

纤维蛋白凝胶携载血管内皮生长因子对大鼠损伤坐骨神经运动功能的影响

余英剑¹, 曹瑞治¹, 刘恒¹, 李桂涛¹, 穆天旺¹, 胡明云²

Effect of fibrin glue loaded exogenous vascular endothelial growth factor on the motor function of rats with sciatic nerve injury

Yu Ying-jian¹, Cao Rui-zhi¹, Liu Heng¹, Li Gui-tao¹, Mu Tian-wang¹, Hu Ming-yun²

Abstract

BACKGROUND: There are various methods for repair sciatic nerve injury, however, the recovery of nerve function is not satisfactory due to complexity of sciatic nerve anatomy and function.

OBJECTIVE: To investigate the effects on functional outcome of the injured sciatic nerve using exogenous vascular endothelial growth factor (VEGF) mixed with fibrin glue as a carrier.

METHODS: The sciatic nerve injury model was made by cutting off the left sciatic nerve of Wistar rats and suturing in normal position. The successful model rats were randomly into two groups. Experimental group was injected with VEGF/fibrin glue complex *via* adventitia at the site of cutting off sciatic nerve. Control group was injected with VEGF165 plasmid. Sciatic-nerve function index, motor nerve conduction velocity and gross appearance were performed at 4, 8, 12 weeks after medication.

RESULTS AND CONCLUSION: The primary healing of wound was found in animals of two groups. At 1 week after treatment, 6 rats of the experimental group appeared foot ulcers and muscle atrophy; five rats of the control group showed foot ulcers. In the experimental group, fibrin gel almost absorbed at 4 weeks, completely absorbed at 8 weeks, normal nerve appearance was found at 12 weeks. In the control group, nerve showed mild congestion and edema at 4 weeks, the edema disappeared and the nerve slightly adhered on surrounding tissues at 8 weeks, the scars formed surrounding nerves at 12 weeks. At 4 and 8 weeks in the experimental group, nerve function index and nerve conduction velocity were lower than the control group ($P < 0.05$), with no statistical difference at 12 weeks ($P > 0.05$). These results indicate that fibrin glue can be used as a carrier for VEGF, fibrin glue carrying VEGF can enhance neurological structural and functional recovery of the injured nerve.

Yu YJ, Cao RZ, Liu H, Li GT, Mu TW, Hu MY. Effect of fibrin glue loaded exogenous vascular endothelial growth factor on the motor function of rats with sciatic nerve injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(29): 5379-5382. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

¹Department of Orthopaedics, Longgang District Central Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518116, Guangdong Province, China; ²Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Yu Ying-jian, Attending physician, Department of Orthopaedics, Longgang District Central Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518116, Guangdong Province, China szlgyj@sohu.com

Received: 2010-06-08 Accepted: 2010-06-18

摘要

背景: 坐骨神经损伤后的修复方法多样, 但由于坐骨神经解剖和功能上的特殊性, 神经功能的恢复仍不理想。

目的: 观察局部应用纤维蛋白凝胶携载血管内皮生长因子, 对损伤坐骨神经组织神经功能恢复的疗效。

方法: 将 Wistar 大鼠左侧坐骨神经切断, 神经两断端原位缝合, 制作大鼠坐骨神经损伤动物模型, 然后随机分为 2 组, 实验组于坐骨神经切断处外膜内、外注射纤维蛋白凝胶/血管内皮生长因子复合体; 对照组于同处注射血管内皮生长因子 165 质粒。于用药后 4, 8, 12 周行大体观察、神经功能指数检测、电生理检测(测运动神经传导速度)。

结果与结论: 两组动物伤口均为一期愈合。实验组用药后 1 周有 6 只出现足底溃疡伴肌萎缩; 对照组有 5 只出现足底溃疡。实验组 4 周时, 纤维蛋白凝胶基本被吸收; 8 周时完全吸收; 12 周时, 神经外形基本正常。对照组 4 周时, 神经轻度充血、水肿; 8 周时, 神经无水肿, 与周围组织见少量粘连; 12 周时, 神经周围见瘢痕形成。实验组 4, 8 周的神经功能指数、运动神经传导速度较对照组降低($P < 0.05$), 12 周无显著性差异($P > 0.05$)。提示纤维蛋白凝胶可以作为血管内皮生长因子的载体, 纤维蛋白凝胶携载血管内皮生长因子给药可以促进损伤神经结构和功能的恢复。

关键词: 坐骨神经; 损伤; 纤维蛋白凝胶; 血管内皮生长因子; 载体

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.29.015

余英剑, 曹瑞治, 刘恒, 李桂涛, 穆天旺, 胡明云. 纤维蛋白凝胶携载血管内皮生长因子对大鼠损伤坐骨神经运动功能的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(29):5379-5382. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹深圳龙岗中心医院骨科, 广东省深圳市 518116; ²遵义医学院, 贵州省遵义市 563003

余英剑, 男, 1976 年生, 广东省梅州市人, 汉族, 2000 年广东医学院毕业, 主治医师, 主要从事骨创伤和周围神经的研究。szlgyj@sohu.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225
(2010)29-05379-04

收稿日期:2010-06-08
修回日期:2010-06-18
(20100608004/WL · Y)

0 引言

坐骨神经损伤后由于神经解剖和功能上的特殊性, 神经功能的恢复仍不理想, 如何提高神经再生的速度和质量, 寻找新的修复方法是目前迫切需要解决的问题。近年来, 在神经修复过程中, 生物因子的作用受到关注。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)具有较强的促血管内皮细胞增殖作用^[1], 还可促

进神经再生、加速其功能恢复^[2]。但 VEGF 蛋白制品半衰期较短($< 6 \text{ min}$), 易在体内降解而降低其效价, 目前利用 VEGF 治疗疾病主要采用基因转染给药, 基因转染给药工艺复杂, 费用较高, 且有致癌可能性。纤维蛋白凝胶(fibrin glue, FG)是一种具有良好生物相容性的药物缓释系统, 能将细胞因子均匀分布在人工血管壁上逐步释放这些细胞因子^[3], 弥补 VEGF 半衰期短之不足。本实验旨在探讨 FG/VEGF 复合体对损伤坐骨神经功能恢复的影响。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2007-05/2009-06在山西医科大学病理实验室完成。

材料: 清洁级Wistar大鼠72只, 雌雄各36只, 体重250~300 g, 由山西医科大学动物实验饲养中心提供, 实验过程中对动物的处置符合科技部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
纤维蛋白凝胶 (批号: 20080510)	哈尔滨瀚邦医疗科技有限公司
pHVEGF165 (批号: 20080120)	山西医科大学免疫实验室
1%戊巴比妥钠 (批号: 20080201)	山西医科大学医院制剂室
光学显微镜, 型号: CH20BIMF200	日本 Olympus 公司
BL-420 生物机能实验系统	成都泰盟电子厂

实验方法:

动物模型制作: Wistar 大鼠经 1% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 仰卧位, 固定, 碘伏消毒, 铺无菌布巾, 取左侧大腿后外侧纵形切口, 切开皮肤及皮下组织, 分离股二头肌和半腱肌、半膜肌肌间隙, 暴露坐骨神经。在梨状肌孔以远 0.5 cm 处切断坐骨神经, 然后采用 10-0 尼龙线将神经两断端原位缝合。

FG/VEGF复合体的制备: FG包括4种成分: 浓缩的纤维蛋白原, 纤维蛋白溶解酶抑制剂, 干凝血酶和氯化钙。将纤维蛋白原溶解于其溶解液配成 2 g/L 纤维蛋白原溶解液, 凝血酶溶解于氯化钙溶液配成 500 U/mL 的凝血酶溶解液。抽取 100 mg/LVEGF165 溶液 0.5 mL (VEGF165 总剂量为 50 μg), 加入配好的凝血酶溶解液得到 1 mL 的混合液 (VEGF : FG=1 : 40), 抽吸注射器使腔内形成负压, 使两种溶液充分混合, 再抽取 1 mL 纤维蛋白原溶解液放于推液器上备用, 以上程序在使用前 30 min 配置。

pHVEGF165质粒的大量制备: 将 pHVEGF165 转化 E.coli DHα, 经挑单克隆, 酶切鉴定正确后, 保存菌种, 并大量培养, 提取质粒备用 (质粒及菌株由山西医科大学组建并保存)。使用时, 用无菌 PBS (pH7.2) 溶解稀释, 将 pHVEGF165 基因导入大鼠损伤坐骨神经局部。

动物分组: 将造模成功后的 72 只 Wistar 大鼠随机抽签法分为实验组 (FG/VEGF 复合体给药组) 与对照组 (VEGF 基因转染给药组), 每组 36 只, 实验组于坐骨神经切断处外膜内、外注射 FG/VEGF 复合体 (含 VEGF 50 μg); 对照组于同处注射 100 mg/L 的 pHVEGF165 质

粒 50 μg。

检测指标:

大体观察: 用药后近期观察伤口愈合情况, 远期观察足底溃疡, 肌肉萎缩, 神经与周围粘连程度, 纤维蛋白凝胶吸收时间及有无炎症反应等情况。

坐骨神经功能指数 (sciatic-nerve function index, SFI) 的测定: 参照沈宁江等^[4]的方法, 自制一长 50 cm、宽 15 cm、高 15 cm 的两端开口走廊槽, 将白纸制成与槽等长等宽后置于槽底, 于用药后 4, 8, 12 周将大鼠双后肢用墨水浸至双踝关节, 着色后放置槽的一端, 诱导其向槽另一端行走。选择清晰的足印迹分别测量正常足 (N) 和伤侧足 (E) 3 个指标: ① 足印长度 (PL): 从足尖至足跟的最大距离。② 足趾宽度 (TS): 第 1 趾到第 5 趾的距离。③ 中间足趾宽度 (IT): 第 2 趾到第 4 趾的距离。每组数据精确到毫米。代入 Bain 公式, 计算坐骨神经功能指数:

$$SFI = -38.3 \times [(EPL - NPL) / NPL] + 109.5 \times [(ETS - NTS) / NTS] + 13.3 \times [(EIT - NIT) / NIT] - 8.8$$

SFI=0 为正常, -100 代表功能完全丧失。

坐骨神经电生理检测: 在用药后 4, 8, 12 周, 大鼠常规麻醉后, 沿原切口显露坐骨神经, 将针形刺激电极钩在神经损伤处近端, 记录电极置入胫前肌, 用 BL-420 生物机能实验系统, 刺激强度为 2 mA, 频率 1 Hz, 观察并记录运动诱发电位, 分析运动神经传导速度 (motor nerve conduction velocity, MNCV) 的变化。

主要观察指标: 神经功能指数检测、电生理检测 (测运动神经传导速度)、大体观察、轴突直径、髓鞘厚度和有髓神经纤维数目。

设计、实施、评估者: 实验设计及评估为第一作者, 干预实施为第二作者, 经过正规培训, 采用盲法评估。

统计学分析: 由第三作者采用 SPSS 12.0 软件完成统计处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组均数比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入 Wistar 大鼠 72 只, 均进入结果分析, 无脱落。

2.2 动物大体观察 两组伤口均为一期愈合, 未出现感染。实验组用药后 1 周 6 只出现足底溃疡伴肌萎缩, 其余仅出现红肿伴肌萎缩, 12 周时愈合较好。对照组用药后 1 周 5 只出现足底溃疡, 其余出现红肿伴肌萎缩。实验组 4 周时, FG 基本被吸收, 仅少量残留, 周围组织无炎症反应, 神经轻度充血、水肿。8 周时, FG 完全吸收, 神经无充血、水肿, 神经干与周围组织少许粘连。12 周时, 神经外形基本正常, 神经周围形成少量瘢痕组织, 见图 1。



Figure 1 In the experimental group, nerve shape was essentially normal, with some scars and capillaries crossing through at 12 wk after treatment
图1 用药后12周, 实验组神经形态基本正常, 见少量瘢痕, 可见微血管通过

对照组4周时, 神经轻度充血、水肿, 神经干与周围组织无明显粘连。8周时, 神经无水肿, 与周围组织见少量粘连。12周时, 神经周围见瘢痕形成, 较实验组稍多, 见图2。



Figure 2 In the control group, scar formation surrounding nerve was more than that in the experimental group at 12 wk after treatment
图2 用药后12周, 对照组神经与周围瘢痕形成, 较实验组多

2.3 坐骨神经功能指数测定 两组动物在12周时均出现展趾反射。用药后4, 8周两组大鼠的坐骨神经功能指数相比, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 用药后12周两组大鼠的坐骨神经功能指数相比, 差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表1。

表1 两组用药不同时间坐骨神经功能指数恢复检测情况
Table 1 Recovery of sciatic nerve functional index in two groups of rats at different time of medications ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Group	4 wk	8 wk	12 wk
Experiment	-64.89±1.37 ^a	-55.76±1.60 ^a	-49.06±1.75
Control	-61.09±1.55	-52.05±1.61	-47.13±1.45

2.4 神经电生理检测结果 用药后行肌电图检测, 两组动物MNCV均逐渐增快, 实验组增速快于对照组。在4, 8周时, 实验组MNCV慢于对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。12周时, 实验组与对照组MNCV差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图3~5, 表2。

表2 两组大鼠用药不同时间运动神经传导速度变化
Table 2 Changes of motor nerve conduction velocity in two groups of rats at different time of medications ($\bar{x} \pm s, n=12, \text{m/s}$)

Group	4 wk	8 wk	12 wk
Experiment	10.24±1.18 ^a	14.21±2.69 ^a	18.78±2.71
Control	14.04±1.94	18.50±2.21	18.53±2.24

^a $P < 0.05$, vs. control group

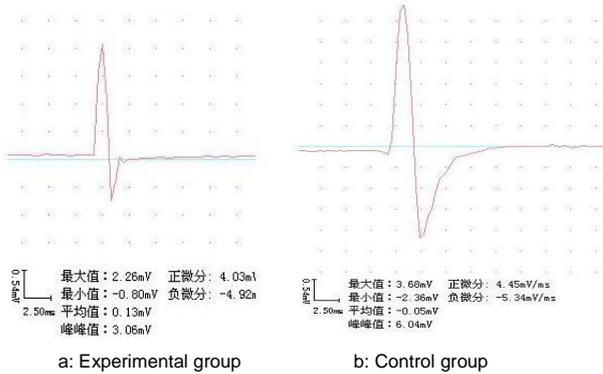


Figure 3 Sciatic nerve action potential in two groups at 4 wk
图3 两组动物用药4周坐骨神经动作电位

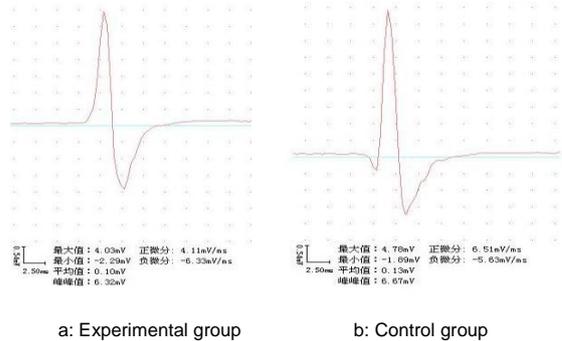


Figure 4 Sciatic nerve action potential in two groups at 8 wk
图4 两组动物用药8周坐骨神经动作电位

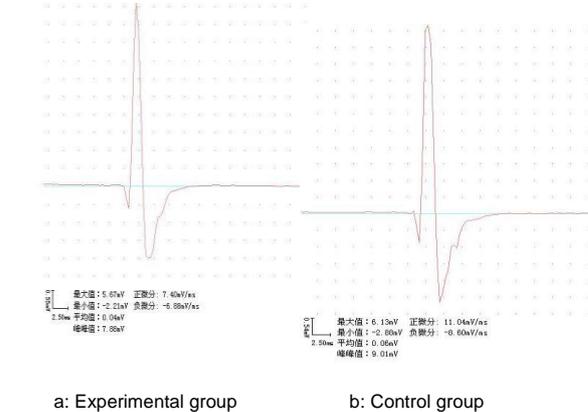


Figure 5 Sciatic nerve action potential in two groups at 12 wk
图5 两组动物用药12周坐骨神经动作电位

3 讨论

VEGF具有较强的促血管内皮细胞增殖作用, 可促进损伤血管内皮细胞迅速增生, 促进新生血管形成, 加速创伤愈合^[5]; 而且VEGF可明显促进神经再生、加速其功能恢复^[2]。它可能通过以下两种方式发挥作用: ①VEGF分别作用于内皮细胞或神经干细胞, 两者之间的作用是互相独立的。②VEGF诱导内皮细胞产生其他生长因子如脑源性神经生长因子, 后者进一步作用于神经干细胞并刺激神经发生^[6]。在神经导管内加入VEGF, 也可显著提高神经移植修复的效果^[7]。Yu等^[8]研究显示: VEGF通过作用于三叉神经核中的VEGF受体而促进大鼠角膜神经修复。而且VEGF对化学药物引起的神经损害也有一定的逆转作用^[9]。最近的研究认为: 在缺血性周围神经损伤中^[10-11], VEGF对神经元均具有神经保护作用, 但其机制仍有争议^[12-13]。VEGF蛋白制品半衰期较短, 目前利用VEGF治疗疾病主要采用基因转染给药。基因转染给药其优点在于持续分泌VEGF且维持一定的浓度, 从而有效的治疗疾病, 但基因转染给药转染效率低、选择合适的基因载体较为困难, 且有致癌可能性、费用较高, 距离临床应用还有一定距离。FG是一种有良好生物相容性的药物缓释系统, 已经用于多种细胞因子的载体, 并取得了良好的效果^[14-15], 弥补VEGF半衰期短之不足。因此, 将VEGF复合在FG这种缓释载体上, 较长时间内维持VEGF的有效浓度, 避免被血液稀释, 势必能够更好发挥其促进神经功能恢复的效应。因此, 考虑将VEGF复合至FG上, 将其注射至损伤坐骨神经局部, 用于治疗坐骨神经损伤。

本实验大体观察结果表明: 实验组由于受到FG的保护, 减少了神经周围粘连及瘢痕的形成。根据Songer等^[16]粘连形成的三维立体学说, 预防粘连最好的材料应该是半流体物质, 而FG正是这样一种材料。本实验结果表明FG/VEGF复合体给药和VEGF基因转染给药同样可明显促进神经损伤后轴突的再生, 说明FG是VEGF较为合适的载体, FG/VEGF复合体给药和VEGF基因转染给药在促进损伤坐骨神经再生方面无显著性差异。实验组大鼠用药后4, 8周坐骨神经功能指数及MNCV低于对照组($P < 0.05$), 用药后12周无显著性差异($P > 0.05$), 可能是实验组初期在维持神经纤维周围VEGF有效浓度方面不如对照组, 但中、后期优于对照组, 加上实验组抑制了神经外膜内、外粘连及瘢痕的形成, 而最终神经功能恢复方面无明显差异。坐骨神经损伤后运动功能的评估直接反应了神经修复与再生水平, 对于坐骨神经损伤后的研究十分重要, 但诱发电位的改变并不能与运动和行为习惯的改变相一致, 故本实验选用电生理、坐骨神经功能指数及图像分析等指标来综合评价, 故能较为

准确、相对客观评价神经功能。其中神经电生理变化是评价神经损伤及修复最早、最敏感的客观指标。坐骨神经功能指数是坐骨神经研究领域极为常用的一个指标, 已经被广泛应用于各种神经损伤模型。

本实验促进大鼠坐骨神经功能恢复的原因可能如下: ①FG是VEGF较为合适的载体, 可使VEGF在一特定的时间范围内持续释放并保持一有效浓度。②VEGF促进了大鼠坐骨神经中微血管的新生, 改善了损伤神经血流量。③VEGF可以促进神经再生且对受损神经元具有保护作用。④FG减少了瘢痕组织的形成及侵入。

本实验证明了局部应用FG/VEGF复合体能够预防损伤神经粘连及瘢痕形成, 促进损伤血管内皮化及新生血管形成、改善神经局部血运; 还可促进神经纤维再生, 修复损伤神经组织, 理论上可扩展到临床周围神经损伤修复方面, 配合应用神经生长因子、神经节甙酯等, 临床应用前景应该十分广阔。FG/VEGF复合体给药在损伤神经组织中如何表达, 单位时间内释放的量是多少有待于进一步研究。

4 参考文献

- [1] Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *EXS*. 2005;(94):209-231.
- [2] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat*. 1995;36(2):169-180.
- [3] Steyers CM. Recurrent carpal tunnel syndrome. *Hand clin*. 2002; 18(2): 339-340.
- [4] Shen NJ, Zhu JK. *Zhonghua Xianwei Waike Zazhi*. 1993;16(4): 284-287. 沈宁江, 朱家恺. 坐骨神经功能指数在神经功能评价中的应用[J]. *中华显微外科杂志*. 1993, 16(4): 284-287.
- [5] Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *EXS*. 2005;(94):209-231.
- [6] Chen J, Zhang C, Jiang H, et al. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25(2):281-290.
- [7] Le Bras B, Barallobre MJ, Homman-Ludiyee J, et al. VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain. *Nat Neurosci*. 2006;9(3):340-348.
- [8] Yu CQ, Zhang M, Matis KI, et al. Vascular endothelial growth factor mediates corneal nerve repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(9): 3870-3878.
- [9] Kirchmair R, Tietz AB, Panagiotou E, et al. Therapeutic angiogenesis inhibits or rescues chemotherapy-induced peripheral neuropathy: taxol- and thalidomide-induced injury of vasa nervorum is ameliorated by VEGF. *Mol Ther* 2007;15(1):69-75.
- [10] Zachary I. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. *Neurosignals*. 2005;14(5):207-221.
- [11] Namiecińska M, Marciniak K, Nowak JZ. VEGF as an angiogenic, neurotrophic, and neuroprotective factor. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2005;59:573-583.
- [12] Sun FY, Guo X. Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor. *J Neurosci Res*. 2005;79(1-2):180-184.
- [13] Kalina GK, Jadwiga J. The neuroprotective function of vascular endothelium growth factor. *Folia Neuropathol*. 2005;43:31-39.
- [14] Le Guéhennec L, Layrolle P, Daculsi G. A review of bioceramics and fibrin sealant. *Eur Cell Mater*. 2004;8:1-10.
- [15] Le Guehennec L, Goyenvallé E, Aguado E, et al. MBCP biphasic calcium phosphate granules and tissucol fibrin sealant in rabbit femoral defects: the effect of fibrin on bone ingrowth. *J Mater Sci Mater Med*. 2005;16(1):29-35.
- [16] Songer MN, Ghosh L, Spencer DL. Effects of sodium hyaluronate on peridural fibrosis after lumbar laminotomy and discectomy. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1990;15(6):550-554.