

· 基础研究 ·

雷公藤甲素在羊膜复合异体神经移植
治疗坐骨神经损伤中的应用*蒙艳斌¹ 贺莉萍² 黄庆红¹ 邝满元¹ 谢应桂¹ 王岐本^{1,3}

摘要 目的:探讨雷公藤甲素对羊膜复合异体神经移植促神经再生和功能恢复的作用。方法:成年 SD 雄性大鼠 30 只,随机分 3 组,切除 10mm 坐骨神经造模,造模后 3 组分别采用自体神经移植、异体神经移植加雷公藤药物、异体神经移植。移植术后第 24 周,观察移植段神经形态学、坐骨神经指数(SFI,术后第 8 周开始)、胫前肌湿重、单位面积移植神经中段轴突数量和髓鞘厚度。结果:移植术后第 24 周自体神经移植组和异体神经移植加雷公藤药物组的坐骨神经指数、单位面积移植神经中段轴突数量和髓鞘厚度、胫前肌湿重各项检测指标无显著差异($P>0.05$),但再生神经形态和功能恢复良好,检测的各项指标明显优于异体神经移植组($P<0.05$)。结论:雷公藤甲素可促进同种异体神经移植神经再生和功能恢复治疗坐骨神经损伤。

关键词 雷公藤甲素;移植;羊膜;周围神经;坐骨神经

中图分类号:R651 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-12-1074-03

The use of triptolide in sciatic nerve deficit bridged by amnion allograft/MENG Yanbin, HE Liping, HUANG Qinghong, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(12):1074—1076

Abstract Objective: To investigate the effect of triptolide on nerve regeneration and function recovery in the allogenic nerve graft bridged by amnion. **Method:** The sciatic nerve deficit model was performed by excising 10mm of the nerve. Thirty adult male SD rats were randomly divided into autologous nerve graft group, experimental group (allogenic nerve graft bridged by amnion and triptolide) and allogeneic nerve graft group, 10 mice in each group. Twenty-four weeks after transplantation, the morphological changes, sciatic nerve function index (SFI), wet weight of bilateral tibialis anterior muscle, the number of transplanted nerve axons in unit area and the thickness of the myelin nerve axons were observed. **Result:** The recovery on morphology and function of regenerative nerve in autologous nerve graft group and experimental group were better than those in allogeneic nerve graft group. Among three groups there were significant differences of SFI, wet weight of bilateral tibialis anterior muscle, the number of transplanted nerve axons in unit area and the thickness of the myelin nerve axons ($P<0.05$). **Conclusion:** Triptolide can promote nerve regeneration and function recovery in the allogenic nerve graft bridged by amnion to treat sciatic nerve deficit.

Author's address Department of Human Anatomy, Xiangnan College, Chenzhou, 423000

Key words triptolide; transplantation; amnion; peripheral nerve; sciatic nerve

周围神经急性损伤多由切割伤、挤压伤引起,如何使受损神经的功能最大程度恢复一直是临床研究的热点。周围神经完全性损伤,特别是神经缺损较长,不能通过适当方法达到无张力直接对端缝合时,应行神经移植术^[1]。本实验旨在研究坐骨神经长段缺损后行同种异体神经复合材料桥接缺损神经,应用雷公藤甲素作为免疫抑制和促神经再生,为临床应用的推广提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

SPF 级雄性大鼠,购自中南大学动物部。健康成年 SD 雄性大鼠 30 只,体重 180—210g,随机分为 3 组,每组 10 只,切除 10mm 坐骨神经造模。造模后第

一组行自体神经移植(自体移植组);第二组行异体神经移植后用羊膜材料桥接缺损,并应用雷公藤甲素 5mg/(kg·d) 5 周(异体移植加药物组);第三组动物行异体神经移植(异体移植组)。6 只 Wistar 鼠提供供体,取双侧坐骨神经。

1.2 桥体制备

①羊膜基质膜管:取妊娠大鼠,麻醉后游离切取羊膜组织。生理盐水反复清洗后制备成 8mm×12mm 小片,卷曲缝合为 10mm 长的膜管。②同种异体神

* 基金项目:湖南省卫生厅科研基金(C2007038)

1 湖南湘南学院解剖教研室,郴州,423000

2 湖南湘南学院流行病与卫生统计学教研室

3 通讯作者

作者简介:蒙艳斌,男,副教授

收稿日期:2009-03-03

经: 成年 Wistar 雄性大鼠, 用 2% 戊巴比妥钠麻醉 (0.002ml/g) 腹腔注射麻醉动物, 在鼠股后外侧区行纵形切口, 自股二头肌与半腱肌、半膜肌间钝性分离, 以缝吊法牵开臀大肌充分暴露坐骨神经, 切除 10mm。

1.3 动物模型

用 1% 戊巴比妥钠麻醉 (60mg/kg)。手术显微镜 (上海医用仪器厂) 下暴露、游离坐骨神经, 梨状肌下缘 5mm 处切除神经 10mm。自体移植组选用相应粗细的自体神经、异体移植组选用相应粗细的异体神经 10mm 原位桥接, 用 10—0 尼龙线缝合神经外膜 2—3 针。异体移植加药物组取异体新鲜坐骨神经 10—0 显微缝合线缝合, 每端 2 针, 羊膜基质膜管卷曲缝合包裹桥体, 术后雷公藤甲素 5mg/(kg·d) 5 周灌胃; 自体移植组、异体移植组给予生理盐水空白对照。手术区放适量青霉素粉, 分层缝合肌肉、皮肤。术后 24 周处死动物。

1.4 观察指标

1.4.1 一般观察: 步态变化、溃疡发生及愈合时间、肌肉萎缩与恢复时间、肢体感觉及自主运动恢复情况。

1.4.2 坐骨神经指数: 坐骨神经功能指数 (sciatic nerve functional index, SFI) 依据 Bain 方法改良制作大鼠足印行走通道, 长度为 1.5m。箱底铺设等长、等宽的白色记录纸带。测定前应用墨汁对大鼠后足进行标记, 让其在箱内行走, 记录清晰大鼠双侧后足足印 7—8 个。健侧为正常足印 (N), 手术侧为实验侧足印 (E)。根据纸带结果测定以下三个变量: ①足印长度 (print length factor, PLF): 足印的最长距离。②足印宽度 (toe spread factor, TSF): 第 1—5 趾连线的距离。③中间足趾宽度的距离 (intermediary toes dread factor, ITF): 第 2—4 趾宽度连线的距离。将各数据带入 Bain 公式计算各组大鼠的 SFI。

$$SFI = -38.3[(EPL - NPI)/NPI] + 109.5 + [(ETS - N1s)/N1s] + 13.3[(EIT - NIT)/NIT] - 8.8$$

1.4.3 形态学观察: 半薄切片 4% 多聚甲醛常规灌注后取桥体中间段和缺损远段神经各 5 mm, 2.5% 戊二醛、4% 锇酸后固定, 梯度丙酮脱水, Epon 812 包埋, 做横断面半薄切片, 1% 甲苯胺蓝染色 30s, DPX 封片。每例标本随机选 3 张切片, 每张切片随机取 3—5 个视野, 采用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图像分析系统 (同济医科大学千屏影像工程公司) 计数再生有髓纤维数目和髓鞘厚度, 取平均值。

1.4.4 胫前肌湿重: 术后第 24 周动物双侧胫前肌, 去除结缔组织, 滤纸吸干表面水分, 万分之一精度电

子天平称重, 双侧胫前肌恢复率以术侧胫前肌湿重/正常对照侧胫前肌湿重 $\times 100\%$ 来表示。

1.4.5 轴突计数: 光镜切片, 放大 400 倍下应用 MPLAS-500 彩色多媒体病理图文分析系统, 计数 10mm 横断面轴突数。

1.5 统计学分析

所有数据使用 SPSS13.0 进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 方差齐性检验和正态分布评估后进行方差分析, 确定各组在终点时的差异。用最小显著差异法 (LSD) 检验对各组间的参数进行两两比较, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 一般观察

术后术侧足趾屈曲、拖行。第 5—6 天伤口愈合。溃疡出现情况: 自体移植组 3 只; 异体移植加药物组 1 只; 异体移植组 4 只, 并有部分动物自残术侧足趾; 第 8—9 周溃疡逐渐愈合, 异体移植加药物组愈合最快, 自体移植组其次; 术后第 16 周各组术侧腓肠肌肌肉萎缩恢复不明显, 但跛行程度减轻; 第 24 周时 3 组动物步态及运动功能进一步恢复, 自体移植组、异体移植加药物组术侧肌肉萎缩恢复明显, 异体移植组萎缩肌肉略有恢复。在各时间点针刺桥接物远段神经干时, 自体移植组、异体移植加药物组动物出现敏感的痛觉反应, 并有明显的后肢肌肉收缩, 异体移植组出现轻微的痛觉反应及后肢收缩。

2.2 坐骨神经指数

SFI 值于损伤时显著下降; 术后第 2 周, 各组间 SFI 值无显著性差异 ($P>0.05$)。术后第 4—24 周, 自体移植组、异体移植加药物组动物坐骨神经功能均得到恢复, 两组之间无显著性差异; 但各时间点两组均显著优于异体移植组 ($P<0.05$), 见表 1。

表 1 不同时间点 SFI 测定结果 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

时间点	自体移植组	异体移植加药物组	异体移植组
第 8 周	-63.48 $\pm$ 4.36 ^①	-66.94 $\pm$ 3.96 ^①	-79.85 $\pm$ 4.40 ^②
第 12 周	-40.83 $\pm$ 3.45 ^①	-42.99 $\pm$ 4.80 ^①	-54.74 $\pm$ 2.25 ^②
第 16 周	-30.21 $\pm$ 2.80 ^①	-31.24 $\pm$ 2.53 ^①	-46.84 $\pm$ 3.09 ^②
第 24 周	-20.60 $\pm$ 2.25 ^①	-20.77 $\pm$ 2.19 ^①	-35.34 $\pm$ 3.81 ^②

①与异体移植组比较 $P<0.01$; ②与自体移植组比较 $P<0.01$

2.3 形态学

半薄切片组织形态学观察自体移植组、异体移植加药物组桥体及坐骨神经远段术后第 24 周光镜下可见再生有髓神经纤维数目较多、粗大、髓鞘厚, 束状生长, 典型微束内有数至数十条纤维, 束间结缔组织少, 微束界限明确, 束膜较薄, 有较多微血管 (图

1a,1b,见彩色插页);异体移植组有散在的再生单位,再生有髓神经纤维细小、稀疏、髓鞘薄,微束内再生有髓神经纤维数目较少,有少量微血管形成(图1c,见彩色插页)。各组单位面积移植神经中段轴突计数分析和髓鞘厚度测量,自体移植组与异体移植加药物组相比差异无显著性($P>0.05$),但两组与异体移植组相比有显著性差异,见表2。

2.4 胫前肌湿重

见表3。自体移植组与异体移植加药物组比较差异无显著性($P>0.05$),与异体移植组比较差异均有显著性($P<0.05$)。

表2 术后第24周移植神经中段轴突计数和髓鞘厚度分析结果 (n=10, $\bar{x}\pm s$)

	自体移植组	异体移植加药物组	异体移植组
轴突数目	63.00±3.92 ^①	60.10±4.65 ^①	34.70±3.97 ^②
髓鞘厚度(μm)	1.27±0.15 ^①	1.32±0.17 ^①	1.05±0.11 ^②

①与异体移植组比较 $P<0.01$;②与自体移植组比较 $P<0.01$

表3 术后第24周胫前肌恢复率的比较 (n=10, $\bar{x}\pm s$)

	自体移植组	异体移植加药物组	异体移植组
对侧肌重(g)	0.99±0.08	0.99±0.06	0.98±0.07
手术侧肌重(g)	0.77±0.07 ^①	0.75±0.08 ^①	0.67±0.11 ^②
胫前肌恢复率(%)	78.04±4.24 ^①	75.47±6.35 ^①	67.10±9.29 ^②

①与异体移植组比较 $P<0.01$;②与自体移植组比较 $P<0.01$

3 讨论

神经断裂后,断裂处远、近端神经纤维均将出现 Waller 变性。远端轴索及髓鞘伤后数小时即出现组织结构改变,数天后崩解为小段碎片,5—6d后,大量吞噬细胞浸润,清除碎裂溶解的轴索与髓鞘。在神经再生过程中雪旺细胞和基底膜结构至关重要。自体神经具有雪旺细胞和基底膜结构,雪旺细胞能清除再生中的坏死碎片,分泌多种活性物质诱导、刺激和调控轴突再生及髓鞘形成,基底膜结构则为轴突芽生提供附着处,从而促进神经再生。神经移植作为较理想的修复方法,多采用生物性材料,如静脉、人工合成的生物多聚体如聚羟基乙酸(polyglycolic acid,PGA)管、聚乳酸(polylactic acid,PLA)管、共聚物[poly(lactide-co-glycolide),PLGA]、壳聚糖和其合成物及衍生物用来建造神经导管修复周围神经缺损^[2-4],存在误向支配以及免疫排斥等诸多问题。Mligiliche等^[5]用羊膜基质导管修复小鼠10mm的神经缺损,发现可促进神经再生,同时还可以防止瘢痕粘连。本实验中异体移植加药物组动物坐骨神经桥段与周围组织只有轻微的粘连,能很好的血管化,说明羊膜基质膜的应用确实防止了局部的瘢痕粘连。羊膜是母体与胎儿间的一层生物膜,具有免疫赦免特性^[6-8],经过处理的人羊膜由细胞外基质、LN, FN,

IV型胶原、硫酸乙酰肝素、蛋白多糖及其他一些大分子构成,与周围神经雪旺细胞基底膜成分类似,具有很好的生物相容性,可被机体完全吸收,其产生的多种生物活性物质提供周围神经轴索再生接触引导,对神经再生有较好的促进作用。

雷公藤(Tripterygium wilfordii Hook f., TWHF)属卫矛科雷公藤属植物,作为中药已有悠久的历史。雷公藤甲素(triptolide)是其环氧化二萜类成分,是雷公藤的主要有效成分之一,作为免疫抑制剂和抗炎药物在临床上用于治疗类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等^[9]。中药雷公藤制剂可延长异体心肌和肾的存活期^[10-11]。在肾移植的临床应用中,雷公藤对移植肾功能的恢复较硫唑嘌呤快,雷公藤作为免疫抑制剂作用不亚于硫唑嘌呤^[12]。雷公藤价格便宜、毒性反应较环孢素A(Cyclosporin A)轻,感染发生率低,提高了肾移植的存活率^[13]。本实验结果表明,异体羊膜复合桥接长段神经缺损后,用雷公藤甲素为免疫抑制剂,使再生神经纤维的形态结构、功能学指标都优于异体神经移植。本实验运用羊膜材料复合异体神经桥接长段周围神经缺损,有利于损伤神经的再生与功能恢复。

参考文献

- [1] 于昆伦,田德虎.周围神经急性损伤的治理与康复[J].中国康复医学杂志,2008,23(11):1051—1053.
- [2] Wang X, Hu W, Cao Y, et al. Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft[J]. Brain, 2005, 128(Pt 8):1897—910.
- [3] 刘晓富,郑林丰,谢乐斯,等. PLGA 导管修复大鼠坐骨神经缺损的实验研究[J].第三军医大学学报,2008,30(15):1462—1465.
- [4] 焦海山,姚健,任艳玲,等. 甲壳素神经导管修复大鼠坐骨神经10mm缺损的实验研究[J]. 中国生物医学工程学报,2008,27(4):597—602,620.
- [5] Mligiliche N, Endo K, Okamoto K, et al. Extracellular matrix of human amnion manufactured into tubes as conduits for peripheral nerve regeneration [J]. J Biomed Mater Res, 2002, 63 (5):591—600.
- [6] Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, et al. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42 (7): 1539—1546.
- [7] Mohammad J, Shenaq J, Rabinovsky E, et al. Modulation of peripheral nerve regeneration: a tissue-engineering approach. The role of amnion tube nerve conduit across a 12centimeter nerve gap [J]. Plast Reconstr Surg, 2000, 105(2):660—666.
- [8] Khokhar S, Natung T, Sony P, et al. Amniotic membrane transplantation in refractory neurotrophic corneal ulcers: a randomized, controlled clinical trial[J]. Cornea, 2005, 24(6):654—660.
- [9] Choi YJ, Kim TG, Kim YH, et al. Immunosuppressant PG490 (triptolide) induces apoptosis through the activation of caspase-3 and down-regulation of XIAP in U937 cells [J]. Biochem Pharmacol, 2003, 66(2):273—280.
- [10] 高江平,李炎唐,刘成贵,等. 雷公藤多甙对异位心肌移植小鼠T淋巴细胞亚群的影响[J]. 中华器官移植杂志,1992,13 (1): 26.
- [11] 高江平,李炎唐,李求是,等. 雷公藤多甙对心肌移植小鼠白细胞介素2受体表达的影响[J]. 中华器官移植杂志,1993,14 (1):21.