

文章编号:1007-4287(2009)09-1218-03

聚乳酸-三亚甲基碳酸酯/神经生长因子缓释导管修复大鼠脊髓损伤的分析

邵国喜,黄岚峰,刘钦毅,杨有庚*

(吉林大学第二医院 骨科,吉林 长春 130041)

摘要:目的 探讨聚乳酸-三亚甲基碳酸酯/胶质细胞源性神经营养因子[P(LA-TMC)/GDNF]复合导管中促进大白鼠脊髓再生的GDNF的合适含量。方法 Wistar 雌性大白鼠 60 只,随机分为 6 组,每组 10 只。各组采用 P(LA-TMC)/GDNF 复合导管中的 GDNF 含量分别为 150 u、300 u、450 u、550 u 和 700 u、850 u。将每组动物的脊髓造成 4 mm 缺损的间隙,分别以不同 GDNF 含量的[P(LA-TMC)]/GDNF 复合导管桥接缺损。术后 2 个月检测比较各组脊髓的再生情况。结果 GDNF 含量为 450 u 和 550 u 的 P(LA-TMC)/GDNF 复合导管桥接组的脊髓再生情况显著优于其他 4 组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),而该 2 组间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。其中 GDNF 含量为 150 u 和 800 u 组的神经再生情况最差。结论 P(LA-TMC)/GDNF 复合导管中 GDNF 的含量为 450 - 550 u 左右,对促进大白鼠脊髓再生最为合适。

关键词:脊髓损伤;聚乳酸-三亚甲基碳酸酯;神经生长因子

中图分类号:R651.2

文献标识码:A

Analyse the dose of GDNF in the P(LA-TMC)/GDNF compound conduit on restoration of rat spinal defect SHAO Guoxi, HUANG Lanfeng, YANG Yougeng, et al. (Hospital, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China)

Abstract: **Objective** To analyse the suitable dose of in the P(LA-TMC)/GDNF on restoration of rat spinal defect. **Methods** 60 female Wistar rats were randomly assigned into six groups with 8 each. The doses of GDNF in the P(LA-TMC)/GDNF conduit were 150 u, 350 u, 450 u, 550 u, and 850 u respectively. The spinal of the animals was transected to create a 4 mm gap and then bridged with P(LA-TMC)/GDNF compound conduit containing different doses of GDNF according to group assignment. Spinal regeneration was evaluated at 2 months following the operation by potential plane test, comparing by basso, beattie and bresnahan (BBB) score, comparing by myelinated nerve fiber count and axon diameter among the groups. **Results** Nerve regeneration in the groups containing 450 u and 550 u GDNF was significantly superior to those in the other four groups. There was no difference between parameters of 450 u GDNF group and 550 u GDNF group. Among the 6 groups nerve regeneration was most unfavorable in the 850 u GDNF and 150 u GDNF group. **Conclusion** The suitable dose of GDNF in P(LA-TMC)/GDNF compound conduit is around 450 - 550 u. Higher or lower concentrations of GDNF could inhibit nerve regeneration.

Key words: spinal regeneration; P(LA-TMC); nerve growth factors

(Chin J Lab Diagn, 2009, 13:1218)

脊髓损伤后,如何将神经生长因子与人工合成导管材料结合应用能更有效地发挥其生物学活性来修复脊髓损伤国内外还未见相关实验报道。本实验旨在进行聚乳酸-三亚甲基碳酸酯 P(LA-TMC)可吸收导管移植的同时,联合应用 GDNF,形成聚乳酸-三亚甲基碳酸酯结合神经生长因子的缓释导管[P(LA-TMC)/GDNF],并观察 P(LA-TMC)/GDNF 复合导管中 GDNF 的含量与促神经再生作用是否有关,即二者之间的量效关系,探讨复合导管中 GDNF 的合适含量。

1 材料与方法

1.1 动物和分组

健康 Wistar 雌性大鼠 60 只,体重 120 - 150 g,随机分为 6 组,每组 10 只,各组采用 P(LA-TMC)/GDNF 复合导管中 GDNF 的含量各不相同,即 A 组 150 u、B 组 300 u、C 组 450 u、D 组 550 u、E 组 700 u、F 组 850 u。于不同阶段行斜坡试验、运动功能评分、组织学观察。

1.2 PDLLA/NGF 复合导管的制备

称取适量 PDLLA 溶于乙酸乙酯中,分别加入不同量的 GDNF 冻干粉,超声分散法充分混匀。采用溶剂挥发法制成不同 GDNF 含量的 P(LA-TMC)/GDNF 复合导管,导管长 10 mm,内径 3 mm,壁厚 1.5 mm,不同导管中 GDNF 含量分别为 100 u、250 u、400 u、500 u、800 u。射线照射灭菌、备用。P(LA-TMC)

*通讯作者

由济南健宝开元生物材料有限公司研究中心提供。
GDNF为RD公司产品,编号:512GF/CF。

1.3 实验方法

将大鼠行1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉。腰背手术区3.0 cm ×1.5 cm剃去毛,常规碘氟消毒,暴露棘突。咬开胸第8、9、10棘突及第9、10椎板,切开硬脊膜,用眼科剪横断脊髓,负压吸引出少许断端脊髓组织,脊髓断端回缩4 mm,确保完全断裂。分别用不同GDNF含量的复合导管桥切割成4 mm长桥接缺损间隙,由切口下端向上端植入脊髓断端间,用9.0线缝合硬脊膜。并缝合皮下组织、皮肤。各组桥接方法完全相同。术后肌注青霉素5万U/kg。连续3 d。术后实行分笼饲养。手术后3 d内,需要每日皮下注射5 ml 10%葡萄糖生理盐水,以补足机体所需要的水分;术后次日开始按摩膀胱辅助排尿,2次/d,以保持大鼠身体干燥,直到恢复自主排尿功能为止。术后1、3、4、6、8周检测各组神经再生情况,并作比较。

1.4 检测方法

1.4.1 斜板试验 将大鼠置于纹理橡皮覆盖的木

制斜板上,斜板倾斜角度由0缓慢上升,直到大鼠跌落,读取斜板度数。每例由不同实验者测试3次,取均值。

1.4.2 BBB运动功能评分方法(BBB评分) 第一部(0-7分)评判动物后肢各关节活动;第二部(8-13分)评判动物后肢的步态和协调功能;第三部(14-21分)评判动物运动中爪的精细动作,三项满分21分。双人独立观察,取平均值。

1.4.3 组织学观察 切取导管内再生的神经中下段,固定包埋后,按1 μm厚度横切片,亚甲基蓝多色染液染色,LUZWX-F彩色图像分析仪对半薄切片中有髓神经纤维数量、有髓神经纤维直径、轴突直径进行分析

1.5 统计学处理 软件行方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 判定差异有显著性意义。

2 结果

2.1 斜板试验 术后2周内,A-F组无显著性差异($P > 0.05$)。术后4-8周,C组与D组与A、B、E、F间有非常显著性差异($P < 0.01$),C组与D组间无显著性差异($P > 0.05$),见表1。

表1 术后斜板试验比较(°)

时间 \ 组别	A组	B组	C组	D组	E组	F组
1周	27.89 ±3.77	28.43 ±2.89	28.30 ±2.66	27.30 ±2.62	29.37 ±3.06	28.56 ±2.48
2周	28.43 ±2.55	29.85 ±1.88	29.25 ±3.09	29.98 ±2.89	30.89 ±3.12	29.67 ±3.21
4周	32.55 ±3.19	36.32 ±2.59	46.55 ±3.19*	47.06 ±3.24*	37.57 ±2.89	32.68 ±3.16
8周	41.55 ±1.99	46.69 ±2.34	57.55 ±2.44*	56.10 ±2.53*	45.35 ±3.01	40.41 ±2.28

注:与A、B、E、F组比较,*: $P < 0.01$;与C组比较, : $P > 0.05$;与B、E组比较, : $P < 0.01$

2.2 术后BBB运动功能评分法评分结果 术后2周内,A-F组无显著性差异($P > 0.05$)。术后4-8周,C组与D组与A、B、E、F间有非常显著性差异(P

< 0.01),C组与D组无显著性差异($P > 0.05$),A、F组与B、E组有显著性差异($P < 0.05$),见表2。

表2 6组大鼠后肢功能的BBB评分比较表($\bar{x} \pm s$)

时间 \ 组别	A组	B组	C组	D组	E组	F组
1周	2.54 ±0.85	2.43 ±0.69	2.49 ±0.36	1.96 ±0.62	3.05 ±0.56	2.46 ±0.48
2周	3.23 ±0.68	3.43 ±0.87	3.27 ±0.58	3.28 ±0.69	3.33 ±0.98	3.32 ±0.44
4周	4.89 ±0.55 ^c	5.12 ±0.59	8.78 ±0.52 ^a	8.89 ±0.47 ^{ab}	4.98 ±0.62	4.69 ±0.46 ^c
6周	9.24 ±1.05 ^c	11.13 ±0.91	15.93 ±0.82 ^a	16.03 ±0.79 ^{ab}	12.95 ±1.12	10.96 ±0.88 ^c
8周	11.58 ±1.22 ^c	13.66 ±1.38	18.41 ±0.99 ^a	19.47 ±0.89 ^{ab}	13.38 ±2.08	11.42 ±2.18 ^c

注:与A、B、E、F组比较,a: $P < 0.01$;与C组比较,b: $P > 0.05$;与B、E组比较,c: $P < 0.05$

2.3 组织学观察 各组的有髓神经纤维计数、直径及脊神经节细胞数目比较见表3。

表3 各组有髓神经纤维计数、直径及轴突直径比较

项目 组别	A组	B组	C组	D组	E组	F组
有髓神经纤维直径	4.18 ±0.25	5.13 ±0.20	6.48 ±0.19 [#]	6.28 ±0.41 ^{#▽}	4.89 ±0.12	4.09 ±0.28
轴突直径(μm)	2.06 ±0.24	2.68 ±0.22	3.99 ±0.16 [#]	3.85 ±0.32 ^{#▽}	2.45 ±0.28	1.77 ±0.30
有髓神经纤维计数	128.21 ±17.35	148.65 ±9.28	209.48 ±15.19 [#]	221.10 ±16.98 ^{#▽}	150.18 ±11.35	129.10 ±18.37

注:与A、B、E、F组比较, #: $P < 0.01$;与C组比较, ▽: $P > 0.05$,与B、E比较, : $P < 0.05$

3 讨论

脊髓损伤后缺乏适合的微环境而再生困难,如何桥接脊髓使再生神经纤维穿越空洞和瘢痕成为关键。通过改善成熟中枢神经系统损伤部位的内环境可以诱导轴突的再生,近年来许多研究也证明了这一点。用生物材料制成的导管诱导修复脊髓损伤,越来越受到人们的重视。它可以保证再生神经不受周围纤维结缔组织的影响和新生神经纤维能够顺利长入远端,到达靶器官以实现功能恢复,神经导管作为引导神经再生的中空管道,可以为再生轴突提供一个相对密闭的微环境,避免神经误长以及神经瘤的形成。以聚乳酸-三亚甲基碳酸酯 P(LA-TMC)为材料,制备成可吸收性导管是最新应用的一种。实验证明其具有良好的生物降解性和生物相容性;可在修复前保持诱导管强度、弹性和形状,从而防止结缔组织长入,且保证神经再生通道的作用;它本身又可以在体内逐渐降解、适时地被吸收,对神经不产生异物反应,可以提高脊髓横断损伤后再生修复所需要的生长环境,为神经组织工程的发展又提供新的途径^[1]。胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)是近年来发现并已克隆其基因的一种蛋白质,研究发现其对损伤运动神经元亦有促存活作用而受到重视,GDNF亦是一种小分子多肽,在神经损伤的保护和修复过程中发挥重要作用,它对运动神经元有明显的助存活、促分化、增强代谢的功能。近二十年来,大量的研究工作证实损伤的中枢神经元具有可塑性,其中有否有效的特殊神经生长因子支持是影响其再生的因素之一。GDNF是一种蛋白,不能通过血脑屏障及脊髓屏障,亦不能通过消化道给药,必须通过有效方法使其进入脊髓或其周围,才能发挥其最佳生物效应^[2]。在导管内注入这些生物活性物质,可减少纤维组织的浸润,直接提高导管的生物活性,使再生神经通过容易通过神经损伤区。

在脊髓损伤研究上,应用导管的同时结合使用神经营养因子,并分析如何将营养因子与导管材料结合应用能更有效地发挥其生物学活性来修复脊髓

损伤国内外还未见报道。为探讨 P(LA-TMC)/GDNF 复合导管中 GDNF 的合适含量,我们设计并进行了本项实验研究。本实验采用含有 150 - 850 u 6 种不同 GDNF 含量的 P(LA-TMC)/GDNF 复合导管桥接大白鼠脊髓 4 mm 的缺损间隙。术后 1-8 周测定各实验组斜板试验、后肢功能的 BBB 评分、各组有髓神经纤维计数、直径及轴突直径指标,并作各组间统计学比较,以评定各组神经再生情况。结果表明术后 2 周内,A-F 组间无显著性差异($P > 0.05$)。术后 4 - 8 周 P(LA-TMC)/GDNF 复合导管中 GDNF 含量为 450 u 和 550 u 2 组的神经再生情况最好,各项测定指标显著优于其余 4 组,经统计学比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),而该 2 组间的差异则无统计学意义($P > 0.05$)。其余 4 组中,GDNF 含量为 150 u 和 850 u 组的神经再生情况最差,其斜板试验、后肢功能的 BBB 评分检测的各项测定指标,均显著差于另外 2 组,其差异有统计学意义($P < 0.05$)。本实验结果表明 P(LA-TMC)/GDNF 复合导管中,GDNF 含量为 450 - 550 u 左右对促进大白鼠脊髓再生最为有利,是合适的 GDNF 含量,而 GDNF 含量过高或过低都对神经再生不利。表明了 P(LA-TMC)/GDNF 复合导管中 GDNF 的含量与神经再生作用之间存在着量效关系,并非 GDNF 含量越高神经再生越好,而适量的 GDNF 才能有效地发挥其促神经再生的作用。但其中的具体原因还有待我们做进一步的实验研究。这个实验结果对以后 PLLA/GDNF 复合导管用于临床时具有某种参考价值。并为下一步观察给予相应治疗后大鼠脊髓完全横断损伤的恢复情况,探索适宜修复脊髓再生的理想内环境提供了经验。

参考文献:

- [1]倪东江,宋德业.人发角蛋白修复大鼠脊髓损伤的实验研究[J].中国现代医学杂志,2003,13(19):27.
- [2]宋海涛,贾连顺.GDNF 及其对脊髓损伤修复的前景[J].中国矫形外科杂志,2000,7(12):1202.

(收稿日期:2008-09-06)