

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.33.002

NGF 电纺纤维的体外缓释研究 *

牟颖 卢映蓉 蔡婷 吴飞[△]

(上海交通大学药学院 上海 200240)

摘要 目的:研究负载神经生长因子(NGF)的静电纺丝纤维的表征,考察 NGF 电纺纤维对于周围神经修复的效果。**方法:**将 NGF 水溶液分散于 PLLA 溶液,通过 W/O 乳液法制备静电纺丝纤维,对纤维的形态、力学性能等进行表征, Elisa 方法测定 NGF 的体外释放动力学, Alamer Blue 法检测试剂来考察纤维释放液对于 PC12 细胞增殖的影响。**结果:**NGF 电纺纤维具备良好的形态和力学性质,直径为 500-900 nm,纤维具备三维多孔结构。纤维的最大拉伸应力为 2.50 ± 0.41 MPa。电纺纤维中 NGF 在体外可有效释放 9 天,累积释放量接近 3000 pg。细胞活性实验结果显示,第 1、3、5、7 天释放液的荧光强度与对照组相比有显著差异。**结论:**负载 NGF 的乳液法静电纺丝纤维有促进缺损周围神经修复的潜质。

关键词:静电纺丝纤维;神经导管;NGF;PLLA;神经修复

中图分类号:R745,R318.08 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)33-6404-03

In Vitro Sustained Release Research of NGF Electrospun Fibers*

MU Ying, LU Ying-rong, CAI Ting, WU Fei[△]

(Shanghai JiaoTong University School of Pharmacy, Shanghai, 200240, China)

ABSTRACT Objective: To investigate characterization and effect on peripheral nerve repair of NGF electrospun fibers. **Methods:** NGF solution was dispersed into PLLA solution, and then electrospun fibers were fabricated by W/O emulsion method. The morphology and mechanical properties of the electrospun fibers were characterized and release kinetic of NGF in fibers was detected by NGF Elisa kit. The effect of release solution on cell activity was tested by Alamer Blue. **Results:** The NGF emulsion electrospun fibers had good morphology and mechanical properties. The fibers had porous structure with diameters between 500 nm and 900 nm. The maximum tensile stress of fibers is 2.50 ± 0.41 MPa. NGF in fibers had sustained release for 9 days in vitro with a cumulative release of nearly 3000 pg. Statistical difference was found in fluorescence intensity of release solution compared to blank group in cell viability experiment. **Conclusions:** NGF emulsion electrospun fibers provide a promising approach in the application of peripheral nerve repair.

Key Words: Electrospun fibers; Nerve conduit; NGF; PLLA; Nerve repair

Chinese Library Classification: R745, R318.08 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)33-6404-03

前言

周围神经损伤后,由于神经传导功能被破坏,会导致运动神经和交感神经的功能发生障碍,四肢与躯干感觉受到影响,因此会给患者带来严重的功能障碍。然而周围神经损伤的治疗仍是临床面临的一个非常棘手的难题。目前,周围神经损伤的修复方式主要有以下四种:自体神经移植,异体神经移植,无张力端端吻合术,神经导管^[1]。在这些方法中,无张力端端吻合术只适用于小范围的神经缺损治疗,当缺损长度超过 5 mm 的时候则难以采用此种方法,而很多外周神经损伤造成的断端缺损长度都大于 5 mm,因此无张力端端吻合术的应用受到了很大的限制。自体神经移植的神经来源有限,而且需要牺牲次要神经功能,还会产生供区神经瘤和瘢痕,并且容易发生感染,这些缺点也限制了自体神经移植的临床应用^[2-4]。而异体神经移植最大的问题则是会产生免疫反应,要应用免疫抑制剂,而免疫抑制剂的使用会降低机体的免疫力,造成肿瘤和继发性感染疾病的发生^[5]。在这种情况下,神经导管的出现为神经损伤治疗带来

了新的解决方案^[6]。神经导管是由生物或非生物材料制成的管状支架,又可称为神经再生室、神经桥接体等。神经导管具有一定的生物活性和三维结构,可以连接于缺损神经断端,为神经再生提供适宜的环境,并且可以防止疤痕组织的侵入,同时避免再生神经向其他组织生长^[7]。

静电纺丝是一种使带电荷的聚合物溶液或熔体在静电场中喷射出来制备聚合物纳米纤维的方法^[8-10],在组织工程支架、药物输送、电极材料、传感器材料、复合材料、吸音材料、生物催化、亲和性膜等领域均有一定的应用^[11-13]。静电纺丝作为制备神经导管的方法之一有着很大优势,例如电纺纤维类似于细胞外基质(ECM)的形态有利于细胞的增殖与分化,提高细胞的附着能力;电纺纤维具有良好的机械强度,在体内可以起到很好的支撑作用;纤维可负载细胞因子、抗生素、活细胞悬液等^[14]。另外,大量研究表明,神经生长因子(NGF)在神经系统修复期会通过层粘连蛋白和纤维粘连蛋白等物质的共同作用来引导轴突沿一定方向向远端的生长和髓鞘的分化,从而实现神经的再生和功能的恢复^[15]。本文将负载 NGF 的乳液法电纺纤维的

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81102406)

作者简介:牟颖(1988-),女,硕士研究生,研究方向:负载生物大分子的静电纺丝纤维

[△]通讯作者:吴飞, E-mail: feiwu@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2014-05-17 接受日期:2014-06-12)

物理性质、释放行为、细胞活性进行研究,为电纺纤维在后续神经导管中的研究提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Sartorius 电子天平(北京塞多利斯仪器系统有限公司);恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司);漩涡混合器(美国 Scientific Industries);静电纺丝装置(北京永康乐业有限公司);扫描电镜(SEM)(日本 Hitachi 公司);电子拉力机(美国英斯特朗公司);恒温水浴摇床(太仓市科教器材厂);酶标仪(芬兰 Thermo Labsystem 公司);超纯水仪器(Millipore 公司);微量移液枪(Eppendorf 公司);MK3 酶标仪(芬兰 Thermo Labsystem 公司);96 孔板(德国 Greiner bio-one 公司);细胞培养箱(美国 Thermo Scientific 公司);左旋聚乳酸(PLLA)(Sigma 公司);神经生长因子(NGF)(上海优宁维试剂有限公司);BSA(上海思吉生物制品有限公司);NGF Elisa 试剂盒(上海优宁维试剂有限公司);RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司);马血清、胎牛血清(美国 PAA 公司);青链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司);PC12 细胞(未分化)(中科院神经所);二甲基亚砜(分子生物级)(美国 Sigma 公司);Alamer Blue(美国 Life technology 公司);二氯甲烷等其它试剂均为分析纯,采购自国药集团。

1.2 实验方法

1.2.1 负载神经生长因子的乳液法电纺纤维的制备 称取 250 mg PLLA,溶于 0.7 mL 二氯甲烷中,待 PLLA 完全溶解后再加入 0.3 mL N,N-二甲基甲酰胺,作为外油相。称取适量 NGF 冻干粉,加入 0.1% 的牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 缓冲液中,涡旋 3 min 使 NGF 溶解均匀,作为内水相。将内水相逐滴加入外油相中,采用磁力搅拌器搅拌 30 min,形成 W/O 乳液。用注射器吸取乳液,固定于静电纺丝装置的推注泵上,开启高压电源,进行静电纺丝。得到 NGF 乳液纤维。

1.2.2 纤维的表征 将纤维固定于导电胶上,用离子镀膜仪喷金后,置于扫描电镜下,观察纤维的形态。用切割模具将纤维切成哑铃状,用橡胶垫固定,将纤维置于电子拉力机中检测力学强度。

1.2.3 纤维的中 NGF 体外释放研究 称取纤维 0.02 g 放入释放瓶中,加入 4 mL PBS 缓冲液,放置于 37 °C 摇床中。每隔 24 h

吸取释放液,再加入等量 PBS 缓冲液。取出的释放液置于 -20 °C 保存。用 ELISA 分析方法测定释放液中 NGF 含量。

1.2.4 纤维释放液细胞活性考察 用培养基配成单个细胞悬液,以每孔 10000 个细胞接种到 96 孔板,每孔体积 100 μ L。取第 1、3、5、7、9 天的纤维释放液各 10 μ L 加入细胞培养基中,对照组中每孔加入 10 μ L PBS 缓冲液。在 37 °C,5% CO₂ 的条件下培养 6 h。向每孔中加入 10 μ L Alamer Blue 溶液,继续培养 4 h。使用酶标仪,在 585 nm 散射峰,570 nm 吸收峰的条件下测定各孔荧光强度。

1.3 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理,考察实验组和空白对照组之间荧光强度值的差异。各组数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),检测水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 纤维的表征

从纤维的扫描电镜图(图一)中可见纤维直径分布均匀,为 500-900 nm,纤维具有三维多孔结构,因而能够模拟细胞外基质(ECM),维持细胞的附着、增殖、分化。纤维的力学性质测试结果如表 1 所示,结果表明,纤维的拉伸性能和弹性良好。

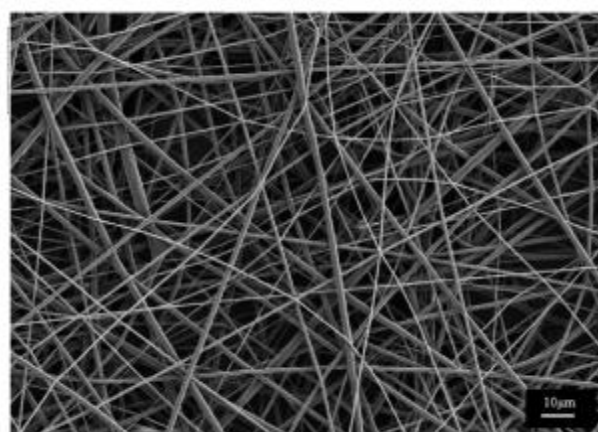


图 1 电纺纤维扫描电镜图

Fig. 1 SEM image of emulsion electrospun fibers

表 1 静电纺丝纤维的力学性能

Table 1 Mechanical properties of electrospun fibers

Thickness (mm)	Modulus of elasticity (MPa)	Tensile strain at yield (mm/mm)	Tensile stress at yield (MPa)	Maximum tensile strain (mm/mm)	Maximum tensile stress (MPa)
0.05	37.01 $\pm$ 4.81	0.06 $\pm$ 0.01	1.82 $\pm$ 0.21	0.29 $\pm$ 0.04	2.50 $\pm$ 0.41

2.2 纤维中 NGF 体外释放动力学结果

NGF 的体外累计释放结果如图 2 所示。结果可见 NGF 可以累积释放时间 9 天,累积释放量接近 3000 pg。由释放图中可以看出,释放初期存在着一定的突释,但总释放量能够维持 NGF 的有效作用浓度,有利于促进缺损神经的再生。

2.3 纤维释放液细胞活性测定结果

采用 Alamer Blue 检测试剂来检测纤维不同天数释放液对于细胞活性的影响,结果如图三所示,与空白对照实验相比,PC12 细胞在纤维释放液中的增殖速度更快,随着天数增加,释放液的细胞活性略有下降,统计学结果表明,第 1、3、5、7 天释放液

的细胞活性与对照组相比有显著差异,而第 9 天细胞活性与对照组相比则无显著性差异,这一结果也与体外释放行为结果基本一致。实验结果说明负载神经生长因子的电纺纤维在体内具有一定的缓释功能和良好的生物活性,能够促进 PC12 细胞的增殖。

3 讨论

目前已有大量研究将静电纺丝作为一种良好的方式来制备神经导管,用于缺损神经的修复。理想的神经修复材料应满足如下要求:具有模拟细胞外基质的结构和生物学功能;生物相容性良好,不会产生免疫反应;具有适宜的力学性能,可以支

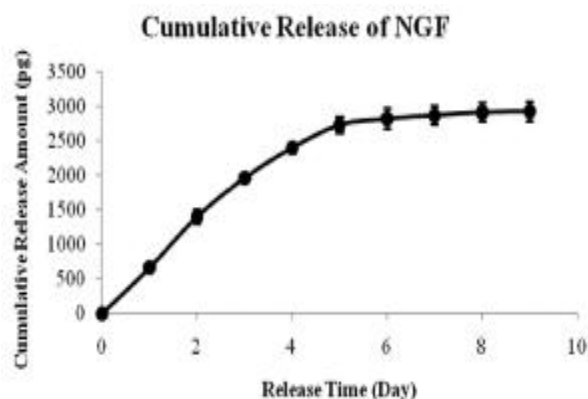


图2 电纺纤维中 NGF 累积释放曲线

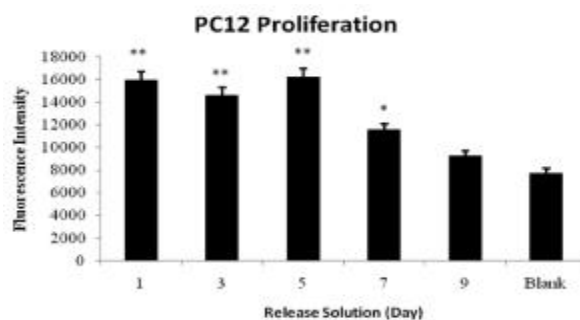
Fig. 2 Cumulative release of NGF in fibers

撑细胞生长;能够有效释放负载的药物^[16,17]。本文中的 PLLA 作为一种生物可降解材料,在体内最终可降解为无毒副作用的 CO₂ 和 H₂O,可被机体吸收,生物相容性良好^[18,19]。另外,利用 PLLA 制备的电纺纤维直径分布均匀,具有良好的外观形貌和三维结构,能够模拟细胞外基质,有利于细胞的附着、增殖和分化,并且具有合适的力学性质,纤维的弹性和拉伸性能良好。

为了更好地促进缺损神经的生长,研究者们将具有生物活性的大分子包裹在静电纺丝纤维中,在电纺纤维模拟和维持细胞外基质的结构的同时,让这些大分子通过释放起到刺激细胞增殖、分化,促进神经再生的作用^[20-22]。将生物活性分子加入电纺纤维的关键在于如何维持这些物质的持续有效释放,从而促进神经修复。本文中制备的乳液法电纺纤维中负载了神经生长因子,在体外可持续释放 9 天,累积释放量接近 3000 pg,可以维持细胞的生长。体外细胞活性实验亦进一步表明,负载 NGF 的电纺纤维可以有效促进 PC12 细胞的增殖,说明纤维具有良好的生物活性。本文中的研究结果为今后进一步研究电纺纤维在神经修复中的作用提供了重要的依据。

参考文献(References)

- [1] Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review[J]. *Neuro surg Focus*, 2004, 16(5): 1-7
- [2] Pabari A, Yang SY, Seifalian AM, et al. Modern surgical management of peripheral nerve gap [J]. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 2010, 63(12): 1941-1948
- [3] Panseri S, Cunha C, Lowery J, et al. Electrospun micro-and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections [J]. *BMC biotechnology*, 2008, 8(1): 39
- [4] Chen MB, Zhang F, Lineaweaver WC. Luminal fillers in nerve conduits for peripheral nerve repair [J]. *Ann Plast Surg*, 2006, 57(4): 462-471
- [5] Liu Y, Hou CL. Current development of nerve guid conduits [J]. *International Journal of Orthopaedics*. 2010, 31(5): 279-281
- [6] Panseri S, Cunha C, Lowery J, et al. Electrospun micro- and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections [J]. *BMC Biotechnol*, 2008, 8(1): 39
- [7] Evans G. R. Challenges to nerve regeneration [J]. *Semin Surg Oncol*, 2000, 19(3): 312-318
- [8] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering [J]. *Science*, 1993, 260 (5110): 920-926
- [9] Chew SY, Mi RF, Hoke A, et al. Aligned protein-polymer composite

图3 释放液细胞活性结果 (n=5, $\bar{x} \pm s$)Fig.3 Cell proliferation of fiber release solution (n=5, $\bar{x} \pm s$)

注: *表示与空白对照组比较, $P < 0.01$; *表示与空白对照组比较, $P < 0.05$
Note: ** $P < 0.01$ compared with blank group; * $P < 0.05$ compared with blank group

- fibers enhance nerve regeneration: A potential tissue-engineering plat-form[J]. *Advanced Functional Materials*, 2007, 17(8): 1288-1296
- [10] Zhou J, Cao CB, Ma XL, et al. Electrospinning of silk fibroin and collagen for vascular tissue engineering [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 47(4): 514-519
 - [11] Dai Y, Niu J, Liu J, et al. In situ encapsulation of laccase in microfibers by emulsion electrospinning: preparation, characterization, and application[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(23): 8942-8947
 - [12] Greiner A, Webdorrff J. Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers[J]. *Angew Chem*, 2007, 46(30): 5670-5703
 - [13] Teo WE, Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofiber assemblies [J]. *Nanotechnology*, 2006, 17(14): 89-95
 - [14] Yu DG, Shen XX, White CB, et al. Latric fiber and its application in novel drug delivery system [J]. *China synthetic fiber industry*, 2008, 31(3): 57-61
 - [15] Bothwell M. Neuronal growth factors [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1991: 11
 - [16] Pabari A, Yang SY, Mosahebi A, et al. Recent advances in artificial nerve conduit design: strategies for the delivery of luminal fillers [J]. *Journal of Controlled Release*, 2011, 156(1): 2-10
 - [17] Cunha C, Panseri S, Antonini S. Emerging nanotechnology approaches in tissue engineering for peripheral nerve regeneration [J]. *Nanom edicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2011, 7(1): 50-59
 - [18] Bini TB, Gao S, Wang S, et al. Electrospun poly (L-lactide-co-glycolide) biodegradable polymer nanofiber tubes for peripheral nerve regeneration[J]. *Nanotechnology*, 2004, 15(11): 1459
 - [19] Maretschek S, Greiner A, Kissel T. Electrospun biodegradable nanofiber nonwovens for controlled release of proteins [J]. *Journal of Controlled Release*, 2008, 127(2): 180-187
 - [20] Sun W, Sun C, Lin H, et al. The effect of collagen-binding NGF-b on the promotion of sciatic nerve regeneration in a rat sciatic nerve crush injury model[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(27): 4649-4656
 - [21] Krewson CE, Klarman ML, Saltzman WM. Distribution of nerve growth factor following direct delivery to brain interstitium [J]. *Brain Res*, 1995, 680(1): 196-206
 - [22] Moore K, Macsween M, Shoichet M. Immobilized concentration gradients of neurotrophic factors guide neurite outgrowth of primary neurons in macroporous scaffolds[J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(2): 267-278