

神经生长因子温敏凝胶对大鼠坐骨神经损伤的修复作用

江敏¹, 宋旺弟¹, 陈文¹, 郭亚可^{2*}

(1. 石河子大学药学院, 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆石河子 832000;
2. 石河子大学医学院第一附属医院, 新疆石河子 832008)

[摘要] **目的:**制备神经生长因子(NGF)温度敏感型原位凝胶,以大鼠坐骨神经损伤为模型,探讨NGF温敏凝胶对大鼠坐骨神经损伤的修复作用。**方法:**制备NGF温敏凝胶,利用星点设计-效应面法优化其处方。将50只大鼠随机分为正常组,模型组,NGF注射剂组(10 mg·L⁻¹),NGF低剂量温敏凝胶组(10 mg·L⁻¹)和NGF高剂量温敏凝胶组(20 mg·L⁻¹),建立大鼠坐骨神经损伤模型;以大鼠行为学,坐骨神经功能指数(SFI),撤回反射时间的测定实验,腓肠肌湿重比的测定以及组织形态学变化为指标,综合考察NGF温敏凝胶对损伤坐骨神经的影响。**结果:**处方优化后NGF温敏凝胶的胶凝温度35.2℃,符合注射用标准。术后4~8周,各时间点测得NGF高剂量温敏凝胶组大鼠的SFI和腓肠肌湿重比都显著高于模型组和NGF注射剂组,但其撤回反射时间显著低于模型组和NGF注射剂组,且作用呈剂量依赖性。由苏木精-伊红(HE)染色试验可知,NGF高剂量温敏凝胶组的大鼠坐骨神经损伤区再生神经纤维排列较模型组整齐、密集,而且连续性也较好。**结论:**NGF温敏凝胶能促进大鼠坐骨神经损伤的修复。

[关键词] 神经生长因子; 温度敏感型原位凝胶; 星点设计-效应面法; 坐骨神经损伤; 修复作用; 坐骨神经功能指数; 撤回反射时间

[中图分类号] R22;R24;R28;C37;TS193 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)03-0027-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190207

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181031.0926.016.html>

[网络出版时间] 2018-11-02 09:35

Therapeutic Effect of Nerve Growth Factor Thermosensitive Gel on Sciatic Nerve Injury of Rats

JIANG Min¹, SONG Wang-di¹, CHEN Wen¹, GUO Ya-ke^{2*}

(1. School of Pharmacy, Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resource and Utilization, Ministry of Education, Shihezi University, Shihezi 832000, China;

2. The First Affiliated Hospital of the Medical College, Shihezi University, Shihezi 832008, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare nerve growth factor (NGF) temperature sensitive *in situ* gel and investigate its therapeutic effect on sciatic nerve injury of rats. **Method:** NGF thermosensitive gel was prepared and its prescription was optimized by central composite design-response surface methodology. Fifty rats were randomly divided into the normal group, model group, NGF injection group (10 mg·L⁻¹), NGF low-dose (10 mg·L⁻¹) and high-dose (20 mg·L⁻¹) thermosensitive gel groups, and sciatic nerve injury model of rats was established. The effect of NGF thermosensitive gel on the injury of sciatic nerve were comprehensively examined by taking rat behavior, sciatic nerve function index (SFI), time of withdrawal reflex, wet weight ratio of gastrocnemius muscle, and histomorphological changes as indicators. **Result:** The gelation temperature of NGF thermosensitive gel was 35.2℃ after the formulation being optimized, which was in line with the standard for injection. Four-

[收稿日期] 20180429(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160395)

[第一作者] 江敏, 硕士, 从事药物新剂型研究, E-mail:1252845049@qq.com

[通信作者] *郭亚可, 硕士, 主管药师, 从事医院药学研究, E-mail:guoyake1985@163.com

eight weeks after operation, the SFI and wet weight ratio of gastrocnemius muscle in rats of NGF high-dose thermosensitive gel group were significantly higher than those in the model group and NGF injection group, but its time of withdrawal reflex was significantly lower than those in the model group and NGF injection group, and the effect was in a dose-dependent manner. Arrangement of regenerated nerve fibers in sciatic nerve injury area of rats from NGF high-dose thermosensitive gel group was more tidy, dense and continuous than that of the model group.

Conclusion: NGF thermosensitive gel can promote repair of sciatic nerve injury in rats.

[Key words] nerve growth factor; thermosensitive *in situ* gel; central composite design-response surface methodology; sciatic nerve injury; restorative effect; sciatic nerve function index; time of withdrawal reflex

鼠神经生长因子(NGF)具有促进神经元生长和营养神经元双重作用的一种神经生长调节因子^[1],是神经系统中最重要生物活性分子之一^[2-5]。其中,从小鼠颌下腺提取的鼠 NGF 对外周神经损伤均有潜在医疗价值^[6-8]。目前,周围神经损伤发生率高、治疗困难,是临床急需解决的难题^[9]。然而,NGF 存在一定的局限性,比如半衰期较短、吸收较差以及生物利用度低等问题,而目前 NGF 的给药方式主要为注射给药,这种方式不能使 NGF 更持久地发挥药效,为改善其缓释性,延长药物发挥作用的时间,亟待寻找出一种高效的给药方式。

温敏凝胶在室温或低于室温的条件下呈液态,注射于患处后可快速胶凝,变成半固体的状态,这样不仅能使凝胶更均匀地分布于病变部位,使患处的局部药物浓度较高,而且还可以降低载药凝胶的释药速度,更好地发挥缓控释作用,从而达到药效更加持久的目的。张贝贝^[10]制备了可注射磺化壳寡糖温敏水凝胶,采用大鼠坐骨神经损伤模型,注射不同浓度的温敏凝胶后,测定大鼠坐骨神经的恢复情况。结果表明实验组大鼠的机械缩足阈值和热缩足潜伏期明显变小,高剂量给药组在实验周期之内,被损伤的坐骨神经已完全愈合,说明该药物对坐骨神经损伤具有修复作用。本实验拟以 NGF 为模型药物,制备载 NGF 的温敏凝胶,通过建立大鼠坐骨神经损伤模型,探讨 NGF 温敏凝胶对坐骨神经损伤后的神经再生与功能修复的治疗作用,以期为临床上治疗神经损伤提供一定的理论依据和参考意义。

1 材料

RM2245 型切片机, RM2245 型显微镜和 CM1860 型冰冻切片机(德国徕卡公司);DB-09 型石蜡包埋机(湖北德立森科技有限公司),CX31 型显微镜(日本 Olympus 公司),BP-211D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司),MLS-3020 型高压灭菌锅(日本 Sanyo 公司),PHS-3C 型精密 pH 计(上海精

密科学仪器有限公司),DV-C 型数显旋转粘度计(广州市东南科创科技有限公司)。

鼠神经生长因子温度敏感型原位凝胶(自制),水合氯醛(青岛宇龙海藻有限公司),注射用青霉素钠(哈药集团制药总厂),2.5%戊二醛(瑞高化工有限公司),泊洛沙姆 407(P407)和泊洛沙姆 188(P188)(德国 BASF 公司),聚乙烯吡咯烷酮 K30(PVP-K30,上海蓝季生物科技有限公司)。

成年雄性 SD 大鼠 50 只,体质量 220 ~ 250 g,购自新疆维吾尔自治区实验动物研究中心,合格证号 SCXK(新)2011-0003。动物均在温度 20 ~ 25 ℃,相对湿度 55% ~ 65% 的环境饲养,自由饮水进食。本实验取得了石河子大学医学院第一附属医院实验动物伦理委员会的批准。

2 方法

2.1 神经生长因子温敏凝胶的制备及其处方优化

2.1.1 神经生长因子温敏凝胶的制备 采用冷溶法配制。精密称取处方量的 P407 和 P188,在磁力搅拌的作用下,依次加至适量水中使其充分溶解,于 4 ℃ 冰箱中冷藏 24 h 至充分溶胀且分散均匀,得到澄清溶液;加入处方量 PVP-K30,维生素 E,氯化钠和对羟基苯甲酸甲酯,制得溶液 A。精密称取处方量的神经生长因子加入适量水中,超声(40 kHz, 250 W)使溶解,得溶液 B。将溶液 B 加入溶液 A 中,用磷酸盐缓冲液调节 pH 6.8 ~ 7.8,搅拌混合均匀,即得。

2.1.2 胶凝温度的测定 采用搅拌子法^[11]。取 4 ℃ 冷藏 24 h 后的温敏凝胶液 10 g 于西林瓶中,加入磁力搅拌子,使用精度为 0.1 ℃ 的精密温度计测定,使温度计的水银球完全浸没在凝胶溶液中,将西林瓶置于磁力搅拌的水浴锅中搅拌,按升温速率约 1 ~ 2 ℃ · min⁻¹ 缓慢升高水浴温度,将转速设置为 300 r · min⁻¹,以磁力搅拌子完全停止转动时的温度作为该凝胶溶液的胶凝温度,每组样品平行测定 3 次,取平均值^[12-13],即得。

2.1.3 星点设计-效应面法优化处方 选择 P407 和 P188 为基质,以 P407, P188 和 PVP-K30 质量分数为考察因素,以胶凝温度 (T_{gel}) 为评价指标,采用星点设计-效应面法优化处方。因素水平的代码值和实际操作值是由星点设计原理确定,每个因素设置 5 个水平,水平数分别为 ± 1.732 , ± 1 和 0。

2.2 温敏凝胶的质量评价

2.2.1 pH 的测定 使用 pH 计测定 pH,在使用前分别用 pH 9.18 和 pH 4.00 的磷酸盐缓冲液对精密 pH 计进行校正,载药温敏凝胶的 pH 测定 3 次,求平均值。

2.2.2 胶凝时间的测定^[14] 另取 4 ℃ 冷藏 24 h 的温敏凝胶溶液 2 mL 于安瓿瓶中,放在 37 ℃ 水浴锅中,以倒置安瓿瓶 30 s 凝胶溶液未发生流动时的时间作为该凝胶溶液的胶凝时间。

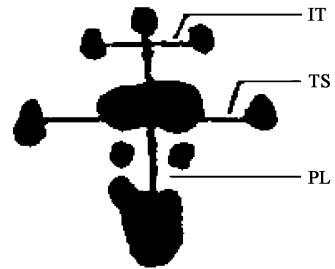
2.2.3 黏度的测定^[15] 取适量神经生长因子温度敏感型原位凝胶,使其在常温水浴下充分稳定,使用粘度计,选用 4 号转子,转速 $60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,升温速度 $1 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$,在 25 ~ 37 ℃ 内匀速升温,将黏度发生突变时的黏度值作为相应黏度。

2.3 大鼠坐骨神经损伤模型的建立^[16] 按剂量 $3.5 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ 腹腔注射 10% 水合氯醛,静置几分钟,直至膝跳反射消失,将大鼠俯卧固定于定制手术板上,无菌条件下沿股骨走向切开右下肢臀大肌,用止血弯钳分离肌肉,玻璃分针游离坐骨神经,用特制无齿血管钳末端钳夹坐骨神经干,造成宽度约 1 cm 的损伤区,5-0 丝线标记后缝合。术后腹腔注射青霉素,按剂量 $2.0 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ 腹腔注射青霉素,防止大鼠的伤口感染。以坐骨神经功能指数 (SFI) 急剧降低,且 SFI 骤降至约 -100 为坐骨神经损伤模型成功建立的标志^[16]。

2.4 试验设计 大鼠随机分为正常组,模型组,神经生长因子 (NGF) 注射剂组,NGF 低剂量温敏凝胶组和 NGF 高剂量温敏凝胶组,每组各 10 只。进行坐骨神经钳夹损伤术。取用 1 mL 注射器缓慢注射液体 0.5 mL 于损伤的神经部位。正常组、模型组损伤部位注射生理盐水,NGF 注射剂组损伤部位注射 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NGF 注射液,NGF 低、高剂量温敏凝胶组分别于损伤部位按 $10, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 注射 NGF 温敏凝胶,每日 1 次,连续给药 2 周,并给予青霉素预防感染;各组大鼠于术后的 1, 2, 4, 6, 8 周分别测定坐骨神经功能指数 (SFI) 和撤回反射时间,并进行腓肠肌湿重的测定。8 周后处死大鼠,切下线结标记上下各 0.5 cm 段坐骨神经干,随即泡入 10% 甲醛固

定备用,进行苏木精-伊红 (HE) 染色试验。

2.5 SFI 的测定^[17] 将每只大鼠于手术前及手术后 1, 2, 4, 6, 8 周进行大鼠足印迹试验。实验室自制长 50 cm, 宽 10 cm 和高 10 cm 的长方体动物行步箱,在每一个测量的时间点将大鼠后肢足趾蘸上墨汁,左右足可以蘸不同颜色的墨水以便于区别左右脚的足印迹,并在行步箱的通道铺上裁剪好的适宜大小的白纸条,让大鼠在白纸上踩下脚印,分别在两侧脚印中各选取 3 个清晰的足印,晾干测量。测量足迹的相关参数,按 $\text{SFI} = -38.3 \times (\text{EPL} - \text{NPL}) / \text{NPL} + 109.5 \times (\text{ETS} - \text{NTS}) / \text{NTS} + 13.3 \times (\text{EIT} - \text{NIT}) / \text{NIT} - 8.8$ 计算大鼠于各时间点的 SFI。式中 N 代表正常足,即右足;E 代表损伤足,即左足;NTS 为右足的足趾宽度,NPL 为右足的足印长度,NIT 为右足的中间足趾距离;ETS 为左足的足趾宽度,EPL 为左足的足印长度,EIT 为左足的中间足趾距离。若 SFI 接近 0 则代表功能正常,SFI 接近 -100 代表功能完全丧失。见图 1。



IT. 中间足趾距离;TS. 足趾宽度;PL. 足印长度

图 1 大鼠的足印

Fig. 1 Footprints of rats

2.6 撤回反射时间的测定 将每只实验用大鼠在手术前及手术后的不同时间点进行撤回反射试验。在每一个用棉布包裹大鼠腰部及腰部以上皮肤以及正常侧 (右肢),只露出左后肢,将大鼠置于 56 ℃ 的热板上,记录左后足从刚接触热板到撤回所需的时间,每间隔 5 min 测量 1 次。每只大鼠测定 3 次,取平均值,若大鼠长时间没有做出反应,实验停止,以免引起大鼠皮肤的烫伤。

2.7 腓肠肌湿重比的测定 手术 8 周之后腹腔注射过量的水合氯醛处死大鼠,解剖大鼠双侧腓肠肌,并用干净滤纸将腓肠肌表面的组织液吸去,用电子天平称重,按腓肠肌湿重比 = 手术侧腓肠肌湿重 / 正常侧腓肠肌湿重计算腓肠肌湿重比。

2.8 组织形态学观察 手术 8 周后分别在每组中随机选取 3 只大鼠为实验对象,处死,分离手术侧坐

骨神经,切下包括损伤部位在内的上下各 5 mm 的坐骨神经干,随即浸入 10% 甲醛中过夜固定,同法取正常侧相同部位的坐骨神经作为正常对照。经乙醇梯度脱水后,石蜡包埋,4 μm 切片,组织片在展片机 37 $^{\circ}\text{C}$ 水中展开后,贴附于黏性载玻片上再进行 HE 染色,显微镜下观察形态。

2.9 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件对相关实验数据进行统计学分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验比较组间均值差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 温敏凝胶处方的优化 每个试验组的凝胶分别制备 20 g,试验安排及结果见表 1。利用 Design-Expert 8.0.6 软件,以 A, B, C 对 T_{gel} 进行二元多项式回归,得回归方程 $T_{\text{gel}} = 34.53 - 6.86A + 4.75B + 1.15C + 0.82AB - 0.65AC - 0.70BC + 1.91A^2$ ($R^2 = 0.9908, P < 0.0001$),方差分析见表 2。利用 Design-Expert 8.0.6 软件所绘制的效应面曲线图见图 2。

表 1 神经生长因子温敏凝胶处方优选的星点试验分析

Table 1 Central composite test analysis of optimal formulation of NGF thermosensitive gel

No.	A P407/%	B P188/%	C PVP-K30/%	T_{gel} / $^{\circ}\text{C}$
1	14.64	3.00	0.20	-
2	16.00	1.00	0.10	36.05 \pm 0.05
3	16.00	1.00	0.30	42.70 \pm 0.30
4	16.00	5.00	0.10	46.95 \pm 0.35
5	16.00	5.00	0.30	47.50 \pm 0.20
6	18.00	0.36	0.20	-
7	18.00	3.00	0.03	-
8	18.00	3.00	0.20	34.53 \pm 0.27
9	18.00	3.00	0.20	34.53 \pm 0.27
10	18.00	3.00	0.20	34.63 \pm 0.17
11	18.00	3.00	0.20	34.43 \pm 0.39
12	18.00	3.00	0.20	34.83 \pm 0.41
13	18.00	3.00	0.20	34.23 \pm 0.37
14	18.00	3.00	0.37	-
15	18.00	6.36	0.20	-
16	20.00	1.00	0.10	23.65 \pm 0.35
17	20.00	1.00	0.30	24.38 \pm 0.08
18	20.00	5.00	0.10	34.53 \pm 0.07
19	20.00	5.00	0.30	35.78 \pm 0.08
20	21.36	3.00	0.20	-

表 2 回归方程的方差分析

Table 2 Variance analysis of regression equation

变异来源	SS	f	MS	F	P
模型	592.30	7	84.61	92.68	<0.0001
A	376.20	1	376.20	412.05	<0.0001
B	180.31	1	180.31	197.49	<0.0001
C	10.53	1	10.53	11.54	0.0146
AB	5.41	1	5.41	5.93	0.0508
AC	3.14	1	3.14	3.73	0.1016
BC	3.89	1	3.89	4.26	0.0845
A^2	12.54	1	12.54	13.74	0.0100
B^2	0	0			
C^2	0	0			
残差	5.48	6	0.91		
失拟项	5.48	1	5.48		
纯误差	0	5	0		
总差	597.78	13			

由图 2 可知, T_{gel} 随着 P407 用量的增大而降低,随着 P188 用量的增大而升高,而 PVP-K30 的用量则对胶凝温度没有显著影响,即 P407 的用量对胶凝温度的影响最大。依据注射剂的温度选择范围为 34 ~ 36 $^{\circ}\text{C}$, T_{gel} 以略低于这个温度范围为宜。故选择最佳处方为 P407-P188-(PVP-K30) (18% : 4% : 0.2%) 或 (18% : 5% : 0.2%),平行进行 3 次验证试验。将预测值与实测值进行比较,按偏差 = (预测值 - 实测值) / 预测值 \times 100% 计算偏差。结果平均 T_{gel} 分别为 (35.10 \pm 0.10), (35.20 \pm 0.21) $^{\circ}\text{C}$ 。结果表明该拟合模型较为可靠,根据处方用量最小原则,最优处方为 P407 18%,P188 4%,PVP-K30 0.2%。在最优处方下, T_{gel} 的预测值 35.0 $^{\circ}\text{C}$, T_{gel} 的实测值分别为 35.3,35.2,35.1 $^{\circ}\text{C}$,偏差极小。由于其余辅料对 T_{gel} 的影响可以忽略不计,所得最优处方为 P407 18%,P188 4%,PVP-K30 0.2%,氯化钠 0.9%,维生素 E 0.01%,尼泊金甲酯 0.1%。

3.2 温敏凝胶处方的质量评价 NGF 温敏凝胶的平均 pH 6.6,平均黏度 1 739 mPa \cdot s,平均胶凝时间 23 s。

3.3 大鼠坐骨神经损伤模型的造模情况观察 SFI 的测定结果显示,正常组的大鼠 SFI 约 -10,其余组别的大鼠 SFI 约 -100。正常组的大鼠步态无变化,无行动困难;而模型组,NGF 注射剂组,NGF 低剂量和高剂量温敏凝胶组均出现左下肢功能活动受限,左足踝部皮肤红肿,手术侧腿部肌肉萎缩,呈拖曳步态,针刺反应消失。

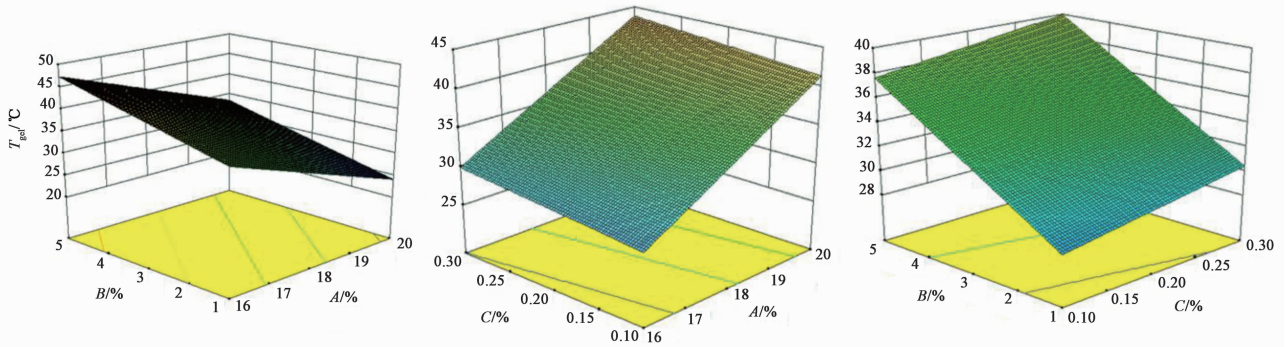


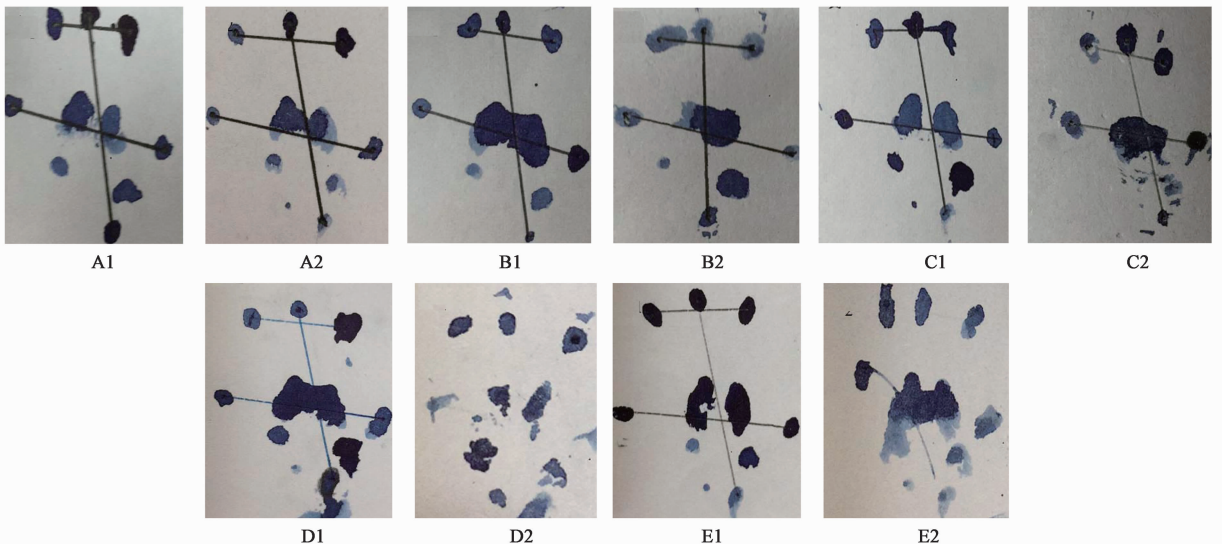
图 2 各考察因素对神经生长因子温敏凝胶胶凝温度影响的三维效应面

Fig. 2 Three-dimensional effect surface of influence of various factors on gelation temperature of NGF thermosensitive gel

3.4 大鼠行为学观察 术后 1~3 d, 模型组, NGF 注射剂组, NGF 低、高剂量温敏凝胶组大鼠的左后肢均有不同程度的足趾红肿、下垂、无法伸展等症状。手术 1 周后各组大鼠均呈现足背部着地的拖曳步态; 手术 2 周后各组大鼠行走时左后肢足底及膝关节可以着地, 呈足趾弯曲的跛行步态, 且各组无明显差异; 手术 4 周后 NGF 低、高剂量温敏凝胶组的大鼠行走步态基本正常, 活动灵活, NGF 注射剂组次之, 模型组最差; 手术 8 周后各组大鼠的步态几乎恢复正常, 且各组的大鼠均无死亡, 伤口无感染, 愈合良好。

3.5 SFI 的测定 手术前和手术 8 周后, 5 组大鼠

的足迹见图 3。计算不同时间点各组大鼠的 SFI 并进行统计学分析, 见图 4。手术前, 各组大鼠的 SFI 接近于 0, 说明各组大鼠的神经功能均正常。术后的 1 周到 8 周, 各组大鼠的 SFI 均增加。其中术后 1 周和 2 周内, 各组大鼠间 SFI 均无显著性差异; 术后的 4 周, 6 周及 8 周, NGF 高剂量温敏凝胶组大鼠的 SFI 较模型组及 NGF 注射剂组大, 且具有统计学意义 ($P < 0.05$), 同时, NGF 高剂量温敏凝胶组大鼠的 SFI 相比 NGF 低剂量温敏凝胶组大鼠的 SFI 大, 且具有显著性差异 ($P < 0.05$), 并且 NGF 高剂量温敏凝胶组大鼠的 SFI 增长最快。



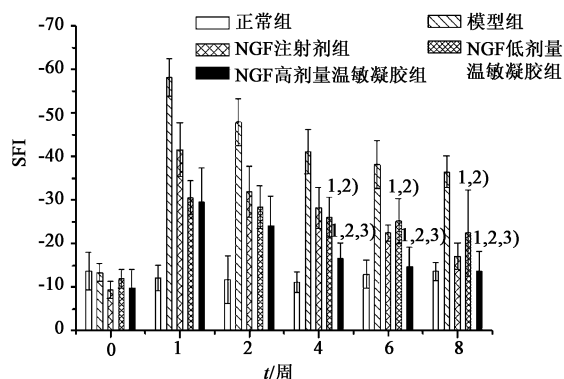
A. 正常组; B. 模型组; C. NGF 注射剂组; D. NGF 低剂量温敏凝胶组; E. NGF 高剂量温敏凝胶组 (图 5 同); 1. 损伤前; 2. 手术后 8 周

图 3 神经损伤前和手术后 8 周各组大鼠的足印

Fig. 3 Footprints of rats in each group before and after 8 weeks of nerve injury

3.6 撤回反射时间的测定 撤回反射时间是指大鼠的后足从接触热板到撤回热板的时间, 是反映运动神经对痛觉感知能力的指标。各组大鼠在不同时间的撤回反射时间见表 3。结果发现手术前大鼠的

撤回反射时间处于 7~11 s。手术后 1 周, 大鼠坐骨神经受到损伤, 模型组及各给药组大鼠的撤回反射时间均有不同程度的增大, 但各组别之间均无显著性差异。手术后 2 周, 4 周, 6 周及 8 周, 与模型组与



与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 NGF 注射剂组比较²⁾ $P < 0.05$; 与 NGF 低剂量温敏凝胶组比较³⁾ $P < 0.05$

图 4 各组大鼠不同时间点的坐骨神经功能指数 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Fig. 4 Sciatic nerve function index of rats in each group at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

表 3 各组大鼠在不同时间点的撤回反射时间 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Time of withdrawal reflex of rats in each group at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	t/周					
		0	1	2	4	6	8
正常	-	10.93 ± 1.05	8.32 ± 0.76	6.99 ± 0.46	8.85 ± 0.80	7.89 ± 0.86	6.01 ± 0.35
模型	-	10.07 ± 1.31	25.19 ± 1.96	23.87 ± 2.18	21.68 ± 2.54	14.86 ± 1.55	11.45 ± 1.25
NGF 注射剂	10	8.99 ± 1.29	22.89 ± 2.85	21.30 ± 2.34	15.39 ± 3.09	13.77 ± 1.45	10.50 ± 1.66
NGF 低剂量温敏凝胶	10	9.11 ± 1.26	23.61 ± 1.66	19.41 ± 4.22	14.76 ± 2.55	10.83 ± 1.44	8.64 ± 0.81
NGF 高剂量温敏凝胶	20	7.54 ± 0.72	20.22 ± 1.90	17.07 ± 1.41	12.01 ± 1.32	9.60 ± 1.75	8.09 ± 0.45

量温敏凝胶组的大鼠腓肠肌湿重比分别为 (56.94 ± 1.04)%, (75.22 ± 3.13)%, (83.75 ± 2.62)%, (89.82 ± 2.06)%。NGF 低剂量温敏凝胶组的大鼠腓肠肌萎缩程度比模型组和 NGF 注射剂组较轻, NGF 高剂量温敏凝胶组腓肠肌湿重比最大。

3.8 再生神经的 HE 染色 手术 8 周后取出大鼠的坐骨神经进行 HE 染色, 见图 5。除正常组之外, 模型组和 NGF 注射剂组的神经纤维排列比较稀疏, 神经纤维的连续性差, 并且具有可见的变形性神经纤维碎片; 而 NGF 低剂量温敏凝胶组的神经纤维排列较模型组及 NGF 注射剂组密集, 并且连续性也较好; NGF 高剂量温敏凝胶组的神经纤维排列较其他组别整齐、密集, 且连续性也较好, 其形态也最接近正常组。

4 讨论

温度敏感型原位凝胶作为智能化载体材料, 用于局部注射给药时, 应确保温敏凝胶在体外是可注射使用的液体, 并在给药部位能形成半固体凝胶态, 因此合适的 T_{gel} 至关重要。本实验选择 T_{gel} 作为考察指标对方剂进行优化。P407 是国内外研究较为

NGF 注射剂组相比, NGF 低、高剂量温敏凝胶组大鼠的撤回反射时间降低; 且 NGF 高剂量温敏凝胶组的撤回反射时间低于 NGF 低剂量温敏凝胶组的撤回反射时间; 但 NGF 注射剂组与模型组相比则无显著性差异。

3.7 腓肠肌湿重比的测定 坐骨神经受损后, 腓肠肌与其支配的神经失去营养联系, 腓肠肌的肌肉萎缩, 随着神经的修复, 萎缩的肌肉能够得到恢复, 正常组的大鼠的腓肠肌湿重比大约为 1, 因此腓肠肌的湿重比大体上可以反应坐骨神经的恢复情况。在术后的第 8 周, 处死大鼠, 分别测定了各组大鼠的腓肠肌湿重比, 结果发现 5 组大鼠的腓肠肌均有不同程度的萎缩, 模型组, NGF 注射剂组, NGF 低、高剂

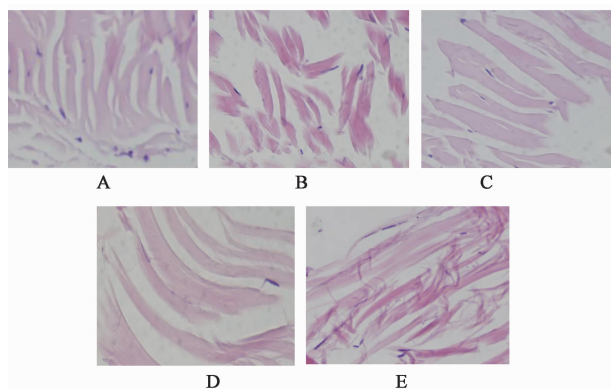


图 5 神经生长因子温敏凝胶对大鼠坐骨神经损伤的影响 (HE, × 400)

Fig. 5 Effect of NGF thermosensitive gel on sciatic nerve injury of rats (HE, × 400)

深入的温敏性材料, 具有毒性低、生物相容性良好等特点, 从而被广泛应用。单用 P407 时, T_{gel} 较低, 常用 P188 进行调节。同时, 为增加凝胶的生物黏附性和滞留时间, 常加入 PVP-K30 等高分子材料。本研究发现适量 PVP-K30 可以增加药物的黏附性, 从而延长药物的滞留时间, 提高药物吸收量。但温敏凝胶的黏度将决定其是否被顺利注射, 所以温敏凝胶在室温条件下的黏度不宜过大, 否则难以注射使用。

因此,本实验通过处方优化,加入 0.2% PVP-K30 作为黏度调节剂,所制得神经生长因子温敏凝胶的 $T_{gel} = 35.2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 室温(25 $^{\circ}\text{C}$)条件下黏度小,便于注射,而在生理条件下可以快速形成半固体凝胶。本实验所制备的神经生长因子温敏凝胶具有明显的缓释作用,有利于延长药物的作用时间,提高药物的疗效,降低不良反应,但其注入体内的降解时间和生物相容性还有待进一步研究。

周围神经损伤后,轴突再生的数目与质量决定了神经功能的恢复情况。神经生长因子具有促进施旺细胞增殖和存活,抑制其凋亡,促进神经损伤后轴突再生和髓鞘化,并参与神经元的保护、损伤后突触的重构以及抑制神经肌肉萎缩等作用,即神经生长因子既能有效促进神经损伤的修复与生长,又能保证再生神经纤维的功能。本实验通过探讨神经生长因子温敏凝胶对周围神经损伤的治疗作用,为其可能研制成治疗周围神经损伤的新药奠定基础。

大鼠坐骨神经钳夹损伤模型被广泛用于周围神经再生与修复的实验研究,操作简单易行、损伤程度易把握、重复性好、个体差异小、恢复快,建模后数天即可进行神经行为学指数测定。SFI 是评价坐骨神经损伤后神经再生与功能恢复的可靠指标。通过对大鼠的足迹分析发现,各测定时间点模型组的大鼠 SFI 及 SFI 恢复率较正常组低,说明钳夹的方式能有效损伤坐骨神经;而 NGF 低、高剂量温敏凝胶组大鼠的 SFI 和 SFI 恢复率有明显的提升。由撤回反射时间测定实验和腓肠肌湿重比测定实验结果可知,NGF 低、高剂量温敏凝胶组大鼠神经损伤的恢复效果均显著高于模型组和 NGF 注射剂组。神经轴突的结构和数目是其功能的基础,一般而言,成熟度高的纤维镜下可见排列规则、致密,髓鞘较厚且完整;而成熟度低的神经纤维则直径较细,髓鞘较薄或缺失,排列紊乱。本实验发现,NGF 对大鼠坐骨神经钳夹损伤的结构恢复具有一定的促进作用。综上所述,NGF 对坐骨神经损伤大鼠的神经行为功能恢复以及神经再生具有促进作用,为 NGF 用于治疗周围神经损伤提供了药效学依据。

[参考文献]

[1] Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later [J]. Science, 1987, 237(4819): 1154-1162.
[2] 赵广翔,丁旭东,黄威,等. 神经生长因子预处理对神经损伤大鼠脊髓髓鞘反应的影响[J]. 中国医科大

学学报, 2016, 45(9): 783-786, 792.

[3] 李明明, 李林林, 季晓燕. 神经生长因子治疗周围神经损伤的疗效观察[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2015, 18(4): 24-26.
[4] Tucker K L, Meyer M, Barde Y A. Neurotrophins are required for nerve growth during development [J]. Nat Neurosci, 2001, 4(1): 29-37.
[5] 徐莉. 神经生长因子的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(1): 131-134.
[6] 陈庆真, 施明祥, 刘盛飞, 等. 鼠神经生长因子不同给药方式修复周围神经损伤[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(33): 5356-5360.
[7] Cattaneo A, Calissano P. Nerve growth factor and Alzheimer's disease: new facts for an old hypothesis [J]. Mol Neurobiol, 2012, 46(3): 588-604.
[8] Lambiase A, Sacchetti M, Bonini S. Nerve growth factor therapy for corneal disease [J]. Curr Opin Ophthalmol, 2012, 23(4): 296-302.
[9] Bronzetti E, Artico M, Lo V V, et al. Expression of neurotransmitters and neurotrophins in human adenoid tissue [J]. Int J Mol Med, 2005, 15(6): 921-928.
[10] 张贝贝. 可注射 aFGF/磺化壳寡糖温敏水凝胶的制备及药效学研究[D]. 广州: 暨南大学, 2016.
[11] 梁浩明, 龙晓英, 卢彬. 黄芩苷外用温敏凝胶的处方设计及优化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 34-38.
[12] 项佳音, 熊欣, 陈燕军. 可注射参麦温度敏感型原位凝胶的制剂学评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 60-64.
[13] 王锐, 殷悦, 曲炳楠, 等. 蛇床子素微囊-温敏凝胶的制备与质量分析研究[J]. 中国药学杂志, 2017, 52(12): 1044-1048.
[14] 黄嘉元, 曾优美, 杨佩佩, 等. 马来酸噻吗洛尔眼用温敏凝胶的处方筛选与体外释放评价[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(24): 2196-2200.
[15] 张越, 瞿叶清, 陈军, 等. 阿魏酸脂质体的体外释放度考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(19): 1-5.
[16] 张蕾, 芮永军, 王骏. 足迹分析法评定超短波促进大鼠坐骨神经损伤后功能恢复的研究[J]. 交通医学, 2007, 21(5): 485-486.
[17] 王维, 苑秀华, 王中莉, 等. 坐骨神经损伤模型大鼠神经传导速度及损伤运动神经元内生长相关蛋白 43 表达与磁刺激干预[J]. 中国组织工程研究, 2011, 15(46): 8617-8620.

[责任编辑 刘德文]