

· 基础研究 ·

NGF/PLGA 复合神经导管修复大鼠周围神经缺损的实验研究*

李 政¹ 王 伟^{1,2}

摘要 目的:应用神经生长因子(NGF)、聚乳酸和聚羟基乙酸的共聚物(PLGA)和牛血清白蛋白(BSA)制成 NGF/PLGA 复合神经导管。检测其综合性能和了解其修复大鼠周围神经缺损的可能性。方法:体外模拟体内环境,检测它的降解时间及用 ELISA 的方法来检测 NGF 的释放情况;手术造成大鼠坐骨神经约 10mm 的缺损,分别采用自体神经移植(A 组)、NGF/PLGA 复合神经导管桥接(B 组)和单纯 PLGA 导管(C 组)桥接,术后 4、8、12 周进行大体观察、神经电生理测定、HE 染色、变色酸 2R-亮绿髓鞘染色、电镜观察和图像分析对比。结果:在体外 NGF/PLGA 复合神经导管能在体外释放 NGF 约 18 天,约在 14 周左右导管降解完毕。NGF/PLGA 神经导管组在促进坐骨神经再生、再生神经纤维排列规律化、提高再生神经髓鞘化、加速再生神经功能重建等方面均优于单纯 PLGA 导管组,比自体神经移植组略差。结论:NGF/PLGA 复合神经导管具有良好的组织相容性,对大鼠坐骨神经缺损具有良好的桥梁作用和促神经生长的作用,效果接近自体神经移植。

关键词 神经导管;神经生长因子;神经再生;聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物

中图分类号:R493,R651.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-03-0234-04

Experimental study on NGF/PLGA nerve guide conduits promoting peripheral nerve regeneration in rats/LI Zheng, WANG Wei//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(3): 234—237

Abstract **Objective:** To investigate degradation behaviors, the amount of NGF released in vitro and the effect of NGF/PLGA nerve guide conduits on regeneration of the peripheral nerve defects in vivo. **Method:** The degradation test was performed by weight loss measurements in phosphate-buffered saline (PBS) and the amount of NGF released by the nerve guide conduits was quantified by ELISA analysis in vitro. A 10 mm defect was produced in the left sciatic nerve of each rat. Autograft, NGF/PLGA nerve guide conduits and PLGA nerve guide conduits were used to bridge the nerve defects. Pathological examination, neural electrophysiological examination and computerized imaging analysis were carried out at week 4, 8, 12 postoperation. **Result:** In vitro, NGF can't be detected by ELISA after 18 days and the nerve guide conduits were fully degraded after about 13 weeks. In vivo, the number of nerve regeneration, nerve fibers arrangement, myelination and nerve function reconstruction in NGF/PLGA nerve guide conduits were better than those in PLGA nerve guide conduits. **Conclusion:** NGF/PLGA compound guide conduits can effectively promote peripheral nerve regeneration.

Author's address Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical College, Jinzhou, 121001

Key words nerve guide conduits; nerve growth factor; nerve regeneration; poly(L-lactide-co-glycolide)

临床上常见的周围神经损伤与缺损一直是国内外学者亟待解决的难题,其中寻求非生物材料移植体日渐受到重视,本课题采用牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)作为神经生长因子(nerve growth factor, NGF)的载体,以聚乳酸和聚羟基乙酸的共聚物(PLGA)包埋以上二者的复合体构制成可降解的 NGF/PLGA 复合神经导管,达到对 NGF 保护和缓释作用,来探讨该复合导管对大鼠坐骨神经再生的作用。

1 材料与方法

1.1 NGF/PLGA 复合神经导管和单纯 PLGA 导管的

制作^[1]

按 2000U NGF:0.01g BSA 的比例混匀于水中(NGF 为厦门北大之路生物工程公司产品,药品批号:S20020116,每支含量 2000AU;BSA 购于 SIGMA 公司),真空冷冻干燥备用。将 PLGA(85:15)(购于河北康源缓释材料科技开发公司,分子量:20000,质量

* 基金项目:辽宁省教育厅高等学校科学研究项目(202173365)

1 辽宁医学院,121001; 工作于江苏省镇江市第一人民医院急诊医学中心, 212000

2 通讯作者:王伟(辽宁医学院,121001)

作者简介:李政,男,硕士,住院医师

收稿日期:2006-04-06

标准:Q/HBKY01-2003)用三氯甲烷配制成 10%溶液,以 0.1g PLGA:2000U NGF:0.01g BSA 的比例加入以上置备好的冻干粉,以磁力搅拌器混匀。利用溶剂挥发法制成管长 12mm、壁厚 0.3mm、内径 1.5mm 的 NGF/PLGA 复合神经导管;将导管置于酒精水溶液 8:1(v:v)中 2h 快速提取三氯甲烷以及单体或低聚物,蒸馏水冲洗 5min,真空干燥至恒重。单纯 PLGA 导管按 0.1g PLGA:0.01g BSA 配制 10%三氯甲烷溶液,用以上相同方法不加 NGF 制成。

1.2 动物模型的制作

雄性健康成年 SD 大鼠 45 只(锦州医学院实验动物中心提供),随机分为 3 组,每组 15 只。分为自体神经移植组(A 组),实验组 NGF/PLGA 神经导管组(B 组),单纯 PLGA 神经导管组(C 组)。以 10%水合氯醛腹腔注射麻醉(0.3ml/100g),由股后外侧肌间隙分离显露大鼠左侧坐骨神经,A 组于坐骨神经中段切取神经干 10mm,近远端颠倒后 9-0 线两端各缝合 2 针。其他各组锐性切除坐骨神经干 6mm,让断端自然回缩至 10mm,将导管两端各插入 1mm,9-0 线导管两端各缝合 2 针。缝合前 B 组导管中注满生理盐水,C 组导管组中注入含 NGF 1000U 生理盐水 40 μ l,关闭切口。

1.3 检测指标

1.3.1 体外 ELISA 检测神经营养因子的释放^[2]:将复合导管置于装有 1ml 的含 1%BSA 的 PBS 溶液密闭 Ep 管中,在 37℃孵育 48h。随后在新配介质溶液中孵育释放 1h,然后取出导管,作 ELISA 检测(ELISA 试剂盒为 PROMEGA 公司产品)。测完后导管重新被置于新配介质溶液中孵育,每周检测神经营养因子 2 次。

1.3.2 导管降解试验^[3]:将复合导管置于 pH 为 7.4 的装有 1ml 的含 1%BSA 的 PBS 溶液密闭 Ep 管中在 37℃孵育。在每周取出材料样品,真空干燥至恒重,测其干重,PBS 液每周更新一次。按以下公式计算复合导管的剩余重量百分比:

剩余重量百分比=降解后重量/降解前重量 $\times$ 100%

1.3.3 大体观察:术后定期观察各组术侧足底、足趾的皮肤溃疡情况和后肢肌肉萎缩程度及关节僵直屈伸情况。每次取标本前观察神经导管与神经、周围组织的关系、瘢痕形成及导管降解情况。另外在导管植

入大鼠体内后的第 4 周、8 周和 12 周取材时仔细剪切下导管,蒸馏水清洗干净后真空干燥至恒重,测其重量,与同时期体外降解试验的导管重量相对比。

1.3.4 电生理测定:各组分别于术后第 4 周、8 周和 12 周取材,将术侧坐骨神经游离,刺激电极置于桥接体近端的神经干上,在小腿腓肠肌处插入记录电极,使用 Pc lab 生物信号采集系统(北京)检测神经传导速度。

1.3.5 组织学观察:光镜观察:电生理检测完毕后立即完整取下神经桥接体,4%甲醛钙液固定、石蜡包埋、切片和 HE 染色和变色酸 2R-亮绿髓鞘染色^[4]。变色酸 2R-亮绿髓鞘染色的组织切片,神经髓鞘呈深红色,轴索和间质呈绿色,脱髓鞘神经纤维不着色。

电镜观察:移植物中段取材;4%戊二醛前固定,1%锇酸室温下后固定;乙醇逐级脱水;Epon812 包埋;半薄切片,甲苯胺蓝染色,超薄切片,铅-铀染色;JEU-1200EX 透射电镜观察。

1.3.6 计算机图像分析:取变色酸 2R-亮绿髓鞘染色的神经组织切片,采用 CAIS-1000 细胞图像分析系统进行分析。根据经移植体中部的横切面计算出单位面积的轴突数量、神经纤维的平均直径、轴突的平均直径和髓鞘的厚度。

1.4 统计学分析

数据采用统计程序软件包 SPSS 12.0 进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 NGF/PLGA 神经导管的 NGF 的释放情况

见表 1。NGF/PLGA 神经导管经人工降解液孵育后的第一次检测到的 NGF 的量最大,为 0.21 μ g,此后逐渐降低,到第 18d 左右即检测不到(本 ELISA 试剂盒的 NGF 定量范围是 7.8—500pg/ml)。

2.2 导管降解试验

见表 2 制备的 NGF/PLGA 复合神经导管,平均管重 0.05g,内外腔壁光滑呈白色,在人工降解条件下,孵育的导管随时间延长呈现逐渐吸水膨胀外观,管壁锐缘变钝,颜色逐渐向灰白转变。在第 10 周左右导管出现部分降解吸收现象的同时,管壁结构大部分破坏,管状结构不能维持而塌陷,呈不规则形

表 1 复合神经导管体外释放情况

($\bar{x}\pm s$)

时间(天)	3	6	9	12	15	18
释放量(μ g)	0.21 $\pm$ 0.31	0.19 $\pm$ 0.11	0.115 $\pm$ 0.09	0.062 $\pm$ 0.10	0.051 $\pm$ 0.14	0.023 $\pm$ 0.06

表 2 复合神经导管体外降解情况

(%, $\bar{x}\pm s$)

时间(周)	2	4	6	8	10	12	13	14
剩余重量百分比	95.0 $\pm$ 1.4	89.8 $\pm$ 2.0	75.2 $\pm$ 1.2	45.2 $\pm$ 3.1	25.3 $\pm$ 2.5	7.60 $\pm$ 3.0	3.12 $\pm$ 3.2	0.00

状,第 14 周左右基本降解完毕。动物模型中的复合导管在第 4 周、8 周、12 周取材后,平均导管剩余重量百分比分别为 74.8%、34.6%和 0%均低于同期体外降解试验的 89.80%、45.20%和 7.60%。体内在第 12 周取材时肉眼已看不见导管。

2.3 大体观察

术后第 2 周各组大鼠均不同程度地出现术侧足小腿及部分足趾出现红肿甚至溃疡,第 8 周时所有大鼠足底的红肿和溃疡均消退。随时间的延长腓肠肌出现不同程度萎缩,以及关节僵直,以上情况以 A 组较轻。

B 组的神经导管与周围组织均未见明显粘连,易分离,管壁表面纤维膜性组织形成并有丰富的微血管,周围未见炎症反应,神经吻合口未见神经瘤形成。第 4 周时导管呈乳白色,表面空隙增大,完整性保存,质地较软,管壁增厚膨胀较术前明显,剖开导管见再生神经已经将远近端神经连接,中段神经细小,神经连接处未见明显瘢痕形成(图 1,见后置彩色插页 1);第 8 周时导管孔隙继续增大,硬度又较 1 个月时变软,管壁厚度较第 4 周变薄,导管纵行剖开见内层变松散,成细颗粒沙状;第 12 周时导管均已基本降解完毕,此时复合导管组的再生神经已经完整地连接神经断端(图 2,见后置彩色插页 1)。

2.4 电生理测定

术后第 12 周检测术侧坐骨神经传导速度(m/s),B 组 20.01 ± 2.81 慢于 A 组 22.62 ± 2.27 m/s ($P < 0.05$),但是仍优于 C 组 17.53 ± 1.09 m/s ($P < 0.05$)(见表 3)。

2.5 组织学观察

图 3—4 中箭头所指的红色圆圈为髓鞘,中间包裹的绿色是轴突。B 组(图 3,见后置彩色插页 1)中显示的轴突和髓鞘都比 C 组(图 4,见后置彩色插页 1)粗,而且 C 组中的结缔组织也比 B 组多。

2.5.1 光镜观察及图像分析:详见表 3,在第 12 周的变色酸 2R 一亮绿髓鞘染色和甲苯胺蓝半薄切片染色综合分析,可见 B 组再生的神经纤维较多,且排列整齐,神经数量和轴突粗细,与 A 组无显著性差异,C 组可见许多结缔组织浸润,神经纤维数量少,排列紊乱,轴突较为细小,且髓鞘较薄。

在 B 组和 C 组各期 HE 染色神经组织切片中,均可见再生神经远端有毛细血管形成,未见大量淋

巴细胞浸润,无明显的免疫排斥现象。

2.5.2 电镜观察:术后第 12 周透射电镜观察,A 组和 B 组再生的有髓神经纤维多,髓鞘完整,板层排列紧密,轴突膜与髓鞘膜紧密相邻,髓鞘形成好,比 C 组厚且完整。C 组再生有髓神经纤维少,排列较稀疏。

3 讨论

作为周围神经组织工程的支架材料,其基本要求包括:①良好的生物相容性;②良好的表面活性:即材料表面能使细胞良好的黏附和生长;③生物可降解吸收性;④可塑性和适宜的力学性能:能在一定时限内保持其外形和结构的完整性^[5]。

3.1 PLGA 的良好组织相容性

PLGA 属于 α -羟基酸衍生的脂肪族聚脂,被美国 FDA 认证为可应用于人体的可降解材料、药物释放控制体系和其他人体植入的装置,其在生物体内的最终降解产物为水和 CO_2 。有研究显示相关神经导管移植排斥反应的最明显表现就是在神经移植物的局部有大量的单核细胞浸润,该细胞在神经外膜以内部存在于少见的血管周围,雪旺细胞的基底膜内外,在神经外膜以外局部则代替神经膜细胞包围着神经,原来的神经外膜消失,以及神经内血管减少,雪旺细胞大量丧失并被单核细胞替代^[6]。实验显示所有的神经导管局部始终未见上述反应,说明该材料具有良好的组织相容性。

3.2 PLGA 的综合性能

PLGA 是由结晶态的 PLA(聚乳酸)和 PGA(聚羟基乙酸)发生共聚而形成的无定形非结晶性聚合物,在体内的降解时间可以根据 PLA 和 PGA 的比例来调节,从而调节药物的释放速度。其中 PGA 的亲水性较强,但机械性能较弱,而 PLA 则相反。因此共聚物中的 PLA 和 PGA 的构成比与材料的生物降解率及其机械性能密切相关^[7]。为了使导管降解的速度和神经再生的速度相适应,神经再生完成之后导管能及时在体内消失,减少对神经的压迫,实验采用 PLA:PGA 为 85:15 的比例^[8-11]。

PLGA 的降解主要是通过化学水解(酯键的断裂),而对酶性溶解不敏感,表现以本体降解为主的降解方式,因此降解特性和过程不会因个体差异而不同^[8-9]。由于材料的生物降解性能,可因化学结构、降解条件、分子量大小、几何形状等因素的差异而有所不同^[12-13],因此本实验对自制的神经导管的相关性能进行了检测。

聚酯类聚合物中不稳定化学键为大分子主链结

表 3 各组图像分析和电生理结果的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	神经纤维直径(μm)	轴突直径(μm)	髓鞘厚度(μm)	神经纤维数目(个/ mm^2)	神经传导速度(m/s)
A	5.33 ± 0.75	4.01 ± 0.16	1.33 ± 0.29	21250 ± 1176	22.62 ± 2.27
B	4.73 ± 0.37^{①②}	3.70 ± 0.47^{③}	1.13 ± 0.12^{①②}	19192 ± 1592^{①③}	20.01 ± 2.81^{①②}
C	4.11 ± 0.15	2.90 ± 0.67	0.93 ± 0.17	12014 ± 2459	17.53 ± 1.09

与 A 组比较:① $P < 0.05$;与 C 组比较:② $P < 0.05$;③ $P < 0.01$

构的一部分, 其降解主要通过主链区的随机性断裂引起。水解后产生较低分子量的聚合物碎片^[9], 这些低分子聚合物的形成将导致吸水量的大大增加, 这是在实验中导管材料吸水膨胀的原因。实验的另一个结果显示, 导管的降解速度体外条件下慢于体内条件。分析原因, 可能与以下机制有关: ①酸性降解产物的自动催化效应: PLGA 降解的加速被认为与低聚物和链断裂产物中游离羧基的增多及伴发的 PLGA 基质 pH 值的降低所引发, 从而导致降解速率随时间延长的显著增高, 即所谓自动催化效应^[14]。体内降解条件下, 聚合物基质释出酸性降解产物, 并聚集于植入物的周围而促进了自动催化效应的产生。而体外条件下, 由于频繁的换液而极大程度地降低了这种效应。②体内外降解条件的差异: 本实验中导管体外降解是以 PBS(pH 7.4) 为人工降解液的较单一的条件下进行的, 此过程没有酶或其他因素的催化, 而仅仅是不稳定键的简单水解, 而体内降解条件并不完全相同, 体液中电解质以及酸性或碱性物质及酯酶等对聚合物均具有催化作用。因此体内环境下降解条件更为复杂, 降解途径也有增多。

3.3 神经生长因子的缓释与促神经再生作用

NGF 是一种靶源性神经营养因子, 具有神经元营养效应和促进和诱导神经突起生长的作用, 大量的实验和临床研究表明对周围神经的再生具有明显的促进作用。由于 NGF 分子量较大, 不能透过血脑和血神经屏障, 必须通过 NGF 受体介导的内吞机制并经轴突逆行运输至胞体, 对胞体的代谢进行调节才能发挥促神经再生的作用。因此应用 NGF 的途径主要限于神经损伤的局部(如神经再生室内)。但是 NGF 在体内的半衰期非常短, 只有 2.4min, 在水溶液中活性丢失快, 且易受温度、酸碱度等多种因素影响, 生物利用度不高。因此, 如何在体内保持神经生长因子的生物活性, 是使神经生长因子在神经再生过程中发挥作用的关键^[15]。

本实验采用 BSA 与 NGF 在制作复合导管前混匀溶解在蒸馏水中, 冷冻干燥, 最后用 PLGA 来包埋 NGF 和 BSA 的复合体, 在体内通过 PLGA 的逐渐降解, 管壁中包埋的 NGF-BSA 复合体逐渐暴露出来, 同时 BSA 可以调节 NGF 的释放速度, 以及缓冲周围环境的作用来稳定 NGF 的活性^[16], 最大限度地发挥 NGF 的生物学作用。体外 ELISA 检测显示 NGF/PLGA 复合神经导管可以释放 NGF 约 18d。从 B 组与 C 组的结果来看, 术后 12 周 B 组的神经纤维的数目、直径、髓鞘厚度以及神经传导速度均不同程度优于 C 组, 比自体神经移植组略差, 说明了 NGF/

PLGA 复合神经导管能缓释 NGF, 从而促进周围神经的再生。

周围神经再生是一个复杂和漫长的过程, 其相关的因素很多, 我们应该运用一切可以应用的手段来最大化周围神经再生的效果, 如种子细胞、基因转染技术甚至是克隆技术。

参考文献

- [1] Barras FM, Pasche P, Bouche N, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor released by synthetic guidance channels promotes facial nerve regeneration in the rat [J]. J of Neurosci Res, 2002, 70(6):746—755.
- [2] Bloch J, Fine EG, Bouche N, et al. Nerve growth factor and neurotrophin-3-releasing guidance channels promote regeneration of the transected rat dorsal root [J]. Experimental Neurology, 2001, 172(2):425—432.
- [3] Bini TB, Gao S, Xu X, et al. Peripheral nerve regeneration by microbraided poly (L-lactide-co -glycolide) biodegradable polymer fibers [J]. J Biomed Mater Res A, 2004, 68(2):286—295.
- [4] 田玉旺, 邢惠清, 丁华野, 等. 变色酸-2R 亮绿法在神经髓鞘染色中的应用 [J]. 中华病理学杂志, 1998, 27(4):307—308.
- [5] Gopferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion [J]. Biomaterials, 1996, 17(1):103—114.
- [6] Sundback CA, Shyu JY, Wang Y, et al. Biocompatibility analysis of poly(glycerol sebacate) as a nerve guide material. Biomaterials, 2005, 26(27):54—64.
- [7] 华楠. 生物降解材料的体内降解机理 [J]. 国外医学·生物医学工程分册, 2004, 27(3):181—185.
- [8] Kissel T. Advanced drug delivery review [J]. J Biomed Mater Res, 2002, 50(1):99—134.
- [9] Seal BL, Otero TC, Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration [J]. Mat Sci Eng, 2001, 34(2):147—230.
- [10] Seal BL, Otero TC, Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration [J]. Mat Sci Eng, 2001, 34(2):147—230.
- [11] 罗丙红, 全大萍, 廖凯荣, 等. PLGA 组织工程支架的构建及降解行为研究 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2003, 42(2):46—51.
- [12] Agrawal CM, Huang D, Schmitz JP, et al. Elevated temperature degradation of a 50 :50 copolymer of PLA PGA [J]. Tissue Engineering, 1997, 3 (4):345—352.
- [13] Zhang Y, Zale S, Sawyer L, et al. Effects of metal salts on poly (DL lactide-co-glycolide) polymer hydrolysis [J]. J Biomed Mater Res, 1997, 34 (4):531—538.
- [14] Grizzi I, Garreau H, Li S, et al. Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence [J]. Biomaterials, 1995, 16 (4):305—311.
- [15] Haller MF, Saltzman WM. Nerve growth factor delivery systems [J]. J Control Release, 1998, 53(1-3):1—6.
- [16] Cao XD, Shoichet MS. Delivering neuroactive molecules from biodegradable microspheres for application in central nervous system disorders [J]. Biomaterials, 1999, 20(4):329—339.