

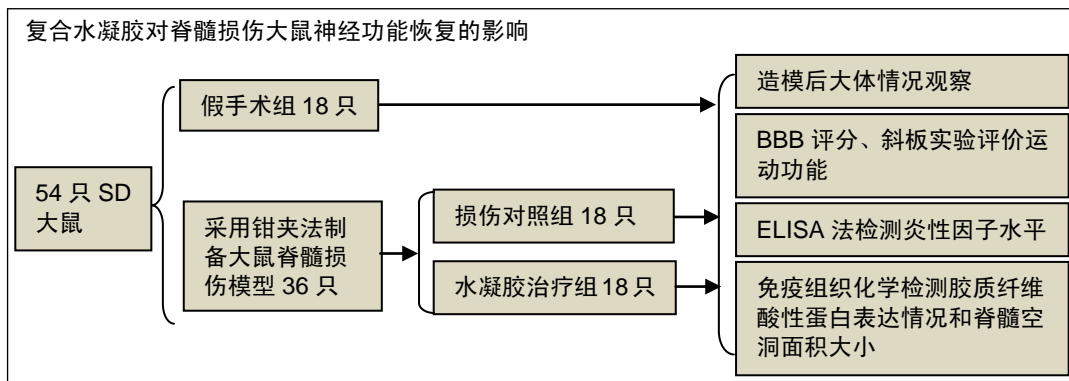
神经营养因子3修饰透明质酸-甲基纤维素水凝胶修复脊髓损伤大鼠神经功能的恢复

何志江^{1,2}, 朱雷², 程世翔³, 黄揆^{1,2}, 陈曹¹, 孙明林² (¹武警后勤学院, 天津市 300309; ²武警特色医学中心脊柱科, 天津市 300162; ³武警特色医学中心脑科中心, 天津市神经创伤修复重点实验室, 天津市 300162)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1640

ORCID: 0000-0002-9372-2461(何志江)

文章快速阅读:



何志江, 男, 1992年生, 广东省广州市人, 汉族, 武警后勤学院在读硕士, 主要从事脊柱脊髓损伤与修复研究。

通讯作者: 孙明林, 博士后, 主任医师, 武警特色医学中心脊柱科, 天津市 300162

文献标识码:A

稿件接受: 2018-11-17



文题释义:

透明质酸-甲基纤维素水凝胶: 在生理温度下可在原位快速凝胶, 适用于微创手术, 利用生物素和链霉亲和素的选择亲和性, 能与短肽序列和生长因子缀合, 实现治疗性分子在脊髓损伤区域的持续缓释, 同时其还具有封闭硬脊膜缺损并减轻炎症反应的作用, 是治疗脊髓损伤的理想生物材料。

神经营养因子: 是一类由神经所支配的组织(如肌肉)和星形胶质细胞产生的且为神经元生长与存活所必需的蛋白质分子, 通常在神经末梢以受体介导式入胞方式进入神经末梢, 再经逆向轴浆运输抵达胞体, 促进胞体合成有关的蛋白质, 发挥其支持神经元生长、发育和功能完整性的作用。

摘要

背景: 透明质酸-甲基纤维素水凝胶不仅能与短肽序列和生长因子缀合实现缓释, 还具有封闭硬脊膜缺损并减轻炎症反应的作用, 是治疗脊髓损伤的理想生物材料。

目的: 探讨透明质酸-甲基纤维素-神经营养因子3水凝胶对大鼠脊髓损伤后神经功能恢复的效果。

方法: 将54只雌性SD大鼠(由解放军军事医学科学院实验动物中心提供)随机分成3组, 每组18只: 假手术组行T₁₀椎板切除; 模型组和实验组行T₁₀椎板切除后, 利用动脉瘤夹建立脊髓损伤模型, 随后实验组脊髓损伤区域局部注射透明质酸-甲基纤维素-神经营养因子3水凝胶。造模后1d及1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8周行Basso Beattie Bresnahan(BBB)功能评分, 造模后4, 6, 8周行斜坡实验, 评估后肢功能恢复情况; 术后1周, 利用ELISA法检测脊髓中炎症因子质量浓度; 造模后8周, 用免疫组织化学染色观察脊髓空洞面积、胶质纤维酸性蛋白表达、神经再生变化情况。

结果与结论: ①模型组、实验组造模后各时间点的BBB评分均低于假手术组($P < 0.05$), 实验组造模后4-8周的BBB评分高于模型组($P < 0.05$); ②斜坡实验中, 模型组、实验组术后各时间点的最大倾斜角均低于假手术组($P < 0.05$), 实验组造模后6, 8周的最大倾斜角高于模型组($P < 0.05$); ③实验组、模型组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素6及白细胞介素10质量浓度高于假手术组($P < 0.05$), 实验组肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素6质量浓度低于模型组($P < 0.05$), 实验组白细胞介素10质量浓度高于模型组($P < 0.05$); ④免疫组织化学染色显示, 实验组和模型组胶质纤维酸性蛋白表达多于假手术组, 实验组胶质纤维酸性蛋白表达低于模型组; 实验组脊髓空洞面积小于模型组($P < 0.05$); ⑤结果表明, 脊髓损伤后局部注射透明质酸-甲基纤维素-神经营养因子3水凝胶, 能有效抑制炎症反应和星形胶质细胞活化增生, 减少纤维瘢痕形成, 保护神经组织, 促进肢体运动功能恢复。

关键词:

水凝胶; 透明质酸; 甲基纤维素; 神经营养因子3; 脊髓损伤; 炎症反应; 星形胶质细胞; 神经保护

主题词:

水凝胶; 透明质酸; 神经营养因子3; 甲基纤维素; 脊髓损伤; 组织工程

中图分类号: R459.9; R318.08

基金资助:

天津市科技计划项目(15ZXLCSY00040), 项目负责人: 程世翔; 天津市科技计划项目(16ZXHLSY00120), 项目负责人: 程世翔; 军队技术研究重大项目(AWS15J001), 项目负责人: 程世翔; 天津市自然科学基金项目(17JCYBJC25700), 项目负责人: 程世翔

He Zhijiang, Master candidate, Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China; Department of Spine Surgery, Characteristic Medical Center of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

Corresponding author: Sun Minglin, MD, Chief physician, Department of Spine Surgery, Characteristic Medical Center of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

Neurotrophin-3 modified hyaluronan-methylcellulose hydrogel promotes neurological function in rats with spinal cord injury

He Zhijiang^{1,2}, Zhu Lei², Cheng Shixiang³, Huang Kui^{1,2}, Chen Cao¹, Sun Minglin² (¹Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China; ²Department of Spine Surgery, Characteristic Medical Center of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China; ³Brain Center for Characteristic Medical Center of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin Key Laboratory of Neurotrauma Repair, Tianjin 300162, China)

Abstract

BACKGROUND: Hyaluronan-methylcellulose hydrogel cannot only be conjugated with short peptide sequences and growth factors to achieve sustained release, but also has a role in blocking dural defects and reducing inflammation. It is an ideal biomaterial for the treatment of spinal cord injury.

OBJECTIVE: To investigate the effect of neurotrophin-3 modified hyaluronan-methylcellulose (HAMC-NT-3) hydrogel on the recovery of neurological function in rats with spinal cord injury.

METHODS: Fifty-four female Sprague-Dawley rats (provided by the Experimental Animal Center of the Academy of Military Medical Sciences in China) were randomly divided into three groups ($n=18$ per group). The sham group only underwent T₁₀ laminectomy. In the model group and the experimental group, an aneurysm clip was used to establish spinal cord injury models after T₁₀ laminectomy. The experimental group was locally injected with HAMC-NT-3 hydrogel. The Basso Beattie Bresnahan function scoring was performed at 1 day, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8 weeks after surgery. The inclined plane test was performed at 4, 6 and 8 weeks after surgery to evaluate the recovery of hindlimb motor function. ELISA was used to detect the concentrations of inflammatory factors in the spinal cord at 1 week after surgery. Immunohistochemical staining was used to observe the area of syringomyelia, glial fibrillary acidic protein expression and nerve regeneration at 8 weeks after surgery.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The Basso Beattie Bresnahan scores of the model group and the experimental group were lower than those of the sham group at various time points after surgery ($P < 0.05$). The Basso Beattie Bresnahan scores of the experimental group were higher than those of the model group at 4–8 weeks after surgery ($P < 0.05$). (2) In the inclined plane test, the maximum inclined angles of the model group and the experimental group at each time point after surgery were lower than that of the sham group ($P < 0.05$). The maximum inclined angles of the experimental group at 6 and 8 weeks after surgery were higher than those of the sham group ($P < 0.05$). (3) The concentrations of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-6 and interleukin-10 in the experimental group and the model group were higher than those in the sham group ($P < 0.05$). The concentrations of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and interleukin-6 in the experimental group were lower than those in the model group ($P < 0.05$). The concentration of interleukin-10 in the experimental group was higher than that in the model group ($P < 0.05$). (4) Immunohistochemical staining showed that the expression levels of glial fibrillary acidic protein in the experimental group and the model group were higher than those in the sham group, while the expression of glial fibrillary acidic protein in the experimental group was lower than that in the model group. The area of syringomyelia in the experimental group was smaller than that in the model group ($P < 0.05$). These results indicate that local injection of HAMC-NT-3 hydrogel can effectively inhibit inflammation as well as astrocyte activation and proliferation, reduce fibrous scar formation, and promote the protection of nerve tissue and the recovery of hindlimb motor function after spinal cord injury.

Subject headings: Hydrogel; Hyaluronic Acid; Neurotrophin 3; Methylcellulose; Spinal Cord Injuries; Tissue Engineering

Funding: the Science & Technology Program of Tianjin, China, No. 15ZXLCSY00040 and 16ZXHLSY00120 (both to CSX); the Military Technology Research Projects, No. AWS15J001 (to CSX); the Tianjin Municipal Natural Science Foundation, No. 17JCYBJC25700 (to CSX)

0 引言 Introduction

脊髓损伤的主要特征在于广泛的组织损伤及损伤节段以下严重的感觉、运动和自主神经功能丧失。在全球范围内,每年每百万人中就有15–40个脊髓损伤新发病例^[1]。除脊髓损伤早期局部出血和缺血导致的组织缺氧、水肿、炎症和氧化应激反应外,随着病情的进一步发展,损伤部位会出现大量神经元死亡、轴突变性、脱髓鞘,以及胶质瘢痕和囊性空洞形成^[2-3]。这一系列不良因素最终导致脊髓的不可逆性损伤,从而阻断神经信号传导和神经功能恢复^[4]。脊髓损伤后轴突再生的能力十分有限,其主要原因在于损伤区域抑制性微环境、囊性空洞及其周围的胶质瘢痕形成、成熟神经元的内在生长能力不足,以及细胞生长因子和生长刺激因子缺乏^[5-6]。

神经生长因子3在神经元保护和分化及轴突再生过程中发挥了重要作用^[7]。通过过度表达或异位递送增加脊髓组织中神经生长因子3的浓度,可克服胶质瘢痕中蛋白聚糖的抑制作用,并刺激损伤区域边缘的轴突生长^[8-9]。研究表明,脊髓发育早期神经生长因子3含量较高,但在成年哺乳动物脊髓中表达量显著下降。由于脊髓损伤后其表达程度有限,无法保持长期有效的治疗浓度,导致其神经保护和

促进轴突再生的作用并不明显^[10]。而通过腹腔、静脉、肌肉及皮下注射等途径递送神经生长因子3,则因为血浆中的酶解作用及血脑屏障和/或血脊髓屏障的存在,使其到达损伤区域极其微量^[11]。损伤区域给药则能形成局部高浓度,但由于神经生长因子3半衰期较短^[12],无法长期发挥作用。透明质酸-甲基纤维素水凝胶在生理温度下可在原位快速凝胶,适用于微创手术,不仅能与短肽序列和生长因子缀合实现缓释,还具有封闭硬脊膜缺损并减轻炎症反应的作用,是治疗脊髓损伤的理想生物材料^[13]。实验旨在研究神经生长因子3修饰的透明质酸-甲基纤维素水凝胶,对脊髓损伤后局部炎症反应以及轴突再生情况的影响,为临床和基础实验研究提供理想的治疗方案。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年11月至2018年5月在武警特色医学中心神经创伤修复重点实验室完成。

1.3 材料

实验动物: 健康成年SPF级雌性SD大鼠54只,体质量

200-230 g, 由解放军军事医学科学院实验动物中心提供。将54只大鼠随机分成假手术组、模型组、实验组, 每组18只。

实验主要试剂与仪器: 透明质酸、甲基纤维素(上海阿拉丁生化科技公司); 重组鼠神经营养因子3(英国Proteintech公司); 多聚甲醛(国药集团化学试剂有限公司); 动脉瘤夹(德国Rebstock公司, 25 g); 神经营养因子3 ELISA 试剂盒(北京索莱宝公司); 肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 、白细胞介素6、白细胞介素10 ELISA试剂盒(北京索莱宝公司); 免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥公司); 胶质纤维酸性蛋白GFAP抗体(英国Abcam公司); 苏木精(北京索莱宝公司); 冰冻切片CM1950(德国Leica 公司); 超声波组织细胞破碎仪(美国Fisher Scientific公司); ECLIPSE Ti-U多端口倒置显微镜(日本Nikon公司)。

1.4 实验方法

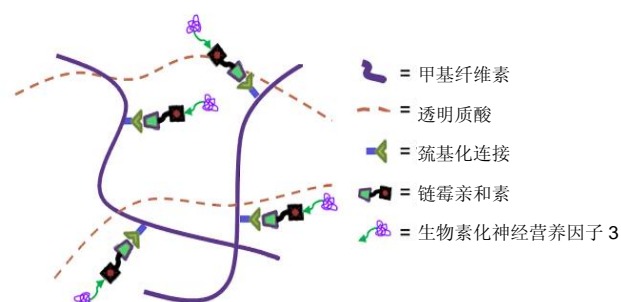
1.4.1 神经营养因子3修饰透明质酸-甲基纤维素水凝胶的制备 采用生物素将重组鼠神经营养因子3进行标记, 并将其固定于甲基纤维素-链霉亲和素上^[14]。首先将链霉亲和素结合在甲基纤维素分子上; 采用溴乙酸和1.5 mol/L氢氧化钠溶解甲基纤维素, 使其羧基化, 后经过透析纯化, 加入4-(4, 6-二甲氧基-1, 3, 5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉氯化物和3, 3'-二硫代二丙酸, 然后用二硫苏糖醇还原二硫键, 使反应性巯基结合在甲基纤维素分子上; 然后加入马来酰亚胺标记的链霉亲和素(马来酰亚胺与链霉亲和素摩尔比为9:1), 在0.1 mol/L PBS中, 与之前合成的巯基-甲基纤维素搅拌过夜; 然后加入N-乙基羟基马来酰亚胺, 以猝灭未反应的游离巯基; 未结合的含马来酰亚胺试剂通过透析去除; 然后将甲基纤维素-链霉亲和素蛋白冻干, 形成无定形白色粉末。

将生物素化的重组神经营养因子3与甲基纤维素-链霉亲和素加入0.05 mol/L三羟甲基氨基甲烷、0.1 mol/L氯化钠缓冲液(pH=8.5)中, 4 °C下进行缀合, 后通过透析去除未结合的生物素化重组鼠神经营养因子3, 然后在去离子水中除去过量盐, 以实现纯化。将得到的甲基纤维素-神经营养因子3无菌过滤并冻干, 备用。

将透明质酸、甲基纤维素-神经营养因子3进行物理混合, 形成透明质酸-甲基纤维素-神经营养因子3水凝胶。最终各组分的质量比为透明质酸:甲基纤维素-神经营养因子3=1.5:3.2。将上述成分溶解在人工脑脊液中, 用高速混合仪进行快速混合, 并在4 °C下搅拌过夜。最终形成的透明质酸-甲基纤维素-神经营养因子3水凝胶在4 °C保存, 直至使用。透明质酸-甲基纤维素-神经营养因子3水凝胶的结构示意图, 见图1。以PBS为体外降解介质, 通过ELISA法检测透明质酸-甲基纤维素-神经营养因子3水凝胶的体外缓释特性。

1.4.2 动物模型的制备 54只SD大鼠术前禁食12 h, 用1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)进行腹腔注射麻醉, 假手术组仅行T₁₀椎板切除术, 不损伤脊髓; 模型组和实验组大鼠行T₁₀椎板切除后, 利用动脉瘤夹(25 g)钳夹1 min建立脊髓损伤模型, 实验组在脊髓损伤5 min后, 利用Hamilton注射器将

10 μ L透明质酸-甲基纤维素-神经营养因子3水凝胶植入到脊髓损伤区域的中心; 充分止血后, 依次缝合肌肉和皮肤, 并将大鼠置于加热垫上, 直至麻醉恢复。术后每天进行膀胱按摩挤尿2次, 直至恢复正常排尿。



图注: 利用生物素和链霉亲和素的选择亲和性, 将神经营养因子3负载到透明质酸-甲基纤维素水凝胶上。

图1 神经营养因子3修饰的透明质酸-甲基纤维素水凝胶的结构示意图

Figure 1 Schematic diagram of neurotrophin-3 modified hyaluronan-methylcellulose hydrogel

1.5 主要观测指标

1.5.1 大体观察 术中观察钳夹脊髓后大鼠后肢和尾部活动情况, 术后观察大鼠肌肉活动、行走步态等。

1.5.2 后肢功能行为学评估 所有测试均采用双人双盲法进行测定和分析。观察记录者为熟悉实验评分细则的非此组实验参与人员, 结果取二者记录的平均值。

BBB评分: 将大鼠置于开放环境中观察4 min, 根据其髋、膝、踝关节的运动及其协调情况进行评分, 21分代表正常, 0分代表无可视的后肢运动^[15]。BBB评分在造模前、造模后1 d及造模后8周进行。

斜板实验: 将大鼠置于可改变倾向角度的平板上, 保持身体纵轴与斜板倾斜方向平行且头部朝上, 逐渐增大倾斜角度, 以大鼠能在斜板上保持身体平衡5 s为标准, 记录最大倾斜角度。斜板实验在造模后4, 6, 8周进行。

1.5.3 采用ELISA法检测脊髓中炎症因子的质量浓度 造模后1周, 每组取6只大鼠处死并收集脊髓组织(损伤部位周围10 mm)于离心管中, PBS洗涤后, 加入裂解缓冲液进行组织溶解, 然后将组织进行超声处理10 s, 以分离蛋白。随后将其在4 °C下10 000 r/min离心10 min, 获得上清液。根据ELISA试剂盒的操作说明, 对脊髓组织中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 、白细胞介素6、白细胞介素10水平进行测量, 通过标准曲线计算相应质量浓度。

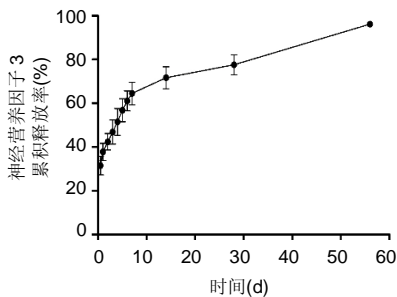
1.5.4 脊髓组织形态学分析 造模后8周, 取所有大鼠, 麻醉后敞开胸腔并暴露心脏, 经左心室插入穿刺针并指向升动脉弓, 剪开右心耳并快速灌注生理盐水250 mL, 直至流出液清凉, 后缓慢灌注40 g/L多聚甲醛, 至大鼠身体僵硬后停止灌注, 打开原手术切口, 将脊髓组织(损伤部位周围2 cm)取出。放入40 g/L多聚甲醛固定48 h, 进行冰冻切片, 切片为纵切面, 厚度10 μ m, 切片行胶质纤维酸性蛋白免疫组织化学染色, 镜下观察脊髓损伤后胶质瘢痕和空洞形成及神经再生情况。

1.6 统计学分析 采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用LSD法, $P < 0.05$ 为结果差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 透明质酸-甲基纤维素-神经营养因子3水凝胶体外缓释曲线 ELISA结果显示, 在PBS中浸泡0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 d, 水凝胶中神经营养因子3的释放率分别为(31.5±4.3)%, (37.8±3.9)%, (42.4±3.8)%, (46.9±5.5)%, (51.5±6.1)%, (56.8±5.2)%, (61.1±4.6)%, 说明水凝胶在PBS浸泡的前6 d内快速释放神经营养因子3; 在PBS中浸泡7, 14, 28, 56 d, 水凝胶中神经营养因子3的释放率分别为(64.5±5.2)%, (71.7±5.0)%, (77.6±4.6)%, (96.2±1.3)%, 说明神经营养因子3的速率逐渐下降, 直至第56天后几乎全部释放, 见图2。



图注: 水凝胶在前6 d内快速释放负载的神经营养因子3, 随后释放速率逐渐下降。

图2 透明质酸-甲基纤维素-神经营养因子3水凝胶中神经营养因子3体外累计释放率曲线

Figure 2 Accumulated release ratio of neurotrophin-3 *in vitro* from neurotrophin-3 modified hyaluronan-methylcellulose hydrogel

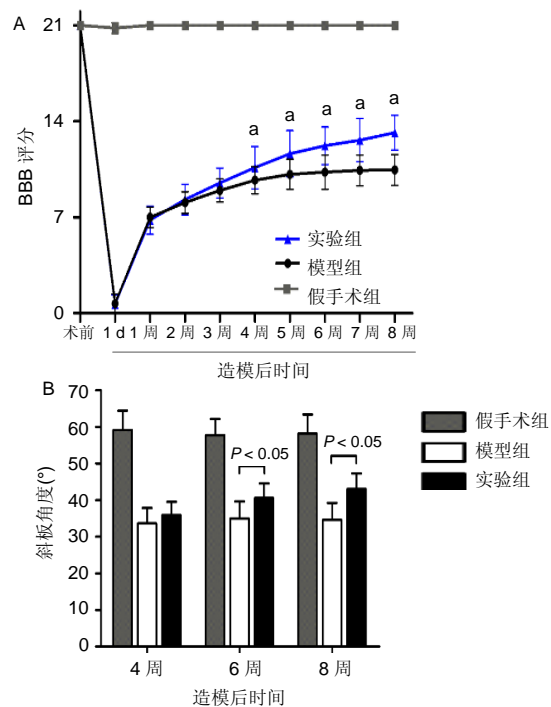
2.2 脊髓损伤后大鼠一般情况观察 实验使用动脉瘤夹建立钳夹型脊髓损伤模型, 伤后即刻大鼠出现双后肢抽搐和摆尾反射, 苏醒后双后肢肌张力减低, 自主活动消失, 仅靠前肢支持爬行, 并有明显尿潴留, 表明造模成功。术后因尿路感染和膀胱破裂而死亡6只, 其中实验组死亡4只, 模型组死亡2只, 均已用同质级雌性SD大鼠补充。

2.3 各组后肢功能行为学评价

2.3.1 BBB评分 术前, 各组大鼠BBB评分均为21分。造模后1 d, 除假手术组外, 其余2组BBB评分均明显下降。实验组和模型组造模后各时间点的BBB评分均显著低于假手术组($P < 0.05$); 造模后1 d至第3周, 实验组和模型组组间BBB评分比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 从造模后第4周起, 实验组BBB评分逐步恢复且均高于模型组($P < 0.05$), 见图3A。

2.3.2 斜板实验 造模后, 实验组和模型组斜板实验最大倾斜角度均减少, 并随着时间推移逐渐增大, 模型组从造模后4周的(33.62±4.24)°上升到造模后8周的(34.61±4.59)°, 实验组从造模后4周的(35.93±3.58)°上升到造模后8周的(43.01±4.27)°; 造模后各时间点, 实验组和模型组斜板实验最大倾斜角度均显著低于假手术组($P < 0.05$); 造模后第4周, 实验组和模型组斜板实验最大倾斜角度比较差异

无显著性意义($P > 0.05$); 自造模后6周起, 实验组斜板实验最大倾斜角度逐渐增大且均高于模型组($P < 0.05$), 见图3B。



图注: 与模型组比较, ^a $P < 0.05$ 。

图3 各组造模后各时间点下肢运动功能行为学评估

Figure 3 Behavioral assessment of hindlimb motor function at different time points after surgery in each group

2.4 各组炎症因子质量浓度比较 造模后8周ELISA检测结果显示, 实验组中促炎因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 和白细胞介素6水平均显著低于模型组($P < 0.05$); 模型组、实验组肿瘤坏死因子 α 水平高于假手术组($P < 0.05$), 实验组肿瘤坏死因子 α 水平明显低于模型组($P < 0.05$), 同样的比较趋势也体现在白细胞介素1 β 和白细胞介素6水平上; 同时, 实验组中抗炎因子白细胞介素10水平明显高于模型组、假手术组($P < 0.05$), 见图4。

2.5 各组免疫组织化学染色结果 胶质纤维酸性蛋白是反应型星形胶质细胞的标志蛋白。免疫组织化学染色时, 胶质纤维酸性蛋白阳性呈棕褐色。脊髓损伤后, 胶质纤维酸性蛋白表达水平明显升高, 给予透明质酸-甲基纤维素-神经营养因子3水凝胶治疗后, 胶质纤维酸性蛋白表达显著减少。模型组损伤局部四周的胶质瘢痕范围广, 脊髓结构破坏明显, 同时反应型星形胶质细胞数量较多, 呈肥大状并互相交织; 实验组损伤局部胶质瘢痕较局限, 反应型星形胶质细胞数量显著减少, 胞体趋向正常, 结果显示透明质酸-甲基纤维素-神经营养因子3水凝胶注射可有效抑制胶质瘢痕过度表达, 见图5A-C。

随着脊髓损伤进入慢性期, 脊髓空洞逐渐形成, 从镜下观察可见, 假手术组脊髓组织灰质、白质界限分明, 结构连续且完整; 模型组灰质、白质界线不清, 结构不规则且出现空洞, 面积较大; 实验组脊髓灰质、白质组织界线较清晰, 且空洞面积较模型组明显减少($P < 0.05$), 见图5D。

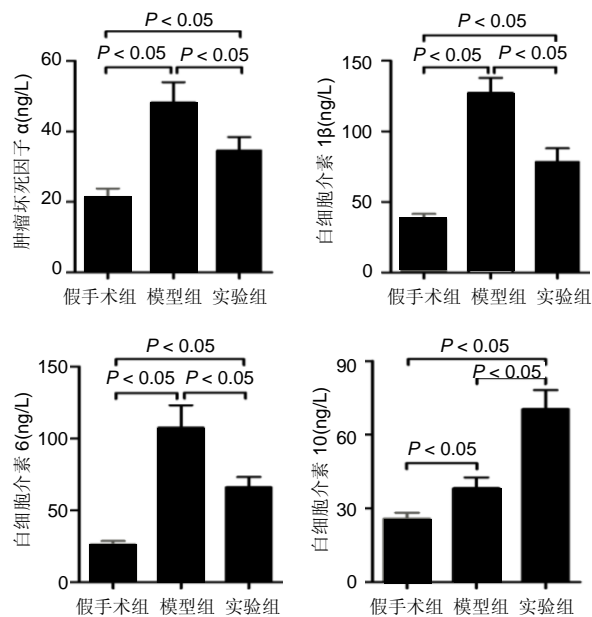
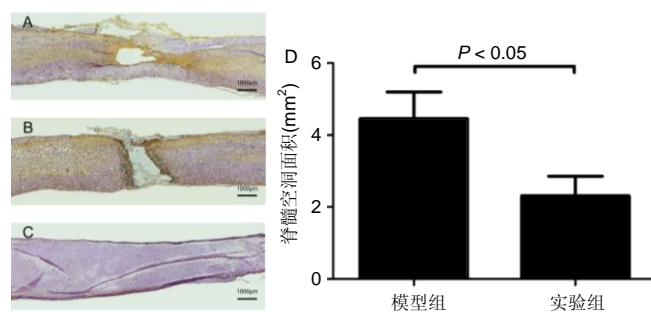


图4 各组造模后1周脊髓损伤周围组织炎性因子水平的比较
Figure 4 Comparison of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-6 and interleukin-10 concentrations at 1 week after surgery in each group



图注: 图中A-C分别为实验组、模型组、假手术组的脊髓胶质纤维酸性蛋白免疫组织化学染色($\times 40$), 显示实验组、模型组的胶质纤维酸性蛋白表达多于假手术组, 实验组胶质纤维酸性蛋白表达低于模型组; D为各组脊髓空洞面积。
图5 各组造模后8周脊髓胶质纤维酸性蛋白免疫组织化学染色和脊髓空洞面积比较

Figure 5 Comparison of glial fibrillary acidic protein immunohistochemical staining and the area of syringomyelia at 8 weeks after surgery in each group

3 讨论 Discussion

在成年哺乳动物中枢神经系统中, 由于神经再生和修复能力不足, 创伤性损伤往往会导致神经功能丧失^[16]。在过去的几十年, 许多治疗方法已被应用于动物和人体实验中, 以观察脊髓再生的效果^[17-19]。当前基于生物材料的水凝胶, 以其能够实现药物递送、调节微环境并提供轴突再生的通道等特点, 成为脊髓损伤后促进神经再生和功能恢复的理想治疗材料^[20-21]。Cigognini等^[22]将RADA16-4G-BMHP1和Ac-FAQ-LDLK12水凝胶注入大鼠脊髓损伤部位, 2种水凝胶在损伤后均能发挥较好的止血作用, 明显改善局部水肿, 并在脊髓损伤局部观察到轴突再生, 大鼠肢体运动和协调功能明显恢复。Liu等^[23]将QL6水凝胶应用到

大鼠脊髓损伤模型中, 结果显示QL6水凝胶可明显减少创伤后的神经细胞凋亡, 抑制局部炎症和星形胶质细胞活化, 保护神经组织。此外, QL6还能促进轴突再生, 改善脊髓损伤后大鼠肢体神经功能。在众多水凝胶中, 透明质酸-甲基纤维素被证实能结合多种治疗性蛋白质, 并在脊髓损伤区域实现持续缓释, 以促进轴突延伸并跨越损伤区域, 是理想的局部药物递送平台。实验将神经营养因子3修饰的透明质酸-甲基纤维素水凝胶植入脊髓损伤区域, 进而验证其抑制局部炎症反应、促进神经组织修复的效果。通过观察脊髓损伤8周后各组大鼠的后肢运动功能和神经组织再生情况, 证实了透明质酸-甲基纤维素-神经营养因子3能够有效促进大鼠脊髓损伤后神经再生和功能恢复。此外, 还发现透明质酸-甲基纤维素-神经营养因子3能抑制损伤区域中星形胶质细胞反应性增生和炎症反应, 明显减少脊髓损伤后脊髓空洞的形成。

脊髓损伤后的病理生理变化十分复杂, 其中损伤局部的炎症反应是改变局部抑制性微环境和加重细胞损伤的重要因素, 因此抗炎治疗是脊髓损伤治疗的重要环节^[24-25]。过去的研究表明, 透明质酸能减少脊髓损伤后炎症细胞浸润和周围组织的星形胶质细胞增殖, 减少局部炎症反应和胶质瘢痕形成^[26]。据作者所知, 脊髓损伤后促炎因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 和白细胞介素6表达水平上调^[27]。而促炎因子与神经毒性和轴突再生抑制之间的联系, 在以往的研究中已被证实^[28]。此次实验的ELISA检测结果显示, 相对模型组而言, 实验组促炎因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 和白细胞介素6的质量浓度明显降低, 同时抗炎因子白细胞介素10的质量浓度显著升高, 进一步证实了透明质酸-甲基纤维素-神经营养因子3能在脊髓损伤早期有效抑制局部炎症反应。除了改善局部抑制性微环境以外, 刺激神经元自身的再生能力, 对恢复脊髓神经功能而言也是十分必要的^[29]。作为标志性的神经营养因子之一, 神经营养因子3已被证实在增加突触可塑性、促进脊髓损伤后神经保护和轴突再生中发挥着重要作用^[7, 30-31]。值得注意的是, mRNA测序显示脊髓损伤后损伤区域中神经营养因子3的表达水平明显不足^[32]。Li等^[7]将神经营养因子3/丝素蛋白复合物修饰的功能性明胶海绵支架植入犬脊髓损伤模型后, 实验犬的后肢运动功能和神经传导明显改善, 结果表明神经营养因子3局部释放是治疗脊髓损伤的可行策略。此次实验利用生物素和链霉亲和素的选择亲和性, 将生物素化的神经营养因子3与甲基纤维素相结合, 实现神经营养因子3在损伤区域的持续缓释。而且这种高亲和力结合并不会破坏神经营养因子3的空间结构, 其生物学功能得以保留。实验中实验组BBB评分和斜板实验等行为学评价及脊髓空洞和胶质瘢痕减少等病理学结果明显优于模型组, 这些结果充分证实了透明质酸-甲基纤维素-神经营养因子3对神经营养因子3的体内持续缓释效果, 以及其对脊髓损伤的治疗前景。

总而言之, 透明质酸-甲基纤维素是一种有前景的脊髓损伤治疗药物递送平台。由于炎症反应和细胞凋亡是脊髓损伤后的主要病理生理变化, 此次研究结果表明, 透明质

酸-甲基纤维素-神经营养因子3水凝胶可有效减少神经细胞凋亡,增强神经细胞存活能力,最终促进神经功能恢复。此外,以透明质酸-甲基纤维素作为载体,还可实现干细胞和生长因子等多种治疗因素的局部和控制性缓释,同时避免了全身递送的相关并发症,实验为探索长期释放多种神经营养成分及其与轴突生长和微环境改善作用潜在治疗效果之间的关系提供了理论基础。同时实验也存在其局限性,如观察时间短、大鼠年龄段范围覆盖不全,对老年及未成熟年龄段的实际疗效尚需进一步的动物实验验证,以期为临床应用提供依据。

作者贡献: 何志江、朱雷进行实验设计,实验实施为何志江、朱雷、黄揆、陈曹,实验评估为程世翔和孙明林,资料收集为何志江、黄揆和陈曹,何志江成文,程世翔和孙明林审核。

经费支持: 该文章接受了“天津市科技计划项目(15ZXCLSY00040,16ZXHLSY00120)、军队技术研究重大项目(AWS15J001)、天津市自然科学基金项目(17JCYBJC25700)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和与研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经天津市神经创伤修复重点实验室伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经武警后勤学院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Ackery A, Tator C, Krassioukov A. A global perspective on spinal cord injury epidemiology. *J Neurotrauma*. 2004;21(10):1355-1370.
- [2] Mothe AJ, Tam RY, Zahir T, et al. Repair of the injured spinal cord by transplantation of neural stem cells in a hyaluronan-based hydrogel. *Biomaterials*. 2013;34(15):3775-3783.
- [3] Moon YJ, Lee JY, Oh MS, et al. Inhibition of inflammation and oxidative stress by *Angelica dahuricae* radix extract decreases apoptotic cell death and improves functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci Res*. 2012;90(1):243-256.
- [4] An Y, Tsang KK, Zhang H. Potential of stem cell based therapy and tissue engineering in the regeneration of the central nervous system. *Biomed Mater*. 2006;1(2):R38-344.
- [5] Blesch A, Tuszynski MH. Spinal cord injury: plasticity, regeneration and the challenge of translational drug development. *Trends Neurosci*. 2009;32(1):41-47.
- [6] Cregg JM, DePaul MA, Filous AR, et al. Functional regeneration beyond the glial scar. *Exp Neurol*. 2014;253:197-207.
- [7] Li G, Che MT, Zeng X, et al. Neurotrophin-3 released from implant of tissue-engineered fibroin scaffolds inhibits inflammation, enhances nerve fiber regeneration, and improves motor function in canine spinal cord injury. *J Biomed Mater Res A*. 2018;106(8):2158-2170.
- [8] Shibayama M, Hattori S, Himes BT, et al. Neurotrophin-3 prevents death of axotomized Clarke's nucleus neurons in adult rat. *J Comp Neurol*. 1998;390(1):102-111.
- [9] McMahon SS, Nikolskaya N, Choileain SN, et al. Thermosensitive hydrogel for prolonged delivery of lentiviral vector expressing neurotrophin-3 in vitro. *J Gene Med*. 2011;13(11):591-601.
- [10] Elliott Donaghue I, Tator CH, Shoichet MS. Sustained delivery of bioactive neurotrophin-3 to the injured spinal cord. *Biomater Sci*. 2015;3(1):65-72.
- [11] Li G, Che MT, Zhang K, et al. Graft of the NT-3 persistent delivery gelatin sponge scaffold promotes axon regeneration, attenuates inflammation, and induces cell migration in rat and canine with spinal cord injury. *Biomaterials*. 2016;83:233-248.
- [12] Ejstrup R, Kiilgaard JF, Tucker BA, et al. Pharmacokinetics of intravitreal glial cell line-derived neurotrophic factor: experimental studies in pigs. *Exp Eye Res*. 2010;91(6):890-895.
- [13] Baumann MD, Kang CE, Tator CH, et al. Intrathecal delivery of a polymeric nanocomposite hydrogel after spinal cord injury. *Biomaterials*. 2010;31(30):7631-7639.
- [14] Tam RY, Cooke MJ, Shoichet MS. A covalently modified hydrogel blend of hyaluronan-methyl cellulose with peptides and growth factors influences neural stem/progenitor cell fate. *J Mater Chem*. 2012;22(37):19402.
- [15] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995;12(1):1-21.
- [16] Liu S, Sandner B, Schackel T, et al. Regulated viral BDNF delivery in combination with Schwann cells promotes axonal regeneration through capillary alginate hydrogels after spinal cord injury. *Acta Biomater*. 2017;60:167-180.
- [17] Bartus K, James ND, Didangelos A, et al. Large-scale chondroitin sulfate proteoglycan digestion with chondroitinase gene therapy leads to reduced pathology and modulates macrophage phenotype following spinal cord contusion injury. *J Neurosci*. 2014;34(14):4822-4836.
- [18] Fouad K, Ghosh M, Vavrek R, et al. Dose and chemical modification considerations for continuous cyclic AMP analog delivery to the injured CNS. *J Neurotrauma*. 2009;26(5):733-740.
- [19] Oh JS, An SS, Gwak SJ, et al. Hypoxia-specific VEGF-expressing neural stem cells in spinal cord injury model. *Neuroreport*. 2012;23(3):174-178.
- [20] Hong LTA, Kim YM, Park HH, et al. An injectable hydrogel enhances tissue repair after spinal cord injury by promoting extracellular matrix remodeling. *Nat Commun*. 2017;8(1):533.
- [21] 卫巍, 刘燕飞, 何洋, 等. β 折叠型自组装短肽水凝胶特性及在神经组织工程中的应用前景[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(10):1586-1592.
- [22] Cigognini D, Silva D, Paloppi S, et al. Evaluation of mechanical properties and therapeutic effect of injectable self-assembling hydrogels for spinal cord injury. *J Biomed Nanotechnol*. 2014;10(2):309-323.
- [23] Liu Y, Ye H, Satkunendrarajah K, et al. A self-assembling peptide reduces glial scarring, attenuates post-traumatic inflammation and promotes neurological recovery following spinal cord injury. *Acta Biomater*. 2013;9(9):8075-8088.
- [24] Saghazadeh A, Rezaei N. The role of timing in the treatment of spinal cord injury. *Biomed Pharmacother*. 2017;92:128-139.
- [25] Coll-Miro M, Francos-Quijorna I, Santos-Nogueira E, et al. Beneficial effects of IL-37 after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(5):1411-1416.
- [26] Wakao N, Imagama S, Zhang H, et al. Hyaluronan oligosaccharides promote functional recovery after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett*. 2011;488(3):299-304.
- [27] Wang CX, Olschowka JA, Wrathall JR. Increase of interleukin-1 β mRNA and protein in the spinal cord following experimental traumatic injury in the rat. *Brain Res*. 1997;759(2):190-196.
- [28] Lacroix S, Chang L, Rose-John S, et al. Delivery of hyper-interleukin-6 to the injured spinal cord increases neutrophil and macrophage infiltration and inhibits axonal growth. *J Comp Neurol*. 2002;454(3):213-228.
- [29] Ropper AE, Ropper AH. Acute Spinal Cord Compression. *N Engl J Med*. 2017;376(14):1358-1369.
- [30] 秦茂林, 杨卫兵, 李红丽, 等. 小鼠胚胎干细胞NT3基因转染后移植对脊髓损伤的恢复作用[J]. *中国组织工程研究*, 2008, 12(12):2263-2266.
- [31] 邓兴力, 梁袁昕, 杨智勇, 等. 神经营养因子3基因修饰神经干细胞移植脊髓损伤的相关蛋白表达[J]. *中国组织工程研究*, 2010, 14(36):6751-6754.
- [32] Anderson MA, Burda JE, Ren Y, et al. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*. 2016;532(7598):195-200.