVAK J M, DENNIS R G, et al. Recovery of muscle contractile function following nerve GAP repair with chemically acellularized peripheral nerve grafts [J]. J Reconstr Microsurg,2003,19(4):241-248.
- [8] FAWCETT J W, KEYNES R J. Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve repair [J]. J Neurosurg, 1986,65:354-357.
- [9] 罗永湘,方煌,庞清江,等. 神经生长因子对周围神经运动纤维再生的影响 [J]. 中华手外科杂志,1997,13(1):3-5.
- [10] LI S, STRITTMATTER S M. Delayed systemic Nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury [J]. J Neurosci,2003,23(10):4219-4227.

(2013-05-13 收稿)