论著

文章编号:1000-5404(2008)15-1462-04

PLGA 导管修复大鼠坐骨神经缺损的实验研究

刘晓富[1],郑林丰[1],谢乐斯[2],张建伟[1],余清平[1],许愿忠[1],曾志成[1] ([1]中南大学湘雅医学院人体解剖学与神经生物学教研室,长沙 410013;[2]长沙医学院组织胚胎学教研室,长沙 410000)

摘 要:**目的** 观察多孔 PLGA[poly(lactide-co-glycolide)]导管修复大鼠坐骨神经缺损的效果。**方法** 健康成年 SD 大鼠 12 只,分为自体神经移植组和 PLGA 导管组。两组动物分别人工造成右侧 10 mm 的坐骨神经缺损后,PLGA 导管组采用聚乳酸(polylactic acid, PLA)和聚羟基乙酸(polyglycolic acid, PGA)按 75∶25 的比例制成多孔 PLGA 管修复坐骨神经缺损。自体神经移植组采用坐骨神经进行桥接。术后 4、8、12 周,分别行坐骨神经功能指数检测,术后 12 周行快蓝(Fast Blue)逆行示踪观察背根神经节(dorsal root ganglion,DRG)和脊髓神经元数目及行胫前肌湿质量测量;半薄和超薄切片观察再生纤维数目、直径及髓鞘厚度。**结果** 坐骨神经功能指数比较,术后 4 周无显著性差异($P>0.05$),但 8 周和 12 周有显著性差异($P<0.05$),自体神经组优于 PLGA 管组。PLGA 组 DRG 及脊髓中快蓝标记的神经元数目及胫前肌湿质量均不及自体神经组,差异有统计学意义($P<0.05$);单位面积再生有髓纤维数目、直径和髓鞘厚度在 PLGA 管组与自体神经组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 单用 PLGA 导管对坐骨神经缺损有一定的修复效果,但不及自体神经。

关键词:PLGA;坐骨神经缺损;自体神经
中图法分类号:R-332;R318.08;R651.305 **文献标识码**:A

PLGA tube repairs sciatic nerve defect in rats

LIU Xiao-fu[1], ZHENG Lin-feng[1], XIE Le-si[2], ZHANG Jian-wei[1], YU Qing-ping[1], XU Yuan-zhong[1], ZENG Zhi-cheng[1] ([1]Department of Anatomy and Neurobiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, [2]Department of Histology and Embryology, Changsha College of Medicine, Changsha 410000, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of poly(lactideco-glycolide) (PLGA) tube on the repair of sciatic nerve defect in rats. **Methods** Totally 12 adult SD rats were inflicted with a 10 mm defect in their right sciatic nerve, and then randomly received PLGA tube bridging (PLGA tube group) or autogenous nerve grafting (autotransplantation group). The PLGA tube was compounded of 75% polylactic acid and 25% polyglycolic acid. The sciatic nerve function index (SFI) was observed in 4, 8 and 12 weeks after transplantation. In 12 weeks after transplantation, Fast Blue retrograde tracing was performed to assess the neurons in spinal cord and dorsal root ganglia, semi-thin and ultrathin sections were made to observe the number, diameter and myelin thickness of the regenerated axons, and the wet weight of tibialis anterior muscle was measured. **Results** The number of Fast Blue-labeled cells in the spinal cord and the dorsal root ganglia and the wet weight of tibial muscle were significantly less in PLGA group than in autotransplatation group ($P<0.05$). So the number, diameter and myelin thickness of the regenerated axons were ($P<0.05$). **Conclusion** The PLGA tube bridging can repair nerve defect to some extent, but the effect is still inferior to that of autogenous nerve grafting.

Key words: poly(lactideco-glycolide); sciatic nerve defect; autogenous nerve

周围神经缺损后的修复效果一直不理想。神经移植作为较理想的修复方法,仍然存在着来源困难、神经瘤形成、运动感觉障碍、误向支配以及免疫排斥等诸多问题。采用生物性材料如静脉、羊膜包裹的骨骼肌[1]或人工合成的生物多聚体如聚羟基乙酸(polyglycolic acid,PGA)管、聚乳酸(polylactic acid,PLA)管、壳聚糖和其合成物及衍生物用来建造神经导管修复周围神经缺损具有相当大的潜力[2,3]。研究表明 PLA、PGA 及其共聚物[poly(lactide-co-glycolide), PLGA]具有的良好的生物相容性、可降解性等特点[3,4],用其作为神经导管修复神经缺损具有较好的应用前景,但是目前尚

作者简介:刘晓富,男,河北省承德市人,硕士研究生,主要从事周围神经损伤与修复方面的研究。电话:13974868920,E-mail:liuxiaofu123@163.com
通信作者:曾志成,电话:(0731)2650426,E-mail:zengzhicherg08@126.tom
收稿日期:2007-07-23 修回日期:2007-10-22

缺乏可靠的实验资料。为此，本研究采用 PLA∶PGA 按 75∶25 比例制成多孔结构的 PLGA 管观察桥接修复 10 mm 的大鼠坐骨神经缺损的效果，从而为其在临床应用修复神经缺损提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　动物　　健康成年 SD 大鼠 12 只，中南大学实验动物中心提供，雌雄各半，体质量（200 ± 20）g。用随机数字表随机分为自体神经组、PLGA 管组，每组 6 只，同时每组动物用对侧做自身对照。

1.1.2　主要试剂　　快蓝（Fast Blue）系 Sigma 公司产品，多孔 PLGA 管系中南大学冶金粉末研究院提供。

1.2　动物模型

采用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉（40 mg/kg）。右下肢股后部正中切口，手术显微镜下（上海医用仪器厂）解剖分离出坐骨神经，自梨状肌下缘切除 7 mm 长坐骨神经，任其两端回缩后，造成神经缺损达 10 mm。PLGA 管组用长 10 mm 的 PLGA 管，桥接于神经两断端间的缺损处，用 9.0 医用尼龙缝合线外膜缝合，每端 4 针，使神经残端套入管内各 1 mm，手术区放适量青霉素粉，分层缝合肌肉、皮肤。自体神经组以自体神经代替 PLGA 管，将自体神经近、远侧对换后缝合至两断端，其余过程同 PLGA 管组。术后分笼常规饲养，存活 12 周。

1.3　大体观察

观察术后大鼠步态变化、溃疡发生及愈合时间、肌肉萎缩与恢复情况、肢体感觉及自主运动恢复情况。观察 12 周时取出的桥接神经的外观、表面黏连情况、再生神经粗细、有无神经瘤生成等。

1.4　快蓝逆行示踪

术后 12 周时，各组均于桥接远端吻合口下 5 mm 处及对侧的坐骨神经干注入 2% 快蓝溶液 0.6 μl，继续常规饲养 7 d。2% 戊巴比妥钠深麻，开胸，暴露心脏，经左心室插管入升主动脉，先用生理盐水约 100 ml 冲洗血液后用 4% 多聚甲醛约 400 ml 灌注，时间持续约 30 min。取与坐骨神经相连的 $L_4 \sim L_6$ 背根神经节（dorsal root ganglion，DRG）和相应节段脊髓，投入相同的固定液后固定 2 h，然后入 20% 和 30% 蔗糖溶液内至标本沉底，连续冰冻切片，片厚 20 μm。裱片后荧光显微镜（×200）下摄片，观察神经元并进行细胞计数。每只动物随机取 10 张切片细胞数用于统计学分析。

1.5　胫前肌湿质量称量

各组动物双下肢胫前肌去除结缔组织，滤纸吸干水份后用精密电子称秤量。

1.6　坐骨神经功能指数计算

自制大鼠足印行走箱，宽 10 cm，行走通道长 60 cm。箱底置与行走箱等长、等宽的白纸。术后 4、8、12 周将碳素墨水浸大鼠后足让其在行走箱内行走，记录清晰的大鼠双侧后足足印四五个。采用 Bain 等[5]的方法计算坐骨神经功能指数（SFI）。SFI 值 0 ~ 11%、－11% ~ 0 表示神经功能完全正常，－100% 表示神经功能完全丧失，－11% ~ －100% 表示部分神经功能恢复。

1.7　半薄及超薄切片观察

取神经桥接物中间段标本 5 mm 入 2.5% 戊二醛溶液内后固定 24 h，0.01 mol/L PBS 漂洗 10 min × 3 次，1% 锇酸固定过夜，梯度丙酮脱水，Epon812 包埋，修块，超薄切片机做横断面 0.95 μm 切片。1% 甲苯胺蓝染色 30 s，光镜观察。而后超薄切片，枸橼酸铅染色，透射电镜观察。

1.8　统计学分析

每例标本随机选 3 张甲苯胺蓝染色半薄切片，每张切片随机取 3 ~ 5 个视野，采用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图像分析系统（同济医科大学千屏影像工程公司）计数视野内再生轴突数目、测量有髓纤维直径和髓鞘厚度，并对所测数据进行统计学处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　大体观察

术后全部动物存活，伤口无感染，5 ~ 6 d 伤口愈合。术侧后肢运动瘫痪，膝关节屈曲障碍。均未出现足底部溃疡。两组均未出现明显的全身排斥反应或炎症反应症状。12 周时术侧肌肉有萎缩，大鼠膝关节屈曲障碍改善明显，针刺足底有反应，但足趾并没有完全展开。取材时可见两组大鼠的神经桥接体与周围组织有程度较轻的黏连，PLGA 管组可见再生组织通过神经导管，无神经瘤形成。自体神经组神经恢复连续性。

2.2　快蓝逆行示踪

两组动物 DRG 及脊髓前角内均可见快蓝标记阳性神经元，DRG 细胞多于脊髓。标记细胞呈亮蓝色，细胞核大、圆形不被标记 前角标记细胞可见神经元突起。对照侧脊髓及 DRG 标记细胞两组差异均无统计学意义（$P > 0.05$）。实验侧自体神经组 DRG 及脊髓内标记细胞均多于 PLGA 管组（图 1），两组比较差异有统计学意义（$P < 0.05$），见图 2。

2.3　胫前肌湿质量测量

动物处死时术侧胫前肌有不同程度恢复但较对侧萎缩。各组动物对照侧胫前肌湿质量无明显差别（$P > 0.05$）；右侧胫前肌湿质量明显减轻，PLGA 组减轻多于自体神经组，两组相比有统计学差异（$P < 0.05$）；两组右侧与左侧相比差别均具有统计学意义（$P < 0.01$）。见表 1。

表 1　双侧下肢胫前肌湿质量（$n = 6$，g，$\bar{x} \pm s$）

组别	对照侧	手术侧
自体神经组	0.451 7 ± 0.023 2	0.341 7 ± 0.025 7[b]
PLGA 管组	0.423 3 ± 0.032 7	0.253 3 ± 0.021 6[ab]

a：$P < 0.05$，与自体神经组比较；b：$P < 0.01$，与对照侧比较

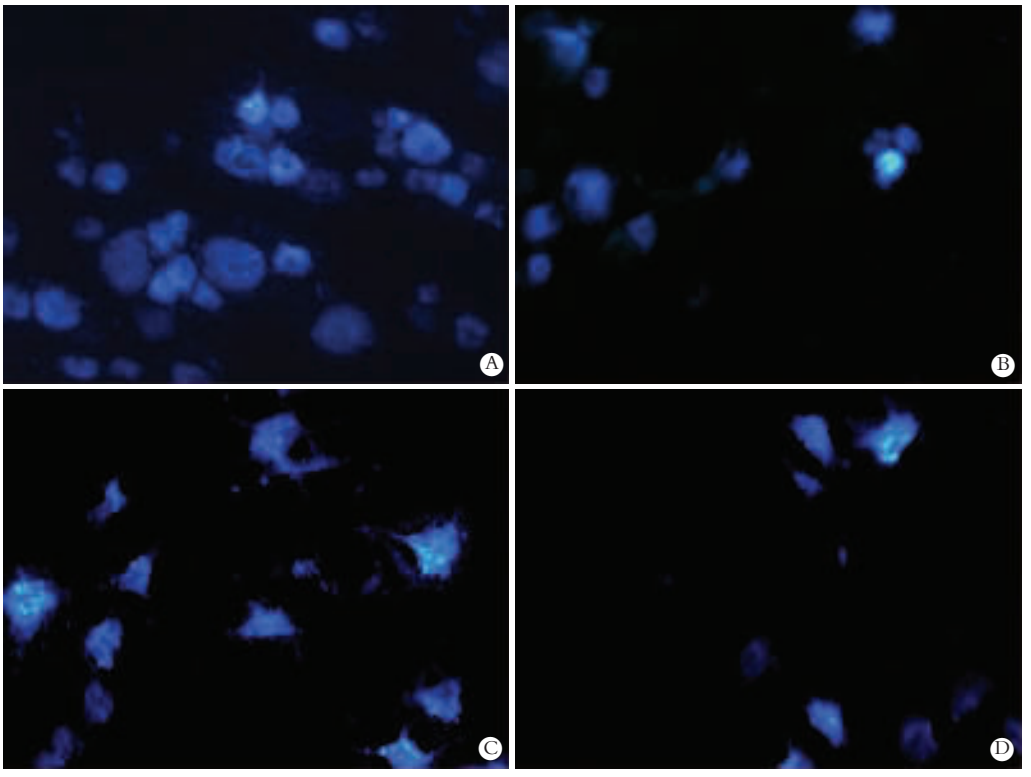
2.4　坐骨神经功能指数计算

在术后 4、8、12 周分别行坐骨神经功能指数计算，在 4 周时两组术侧无明显差别（$P > 0.05$）；在 8、12 周，自体神经组与 PLGA 管组比较有统计学差异（$P < 0.05$）。见表 2。

表 2　各组术后坐骨神经功能指数比较（$n = 6$，$\bar{x} \pm s$）

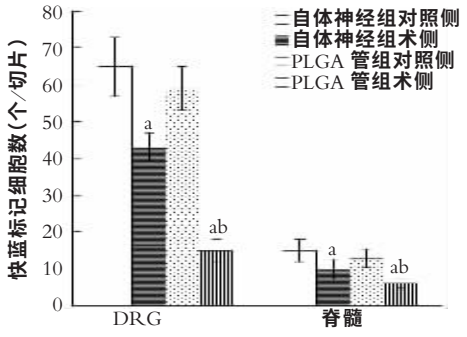
组别	4 周	8 周	12 周
PLGA 管组	－65.9 ± 5.1	－43.2 ± 3.7[a]	－30.6 ± 5.2[a]
自体神经组	－57.9 ± 4.6	－28.2 ± 4.6	－18.6 ± 3.8

a：$P < 0.05$，与自体神经组比较



A：自体神经组 DRG；B：PLGA 管组 DRG；C：自体神经组脊髓；B：PLGA 组脊髓

图1 快蓝逆行示踪结果 （2%快蓝染色 ×200）



a：$P<0.05$，与对照侧比较；b：$P<0.05$，与自体神经组比较

图2 DRG 和脊髓内快蓝标记细胞数

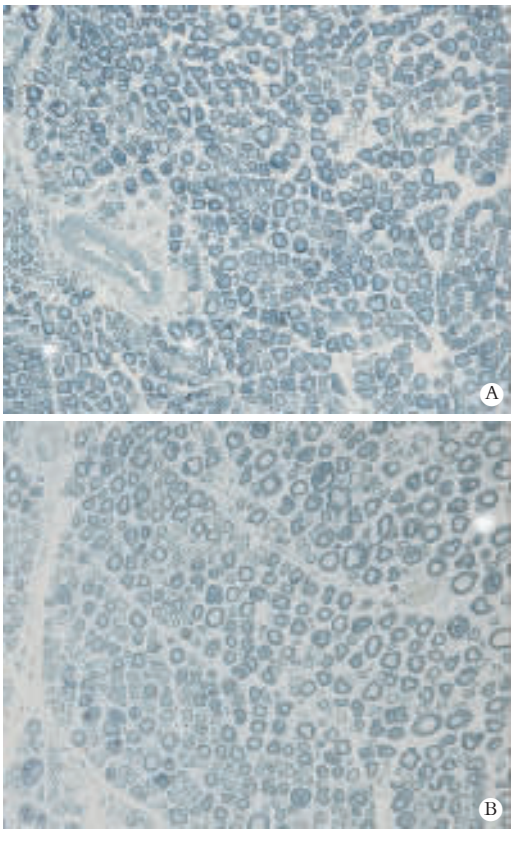
2.5 再生神经组织半薄及超薄切片观察

术后 12 周时，光镜下可见自体神经桥接组桥接体横切面有数目较多的、粗大的相对较为成熟的再生有髓神经纤维，轴突束状成长，束间有不同程度纤维组织相隔，形成明显的神经束。PLGA 管组桥体再生有髓神经纤维较细小稀疏、新生髓鞘较多，有散在的再生单位，微束内再生有髓神经纤维数目较少（图 3）。两组单位面积再生有髓神经纤维数目（密度）、直径和髓鞘厚度差异均有显著性（$P<0.05$）。见表 3。

表3 术后 12 周时两组有髓神经纤维数目、直径及髓鞘厚度比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	轴突数目（个）	直径（μm）	髓鞘厚度（μm）
自体神经组	905.0±50.6	5.98±1.52	1.18±0.16
PLGA 管组	775.0±35.9[a]	3.21±0.95[a]	0.85±0.22[a]

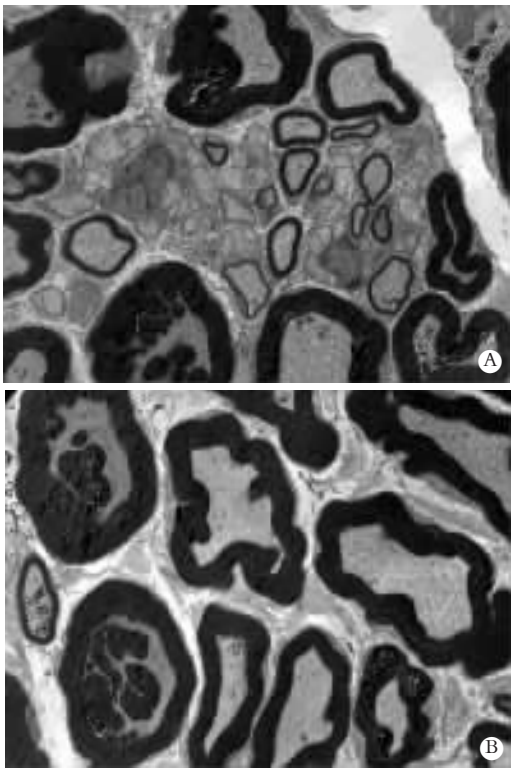
a：$P<0.05$，与自体神经组比较



A：PLGA 管组；B：自体神经组

图3 神经再生半薄切片结果 （1%甲苯胺蓝染色 ×400）

透射电镜下观察显示，PLGA 管与自体神经组再生神经横断面中新生的有髓和无髓神经纤维以及附着的雪旺细胞形态、髓鞘板层清晰可见。偶尔见有崩解或变性的髓鞘或轴突碎片，髓鞘周缘可见雪旺细胞围绕。从神经纤维密度及髓鞘厚度上观察比较，自体神经组优于 PLGA 管组，见图 4。



A：PLGA 管组；B：自体神经组

图 4　神经再生超薄切片结果　（枸橼酸铅 ×5 000）

3　讨论

神经导管修复神经损伤目前面临的主要问题，是寻找一种生物相容性和物理性能均较理想的导管材料。采用生物可降解吸收材料制作的套接管桥接周围神经损伤，国外学者研究较多，大多集中于聚脂类材料，已有临床应用成功的报道[6]。

PLA 和 PGA 是结构最简单、最典型的可降解线性聚羟基脂肪酸酯，其降解产物分别为乳酸和羟基乙酸，两者均是参与体内三羧酸循环的中间代谢产物，具有极高的生物相容性和生物安全性，de-Medinaceli[7] 曾证实 PLA 管及其代谢产物对神经再生无不良影响。有研究表明 PGA 移植入大鼠腹腔或肠道也不会引起有菌或无菌性炎症[8,9]。

人工合成的 PLGA 管具有良好的生物相容性和生物可降解性[10]，在医用领域中广泛应用为药物缓释材料、体内植入材料、手术缝合线、骨科固定材料以及组织工程材料[11]。但在神经修复方面却没有可靠的实验数据。本实验应用多孔的 PLGA 导管材料，术中发现 PLGA 导管在体内能保持良好的物理支撑性能，再生神经能通过导管，未见因管壁挤压造成的变形，并出现较明显的吸收现象，而此时再生神经的外形上已近似于正常的坐骨神经，电镜结果观察显示有大量的有髓和无髓神经纤维的再生，并可见雪旺细胞。目前认为雪旺细胞在周围神经的修复中参与变性髓鞘的清除，加速新生轴突髓鞘的形成与成熟。由此我们认为多孔结构可能为细胞的生长提供限定的空间，防止外界成分干扰，指引神经元轴突延伸，使新形成的结构类似于原有的解剖结构[12,13]。本研究结合示踪、胫前肌恢复、半薄及超薄切片及坐骨神经功能指数检查，结果发现，PLGA 管（75∶25）效果虽均不及自体神经桥接，但是有一定的修复效果，有进一步研究的必要。

（致谢 感谢中南大学冶金粉末研究院阮建明教授提供本研究用 PLGA 导管！）

参考文献：

[1] 段现来，许愿忠，曾志成. 羊膜包裹的自体神经-肌复合移植物桥接大鼠坐骨神经缺损[J]. 中南大学学报：医学版，2004，29(3)：279－283.

[2] Wang X，Hu W，Cao Y，*et al*. Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft[J]. Brain，2005，128(Pt 8)：1897－1910.

[3] Yuan Y，Zhang P，Yang Y，*et al*. The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro[J]. Biomaterials，2004，25(18)：4273－4278.

[4] 矫树生，李兵仓，陈建梅，等. 嗅鞘细胞与聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物材料的细胞相容性研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(5)：370－373.

[5] Brain J R，Mackinnon S E，Hunter D A. Functional evaluation of complete sciatic，peroneal，and posterior tibial nerve lesions in the rat[J]. Plast Reconstr Surg，1989，83(1)：129－138.

[6] Mackinnon S E，Dellon A L. Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid tube[J]. Plast Reconstr Surg，1990，85(3)：419－424.

[7] de-Medinaceli L，al-Khoury R，Merle M. Large amounts of polylactic acid in contact with divided nerve sheaths have no adverse effects on regeneration[J]. J Reconstr Microsurg，1995，11(1)：43－49.

[8] Murakami T，Fujimoto Y，Yasunaga Y，*et al*. Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair[J]. Brain Res，2003，974(1－2)：17－24.

[9] 王树森，胡蕴玉，罗卓荆，等. 硫酸肝素复合胶原蛋白制备新型神经组织工程支架材料[J]. 第四军医大学学报，2004，25(10)：869－873.

[10] 马晓妍，石淑先，夏宇正，等. 聚乳酸及其共聚物的制备和降解性能[J]. 北京化工大学学报，2004，31(1)：51－56.

[11] Kricheldorf H R. Syntheses and application of polylactides[J]. Chemophere，2001，43(1)：49－54.

[12] Teng Y D，Lavik E B，Qu X，*et al*. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2002，99(5)：3024－3029.

[13] Luis A L，Rodrigues J M，Amado S，*et al*. PLGA 90/10 and caprolactone biodegradable nerve guides for the reconstruction of the rat sciatic nerve[J]. Microsurgery，2007，27(2)：125－137.

（编辑　栾　嘉）