

自體纖維蛋白膠在周邊神經修補上之評估

賴精二 邱文達* 宋奉宜 邱瀚模 李文軒

摘 要

本研究之目的，在於了解周邊神經損傷後之修補除了以傳統顯微手術縫合之外，能否以自體血液成分製成之纖維蛋白膠黏合術來達成，並比較其間之差異。本研究以紐西蘭白兔為實驗動物。將兩腳之坐骨神經分別切斷後左腳以傳統縫合法縫合神經，右腳則以自體纖維蛋白膠黏合神經進行比較實驗。總共有十二隻兔子接受兩側二十四次手術經六週飼養後作功能恢復測試並製作成組織病理切片後在光學顯微鏡下觀察。其中四隻因中途死亡或傷口感染不列入功能測試及病理評估，其餘八隻在臨床功能評估方面顯示二種手術方法雖無統計學上差異，但在組織病理方面自體纖維蛋白膠黏合組呈現較輕微之神經纖維空泡化(vacuolation)，同時慢性發炎現象及嗜酸性球數目也顯著減少，其表現優於傳統縫合者。此外疤痕組織之減少除因縫合針數較少外，亦可能與纖維蛋白膠阻隔免疫細胞之效應有關。實驗初步結果顯示自體纖維蛋白膠在輔助針線縫合上，具有正面之效果。

關鍵字：自體纖維蛋白膠，神經外膜顯微縫合術，周邊神經再生

末梢神經損傷後之修補方式，目前仍以傳統顯微手術縫合(microsuture)為主，但由於縫合耗時較久，而且縫合後修補處會有疤痕(scar)的產生，造成神經傳導受阻^(1,2)。由於縫合技術上較艱難，耗時較久，且有時會造成縫合處之組織瓦解^(2,3)。早期之醫學界有鑑於此，乃致力於開發新的方法以取代縫合手術，如矽膠(silicone)，膠原纖維(collagen fiber)等...。自1940年代起，即有人研究如何利用血液中與凝血相關之成分來從事周邊神經的修補⁽⁴⁾。以血液中與凝血相關之成分從事組織的修補，在臨床上已被利用在鼓膜、聽小骨、皮膚⁽⁵⁻⁷⁾以及心臟血管^(6,8)之修補。在神經修復方面，雖有許多動物實驗報告及臨床報告，但其

效果迄今仍無定論⁽⁹⁻¹³⁾。不過其中已有多篇報告⁽¹⁴⁻¹⁷⁾指出利用此法之種種優點，其作用已漸漸受到醫界的重視，因此相信是相當具有發展性的。本研究之目的除了印證這些優點之外，尚探求以自體方式製得之纖維蛋白膠改善神經修復之可能性。

材料與方法

本研究使用購自台大醫院動物中心之紐西蘭白兔(New Zealand white rabbit)，年齡相若，且體重控制於3.5至4公斤之間。實驗兔子首先以苯基巴比妥納鹽(phenobarbital) 30 mg/kg 腹腔注射(IP)給予全身麻醉，並且在手

臺北醫學院生化學科，神經外科*
民國八十一年六月十五日受理

術部位皮下注射局部麻醉劑 2% xylocaine。在兔腿的二頭肌附近，撐開肌肉即可找到坐骨神經。將左右兩側坐骨神經均予切斷，再分為二組，右腳用 10-0 尼龍線 (nylon) 以神經外膜縫合術 (epineural microneurorrhaphy) 縫合二針。利用二只分別裝有成分 1 纖維蛋白及成分 2 凝血酶 (thrombin) 之微量管，將兩種成分滴在切斷面周圍及其附近，直到纖維蛋白膠在神經周圍形成一個完整的繭 (cocoon) 為止。左腿則於切斷後以 10-0 尼龍線 (nylon) 作傳統顯微神經外膜縫合術縫合四針，不加纖維蛋白膠，以做為對照。手術後施打抗生素 (Procillin) 以防傷口感染。

成分 1 主要成分為自體纖維蛋白原 (autologous fibrinogen)，其製備方法為取實驗兔子本身 10 cc 耳靜脈血液經化學方法萃取而成。其步驟及流程如下：

10 CC 血液 (含 1 cc 檸檬酸鈉) 置於 4°C 30 分鐘

↓

離心，3000 rpm 4°C 10 分鐘

↓

抽取上清液，捨去沉澱之血球

↓

離心，10000 rpm 0°C 10 分鐘 (去除血小板)

↓

抽取上清液，置入另一離心管

↓

加入 25% 飽和硫酸銨鹽 $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ，靜置於 4°C 30 分鐘

↓

離心，10000 rpm 0°C 10 分鐘

↓

所得沉澱物為纖維蛋白原

↓

去除上清液

↓

沈澱物加入生理食鹽水，製成飽和溶液

上述飽和溶液與 40 mM 氯化鈣 (CaCl_2) 溶液

以體積比 10:3 混合製成成分 1。

成分 2 主要成分為凝血酶 (thrombin, 1000 units, MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD. TOKYO, JAPAN) 加上 50 μl 之生理食鹽水。

臨床評估 (功能復原測試)

手術後每週定期以測量腿圍、針刺感覺 (pin pricking)、下垂足測定 (drop foot)、前推測驗 (push off gait) 四種方式來進行臨床評估。為了避免測試者間之誤差，因此均由同一測試者來進行。評估方法如下：

1. 腿圍：測量腓腸肌 (calf muscle) 之周長。

2. 針刺感覺：以針刺其足掌，觀察其反應情形 (score 0~3, 0 為完全無反應, 1 為刺四次以上才有反應, 2 為刺二至三次才有反應, 3 為刺一次即有反應)。

3. 下垂足測定：觀察其腿部下垂情形 (score 0~3)。

4. 前推測驗：推其臀部促其步行並觀察其跛足情形 (score 0~3, 0 為無法步行, 1 為推 4 次以上才步行且跛行, 2 為推 2~3 次才步行, 稍有跛行, 3 為推一次即行走且跛足輕微)。

組織病理評估

在所有臨床評估完成後，將做過手術之神經委託台北醫學院及三軍總醫院病理科以 H&E stain、Masson Trichrom's stain、PAP stain 染色製作成病理切片。

結果

共有十二隻兔子接受兩側共二十四次手術，但其中二隻在觀察過程中死亡，另二隻則因傷口感染及崩裂而將之除外。其餘總共有八隻兔子接受完整的兩側手術，功能測試及病理

《表一》臨床評估

No.	手術方法		術前腿圍		術後腿圍		Pin pricking		Drop foot		Push off gait
	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	
1	S2G	S4	8.1	9.1	7.5	8.6	3	3	3	3	2
2	S2G	S4	9.9	11.3	8.5	9.0	3	3	3	3	2
3	S2G	S4	8.1	10.5	7.3	7.0	3	3	3	3	3
4	S2G	S4	11.0	11.0	8.0	7.0	3	3	1	2	2
5	S2G	S4	9.5	10.3	8.0	8.5	1	1	1	1	1
6	S2G	S4	9.4	9.7	7.5	7.3	2	1	1	1	2
7	S2G	S4	9.1	11.2	8.0	6.5	1	3	3	3	3
8	S2G	S4	11.0	10.3	9.6	9.9	3	1	3	3	3

R: right L: left S2G: 縫合二針輔以AFG S4: 縫合四針; 腿圍之單位為公分

《表二》組織病理評估

No.		granuloma formation	fibrosis	axon disorganization (vacuolation demyelination)	chronic inflammation (eosinophilia)	alignment
1	L	+	marked	+++ (75%)	mild	good
	R	-	mild	++ (50%)	mild	good
2	L	+	marked	++++ (80%)	moderate	good
	R	-	mild	++ (60%)	-	good
3	L	+	marked	++++ (85%)	moderate	fair
	R	-	marked	++ (50%)	-	fair
4	L	+	marked	++ (60%)	-	fair
	R	+	mild	+	-	good
5	L	+	marked	+++ (85%)	moderate	fair
	R	-	mild	++ (60%)	mild	good
6	L	+	marked	+++ (75%)	mild	fair
	R	+	marked	++ (60%)	-	good
7	L	+	marked	+++ (75%)	moderate	fair
	R	+	mild	++ (60%)	mild	good
8	L	+	marked	++++ (85%)	moderate	poor
	R	-	mild	++ (50%)	-	good

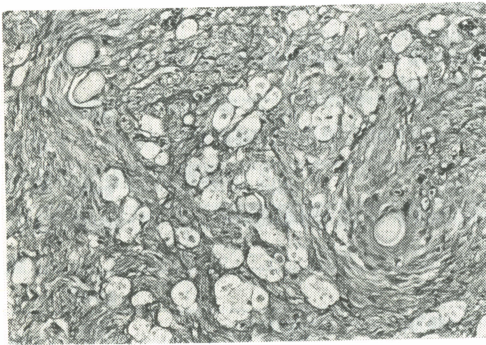
marked: ≥50% fibrosis. 25%: + 75%: +++
 mild: <50% fibrosis. 50%: ++ >75%: +++++

評估。臨床功能評估方面，前後共測試六次，其結果則如《表一》所示。由於愈晚觀察結果愈接近其復原之真正狀況，因此表上僅列最後一次測定之結果。兩組手術方式在四種功能評估(腿圍、針刺感覺、下垂足測定、前推測驗)雖然接受 AFG 黏合術的右側功能上似乎比接受傳統顯微縫合手術的左腿恢復較佳，但在統計上並無顯著差異。

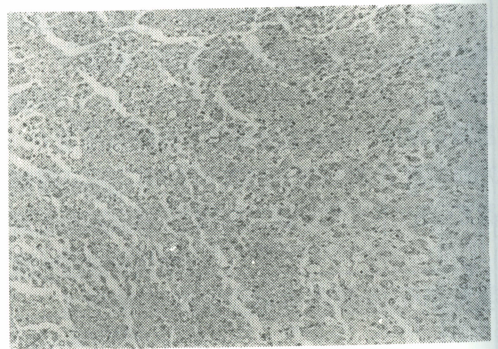
組織病理評估方面，則由病理科醫師依神經接合處前後之肉芽腫形成(granuloma formation)、纖維化程度(fibrosis)、去髓空泡

(vacuolation demyelination)、慢性炎症反應(chronic inflammation)及神經斷端接合程度(alignment)等五種狀況來評估神經之恢復。

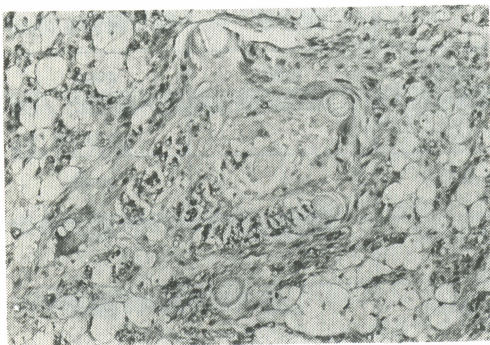
《表二》為二組手術方法的病理結果紀錄，顯示接受 AFG 黏合術之右腳明顯的比接受傳統神經外膜縫合術之左腳有較好的組織學上恢復。右腿(使用 AFG 及縫合)的神經束外圍形成由 AFG 構成之保護膜，因此神經受免疫反應破壞情形較輕微，而神經纖維的空泡化情形也較少如(圖一)及(圖二)。反之，左腿(只有縫合而未使用 AFG)則在 10-0 尼龍線(nylon)



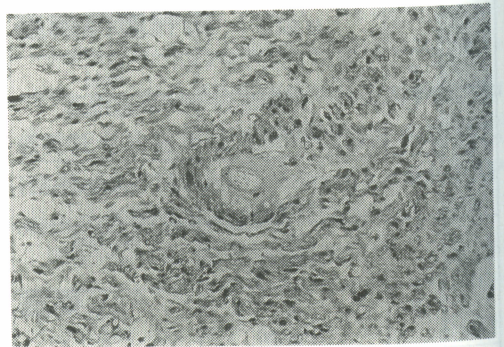
圖一 對照組手術部位之橫切面在顯微鏡觀察下，可見多處“線頭肉芽腫塊”(stitch-granulomas)(箭頭所示)周圍神經組織呈明顯空泡及極度纖維化。(Masson Trichrom's染色，X 200)



圖二 AFG處理組之橫切面在顯微鏡觀下，可見神經組織呈輕微空泡及纖維化。(H&E，X 100)

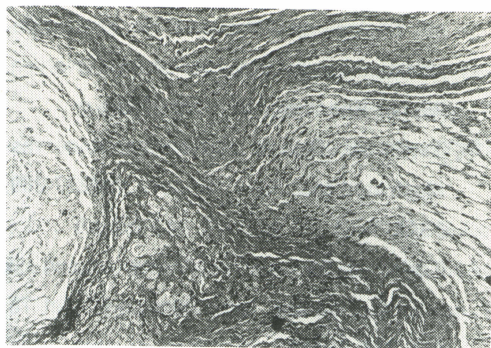


(a)



(b)

圖三 手術部位之橫切面在顯微鏡觀察下，(a)對照組可見多處“線頭肉芽腫塊”(stitch-granulomas)(箭頭所示)周圍神經組織亦呈明顯空泡及極度纖維化。其對S-100蛋白質呈黑色陽性反應。(b) AFG處理組僅可見單一“線頭肉芽腫塊”(stitch-granuloma)(中央部份)周圍神經組織呈輕微空泡及纖維化，其對S-100蛋白質亦呈黑色陽性反應。(免疫組織化學染色，抗S-100蛋白質單源抗體，X 200)



圖四 AFG處理組之縱切面在顯微鏡觀察下，可見神經組織接合處呈明顯纖維化，固定軸線 (alignment) 尚可。(Masson Trichrom's 染色, X 100)

線旁形成多處肉芽腫 (granuloma)，並在附近看到一些嗜酸性球 (eosinophil)，空泡化情形也較嚴重，顯示遭到免疫反應之破壞 (圖三)。此外，若作縱切面研究，則使用 AFG 的右腿坐骨神經接合處雖呈明顯纖維化，但其固定軸線 (alignment) 尚可，恢復情況較佳 (圖四)。因此就組織病理學上觀之，則以使用 AFG 者得到較佳之復原狀況。

討論

纖維蛋白膠黏合術與傳統顯微縫合術到底何者較優，文獻上仍有一些爭論，認為前者較好的有：Ventura et al. (1981)，Faldini et al. (1984)，Sandvoss et al. (1986)，Boedts (1987)，Narakas et al. (1988)，Chen et al. (1990) 等六篇研究報告。認為後者結果較佳的則有：Cruz et al. (1986)，Moy et al. (1988) 等二篇研究報告。此外亦有四篇報告認為兩者沒有明顯差異，包括 Becker et al (1985)，Feldman et al (1987)，Smahel et al (1987)，Medders et al (1989) 等。本研究則顯示在臨床功能評估方面兩者無統計學上差異，但在病理組織方面，則以纖維蛋白膠 (AFG) 黏合者的恢復較佳。

AFG 之優點在於其呈液狀，因此對於凹凸不整處或較深位神經亦可應用，省卻縫合時技

術上的困難，況且少縫二針 (相較於對照組)，也省了不少時間。而且由於是自體物質 (autologous) 之故，也不必擔心是否會因含有 B 型肝炎病毒 (HBV) 或愛滋病病毒 (HIV) 而造成感染，同時也減少免疫反應的發生機會。由附圖亦可看出，以 AFG 包住縫合二針處，可將免疫細胞隔絕在外，使縫線處的異物反應 (foreign body reaction) 減低至最少。此外，AFG 所牽涉到的凝血機制為一般途徑 (common pathway)，因此不論病人有否血小板之障礙，均可預期其效果。但由另一方面來看，AFG 也可能在神經之兩個斷端之間凝固而阻礙了神經之再生。因此最理想之狀況乃是製造出一種黏著力強且易被吸收之 AFG，使我們不必依賴縫合且又不必擔心 AFG 會妨礙神經之再生。

根據我們臨床評估的結果，縫合四針與縫合二針輔以 AFG，可以得到極為相近之結果。然而後者比前者節省了不少時間，對於傷患之緊急處理是十分具有價值的。此外，組織病理評估後，以後者得到的結果較佳，亦顯示了其優點。本研究所採用之病理評估方式較諸過去的文獻報告更為詳盡。但未來須在電子顯微鏡下作進一步的探討。現在吾人所面臨的問題在於 AFG 的強度仍不是很堅牢，因此目前只能做為縫合之輔助工具而尚不能完全取代之。此外，由於個人血液中纖維蛋白原及其他凝血因子含量不盡相同，因此製造出之纖維蛋白膠黏合度亦常不同。Herter 的報告指出在製備纖維蛋白膠的過程中所加入之纖維蛋白分解抑制因子 (fibrinolytic inhibitor)，(如 tranexamic acid, aprotinin 等)，可能是造成纖維化 (fibrosis) 的另一個因子，也值得作進一步的探討。

本次實驗純粹是屬於初步之測試，期望能突破以往神經縫合之手術方法。AFG 之製備方法在純度、強度、時效及吸收性方面之改良，將有助於臨床之應用。本研究室另一組研究人員正著手進行有關這方面之探研。

誌謝

本研究計劃由行政院國科會所資助，編號：NSC 81-0115-C 038-01-014 B。另外，承蒙三軍總醫院病理科李偉華主任、台北醫學院附設醫院陳新源醫師、林政輝、郭菟婷諸君之鼎力協助方得以順利進行，特此一併誌謝。

參考文獻

1. 施純仁、王有智、邱文達等：末梢神經損傷後的顯微神經縫合術，三軍總醫院醫學研究論文專輯第二卷；129-135, 1978
2. Bora FW, Pleasure DE, Didizian NA: A study of nerve regeneration and neuroma formation after nerve suture by various techniques. *The Journal of Hand Surgery* 1 (2); 138-143, 1976.
3. Cabaud HE, Rodkey WG, McCarroll HR, et al: Epineural and perineural fascicular nerve repairs: A critical comparison. *The Journal of Hand Surgery* 1 (2); 131-137, 1976.
4. Young JZ, Medawar PB: Fibrin suture of peripheral Nerves. Measurement of the rate of regeneration. *Lancet* 239; 126-128, 1940.
5. Wolf G: Autologous fibrin glue in tympanoplasty. *Am J Otol* 7; 287-288, 1986.
6. 長田尚夫：接著劑。產婦人科の實際 39 (3); 353~357, 1990.
7. Cronkite EP, Lozner EL, Deaver JM: Use of thrombin and fibrinogen in skin grafting. *JAMA* 124; 976-978, 1944.
8. 中村紀夫：局所止血劑。臨床外科 45 (3); 307-312, 1990.
9. Kuderna H, Matras H: Die klinische Anwendung der klebung von Nerven-anastomosen mit Gerinnungssubkutazen bei der Rekonstruktion verletzter peripherer Nerven. *Wiener Klin Wschr* 87; 459, 1975.
10. Tarlov IM: Plasma clot suture of nerves-illustrated technique. *Surgery* 15; 257-269, 1944.
11. Tarlov IM, Benjamin B: Plasma clot and silk suture of nerves. *Surg Gynecol Obstet* 76; 366-374, 1943.
12. Tarlov IM, Denslow C, Swarz S, et al: Plasma clot suture of nerves. *Arch Surg* 47; 44-58, 1943.
13. Ventura R, Torri G, Campari A, et al: Experimental suture of the peripheral nerves with "fibrin glue". *Ital J Orthop Traumatol* 6; 407-414, 1980.
14. Faldini A, Puntini P, Magherini PC, et al: Comparative neurophysiologic assessments of nerve sutures performed by microsurgical methods and with fibrin glue: Experimental study. *Ital J Orthop Traumatol* 10; 527-532, 1984.
15. Sandvoss G, Cervos-Navarro J, Yasargil MG: Intracranial repair of the oculomotor nerve in cats. *Neurochirurgia* 29 (1); 1-8, 1986.
16. Boedts D: A comparative experimental study on nerve repair. *Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 244 (1); 1-6, 1987.
17. Narakas A: The use of fibrin glue in repair of peripheral nerves. *Orthop Crin North Am* 19; 187-199, 1988.
18. 陳玉祥、戴中杰、胡德民：自體纖維蛋白膠在顏面神經修復上的評估。中華民國耳鼻喉科醫學會雜誌 25; 209-214, 1990.
19. Cruz NI, Debs N, Fiol RE: Evaluation of fibrin glue in rat sciatic nerve repairs. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 78 (3); 369-373, 1986.

20. Moy OJ, Peimer CA, Koniuch MP, et al: Fibrin seal adhesive versus nonabsorbable microsuture in peripheral nerve repair. *The Journal of Hand Surgery* 13 (2); 273-278, 1988.
21. Becker CM, Guening CO, Graff GL: Sutures or fibrin glue for divided rat nerves: Schwann cell and muscle metabolism. *Microsurgery* 6; 1-10, 1985.
22. Feldman MD, Sataloff RT, Epstein G, et al: Autologous fibrin tissue adhesive for peripheral nerve anastomosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 113; 963-967, 1987.
23. Smahel J, Meyer VE, Bachem U: Glueing of peripheral nerves with fibrin: Experimental studies. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. 3 (3); 211-220, 1987.
24. Medders G, Mattox DE, Lyles A: Effects of fibrin glue on rat facial nerve regeneration. *Otolaryngology* 100 (2); 106-109, 1989.
25. Herter T: Problems of fibrin adhesion of the nerves. *Neurosurgical Review* 11 (3-4); 249-258, 1988.

Evaluation of Autologous Fibrin Glue in Peripheral Nerve Regeneration

Jing-Erh Lai, Wen-Ta Chiu*, Feng-Yi Song, Han-Mo Chiu, Wen-Shuan Lee

ABSTRACT

The purpose of this work is to study the regeneration of the peripheral nerve injury. Aside from conventional microneurorrhaphy, an alternative method whereby blood taken from rabbits to create autologous fibrin glue (AFG) is utilized. New Zealand white rabbits were used in this study. Its sciatic nerves were exposed and severed at the base of the buttocks. The left leg utilized conventional microneurorrhaphy while the right was treated by AFG. Twelve rabbits underwent a total of 24 operations. Functional tests were performed 6 weeks postoperatively. Four of 12 rabbits were ruled out of the evaluation due to wound infection or death. The remaining 8 rabbits showed no significant statistical differences between microneurorrhaphy and AFG treatment. In pathohistologic findings, however, the milder vacuolation, less inflammatory reaction and eosinophils showed that AFG resulted in better histological recovery. This may be due to the fewer operative scars and less stitches in AFG treatment. A possible hypothesis for result is that the AFG may create a protective barrier against the autoimmune system. The alternative AFG also sealed the epineurium more completely than conventional microneurorrhaphy. This preliminary study suggested that the alternative AFG seal provided the potential improvement in the accuracy of the regeneration.

Department of Biochemistry, Division of Neurosurgery*

Taipei Medical College

Received for Publication: June 15, 1992.