维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)02-0189-05

PHB/PEO 共聚物复合神经生长因子治疗坐骨神经损伤研究

陈 渝,王大勇,王祖贵,翁 政

(重庆市第九人民医院骨科,重庆 400700)

【摘 要】目的:研究 PHB/PEO 共聚物复合神经生长因子在周围神经缺损修复中的作用。方法:SD 雄性大鼠分别进行自体神经移植、免疫抑制下的异体神经移植、PHB/PEO 导管复合应用神经生长因子桥接缺损及 PHB/PEO 神经导管移植。采用坐骨神经功能指数检测和神经电生理测定进行神经功能测试。神经纤维计数和电镜观察研究神经解剖结构。结果:PHB/PEO 导管复合神经生长因子组坐骨神经功能指数、神经传导速度和神经纤维计数与自体神经移植组相比无差异,显著优于异体神经移植组和 PHB/PEO 神经导管移植组;组织学和电镜检测显示 PHB/PEO 导管复合神经生长因子组神经纤维和髓鞘再生与自体神经移植组相相似,而显著优于其余 2 组。结论:在坐骨神经损伤修复中 PHB/PEO 导管复合应用神经生长因子神经修复效果与自体神经移植相似,而显著优于异体神经移植和 PHB/PEO 神经导管移植。

【关键词】PHB/PEO 共聚物;周围神经;损伤

【中国图书分类法分类号】R68 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-06

Study of the PHB/PEO polymer combined with nerve growth factor in sciatic nerve injury

CHEN Yu, et al

(*Department of Orthopedics, The Ninth People Hospital of Chongqing*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of PHB/PEO polymer combined with nerve growth factor in the peripheral nerve injury. *Method*: The male SD rats were treated with autogentic neural transplantation, xenogenic neural transplantation under the immunosuppression, transplantation of PHB/PEO polymer combined with nerve growth factor and PHB/PEO guidance transplantation, respectively. The nerve function and the nerve anatomic structure were evaluated by the sciatic function index (SFI), nerval electrophysiology test, nerve fiber number and electron microscope. *Result*: The SFI, nerve conduction velocity, nerve fiber number and the regeneration of nerve fiber and myeline sheath of the PHB/PEO polymer combined with nerve growth factor group is similar to the autogentic neural transplantation group, and is better than the xenogenic neural transplantation group and PHB/PEO guidance group significantly. *Conclusion*: The effect of PHB/PEO polymer combined with nerve growth factor is similar to the autogentic neural transplantation, and is better than the xenogenic neural transplantation and PHB/PEO guidance significantly in the repair of sciatic nerve injury.

【Key words】 PHB/PEO polymer; Peripheral nerve; Injury

周围神经损伤的治疗是当前面临的最棘手也富有挑战性的难题之一。20 世纪 60 年代,Mellesi 进行了首例自体神经移植手术,之后不断涌现出各种新的移植技术和材料。PHB/PEO 共聚物中的主要成分聚羟基丁酸脂(PHB)是微生物在不平衡生长条件下储存于细胞内的一种天然高分子聚合物[1]。它具有生物可降解性、生物相容性、压电性、光学活性、无毒性、无刺激性、无免疫原性等特殊性质,在生物医学领域及组织工程中广为应用。通过生物可降解材料聚环氧乙烷(PEO)对 PHB 多孔材料进行表面处理,可提高 PHB 材料的亲水性及对细胞的吸附力,为神经修复提供支架。本文的目的在于观察 PHB/PEO 共聚物复合神经生长因子在大鼠坐骨神经损伤后修复中的作用,为寻找理想的神经移植物奠定基础。

作者介绍:陈 渝(1977-),男,硕士,
研究方向:周围神经损伤。

通讯作者:王大勇,男,主任医师,E-mail:chenyu@vip.163.com。

1 材料和方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 动物

Ⅰ级 SD 雄性大鼠,体重 150~210g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

神经生长因子由第四军医大学科研部生物技术中心提供。

1.3 主要材料

PHB 原材料系西北大学生命科学院提供。

1.4 主要仪器

Sierra Ⅱ Wedge 神经电生理仪, 美国凯威实验室公司研制。

1.5 PHB/PEO 可降解管型支架的制备

将 PHB,PEO 及氯仿溶液按照一定比例共混,搅拌待 PHB 及 PEO 完全溶解于氯仿溶液后,取一定量的纺丝原液放入喷丝管中,从喷丝头的小孔中压出粘液细流被引入通有热空气流的通道中,热空气使粘液细流中的溶剂快速挥发,挥发出来的溶剂蒸气被热空气流带走,而粘液细流脱去溶剂后很快转变成细丝,进而可得到一种具有一定弹性和韧性,直径为 6.3μm 的超细单纤维材料。将 PHB/PEO 复合纤维材料松散而均匀地编织于直径 1.0mm 的导管上,制成长 20mm,厚度为 200μm 的圆管状支架,管内平行放置 70 根制备的 PHB/PEO 超细单纤维作为内支架。将神经生长因子(NGF)溶液,表面修饰于 PHB 导管。

1.6 动物分组

48 只 SD 雄性大鼠,随机分为 A、B、C 和 D 4 组,每组 12 只。A 组动物行自体神经移植;B 组动物行 CSA 5mg/(kg·d)5 周 免疫抑制下的异体神经移植;C 组 PHB/PEO 导管复合应用神经生长因子桥接缺损;D 组动物行 PHB/PEO 神经导管而不应用神经生长因子。

1.7 手术方法

实验大鼠均采用以 5%戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔注射麻醉,俯卧位固定。75%的酒精消毒皮肤,作右后肢后部斜切口,用组织剪剪开皮肤切口,长约 20mm,钝性分离皮下,沿股后外侧肌间隙钝性分离到腘上缘显露坐骨神经约 20mm,轻轻游离。剪断切除坐骨神经 5~7mm,使自然回缩后实测缺损距离为 10~12mm。剪取长度略大于缺损距离的导管,先将远端套入导管内,再将近端套入导管,医用生物蛋白胶滴于结合处粘合,以防肢体活动时神经脱出导管。A 组动物行自体神经移植;B 组动物行 CSA 5mg/(kg·d)5 周免疫抑制下的异体神经移植;C 组 PHB/PEO 导管复合应用神经生长因子桥接缺损;D 组动物行 PHB/PEO 神经导管而不应用神经生长因子。

1.8 坐骨神经功能指数检测

让大鼠走过一个 42cm×8.2cm 末端为暗箱的过道,过道底部铺上白纸,大鼠在行走时,两后足均匀沾染黑色炭素墨水,行走后纸上留有足印,取左右侧足(E 试验侧,N 正常侧)各测 3 个参数(精确到 mm):PL(足印长度)即从足跟到足尖的最长距离,每次使用最长的 PL;TS 即第一趾到第五趾的连线距离,每次使用最长的 TS;IT(中间足趾距离)即第二趾到第四趾的连线距离,每次使用最长的 IT。将上述 3 个参数代入公式:SFI=109.5×(ETS-NTS)/NTS-38.3×(EPL-NPL)/NPL+13.3×(EIT-NIT)/NIT-8.8。公式计算结果 0 为正常,-100 为神经完全损伤,功能丧失。伤侧以爪背拖行者,SFI 为 -100。

1.9 神经电生理测定

分离大鼠坐骨神经,腓总神经及胫前肌,于损伤处近端置入 3 个相距 5mm 的刺激电极,由近到远分别标记为 S1、S2、S3,刺激时使正极在神经干近端,于胫前肌肌腹中插入 2 个引导电极和 1 个接地电极。先在 S1,S2 处运用不同强度的电流刺激神经,记录刺激脉冲开始时到肌肉动作电位产生的时间(刺激神经干诱发出动作电位的潜伏期)。同样再在 S2、S3 进行刺激和测定。根据数据计算神经传导速度。公式如下:神经传导速度(Nerve conductivevelocity,NCV)= 近端刺激点与远端刺激点的距离/(近端点刺激时诱发电位的潜伏期 - 远端点刺激时诱发电位的潜伏期)。

1.10 神经纤维计数

坐骨神经标本用 10%的福尔马林固定取横向截面切片,在放大 400 倍的光学显微镜下对神经断面进行单位视野神经纤维计数,取左上、右上、左下、右下和正中 5 处视野为单位视野,进行计数,将 5 组的平均值作为单位视野神经纤维数量。

1.11 电镜观察

选取部分标本电镜观察,了解再生神经髓鞘形态。

1.12 统计方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SSPS11.5 统计软件进行 t 检验。

2 结 果

2.1 SFI、神经传导速度和神经纤维计数

术后不同时期各实验组 SFI、神经传导速度和神经纤维计数变化见表 1~3。PHB/PEO 导管复合应用神经营养因子组与自体神经移植组相比较,其 SFI、神经传导速度和神经纤维计数无统计学差异,而显著优于异体神经移植和单独 PHB/PEO 导管移植。提示 PHB/PEO 导管复合应用神经营养因子修复外周神经损伤其功能修复与自体神经移植修复相近。

2.2 光镜观察

选取部分标本作 HE 染色,了解神经纤维再生情况,见图 1。由图 1 可见 PHB/PEO 导管复合应用神经营养因子其神经纤维较多,显著优于异体神经移植和单纯 PHB/PEO 移植,与自体神经移植相似。提示 PHB/PEO 导管复合应用神经营养因子在神经纤维再生与自体神经移植效果接近。各组均未见明

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 术后 4 周各组 SFI、神经传导速度和神经纤维计数比较(n=4, $\bar{x} \pm s$)

组别	SFI	NCV(m/s)计数	神经纤维
A	−40.31 ± 4.12	30.71 ± 3.59	63.47 ± 4.08
B	−77.27 ± 4.23*	25.12 ± 3.42*	55.71 ± 4.33*
C	−38.96 ± 3.73	28.78 ± 4.12	61.84 ± 3.87
D	−78.24 ± 5.58*	23.76 ± 3.58*	53.20 ± 4.94*

*:P<0.05 与 C 组比较

表 2 术后 12 周各组 SFI、神经传导速度和神经纤维计数比较(n=4, $\bar{x} \pm s$)

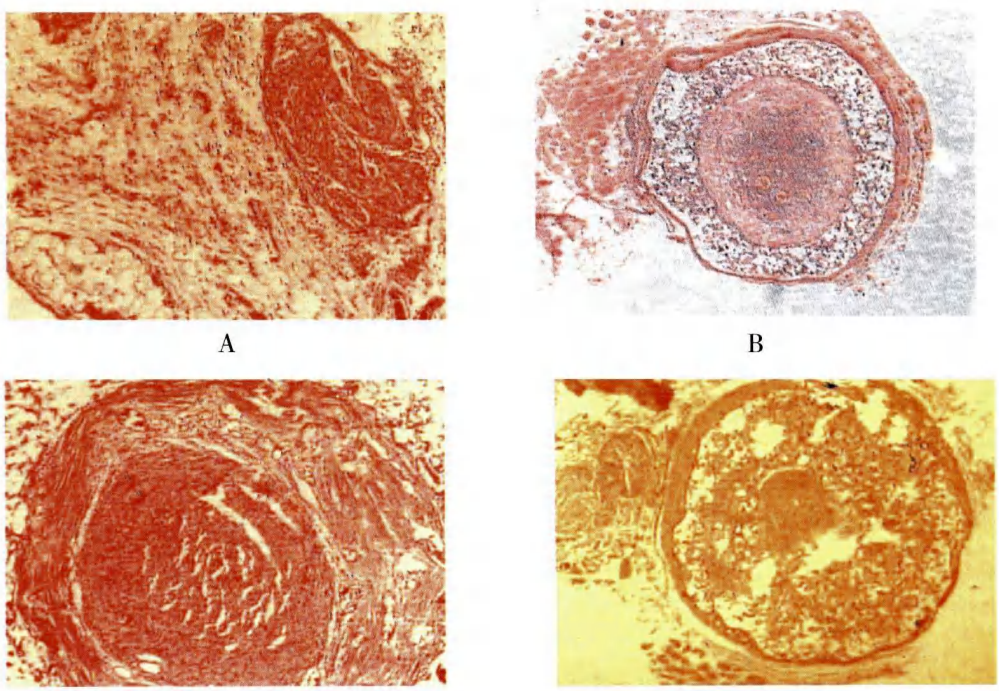
组别	SFI	NCV(m/s)	神经纤维计数
A	−32.30 ± 3.15	35.12 ± 2.11	68.11 ± 5.21
B	−64.13 ± 5.26**	30.13 ± 2.29*	60.32 ± 4.75*
C	−31.16 ± 3.79	34.21 ± 4.11	67.55 ± 3.66
D	−70.74 ± 4.14*	29.12 ± 2.89*	61.11 ± 3.43*

*:P<0.05 与 C 组比较;**:P<0.01 与 C 组比较

表 3 术后 16 周各组 SFI、神经传导速度和神经纤维计数比较(n=4, $\bar{x} \pm s$)

组别	SFI	NCV(m/s)	神经纤维计数
A	−20.30 ± 3.22	38.66 ± 3.61	72.59 ± 4.68
B	−59.87 ± 5.03*	34.20 ± 3.21*	65.91 ± 4.26*
C	−22.16 ± 4.23	36.88 ± 3.82	70.14 ± 4.77
D	−62.74 ± 3.28*	34.16 ± 3.50*	67.19 ± 5.84*

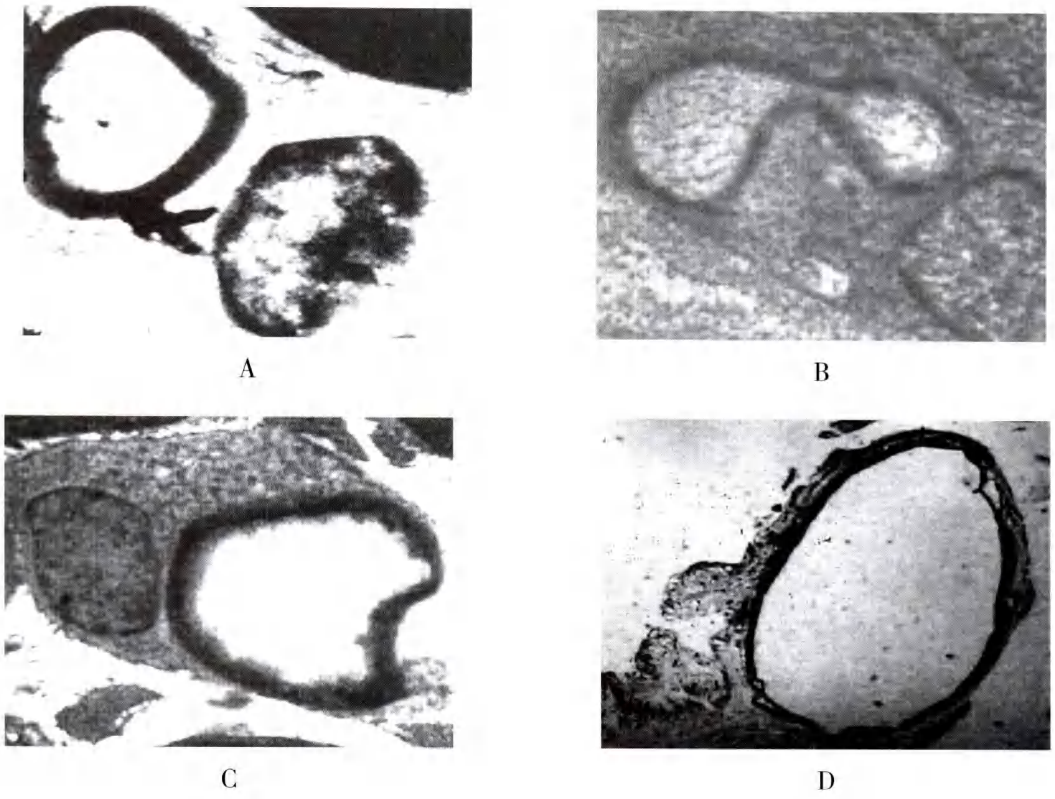
*:P<0.05 与 C 组比较



A. 自体神经移植;B. 异体神经移植;C. PHB/PEO 移植复合应用神经生长因子;D. PHB/PEO 移植

图 1 术后第 16 周再生神经纤维横切面 HE 染色 ×40

维普资讯 http://www.cqvip.com



A. 自体神经移植;B. 异体神经移植;C. PHB/PEO 移植复合应用神经生长因子;D. PHB/PEO 移植

图 2 术后第 16 周再生神经纤维横切面电镜

显炎症细胞侵润。

2.3 电镜观察

取部分标本进行电镜观察,了解髓鞘生成情况,见图 2。由图 2 可见 PHB/PEO 导管复合应用神经营养因子其再生神经髓鞘较厚,与自体神经移植神经髓鞘再生相似。异体神经移植后髓鞘生长较为缓慢,且髓鞘较薄。单纯 PHB/PEO 移植神经髓鞘亦较薄。故 PHB/PEO 导管复合应用神经营养因子与自体神经移植疗效相似,显著优于异体神经移植与单纯 PHB/PEO 移植。

3 讨 论

周围神经损伤会导致感觉及运动功能丧失,甚至致残。外科治疗周围神经损伤已经有超过 150 年的历史。治疗方法也由最初的断端直接缝合逐渐发展到自体神经移植再到现代的自体神经替代物移植和生物治疗。自体神经移植神经通常来源于皮神经,如腓神经和隐神经。但自体神经移植会导致供体部位的功能缺失、需要进行多重手术、自体组织分离困难等[2],限制了其在临床的应用。

为此需要寻找一种有效的自体神经移植替代物。作为自体神经移植替代物,神经导管具有特定的三维结构支架,对轴突生长起机械引导作用。目前用作神经导管的材料主要分为天然材料和生物工程材料。天然材料包括小肠下粘膜、羊膜和细胞外基质蛋白等[3-6]。天然材料具有易降解的优点,同时也存在管形塌陷、再生不良、吸收瘢痕组织、增生及粘连等问题。生物工程材料如聚羧基乙酸内酯、聚氨基甲酸乙酯、异丁烯酸水凝胶也都有促神经再生的作用[7,8],但生物工程材料存在降解不良,限制神经生长等问题。

基于上述原因,本次试验设计了 PHB/PEO 共聚物复合神经生长因子导管,研究其在治疗大鼠坐骨神经损伤中的作用。PHB 完全由微生物发酵生成的,纯度高达 99.9%。聚氧化乙烯(PEO)是水溶性高聚物,可完全溶于水。通过将 PHB 与生物相容性良好的 PEO 材料共混加工改性,以达到改善 PHB 的脆性及加快其生物降解速率。NGF 对于神经系统的发育和损伤后再生具有重要作用[9]。将 NGF 修饰于

维普资讯 http://www.cqvip.com

PHB/PEO 导管的表面既达到了为神经生长提供支架的作用，又构建了一个有利于神经再生的内环境。本次研究中，电镜和组织学结果显示 PHB/PEO 导管复合神经生长因子可显著促进神经纤维和神经髓鞘再生，其疗效与自体神经移植效果相近，显著优于异体神经移植和 PHB/PEO 移植。SFI 和神经传导速度等反映神经功能的检测指标显示，PHB/PEO 导管复合神经生长因子可显著促进坐骨神经电生理功能恢复，改善运动功能，其改善程度与自体神经移植相似，优于异体神经移植和 PHB/PEO 移植。其它也有研究证明生物导管复合生物分子治疗，较单独使用生物导管更能促进神经再生，疗效较对照组高 98%[10]。

综上所述，PHB/PEO 导管复合神经生长因子可显著促进大鼠坐骨神经损伤后神经纤维的解剖结构和神经功能的恢复，疗效与自体神经移植相似。我们认为下一步如果能够对该材料在生物相容性和生物降解率进行深入的研究，该材料在替代自体神经移植方面具有一定的潜力。

参 考 文 献

[1] Slater SC, Gallaher T, Dennis D, et al. Polyhydroxybutyrate, natural biocompatible and biodegradable polyesters produced by barteria [J]. J Bacterial, 1988; 170(10): 4431-4436.

[2] Schmidt CE, Leach JB. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration[J]. Annu Rev Biomed Eng, 2003; 5: 293-347.

[3] Hadlock TA, Sundback CA, Hunter DA, et al. A new artificial nerve graft containing rolled Schwann cell monolayers[J]. Microsurgery, 2001; 21: 96-101.

[4] Mohammad J, Shenaq J, Rabinovsky E, et al. Modulation of peripheral nerve regeneration: a tissue-engineering approach. The role of amnion tube nerve conduit across a 1-centimeter nerve gap [J]. Plast Reconstr Surg, 2000; 105: 660-666.

[5] Yoshii S, Oka M, Shima M, et al. 30mm regeneration of rat sciatic nerve along collagen filaments[J]. Brain Res, 2002; 949: 202-208.

[6] Chen YS, Hsieh CL, Tsai CC, et al. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin[J]. Biomaterials, 2000; 21: 1541-1547.

[7] Lesny P, De Croos J, Pradny M, et al. Polymer hydrogels usable for nervous tissue repair[J]. J Chem Neuroanat, 2002; 23: 243-247.

[8] Matheson CR, Carnahan J, Urich JL, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a neurotrophic factor for sensory neurons: comparison with the effects of the neurotrophins[J]. J Neurobiol, 1997; 32: 22-32.

[9] Heumann R, Lindholm D, Bandtlow C, et al. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987; 84: 8735-8739.

[10] Miller C, Jeftinija S, Mallapragada S. Micropatterned Schwann cell-seeded biodegradable polymer substrates significantly enhance neurite alignment and outgrowth[J]. Tissue Eng, 2001; 7: 705-715.

(责任编辑：冉明会)

(上接第 135 页)

[1] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. Nature, 1989; 340(6230): 245-246.

[2] Aronheim A, Zandi E, Hennemann H, et al. Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions[J]. Mol Cell Biol, 1997; 17(6): 3094-3102.

[3] Broder YC, Katz S, Aronheim A. The Ras recruitment system, a novel approach to the study of protein-protein interactions[J]. Curr Biol, 1998; 8(20): 1121-1124.

[4] Aronheim A, Broder YC, Cohen A, et al. Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton [J]. Curr Biol, 1998; 8(20): 1125-1128.

[5] 金冬雁，黎孟枫，译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 科学出版社，1996.

[6] Iwasaki T, Chin WW, Ko L. Identification and characterization of RRM-containing coactivator activator (CoAA) as TRBP-interacting protein, and its splice variant as a coactivator modulator (CoAM)[J]. Biol Chem, 2001; 276(36): 33375-33383.

[7] Shamay M, Barak O, Shaul Y. HBXAP, a novel PHD-finger protein, possesses transcription repression activity [J]. Genomics, 2002; 79(4): 523-529.

(责任编辑：冉明会)