

家兔再造阴茎再生神经纤维轴浆流的恢复

吴包金¹, 江 华^{1*}, 李文鹏¹, 张盈帆¹, 倪灿荣²

(1. 第二军医大学长征医院整形外科, 上海 200003; 2. 第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**观察家兔再造阴茎植入神经轴浆流恢复情况,以探讨感觉神经末梢再生以及阴茎再造后感觉功能恢复的可能性。**方法:**将游离隐神经移植体与阴茎背神经吻接后植入腹壁浅血管筋膜蒂岛状皮瓣内,以建立阴茎再造重建感觉功能的动物模型。术后不同时间切取 S₂~S₄ 节段双侧背根神经节(dorsal root ganglia, DRG),应用辣根过氧化酶法(horseradish peroxidase method, HRP)对实验组(植入神经)和对照组(未植神经)进行逆行神经示踪,观察 DRG 内辣根过氧化酶法(HRP)阳性标记细胞出现的时间和数量。**结果:**术后 1 个月实验组动物吻接侧 DRG 内开始出现 HRP 阳性细胞,且随着时间延长,阳性细胞数逐渐增多,植入隐神经束也可见 HRP 阳性;而对照组术后始终未见 DRG 内 HRP 阳性标记细胞出现。术后 1 个月、3 个月和 6 个月 3 个时间点的 HRP 阳性神经元计数结果: S₂ 为 35.0±9.3、97.0±12.5、106.6±17.9, S₃ 为 22.1±7.7、71.3±16.7、103.8±29.4, S₄ 为 17.8±6.5、35.0±7.1、81.1±6.2。**结论:**家兔阴茎再造术后,植入神经轴浆流恢复,提示其感觉神经末梢再生与感觉功能重建是可能的。

[关键词] 阴茎再造;神经移植;神经再生;轴浆流

[中图分类号] R 699.8

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2005)01-0021-03

Axoplasm flow restoration in regenerative nerve fiber in reconstructed penis of rabbits

WU Bao-jin¹, JIANG Hua^{1*}, LI Wen-peng¹, ZHANG Ying-fan¹, NI Can-rong² (1. Department of Plastic Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the axoplasm flow restoration in regenerative nerve fiber and to investigate the regeneration of sensory nerve endings and the restoration of sensory function in the reconstructed penis in rabbits. **Methods:** Animal models were established as follows: one segment of dissociative saphenous nerve was end-to-end anastomosed to pudendal nerve and then embedded in a superficial epigastric faciovascular pedicle flap to reconstruct penis. HRP retrograde tracing method was performed postoperatively to observe the restoration time and quantity of HRP positive neuron in dorsal root ganglion (DRG) in the nerve implantation group and the control group. **Results:** HRP-positive neurons in DRG appeared 1 month after operation and the number of the labelled neurons increased gradually with the prolonged survival time in experimental group, while the HRP-positive cell was not scanned in the control group all the time after operation. The numbers of HRP positive neuron in the 1 month group, 3 months group and 6 months group were S₂ (35.0±9.3, 97.0±12.5, 106.6±17.9), S₃ (22.1±7.7, 71.3±16.7, 103.8±29.4) and S₄ (17.8±6.5, 35.0±7.1, 81.1±6.2) respectively. **Conclusion:** The implanted nerves in the rabbit reconstructed penis have resumed axoplasm flow. It is suggested that both sensory nerve ending regeneration and sensory function restoration are possible.

[KEY WORDS] phallic reconstruction; nerve transplantation; nerve regeneration; axoplasm flow

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(1): 21-23]

阴茎是重要的泌尿排泄和性器官,临床上各种病因引起的阴茎缺如、缺损或发育不全、性别畸形以及易性病等治疗都需行阴茎再造。理想的阴茎再造术不仅应具备接近正常的良好外形,尿道开口于再造阴茎顶端,能站立排尿;还要有良好的感觉功能。目前的阴茎再造均以游离皮瓣或带蒂皮瓣再造阴茎体和尿道,并内置软骨、骨或假体为支撑物,基本达到了形态的要求^[1]。但再造阴茎的感觉功能缺失一直是困扰临床的难题,它严重影响了性生活的质量,给患者身心带来极大痛苦。迄今尚无有关再造阴茎

感觉功能重建的研究报道。轴浆流或轴浆运输功能的恢复是感觉功能重建的基础。辣根过氧化酶法(HRP)逆行示踪技术是判断神经纤维之间或神经纤维与神经元之间是否建立了联系的最可靠研究方法。Hattori 等^[2]曾经应用该方法对移植肌瓣表面

[基金项目] 上海市科技发展基金(024119057)。

[作者简介] 吴包金(1973-),男(汉族),硕士,讲师、主治医师。现在复旦大学附属华山医院整形外科,上海 200040。

E-mail: pokingwu@126.com

* Corresponding author. E-mail: dosjh@sh163c.sta.net.cn

皮片移植物的感觉重建进行研究,证明它是行之有效的办法。本研究在建立隐神经游离移植与阴茎背神经吻合植入腹壁浅血管筋膜蒂皮瓣再造阴茎动物模型的基础上,将 HRP 注入再造阴茎皮下,根据再生神经纤维轴浆逆行运输的原理,观察感觉神经元和植入神经的标记结果,了解再生纤维轴浆流的恢复情况,推断再造阴茎皮肤感觉神经末梢能否通过植入神经再生轴突及吻合口,并与骶部背根神经节(DRG)内的感觉神经元重新建立联系,能否恢复正常的神经传导功能,以探讨感觉神经纤维再生和再造阴茎感觉功能重建的可能性。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 雄性新西兰白兔 40 只,体重 2.0~2.5 kg,由本校实验动物中心提供,随机均分为实验组和对照组,实验组在阴茎再造的同时行隐神经游离移植与阴部神经吻合植入皮瓣,对照组仅行腹壁浅血管筋膜蒂阴茎再造术。

1.2 动物模型的制备 参考本实验室建立的方法^[3,4]制备家兔阴茎再造术模型。动物以 3%戊巴比妥钠(1.5 ml/kg)腹腔内麻醉。阴茎再造术采用腹壁浅血管筋膜蒂岛状皮瓣法进行:设计 5 cm×3 cm 的矩形腹壁浅血管筋膜蒂皮瓣,蒂部去表皮,经皮下隧道将皮瓣转移至会阴部。实验组均在右下肢切取一段 5 cm 长隐神经游离移植,供神经近端与左侧阴茎背神经近断端用 11-0 无损伤缝线行外膜端端吻合纵向植入皮瓣中央,远端固定于皮瓣远侧游离缘,皮瓣包绕埋植神经后于会阴部阴茎成形。对照组再造阴茎内未植入神经。术后单笼饲养。

1.3 HRP 逆行神经示踪及标本制备^[5] 两组均分别于术后 1 周、2 周、1 个月、3 个月与 6 个月各取 4 只动物,经 3%戊巴比妥钠(1.5 ml/kg)腹腔内注射麻醉后,用微量注射器于再造阴茎中远段皮下多点注射 50% HRP(RZ3.0⁺, Cat. P6782, Sigma)50 μ l,并留针片刻。5 d 后动物在过量麻醉状态下,经左心室快速灌注 4%多聚甲醛 500 ml;立即手术切取 S₂~S₄ 节段双侧 DRG 置于 4%多聚甲醛固定液中固定 4 h,再放入 5%蔗糖 4℃过夜;20 μ m 连续冰冻切片,DAB 显色液孵育 20 min,PBS 液漂洗 1 min,贴片待干,二甲苯、乙醇常规脱水透明,中性树胶封片。再造阴茎标本则直接置于 10%中性缓冲甲醛溶液固定 12 h 后,横断面取材,甲基纤维素糊胶

(OCT)包埋,连续冰冻切片,DAB 显色镜检,观察再造阴茎内的隐神经染色情况。阳性着色呈棕色颗粒状,位于细胞质及神经轴突。

1.4 阳性细胞计数 应用 MIAS 2000 病理图像分析系统对切片进行阳性细胞计数。将整个 DRG 切面进行分区,图像经 CCD 摄像头转入计算机图像分析系统进行处理。镜下先定性观察,确定阳性神经元分布区域。为避免棕色着色的少量红细胞及神经轴突与神经元相混淆,在选择阳性神经元所在目标区域的同时,先人工剔除干扰细胞及假象。阳性神经定性标准:神经元胞质染成棕色,不计着色深浅程度。根据着色与否,图像分析仪对阳性细胞进行自动计数,并进行自动门限分割与统计,测定 DRG 内 HRP 阳性标记神经元数量。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间均数两两比较用 SNK-*q* 检验,由 SAS 6.12 统计软件完成。

2 结果

2.1 DRG 内的感觉神经元 对照组动物在阴茎再造术后 1 周、2 周、1 个月、3 个月和 6 个月各时间点,S₂~S₄ 节段的双侧 DRG 内均未见 HRP 阳性神经元(图 1A)。实验组动物再造阴茎术后 1 周和 2 周,S₂~S₄ 节段的双侧 DRG 内均未观察到 HRP 阳性标记神经元。术后 1 个月移植神经侧(左侧)的 DRG 内开始出现少量 HRP 阳性神经元,细胞呈圆形或椭圆形,以小细胞为主,浓淡不一,阳性颗粒定位于细胞质,呈棕褐色(图 1B)。随着时间延长,阳性细胞数逐渐增多,密集深染。术后 6 个月,大、中、小型神经元内均可见 HRP 阳性颗粒,着色深,位于细胞质内(图 1C)。阳性标记神经元在 S₂、S₃、S₄ 各节段 DRG 内的分布并不均等,1 个月、3 个月和 6 个月的 HRP 阳性神经元计数结果:S₂ 为 35.0±9.3、97.0±12.5、106.6±17.9,S₃ 为 22.1±7.7、71.3±16.7、103.8±29.4,S₄ 为 17.8±6.5、35.0±7.1、81.1±6.2。同一时间点比较:S₂>S₃>S₄;同一骶髓节段 DRG 比较:6 个月>3 个月>1 个月,两两比较差异具有统计学意义(*P*<0.01)。

2.2 再造阴茎内的移植隐神经束 实验组动物再造阴茎内植入的隐神经束,在术后 1 个月时也可见 HRP 阳性标记(图 1D),且其 HRP 阳性颗粒及纤维密度随时间延长更趋浓密。对照组动物再造阴茎内各时间点均未见 HRP 阳性标记神经束。

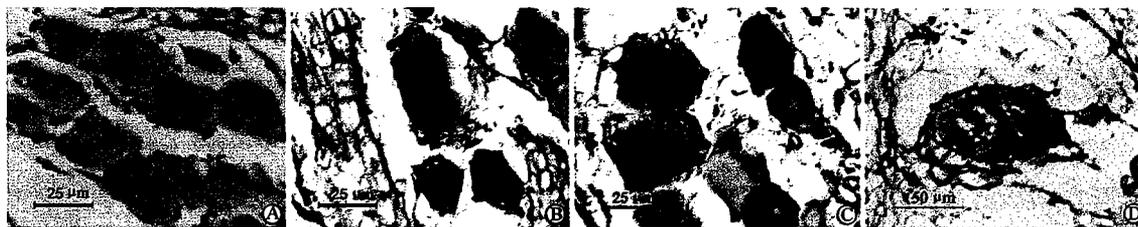


图1 HRP逆行神经示踪结果

Fig 1 HRP retrograde tracing results

A: HRP negative reaction in the DRG 6 months after operation in control group; B: HRP positive neurons in the DRG 1 month after operation in experimental group; C: HRP positive neurons in the DRG 6 months after operation in experimental group; D: HRP positive staining in the saphenous nerve bundle embedded in the reconstructed penis 1 month after operation in experimental group

3 讨论

迄今,临床上尚无一种理想的重建再造阴茎感觉功能的手术方法^[6,7]。本实验建立了兔隐神经游离移植体与阴茎背神经吻合植入腹壁浅血管筋膜蒂岛状皮瓣再造阴茎的动物模型。再造阴茎感觉功能的恢复有赖于游离神经末梢的再生以及末梢与神经元之间轴突联系完整性和连续性的再建立。HRP逆行神经示踪则是追踪感觉神经末梢、周围神经束与DRG感觉神经元之间神经纤维联系重建与否的最具说服力的方法^[8]。研究结果首次发现,再造阴茎植入神经后1个月,植入的神经束及同侧 $S_2 \sim S_4$ 节段DRG内开始出现少量HRP阳性标记,并随着时间延长,阳性标记物逐渐增多,这表明再造阴茎内的感觉神经不仅获得了形态结构上重建,而且皮肤感觉神经末梢与感觉神经元之间通过再生神经已经重新建立了联系。 S_2 、 S_3 和 S_4 各节段DRG内阳性神经元分布的差异性可能与以下两种因素有关:(1)DRG主要由感觉神经元和神经纤维组成,其大小与相连的后根的粗细成正比, S_2 节段的DRG体积较大, S_3 节段次之,而 S_4 节段的DRG体积较小,DRG内所含神经元数量依次递减;(2)阴茎感觉支配主要源自 $S_2 \sim S_4$ 脊神经节,而兔阴部神经躯体感觉传入纤维的定位投射也位于 $S_2 \sim S_4$ 节段DRG,以 S_2 、 S_3 为主,并呈明显节段性分布^[9]。

注入HRP后,动物需存活一段时间,称为存活期,因为HRP在注入部位被神经末梢摄取,摄取后经轴浆逆行运输至胞体,其积累需要一定的时间。存活期超过5d,HRP容易出现胞内降解。为了防止出现假阴性或假阳性,或降低假阳性发生率,实验中应注意:(1)HRP是注入皮下,而不是直接注射或涂于神经束内,相对来说,它可能需要更长时间的运输才能到达神经元胞体。所以在行HRP逆行神经示踪时最好选择多点注射并皮下留置数分钟,存活

期适当延长。(2)低等动物具有较强的神经再生能力,邻近的神经可能长入皮瓣,又因HRP的标记结果易受注射范围、过路纤维等因素的干扰,所以注射点不可太靠近阴茎阴囊根部,最好选在再造阴茎的中远段。(3)在注射HRP时,注射点外垫塑料薄膜或贴膜,注射后局部用固体凡士林封闭,以防HRP的外渗与污染。

本研究结果表明,家兔阴茎再造术后植入神经轴浆流恢复,感觉神经末梢再生与感觉功能重建是有可能的。这为临床采用隐神经游离移植体与阴茎背神经吻合植入腹壁浅血管筋膜蒂岛状皮瓣再造阴茎,以重建再造阴茎感觉功能提供了直接依据。

[参考文献]

- [1] Sievert KD. Vaginal and penile reconstruction[J]. *Curr Opin Urol*, 2003, 13(6): 489-494.
- [2] Hattori Y, Chuang DC, Lan CT. Sensory restoration of the skin graft on a free muscle flap: experimental rabbit study[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2001, 108(1): 132-140.
- [3] 吴包金, 江华, 李文鹏, 等. 再造阴茎感觉重建过程中背根节胶质细胞源性神经营养因子基因表达变化及意义[J]. *中国临床康复*, 2004, 8(20): 4039-4041.
- [4] 吴包金, 江华, 李文鹏, 等. 再造阴茎感觉功能重建动物模型的建立[J]. *第二军医大学学报*, 2005, 26(1): 17-20.
- [5] 何仲义, 焦旭文, 秦毅, 等. HRP法对异种神经移植后再生纤维恢复的形态学研究[J]. *中国实验动物学报*, 2001, 9(3): 139-142.
- [6] Sengezer M, Ozturk S, Deveci M, et al. Long-term follow-up of total penile reconstruction with sensate osteocutaneous free fibula flap in 18 biological male patients[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2004, 114(2): 439-450.
- [7] Perovic SV, Djordjevic ML, Kekic ZK, et al. Penile surgery and reconstruction[J]. *Curr Opin Urol*, 2002, 12(3): 191-194.
- [8] Azevedo AM, Martins VC, Prazeres DM, et al. Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology[J]. *Biotechnol Annu Rev*, 2003, 9(3): 199-247.
- [9] 柯国平, 杨淑芬, 黄文铎. 家兔阴部神经躯体纤维来源及其节段性分布: HRP法研究[J]. *湖北医科大学学报*, 1996, 17(2): 110-111.

[收稿日期] 2004-07-15

[修回日期] 2004-10-11

[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群