

· 综述 ·

周围神经损伤的修复和治疗进展

武继祥 吴宗耀

周围神经损伤在临床上极为常见。尽管周围神经修复技术已有了长足的进步,如精细的显微外科技术、术中采用组织化学或免疫组化进行运动和感觉功能束定位等,但即使是新鲜、清洁的周围神经断裂伤,及时采用先进的显微外科技术进行修复,通常也不可能获得完全再生,功能也往往不能完全恢复;而长时间的感觉或运动的缺失将引起肌肉萎缩、关节挛缩畸形等^[1]。因此,如何促进周围神经损伤的再生,最大限度地恢复其功能,一直是神经修复的基础和临床研究的热点。

周围神经损伤后的再生机制

周围神经纤维外包结缔组织。从外到内分为神经内膜、神经束膜和神经外膜。神经损伤后,神经元胞体肿胀,尼氏体消失,细胞核偏移,突触终端减少;远端轴突和髓鞘因瓦氏(Waller)变性而崩解,但雪旺氏细胞(Schwann cells, SCs)却很少坏死,相反地呈肥大增殖,形成Bungner带,当Bungner带形成后,远端轴突开始以1~4 mm/d的速度逆行性生长。同时,神经元胞体逐渐产生轴突反应,由胞体合成蛋白质和轴突生长所需的物质,通过轴突运输到达断端的回缩球,在回缩球的表面长出许多再生的轴突支芽(生长锥),称之为终末再生(terminal regeneration)。轴突支芽有许多分支,其末端膨大处称为丝足(filopodia)。当丝足遇到Bungner带时,则伸入带的中央,为SCs所包裹,从而走上由引导的再生道路,此后轴突再生相当迅速,一般以2~4 mm/d的速度向靶器官生长。在神经轴突的再生过程中,SCs分泌多种神经营养因子和细胞外基质,参与构成周围神经再生微环境,影响神经的再生。神经损伤中的这些病理变化已有许多报道,但神经损伤后修复的机制和影响因素仍不清楚^[2,3]。

神经修复

一、外科修复

本世纪50年代,显微外科手术开始运用到神经损伤的修复。神经修复的显微外科手术包括:①神经松解术-神经松解术-外膜松解术,束间松解术和束膜切开术;②神经缝合术-神经缝合术-外膜缝合术,束间缝合术,外膜束膜联合缝合术;③神经移植术-神经移植术-束间移植术(游离自体神经和带血管蒂的自体神经),神经移位术,神经置入骨骼肌术等^[1,4]。但由于周围神经结构十分复杂,即使辅以神经束定位图、神经电刺激、胆碱酯酶组化染色及神经束的定位染色等手段,也很难达到神经束完全准确的对位,导致轴突错长及误向支配,达不到令人满意的生理功能要求。因此修复时如何做到准确的神经功能束对位,仍是神经修复面临的一个很大难题^[5]。

粘合剂也是一种较常用的神经修复方法。由于粘合剂吻合

神经应在无张力情况下,故通常不易单独使用,常用方法包括断端间滴注法(用于较细的周围神经的修复)、硅胶管内粘合法、缝线缝合+粘合剂封闭法^[6]。 α -氰基丙烯酸酯作为一种医用组织粘合剂,有促进组织修复和止血、止痛、抗感染等作用,在几丁质修复神经缺损的实验中获得良好效果,神经再生成功率优于缝合法^[7]。但也有文献报道粘合剂修复神经的再生效果并不比手术缝线好,而且愈合强度较差。

对于小的神经缺损可以利用神经本身具有一定弹性和曲度的特性,在保证无张力缝合条件下,通过适当牵引和游离来延长神经,弥补神经缺失。当神经缺损超过一定距离,很难达到无张力缝合时,必须进行神经移植。

神经移植包括自体移植、异体移植、异种移植。目前临床应用较多的是自体神经移植,并作为其它修复方法的金标准。然而,对于粗大的、长段的外周神经缺损,存在自体神经移植体的来源困难,且有供区瘢痕、神经瘤形成、运动感觉障碍、误向支配等问题,无法满足临床需要。异体神经、异种神经移植修复周围神经缺损已有许多文献报道,但需要解决宿主排斥移植体的问题。由于免疫排斥反应,移植神经结构被破坏,基底膜管塌陷并纤维化,再生轴突无法通过,常导致移植失败。至于神经移植体中何种成份抗原性高,是引起免疫排斥反应的主要因素,目前尚存在争议。大多数学者认为神经移植体的抗原性主要在于活性SCs,因其具有较强的抗原递呈作用,可通过产生TNF- α 、IL-1、IL-12、INF- γ 等细胞因子,激发免疫排斥反应^[8]。为此许多研究者尝试用多种措施来降低供体神经的抗原性,如冷冻、冻干、放疗、预溃变、乙醇浸泡、胚胎神经移植以及对宿主使用免疫抑制剂等方法,但目前尚无一种十分理想的方法^[9]。

二、组织工程学建构

组织工程学建构在神经再生桥接物、支持细胞(如SCs)、神经因子和细胞外基质等四个方面对神经再生有着重要影响。由于是利用神经管套连接受损神经促其再生,因此理想的神经引导管必需具有以下特性:易得到、易被生物降解、有利于血管形成、低抗原性、多孔易于氧气的扩散交流和避免长期受压^[10]。

(一)神经再生桥接物

用于支持轴突再生迁移的神经管桥接物,有天然的和人工的两种。天然材料有生物膜、静脉、动脉、神经外膜管、骨骼肌、小肠衣、透明质酸管、羊膜等。单纯静脉桥接体容易塌陷,尤其是桥接较长的缺损时,且缺乏促神经再生的活性因子,效果并不理想。进而出现了一些复合静脉桥接体,如骨骼肌填充入静脉管道中形成肌肉-静脉复合体,通过静脉提供神经再生的管道,骨骼肌防止静脉管道塌陷和促进轴突再生,此外在静脉桥接体内注入轴索促进因子,轴突再生速度也明显增加^[11,12]。骨骼肌桥接体为肌基膜管,管的内表面覆盖有基底膜。这些类似神经膜管样的空泡管和基底膜结构,不仅可为再生神经纤维提供定向的、低阻力的通道,其基底膜成分层粘连蛋白(laminin, LN)和纤维粘连蛋白(fibronectin, FN)还能对再生轴突起接触性引

导作用,引导轴突再生。但对于较长段的缺损,由于骨骼肌桥接体的皱缩、塌陷及瘢痕形成,效果仍无法令人满意^[13]。另有文献报道用胎盘膜作神经再生桥接物,取得较好效果,胎盘膜具有排异性小、可吸收、含有 I、IV 型胶原等特点,并能制成各种规格储存备用,应用十分方便^[14]。

合成材料分为不吸收材料和可降解材料两大类。前者包括硅胶管、碳纤维管、聚酯纤维等。硅胶管由于具有取材方便、不塌陷的优点,一度成为研究热点。但其术后会产生致命的神经卡压现象及炎性刺激,另外需要再次手术取出,所以并不适合临床应用。可降解材料包括聚乙二醇酸、聚乳酸 (polyactic acid, PLA)、聚左旋乳酸-聚乙酸内酯等^[15]。这些人工合成材料生理惰性好、无抗原性、对人体组织无刺激、无致癌作用,植入人体内异物反应小、桥接神经纤维的管腔不易塌陷、使神经近端再生的轴索可顺利地通过导管、减少瘢痕干扰、跨越缺损长入远端、完成自然修复。聚乙醇酸 (PGA)、PLA 及其共聚物是较为普遍使用的可降解材料,运用这些材料制备导管进行动物实验及临床实验的报导很多^[16]。而 PLLA 相对其他聚合物来说有更稳定的几何结构和强度,富于弹性,制成的神经导引管无毒性,易于皮下生物降解,且不会因萎缩和狭窄使神经受压迫,成为近年来的研究热点之一^[17]。

最近,壳聚糖 (chitosan)、几丁质、胶原等新型材料也开始用于神经再生的实验研究^[18]。壳聚糖具有良好的生物相容性、低毒性,并可利用其分子中的活性基团易于反应的特点,对其进行化学修饰,制成具有良好神经亲和性和机械性能的神导管,具有良好的应用前景。另外,壳聚糖来源广泛,资源丰富,为以壳聚糖为原料制备人工神经导管的普遍应用提供了极大的方便,因此壳聚糖及其改性产物是一种理想的潜在的人工神经导管材料^[19]。几丁质作为人工室桥接神经损伤能有效阻止瘢痕组织侵入,引导轴突再生,同时为施加外源性神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 提供了有益的空间,并能在一定时间内维持其有效浓度^[20]。几丁糖-胶原复合膜能防止神经瘤形成,避免再生神经与周围组织产生粘连,也成为组织工程学上神经的良好载体,有一定的临床实用价值。此外, Gilchrist 等^[21]探索了使用无机高分子材料-可降解的玻璃作为导管修复羊的面神经缺损,这一方法的一个优势是可降解玻璃能作为释放促进神经生长药物的控释载体。但是,人工合成材料桥接体并不具有理想神经移植体的特点,不能提供有效的接触引导作用,再生轴突生长的距离也有限。

近年来,组织工程的原则和方法日益得到重视,在许多创伤修复和功能恢复的研究中取得了突出的成果。实际上,在上述修复神经缺损的探索中,将细胞、生长因子与导管综合起来就是组织工程方法的典型表现^[12]。这些研究的结果也显示,将组织工程的思想和方法用于修复周围神经缺损有着良好的前景。

(二) 神经因子

可溶性的神经营养因子可以直接结合进神经引导管促进神经再生。神经营养因子可分为 NGF, 脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF), 神经营养素-3 (NT-3) 等。神经细胞分裂素, 如睫状神经营养因子 (CNTF), 白细胞介素-1, 3, 6 (IL-1, 3, 6) 等。成纤维细胞生长因子, 如碱性成纤维细胞生成因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 等。其他因子, 如胶质源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic

factor, GDNF), 胰岛素样生长因子-3 (IGF-3) 等 20 余种^[22]。越来越多的证据显示,许多神经营养因子 (NGF, BDNF, NT3, NT4/5 等) 有直接提高轴突存活率及间接影响神经细胞以及非神经细胞的再生能力^[3]。

神经生长因子是最早被发现,目前唯一被阐明结构的神经细胞生长调节因子,具有如下特点:(1)体内有特异受体;(2)体内外均起作用;(3)制备的抗体能阻断其活性。NGF 兼有神经元营养和促突触生长的双重效应;对中枢和周围神经系统神经元的生长、发育、分化、再生和功能特性的表达均具有重要的调控作用。其作用机制是神经生长因子与受体结合,提供受体介导的内吞机制产生内在化,形成由轴膜包裹、含有 NGF 并保持其生物活性的小泡,经轴突沿微管逆行到胞体,经第二信使体系的转导,启动一系列连动反应,对靶细胞的基因表达进行调控而发挥其生物效应^[3]。动物实验证明,周围神经损伤后,神经近断端局部应用 NGF,可防止感觉神经元的死亡。周围神经再生室应用 NGF,可加快感觉神经纤维的再生速度,提示外源性 NGF 作为靶源性神经营养因子对交感和感觉神经元生长发育、分化、存活和功能特异性表达有重要的调控作用^[23]。目前 NGF 已人工合成,并进入临床试验阶段。CNTF 已被证明能支持多种体外培养神经元的存活,也能阻止神经元的退行性变,可在周围神经的 SCs 中表达,有促进周围神经特别是运动神经损伤的再生和对胶质细胞的保护作用;GDNF 对多巴胺能神经元、运动神经元、感觉神经元和交感神经元都有营养作用,能促进多种周围神经元的存活,对不同发育时期的神经元都有调节作用。但神经生长因子作用的分子机制还有许多细节未阐明,有待进一步研究。

(三) 支持细胞

在正常神经中,支持细胞胞核中有丰富的异染色质,胞质中的电子密度较高,似乎静止不动。神经损伤时,神经远端的支持细胞会伴随轴突再生发生较大变化。它提供轴突迁移的高结合性底物并分泌生物活性因子以增强神经的再生迁移,如支持细胞合成和分泌多种细胞外基质分子如层粘连蛋白和胶原,许多其他粘连分子及其受体,包括 N-钙粘连素、整合素及神经细胞粘连分子等;支持细胞也能合成与分泌许多神经营养因子,如 NGF、BDNF、CNTF、NT3、NT4/5 等^[24]。

在支持细胞中,SCs 和嗅被膜细胞 (olfactory ensheathing cell, OECs) 是较重要的神经胶质细胞。SCs 所分泌的一系列神经营养因子及其与再生时的诸多因素相联系的作用均支持神经再生^[25,26]。来自嗅基板的 OECs 也能促进轴突再生和髓鞘形成^[27,28]。在对大鼠坐骨神经损伤的研究中,OECs 能明显减少相应脊髓前角运动神经元的退行性变。总之,支持细胞通过释放生物活性分子与提供轴突移行生长时的支持在周围神经损伤的再生中起着不可替代的作用。

(四) 细胞外基质

不可溶的细胞外基质分子包括胶原、层粘连蛋白、纤维结合素等,它们通过分子间的粘连或类似过程结合于天然生物活性管道,促进轴突的生长^[24]。研究表明,由 Engelbrath Holm Swarm 瘤细胞株分泌的胞外基质凝胶与 SCs 混合后置入 PLA 可渗透到神经导引管中,使多数细胞存活并使背根神经节内 83.5% 的神经元受到保护而免于死亡。它在低温下为液态,易将 SCs 植入其中,加温到 37℃ 则自然形成凝胶,SCs 能移动但又

不会向外流出^[29]。体内三维神经通路在细胞外基质凝胶层的交替叠合下更易形成,满足了神经的三个再生趋化性即组织特异性、功能束特异性和终器特异性^[12]。

以上四个部分在组织工程学建构上起着缺一不可的作用,它们必须组合成良好的复合型材料才能更好地支持神经再生。

三、基因治疗

在周围神经损伤的治疗手段中,基因治疗随着基因工程的研究进展得到了广泛的重视。周围神经损伤基因治疗的作用包括对中枢神经元起保护作用 and 促进损伤神经的再生。

基因修饰是将有功能的目的基因导入原发病灶的细胞,或导入其他类型的相关细胞,使目的基因的产物大量表达,以达到治疗目的。具体实施策略包括:目的基因的选择、载体的选择、基因转染方法的选择及靶细胞基因位点的选择。目前较常用的目的基因包括 NGF、CNTF、BDNF 等神经营养因子基因以及与 SCs 增殖、髓鞘生长有关的因子,如周围磷脂蛋白 PMP22 和 P0 蛋白的基因。较为常用的靶细胞为 SCs、神经元^[30]。表达的载体一般为逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒和单纯疱疹病毒等。基因转染方式包括:①活体直接转移(in vivo):将携带治疗基因的病毒、脂质体甚至裸露 DNA 直接注射到试验个体内。②回体转移(ex vivo):即将受体细胞取出,体外培养并导入治疗基因,然后将这些基因修饰的细胞重新输回受体内^[31]。

总之,在周围神经损伤的治疗中,外科手术、组织工程学和基因工程学为我们提供了诸多的途径,但要达到神经功能的完全恢复还需要不懈的努力。

参 考 文 献

- Siemionow M, Sari A. A contemporary overview of peripheral nerve research from the Cleveland Clinic microsurgery laboratory. *Neurol Res*, 2004, 26:218-25.
- 蔡文琴,阮怀珍,黎海蒂. 医用神经生物学基础. 重庆:西南师范大学出版社,2001. 46.
- Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*, 2004, 16:E1.
- Myckatyn TM, Mackinnon SE. A review of research endeavors to optimize peripheral nerve reconstruction. *Neurol Res*, 2004, 26:124-38.
- Watchmaker GP, Mackinnon SE. Nerve injury and repair. In: Peimer C. *Surgery of the hand and upper extremity*. New York: McGraw Hill, 1996. 1251-1275.
- 徐林,易斌,俞兴. 外周神经外科进展与前景. *当代医学*, 2001, 7:31-34.
- 蔡萍,刘公汉,华清泉,等. α -氰基丙烯酸脂医用胶在几丁质室修复兔颞骨内面神经缺损中的应用. *中国修复重建外科杂志*, 2002, 16:158-160.
- Gulati AK. Immune response and neurotrophic factor interactions in peripheral nerve transplants. *Acta Haematol*, 1998, 99:171-174.
- Atchabahian A, Mackinnon SE, Hunter DA. Cold preservation of nerve grafts decrease expression of ICAM-1 and class II MHC antigens. *Reconstr Microsurg*, 1999, 15:307-311.
- Belkas JS, Shoichet MS, Midha R. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurol Res*, 2004, 26:151-160.
- Tos P, Battiston B, Geuna S, et al. Tissue specificity in rat peripheral nerve regeneration through combined skeletal muscle and vein conduit grafts. *Microsurgery*, 2000, 20:65-71.
- Rochkind S, Astachov L, el-Ani D, et al. Further development of reconstructive and cell tissue-engineering technology for treatment of complete peripheral nerve injury in rats. *Neurol Res*, 2004, 26:161-166.
- Houstava L, Dubovy P, Haninee P, et al. An alternative preparation of the acellular muscle graft for reconstruction of the injured nerve morphological and morphometric analysis. *Ann Anat*, 1999, 181:275-281.
- Jamal A, Mohammad MD, Patrick H, et al. Increased axonal regeneration through a biodegradable amniotic tube nerve conduit: effect of local delivery and incorporation of nerve growth factor/hyaluronic acid media. *Ann Plastic Surg*, 2000, 44:59-64.
- 于炎冰,张黎. 神经导引管与周围神经再生. *国外医学. 神经病学, 神经外科学分册*, 2000, 27:250-252.
- Stevenson TR, Kadhiresan VA, Faullerr J. Tubular nerve guide and epineurial repair: comparison of techniques for neurotherapy. *J Reconstr Microsurg*, 1994, 10:171-174.
- Evans GRD, Brandt K, Widmer MS, et al. In vivo evaluation of poly(L-Lactic Acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 1999, 20:1109-1115.
- Gingras M, Paradis I, Berthod F. Nerve regeneration in a collagen-chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice. *Biomaterials*, 2003, 24:1653-1661.
- Haipeng G, Yinghui Z, Jianchun L, et al. Studies on nerve cell affinity of Chitosan-derived materials. *J Biomed Mater Res*, 2000, 52:285-288.
- 张森林,孟昭业. 含神经生长因子的几丁质管桥接兔面神经缺损的实验研究. *中国修复重建外科杂志*, 2000, 14:340-342.
- Gilchrist T. In vitro nerve repair-in vivo. The reconstruction of peripheral nerves by entubulation with biodegradable glass tubes-preliminary report. *Br J Plast Surg*, 1998, 51:231-237.
- Seniuk NA. Neurotrophic factors: a role in peripheral neuron survival and axonal repair. *J Reconstr Microsurg*, 1992, 8:399-340.
- Zochodne DW, Cheng C. Neurotrophins and other growth factors in the regenerative milieu of proximal nerve stump tips. *J Anat*, 2002, 196:279-832.
- Evans GR. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat Rec*, 2001, 263:396-404.
- Chernousov MA, Carey DJ. Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. *Histol Histopathol*, 2000, 15:593-601.
- 李强,李民,伍亚民. 雪旺氏细胞促进周围神经再生的分子机制. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26:561-563.
- Cao L, Liu L, Chen ZY, et al. Olfactory ensheathing cells genetically modified to secrete GDNF to promote spinal cord repair. *Brain*, 2004, 127:535-49.
- Williams SK, Franklin RJ, Barnett SC. Response of olfactory ensheathing cells to the degeneration and regeneration of the peripheral olfactory system and the involvement of the neuregulins. *J Comp Neurol*, 2004, 470:50-62.
- 王光林,杨志明,林卫,等. 雪旺细胞复合细胞外基质凝胶移植对神经元逆行性死亡保护作用的研究. *中国修复重建外科杂志*, 2002, 16:147-51.
- Sorensen J, Hase G, Krarup C, et al. Genetransfer to Schwann cells after peripheral nerve injury: a delivery system for therapeutic agents. *Ann Neurol*, 1998, 43:205-211.
- Gravel C, Gotz R, Lorrain A, et al. Adenoviral gene transfer of ciliary neurotrophic factor and brain derived neurotrophic factor leads to long term survival of axotomized motoneurons. *Nat Med*, 1997, 3:765-770.

(修回日期:2005-04-11)

(本文编辑:阮仕衡)