

文章编号:1000-5404(2013)19-2065-04

含川芎嗪 UW 液保存不同时间对异体神经再生的影响

钟建¹, 阳明明², 蒋电明² (402160 重庆, 重庆医科大学附属永川医院骨科¹; 400016 重庆, 重庆医科大学附属第一医院骨科²)

[摘要] **目的** 探讨在4℃条件下用含川芎嗪的UW液保存不同时间后大鼠异体神经再生的影响, 阐明川芎嗪在短期内能促进异体神经再生。**方法** 取3月龄雄性清洁级成年健康Wistar大鼠56只(受体), 体质量200~250g, 随机数字表法分为A、A'、B、B'、C、C'、D组, 每组8只。取3月龄雄性清洁级成年SD大鼠24只(供体), 体质量200~250g, 切取双侧坐骨神经干约15mm, 共取48条神经, 经生理盐水冲洗后随机放入24根冻存管中(每根冻存管含2条供体神经), 随机分为6组, 于4℃条件下, 任选3组分别经含川芎嗪的UW液分别保存4、6、12周后, 作为实验A、B、C组神经修复供体, 剩余3组用不含川芎嗪的UW液分别保存4、6、12周后, 作为对照A'、B'、C'组神经修复供体。D组为新鲜自体神经移植组。术后4、8、12周行大体观察, 术后12周行电生理检测, 光镜、电镜观察神经再生情况。**结果** 术后12周检测腓肠肌湿质量、电生理情况, A、D两组优于其他组, 但D组优于A组, 组间有统计学差异($P < 0.05$)。术后12周移植神经段行HE染色光镜观察结果显示, C组及C'组炎症反应最重且空泡变性最为明显, D组炎症反应最轻, 镜下见A、D两组神经纤维排列较规则。术后12周行透射电镜检测结果显示, A、D两组再生的有髓神经纤维较多, 并可见少许无髓神经纤维, 髓鞘完整, 呈同心圆排列, 细胞器丰富; B组镜下情况差于A组, C、C'组再生的有髓神经纤维较少, 并见结缔组织结构。**结论** 在4周内保存异体神经, 川芎嗪可改善其神经再生效果。

[关键词] UW液; 川芎嗪; 异体神经; 时间

[中图分类号] R282.71; R329.24; R622.3

[文献标志码] A

Regenerative effect of rat allograft nerves preserved in UW solution with tetramethylpyrazine for different time at 4 °C

Zhong Jian¹, Yang Mingming², Jiang Dianming² (¹Department of Orthopedics, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 402160; ²Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the regeneration of peripheral nerve allografts after being preserved in University of Wisconsin solution (UW solution) containing tetramethylpyrazine (TMP) for different times at 4 °C. **Methods** Fifty-six Wistar rats (male, weighing 200 to 250 g) were divided into 7 groups randomly, A, A', B, B', C, C' and D groups ($n = 8$) and were inflicted with sciatic nerve defect. The sciatic nerve allografts were collected from another 24 SD rats (3-month-old, weighing 200 to 250 g) and then preserved in UW solution containing TMP (for A, B and C groups) or not (for A', B' and C' groups) at 4 °C for different time intervals (4, 6 and 12 weeks), and then employed to repair the sciatic nerve defect of Wistar rats. The rats from group D were treated with fresh sciatic nerve autografts and served as control. In 4, 8 and 12 weeks postoperatively, the function of affected limb was observed. The weight, morphological and electric neurophysiology of gastrocnemius were measured and observed in 12 weeks postoperatively. **Results** With respect to the electrophysiological values as well as gastrocnemius weight, the results of groups A and D were better than the other groups, and those of group D were superior to those of group A ($P < 0.05$). Pathological observation in 12 weeks after transplantation indicated that the sciatic nerves of groups C and C' were in severe infection and obvious structural disorders with vacuolar degeneration. And the infection was slightest in group D. Microscopic and transmission electron microscopic observation showed that in groups A and D, the nerve fibers were in well-arrangement, and there were more regenerative medullated nerve fibers, with integrated myelin in concentric circles and abundant organelles. The condition in group B was worse than that in group A.

[基金项目] 重庆市卫生局中医药科技资助项目([2009]64)

[通信作者] 蒋电明, E-mail: jdm571026@vip.163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130701.0925.006.html> (2013-07-01)

There were few regenerative myelinated nerve fibers in groups C and C'. **Conclusion** TMP exerts its protective effect on the regeneration of allograft nerve in 4 weeks.

[**Key words**] UW solution; tetramethylpyrazine; allograft nerve; time

Supported by the Project of Science and Technology Research in Traditional Chinese Medicine of Chongqing Municipal Health Bureau (2009-64). Corresponding author: Jiang Dianming, E-mail: jdm571026@vip.163.com

自体神经移植是治疗周围神经损伤的金标准。周围神经缺损的治疗方式,目前的临床标准是移植一段“相对不重要”的自体神经,感觉神经诸如腓肠神经是常用的供体神经^[1]。然而周围神经损伤的治疗对于重建外科来说始终是个挑战,因为供体神经的稀缺且供区的并发症不可避免。异体神经可能是自体神经移植极佳的替代物^[2]。大多数周围神经损伤患者需行急诊手术治疗,故要求异体神经的保存时间较长且保存条件简便。川芎嗪(TMP)是中药川芎所含的生物碱,对清除氧自由基的作用极强,其作为中国传统医学药物广泛用于心、脑、肾等疾病的治疗^[3-6]。随着研究的进展,在兔和大鼠实验中发现川芎嗪能减轻神经细胞的缺血性或创伤性脑脊髓损伤,并有助于功能恢复^[7-8]。另有研究报道,川芎嗪在创伤性脊髓的治疗中能降低促炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的表达,上调抗炎因子 IL-10 的表达,并抑制 NF- κ B 活化^[9]。我们在前期实验中发现异体神经在 4℃ 条件下经川芎嗪预处理后保存 4 周移植,与自体神经移植效果相近,为使异体神经移植应用于临床,本实验延长异体神经保存时间进一步探讨神经再生效果。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

供体为成年健康雄性 SD 大鼠 24 只,体质量 200 ~ 250 g,由重庆医科大学实验动物中心提供[生产许可证号:SCXK(渝)2012-0001]。受体为成年健康雄性 Wistar 大鼠 56 只,体质量 200 ~ 250 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供[生产许可证号:SCXK(渝)2012-0005]。实验大鼠在重庆医科大学附属第一医院动物实验室屏障系统动物饲养室中分笼饲养,饲养室按照 10 h:14 h 昼夜明暗交替的控光,室内温度(22±2)℃,湿度(50±5)%。实验大鼠自由采食,饮水。本实验研究方案得到了重庆医科大学附属第一医院伦理委员会的许可。48 只 Wistar 大鼠按随机数字表法分为 A、A'、B、B'、C、C' 6 组,每组 8 只,其中 A、B、C 组分别用于含川芎嗪的 UW 液保存 4、6、12 周后的异体神经移植(实验组),A'、B'、C' 组用于不含川芎嗪的 UW 液保存 4、6、12 周后的异体神经移植(对照组)。另 8 只 Wistar 大鼠被切取部分坐骨神经后立即做原位移植,即为新鲜自体神经移植组(D 组)。

1.2 主要仪器及材料

盐酸川芎嗪注射液(中国北京市燕京药业有限公司),UW 液(美国 Bristol-Myers squibb 公司),双目显微镜(日本奥林巴斯),肌电图仪(日本 Hitachi-2000),透射电镜(日本 Hitachi 公

司),显微手术器械(中国上海市泽强医疗器械公司)。

1.3 方法

1.3.1 神经保存液的配制 川芎嗪(40 mg/支),按比例加入 30 mL UW 液,配备成含川芎嗪浓度为 200 mg/L 的 UW 液,同时添加 16 mg/L 地塞米松、40 U/L 胰岛素以及 100 U/mL 盘尼西林。对照组用不含川芎嗪的 UW 液保存。液体均即用即配。

1.3.2 供体神经的获取与保存 以 10% 水合氯醛 0.2 mL/100 g 将 SD 大鼠腹腔麻醉,麻醉成功后手术部位脱毛,常规消毒铺巾,沿股后外侧做约 35 mm 纵向切口,于股外侧肌、股二头肌及外展短肌肌间隙钝性分离,拉钩牵开两侧肌肉,清晰暴露双侧坐骨神经,于无菌条件下距梨状肌下缘以远 5 mm 处游离并平整切取双侧坐骨神经干,所取神经长约 15 mm。共取得 48 条神经,经生理盐水冲洗后随机放入 24 根冻存管中,每根冻存管含 2 条供体神经。24 根冻存管又随机分为 6 组,3 组分别经含川芎嗪的 UW 液保存 4、6、12 周后,依次移植于 A、B、C 组(实验组),另外 3 组分别用不含川芎嗪的保存液保存 4、6、12 周后,依次移植于 A'、B'、C' 组(对照组)。

1.3.3 建立动物模型 操作步骤同 1.3.2,暴露受体 Wistar 大鼠右侧坐骨神经,在距梨状肌下缘以远 5 mm 处整齐切除受体 Wistar 大鼠部分坐骨神经,造成 10 mm 的神经缺损,将保存的 SD 大鼠神经修成 10 mm 长的神经段,于手术显微镜下以 11-0 尼龙线缝合神经外膜 4~6 针,对合满意。D 组为将 Wistar 大鼠坐骨神经切断后立即原位移植。术后 3 d 抗生素预防感染,按移植神经来源,各组分笼饲养。

1.4 检测指标

1.4.1 大体观察 神经移植术后当天观察所有大鼠麻醉苏醒及进食情况,移植术后 4、8、12 周观察实验动物术后肢体功能及足底溃疡,移植术后 12 周取材时肉眼进一步仔细观察移植神经的肿胀情况及与受体组织的粘连情况。

1.4.2 神经电生理检测 移植术后 12 周,各组 8 只 Wistar 大鼠麻醉成功后取股后外侧纵向切口暴露移植神经,刺激电极放置于移植神经近端吻合口以近约 2 mm 处,接收电极放置于移植神经远端吻合口以远约 2 mm 处,地线放置于两电极之间的股二头肌,线路检查准确无误后测定神经动作电位潜伏期和传导速度。

1.4.3 腓肠肌湿质量 移植术后 12 周,取各组 Wistar 大鼠腓肠肌后立刻于电子天平称质量,观察腓肠肌萎缩情况。

1.4.4 透射电镜观察 移植术后 12 周行电生理检测后,各组每组随机取 4 只移植神经段,即刻置入戊二醛溶液中,行透射电镜检查,进一步观察再生神经超微结构情况。

1.4.5 光镜观察 移植术后 12 周,各组取 4 只大鼠移植神经段,即刻置入 10% 甲醛溶液中,行 HE 染色后切片,光镜下观察炎性细胞浸润及移植神经结构形态。

1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 9.1 软件,组间差异比较行 GLM 方法,两两比较行 SNK 法。

2 结果

2.1 大体观察

术后4周每组动物均出现右后肢功能障碍及患肢肿胀,尤以C及C'组肿胀程度为重,A组及D组大鼠患肢肿胀程度最轻,患肢拖行、足趾并拢。C组3只、C'组4只大鼠出现足底溃疡。术后8周,A、A'、D组动物跛行情况减轻明显,B'组动物跛行稍改善。C、C'组跛行无明显改变,两组足底溃疡情况较术后4周观察情况好转,溃疡面积较术后4周观察时稍缩小。术后12周A、D组中部分大鼠恢复四足行走,A'、B'组大鼠右后肢跛行明显改善,C、C'组中部分大鼠跛行较前仍无明显改变且两组中部分大鼠仍残存足底溃疡。术后12周进一步观察发现A、D组移植段神经与周围组织粘连较轻,稍加钝性分离后即可取出。C、C'组移植神经段肿胀情况明显,粘连严重,不易钝性分离。A'、B两组移植神经段与周围组织粘连情况介于A组及D组之间。

2.2 神经电生理检测

术后12周行神经电生理检测,测定各组神经动作电位潜伏期和传导速度,D组神经传导速度最高,潜伏期最短,A组两项指标次之,2组间差异有统计学意义($P < 0.05$);C组及C'组神经传导速度相对其他组慢,潜伏期相对其他组最长,2组间差异无统计学意义($P > 0.05$,表1)。

表1 各组大鼠动作电位潜伏期及传导速度和腓肠肌湿质量检测结果 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	神经传导速度(m/s)	潜伏期(ms)	腓肠肌湿质量(g)
A	9.43 ± 0.40 ^{ac}	1.35 ± 0.04 ^{ac}	1.25 ± 0.05 ^a
A'	8.52 ± 0.37 ^c	1.41 ± 0.04 ^c	1.15 ± 0.06 ^c
B	7.93 ± 0.35 ^{bc}	1.50 ± 0.05 ^{bc}	1.02 ± 0.07 ^{bc}
B'	7.06 ± 0.54 ^c	1.62 ± 0.06 ^c	0.82 ± 0.08 ^c
C	4.87 ± 0.69 ^c	1.91 ± 0.06 ^c	0.65 ± 0.10 ^c
C'	4.89 ± 0.62 ^c	1.89 ± 0.07 ^c	0.67 ± 0.09 ^c
D	10.20 ± 0.52	1.21 ± 0.03	1.26 ± 0.04

a: $P < 0.05$,与A'组比较;b: $P < 0.05$,与B'组比较;c: $P < 0.05$,与D组比较

2.3 腓肠肌湿质量

术后12周取腓肠肌后即刻于电子天平称质量,各组检测结果中以A、D组最高,两组间无统计学差异($P > 0.05$)。C及C'组检测结果最差。见表1。

2.4 光镜观察

术后12周移植神经段行HE染色光镜观察,C组及C'组炎症反应最重且空泡变性最为明显,D组炎症反应最轻,镜下见A、D两组神经纤维排列较规则。

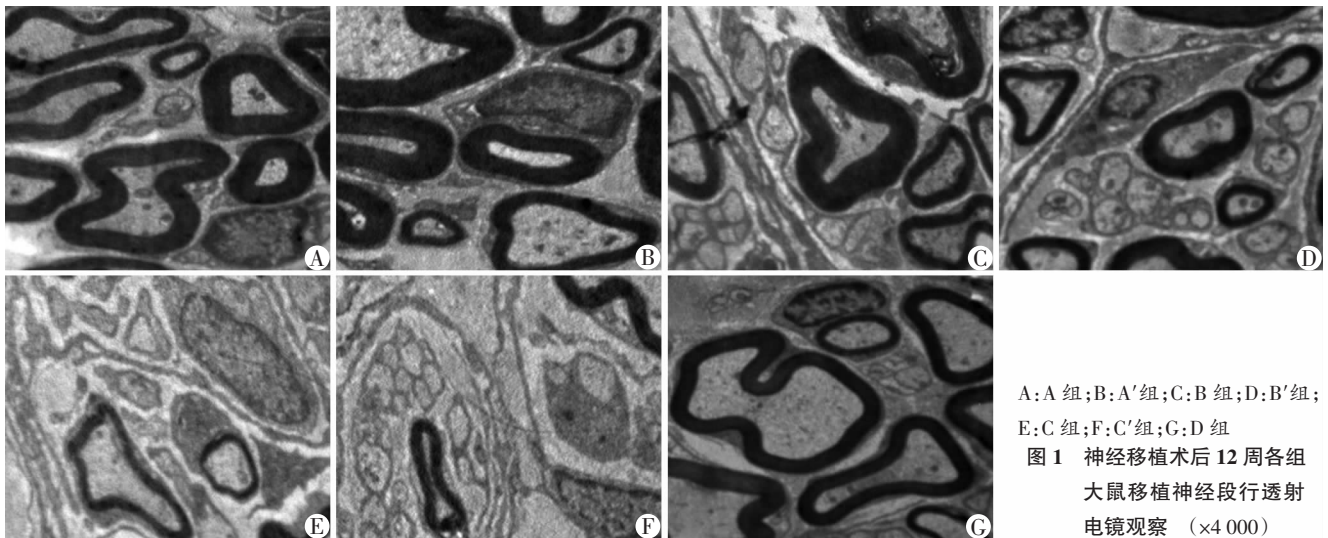
2.5 透射电镜观察

术后12周行透射电镜检测,A、D两组再生的有髓神经纤维较多,并可见少许无髓神经纤维,髓鞘完整,呈同心圆排列,细胞器丰富;B组镜下情况差于A组,C、C'组再生的有髓神经纤维较少,并见结缔组织结构(图1)。

3 讨论

自体神经移植是治疗周围神经损伤的金标准,却有其诸多弊病,如造成相应供区的功能障碍等^[10]。神经套管技术应用于临床已有较长时间,但仅适用于修复较短的神经缺损,且临床效果欠佳^[11]。异体神经因其含有正常神经的三维结构,有可能成为极佳的自体神经替代移植。理想的异体神经移植应有满意的神经修复效果,保存时间较长及保存方便。雪旺细胞(schwanncell, SC)是周围神经系统的神经胶质细胞,并是周围神经主要的细胞成分。雪旺细胞所生成的神经营养因子对周围神经系统的再生至关重要^[12]。现有冷冻保存、酒精处理、甘油处理、化学去细胞等方法用以降低异体神经免疫原性,但处理过程较为繁琐,不适用于临床工作的应用开展。

UW液目前广泛用于组织、器官的保存。在心、肝、肾器官的保存中,UW液是最为常用及首选的保存液并成为保存液中的金标准^[13-14],UW液通过其强大的抗氧化作用减轻移植组织器官的缺血性损伤^[15]。



A: A组; B: A'组; C: B组; D: B'组; E: C组; F: C'组; G: D组
图1 神经移植术后12周各组大鼠移植神经段行透射电镜观察 (×4 000)

缺血性损伤可能在一定程度上与有活性雪旺细胞的减少有关,因其激发一系列反应进而导致雪旺细胞坏死、凋亡^[16]。故本实验选用 UW 液作为神经保存液。

为进一步提高保存神经的活性,我们在保存液中加入 TMP。TMP 对清除氧自由基有极强的作用,其作为中国传统医学药物广泛用于心、脑、肾等疾病的治疗^[3-6],多年来对 TMP 在体内外的代谢、毒性及分布已做了大量的研究。随着研究的进展,在兔和大鼠的动物实验中发现 TMP 能减轻神经元细胞的缺血性或创伤性脑脊髓损伤,并有助于功能恢复^[7-8]。另有研究发现,TMP 在创伤性脊髓的治疗中能降低促炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的表达,上调抗炎因子 IL-10 的表达,并抑制 NF- κ B 活化^[9]。研究发现 TMP 可能通过增加硫氧化蛋白的表达,降低一氧化氮合酶系统的表达,进而对缺血性脑损伤发挥神经保护作用^[17-18]。此外,TMP 还有一定的免疫抑制作用,实验结果显示淋巴细胞 DNA 的合成可被 TMP 所抑制,其机制可能为 TMP 通过对过度活化的 CD4 T 淋巴细胞的直接抑制,从而抑制免疫功能^[19]。

前期研究发现异体神经在 4 °C 条件下经 TMP 预处理后保存 4 周移植,与自体神经移植效果相近^[20]。为进一步延长异体神经保存时间并探讨移植效果,本实验分别保存异体神经 4、6、12 周。实验结果显示 A 组神经电生理及腓肠肌湿质量结果与 E 组相近,B 组结果尚可,但与 A 组相较有统计学差异,C 组与 C' 组效果最差,且两组之间无统计学差异。考虑由于 TMP 具有神经保护作用及免疫抑制作用,一定程度上减轻了免疫排斥反应及雪旺细胞的凋亡,进而促进周围神经再生,但随着保存时间的延长,有活性的雪旺细胞逐渐减少。本实验一定程度上证实了川芎嗪在短期内能促进异体神经再生,但 TMP 的具体作用机制及进一步简便神经保存条件有待进一步探讨。

参考文献:

[1] Battiston B, Geuna S, Ferrero M, *et al.* Nerve repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair[J]. *Microsurgery*, 2005, 25(4): 258-267.

[2] Rustemeyer J, Krajacic A, Dicke U. Histomorphological and functional impacts of postoperative motor training in rats after allograft sciatic nerve transplantation under low-dose FK 506 [J]. *Muscle Nerve*, 2009, 39(4): 480-488.

[3] Ho J W, Jie M. Pharmacological activity of cardiovascular agents from herbal medicine[J]. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2007, 5(4): 273-277.

[4] 陈郡兴, 苏志源, 詹鸿. 川芎嗪对体外循环心脏手术血浆神经元特异性烯醇化酶及术后认知功能障碍作用的初步探讨[J]. *临床医学工程*, 2010, 17(7): 22-24.

[5] 严根福, 王健, 贾玉柱, 等. 川芎嗪对急性脊髓损伤大鼠神经细胞早期凋亡的影响[J]. *浙江中医杂志*, 2012, 47(9): 666-668.

[6] Liao S L, Kao T K, Chen W Y, *et al.* Tetramethylpyrazine reduces ischemic brain injury in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2004, 372(1/2): 40-45.

[7] Kao T K, Ou Y C, Kuo J S, *et al.* Neuroprotection by tetramethylpyrazine against ischemic brain injury in rats[J]. *Neurochem Int*, 2006, 48(3): 166-176.

[8] 周贇, 胡建中, 吕红斌, 等. 川芎嗪对脊髓急性损伤大鼠神经因子表达的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2010, 19(9): 1058-1060.

[9] Fan L, Wang K, Shi Z, *et al.* Tetramethylpyrazine protects spinal cord and reduces inflammation in a rat model of spinal cord ischemia-reperfusion injury[J]. *J Vasc Surg*, 2011, 54(1): 192-200.

[10] Hood B, Levene H B, Levi A D. Transplantation of autologous Schwann cells for the repair of segmental peripheral nerve defects [J]. *Neurosurg Focus*, 2009, 26(2): E4.

[11] Siemionow M, Brzezicki G. Chapter 8: Current techniques and concepts in peripheral nerve repair[J]. *Int Rev Neurobiol*, 2009, 87: 141-172.

[12] Zarbakhsh S, Bakhtiyari M, Faghihi A, *et al.* The effects of schwann and bone marrow stromal stem cells on sciatic nerve injury in rat: a comparison of functional recovery[J]. *Cell J*, 2012, 14(1): 39-46.

[13] Hoeger S, Lueg G, Tsagogiorgas C, *et al.* UW is superior compared with HTK after prolonged preservation of renal grafts [J]. *J Surg Res*, 2011, 170(1): e149-e157.

[14] George T J, Arnaoutakis G J, Baumgartner W A, *et al.* Organ storage with University of Wisconsin solution is associated with improved outcomes after orthotopic heart transplantation[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2011, 30(9): 1033-1043.

[15] Belzer F O, Southard J H. Principle of solid-organ preservation by cold storage[J]. *Transplantation*, 1988, 45(4): 673-676.

[16] Faubel S, Edelstein C L. Caspases as drug targets in ischemic organ injury[J]. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2005, 5(3): 269-287.

[17] Zhu X L, Xiong L Z, Wang Q, *et al.* Therapeutic time window and mechanism of tetramethylpyrazine on transient focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2009, 449(1): 24-27.

[18] Xiao X, Liu Y, Qi C, *et al.* Neuroprotection and enhanced neurogenesis by tetramethylpyrazine in adult rat brain after focal ischemia[J]. *Neurol Res*, 2010, 32(5): 547-555.

[19] 王建杰, 罗文哲, 张涛, 等. 川芎嗪对类风湿性关节炎患者PBMC 免疫球蛋白合成的影响[J]. *黑龙江医药科学*, 2004, 27(4): 15.

[20] 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.

(收稿:2013-04-10;修回:2013-05-10)

(编辑 龙亮)