

中华人民共和国

行业标准

XX/T XXXXX—XXXX

# 组织工程医疗器械产品 周围神经植入物 周围神经损伤修复的动物试验评价通则

Tissue-engineered medical products –Peripheral nerve implants - General  
recommendation of animal experimental evaluation for repairing peripheral nerve  
injury

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(工作组讨论稿)

(本草案完成时间: 2024-3)

在提交反馈意见时, 请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

发布

## 目 次

前言 .....	II
引言 .....	III
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 缩略语 .....	1
5 动物模型 .....	1
6 试验方案设计和试验方法 .....	2
7 临床观察与评价 .....	5
8 解剖和取材 .....	8
9 结果分析和试验报告 .....	8
附录 A（资料性） 常见周围神经缺损模型 .....	10
附录 B（资料性） 组织切片的制备 .....	11
参考文献 .....	12

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会组织工程医疗器械产品分技术委员会（SAC/TC110/SC3）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

## 引 言

周围神经植入物包括生物源性材料、合成材料及其复合材料等，被制备成条索、膜片、套管、水凝胶等不同形态，在周围神经损伤的再生修复过程中可以提供引导神经轴突生长、防止瘢痕侵入或防止吻合口粘连的微环境，促进受损神经结构的修复和功能的重建。周围神经植入物的安全性和有效性必须通过临床前的体内试验来进行验证和评价，建立有效的周围神经损伤修复动物模型和普适性的统一评价体系是保证体内试验可靠和可比较的关键。由于每一种动物模型都各有其优势和不足，并没有某个确切的动物种属能完全复制人体周围神经损伤后再生的特征性生物学过程，因此，需要综合考量动物种属的神经生物学特性、遗传稳定性、寿命、可用实验动物数量、动物的经济及管理成本，以及社会伦理和管理法规的相关要求等诸多因素，遵循相似性、再现性、可靠性、适用性、可控性、易行性等实验动物模型复制的一般原则，将周围神经植入物临床前体内评价的动物模型及其试验和评价方法合理化、标准化。

常用的周围神经损伤动物模型按损伤建立方法的不同，有卡压伤模型、牵拉伤模型和横断伤模型等，其中横断伤通过选择性切断目标周围神经来造成受损神经支配区的运动功能、感觉功能及自主神经功能障碍，模拟了神经断裂的情况，是最严重的一种神经损伤；其制作流程简单，建模方法稳定，可重复性强，具有损伤级别的统一性，有利于定性定量分析，适用于神经再生组织工程研究和失神经支配区病理变化及其影响因素探讨。

周围神经损伤修复按手术范式的不同，可分为直接缝合、移植物桥接和吻合口包裹三种类型，其中，直接缝合适用于无缺损或无明显张力的微小神经缺损的修复，移植物桥接适用于不能直接缝合或缝合后产生较大张力的神经缺损修复，吻合口包裹则用于防止神经端端吻合后吻合口与周围组织粘连，以及非完全离断性神经损伤的辅助治疗。

常用的周围神经损伤修复动物模型按实验动物分类，包括大鼠、兔等小动物和狗、猪、羊以及猴等大动物试验模型，不同动物基于其神经直径、长度、类型等解剖形态特征，适用于不同的研究目的。小动物模型易于管理，成本较低，其中，大鼠坐骨神经是其周围神经中最大的神经，周围软组织条件良好，易于显微手术操作，不易感染，遗传稳定性好，能够便利地进行神经修复的功能性评价，利于在更短的时间内高通量产出研究结果以进行统计分析和评估，可参考比较的研究数据丰富，相较于其他动物模型具有显著优势，故大鼠坐骨神经损伤模型是周围神经修复研究中最普遍应用的小动物模型；但啮齿类动物的神经再生能力过强，限制了其试验结果预示临床疗效的可靠程度；此外，大鼠周围神经长度有限，通常<15 mm，不适于作为长段神经缺损修复的研究模型。实验兔的体型、体重和神经结构均较大鼠更大，易于造模、取材及对神经微结构进行观察与研究，是周围神经损伤修复研究的常见选择；其坐骨神经长度较长，易于制作3-4厘米的缺损，常用作较大神经缺损的非啮齿动物模型；其咀嚼肌运动活跃，下颌发育充分，适用于面神经修复模型，是头颈周围神经修复的代表模型。大动物模型的优势在于其神经组织修复及功能重建行为更接近于人，寿命更长，可以实现更长时间内对周围神经再生行为的评价。其中，比格犬则是世界卫生组织推荐的标准化动物，是大动物模型中最常使用的动物；狗的神经纤维数量和神经大小接近人，其腓总神经常用于周围神经损伤修复模型。猴在物种上与人高度相似，且能够进行远端的精细运动，主要用于建立桡神经、尺神经等上肢神经模型；羊的正中神经与人尺神经和正中神经的尺寸相当，股神经与人尺神经长度相近，再生行为也与人相似，羊正中神经模型有望成为周围神经修复研究的大动物代表模型。但大动物体积更大，导致神经再支配的距离增加；大动物模型，尤其是灵长类动物的神经再生研究，普遍受限于周期较长、成本过高、实验动物数量有限、伦理审核难于通过、可参考比较的数据较少等问题。

遵循《医疗器械动物试验研究注册审查指导原则》、结合产品用途选择适宜的动物模型、获得充分的临床前体内评价基础数据，是符合减少（Reduction）、替代（Replacement）和优化（Refinement）的3R原则、科学客观评价周围神经修复材料安全性和有效性的优化模式。

周围神经损伤修复动物模型及其试验方法的研究仍处于持续发展中，本文件提供了具有代表性的大鼠坐骨神经、兔坐骨神经/腓总神经及面神经、犬坐骨神经及腓总神经损伤模型和方案以及手术操作示例，但并不排除其他可用的动物模型及试验方法应用于临床前评价。

尽管动物模型近似模拟了临床上人体的生理条件，这些模型也仅代表人体对病理因素的大致反应，不一定能完全预示人体使用效果，标准的使用者有责任保证体内试验的可靠性、确定规则的适用性，谨慎解释临床前体内试验结果在人体的可能适用条件。

# 组织工程医疗器械产品 周围神经植入物 周围神经损伤修复的临床前体内评价方法

## 1 范围

本文件规定了大鼠坐骨神经、兔坐骨神经/腓总神经及面神经和犬坐骨神经/腓总神经损伤动物模型的制备方法和相应试验操作示例，以及形态学、组织学、电生理、行为学分析等测定和评价方法。

本文件适用于周围神经植入物的临床前体内试验评价。

注：特定临床应用目的的动物试验研究，可选用相应的特定神经损伤模型，如指/趾神经等。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1部分：风险管理过程中的评价与试验

GB/T 16886.2 医疗器械生物学评价 第2部分：动物保护要求

GB/T 16886.6 医疗器械生物学评价 第6部分：植入实验

GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照样品

GB 14925 实验动物 环境及设施

YY/T 1576 组织工程医疗器械产品 可吸收材料植入试验

YY/T XXXX 组织工程医疗器械产品 生物源性周围神经修复植入物通用要求

## 3 术语和定义

YY/T 1670.1及YY/T XXXX 中界定的术语和定义适用于本文件。

### 3.1

#### 髓鞘 Myelin sheath

包绕有髓神经纤维的管状外膜，其化学成分为髓磷脂，又称髓磷脂鞘；周围神经系统的髓鞘由施万细胞的胞膜融合、并呈同心圆状包裹轴突而形成。

注：髓鞘具有绝缘作用，能提高神经冲动的传导速度，并保证其定向传导，增强神经细胞与组织间的连接。

### 3.2

#### 髓鞘化 Myelination

神经系统发育或神经损伤修复过程中髓鞘形成的过程。

### 3.3

#### 周围神经临界缺损长度 Critical Gap Length (CGL) of peripheral nerve[3]

指动物周围神经损伤后可以自行修复的最大长度，是由动物种属决定的固有性能。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CGL 周围神经临界缺损长度 Critical Gap Length;

DRG 背根神经节 Dorsal root ganglion;

## 5 动物模型

### 5.1 动物种属

本文件推荐用于周围神经损伤修复的小动物模型首选大鼠和兔，大动物模型首选比格犬。如选用其他动物种属的，应说明合理性。

## 5.2 周围神经损伤动物模型选择原则

应按照GB/T 16886.2规定的实验动物要求选择动物和设计；根据产品的预期用途、适用的手术范式、周围神经缺损的长度、以及动物的体型限制来选择和建立动物模型。一般考虑参见表1。一般情况下，神经组织修复及功能重建等中长期评价项目推荐选用大动物模型进行。

表1 周围神经损伤动物模型选择

产品预期用途	手术范式	周围神经缺损长度 mm	选用模型	动物种属	品系	基线情况 年龄/体重/性别
防粘连、辅助治疗等膜类产品	神经端端吻合	0	大鼠坐骨神经离断伤模型	大鼠	Sprague-Dawley (SD) 或 Wistar 或 Lewis 或 Fischer	成年 150 g~300 g 雌雄不限
小间隙移植桥接材料等	神经小间隙吻合	0~5	大鼠坐骨神经小间隙缺损模型	大鼠	同上	同上
周围神经导管等	神经桥接修复	5~15	大鼠坐骨神经长段缺损	大鼠	同上	同上
		5~50	兔坐骨神经/腓总神经缺损	兔	新西兰白兔 日本大耳白兔 中国白兔	成年 2.5 kg~5 kg 雌雄不限
			兔面神经缺损			
5~50	犬坐骨神经/腓总神经缺损	犬	比格犬	成年 8 kg~15 kg 雌雄不限		

注1：根据文献报道，推荐大鼠坐骨神经临界缺损长度CGL为10 mm，宜不大于15 mm；兔腓总神经临界缺损长度CGL为30 mm，宜不大于50 mm；比格犬坐骨神经/腓总神经临界缺损长度CGL为30 mm，宜不大于50 mm。  
注2：常用不同动物种属的周围神经临界缺损尺寸以及各模型选用的最大缺损尺寸值参见附录A。

## 5.3 实验动物管理

5.3.1 动物饲养与管理按 GB/T 16886.2 和 GB 14925 的要求进行。动物试验方案需经过动物福利和伦理审查，应符合国家《实验动物管理条例》、《实验动物质量管理办法》、《医疗器械动物试验研究注册审查指导原则》有关规定。

5.3.2 应使用质量合格的 SPF 级实验动物或检疫合格的实验用动物，在具备动物实验资质（如：有关部门颁发的动物实验资格证明文件）的机构开展动物实验，以保证动物实验结果真实、可靠。

5.3.3 应将动物饲养记录、镇痛麻醉记录、手术过程记录、原始病理照片、手术切片、手术录像等实验原始资料、对动物麻醉死亡等非预期事件的有关证据及分析资料等归档保存，避免不同术者手术操作差异、动物麻醉死亡、手术死亡、术后感染及其他意外情况对产品评价产生影响。

## 6 试验方案设计和试验方法

### 6.1 供试品和对照品

6.1.1 供试品：应按 GB/T 16886.1 的要求经过生物学评价，可吸收生物材料的相容性宜参考 YY/T 1576 进一步评价。应参照 GB/T 16886.12 的要求进行制备，与最终产品的制造、处理、清洗及灭菌等全过程一致，且保持完好直至植入。

6.1.2 对照品：应参照 GB/T 16886.12 的要求，所选择的对照品材质、结构设计、预期用途应与供试品一致或尽可能相似，其所采用的处理、清洗及灭菌方法应能保持可接受性和良好的对照性，以境内已上市产品或已被临床所接受的同类材料作为首选对照样品；无同类或已上市产品时，可选择切取自体神经作为对照。

6.1.3 对照品和供试品应以相同条件施行植入手术，试验动物的种属、品系、年龄、性别、体重及解剖部位均应保持一致。

6.1.4 试验需进行随机化分组，如适用，建议设置如下2个对照组：空白组、上市产品组或自体神经移植组。

## 6.2 试验样品尺寸

试验样品应根据供试品产品的预期用途和使用的动物模型设定植入尺寸。一般地，基于受损神经功能重建要求和供试品促进神经修复有效性评价的考量，试验样品尺寸宜至少长于模型缺损长度2 mm。

## 6.3 样本量

鉴于实验动物的变异性，综合统计学因素，应保证试验植入的试验品及对照品的动物样本量均不少于10只。

## 6.4 评价指标

宜根据供试品的预期用途、动物神经损伤模型设置评价指标；常用检测及评价的项目如表2。

表2 检测评价指标

序号	评价项目	检测/观察指标	大鼠模型	兔模型	比格犬模型
1	行为学（运动功能）	足迹分析-坐骨神经功能指数/趾展试验（大鼠适用） 踝关节指数（兔坐骨/腓总神经适用）* 面部对称指数/触须运动评分（兔面神经适用） 录像法（比格犬适用）*	√	√	√
2	感觉神经功能*	针刺试验	√	/	/
3	神经电生理	神经传导速度(NCV)； 动作电位波幅(CMAP)	√	√	√
4	大体观察	与周围组织的粘连、受压情况； 缝合口的连续性、有无神经瘤的形成等	√	√	√
5	组织反应*	炎性细胞的数量、纤维包裹的厚度 血管的生成、细胞浸润程度等	√	√	/
6	肌肉恢复率	靶肌肉称重（患侧/健侧）（坐骨/腓总神经模型适用）；或 靶肌肉小腿中段周长比（患侧/健侧）（大鼠适用）	√	√	√
7	组织形态学	新生神经纤维，包括轴突和髓鞘； 髓鞘数量、厚度及直径，G-ratio	√	√	√
8	免疫组化/荧光	新生神经纤维，包括轴突和髓鞘	√	√	√
9	超微结构观察*	再生神经纤维的超微结构观察	√	√	√
注1：*项为选做项目； 注2：同一评价项目中，可根据评价目的，选择1项或多项指标进行检测评价。					

## 6.5 试验周期和观察时间

6.5.1 在开展体内试验前，应通过体外实时、加速降解实验等预先评估供试品的降解性能和降解周期。对于可降解吸收的供试品，试验周期应长于试验样品降解吸收的时间；对不降解或不能完全降解的产品，试验周期应覆盖相应的组织反应达到一定稳定状态所需的时间。

6.5.2 根据所选择的动物模型种类、产品的降解/吸收周期、轴突形成、髓鞘化及趋化性再生等因素，原则上观察期应至少设置3个节点，宜覆盖供试品于体内转归的各个阶段，包括：

- a) 移植反应的早期阶段，没有或仅有少许降解；
- b) 降解及组织修复过程，降解达到50%~70%左右；
- c) 完全降解或达到组织修复的稳定阶段。

## 6.6 试验方法

### 6.6.1 大鼠坐骨神经损伤模型手术方法

手术操作示例如下，见表3：

表3 大鼠坐骨神经损伤模型手术操作示例

序号	手术流程		手术操作步骤示例
1	麻醉、备皮		a. 对试验大鼠称体质量后腹腔注射2%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉; b. 麻醉成功后,将术区(臀部和大腿后方)毛发剃干净; c. 取俯卧位固定四肢,2%碘町和75%酒精常规消毒,铺无菌孔巾。
2	显露、游离神经		a. 于一侧股后外侧、股骨下缘行纵行、长约30 mm切口,逐层切开皮肤和皮下组织; b. 沿肌肉间隙分离,显露坐骨神经及其主要分支; c. 将盐酸利多卡因滴于显露的坐骨神经上。
3	模型制备	端端吻合模型	剪断坐骨神经,过程中应尽量避免和减少出血。
		小间隙缺损模型	剪断坐骨神经,自然回缩形成缺损,过程中应尽量避免和减少出血。
		长段缺损模型	剪断坐骨神经,待自然回缩,由近端至远端切除神经,制作试验方案所设定长度的缺损;过程中应尽量避免和减少出血。
4	材料植入	端端吻合模型	a. 显微镜下用8/0-10/0无损伤缝线行神经端端吻合; b. 供试品组/上市产品对照组:在缝合口包裹受试品,确认植入材料无扭曲、翻转等异常; c. 空白组:不做处理。
		小间隙缺损模型	a. 供试品组/上市产品对照组:保持神经缺损为1mm~3mm,将受试品置入缺损部位,显微镜下用8/0-10/0无损伤缝线将材料两端分别与两断端神经外膜间断缝合2~4针,确认远端解剖学标志对位良好; b. 空白组:于显微镜下用8/0-10/0无损伤缝线行神经端端吻合。
		长段缺损模型	a. 供试品组/上市产品对照组:将受试品置入缺损部位,显微镜下用8/0~10/0无损伤缝线将材料两端分别与两断端神经外膜间断缝合2~4针,确认神经远端解剖学标志对位良好; b. 自体神经移植组:切取所需长度的自体神经段,翻转后回植,于显微镜下用8/0-10/0无损伤缝线分别与两神经断端吻合; c. 空白组:不做处理。
5	缝合		以4/0缝线逐层缝合肌肉、筋膜、皮下及皮肤,常规消毒包扎,清除皮肤表面血迹。
6	术后管理		术后常规管理,防止撕咬和感染,观察精神状态、饮食状况及伤口愈合情况。

## 6.6.2 兔坐骨/腓总神经缺损模型手术方法

手术操作示例如下,见表4:

表4 兔坐骨/腓总神经缺损模型手术示例

序号	手术流程		手术操作步骤示例
1	麻醉、备皮		a. 对试验兔称体质量后以3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉; b. 麻醉成功后,将术区(臀部和大腿后方)毛发剃干净; c. 取俯卧位固定四肢,2%碘町和75%酒精常规消毒,铺无菌孔巾。
2	显露、游离神经		a. 于一侧大腿中下段后外侧切口,切口长度根据试验方案待植入受试品的长度确定; b. 沿股二头肌和内收肌之间肌肉间隙分离,显露坐骨神经、腓总神经和胫神经; c. 将坐骨神经自梨状肌下缘至膝关节上缘游离,滴加盐酸利多卡因。
3	模型制备	坐骨神经缺损模型	自梨状肌以远切断坐骨神经,待自然回缩,由近端至远端制作试验方案所设定长度的缺损。
		腓总神经缺损模型	距坐骨神经分叉处2 mm~10 mm剪断腓总神经,待自然回缩,由近端至远端制作试验方案所设定长度的缺损。
4	材料植入		供试品组/上市产品对照组:将受试品置入缺损部位,显微镜下用8/0~10/0无损伤缝线将材料两端分别与两断端神经外膜间断缝合4~8针; 自体神经移植组:切取所需长度的自体神经段,翻转后回植,于显微镜下用8/0-10/0无损伤缝线分别与两神经断端吻合; 空白组:不做处理。
5	缝合		以4/0缝线逐层缝合肌肉、筋膜、皮下及皮肤,常规消毒包扎。
6	术后管理		术后常规给予分笼饲养。连续3天肌肉注射恩诺沙星(5 mg/kg),预防感染。

## 6.6.3 兔面神经缺损模型手术方法

手术操作示例如下，见表5：

表5 兔面神经缺损模型手术操作示例

序号	手术流程	手术操作步骤示例
1	麻醉、备皮	对试验兔称体质量后以3%戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔麻醉；去除面部毛发，侧卧位固定于手术台上并消毒。
2	显露、游离神经	取口角至耳前连线中点切开皮肤，切口长度根据试验方案待植入受试品的长度确定；分离咬肌表面筋膜，显露面神经主干及其分支。
3	模型制备：下颊支缺损模型	切断下颊支，待自然回缩，制作试验方案所设定长度的神经缺损。
4	材料植入	供试品组/上市产品对照组：将受试品置入缺损部位，显微镜下以10/0无损伤丝线3~4针吻合神经外膜； 自体神经移植组：切取所需长度的自体神经段，翻转后回植，显微镜下以10/0无损伤丝线分别与两神经断端吻合； 空白组：不做处理。
5	缝合	庆大霉素喷洒创面后，以4/0缝线逐层缝合肌肉、筋膜、皮下及皮肤，常规消毒包扎。
6	术后管理	术后常规给予分笼饲养。每2天以碘伏溶液消毒术区创面，连续3次。

#### 6.6.4 比格犬坐骨/腓总神经缺损模型手术方法

手术操作示例如下，见表6：

表6 比格犬坐骨/腓总神经缺损模型手术示例

序号	手术流程	手术操作步骤示例
1	麻醉、备皮	对试验比格犬称体质量后用3%戊巴比妥钠(1 mg/kg)静脉注射+速眠新注射液(846合剂)(0.08 ml/kg)肌肉注射麻醉；常规备皮消毒、配皮，侧卧位固定四肢，铺无菌孔巾。
2	显露、游离神经	坐骨神经缺损模型 于一侧臀部至大腿后外侧切口，切口长度根据试验方案待植入受试品的长度确定；沿肌肉间隙分离，显露坐骨神经及其主要分支；滴加盐酸利多卡因于显露的坐骨神经上。
		腓总神经缺损模型 于一侧大腿中下段后外侧切口，切口长度根据试验方案待植入受试品的长度确定；沿肌肉间隙分离，显露坐骨神经、腓总神经和胫神经；滴加盐酸利多卡因于腓总神经上。
3	模型制备	坐骨神经缺损模型 自梨状肌以远剪断坐骨神经，待自然回缩后由近端至远端制作试验方案所设定长度的缺损。
		腓总神经缺损模型 距坐骨神经分叉处2 mm~10 mm剪断腓总神经，待自然回缩后由近端至远端制作试验方案所设定长度的缺损。
4	材料植入	供试品组/上市产品对照组：将受试品置入缺损部位，显微镜下用8/0~10/0无损伤缝线将材料两端分别与两断端神经外膜各间断缝合4~8针； 自体神经移植组：切取所需长度的自体神经段，翻转后回植，显微镜下以10/0无损伤丝线将其两端分别与两神经断端吻合； 空白组：不做处理。
5	缝合	以4/0缝线逐层缝合肌肉、筋膜、皮下及皮肤，常规消毒包扎。
6	术后管理	术后三天均肌肉注射80万单位青霉素，预防感染。术后常规给予分笼饲养。

## 7 临床观察与评价

### 7.1 临床观察

植入周期内每天观察动物的一般状态，记录任何异常，如自噬、伤口、双下肢足底有无溃疡形成及愈合情况等。若有动物死亡，应及时尸检并分析、记录原因；垂死动物应及时隔离处理。

在试验方案设定的观察时间点进行活体评价项目。

### 7.2 临床评价

7.2.1 行为学分析

7.2.1.1 小动物行为学分析：大鼠

7.2.1.1.1 足迹分析-坐骨神经功能指数的测定

在试验方案设置的观察时间点进行。

- (1) 在大鼠双侧后足底部涂上黑墨水，然后让其走过一个40 cm×8 cm底部铺有白纸、末端连接暗箱的过道，行走后白纸上留下足迹；
- (2) 分别测量实验侧（E）和正常侧（N）的足印长度（Print length, PL）、足距宽度（Toe spread, TS）和中间足趾宽度（Intermediary toe spread, ITS）。其中，足印长度PL测量值为足跟到足尖的最长距离；足距宽度（Toe spread, TS）测量值为第一趾到第五趾之间的连线距离；中间足趾宽度（Intermediary toe spread, ITS）测量值为第二趾到第四趾之间的连线长度。
- (3) 将测得的参数代入式（1），计算坐骨神经功能指数（Sciatic Function Index, SFI）。

$$SFI = -38.3(EPL - NPL)/NPL + 109.5(ETS - NTS)/NTS + 13.3(EITS - NITS)/NITS - 8 \dots \dots \dots (1)$$

式中：

- SFI ——坐骨神经功能指数；
- EPL ——试验侧足印长度，mm；
- NPL ——正常侧足印长度，mm；
- ETS ——试验侧足距宽度，mm；
- NTS ——正常侧足距宽度，mm；
- EITS——试验侧中间足趾宽度，mm；
- NITS——正常侧中间足趾宽度，mm。

(4) 结果判定：

SFI为0表示功能正常；-100表示坐骨神经功能完全丧失。SFI绝对值越大，代表运动功能越差。

7.2.1.1.2 趾展试验

在试验方案设置的观察时间点进行。

提住大鼠尾巴根部使大鼠悬吊，待健侧后肢足趾完全伸展时，根据足趾伸展分级评价量表（表7）对患肢足趾伸展情况进行赋分。操作中注意双侧对比。

表 7 足趾伸展分级评价量表

评分	临床特征
0 级	患肢没有足趾伸展
1 级	患肢足趾部分伸展
2 级	患肢足趾完全伸展，并且维持伸展状态超过2 s

7.2.1.2 小动物行为学分析：兔

7.2.1.2.1 兔坐骨/腓总神经损伤：踝关节指数

在试验方案设置的观察时间点进行。

- 1) 采用高速摄像机记录实验兔踝关节跳跃过程中踝关节活动情况，实验兔从静止-跳跃-静止即为一个完整跳跃周期；
- 2) 录制5个跳跃周期，通过MATLAB软件将获取的视频输出为系列图片(2帧/张)；
- 3) 测量系列图片中兔在跳跃过程中的踝关节角度(Q°)，即以踝关节为支点，其连接的下肢与足爪之间形成的夹角；
- 4) 绘制运动时间(t)-角度(Q°)曲线，分析踝关节指数。

$$\text{踝关节指数} = Q^\circ_{\text{最大}} - Q^\circ_{\text{最小}} \dots \dots \dots (1)$$

式中：Q° ——兔跳跃过程中踝关节角度

### 7.2.1.2.2 兔面神经损伤：面部对称性分析、触须运动评分

#### a) 面部对称性指数：

于术前及术后观察时间点进行。

用高清相机拍摄静止状态下的兔面部表情，分别测量鼻唇中线与双侧上唇之间的夹角 $Q^\circ$ ，观察唇部偏斜情况，统计分析面部对称性指数。

结果判定：对称性指数绝对值越低表明对称性越好，面神经的修复越好。

$$\text{面部对称性指数} = Q^\circ_{\text{术侧}} - Q^\circ_{\text{健侧}} \dots\dots\dots (1)$$

式中： $Q^\circ$  ——鼻唇中线与上唇之间的夹角

#### b) 触须运动

于术前及术后观察时间点进行。

使用固定机位高清摄像机（25 帧/s）拍摄兔的面部运动视频15 s，记录触须运动。通过MATLAB软件将获取的视频输出为系列图片（2帧/张）。由两位经过培训、且对干预措施不知情的测试员独立评估视频，比较术侧和正常侧触须拂动的程度和对称性，并根据触须运动分级评价量表（表8）赋分。

结果判定：分值越高表明面神经运动功能恢复越好。

表 8 触须运动分级评价量表

评分	临床特征
0	触须拂动消失
1	触须拂动轻微
2	触须拂动缓慢
3	触须拂动正常且双侧对称

### 7.2.1.3 大动物行为学分析：录像法

在试验方案设置的观察时间点进行。用高精度摄像机拍照和录像，进行步态分析：比较手术侧后肢的运动行为特征及双侧后肢的运动协调能力，包括保持上肢抬起的站立姿势时后肢的负重表现和跖趾关节跖屈位情况等。

### 7.2.2 感觉神经功能：针刺测试 Pinprick Test

在试验方案设置的观察时间点进行。

由经过培训、且对干预措施不知情的测试员用标准钝头骨针对大鼠后肢脚趾到膝关节段皮肤施加挤压刺激，观察因疼痛刺激引起的反应，并根据刺激分级评价量表（表9）对感觉功能恢复情况赋分。

结果判定：分值越高表明感觉神经功能恢复越好。

表 9 刺激分级评价量表

评分	临床特征
0	对任何区域的刺激均无反应
1	刺激踝关节以上区域有反应
2	刺激足跟/足底区域脚踝远端有反应
3	刺激跖骨区域有反应

### 7.2.3 神经电生理检测

在试验方案设置的观察时间点进行。

腹腔麻醉试验动物后，无菌条件下，在原手术切口处暴露所植入受试品的近、远侧端，采用电生理仪检测并记录复合肌肉动作电位（Compound muscle action potentials, CMAP）。刺激电极位于神经移植物的近、远端，记录电极位于神经支配的目标肌肉，地线位于记录电极附近肌肉。

测量两个刺激电极间的距离和潜伏期，并通过式（4）计算出神经传导速度（Nerve conduction velocity, NCV）。同时记录双侧CMAP的波幅，数据用实验侧与正常侧波幅之比来表示。

$$\text{神经传导速度} = \text{冲动传导距离} / \text{冲动传导所需时间} \dots\dots\dots (1)$$

## 8 解剖和取材

### 8.1 大体解剖观察

在试验方案设定的试验终点，按GB/T16886.2的要求，以适用方式人道地处死动物并取材。

无菌条件下，由原手术入路完整暴露受试品，肉眼观察受试品与周围组织的粘连、离断情况，有无神经瘤的形成、材料降解情况等。沿受试品上下各5 mm截断坐骨/腓总/面神经取样，处理后制备切片，方法参照附录B。

### 8.2 组织形态学评价-组织反应

用石蜡切片进行HE染色，在光学显微镜下观察并采集图像，观察炎性细胞浸润，纤维包裹厚度，血管生成及细胞浸润程度。

### 8.3 组织形态学评价-新生神经纤维：髓鞘数量、厚度、直径、G-ratio

按下列步骤进行：

a) 将受试品和远端神经进行修剪，4 ℃条件下在2.5 % (v/v)的戊二醛中固定2 h后，继续使用1 % (w/v) 四氧化锇进行后固定20 min。梯度乙醇脱水，并包埋在Epon 812环氧树脂中，使用超薄切片机制备半薄切片(1.0 μm)和超薄切片(50.0 nm)。

b) 超薄切片经乙酸双氧铀和枸橼酸铅染色后，应用透射电镜观察。半薄切片用1%的甲苯胺蓝/1%硼砂溶液染色后，光学显微镜下观察。形态学测量评估：各组轴突再生情况通过平均髓鞘厚度(the mean thickness of myelin sheath)、有髓神经纤维平均直径(the mean diameter of the nerve fibers)、G-ratio(the axon to fiber diameter ratio)评价。

c) 切片行甲苯胺蓝染色后，在光学显微镜下观察并采集图像，其中每个切片选择5个高倍视野(×1000, 切片的中央、顶部、底部、左侧和右侧)进行分析，通过Image-Pro Plus软件计算有髓神经纤维的平均密度(轴突数量/mm<sup>2</sup>)。

### 8.4 免疫组化/荧光-新生神经纤维轴突、髓鞘

冰冻切片免疫荧光染色。冰冻切片0.3 % (v/v) Triton-X溶液漂洗30 min, 10 %马血清封闭2 h, 加入一抗(NF200 1:1000和 S100 1:1000), 4 ℃湿盒内孵育24 h, PBS(p H 7.4)彻底漂洗3次后, 加入荧光标记的二抗(FITC 1:200和 CY3 1:200), 室温下避光完全反应2 h后, PBS彻底漂洗后甘油封片, 激光共聚焦显微镜、荧光显微镜观察结果。

### 8.5 超微结构观察-透射电镜(TEM)

使用超薄切片透射电镜观察髓鞘纤维、施万细胞、再生血管、髓鞘板层结构等，进一步分析再生轴突和髓鞘的成熟度。

### 8.6 运动神经功能-靶肌肉神经再支配评价

按以下方法进行运动神经功能分析。

#### a) 靶肌肉湿重比

完整切取术侧与健侧神经支配的靶肌肉，以纸巾等将表面附着血液吸取干净，电子天平称重。按式(5)计算靶肌肉湿重比。

$$\text{靶肌肉湿重比} = (\text{术侧肌肉湿重} / \text{健侧肌肉湿重}) * 100\% \dots\dots\dots (1)$$

#### b) 小腿中段周长比

分别测量术侧与健侧小腿中段周长，按式(6)计算。

$$\text{小腿周长比} = (\text{术侧小腿中段周长} / \text{健侧小腿中段周长}) * 100\% \dots\dots\dots (2)$$

## 9 结果分析和试验报告

## 9.1 结果分析

采用观察、检测记录分析，结合病理解剖的综合评价方式进行试验结果的分析 and 评价。具体宜包括如下内容：

- a) 定量指标的统计描述应计算均值、标准差、中位数、最小值、最大值，下四分位数（Q1），上四分位数（Q3）；分类指标的统计应描述各类的例数、发生率及构成比；
- b) 动物模型实验采用单只动物分别植入受试品或对照产品，对两组一般情况的比较应根据指标的类型采用适当的方法进行分析，定量资料的组间比较采用成组 t 检验或 Wilcoxon 秩和检验，分类数据采用卡方检验或精确概率法，等级资料采用 Wilcoxon 秩和检验。提供试验组与对照组的优良率差值及其可信区间。
- c) 动物试验结论需包括统计学分析与生物学数据分析，并结合临床预期用途作出综合总体评价。

## 9.2 试验报告

试验报告应提供详细的数据资料，以能够对结果作出独立的评价，至少应包括以下内容：

- a) 所有受试品及对照品的详细信息、试验方案、手术操作过程及评价方法；
- b) 取样与组织学制备方法、图像分析软件的名称及版本号、结果的综合及比较评价；
- c) 应注明检测机构和检测日期。

附 录 A  
(资料性)  
常见周围神经缺损模型

表A给出了文献报道的及选用的最大缺损尺寸。

表 A.1 文献报道的不同种属动物的各种周围神经缺损模型及选用的最大缺损尺寸

种属	品系	年龄	体重	神经类型	选用的缺损长度/mm	材料特征
大鼠	Lewis, SD, Wistar	成年	250 g~300 g	坐骨神经	15*[3]/30	Collagen <sup>[4]</sup> , PCL <sup>[5]</sup> , PVC <sup>[6]</sup> , Chitosan <sup>[7]</sup> , Silicone <sup>[8]</sup> , PLGA <sup>[9]</sup> , Collagen <sup>[10]</sup>
	Lewis	成年	200 g~220 g	正中神经	20	trimethylenecarbonate-co-epsilon-caprolactone <sup>[11]</sup>
	Lewis	成年	200 g~300 g	股神经	10	羊膜 <sup>[12]</sup>
	Wistar	成年	~250 g	胫神经	20	Collagen <sup>[13]</sup>
	Fischer	成年	~250 g	腓神经	14	Glycolide trimethylene carbonate/ collagen <sup>[14]</sup>
	Wistar	成年	~400 g	腓肠神经	10	硅胶 <sup>[15]</sup>
	Lewis	成年	——	面神经	7	硅胶 <sup>[16]</sup>
	SD	成年	~350 g	齿槽神经	10	Collagen <sup>[17]</sup>
	Fischer	成年	250 g~300 g	海绵体神经	5	硅胶+施万细胞 <sup>[18]</sup>
兔	新西兰大白兔	成年	2.5 kg~3 kg	腓总神经	30*[3]/40	Collagen/Col+ GAG <sup>[19]</sup> 、PHB <sup>[20]</sup>
	新西兰大白兔	成年	2.5 kg~3 kg	腓神经	40	PHB+GGF <sup>[21]</sup>
	日本大白兔	成年	4 kg~4.5 kg	坐骨神经	50	Poly-lactic acid+ε-caprolactone (PLAC)+肌肉 <sup>[22]</sup>
	新西兰大白兔	成年	2.5 kg~3 kg	腹膜神经	60	自体静脉导管+自体施万细胞 <sup>[23]</sup>
	新西兰大白兔	成年	2.5 kg~3 kg	面神经	13	硅胶+NGF <sup>[24]</sup>
	新西兰大白兔	成年	2.5 kg~3 kg	胫神经	40	自体静脉导管 <sup>[25]</sup>
	新西兰大白兔	成年	2 kg~3 kg	桡神经	5	胶原 <sup>[26]</sup>
	新西兰大白兔	成年	3.5 kg	隐神经	10	硅胶 <sup>[27]</sup> 、胶原 <sup>[28]</sup>
	日本大白兔	成年	~4.5 kg	下牙槽神经	6	ePTEF <sup>[29]</sup> 、硅胶+NGF <sup>[30]</sup>
狗	比格犬	成年	6 kg~9 kg	坐骨神经	30*[3]/50	人工组织神经+神经再生素 <sup>[31]</sup> 、PGA/Chitosan <sup>[32]</sup> 、Chitosan/collagen <sup>[33]</sup> PLGA/Chitosan+BMSC <sup>[34]</sup>
	比格犬	成年	8 kg~15 kg	腓神经	80	PGA/Collagen <sup>[35]</sup>
	蒙古犬	成年	15 kg~25 kg	尺神经	54	硅胶+神经移植 <sup>[36]</sup>
	杂交犬	成年	8 kg~11 kg	胫神经	25	PLGA-Chitosan <sup>[37]</sup>
	蒙古犬	成年	9 kg~12 kg	面神经	20	Millipore <sup>[38]</sup>
	比格犬	成年	10 kg~12 kg	腹后神经	10	PGA/Collagen <sup>[39]</sup>
	比格犬	成年	10 kg~15 kg	膈神经	10	PGA/Collagen <sup>[40]</sup>
	比格犬	成年	7 kg~15 kg	喉返神经	10	PGA/Collagen <sup>[41]</sup>
猪	小型猪	5 m~7 m	30 kg~40 kg	腓总神经	40*[3]/50	隐神经自体移植 <sup>[42]</sup>
	小型猪	5 m~7 m	30 kg~40 kg	坐骨神经	10	Collagen + fibrin glue <sup>[43]</sup>
	小型猪	5 m~7 m	30 kg~40 kg	尺神经	80	脱细胞神经/自体神经 <sup>[44]</sup>
猴	猕猴	成年	3 kg~6 kg	正中神经	50	Collagen <sup>[45]</sup>
	狨猴	成年	3 kg~6 kg	桡神经	25	猪脱细胞神经 <sup>[46]</sup>
	猕猴	成年	3 kg~6 kg	尺神经	50	Glycolide trimethylene carbonate (GTMC) <sup>[47]</sup>
羊	山羊	成年	20 kg~25 kg	腓总神经	30	Chitosan+BMSC <sup>[48]</sup>
	绵羊	成年	20 kg~25 kg	桡神经	80	同种异体脱细胞神经 <sup>[49]</sup>
	绵羊	成年	20 kg~25 kg	正中神经	30	冻融肌肉 <sup>[50]</sup>

注：\*文献报道的临界缺损长度

## 附录 B (资料性) 组织切片的制备

### B.1 组织切片分类

分三种方法对取样组织进行处理及固定:

- a) 4 %多聚甲醛固定液中固定, 制备石蜡切片;
- b) 2.5 %戊二醛液固定后, 备做电镜;
- c) 液氮中冷冻, 备做冰冻切片。

### B.2 石蜡切片制备

在4%多聚甲醛中固定6 h~24h后, 乙醇梯度脱水、透明、浸蜡、包埋。石蜡块放在-20 °C冰箱中降温xx min, 在切片机上纵行切片, 切片厚度4 um, 置于水槽中展开、捞片和贴片。标本玻片于60 °C烘烤2 h, 二甲苯脱蜡 (I、II 各15 min), 不同浓度酒精 (100 %、95 %、80 %、70 %) 置换二甲苯并经蒸馏水水化后即可进行染色。

### B.3 冰冻切片制备

冰冻组织采用恒温冰冻切片机连续切片。切片时, 低温室内温度以-15 °C ~ -20°C为宜, 温度过低组织易破碎, 抗卷板的位置及角度要适当, 载玻片附贴组织切片, 切勿上下移动。切好室温放置30 min后, 放入4 °C丙酮固定5 min~10 min, 烤箱干燥20 min。PBS漂洗5 min, 重复3次。进行抗原热修复, 或微波热修复, 室温自然冷却。可用3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>孵育5 min~10 min, 消除内源性过氧化物酶的活性。

### B.4 苏木素-伊红 (HE) 染色

水洗后的石蜡切片入Harris苏木素染3 min~8min, 自来水洗, 1 %的盐酸酒精分化数秒, 自来水冲洗, 0.6%氨水返蓝, 流水冲洗。切片入伊红染液中染色1 min~3 min。将切片依次放入95 %酒精 I 5 min, 95 %酒精 II 5 min。无水乙醇 I 5 min, 无水乙醇 II 5 min, 二甲苯 I 5 min, 二甲苯 II 5 min中脱水, 将切片从二甲苯拿出来稍晾干, 中性树胶封片。

### B.5 甲苯胺蓝染色

水洗后的石蜡切片入1 %甲苯胺蓝溶液染色5 min; 蒸馏水洗涤, 然后立即用95 %的酒精分色; 无水乙醇脱水后再用二甲苯 I、II 分别透明2 min; 中性树胶封固。

## 参 考 文 献

- [1] 国家药品监督管理局 医疗器械动物试验研究注册审查指导原则 2021 年第 75 号通告
- [2] 国家药品监督管理局 医疗器械临床试验设计指导原则 2018 年第 6 号通告
- [3] Hilton M, Kaplan, Prakhar Mishra, Joachim Kohn. The overwhelming use of rat models in nerve regeneration research may compromise designs of nerve guidance conduits for humans. *J Mater Sci: Mater Med.* 2015;26:226
- [4] Archibald S, Krarup C, Shefner J, Li S, Madison R. A collagen-based nerve guide conduit for peripheral nerve repair: an electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and nonhuman primates. *Journal of Comparative Neurology.* 1991; 306:685-96
- [5] Kokai LE, Ghaznavi AM, Marra KG. Incorporation of double-walled microspheres into polymer nerve guides for the sustained delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Biomaterials.* 2010; 31:2313-22
- [6] Penna V, Munder B, Stark GB, Lang EM. An in vivo engineered nerve conduit-fabrication and experimental study in rats. *Microsurgery.* 2011;31:395-400
- [7] Itoh S, Yamaguchi I, Suzuki M, et al. Hydroxyapatite-coated tendon chitosan tubes with adsorbed laminin peptides facilitate nerve regeneration in vivo. *Brain Research.* 2003;993:111-23
- [8] Yamakawa T, Kakinoki R, Ikeguchi R, et al. Nerve regeneration promoted in a tube with vascularity containing bone marrow-derived cells. *Cell Transplantation.* 2007;16:811-22
- [9] Chang CJ, Hsu SH, Lin FT, et al. Low-intensity-ultrasound-accelerated nerve regeneration using cell-seeded poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) conduits: an in vivo and in vitro study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005;75:99-107
- [10] Yoshii S, Oka M, Shima M, Taniguchi A, Akagi M. Bridging a 30-mm nerve defect using collagen filaments. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2003;67:467-74
- [11] Sinis N, Schaller, H.E., et al. Comparative neuro tissue engineering using different nerve guide implants. *Acta Neurochirurgica.* 2007;100:61-4
- [12] Ozcan G, Shenaq S, Spira M. Vascularized nerve tube: an experimental alternative for vascularized nerve grafts over short gaps. *Journal of Reconstructive Microsurgery.* 1993;9:405-13
- [13] Yoshii S, Shima M, Oka M, et al. Nerve regeneration along collagen filament and the presence of distal nerve stump. *Neurological Research.* 2004;26:145-50
- [14] Keeley R, Atagi T, Sabelman E, et al. Peripheral nerve regeneration across 14-mm gaps: a comparison of autograft and entubulation repair methods in the rat. *Journal of Reconstructive Microsurgery.* 1993;9:349-58; discussion 59-60
- [15] Papaloizos MY, Holmquist, B.,Lundborg,G. An experimental study of nerve grafting combined with silicone tubes in the rat model: Functional outcome and specificity of muscle reinnervation. *Restorative Neurology and Neuroscience.* 1997; 11: 161-8
- [16] Sasaki R, Aoki S, Yamato M, et al. Tubulation with dental pulp cells promotes facial nerve regeneration in rats. *Tissue Engineering.* 2008;14:1141-7
- [17] Eppley BL, Delfino JJ. Collagen tube repair of the mandibular nerve: a preliminary investigation in the rat. *J Oral Maxillofac Surg.* 1988;46:41-7
- [18] May F, Matiasek K, Vroemen M, et al. GDNF-transduced Schwann cell grafts enhance regeneration of erectile nerves. *European Urology.* 2008; 54:1179-87
- [19] Sahakyants T, Lee J, Friedrich F P, et al. Return of Motor Function After Repair of a 3-cm Gap in a Rabbit Peroneal Nerve, A Comparison of Autograft, Collagen Conduit, and Conduit Filled with Collagen-GAG Matrix. *J Bone Joint Surg Am.* 2013; 95:1952-8
- [20] Young RC, Wiberg M, Terenghi G. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB): a resorbable conduit for long-gap repair in peripheral nerves. *British Journal of Plastic Surgery.* 2002; 55:235-40
- [21] Mohanna PN, Terenghi G, Wiberg M. Composite PHB-GGF conduit for long nerve gap repair: a long-term evaluation. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery.* 2005; 39:129-37
- [22] Mligiliche NL, Tabata Y, Kitada M, et al. Poly lactic acid--caprolactone copolymer tube with a denatured skeletal muscle segment inside as a guide for peripheral nerve regeneration: a morphological and electrophysiological evaluation of the regenerated nerves. *Anat Sci Int.* 2003;78:156-61
- [23] Strauch B, Rodriguez DM, Diaz J, Yu HL, Kaplan G, Weinstein DE. Autologous Schwann cells drive regeneration through a 6-cm autogenous venous nerve conduit. *J Reconstr Microsurg.* 2001;17:589-95
- [24] Spector JG, Lee P, Derby A, et al. Rabbit facial nerve regeneration in NGF-containing silastic tubes. *The Laryngoscope.* 1993;103:548-58
- [25] Raimondo S, Nicolino S, Tos P, et al. Schwann cell behavior after nerve repair by means of tissue-engineered muscle-vein combined guides. *J Comp Neurol.* 2005;489:249-59
- [26] Hasegawa J, Shibata M, Takahashi H. Nerve coaptation studies with and without a gap in rabbits. *The Journal of Hand Surgery.* 1996;21:259-65

- [27] Heijke GC, Klopper PJ, Baljet B, van Doorn IB. Silicone rubber tubulization in peripheral sensory nerve reconstruction: an experimental study in rabbits. *Microsurgery*. 2001;21:306-16
- [28] Heijke GC, Klopper PJ, Van Doorn IB, Baljet B. Processed porcine collagen tubulization versus conventional suturing in peripheral nerve reconstruction: an experimental study in rabbits. *Microsurgery*. 2001;21:84-95
- [29] Miloro M, Macy JM. Expanded polytetrafluoroethylene entubulation of the rabbit inferior alveolar nerve. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. 2000;89:292-8
- [30] Bu SS, Li JR, Hu CZ, Zhao YF. The influence of exogenous nerve growth factor on inferior alveolar nerve regeneration in silicone tubes. *Chin J Dent Res*. 1999;2:44-8
- [31] 顾晓松, 张沛云, 王晓冬, 丁斐, 彭聿平, 成红兵, 人工组织神经移植修复狗坐骨神经缺损的实验, 研究自然科学进展, 2002; (12) 4:381-386
- [32] Xiaodong Wang, Wen Hu, Yong Cao, et al. Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft. *Brain*. 2005;128:1897-1910
- [33] Peng Y, Li KY, Chen YF, et al. Beagle sciatic nerve regeneration across a 30 mm defect bridged by chitosan/collagen artificial nerve grafts. *Injury*. 2018;49:1477-84
- [34] Ding, F., Wu, J., Yang, Y., et al. Use of tissue-engineered nerve grafts consisting of a chitosan/ poly(lactic-co-glycolic acid)-based scaffold included with bone marrow mesenchymal cells for bridging 50-mm dog sciatic nerve gaps. *Tissue Eng. A*. 2010 ;16:3779-3790
- [35] Toba T, Nakamura, T., Shimizu, Y. Peripheral nerve regeneration using a polyglycolic acid(PGA)-collagen nerve conduit filled with collagen sponge: experimental research and human application. *Connective Tissue*. 2003;35:45-52
- [36] Prpa B, Huddleston PM, An KN, Wood MB. Revascularization of nerve grafts: a qualitative and quantitative study of the soft-tissue bed contributions to blood flow in canine nerve grafts. *The Journal of Hand Surgery*. 2002;27:1041-7
- [37] Shen H, Shen ZL, Zhang PH, et al. Ciliary neurotrophic factor-coated polylactic-polyglycolic acid chitosan nerve conduit promotes peripheral nerve regeneration in canine tibial nerve defect repair. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010; 95:161-70
- [38] Maw RB, Loizeaux AD. Functional regeneration of facial nerves in dogs when filter tubes are used. *J Oral Surg*. 1971;29:848-52
- [39] Suzuki K, Kawauchi A, Nakamura T, Itoi S, Ito T, So J, et al. Histologic and electrophysiological study of nerve regeneration using a polyglycolic acid-collagen nerve conduit filled with collagen sponge in canine model. *Urology*. 2009; 74:958-63
- [40] Yoshitani M, Fukuda S, Itoi S, Morino S, Tao H, Nakada A, et al. Experimental repair of phrenic nerve using a polyglycolic acid and collagen tube. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2007;133:726-32
- [41] Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Kojima H, Magrufov A, Hiratsuka Y, et al. Recurrent laryngeal nerve regeneration by tissue engineering. *The Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology*. 2003;112:492-8
- [42] Justin C. Burrell, Kevin D. Browne, John L. Dutton, et al., A Porcine Model of Peripheral Nerve Injury Enabling Ultra-Long Regenerative Distances: Surgical Approach, Recovery Kinetics, and Clinical Relevance, *NEUROSURGERY*. 2020;0
- [43] Park BW, Kang DH, Kang EJ, et al. Peripheral nerve regeneration using autologous porcine skin-derived mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012;6:113-24
- [44] Atchabahian A, Genden E M, Mackinnon S E, et al., Regeneration through long nerve grafts in the swine model, *Microsurgery*. 1998; 18(6):379-382
- [45] Madison RD, Archibald SJ, Lacin R, Krarup C. Factors contributing to preferential motor reinnervation in the primate peripheral nervous system. *J Neurosci*. 1999; 19:11007-16
- [46] 黄喜军, 朱庆棠, 江丽等, 复合异体脂肪干细胞的异种去细胞神经修复猕猴周围神经缺损, 中华显微外科杂志, 2014;37 (1) : 48-55
- [47] Mackinnon SE, Dellon AL. A study of nerve regeneration across synthetic (Maxon) and biologic (collagen) nerve conduits for nerve gaps up to 5 cm in the primate. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. 1990;6:117-21
- [48] A Muheremu, Lin Chen, Xiyuan Wang, Yujun Wei, Kai Gong & Qiang Ao. Chitosan nerve conduits seeded with autologous bone marrow mononuclear cells for 30 mm goat peroneal nerve defect. *Scientific Reports*. 2017;7:44002
- [49] Stransberg S R, Mackinnon S E, Genden E M, et al. Long-segment nerve allograft regeneration in the sheep model: experimental study and review of the literature. *Journal of Reconstruction Microsurgery*. 1996;12 (8):529-537
- [50] Lawson G M, Glasby M A. Peripheral nerve reconstruction using freeze-thawed mussle grafts: a comparison with group fascicular nerve grafts in a large animal model. *Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh*. 1998;43 (5): 295-302