

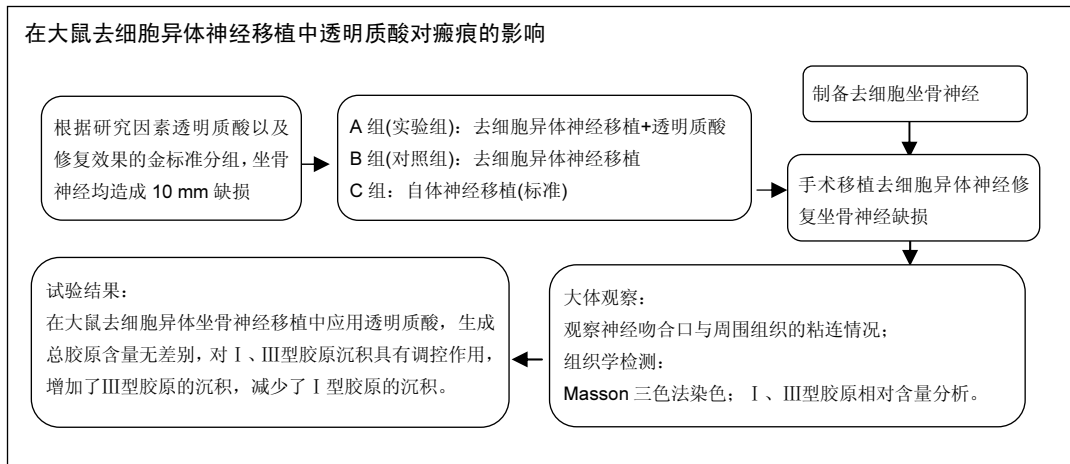
透明质酸在去细胞异体神经移植中对瘢痕的影响

刘英伟, 张万里, 池成涛, 徐青雨, 芦德智(牡丹江医学院附属红旗医院, 黑龙江省牡丹江市 157011)

引用本文: 刘英伟, 张万里, 池成涛, 徐青雨, 芦德智. 透明质酸在去细胞异体神经移植中对瘢痕的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(42):6317-6323.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.42.013 ORCID: 0000-0002-3838-9096(张万里)

文章快速阅读:



刘英伟, 女, 1979 年生, 黑龙江省人, 汉族, 2008 年哈尔滨医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事眼底病研究。

通讯作者: 张万里, 硕士, 主治医师, 牡丹江医学院附属红旗医院, 黑龙江省牡丹江市 157011

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)42-06317-07

稿件接受: 2016-08-05

文题释义:

瘢痕: 神经再生室内复杂的微环境条件会对神经纤维的延伸与重建产生影响, 新生的神经轴突再生速度缓慢且没有穿透能力, 一旦遇到炎性肉芽组织或瘢痕组织等障碍后, 或者造成神经纤维生长扭曲, 或者发生创伤性神经瘤的失败后果。如何防止周围神经损伤局部炎症区的炎性渗出物及纤维结缔组织不长入神经断端, 是防止神经纤维瘤形成的关键。

去细胞异体神经: 在众多的桥接修复神经缺损的替代载体中, 异体神经一直是人们想利用的自体神经移植替代载体, 但免疫排斥反应是导致新鲜异体神经移植失败的主要原因。为了最大限度地去除异体神经免疫原性物质, 同时较完好地保存神经内部结构和细胞外基质的活性成分, 将同种异体神经进行去细胞去抗原处理。在清除神经免疫原性物质的同时, 能够制备出三维网状管状神经结构保存较好的去细胞异体神经。

摘要

背景: 在组织相容性、免疫排斥反应及修复后瘢痕影响程度等方面, 去细胞异体神经移植修复周围神经缺损更接近自体神经。目前, 已经有透明质酸应用于自体周围神经修复的研究, 尚无透明质酸应用于异体神经移植修复周围神经损伤的报道。

目的: 探讨透明质酸在去细胞同种异体神经移植修复大鼠坐骨神经缺损中对吻合口瘢痕形成的影响。

方法: 36 只 SD 大鼠随机分为 3 组, 每组 12 只。3 组大鼠均选取左后肢手术, 手术将坐骨神经锐性切断后造成 10 mm 神经缺损。实验组异体神经移植后在两端吻合口应用透明质酸, 对照组行单纯异体神经移植手术, 自体神经移植组将自体神经切断后远近端倒置吻合。术后观察近端吻合口的愈合情况, 评估近端吻合口的瘢痕成分。

结果与结论: ①大体观察: 大鼠皮肤, 肌肉筋膜愈合组间无差别, 周围组织粘连情况比较, 实验组优于对照组($P < 0.05$); ②Masson 染色: 各组神经外膜均可见胶原沉积, 实验组神经外膜胶原纤维排列整齐有序, 胶原纤维量略少; 对照组大量胶原纤维成堆积状, 排列紊乱; 自体神经移植组神经外膜胶原纤维较多, 胶原纤维排列较整齐, 但胶原纤维较稀疏; ③ I, III型胶原免疫组化灰度值: I 型胶原灰度值实验组高于对照组($P < 0.05$), III型胶原灰度值实验组低于对照组($P < 0.05$), I 型+III型胶原灰度值实验组、对照组及自体神经移植组比较差异无显著性意义($P > 0.05$); ④结果提示, 透明质酸在周围神经损伤修复过程中对 I, III型胶原沉积具有调控作用, 可增加III型胶原沉积, 减少 I 型胶原沉积, 从而减少瘢痕形成。

Liu Ying-Wei, Master,
Attending physician,
Hongqi Hospital Affiliated
to Mudanjiang Medical
University, Mudanjiang
157011, Heilongjiang
Province, China

Corresponding author:
Zhang Wan-li, Master,
Attending physician,
Hongqi Hospital Affiliated
to Mudanjiang Medical
University, Mudanjiang
157011, Heilongjiang
Province, China

关键词:

组织构建; 组织工程; 透明质酸; 坐骨神经缺损; 去细胞异体神经; 瘢痕; I型胶原; III型胶原; 神经移植; 吻合口; 愈合

主题词:

透明质酸; 坐骨神经; 瘢痕; 胶原I型; 胶原III型

基金资助:

牡丹江市科学技术计划项目、攻关类(Z2015s0045)

Effects of hyaluronic acid on scar formation in the acellular nerve allograft

Liu Ying-wei, Zhang Wan-li, Chi Cheng-tao, Xu Qing-yu, Lu De-zhi (Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China)

Abstract

BACKGROUND: In terms of the histocompatibility, immune rejection and scar formation after repair, acellular nerve allograft is closer to autologous nerve cells. At present, hyaluronic acid has been applied for autologous peripheral nerve repair; however, research on the nerve allograft is rarely reported.

OBJECTIVE: To explore the effect of hyaluronic acid on the anastomotic scar in acellular nerve allograft repair of rat sciatic nerve defect.

METHODS: Thirty-six Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups ($n=12$ per group). The rat model of nerve defect of 10 mm was established by cutting the sciatic nerve of the left hind leg and then given nerve allograft combined with the injection of hyaluronic acid at anastomosis (experimental group), only nerve allograft (control group) and autologous nerve graft (nerve autograft group), respectively. Afterwards, the healing of the proximal anastomosis was observed and scar components were assessed.

RESULTS AND CONCLUSION: Gross observations showed that the rat skin and muscle fascia had no significant differences in healing among groups, while the surrounding tissue adhesion in the experimental group was milder than that in the control group ($P < 0.05$). Masson staining found that collagen deposition in the epineurium could be observed in each group. In the experimental group, a small amount of collagen fibers arranged orderly in the epineurium; in the control group numerous collagen fibers accumulated and arranged irregularly; in the nerve autograft group, sparse epineurial collagen fibers appeared in an order arrangement. The gray value of collagen type I in the experimental group was higher than that in the control group ($P < 0.05$), while the gray value of collagen type III was lower than that in the control group ($P < 0.05$). No significant differences were found in the sum gray values of collagen type I and III among groups ($P > 0.05$). These findings indicate that in the peripheral nerve repair, hyaluronic acid abrogates the scar formation by increasing the deposition of collagen type III and reducing the deposition of collagen type I.

Subject headings: Hyaluronic Acid; Sciatic Nerve; Cicatrix; Collagen Type I; Collagen Type III

Funding: the Key Technologies R&D Program of Mudanjiang, No. Z2015s0045

Cite this article: Liu YW, Zhang WL, Chi CT, Xu QY, Lu DZ. Effects of hyaluronic acid on scar formation in the acellular nerve allograft. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(42):6317-6323.

0 引言 Introduction

周围神经损伤的修复是临床上的难题, 目前修复手段依然以自体神经移植为标准手术, 但自体神经来源有限常无法满足较大神经缺损或较广泛神经损伤修复的需要。去细胞异体神经一直是人们想利用的自体神经移植替代材料^[1-9], 虽然能够制备出三维网管状神经结构保存较好的去细胞异体神经。但是神经再生室内复杂的微环境条件会对神经纤维的延伸与重建产生影响, 新生的神经轴突, 一旦遇到炎性肉芽组织或胶原瘢痕组织等障

碍后, 或造成神经修复失败后果^[10]。如何防止周围神经损伤处局部炎症区的炎性渗出物及纤维结缔组织不长入神经断端是关键。因此, 针对神经再生过程中的抑制因素——神经瘢痕的相关研究和预防性治疗很有必要。近年来大量研究报道人工合成透明质酸的特性^[11-15], 并在多领域内应用取得了较好效果。

课题选用高分子量透明质酸作为研究因素, 探讨透明质酸在神经损伤后通过去细胞异体神经移植修复周围神经过程中对瘢痕的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 于2015年5至11月在牡丹江医学院医药研究中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 选用健康成年雄性SD大鼠36只, 体重200-250 g, 由牡丹江医学院实验室提供。实验过程中对动物处置符合动物伦理学要求。

1.3.2 主要实验试剂与仪器设备 医用透明质酸凝胶(15 g/L), 上海其胜生物制剂有限公司; Masson三色染色试剂盒, 福州迈新生物技术开发有限公司; I、III型胶原单克隆抗体, 北京博奥森生物技术有限公司; Sulfobetaine-10, Sulfobetaine-16, Triton X-200, Sigma公司; OLYMPUS显微镜, 日本OLYMPUS公司; 图像分析系统(CIAS-1000型), 北京大恒图像视觉有限公司; 石蜡切片机(RM2135型), 德国LEICA公司。

1.4 实验方法

1.4.1 实验动物与分组 取36只SD大鼠按随机数字表法分为3组, 每组12只。实验组于去细胞异体神经移植吻合口应用透明质酸, 对照组为单纯去细胞异体神经移植, 自体神经移植组采用自体神经移植。

1.4.2 异体神经取材及去细胞异体神经制备

异体神经取材: 取健康成年雄性SD大鼠12只, 双侧坐骨神经作为异体神经移植供体。SD大鼠经10%水合氯醛(1 mL/kg)腹腔注射麻醉, 无菌条件下, 双下肢背侧纵向切口, 于股二头肌和股外侧肌之间钝性分离, 游离坐骨神经, 距梨状肌下缘1 mm处至坐骨神经分叉处将坐骨神经锐性切断约20 mm, 去除神经外膜表面脂肪和结缔组织, 无菌生理盐水冲洗, 放入无菌培养皿中备用。

去细胞异体神经制备: 采用化学优化法制备去细胞异体神经。步骤如下: ①蒸馏水浸浴7 h; ②放入含125 mmol/L Sulfobetaine-10的PBS(磷酸盐10 mmol/L和钠50 mmol/L)中, 摇动15 h; ③用PBS(磷酸盐50 mmol/L和钠100 mmol/L)冲洗15 min 1次; ④放入含0.6 mmol/L Sulfobetaine-16, 0.14% Triton X-200 PBS(磷酸盐10 mmol/L和钠50 mmol/L), 摇动24 h; ⑤用PBS(磷酸盐50 mmol/L和钠100 mmol/L)冲洗3次, 每次5 min; ⑥放入含125 mmol/L Sulfobetaine-10的PBS(磷酸盐10 mmol/L和钠50 mmol/L)摇动7 h; ⑦放入含0.6 mmol/L Sulfobetaine-16, 0.14% Triton X-200 PBS(磷酸盐10 mmol/L和钠50 mmol/L), 摇动15 h; ⑧用PBS(磷酸盐50 mmol/L和钠100 mmol/L)冲洗3次,

15 min/次, 保存在4 °C的PBS中^[16-20]。

1.4.3 坐骨神经缺损修复模型制备 SD大鼠经麻醉后, 无菌条件下行坐骨神经移植。距梨状肌下缘2 mm处至远端将坐骨神经锐性切除6 mm, 回缩后造成约10 mm长的神经缺损。坐骨神经在手术显微镜下用9-0无创缝合针线将神经外膜吻合。实验组采用微量注射法在神经吻合口注射透明质酸, 在吻合口多点注射透明质酸, 间隙注射, 注射量以吻合口溢出透明质酸为止(平均注射量约为15 μ L), 并在吻合口周围覆盖透明质酸; 对照组吻合后不做其他处理; 自体神经移植组两端切断后将远近端倒转吻合。术后置于SD大鼠适宜生活环境分笼饲养12周。

1.4.4 动物模型造模成功标准 神经吻合可靠, 吻合后神经无张力, 术后无深部感染或脓肿形成。

1.5 主要观察指标

1.5.1 大体观察 术后观察各组动物的伤口愈合情况。术后12周麻醉下切开术口观察: 吻合口部及移植段神经与周围组织的粘连情况。按照Peterson等^[21]的分级标准评分进行评估, 见表1。

1.5.2 Masson染色 术后12周取材。超过坐骨神经近端吻合口两端1 mm切取神经组织, 组织块用40 g/L多聚甲醛固定, 切片采用多聚赖氨酸防脱处理, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 切片4 μ m。切片脱蜡至水后按照Masson三色染色试剂盒说明书进行操作: 在400倍光镜下观察。胶原显蓝色。

1.5.3 I、III型胶原相对含量分析 术后12周取材, 对近端吻合口进行检测。采用免疫组化SABC法, 方法参照试剂说明书。常规脱蜡至水、PBS洗片、修复, PBS洗片, 体积分数3%过氧化氢溶液15 min, PBS洗片, 加一抗(I型胶原抗体; III型胶原抗体)4 °C过夜, 次日室温放置1 h后, 加入二抗(Rabbit IgG)在37 °C温箱中放置30 min后PBS洗4 min \times 3次, 37 °C孵箱中血清封闭30 min, PBS洗4 min \times 3次; 加入三抗(SABC, 链酶亲和素-过氧化物酶复合物), 在37 °C温箱中放置30 min, PBS洗4 min \times 3次; DAB显色, 脱水封固。

I、III型胶原分析 100倍光镜下采图, 采用CIAS-1000型图像分析系统进行图像分析。在放大640倍下用鼠标器选定阳性部位, 测定灰度。根据其颜色的深浅不一、阳性部分反应强弱的不同, 在该系统中表现出灰度的大小不同。灰度分256级, 0级最深, 表示阳性反应强, 255级最浅, 表示阳性反应弱, 胶原含量与灰度值呈反比关系。

1.6 统计学分析 数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用SPSS 16.0

统计分析软件进行数据处理。统计数据均行方差齐性检验, 采用多重比较方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 纳入36只SD大鼠, 随机分为3组, 每组12只。全部进入结果分析, 无脱失。

2.2 术口大体观察 所有大鼠麻醉下切开伤口观察神经吻合口与周围组织的粘连情况。术后各组中大部分SD大鼠皮肤及肌肉、筋膜无裂开, 小部分SD大鼠皮肤及肌肉、筋膜部分裂开, 无明显感染现象。将Peterson评分(数据结果为等级分类资料)按定量资料多重比较方差分析, 除了实验组神经吻合口与周围组织粘连较轻, 优于对照组之外($P < 0.05$), 3组其他指标行多重比较, 差异均无显著性意义($P > 0.05$)。各组大体观察Peterson评分结果见表2及图1。

2.3 Masson染色 Masson染色后在400倍光镜下观察所见各组均可见神经吻合口外膜胶原沉积, 图2A可见实验组神经外膜胶原纤维排列整齐有序, 胶原纤维量略少。图2B可见对照组大量胶原纤维成堆积状, 排列紊乱。图2C可见自体神经移植组神经外膜胶原纤维较多, 胶原纤维排列较整齐, 但胶原纤维较稀疏。可见实验组优于对照组及自体神经移植组。

2.4 I, III型胶原相对含量分析 I型胶原灰度值实验组高于对照组($P < 0.05$), 实验组与自体神经移植组相比较差异无显著性意义($P=0.256 > 0.05$), 自体神经移植组高于对照组($P < 0.05$)。

III型胶原灰度值实验组低于对照组($P < 0.05$), 实验组与自体神经移植组比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。对照组高于自体神经移植组($P < 0.05$)。

I型+III型胶原灰度值实验组与对照组比较、实验组与自体神经移植组比较、对照组与自体神经移植组比较 P 分别为0.165, 0.941, 0.145, P 均 > 0.05 , 差异无显著性意义。

虽然3组I型+III型胶原总量差异无显著性意义, 但实验组III型胶原较对照组含量高, 而I型胶原含量较对照组少, 实验组明显优于对照组, 与自体神经移植差异无显著性意义。I, III型胶原免疫组化灰度测量结果见表3。

3 讨论 Discussion

周围神经损伤恢复是多种因素的结果, 其中瘢痕组

织是阻碍神经再生的重要因素之一。瘢痕组织是肉芽组织经过改建成熟形成的纤维结缔组织。瘢痕虽然能够将断裂的组织连接起来, 但是如果胶原形成不足、各胶原含量不同或承受力大而持久, 瘢痕生成过多, 阻碍组织的再生。将瘢痕形成的量降低或将瘢痕中胶原纤维成分优化才会对神经再生产生正效应。为了最大限度在周围神经吻合处减少免疫反应而加重瘢痕形成, 并使得周围神经生长通过度增加, 在神经吻合口及神经再生室内应用他克莫司、神经生长因子以及中药类物质也取得了一定的效果^[22-23]。

随着近年来对器官移植的研究深入及应用, 周围神经移植也取得了较大的进展, 去细胞异体神经移植是自体神经移植较好的替代物^[24-26]。影响去细胞异体神经移植质量的主要因素为去除免疫原性物质的程度和神经三维结构的完整性。周围神经同种异体移植物的抗原性主要存在于许旺细胞和髓鞘, 为降低同种异体神经的抗原性, 人们尝试采用低温保存、冻融、冷冻干燥、冷冻放射和化学萃取方法对同种异体神经进行处理。综合去细胞程度、髓鞘染色分级、结构完整性3方面质量评分, 已经证明优化法运用萃取剂 Triton X-200、Sulfobetaine-10 和 Sulfobetaine-16 进行萃取, 是目前去细胞异体神经较好的制备方法。优化法是一种较好的去细胞异体神经制备方法, 能够制备出免疫物质清除完全、神经结构保存较好的去细胞异体神经移植。目前, 国内外众多研究人员化学法处理神经前给予冻融处理, 也取得较好效果。因此, 本实验采用优化法处理异体神经作为神经缺损的桥接载体, 具有真正意义的仿生性。近年来随着透明质酸特性被研究人员所挖掘^[27-28]。透明质酸主要特性包括: ①无种属特异性, 它广泛存在于动物体内, 是细胞外基质的重要组成部分; ②可生物降解性; ③具有黏弹性。高浓度、高分子量的透明质酸既有溶液特性, 又具有凝胶的弹性, 是理想的物理屏障材料; ④透明质酸钠带有大量负电荷, 对成纤维细胞有排斥作用, 可形成化学屏障; ⑤高浓度、高分子量透明质酸具有抑制淋巴细胞、单核细胞和成纤维细胞的迁移, 减轻炎症反应, 形成免疫屏障的作用; ⑥更为重要的是透明质酸能够选择性地刺激成纤维细胞合成III型胶原, 促进胶原纤维以网状排列方式沉积, 从而减少瘢痕的形成。其中高分子量透明质酸可抑制中性粒细胞及淋巴细胞的趋化性, 并且对巨噬细胞的吞噬作用、前列腺素的释放、淋巴细胞转化、成纤维细胞的运动和复制均有抑制作用^[29]。

表 1 Peterson 分级标准

Table 1 Peterson grading standards

组织	分级	程度
皮肤和肌肉筋膜	1	完全愈合
	2	部分裂开
	3	完全裂开
神经粘连	1	需要轻钝性分离
	2	需要较用力钝性分离
	3	需要锐性分离

表 2 实验组/对照组/自体神经移植组大鼠大体观察 Peterson 评分

Table 2 The Peterson grading scores in the experimental, control and nerve autograft groups

大鼠	皮肤	肌肉筋膜	神经粘连
1	1/2/1	1/2/1	1/2/1
2	1/1/1	1/1/1	1/2/2
3	2/1/2	1/1/1	2/1/2
4	1/2/1	1/2/1	1/2/1
5	1/1/1	1/1/1	1/1/2
6	1/1/1	1/1/1	1/2/1
7	1/1/3	1/1/2	1/2/2
8	1/1/1	1/1/1	1/1/2

表 3 I, III型胶原免疫组化灰度测量分析结果 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	I 型胶原	III型胶原	I 型+III型胶原
实验组	46.614±3.650 ^a	30.578±4.113 ^a	77.192±5.284
对照组	36.803±4.085	36.884±4.090	73.685±6.920
自体神经移植组	44.793±3.826 ^a	32.583±3.390 ^a	77.376±5.835

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

此次实验排除了由于各组伤口裂开造成伤口污染和炎症反应对神经再生影响的混杂因素, 通过实验结果分析显示, 应用透明质酸神经吻合口粘连较轻, 神经外膜胶原纤维排列整齐有序, 胶原纤维量略少, 作者在实验比较初步推断出透明质酸对胶原形成与沉积起作用^[30]。

通过实验对 I、III型胶原含量分析提示: 神经吻合口 I、III型胶原含量在神经损伤的修复后均较多。III型胶原是构成胶原纤维的重要成分, III型胶原所占比例越大, 则胶原纤维越细, 弹性越好, 也就是说, III型胶原含量越高, 瘢痕形成的程度越轻。III型胶原的增多可能是由于透明质酸选择性地刺激成纤维细胞合成III型胶原, 提高III型胶原的合成量。由于神经吻合口透明质酸

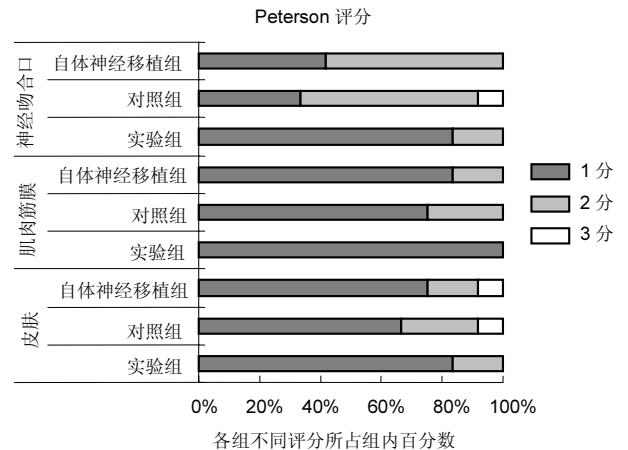


图 1 实验组/对照组/自体神经移植组术口大体观察粘连评分分布表

Figure 1 The distribution of incision adhesion scores in the experimental, control and nerve autograft groups

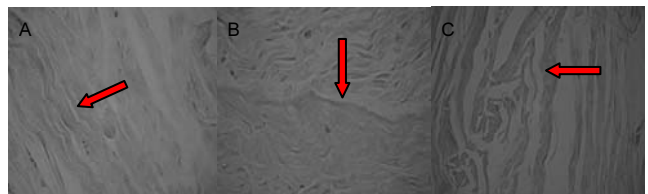


图 2 各组神经吻合口 Masson 三色法染色结果($\times 400$)

Figure 2 Masson trichromatic staining of the neural anastomosis in each group ($\times 400$)

图注: 图 A 为实验组, 箭头示可见胶原蓝染, 神经外膜胶原形成略少, 胶原纤维排列规则; 图 B 为对照组, 箭头示胶原蓝染, 神经外膜胶原沉积较多, 成堆积状, 排列紊乱; 图 C 为自体神经移植组, 箭头示胶原纤维蓝染, 神经外膜胶原沉积较多, 胶原纤维较稀疏。

的应用, 胶原呈网状方式沉积, III型胶原沉积增多, 瘢痕形成减少。目前研究认为神经内胶原的生成恰恰是许旺细胞及成纤维细胞共同调控的结果, 而后期胶原的大量增生则是与时间有一定关系, 新生成的内胶原对胶原纤维的合成速度有调控作用, 它可能减慢 I 胶原的合成, 但 I 胶原的增加是不可逆的^[31]。另外高分子量的透明质酸具有高度的黏弹性、亲水性, 利用其高度黏弹性黏附于组织表面, 有效地预防了术后组织粘连和瘢痕形成^[32-36]。

在实验中作者注意到, 在大鼠坐骨神经损伤修复中, 局部应用透明质酸明显减少神经缝合口的粘连和瘢痕形成, 透明质酸在体内起流体阻隔作用和分子筛效应, 并能控制和调节细胞分化, 能明显抑制白细胞趋化, 纤维蛋白的渗出和肉芽组织形成, 从而抑制粘连及瘢痕组织的产生^[37-38]。另外透明质酸可能是通过抑制周围神经吻合口的炎症反应来减少周围神经吻合口瘢痕形成

的, 但机体正常的炎症反应具有清除异物、保护自我的作用, 同时释放炎症递质和细胞因子, 促进创伤愈合^[39-40]。因此抑制瘢痕产生的同时可能会导致创伤局部炎症反应降低。将炎症反应控制在一个适度范围, 找到抗炎和促炎的平衡点, 即找到应用透明质酸的有效浓度和合理剂量, 透明质酸在体内的代谢时间和不同时段的作用强度; 透明质酸对于调节 I、III 型胶原的形成与抑制炎症反应, 两者抑制瘢痕形成的作用强度还应该进一步深入研究。

控制神经损伤修复过程中的瘢痕, 其目的是为了取得最佳的神经修复效果, 从而恢复神经及其功能, 最终应用于临床工作中服务于患者。因此在此次实验中同时对神经再生效果做了验证。通过对坐骨神经功能指数测量、运动神经平均传导速度和复合肌肉动作电位幅度, 实验组均显示出较好效果。有髓神经纤维的数目和髓鞘厚度是神经成熟的主要形态学指标, 再生神经内有较成熟的有髓神经纤维为有效再生。实验组有髓神经纤维、髓鞘清晰可见, 有髓神经纤维较多, 排列规则。从透射电镜可以观察到, 实验组髓鞘直径大小均匀, 排列规则, 轴突较粗大, 髓鞘致密, 较整齐, 无髓神经纤维较少, 可见许旺细胞, 更接近自体神经移植。

结论: 在大鼠去细胞异体坐骨神经移植中应用透明质酸生成总胶原含量无差别, 对 I、III 型胶原沉积具有调控作用, 可增加 III 型胶原的沉积, 减少 I 型胶原的沉积, 减少瘢痕形成, 间接促进周围神经再生。

致谢: 衷心感谢牡丹江医学院医药研究中心组织工程修复实验室的各位老师们在课题设计和实施方面的帮助和指导。

作者贡献: 所有作者均参与文章的设计、实施和评估, 经过正规培训。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。实验方案中有关动物伦理问题已经牡丹江医学院实验动物伦理委员会讨论批准。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 通讯作者张万里对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包

括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Hudson TW, Zawko S, Deister C, et al. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng.* 2004;10(11):1641-1651.
- [2] Sun MX, Tang JS, Xu WJ. Experimental study on chemical extracted acellular nerve allograft. *Chin J Orthop.* 2006;26(4):267-271.
- [3] Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng.* 2004;10(9-10):1346-1358.
- [4] 黄永旺, 范学政. 几丁糖与聚乳酸合成生物材料修复周围神经缺损[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(25):4059-4063.
- [5] 刘奔, 张彩顺, 高绪斌, 等. 聚己内酯/壳聚糖神经导管复合骨髓间充质干细胞促进大鼠坐骨神经损伤修复的研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2014, 34(2):34-38.
- [6] 张孙富, 王斌. 合成可生物降解神经导管修复损伤周围神经: 生物相容性良好[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(25):4054-4058.
- [7] 王华松, 吴刚, 黄继锋, 等. 新型仿生人工神经导管修复周围神经缺损的初步临床观察[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2014, 32(6):735-738.
- [8] 李玢, 郝立君. 不同神经导管材料的研究进展[J]. *中国美容整形外科杂志*, 2014, 25(1):62-64.
- [9] Arslantunali D, Budak G, Hasirci V. Multiwalled CNT-pHEMA composite conduit for peripheral nerve repair. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(3):828-841.
- [10] Özgenel GY. Effects of hyaluronic acid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *Microsurgery.* 2003;23:575-581.
- [11] 崔媛, 段潜, 李艳辉. 透明质酸的研究进展[J]. *长春理工大学学报(自然科学版)*, 2011, 34(3):101-106.
- [12] 朱维波, 王端诚, 颜廷亭, 等. 透明质酸钠/魔芋葡甘聚糖复合多孔膜的制备及性能研究[J]. *材料导报*, 2014, 28(4):38-41.
- [13] 陈建澍, 王婧茜, 易喻, 等. 透明质酸及其衍生物研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 35(2):111-118.
- [14] 阮超越, 马维虎, 李国庆. 透明质酸及其衍生物在骨组织应用中的研究进展[J]. *北京生物医学工程*, 2015, 34(2):203-207.
- [15] 蒋延超, 蒋世云, 傅凤鸣, 等. 透明质酸生物合成途径及基因工程研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 35(1):104-110.
- [16] Sun MX, Lu SB, Tang JS. Experimental study on repairing different length nerve defects with chemical extracted acellular nerve allograft. *Chin J Orthop.* 2006;14(8):603-607.

- [17] 王冠军,孙明学,卢世璧,等.改良化学去细胞同种异体神经制备方法的实验研究[J].中国矫形外科杂志, 2007, 15(12): 929-932.
- [18] 管树军,王伟,李岩.冻融联合优化化学法制备粗大去细胞同种异体神经[J].中国组织工程研究, 2015,19(12): 1914-1918.
- [19] Zhang Y,Zhang H,Katiella K,et al.Chemically extracted acellular allogeneic nerve graft combined with ciliary neurotrophic factor promotes sciatic nerve repair. *Neural Regen Res.* 2014;9(14):1358-1364.
- [20] 王在军,韩壮,徐先立,等.去细胞神经与自体神经移植桥接修复大鼠坐骨神经缺损的对比研究[J].解剖科学进展, 2013,19(2):163-166.
- [21] Petersen J,Russell L,Andrus K,et al.Reduction of extraneural scarring by Adcon-T/N after surgical intervention. *Neurosurgery.* 1996;38:976-984.
- [22] 林强,蔡杨庭,李皓莘.负载浓度梯度NFG的周围神经导管修复大鼠周围神经缺损的实验研究[J].中国修复重建外科杂志,2014,28(2):167-172.
- [23] 刘彦冬,窦源东,侯春林,等.电纺丝壳聚糖/聚乳酸神经导管修复大鼠周围神经缺损的实验研究[J].中国修复重建外科杂志,2015,29(5):600-608.
- [24] 池昊天,阳运康.干细胞与脱细胞异体神经支架在周围神经长段缺损中的应用[J].中国组织工程研究, 2014, 18(21):3398-3405.
- [25] 王宇博,丁新玲,张春光.胶原神经再生室复合修复周围神经损伤的作用[J].赤峰学院学报(自然科学版), 2014, 30(3):38-39.
- [26] 冷承浩,郝铁成,丁冬,等.NGF和GM1联合应用对去细胞异种神经支架修复大鼠坐骨神经陈旧性缺损的影响[J].神经解剖学杂志,2014,30(1):86-92.
- [27] 吴斗,刘强,龚强,等.透明质酸抑制周围神经局部瘢痕形成的作用[J].中国临床康复, 2006,10(9):77-80.
- [28] Mohammad J, Warnke P, Pan Y, 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 Plast Surg.* 2000;44(1):59-64.
- [29] 吴婷,李朝晖,崔占峰,等.应用多种水凝胶支架材料构建三维神经干细胞培养模型[J].中国细胞生物学学报, 2015, 37(1):66-73.
- [30] Wei W,Li Z,Ming F,et al. Compatibility of hyaluronic acid hydrogel and skeletal muscle myoblasts. *Biomed Mat.* 2009;4(2):7.
- [31] 赖晓文,何晓升,钟晓春,等.不同时期增生性瘢痕组织内透明质酸含量与含水量的相关性[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(2):323-325.
- [32] 刘海峰,常津,陈亦平,等.不同透明质酸的浓度对明胶--透明质酸薄膜性能的影响[J].中国生物医学工程学报, 2008, 27(4):603-610.
- [33] 黄小忠,管国强.透明质酸生理功能及其应用研究进展[J].畜牧与饲料科学,2015,36(1): 21-25.
- [34] 丁金聚,孙伟庆.透明质酸复合材料研究现状[J].中国组织工程研究, 2015,19(21):3403- 3408.
- [35] Lebourg M,Martinez-Diaz S,Garcia-Giralt N,et al. Cell-free cartilage engineering approach using hyaluronic acid-polycaprolactone scaffolds: a study in vivo. *J Biomater Appl.*2014;28(9):1304-1315.
- [36] 杨泽龙,陈竹,刘康,等. II型胶原-透明质酸构建组织工程软骨复合三维纳米支架的体外实验研究[J].中国修复重建外科杂志,2013,27(10):1240-1245.
- [37] 赵丽,梁晓龙,张玉杰,等.表皮生长因子--透明质酸复合膜对大鼠皮肤切口愈合的影响[J].解放军医药杂志, 2015, 27(7):40-43.
- [38] Wu Z,Tang Y,Fang H,et al.Decellularized scaffolds containing hyaluronic acid and EGF for promoting the recovery of skin wounds. *J Mater Sci Mater Med.* 2015; 26(1):5322.
- [39] 马林泉,鲍济洪,陈斌.瘢痕:评估、防治、早期干预方法的研究与进展[J].中国组织工程研究, 2015,19(20): 3253-3257.
- [40] 谭新东,李希军,叶雪玲.透明质酸对创面胶原代谢的影响[J].中国美容医学,2012,21(8):1332-1333.