

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.18.012

三维取向 PLGA 神经导管促进坐骨神经再生的实验研究*

欧阳元明 何 宁 何 劲 范存义[△]

(上海交通大学附属第六人民医院骨科 上海 200233)

摘要 目的: 探讨应用改进静电纺丝技术一次成型制备三维(3D)取向聚乳酸与聚羟基乙酸共聚物(PLGA)纳米神经导管的可行性,检测其对坐骨神经再生的促进作用。**方法:** 应用改进的静电纺丝技术制备无缝取向 PLGA 纳米神经导管,通过扫描电镜和透射电镜检测支架的纳米结构;分别制备取向和非取向纳米纤维支架修复 13mm 坐骨神经缺损模型。36 只成年 SD 大鼠随机分为 3 组(每组 12 只),A 组:非取向 PLGA 神经导管组(阴性对照);B 组:取向 PLGA 神经导管组,C 组:自体神经移植组(阳性对照),于术后 3 月通过大体观察、行走足印分析、腓肠肌萎缩率、电生理检测、组织形态学检测、透射电镜检测及图像分析,评价无缝取向 PLGA 纳米神经导管修复坐骨神经缺损的效果。**结果:** 神经导管修复神经缺损三月后,大体观察显示神经导管结构完整,无坍塌和断裂;各组再生神经均有通过神经导管长入远端。B 组与 C 组的腓肠肌萎缩率和神经电传导速度无统计学差异($P < 0.05$),均优于 A 组。B 组与 C 组再生神经纤维数量及成熟程度均要明显优于 A 组。**结论:** 无缝取向 PLGA 纳米神经导管能够诱导并促进神经再生,提高坐骨神经再生的质量,有望成为自体神经移植的替代物。

关键词: 静电纺;神经组织工程;纳米纤维;神经再生;取向的

中图分类号: Q95-3; R318; R338 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)18-3446-05

Highly Aligned Seamless PLGA Nanofiber Conduits for Sciatic Nerve Regeneration*

OUYANG Yuan-ming, HE Ning, HE Jing, FAN Cun-yi[△]

(Department of Orthopaedic Surgery, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai, 200233, China)

ABSTRACT Objective: This study is to explore the feasibility of the improved electrospinning technique prepared uniaxially aligned three-dimension (3D) orientation PLGA nanofibrous conduit and to investigate the effectiveness of such nerve conduits on the peripheral nerve regeneration. **Methods:** The uniaxially aligned 3D PLGA nanofibrous conduit was made by the improved electrospinning technique. The Nanostructures of the conduit detected by scanning and transmission electron microscope. 36 male adult rats were randomly divided into three groups of 12 rats in each group. A 13mm sciatic nerve defect in the right sciatic nerve was created in the rats and was repaired with non oriented PLGA conduits (group A), with oriented PLGA conduits (group B) and with autograft (group C) respectively. After 3 months postoperatively, the method of the walking footprint analysis, the gastrocnemius muscle atrophy rate, electrophysiological testing, tissue morphology detected, the transmission electron microscopy and image analysis are used to evaluate the result of the seamless orientation PLGA nerve conduit on repairing the peripheral nerve defects. **Results:** There were no collapse and fracture in scaffolds and the conduit can provide ideal mechanical support after three month of the operation. Regenerated nerve through nerve conduit to the distal end of nerve in each group. There were no significant difference between group B and C in the atrophy of gastrocnemius muscle and nerve conduction velocity ($P < 0.05$), and were better than that of group A. The number and the maturity of regenerate nerve fiber in group B and C are obviously better than the group A. **Conclusions:** These uniaxially aligned seamless 3D electrospun PLGA nerve guides can induce and promote nerve regeneration, improve the quality of the sciatic nerve regeneration and so may be a promising substitute for autogenous nerve grafts.

Key words: Electrospinning; Nerve tissue engineering; Nanofiber; Nerve regeneration; Aligned

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R318; R338 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)18-3446-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81171477);上海市卫生局重点项目(20124012);

上海市科委产学研医合作项目(12DZ1940303)

作者简介:欧阳元明(1975-),男,博士,主治医师,主要研究方向:组织工程,神经再生,

电话:13681665183, E-mail: ouyangyuanming@163.com

[△] 通讯作者:范存义, E-mail: fcy883@163.com

(收稿日期:2014-03-01 接受日期:2014-03-28)

前言

周围神经损伤是创伤时发生的常见损伤,最严重的损伤时神经完全离断,这直接导致神经支配的区域感觉和运动功能的丧失。目前的治疗金标准是从自体的其他部位移植一段神经到缺损的部位进行桥接^[1],但这种技术存在许多的缺点,比如神经大小的不匹配、再次手术、及供区的功能丧失,神经瘤的产生等等^[1,2]。理想的神经导管能够提供结构和形态的支持来促进神经再生^[3]。取向的纳米材料能诱导神经再生^[2-6],由于制作具有取向纤维和导管长轴方向一致的神经导管非常困难,研究者在以前的研究中一般是采用卷曲有取向纤维的膜来制作成导管,或者用具有取向纤维的膜来填充硅管^[7]。本研究探讨应用改进静电纺丝技术一次成型制备 3D 取向复合纳米神经导管的可行性,检测其对坐骨神经再生的促进作用。

1 材料和方法

1.1 无缝取向纳米 PLGA 神经导管的制备

对于轴向取向导管支架的成型,我们改进的接收装置,将此设计称为旋转磁性导体棒-绝缘棒法。整个装置由传动转轴、传送皮带、马达以及收集转轴组成。利用改进的静电纺装置制备取向 PLGA 神经导管和用常规方法制备非取向 PLGA 神经导管待用。

1.2 实验分组及方法

雄性 Sprague-Dawley (SD) 清洁级大鼠 36 只,体重 230 克-250 克(上海交通大学附属第六人民医院实验动物中心提供)饲养条件:温度 22℃-24℃,湿度 55%-60%。36 只成年 SD 大鼠随机分为 3 组, A 组:非取向 PLGA 神经导管组; B 组:取向 PLGA 神经导管组, C 组:自体神经移植组。按照体重计算出需要的氯胺酮麻醉药物的剂量(100mg/kg),依照 0.1g/ml 浓度配制氯胺酮麻醉药,在无菌条件下,取右大腿及臀部后正中切口游离分离暴露坐骨神经。

分别将坐骨神经中段切除一段 10 mm 神经,用非取向或取向纳米 PLGA 神经导管(导管 15 mm 长)桥接修复,导管的两端分别利用 8-0 显微缝线缝合神经外膜 1 mm 到管壁上,制备 13 mm 的坐骨神经缺损模型。

1.3 检测指标

1.3.1 大体观察 实验期间所有实验大鼠存活情况。术后观察的大体情况包括:下肢肌肉的萎缩程度,并把萎缩侧和正常侧做比较,足踝部足趾部后跟溃疡情况,下肢跛行程度,伤口的愈合情况,神经导管的卡压和降解情况,以及导管与周围组织粘连的情况。

1.3.2 坐骨神经功能指数(SFI) 通常坐骨神经功能指数(SFI)值在接近 0 表示坐骨神经功能正常,当坐骨神经功能指数(SFI)值在 -100 表示坐骨神经功能完全丧失。所有的实验大鼠都进行行走足印分析。在大鼠进行手术后的 2、4、6、8、10、12 周分别用上述方法进行检检测。按照 SFI 公式进行计算: $SFI = -38.3(EPL - NPL) / (NPL + 109.5(ETS - NTS) / NTS + 13.3(EIT - NIT) / NIT - 8.8)$ (E: Experimental 试验侧足; N: Normal 正常侧足)。

1.3.3 神经电生理检查 所有的实验大鼠均在术后 6 周和 12 周进行神经电生理检测,并记录检测指标复合神经动作电位

(DCAMP)和神经传导速度(NCV)。

1.3.4 肌肉湿重测 将双侧腓肠肌于术后 12 周完整取下,按照公式:腓肠肌湿重比 = 失神经支配侧的腓肠肌的重量(右侧) / 神经支配完好的腓肠肌重量(左侧),计算比值。并将腓肠肌的中部肌做病理组织切片并作 HE 染色。

1.3.5 组织学检测 对再生的坐骨神经进行取材进行组织形态学检查包括 HE 染色,甲苯胺蓝髓鞘染色,透射电镜观察。神经组织可在术后 6 周和 12 周分别取坐骨神经标本,找出缝线标记的吻合口,2.5%戊二醛磷酸缓冲液固定 2 h,1%饿酸后固定,组织脱水后环氧树脂包埋,乙醇梯度脱水,连续半薄组织切片,切片厚度 1 μ m。每段神经分别包埋。由于切片时需磨去一部分标本,故实际切片部位顺延后缩。行甲苯胺蓝(toluidine blue)染色、组织学观察。电子染色使用醋酸双氧铀-枸橼酸铅后,将超薄切片放置于小铜网上,在透射电镜下观察,看再生轴突的数量和再生髓鞘厚度。

1.3.6 图像分析 取甲苯胺蓝染色神经切片,采用 KS 400 图像分析系统(video image digital analysis system)进行图像分析。计数再生神经轴突总数及有髓纤维髓鞘平均厚度,这是评价神经再生状况客观的重要指标。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计软件单因素方差分析所有数据 ANOVA,多样本均数的两两比较采用 LSD 法进行, $P < 0.01$ 及 $P < 0.05$ 差异设为有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察

术后三组大鼠均存活,实验侧(右侧)出现跛行,术后伤口基本愈合,未出现红肿,感染,溃烂等现象,提示进行导管植入手术和自体神经移植后没有急性或亚急性炎症反应现象发生。

2.2 坐骨神经功能指数

在术后两周,各组间没有显著性差异($P > 0.05$)。到第 4 周开始自体移植组和取向的 PLGA 组与非取向 PLGA 组之间开始有显著性的差异。自体移植组的功能指数最高,取向的 PLGA 组功能指数比非取向 PLGA 组高有显著性差异($P < 0.05$),但低于自体移植组的功能指数,没有显著性差异($P > 0.05$), (表 1)。

2.3 神经电生理检测

神经电刺激肌电图分析(表 2)各实验组均有神经纤维通过,肌电图测量各组的神经传导速度和动作电位的振幅都较正常神经有所下降,并且随着时间的推移神经传导速度加快,动作电位的振幅也随之提高。在术后 6 周,非取向 PLGA 组、取向 PLGA 组和自体神经移植组三组之间的神经传导速度及动作电位的振幅都有显著性差异,但自体神经移植组更加接近正常。术后 6 周和术后 12 周相比较,同组之间神经传导速度及动作电位的振幅都随着时间的延长有提高,证明神经的再生正随着时间的推移走向成熟。

2.4 肌肉湿重的测定

术后 12 周,取向 PLGA 导管组和自体神经移植组腓肠肌的横断面 HE 染色提示腓肠肌细胞明显比非取向 PLGA 组要大(图 1),而取向 PLGA 导管组和自体神经移植组之间没有明显差异。术后腓肠肌湿重比,在第 12 周时,取向 PLGA 导管组

表 1 各组坐骨神经功能指数 SFI ($n=6, \bar{x} \pm s$)Table 1 SFI of each group ($n=6, \bar{x} \pm s$)

术后时间 Post-operation time	A 组 (Group A)	B 组 (Group B)	C 组 (Group C)
2 周(2weeks)	-100 $\pm$ 2.18	-95 $\pm$ 2.14	-88 $\pm$ 2.95
4 周(4weeks)	-95 $\pm$ 2.15	-93 $\pm$ 2.15	-76 $\pm$ 2.25
6 周(6weeks)	-93 $\pm$ 1.77	-88 $\pm$ 2.45	-66 $\pm$ 2.45
8 周(8weeks)	-81 $\pm$ 1.75	-74 $\pm$ 1.75	-53 $\pm$ 2.15
10 周(10weeks)	-78 $\pm$ 2.27	-63 $\pm$ 2.44	-49 $\pm$ 2.35
12 周(12weeks)	-73 $\pm$ 2.07	-58 $\pm$ 2.28	-38 $\pm$ 2.05

表 2 术后 6 周及 12 周的肌电图检测($n=6, \bar{x} \pm s$)Table 2 NCV and DCMAP data of each group at 6 weeks and 12 weeks after operation ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别 (Group)	神经传导速度 NCV(M/S)	远端复合动作电位波幅 DCMAP(mv)
A 组 6 周(Group A 6 Weeks)	22 $\pm$ 1.15	3.79 $\pm$ 0.64
A 组 12 周(Group A 12 Weeks)	31 $\pm$ 1.55	6.3 $\pm$ 0.73
B 组 6 周(Group B 6 Weeks)	29 $\pm$ 2.2	3.87 $\pm$ 0.68
B 组 12 周(Group B 12 Weeks)	41 $\pm$ 1.36	8.3 $\pm$ 0.59
C 组 6 周(Group C 6 Weeks)	39 $\pm$ 1.45	6.7 $\pm$ 0.69
C 组 12 周(Group C 12 Weeks)	49 $\pm$ 1.88	10.5 $\pm$ 1.32

和自体神经移植组无显著差异($P>0.05$),而取向 PLGA 导管组和非取向 PLGA 导管组有显著差异,分别为 $75\% \pm 12\%$ 和 $60\% \pm 10\%$, ($P<0.05$)。自体神经移植组 $80.85\% \pm 11\%$ 和非取

向 PLGA 导管组 $60\% \pm 10\%$ 有显著差异($P<0.05$)。这些客观数据表明,取向 PLGA 导管组和自体神经移植组具有类似的促进肌肉保留的功能。

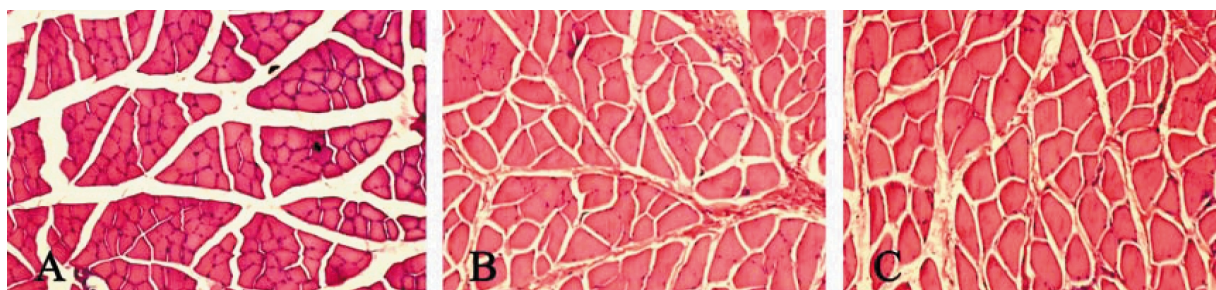


图 1 (A)为非取向 PLGA 组的代表性的典型腓肠肌组织切片,(B)为取向 PLGA 组的代表性的典型腓肠肌组织切片,(C)为自体神经移植组的代表性的典型腓肠肌组织切片

Fig.1 Histology observation of gastrocnemius muscle by cross-sectional HE staining(A-C):Group A; Group B; Group C

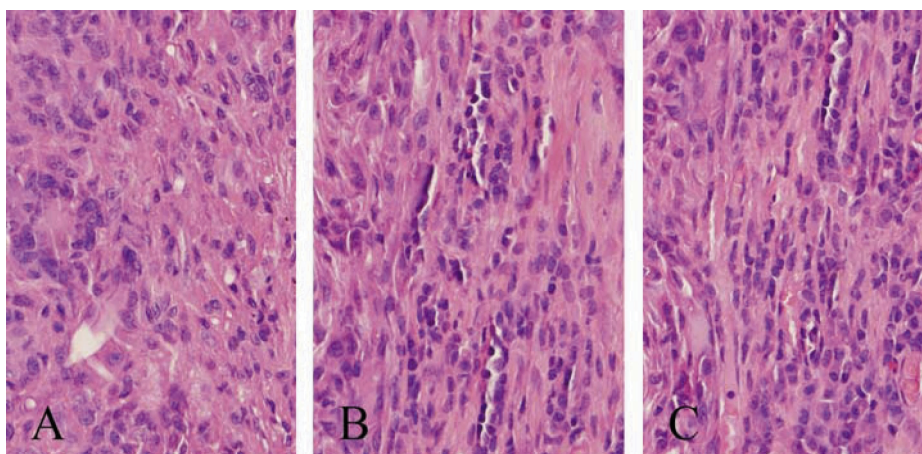


图 2 HE 染色用来分析自体神经和再生神经纤维的纵向切片(A-C):Group A; Group B; Group C

Fig.2 HE staining(A-C): Group A; Group B; Group C

2.5 组织学检测

HE 染色用来分析自体神经和再生神经纤维的纵向切片。如图 2 所示,在取向 PLGA 导管组新生的神经显示出比非取向 PLGA 导管组更具备线性的结构,这表明取向的神经导管能够对新生的神经提供更合适的引导,使再生的神经能够按线性的

结构生长。

甲苯胺蓝染色(图 3)和透射电镜(图 4)主要用来观察再生神经的横断面的轴突数量和轴突粗细,以及轴突周围的雪旺氏细胞形成的髓鞘厚度(表 3)。

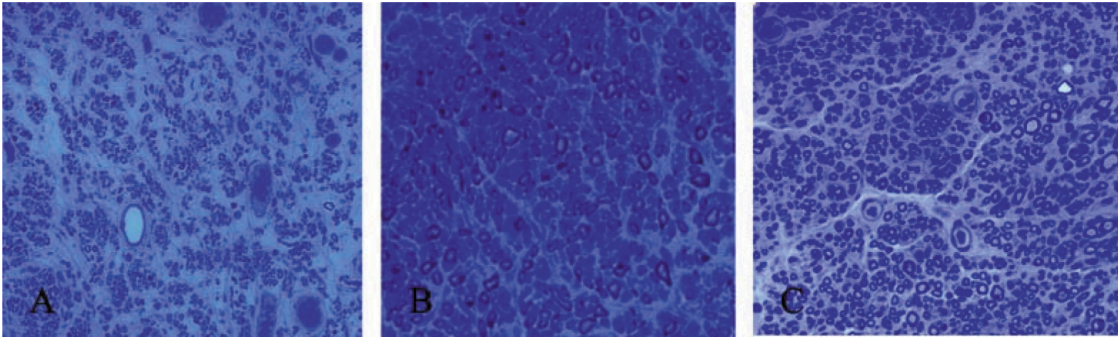


图 3 术后 12 周神经髓鞘的再生情况用甲苯胺蓝染色检查图示(A-C): Group A; Group B; Group C

Fig.3 Myelination of regenerating nerves stained with toluidine blue (A1-C1) at week 12 post-operatively of each group

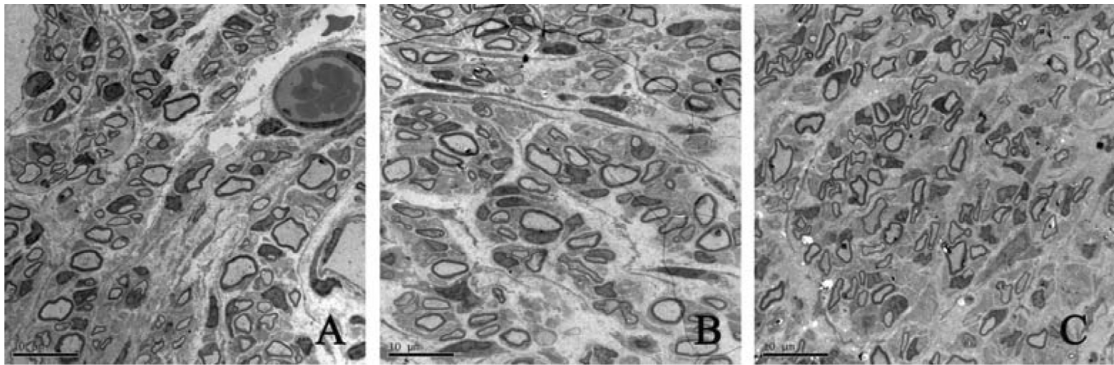


图 4 术后 12 周神经髓鞘的再生情况用超微结构的透射电镜图示(A-C):Group A; Group B; Group C

Fig.4 Ultrastructure of the regenerated nerve under TEM (A-C) at week 12 post-operatively of each group

表 3 术后 6 周和 12 周取中段再生神经的纤维做图像分析(n=6, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 Data image analysis of regeneration of nerve fiber at week 6 and 12 post-operatively of each group(n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别(Group)	A 组(GroupA)	B 组(GroupB)	C 组(GroupC)
神经纤维计数 6 周 (Nerve fiber number at 6 weeks)	4100± 358	4300± 476	8400± 377
神经纤维计数 12 周 (Nerve fiber number at 12 weeks)	5400± 669	7300± 689	12000± 532
轴突直径(μm)6 周 (Axon diameter at 6 weeks)	2.13± 0.45	2.37± 0.51	4.35± 0.35
轴突直径(μm)12 周 (Axon diameter at 12 weeks)	3.44± 0.68	4.72± 0.45	5.3± 0.47
髓鞘厚度(μm)6 周 (Thickness of myelin sheath at 6 weeks)	0.563± 0.13	0.88± 0.15	9.68± 0.17
髓鞘厚度(μm)12 周 (Thickness of myelin sheath at 12weeks)	0.86± 0.14	1.3± 0.16	1.25± 0.14

3 讨论

目前对周围神经再生的挑战是寻找一种理想的替代物来代替自体神经修复长距离的时间缺损。理想的神经导管应该能够提供结构,形态和化学信号来引导细胞增生来达到理想的功能影响效果^[6,8-10]。另一方面,优良的组织支架的一个重要特点

就是取向的纳米纤维,因为纤维的方向高度影响着细胞的增生和相关的功能,比如平滑肌细胞和神经细胞等等^[2,3]。在我们的研究中,我们通过改进静电纺技术制作出了一次成型的无缝取向纳米合成生物材料 PLGA 导管,并在体内实验验证了它的促进神经再生的作用。

分析取向的纳米 PLGA 神经导管组比非取向纳米 PLGA

神经导管组更能促进坐骨神经再生的原因主要有一些几个方面:首先,取向的静电纺丝纳米材料能够控制神经元的生长方向性,这其中的原理叫做“接触引导”^[11,12]。结果我们观察到许旺细胞的迁移和神经的生长在取向的纳米纤维上非常活跃^[9]。其次,取向的静电纺纳米纤维也已经被研究者发现能够在培养的雪旺细胞中上调 P0(雪旺细胞的成熟标志),上调 MAC(促进髓鞘再生的标志)以及下调 NCAM-1(不成熟雪旺细胞的标志),因此能够加速雪旺细胞的成熟^[13]。第三,纵轴取向的微槽结构为神经的再生提供了更多的空间生长^[2,14-17]。

在这项研究中我们呈现了无缝取向的纳米 PLGA 神经导管的设计,制作和应用来促进周围神经再生。使用了 13 mm 的大鼠坐骨神经缺损模型来评估坐骨神经功能的恢复情况和组织形态的分析。所有的结果都显示出无缝取向的纳米 PLGA 神经导管能显著提高神经再生。因此,我们相信在不久的将来无缝取向的纳米 PLGA 神经导管能够有望应用在周围神经再生上。

尽管在我们的研究中无缝取向的纳米 PLGA 神经导管组与自体神经移植组没有显著差异,无缝取向的纳米 PLGA 神经导管组中的各项指标的数值仍然低于自体神经移植组,其中一个可能的原因或许是由于导管中缺乏神经生长因子^[4,18,19]。在未来的研究中,我们可能将把神经生长因子载入无缝取向的纳米 PLGA 神经导管中。此外,Mahairaki 等作者研究发现纳米纤维的直径大小也显著影响着细胞的粘附和细胞在底物中迁移的能力^[20]。我们将在以后的研究中制作不同直径大小的无缝纳米纤维导管,并进行动物体内实验研究优化,从而选择出最佳的纳米纤维直径大小的神经导管以更有利于促进坐骨神经再生^[21]。

参考文献(References)

- [1] Jiang X, Lim SH, Mao HQ, et al. Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits [J]. *Exp Neurol*, 2010, 223(1): 86-101
- [2] Zamani F, Amani-Tehran M, Latifi M, et al. The influence of surface nanoroughness of electrospun PLGA nanofibrous scaffold on nerve cell adhesion and proliferation [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2013, 24(6): 1551-1560
- [3] Mukhatyar V, Pai B, Clements I, et al. Molecular Sequelae of Topographically Guided Peripheral Nerve Repair[J]. *Ann Biomed Eng*, 2013
- [4] Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. Axially aligned electrically conducting biodegradable nanofibers for neural regeneration[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2012, 23(7):1797-1809
- [5] Jiang X, Mi R, Hoke A, et al. Nanofibrous nerve conduit-enhanced peripheral nerve regeneration[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012
- [6] Wang Y, Yao M, Zhou J, et al. The promotion of neural progenitor cells proliferation by aligned and randomly oriented collagen nanofibers through beta1 integrin/MAPK signaling pathway [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(28):6737-6744
- [7] Prabhakaran MP, Vatankeh E, Ramakrishna S. Electrospun aligned PHBV/collagen nanofibers as substrates for nerve tissue engineering [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(10):2775-2784
- [8] Zamani F, Amani-Tehran M, Latifi M, et al. Promotion of spinal cord axon regeneration by 3D nanofibrous core-sheath scaffolds[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2014, 102(2):506-513
- [9] Masaeli E, Morshed M, Nasr-Esfahani MH, et al. Fabrication, characterization and cellular compatibility of poly(hydroxy alkanoate) composite nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):e57157
- [10] Clements IP, Mukhatyar VJ, Srinivasan A, et al. Regenerative scaffold electrodes for peripheral nerve interfacing[J]. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*, 2013, 21(4):554-566
- [11] Zhu Y, Wang A, Patel S, et al. Engineering bi-layer nanofibrous conduits for peripheral nerve regeneration[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2011, 17(7):705-715
- [12] Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. Fabrication of uniaxially aligned 3D electrospun scaffolds for neural regeneration[J]. *Biomed Mater*, 2011, 6(2):025004
- [13] Corey JM, Lin DY, Mycek KB, et al. Aligned electrospun nanofibers specify the direction of dorsal root ganglia neurite growth[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 83(3):636-645
- [14] Neal RA, Tholpady SS, Foley PL, et al. Alignment and composition of laminin-polycaprolactone nanofiber blends enhance peripheral nerve regeneration[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2011
- [15] Koh HS, Yong T, Teo WE, et al. In vivo study of novel nanofibrous intra-luminal guidance channels to promote nerve regeneration [J]. *J Neural Eng*, 2010, 7(4):046003
- [16] Yao L, O'Brien N, Windebank A, et al. Orienting neurite growth in electrospun fibrous neural conduits [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009, 90(2):483-491
- [17] Wang HB, Mullins ME, Clegg JM, et al. Creation of highly aligned electrospun poly-L-lactic acid fibers for nerve regeneration applications[J]. *J Neural Eng*, 2009, 6(1):016001
- [18] Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. Fabrication, characterization and in vitro evaluation of aligned PLGA-PCL nanofibers for neural regeneration[J]. *Ann Biomed Eng*, 2012, 40(10):2098-2110
- [19] Liu T, Houle JD, Xu J, et al. Nanofibrous Collagen Nerve Conduits for Spinal Cord Repair[J]. *Tissue Eng Part A*, 2012
- [20] Mahairaki V, Lim SH, Christopherson GT, et al. Nanofiber matrices promote the neuronal differentiation of human embryonic stem cell-derived neural precursors in vitro [J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(5-6):855-863
- [21] 刘靓, 胡学昱, 张蕾, 等. 高仿真组织工程神经支架制备工艺的参数优化[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(4):624-627, 641

Liu Liang, Hu Xue-yu, Zhang Lei et al. Parameter Optimization of the Fabrication Technique for Highly Bionic Tissue Engineering Nerve Scaffold [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011, 11(4):624-627, 641