

新型温敏型肝素-泊洛沙姆水凝胶包载神经生长因子对糖尿病外周神经损伤修复的作用

李锐^{1,2}, 李多慧², 全大萍¹, 肖健^{2*} (1. 中山大学化学学院高分子化学与物理实验室, 广州 510127; 2. 温州医科大学药学院, 浙江省生物技术制药工程重点实验室, 浙江 温州 325035)

摘要:目的 探讨神经生长因子-肝素泊洛沙姆水凝胶(NGF-HP)对糖尿病大鼠坐骨神经损伤的修复作用。方法 成年雄性 SD 大鼠腹腔注射链脲佐菌素以制备糖尿病(DM)模型。成模后,暴露并分离术侧的坐骨神经,运用静脉夹压迫神经以造成外周神经损伤(PNI)。同时,将其随机分为模型组(PNI-diabetics),游离 NGF 组(free NGF)及 NGF-HP 水凝胶组(NGF-HP hydrogel)。每组给予对应的药物治疗,同时在神经损伤后的每周进行斜板试验和 BBB 评分。30 d 后,处死各组大鼠并收集术侧的坐骨神经,运用免疫印迹检测各组神经内部结构和功能蛋白的表达,运用免疫荧光、Masson 三色染色和透射电镜观察各组神经内轴突和髓鞘的再生。结果 该水凝胶可装载一定剂量的神经生长因子(NGF)并缓控其释放。体内实验结果表明,单次注射一定体积的 NGF-HP 水凝胶后,PNI-diabetics 大鼠运动功能恢复良好,神经内 GAP-43、MAP-2、MBP 及 S-100 的含量出现显著地上调,神经纤维的再生效果好且脱髓鞘情况改善显著。结论 NGF-HP 对 PNI-diabetics 疾病具有优越的疗效,为该药应进入临床提供理论依据。

关键词:外周神经损伤;糖尿病;肝素-泊洛沙姆水凝胶;神经生长因子;再髓鞘化

doi:10.11669/cpj.2019.12.012 中图分类号:R965 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)12-0992-08

Novel Thermosensitive Heparin-poloxamer Hydrogel Bridge NGF to Treat Peripheral Nerve Injury in Diabetic Rats

LI Rui^{1,2}, LI Duo-hui², QUAN Da-ping¹, XIAO Jian^{2*} (1. School of Chemistry, Laboratory of Polymer Chemistry and Physics, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510127, China; 2. College of Pharmacy of Wenzhou Medical University, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biotechnology Pharmaceutical Engineering, Wenzhou 325035, China)

ABSTRACT; OBJECTIVE To investigate the effects of NGF-HP thermosensitive hydrogel on facilitating structural and functional regeneration in diabetic rats with sciatic nerve crush injury. **METHODS** Eight-week-old male SD rats (200–220 g) were intraperitoneally injected with streptozocin (STZ) to induce diabetes. After success of model establishment, the sciatic nerve of the diabetes rats were made crushed through two vascular clips force. Muscle and skin were then closed with 5-0 stitches. Following surgery, the rats were randomly divided into three groups: PNI-diabetics group, free NGF group and NGF-HP hydrogel group. Each group received corresponding therapeutic drugs through a microsyringe. The motor recovery in all tested rats was assessed using Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) locomotion scale and inclined plane test at indicated time points. After 30 d, rats were sacrificed, the crushed nerve and corresponding gastrocnemius muscle were harvested and the pathology index was assessed. The expressions of structural and functional proteins were detected through immunoblotting. The improvement of axon and myelination regeneration were evaluated via immunofluorescence, Masson's trichrom stain and transmission electron microscope. **RESULTS** NGF-HP not only had a good affinity for a certain amounts of nerve growth factor (NGF), but also controlled its release in a steady fashion *in vitro*. *In vivo*, compared with administration of direct free NGF, single injection of NGF-HP hydrogel was more effective at upregulating the expression of nerve associated structural and functional proteins, enhancing axonal regeneration and remyelination, as well as improving motor function recovery. **CONCLUSION** This new type of hydrogel loaded with NGF shows striking effects on functional and morphometric recovery on peripheral nerve injury (PNI) following diabetes, which may provide a theoretical basis strategies for remedying PNI-diabetes in clinical populations.

KEY WORDS: peripheral nerve injury; diabetes; heparin-poloxamer hydrogel; nerve growth factor; remyelination

糖尿病(diabetes mellitus, DM)严重危害人类的身心健康且发病率逐年升高。据 WHO 评估,到 2035 年,全球糖尿病患者人数可达 5.92 亿^[1-2]。这一庞大患病人群需要巨额的医疗费用开销,给社会和家庭带

基金项目:国家自然科学基金项目资助(81802238)

作者简介:李锐,男,博士研究生 研究方向:神经系统疾病的发病机制与治疗 * 通讯作者:肖健,男,博士,研究员 研究方向:糖尿病外周神经病变的发病机制与治疗 Tel:(0577)86689983 E-mail:xfj2000@126.com

来沉重的经济负担。患者体内长期的高血糖会损害神经系统的结构和功能,早期糖尿病患者的外周神经出现功能紊乱,包括神经传导速度减慢,疼痛和感觉异常,晚期患者的神经内部结构出现脱髓鞘和轴突变性,有髓神经纤维丢失等现象^[3-4]。由于高糖环境下,雪旺细胞(schwann cells, SCs)的增殖和再髓鞘化会受到显著地抑制,不利于轴突的生长。此外,新生的血管在紊乱的微环境下,较难进入损伤区,从而影响神经再生的营养和氧气供应^[5-6]。故对患糖尿病合并外周神经损伤(peripheral nerve injury, PNI)的病人恢复其神经内部的结构及功能将变得异常困难。

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是由2个分子量为 12.5×10^3 的单体对称形成的二聚体,兼具营养神经和促进神经突起生长的双重作用。已有研究证实,NGF能够与胶质细胞内的TrkA和p75^{NTR}受体结合,经逆向运输至神经元细胞,发挥保护神经元并促进其生长的功效^[7-8]。且NGF对PNI和糖尿病外周神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)均具有良好的治疗效果^[9-10]。但已有研究报道发现PNI合并糖尿病的患者体内产生和分泌NGF的量不能够满足损伤神经修复的需求,故补充外源性NGF成为治疗PNI-DM患者的良好策略^[11-12]。NGF是一种多肽类的蛋白药物,其半衰期短,在生理条件下易失活且进入机体后容易扩散的缺陷^[13],需迫切寻找一种有效的药物载体,将其运载至机体的病灶区并达到连续缓控释放的效果,进而持续的修复糖尿病人损伤的外周神经。

本实验自主合成的一种新型温敏型肝素-泊洛沙姆水凝胶(heparin-poloxamer hydrogel, HP)具有较好的生物相容性、生物降解性和低毒性^[14]。接枝的肝素能够亲和各类生长因子(growth factors, GFs)。因此,可携带NGF进入机体并于细胞膜上的受体结合,进而调控细胞内部的代谢活动。本实验的研究结果显示,该HP水凝胶是一种多孔状的3D网状结构,易于结合NGF并缓控其释放。体内的研究结果显示,单次注射NGF-HP水凝胶后,糖尿病大鼠损伤的坐骨神经出现显著的运动功能恢复,同时促进轴突和髓鞘的再生。且疗效优于等剂量游离NGF的连续给药。本实验有望为糖尿病坐骨神经损伤的治疗提供新的治疗手段,提升我国在该病领域的原创性技术水平。

1 材料

1.1 药物和试剂

肝素-泊洛沙姆水凝胶(heparin-poloxamer hydrogel, HP, 实验室自主合成);神经生长因子(nerve growth factor, NGF, Sigma公司, SRP3015);神经生长因子ELISA检测试剂盒(MultiScience公司, 48T);Masson三色染色试剂盒(Solarbio公司, G1340);生长相关蛋白43(growth associated protein-43, GAP-43, Abcam公司, ab16053);微管相关蛋白-2(microtubule-associated protein-2, MAP-2, Abcam公司, ab5392);MBP(myelin basic protein, MBP, Abcam公司, ab62631);可溶性蛋白-100(Soluble protein-100, S-100, Santacruz公司, sc-58839); β -肌动蛋白(β -actin, Sigma公司, A1978);神经丝蛋白-200(neurofilament protein -200, NF-200, Abcam公司, ab4680)。

1.2 仪器

ChemiDoc™ XRS + 凝胶成像仪(Bio-Rad公司);正置荧光显微镜(Nikon公司);扫描电镜(Hitachi公司, Japan, TM4000);透射电镜(Hitachi公司, Japan, HT770);血糖仪及其试纸(Sinocare公司, China, GA-3)。

2 方法

2.1 NGF-HP水凝胶的制备

运用1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-二乙胺/N-羟基二酰亚胺(EDC/NHS)法合成HP^[15]。首先,泊洛沙姆407($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)与二氨基乙烯($3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)反应生成单胺终端泊洛沙姆(MATP)。紧接着,该中间体($4.5 \text{ g}, 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)与肝素钠($2.5 \text{ g}, 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)在2-(N-吗啉)磺酸缓冲液(MES)中反应1 d。该反应物透析3 d,冻干获得HP粉末,并于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下长期保存。将制备的HP粉末溶于新鲜的生理盐水,以获得原始浓度为 $640 \text{ } \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的HP水凝胶溶液。然后,分别取原始浓度为 $640 \text{ } \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的HP水凝胶溶液 $250 \text{ } \mu\text{L}$,原始浓度为 $15 \text{ } \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ NGF原溶液 $1 \text{ } \mu\text{L}$ 及新鲜的生理盐水 $749 \text{ } \mu\text{L}$,在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下充分搅拌,获得 1 mL 的NGF-HP水凝胶。其中,NGF的终浓度为 $15 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,HP的终浓度为 $160 \text{ } \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

2.2 扫描电镜

将NGF-HP样品放入 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 的超低温冰箱冻干过夜,次日将其放入冷冻干燥仪中,开启仪器电源并调节其参数,使样品在 $7 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 左右的压力冻干 24 h ,将脱水标本取出,横切 2 mm 的厚度,并用双面胶带粘贴于铜片中放入真空镀膜机内涂喷一层金属导电膜,在扫描电镜下观察样品的表面形态。

2.3 NGF 的体外释放

取配制好的 NGF-HP 水凝胶溶液 1 mL,同时将配置等浓度等体积的 NGF 溶液作为对照组。各样品放入 4 °C 的冰箱并分别于 1、3、7、14、21、28 d 收集上清液,运用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法于 450 nm 波长下检测不同天数 NGF-HP 释放 NGF 的量以及 NGF 溶液含有 NGF 的量,并分别记为实验组和对照组,在二者时间对应的条件下,运用实验组/对照组计算的比值绘制释放曲线。

2.4 动物分组与给药

8 周龄的雄性 SD 大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物证号 SCXK(京)2011-0011。实验大鼠适应性饲养 1 周后,每只腹腔注射剂量为 $65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的链脲佐菌素(溶于 PBS 溶液,浓度 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,避光条件操作),在给药后的第 1、3、7 天测量动物的随机血糖,当 3 次血糖浓度均大于 $16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 视为糖尿病造模成功。次日,将成模的糖尿病大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛($3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉后,切开右后肢的皮肤和肌肉并暴露坐骨神经,在坐骨分叉近端约 7 mm 处用 2 个静脉夹夹持 2 min(30 g,奥斯卡,中国),小心移除静脉夹后,缝合肌肉和皮肤。术后若观察到受试鼠后肢的运动呈现拖行,四肢并拢不能伸展,提示坐骨神经损伤模型制备成功。选出两种模型均制备成功的实验鼠 30 只,随机分为模型组(PNI-diabetics),游离 NGF 组(free NGF)和包裹 NGF 的水凝胶组(NGF-HP hydrogel),每组各 10 只,NGF-HP hydrogel 组在夹闭坐骨神经的损伤区域肌内注射 1 mL 的 NGF-HP 溶液(NGF 的浓度为 $15 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,HP 的浓度为 $160 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$),Free NGF 组连续 30 d 肌内注射 0.1 mL 浓度为 $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 NGF 溶液,PNI-diabetics 给予等体积的生理盐水。动物实验遵守实验动物中心管理规范。术后每周进行动物的行为学评价并于坐骨神经损伤的第 30 天处死各组动物,收集坐骨神经组织进行病理分析。

2.5 BBB 评分

将各组实验大鼠放于空旷的场地使其自由爬行 5 min,待其适应场地后,由实验人员观察动物后肢的活动情况并根据 Basso 等^[16]提出的 BBB 评分标准评判各只鼠的得分,每组至少保证 5 只的量且每周进行 1 次评分。BBB 的评分范围为 0~21,0 代表后肢完全观察不出运动,21 代表后肢运动已达到正常。虽然 BBB 评分主要运用于脊髓损伤,但在 PNI

领域也运用广泛^[17]。

2.6 斜板试验

用于评价实验鼠肌力和运动的恢复情况。试验装置是 2 块矩形板通过铰链将其相连,其中 1 块为底板,另 1 块为移动板,移动板表面覆盖住 1 cm 的橡胶垫。待大鼠处于安静状态后,将其放于移动板并使身体纵轴与斜板纵轴垂直放置,逐渐增大移动板与底板(水平放置)的角度,直至大鼠后肢不能支撑身体并出现下滑的现象时,记录此时斜板的角度,每只受试鼠重复测定 3 次,2 次时间的间隔不小于 5 min。

2.7 组织样品的制备

动物麻醉后,打开胸腔暴露心脏,输液针头扎入左心室并灌注生理盐水,待血液灌净后,分离坐骨神经并用手术刀片切取损伤区约 2 cm 的神经样本放入 30% 的蔗糖溶液脱水 12 h,随后包被于 OTC 中并冷冻成型,将其切成 $5 \mu\text{m}$ 的冰冻切片黏附于载玻片中并用丙酮固定 10 min,以便进行后续的免疫荧光实验。剩余组织放入 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 长期保存以进行 Western blotting 实验。对于透射电镜或 Masson 染色的组织样本,生理盐水灌流后,继续灌流 4% 的多聚甲醛 10 min,取包含损伤区 1 mm 的坐骨神经于 2.5% 的戊二醛中固定 4 h 以便后续的透射电镜实验,再切取 1 cm 的组织样本放入 4% 的多聚甲醛保存,酒精梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后在石蜡切片机上切成 $5 \mu\text{m}$ 厚度的组织切片并黏附于载玻片中,放于烘箱烘干 4 h,以便后续的 Masson 染色。

2.8 免疫印迹

冻存的神经组织加入哺乳动物组织裂解液和 PMSF(1:100)裂解 0.5 h,运用超高速匀浆机匀碎神经组织 2 min,超高速离心后取上清液采用考马斯亮蓝法测定上清液中的蛋白浓度。样品加入十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)后以 80 V 的电压电泳 4 h,转膜至 PVDF 并电转 2 h,取出 PVDF 膜并在 5% 脱脂牛奶中室温封闭 1.5 h,加入兔抗 GAP-43(1:1 000)、兔抗 MBP(1:1 000)、鼠抗 S-100(1:300)、兔抗 MAP-2(1:1 000)和兔抗 β -actin(1:5 000)抗体,4 °C 摇床孵育过夜,TBST 清洗,再分别与相应的辣根过氧化物酶标记的抗体室温下孵育 1 h,TBST 清洗,目的条带加入 Beyo ECL Plus 显色液,利用凝胶成像系统对其化学发光信号进行检测,Quantity One(BIO-RAD)软件分析目的蛋白、内参蛋白的平均光密度值并将二者相除用作半定量比值,实验独立重复 5 次。

2.9 免疫荧光

将切好的冰冻切片用 PBS 洗净组织周围的 OTC 后,滴加 5% BSA + 0.05% Triton x-100 混合液并孵育 0.5 h,滴加鸡抗 NF-200 抗体(1:5 000)4 ℃ 孵育过夜,次日 PBS 洗净一抗,滴加生物素标记的对应的荧光二抗室温孵育 1 h,PBS 洗涤,DAPI 染核 7 min,滴 20 μL 的抗荧光猝灭剂并进行封片,将各组切片放于正置荧光显微镜下拍照并将拍摄的图片运用 Image-J 图像分析软件分析并统计各组轴突数。

2.10 Masson 三色染色

烘干的石蜡切片放入二甲苯中透明 20 min 后,按 Masson 染色说明书的操作步骤处理各组切片,试剂盒内的丽春红染色 7 min,甲苯胺蓝染色 1 min,最后中性树脂封片,待切片风干后在 400 倍镜下观察坐骨神经组织损伤区的恢复情况。

2.11 透射电镜

将浸泡的坐骨神经组织用 PBS 清洗,37 ℃ 放入锇酸和醋酸铀各染色 1 h,丙酮脱水后用环氧树脂包埋并切成 50.0 nm 厚度的超薄切片。将超薄切片用乙酸双氧铀和枸橼酸铅染色后,在透射电镜下拍照观察。运用 Image-Pro plus 对图像中神经纤维数和 G-ratio(轴突直径/纤维直径)进行计算分析。

2.12 统计分析

采用 SPSS21.0 统计软件包进行分析,计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析(ANOVA)统计分析加 Bonferroni 多重比较分析,两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 认为统计学具有显著性差异。

3 结果

3.1 NGF-HP 水凝胶性质检测

HP 是一种相对分子质量约 1.9×10^3 且具有温敏特性的水凝胶,即在 4 ℃ 存储条件下呈现液态,进入生物体,在体温(37 ℃)作用下发生凝胶成型。前期已报道 HP 发生相转变的温度约为 25 ℃,其接枝肝素的效率为 52.4%, $1\ 736\ \text{cm}^{-1}$ 及 $3\ 300 \sim 3\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 为形成 HP 酰胺键($-\text{CO}-\text{NH}-$)的新吸收峰^[18]。为观察 HP 装载 NGF 后的内部结构特征及释放特性,分别运用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)及 ELISA 试剂盒对其性质进行检测。SEM 的拍摄结果显示,NGF-HP 的内部呈现海绵状的多孔网状结构(图 1A),推测这种 3D 立体网状结构可能更有利于附载 NGF。在检测 NGF-HP 释放 NGF 的过程中,同时检测了等浓度等体积的 NGF 在对应天数含有 NGF 的量作为对照组,并将 NGF-

HP 在不同天数释放 NGF 的量除以对应天数的对照组,以此排除 NGF-HP 含有的 NGF 在实验过程中所遇到的不稳定性和降解性等问题。由 NGF-HP 水凝胶在体外的释放曲线可知,前期水凝胶中 NGF 释放迅速,后期平稳,至 28 d 仍有约 42.32% 的 NGF 存留于水凝胶中(图 1B)。此结果表明,HP 内含有的肝素可很好的结合 NGF 并缓控其释放。

3.2 NGF-HP 促进 PNI-diabetics 大鼠运动功能的恢复

为探究 NGF-HP 对 PNI-diabetics 大鼠运动功能的恢复并与游离 NGF 的疗效作对比,各组在给药后的第 0、7、14、21、28 天分别进行斜板实验与 BBB 评分。由斜板实验获取的结果可知,给药组的大鼠在斜板上维持平衡的角度随着治疗天数的推移在逐步变大,在第 21 天 NGF-HP 与游离 NGF 组的斜角数值出现统计学差异并在第 28 天表现的更加显著(图 2A)。这样的趋势在 BBB 评分中同样得到验证(图 2B)。上述分析结果表明,游离 NGF 的治疗可持续地促进 PNI-diabetics 大鼠运动功能的恢复但效果不及单次给予 NGF-HP 的治疗。

3.3 NGF-HP 上调 PNI-diabetics 大鼠神经内部结构和功能蛋白的表达

为进一步探究 NGF-HP 改善 PNI-diabetics 大鼠的行为学与上调神经内结构和功能蛋白表达的密切联系。我们运用免疫印迹法分别检测各组神经内 GAP-43、MAP-2、MBP 及 S-100 的含量。GAP-43 蛋白存在于发育和再生神经元的生长锥中^[19];MAP-2

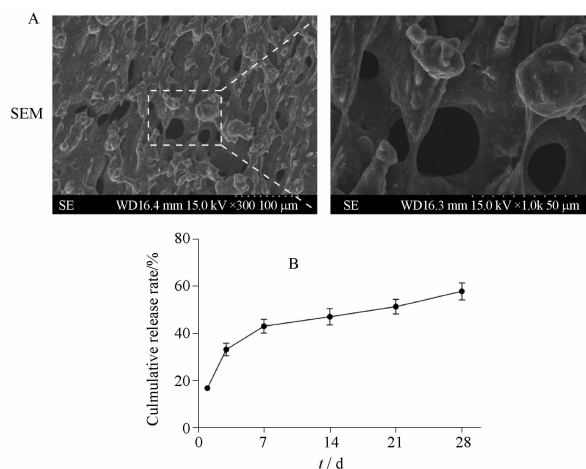


图 1 (NGF-HP) 的内部微观结构与释放曲线. $n = 3, \bar{x} \pm s$ A - 扫描电镜图; B - ELISA 释放曲线

Fig. 1 The microstructure of NGF-HP hydrogel and release profile of encapsulated NGF at different time point. $n = 3, \bar{x} \pm s$ A - scanning electron microscope; B - ELISA released curve

是神经骨架的一个重要组成部分,参与细胞内许多蛋白质的转运^[20];MBP 是外周神经内髓鞘的主要外膜蛋白^[21];S-100 属于增殖 SCs 的标记物^[22]。Western blotting 的检测结果显示,游离 NGF 组中这 4 种蛋白的表达均出现显著的增加,但增幅不及 NGF-HP 组(图 3)。由此可推断,PNI-diabetics 大鼠运动功能的恢复与神经内结构和功能蛋白表达的上调密切相关且 NGF-HP 上调该类蛋白的表达效果最佳。

3.4 NGF-HP 增加 PNI-diabetics 大鼠轴突的数目

轴突是将神经元胞体产生的兴奋冲动传至其他神经元或效应器的枢纽。轴突的缺损会引起神经功能的丧失。为探究 NGF-HP 是否有助于促进 PNI-diabetics 大鼠病变神经内轴突的再生,运用 NF-200

标记各组轴突的形态。图 4A 的结果显示,模型组(PNI-diabetics)轴突数目稀疏且排列紊乱,而连续注射游离 NGF 后,这种情况被逆转。而单次给予 NGF-HP 后,坐骨神经内轴突的再生表现地更加密集和规整。统计结果也显示,NGF-HP 水凝胶增加新生轴突的数目最多(图 4B)。上述分析结果说明,NGF-HP 促进 PNI-diabetics 大鼠神经内轴突再生的效果最佳。

3.5 NGF-HP 加速 PNI-diabetics 大鼠神经纤维的再生和再髓鞘化

Masson 染色用于评价 30 d 后各组损伤神经纤维的再生情况。组织形态学的结果显示,模型组的神经纤维数量稀疏且排列紊乱。相反,游离 NGF 组

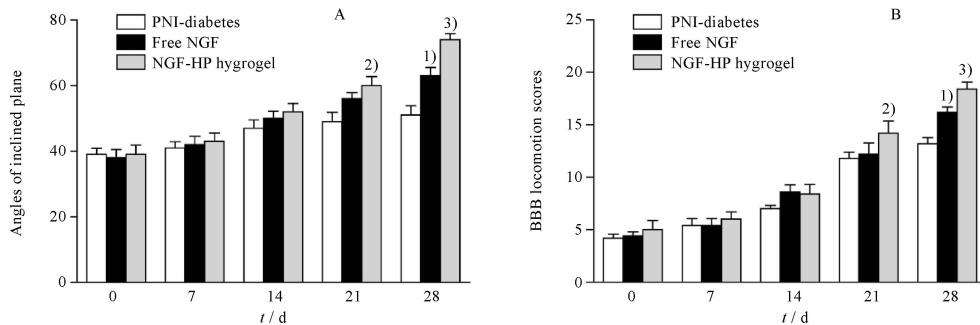


图 2 NGF-HP 促进 PNI-diabetics 大鼠运动功能的恢复。n = 7, $\bar{x} \pm s$

A - 斜坡实验; B - BBB 评分; 与 PNI-diabetics 组相比,¹⁾P < 0.05; 与游离 NGF 组相比,²⁾P < 0.05, ³⁾P < 0.01

Fig. 2 NGF-HP improves the motor functional recovery of PNI-diabetics rat. n = 7, $\bar{x} \pm s$

A - the inclined plane test; B - the BBB locomotion score; ¹⁾P < 0.05, vs PNI-diabetics group; ²⁾P < 0.05, ³⁾P < 0.01, vs free NGF group

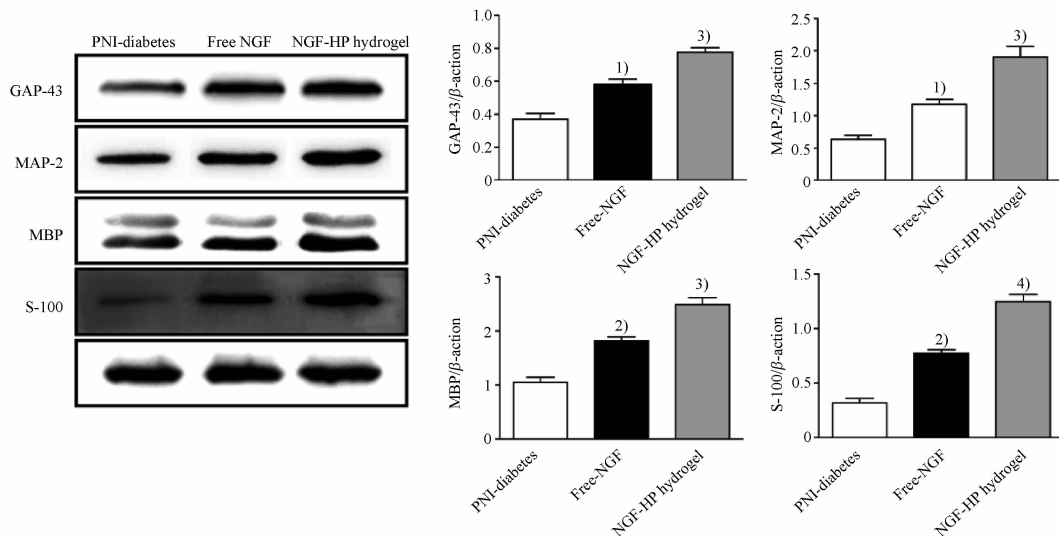


图 3 NGF-HP 水凝胶对 PNI-diabetics 大鼠坐骨神经 GAP-43、MAP-2、MBP、S-100 蛋白表达的影响。n = 5, $\bar{x} \pm s$

与 PNI-diabetics 组相比,¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01; 与游离 NGF 组相比,³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01

Fig. 3 Effect of NGF-HP on GAP-43、MAP-2、MBP、S-100 expression in sciatic nerve of PNI-diabetics rats. n = 5, $\bar{x} \pm s$

¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01, vs PNI-diabetics group; ³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01, vs free NGF group

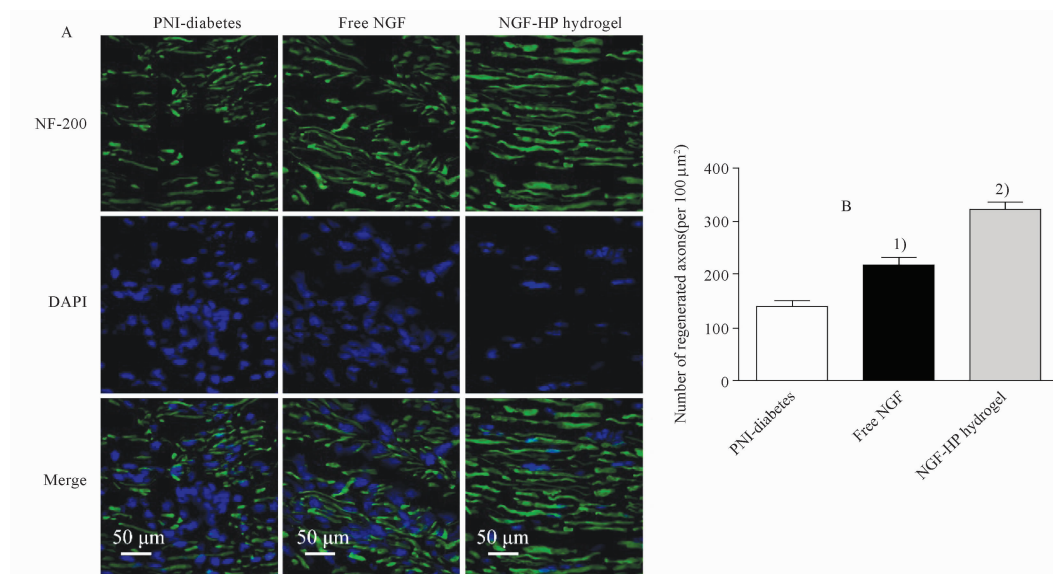


图4 NGF-HP水凝胶对PNI-diabetics大鼠坐骨神经轴突再生的影响

A - 免疫荧光($\times 400$); B - NF-200荧光强度统计图。 $n = 5, \bar{x} \pm s$; 与PNI-diabetics组相比,¹⁾ $P < 0.05$; 与游离NGF组相比,²⁾ $P < 0.01$

Fig. 4 Effect of NGF-HP on axonal regeneration in sciatic nerve of PNI-diabetics rats

A - immunofluorescence ($\times 400$); B - quantitative analysis of NF-200 fluorescence intensity. $n = 5, \bar{x} \pm s$; ¹⁾ $P < 0.05$, vs PNI-diabetics group; ²⁾ $P < 0.01$, vs free NGF group

和NGF-HP组含有大量的有髓神经纤维,排列有序且轮廓清晰(图5A)。透射电镜(TEM)用于显示各组神经内髓鞘的形态及数目变化。与Masson的分析结果一致,术后30d,在游离NGF和NGF-HP组中,绝大多数再生的轴突被致密的髓鞘包裹。而PNI-diabetics组再生的髓鞘呈现稀薄松散状的形态,髓鞘内表现出典型的液泡状结构,提示该组髓鞘发生脱髓鞘化(图5B)。统计结果显示,游离NGF组和NGF-HP组在髓鞘数目和G-ratio参数均显示一定的统计学差异(图5C,5D)。上述分析结果表明,NGF-HP可显著增强PNI-diabetics大鼠神经纤维的再生和再髓鞘化。

4 讨论

恢复损伤的外周围神经功能至正常水平仍然是一个具有挑战性的临床难题。PNI的病人往往会遭受部分或永久性的感觉和自主神经功能的丧失,特别是对那些合并糖尿病的患者^[23]。NGF是一种研究最为广泛的神经营养因子,其促进周围神经修复和再生已被广泛报道。然而,保持适当的空间和时间释放仍然是优化NGF疗效的主要障碍。在本实验中,我们将NGF装载于具有温敏特性的肝素-泊洛沙姆(HP)凝胶内,通过原位注射进入PNI-diabetics大鼠神经周围的病灶区。HP缓控释放NGF的特性可显著地促进轴突的再生和再髓鞘化,增强神

经内结构和功能蛋白的表达,进而达到持续地促进PNI-diabetics大鼠运动功能的恢复。

在神经发育和再生过程中,轴突的萌芽和髓鞘的重组不仅依赖于内在分子和细胞机制的调控,而且也受制于外在因素的微环境变化^[24]。在神经损伤部位提供足量的细胞生长因子是一种能够为神经再生创造良好微环境的优越手段^[25]。NGF是被广泛报道的神经营养因子家族成员之一,兼具促进神经再生和营养神经的双重功效,可显著改善PNI和神经系统疾病的形态和功能的恢复。但内源性的NGF无法满足神经再生的需求,且外源性NGF在生理条件下易失活,导致在机体内的生物利用度急剧下调,增大病人的给药频率和剂量,进而造成临床上不良反应的风险^[26]。因此,寻找一种在机体内部可持续释放NGF的载体迫在眉睫。

与绝大生物组织相比,泊洛沙姆水凝胶是一种理想的药物递送载体,在神经保护和再生医学中被广泛运用^[24]。例如,泊洛沙姆-407/188聚合物与单唾液酸神经节苷脂(GM1-gel)联合运用可有效预防损伤脊髓内细胞的凋亡和胶质瘢痕的形成^[27]。本实验开发的温敏型水凝胶是由泊洛沙姆407和肝素通过缩聚反应而得。泊洛沙姆407是一种安全的生物相容性聚合物,已被美国食品和药品管理局(FDA)批准并用于无创伤血管吻合术的缝合^[28]。肝素是一种由糖胺聚糖聚合而成的高分子聚合物。

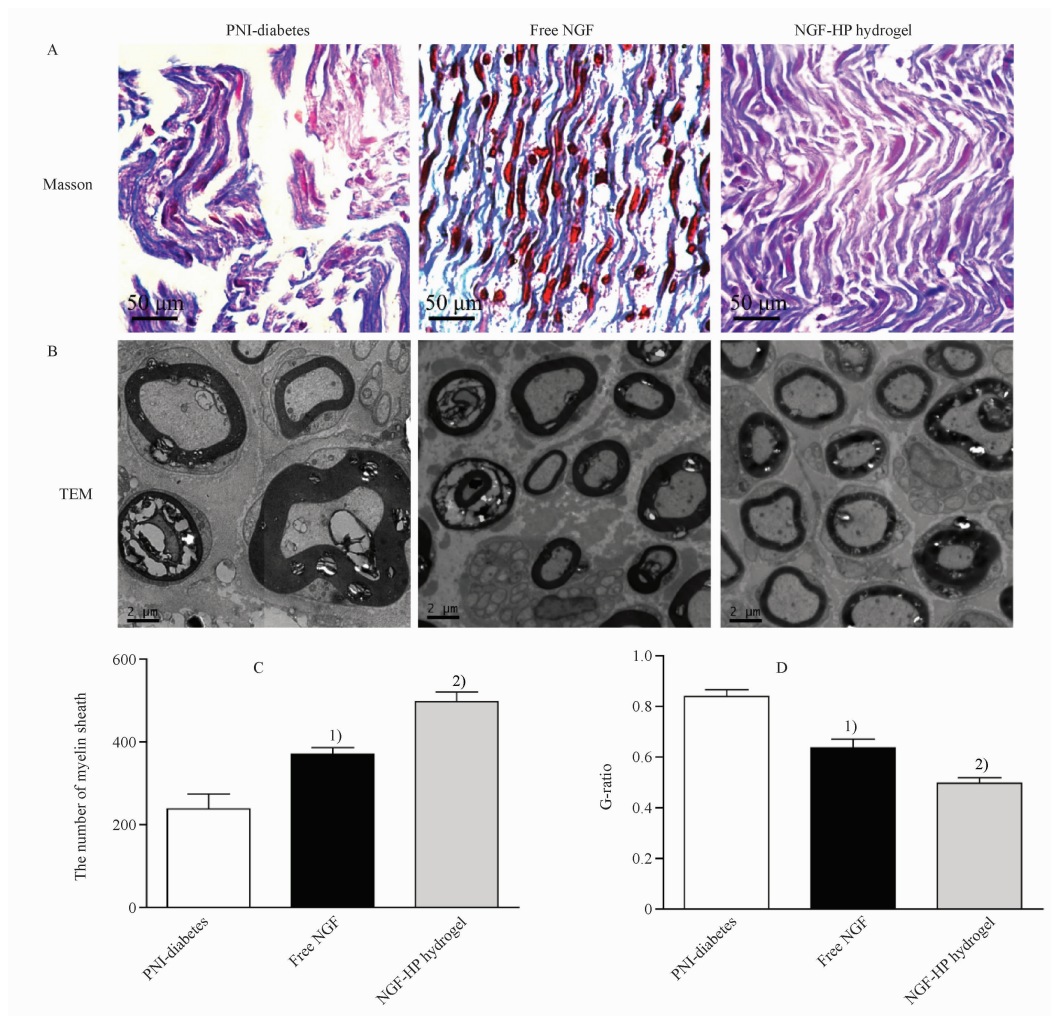


图5 NGF-HP水凝胶促进PNI-diabetics大鼠神经纤维的再生和再髓鞘化

A - Masson三色染色; B - 透射电镜; C - 髓鞘数目统计图; D - G-ratio统计图($n=5, \bar{x} \pm s$); 与PNI-diabetics组相比,¹⁾ $P < 0.01$; 与游离NGF组相比,²⁾ $P < 0.05$

Fig. 5 NGF-HP promotes nerve fibres regeneration and remyelination in PNI-diabetics rats

A - Masson's trichrome staining; B - transmission electron microscope (TEM); C - quantitative analysis of the numbers of myelin; D - quantitative analysis of the g-ratio ($n=5, \bar{x} \pm s$); ¹⁾ $P < 0.01$, vs PNI-diabeticsgroup; ²⁾ $P < 0.05$, vs Free NGF group

前期的研究结果已显示,肝素-泊洛沙姆共聚物可通过抑制内质网应激或自噬诱导的凋亡提高脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的修复和再生^[29-30]。在4℃条件下,HP处于溶液状态,适于装载生长因子(GFs)。在体内,HP在体温作用下(37℃)转变成凝胶状态,其适宜的机械强度可将HP稳固的附着于损伤神经的病灶区并平稳地释放GFs。此外,肝素的另一个重要特征是它能够结合多类GFs,防止其水解,使其成为保持GFs生物活性的常用物质^[31]。因此,与肝素接枝的泊洛沙姆407不仅有助于保护GFs活性和构象,而且可时空性缓控各类GFs的释放。我们的实验结果也表明,NGF-HP其内部的三维网状结构适于结合NGF并缓控其释放(图1)。

外周神经在遭受外界破坏后,损伤近端的SCs会发生去分化并出现增殖,增殖的SCs沿着基底膜向前爬行形成Büngner带为轴突的延伸铺平道路,同时,SCs与轴突相互作用,促使SCs再分化并形成连续包绕轴突的髓鞘^[32]。故轴突和髓鞘的再生,各结构和功能蛋白的表达上调对损伤神经的修复至关重要。为探究NGF-HP对糖尿病大鼠损伤神经的修复作用,我们首先运用斜板实验和BBB评分评价各组大鼠运动功能的恢复。研究表明,与连续30d注射游离NGF相比,单次给予含等剂量NGF的水凝胶能更有效地促进PNI-diabetics大鼠运动功能的恢复(图2)。随后我们对各组神经组织内结构和功能蛋白的表达含量(包括GAP-43、MAP-2、MBP和S-100)进行了检测。Western blotting的检测结果显示

示,游离 NGF 治疗也可在一定程度上促进该类蛋白的表达,但效果不及 NGF-HP 给药(图 3)。我们还评估了各组损伤神经的生长、轴突的再生和再髓鞘化。免疫荧光、Masson 染色及 TEM 的研究结果表明,NGF-HP 可显著改善神经纤维的紊乱,加速轴突和髓鞘的再生并抑制糖尿病脱髓鞘的现象,且这种改善的效果优于游离 NGF 的连续给药(图 4,5)。综上,NGF-HP 可产生广泛的神经保护和神经再生反应,该水凝胶原位递送 GFs 有望成为治疗 PNI-diabetics 疾病的有效方法。

REFERENCES

- [1] MUSTAFA S B, MEHMOOD Z, AKHTER N, *et al.* Review-medicinal plants and management of diabetes mellitus: a review [J]. *Pak J Pharm*, 2016, 29(5 suppl):1885-1891.
- [2] GUARIGUATA L, WHITING D R, HAMBLETO I, *et al.* Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 103(2):137-149.
- [3] ZENKER J, ZIEGLER D, CHRAST R. Novel pathogenic pathways in diabetic neuropathy [J]. *Trends Neurosci*, 2013, 36(8):439-449.
- [4] KAPLAN S. Diabetic neuropathy-a review [J]. *Nat Clin Pract Neurol*, 2007, 3(6):331-340.
- [5] TSUKAMOTO M, SANGO K, NIIMI N, *et al.* Upregulation of galectin-3 in immortalized schwann cells ifrs1 under diabetic conditions [J]. *Neurosci Res*, 2015, 92(69):80-85.
- [6] DEY I, MIDHA N, SINGH G, *et al.* Diabetic schwann cells suffer from nerve growth factor and neurotrophin-3 underproduction and poor associability with axons [J]. *Glia*, 2013, 61(12):1990-1999.
- [7] RAIIVICH G, HELLWEG R, KREUTZBERG G W. Ngf receptor-mediated reduction in axonal ngf uptake and retrograde transport following sciatic nerve injury and during regeneration [J]. *Neuron*, 1991, 7(1):151-164.
- [8] SOFRONIEW M V, HOWE C L, MOBLEY W C. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24(3):1217-1281.
- [9] KEMP S W, WEBB A A, DHALIWAI S, *et al.* Dose and duration of nerve growth factor (ngf) administration determine the extent of behavioral recovery following peripheral nerve injury in the rat [J]. *Exp Neurol*, 2011, 229(2):460-470.
- [10] KARAMOYSOYLI E, BURNAND R C, TOMLINSON D R, *et al.* Neuritin mediates nerve growth factor-induced axonal regeneration and is deficient in experimental diabetic neuropathy [J]. *Diabetes*, 2008, 57(1):181-189.
- [11] GROSHEVA M, NOHROUDI K, SCHWARZ A, *et al.* Comparison of trophic factors' expression between paralyzed and recovering muscles after facial nerve injury. A quantitative analysis in time course [J]. *Exp Neurol*, 2016, 279(35):137-148.
- [12] ZOCHODNE D W, CHENG C. Neurotrophins and other growth factors in the regenerative milieu of proximal nerve stump tips [J]. *J Anat*, 2010, 196(2):279-283.
- [13] TSAI C C, LU M C, CHEN Y S, *et al.* Locally administered nerve growth factor suppresses ginsenoside rb1-enhanced peripheral nerve regeneration [J]. *Am J Chin Med*, 2003, 31(5):665-673.
- [14] ZHAO Y Z, LV H F, LU C T, *et al.* Correction: evaluation of a novel thermosensitive heparin-poloxamer hydrogel for improving vascular anastomosis quality and safety in a rabbit mode [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e73178.
- [15] TIAN J L, ZHAO Y Z, JIN Z, *et al.* Synthesis and characterization of poloxamer 188-grafted heparin copolymer [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2010, 36(7):832-838.
- [16] BASSO D M, BEATTIE M S, BRESNAHAN J C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. *J Neurotrauma*, 1995, 12(1):1-21.
- [17] MOHAMMADI R, SANAEI N, AHSAN S, *et al.* Stromal vascular fraction combined with silicone rubber chamber improves sciatic nerve regeneration in diabetes [J]. *Chin J Traumatol* (中华创生杂志), 2015, 18(4):212-218.
- [18] ZHAO Y Z, LV H F, LU C T, *et al.* Evaluation of a novel thermosensitive heparin-poloxamer hydrogel for improving vascular anastomosis quality and safety in a rabbit model [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e73178.
- [19] GRASSELLI G, STRATA P. Structural plasticity of climbing fibers and the growth-associated protein gap-43 [J]. *Front Neural Circuits*, 2013, 7(3):25-34.
- [20] MERCERON-MARTINEZ D, ALMAGUER-MELIAN W, ALBERTI-AMADOR E, *et al.* Amygdala stimulation promotes recovery of behavioral performance in a spatial memory task and increases gap-43 and map-2 in the hippocampus and prefrontal cortex of male rats [J]. *Brain Res Bull*, 2018, 142(3):8-17.
- [21] ZIERATH D, KUNZE A, FECTEAU L, *et al.* Promiscuity of autoimmune responses to mbp after stroke [J]. *J Neuroimmunol*, 2015, 285(29):101-105.
- [22] MOHANRAJ A, SRINIVASAN S. Role of s-100 immunostaining in demonstration of nerve changes and quantification of dendritic cells in leprosy [J]. *J Clin Diagn Res*, 2014, 8(3):38-40.
- [23] MOORE A M, KASUKURTHI R, MAGILL C K, *et al.* Limitations of conduits in peripheral nerve repairs [J]. *Hand*, 2009, 4(2):180-186.
- [24] FORBES S J, ROSENTHAL N. Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy [J]. *Nat Med*, 2014, 20(8):857-868.
- [25] GIANNACCINI M, CALATAYUD M P, POGGETTI A, *et al.* Magnetic nanoparticles for efficient delivery of growth factors: stimulation of peripheral nerve regeneration [J]. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6(5):57-71.
- [26] GORDON T. Neurotrophic factor expression in denervated motor and sensory schwann cells: relevance to specificity of peripheral nerve regeneration [J]. *Exp Neuro*, 2014, 254(4):99-108.
- [27] LIU D, JIANG T, CAI W, *et al.* An *in situ* gelling drug delivery system for improved recovery after spinal cord injury [J]. *Adv Healthc Mater*, 2016, 5(12):1513-1521.
- [28] CHANG E I, GALVEZ M G, GLOTZBACH J P, *et al.* Vascular anastomosis using controlled phase transitions in poloxamer gels [J]. *Nat Med*, 2011, 17(9):1147-1158.
- [29] WANG Q, HE Y, ZHAO Y, *et al.* A thermosensitive heparin-poloxamer hydrogel bridge afgf to treat spinal cord injury [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(8):6725-6747.
- [30] ZHAO Y Z, JIANG X, LIN Q, *et al.* Thermosensitive heparin-poloxamer hydrogels enhance the effects of gdnf on neuronal circuit remodeling and neuroprotection after spinal cord injury [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2017, 105(10):2816-2829.
- [31] WIJELATH E, NAMEKATA M, MURRAY J, *et al.* Multiple mechanisms for exogenous heparin modulation of vascular endothelial growth factor activity [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(2):461-468.
- [32] KIM H A, MINDOS T, PARKINSON D B. Plastic fantastic: schwann cells and repair of the peripheral nervous system [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2013, 2(8):553-557. (收稿日期:2018-09-26)