·基础研究·

神经轴突延长模型的建立

程飚 Douglas H. Smith 陈峥嵘

【摘要】 目的 建立体外延长人类神经轴突的方法，寻找合适的支持周围神经移植的基质材料。方法 将人胚背根神经节(dorsal root gangim，DRG)神经元细胞种在胶原膜支架上，用自制的神经轴突延长装置对其延长至 10 cm 以上。观察神经元细胞及轴突的生长情况，测定轴突延长后轴膜的渗透性。结果 人胚神经元细胞经过延长后可保持其正常形态及维持轴膜的功能。结论 该模型的建立为研究延长神经轴突构建人工神经提供了依据。

【关键词】 神经元； 细胞，培养的； 模型，神经学； 组织工程

Setup of model of the axonal elongation *CHENG Biao* *, *Douglas H. Smith*, *CHEN Zeng-rong*. * *Department of Orthopaedic*, *Zhongshan Hospital*, *Fudan University*, *Shanghai* 200032, China

【**Abstract**】 **Objective** To establish a method of elongation of human nerve axon in vitro and find suitable support matrices for transplantation of peripheral nerve. **Methods** The human embryo dorsal root gangion (DRG) cells were cultured when they were seeded on collagen membrane scaffolds, then elongated to a length longer than 10 cm with a neuro-axon extending device. The growth of the DRG cells and the axonal growth was observed. The permeability of the axolemma was checked after stretch were made. **Results** After the human embryo DRG cells were elongated, the normal morphology of neuron and function of axolemma were maintained. **Conclusion** Our model can provide a basis for further study of fabricating arficial nerve with elongated nerve axon.

【**Key words**】 Neurons； Cells, cultured； Models, neurological； Tissue engineering

以往对修复神经缺损的研究，主要是促进、引导周围神经的再生。通常是将一段神经或神经引导管移植于神经两断端间，诱导神经轴突从损伤端再生后进入靶器官。但是人的神经组织已发育成熟，机体会产生一些物质来阻止轴突的生长，临床上用上述方法修复各种类型的神经缺损疗效不一。我们设计本实验，试图用人胚背根神经节细胞在胶原膜上培养并延长其轴突，形成有功能的轴突束以替代毁损的的神经段修复周围神经缺损。

材料与方法

一、人胚背根神经节细胞的取材

流产死亡胎儿，以 3 个月内为限。用质量分数为 70% 的乙醇消毒，在超净台上把胚胎移出后放在平衡盐溶液中。在胚胎头部和第一颈椎处离断，用显微器械离断脊椎的尾侧部分，去掉内脏及四肢，暴露出整个脊柱，解剖出整个脊髓，将背根神经节从脊髓上分离后置于平衡盐溶液中。再以 1 000 r/min 的转速离心 3 min，用质量浓度为 0.25% 的胰蛋白酶重悬，在摇床上抚育 1 h。用质量浓度为 20% 的 FBS 中止消化，1 000 r/min 的转速离心 5 min。

重悬于 2 ml 的培养液中，用吸管吹打。计数细胞。

二、种植背根神经节细胞

准备细胞外基质(胶原或多聚赖氨酸 + 成粘蛋白)。胶原，鼠尾胶，多聚赖氨酸 + 成粘蛋白。

在自制的延长装置里重叠放置 2 张胶原膜，当中放硅胶隔离器 10 mm 后，用质量浓度为 10 μg/ml 的多聚赖氨酸(poly-lysine，PLL)在培养箱中孵育过夜。吸尽 PLL 干燥 1 h，将成粘蛋白在冰中溶解。冲洗培养皿 3 次，在冰中准备浓度为 5 μg/L 的成粘蛋白溶液，用最少的成粘蛋白溶液衬底，在 37℃温箱中孵育 1 h，冲洗培养皿 2 次后，加培养液后放在培养箱中备用。

接种消化好背根神经节细胞 2 d 后换液，添加有丝分裂抑制剂，同时取走硅胶制的隔离器，3 d 换掉有丝分裂抑制剂，每隔 2 d 换液。

三、周围神经轴突延长

用上述人胚的背根神经节的神经元细胞种植在两层膜上(图 1)，待 2 张膜上的 DRG 细胞发出的轴突束在 10 mm 间隙处生长、互相重叠后，用微型马达分别以下列速度即 1 cm/24 h，2 cm/24 h，4 cm/24 h 作缓慢匀速牵引，使这两层膜逐渐分开，共持续牵引 5 d。

四、形态学观察

光镜观察：每日在相差显微镜下观察轴突延长后

基金项目：上海市科学技术发展基金资助项目(014019028)；国家 863 启动金资助项目(EXF 000318)

作者单位：200032 上海，复旦大学中山医院骨科(程飚、陈峥嵘)；美国宾西法尼亚大学生物医学工程实验室(Douglas H. Smith)

万方数据

的情况。

免疫组化观察：为观察轴突延长后轴突的细胞骨架和轴浆运输情况，行神经微丝蛋白免疫组化染色。将延长后的样本用质量分数为 4% 的甲醛固定，用 DAKO envision 二步法显色（试剂系 DAKO 公司生产）。

五、轴突延长后轴膜的渗透性观察

用 Alexa 488 酰肼（分子探针）染色，它是一种相对分子质量为 570 000 的膜渗透性荧光染料。因此，细胞内有染料的积累表明轴膜对此分子有通透性。在轴突延长结束后，将浓度为 500 μmol/L 的 Alexa 488 酰肼 200 μl 加入培养液，孵育 2 min 后，用平衡液洗涤。延长轴突用相差显微镜和荧光显微镜观察，同时用未作延长牵引的轴突作阴性对照。

结　果

一、延长后轴突形态学的变化

经过 24 h 的延长，这些神经轴突被拉长了 1 cm。在培养过程中发现，神经元的轴突在牵引拉伸下可以直接平行的生长，形成平行有序的结构聚成神经束（图 2）。

培养的神经元轴突对牵拉断裂的限度，本组结果示在膜上被 2 cm/d 匀速牵拉延长是不会造成轴突断裂的，而且即使将速度增加至 4 cm/d，虽有部分轴突束断裂，仍不会使所有轴突发生断裂。

二、延长后神经微丝蛋白结构的变化

以 1 cm/d 和 2 cm/d 速度延长的轴突，其轴心神经微丝蛋白染色呈阳性，说明这部分轴索的连续性存在（图 3）。

三、轴突延长后轴膜渗透性的变化

在无牵拉损伤或化学渗透时，神经轴突是不会吸收 Alexa 488 酰肼染料的，这说明小分子不能透过轴膜。但是，化学渗透可使未受损伤的轴突吸收 Alexa 488 染料。相反，在以速度为 1 cm/24 h 的牵引下延长神经，没有发现轴突断裂，故并不导致轴突摄取染料。在以速度为 4 cm/d 延长后，发现在被拉断的轴突上有 Alexa 488 染料的摄取。轴突如果没有断裂即使高度牵拉延长也不会使轴突膜对染料发生渗透。

讨　论

随着组织工程技术的迅速发展，应用组织工程方法在体外构建人工神经，修复周围神经缺损，获得了一定的成果[1,2]。对于长段神经缺损及陈旧性周围神经损伤，无论用自体神经移植或各种组织工程的神经引导管移植，效果都不理想。原因是神经轴突的生长能

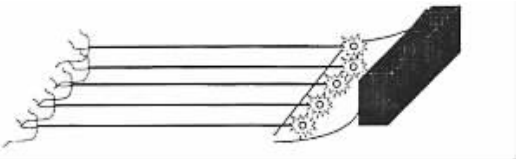


图 1　神经元种植在自制延长装置中的 2 张胶原膜上

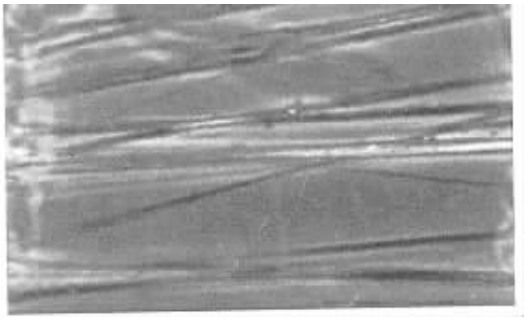


图 2　在牵引拉伸下生长的神经轴突会聚成神经束　相差显微镜　×400

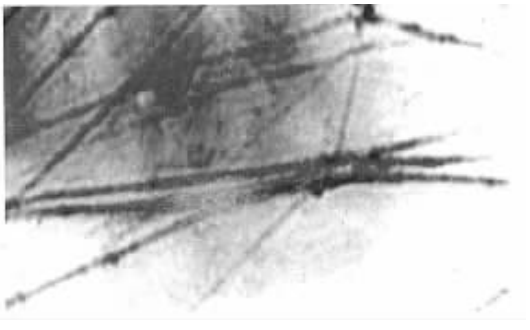


图 3　延长后轴突的轴心神经微丝蛋白染色呈阳性　光镜　×400

力有限，影响了神经移植的效果。我们在用人胚周围神经细胞构建人工神经方面，已经取得了一定的经验[3]。本实验的目的，是在体外分离、培养人背根神经节细胞，并延长神经节细胞的轴突，使其能够满足修复神经缺损长度的需要。此外，由于胶原膜在诱导神经再生的动物实验中已经取得了很好的效果[4]，我们选用胶原膜作为神经轴突延长的附着体，以延长的神经束为基础构建真正有功能的神经。这一模型的建立，为周围神经缺损的研究工作创用了一种新的方法。

延长神经的轴突必需是同向有序，才能形成神经束。人胚背根神经节培养出的轴突是杂乱的微小结构，我们利用轴突具有的趋向性这一特性，来形成平行的神经连接（图 1）。使用硅胶做的间隙来间隔神经元，使其在贴壁过程中，形成在间隙范围内没有神经元存在。在去掉间隙后，培养过程中神经元的轴突可以相互吸引呈平行生长，形成平行有序的结构。

DAKO envision 显色系统是将二抗和酶通过 1 个多聚葡萄糖骨架联结成 1 个多聚体（envision），直接放大信号 40 ~ 50 倍，把传统的二抗、三抗孵育合为 1 次孵

方方数据

育。这就形成了敏感,背景低,避免了内源性生物素的干扰等特点。用此神经微丝蛋白免疫组化技术显示轴突染色阳性的连续性存在,这说明,虽然轴突延长了,但轴浆的运输或神经轴突的细胞骨架则没有断裂,因此延长的神经轴突在结构和功能上是完整的。

本实验结果显示,以 2 cm/d 的速度延长,5 d 后轴突可延长到 10 cm。延长的轴突没有摄取小分子的荧光染料,这说明轴膜对小分子仍然没有通透性,轴膜依然完整。只有当过度牵拉轴突断裂时(4 cm/d)才发现轴突对染料有中度的摄取。这与中枢神经系统的轴突在被扭曲、牵拉后,轴膜渗透性立即发生改变完全不一样[5]。

本实验结果同时证实,在牵引拉伸下生长的神经轴突会聚成神经束(图 2)。这些神经纤维由大量的轴突构成,神经束聚合最终融合形成更大的神经。由于单个的神经元不能传递大量的信息,而如果大股神经束的构建成功的话,必然会成为替代毁损神经间的信号传递。由于在体内,用于培养的胶原膜会很快吸收,我们寄希望于利用神经元的嵌入能力对离断缺损的神经进行修补。当然,要实现用延长的神经轴突来桥接神经缺损的构想,还有相当长的距离,模型的建立仅仅是起步。本轴突延长模型的建立还为研究脊髓轴突的延长,视神经的延长等提供了依据。

参 考 文 献

1 Cheng B, Chen ZR. Fabricating autologous tissue to engineer artificial nerve. Microsurgery, 2002, 22: 133-137.

2 陈峥嵘, 程飚. 雪旺细胞种于医用组织引导再生胶原膜构建自体人工神经的实验研究. 中华手外科杂志, 2001, 17: 176-178.

3 程飚, 陈峥嵘. 修饰后的聚羟基乙酸和聚乳酸共聚物支架与人胚雪旺细胞联合培养的实验研究. 中华手外科杂志, 2002, 18: 119-121.

4 沈遵理, Berger A, Hiemer R, 等. 组织工程化人工神经修复长段神经缺损实验的初步报告. 中华手外科杂志, 2001, 17: 112-115.

5 Povlishock JY, Marmarou A, McIntosh TK, et al. Impact acceleration injury in the rat: evidence for focal axolemmal change and related neurofilament sidearm alteration. J Neuropathol Exp Neurol, 1997, 56: 347-359.

(收稿日期: 2002-10-28) (本文编辑: 郑忆柳)

手部屈肌腱损伤的早期显微外科修复

·临床经验·

杜冬 庄永青 傅小宽 童静 杨怿健

在屈肌腱损伤修复中,保证肌腱表面的光滑是减少术后肌腱粘连,加速屈肌腱功能恢复的因素之一。为提高屈肌腱损伤后的修复质量,1999 年 7 月 ~ 2001 年 7 月,我科应用显微外科技术修复屈肌腱 107 例 379 条,术后早期行主动功能练习并辅助应用 CPM 机作被动功能锻炼,取得了良好的效果。

一、资料与方法

1. 一般资料:本组共 107 例,男 76 例,女 31 例;年龄最大 54 岁,最小 4 岁。伤因:利刃伤 58 例,玻璃割伤 29 例,电锯伤 20 例。损伤部位:Ⅱ区 24 例,Ⅲ区 12 例,Ⅳ区 22 例,Ⅴ区 49 例。其中桡、尺侧腕屈肌腱 66 条;拇长屈肌腱 39 条;示中环小指指浅屈肌腱 172 条、指深屈肌腱 102 条,共计 379 条。

2. 手术方法:彻底清创后,于切口中分别暴露损伤肌腱的远近两断端,牵出固定。应用显微外科无创操作技术,在手术显微镜下用 5-0 进口普里宁缝线,将肌腱两断端作 Kessler 法缝合,结打在断端之间,然后用 7-0 无损伤线作周边连续内翻缝合,使肌腱表面光滑整齐。肌腱修复后用透明质酸钠涂于组织床面,防止肌腱粘连。术毕,用大角针及 10 号线将橡皮筋固定在指甲远端,另一端用别针固定到前臂远端掌侧的敷料上,张力维持在手处于休息位,石膏托外固定于腕背侧,患手处于略屈腕伸指位。术后 48 h 开始作被动屈指、主动伸指锻炼。术后第 1 周每日 3 次,每次 5 min。术后第 2 ~ 3 周,每日 6 次,每次 10 min;并每日辅加 1 次 CPM 机被动锻炼 30 min。术后 3 周去石膏及胶皮条,主动练习患指功能。

3. 结果:按美国手外科学会提出的测量主动活动度 TAM 法进行评价:优 ≥ 220°,良 200 ~ 220°,可 ≥ 180°,差 < 180°。本组术后随访 9 个月 ~ 2 年,379 条肌腱的功能:优 314 条占 82.85%;良 36 条占 9.50%;可 20 条占 5.28%;差 9 条占 2.37%,经二次手术作肌腱松解后功能恢复到良。

二、讨论

本组均选用 5-0 进口普里宁缝线缝合肌腱,不但有足够的牢度,而且组织反应小,既保证了肌腱缝合口的光滑,又可减少组织的创伤性炎症反应,最大限度地预防了腱旁粘连的发生。缝合方法均用 Kessler 法,肌腱固定牢固,表面光滑、无粗糙面,为肌腱的滑动提供良好的形态学基础。

为减少肌腱断端的张力,术后用腕背侧石膏托外固定。术后 48 h 开始在医生指导下被动屈指,主动伸指锻炼,当伸肌腱主动收缩时,胶皮条伸屈装置可使拮抗肌松弛,使屈肌腱保持在一定范围内滑动。术后 1 周开始辅助 CPM 机被动功能锻炼,术后 3 周进行正常的主动功能锻炼。术后 5 ~ 8 周作轻柔的阻滞练习,可将近侧指间关节局限在伸直位,屈肌的力量集中在远侧指间关节。以后将阻滞练习逐步加强,直至恢复功能,但在术后 10 周前患指不能做重力工作。

作者单位:518020 广东,深圳市人民医院、暨南大学医学院附属二院显微手外科

(收稿日期: 2002-11-04) (本文编辑: 郑忆柳)

万方数据