

·基础研究·

搭载鹿茸多肽的 PLGA 纤维对肌腱组织的修复重建作用

徐效义^{1,3} 路来金² 王克利² 李征² 陈学思¹ 景遐斌^{1,4}

摘要 目的:探讨载有鹿茸多肽(VAP)的乙交酯与丙交酯共聚物(PLGA)纤维对吻合后鸡趾鞘管区屈肌腱愈合和防粘连的效果。**方法:**健康来亨鸡48只,雌雄各半,随机分成4组,每组12只。将家鸡左足趾浅屈肌腱切除,趾深屈肌腱横断,改良Kessler法缝合,A组为对照;肌腱吻合后不进行处理;B、C和D组分别在吻合处包裹PLGA纤维、低剂量(质量比为0.3%)VAP/PLGA和高剂量(质量比为1.5%)VAP/PLGA纤维。术后2、3、4周取材,分别进行大体观察,组织学检查,生物力学实验。**结果:**A组粘连严重,其余各组肌腱粘连程度无明显差异,C、D组肌腱断裂张力增强,与A、B组比较差异有显著性意义($P<0.05$)。**结论:**VAP/PLGA纤维能减轻肌腱术后粘连、促进肌腱愈合,是理想的生物降解组织修复重建材料。

关键词 乙交酯与丙交酯共聚物 PLGA 纤维;鹿茸多肽;肌腱;粘连;生物降解材料

中图分类号:R493,R687 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-09-0796-03

Effect of VAP/PLGA fibers on tendon repair and reconstruction/XU Xiaoyi, LU Laijin, WANG Keli, et al.// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(9): 796-798

Abstract Objective: To investigate the effect of poly (lactide-co-glycolid) (PLGA) fibers containing Velvet Antler Peptide (VAP) on tendon repair and reconstruction. **Method:** Forty-eight Leghorn chickens were divided into four groups randomly, 12 in each group. The chickens of group A were served as blank controls, group B were used PLGA fibers, group C and group D were used low (0.3%, w/w) and high (1.5%, w/w) dose VAP/PLGA fibers, respectively. The superficial and profundus flexor tendon of the second, third and fourth toes were cut and sutured with a single 6-0 nylon stitch by modified Kessler technique, and were not wrapped (Group A) or wrapped with PLGA fibers(Group B), low dose(Group C) and high dose(Group D) VAP/PLGA fibers, respectively. The specimens were evaluated by microscope, transmission electron microscope and mechanical tensile measurements. **Result:** The specimens in group A showed more serious adhesions than others groups. Tendons in group C and D had bigger strain than those in group A and group B. **Conclusion:** As biodegradable materials, VAP/PLGA fibers could prevent tendon adhesion and promote tissue repair and reconstruction.

Author's address State Key Laboratory of Polymer Physics and Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, 130022

Key words poly(lactide-co-glycolid) fibers; Velvet antler peptide; tendon; adhesion; biodegradable materials

肌腱组织修复、愈合较慢,并且极易发生粘连,是影响疗效的主要因素。如果治疗不当,可导致患者运动功能障碍,甚至丧失劳动能力,因此,提高肌腱修复重建速度、加速组织再生、防止瘢痕形成、促进功能恢复,是目前亟待解决的重要课题。为此,我们探讨生物降解材料作为隔离屏障和药物缓释载体在肌腱组织康复中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

L-丙交酯(LA)与乙交酯(GA)购自荷兰 Purac 公司,以 0.05%辛酸亚锡为催化剂,开环共聚制成 PLGA[poly(lactide-co-glycolid)]纤维, LA/GA 共聚比例为 80/20, 分子量为 9 万。鹿茸多肽(Velvet antler peptide, VAP)纯度 90%,由吉林天然药物有

限公司提供。

1.2 VAP/PLGA 纤维的制备

采用静电纺丝方法,在 15kV 电压下制备载有 VAP 的 PLGA 纤维,针头与收集屏间距为 25cm,得到厚度为 50mm 的白色 VAP/PLGA 纤维,VAP 浓度分别为 0.3%和 1.5%,真空干燥 48h,除去残余有机溶剂。消毒,低温保存备用。

1.3 VAP 释放

称取 100mg 纤维,加入 10ml PBS(0.02 mol/L,

1 中国科学院长春应用化学研究所 高分子物理与化学国家重点实验室,长春,130022

2 吉林大学第一医院 手足外科

3 中国科学院研究生院

4 通讯作者:景遐斌(中国科学院长春应用化学研究所 高分子物理与化学国家重点实验室,长春,130022)

作者简介:徐效义,男,博士,助理研究员

收稿日期:2006-06-05

pH=7.4), 置于 37℃ 振荡培养箱, 每分钟振荡 90 次, 定期取出释放液, 补充等量 PBS, 每组设 3 个平行样品, 应用紫外-可见光谱仪(岛津 UV-2401PC), 在波长 260nm 分析 VAP 吸光度(A 值), 取平均值, 通过已知标准曲线, 计算 VAP 累积释放量(mg)。

1.4 SDS-PAGE 电泳

参照文献[1], 用蛋白电泳分析 VAP 制备纤维前后分子量有无变化。

1.5 家鸡肌腱修复实验

健康来亨鸡 48 只, 雌雄各半, 体重在 2.0—2.5kg, 长春高新医学实验动物研究中心提供。随机分成 4 组, 每组 12 只。2.5% 戊巴比妥钠注射液, 以 40mg/kg 剂量做肌肉注射麻醉, 切开左足二、三、四趾鞘管, 切除趾浅屈肌腱, 横断趾深屈肌腱, 断端用 6-0 丝线行改良 Kessler 法缝合, 右足为健康对照。A 组(假手术组): 肌腱横断后不进行处理; B 组(空白对照组): PLGA 纤维包绕吻合口; C 组(低剂量 VAP/PLGA 组): 0.3% VAP/PLGA 纤维包绕吻合口; D 组(高剂量 VAP/PLGA 组): 1.5% VAP/PLGA 纤维包绕吻合口。然后以 6-0 丝线缝合固定, 缝合鞘管和皮肤, 术后无菌包扎, 石膏固定跖趾及趾间关节于屈曲位。术后定期取 3 只实验鸡, 进行大体、组织学、透射电镜观察和生物力学测定。

1.6 统计学分析

实验测得的数据采用 SPSS 11.5 统计软件对组内计数资料方差分析, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 VAP 释放

低浓度(质量比为 0.3%)和高浓度(质量比为 1.5%)VAP 释放曲线结果见图 1。低浓度 VAP 前 7 天释放速度较快, 累积释放剂量超过 0.5mg, 此后释放量缓慢增加, 6 周时, 释放量为 0.8mg(B); 在释放过程的前 4 周, 高浓度 VAP 累积释放量持续增加, 4 周时, 释放剂量为 2.8mg, 此后, 累积释放量增加幅

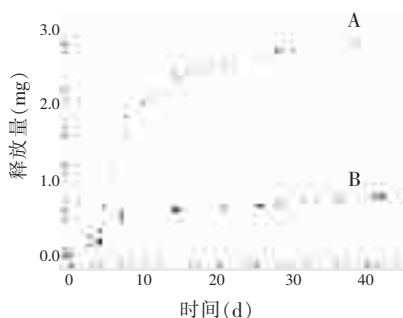


图 1 载有不同剂量鹿茸多肽的 PLGA 纤维在体外 PBS 缓冲液中释放曲线
鹿茸多肽质量百分比分别为 1.5%(A)和 0.3%(B)

度减缓(A)。6 周时, 低浓度和高浓度 VAP 累积释放百分率达到 70%—80%。

2.2 SDS-PAGE 电泳

为探讨纺丝制备载药纤维过程中, 是否改变多肽类药物分子量, 用蛋白电泳评价 VAP 原药与释放后浓缩品分子量变化。结果显示 PLGA 担载的 VAP 释放后电泳凝胶上只有一条泳带, 与原药分子量比较无差异, 说明纺丝过程对 VAP 分子量没有影响。

2.3 肌腱修复实验大体观察

分别在术后 2, 3, 4 周将鸡处死后拆除石膏及绷带, 切开实验趾肌腱表层的皮肤, 暴露肌腱, 肉眼观察各组肌腱吻合口处均未断裂, C 组和 D 组吻合口处肌腱色泽正常, 2 周时取材, B, C, D 组均可见聚合物纤维, 鞘管与肌腱间有间隙存在。A 组鞘管与肌腱粘连, 需要进行锐性剥离才能够分开。A 组和 B 组可见吻合口处组织水肿, 色泽灰暗, C 组和 D 组吻合口处肌腱色泽正常, 各组吻合口处均膨大; 3 周时 B, C, D 组肉眼可见纤维碎片, 鞘管与肌腱间有空隙, A 组鞘管与肌腱粘连较明显, 二者间无间隙存在, 影响肌腱滑动, 各组吻合口处明显膨大; 4 周时仍有少量纤维残留, 粘连较为疏松, 肌腱滑动度较大, C, D 组膨大减小, 肌腱外形恢复正常, A 组粘连紧密, 尤其肌腱吻合处与周围组织粘连较重, 肌腱滑动明显受阻, 吻合口部呈梭形膨大。

2.4 肌腱抗拉伸测试

分别于术后 1, 2, 3, 4 周, 在 SLW-10 型万能生物力学实验机上进行屈肌腱拉伸检测, 直至肌腱断裂, 测定其最大断裂负荷, 断裂负荷越大, 说明肌腱抗拉伸功能越强。本实验条件下测得鸡的正常 FDP 断裂张力为 131.8±19.8N, 各组实验鸡的结果见图 2。随着术后时间的增加, 断裂张力增大, C, D 组断裂张力高于 A 组和 B 组, 说明肌腱抗拉伸功能得到恢复; 随着 VAP 剂量加大, 断裂张力提高, 但是, 仍然低于正常值。

2.5 肌腱粘连测定

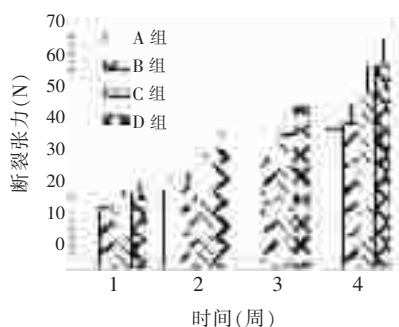


图 2 各组肌腱在不同修复时间最大断裂负荷
A 组为假手术组, B 组为 PLGA 纤维组, C 组为低剂量鹿茸多肽组(质量比为 0.3%), D 组为高剂量鹿茸多肽组(质量比为 1.5%)

用 SLW-10 型生物力学万能试验机, 以 10mm/min 速度拉伸, 测定将趾深屈肌腱牵拉出鞘管所需最大负荷, 表征肌腱粘连情况。所需的拉力越大, 说明粘连越重(图 3)。由于实验动物术后无法进行功能锻炼, 随着术后时间的增加, 患趾较健趾粘连程度增加, 表现为两者比值(患/健)增大。但是各组比较可见 D 组肌腱粘连最轻, B 组次之, A 组粘连最重。

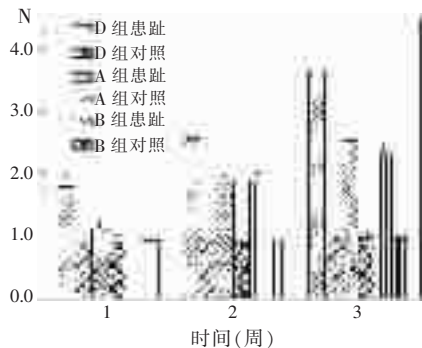


图 3 各组肌腱在不同修复时间粘连情况

A 组为假手术组, B 组为 PLGA 纤维组, D 组为高剂量鹿茸多肽组(鹿茸多肽质量百分比为 1.5%)

2.6 组织学观察

自肌腱吻合口处取直径 0.5cm 肌腱组织块, 常规脱水包埋, HE 染色, 切成 50 μ m 厚的切片, 光镜下观察组织学变化。术后 2 周 C 组和 D 组开始肌腱内膜增殖, 腱外膜增厚并连接吻合口两端, 3 周后肌腱内膜明显增厚并劈裂腱束, 肌腱内外膜细胞梭形变, 与之相连的胶原纤维增多并与腱长轴平行排列, 通过吻合口。4 周后发现吻合口内有腱细胞丰富的肌腱组织形成, 纤维排列整齐, 与肌腱轴方向一致。术后 2 周 B 组肌腱外膜增厚, 肌腱断端部分纤维碎裂, 吻合口处与腱轴方向垂直的毛细血管及纤维母细胞侵入, 增厚肌腱外膜桥接吻合口两端。3 周吻合口部纤维方向紊乱, 肌腱内膜出现增殖现象。4 周呈涡流样排列纤维母细胞和胶原纤维通过吻合口。

2.7 透射电镜观察

术后 2 周, C 组和 D 组增殖的腱内、外膜细胞内可见丰富的含有核糖体的粗面内质网, 细胞表面有胶原纤维合成分泌。3 周细胞周围新生胶原纤维聚集成束, 纤维束间的成纤维细胞与正常腱细胞结构相同。术后 2 周 B 组肌腱内膜细胞变性, 细胞内有大量空泡, 腱内膜内出现吞噬细胞。3 周肌腱内膜细胞增殖, 细胞内可见大量游离核糖体和发达的粗面内质网, 细胞表面和细胞间的新生胶原纤维合成。

3 讨论

近年来, 众多学者尝试应用生物材料作为防止组织粘连的隔离介质和引导组织再生的中空管道,

再生室桥接两断端, 以利受损组织再生^[2-5]。远、近侧断端被固定于管的两端, 神经和肌腱组织的再生即可通过管腔来进行。作为桥接缺损组织的天然或人工合成的管状物, 应具备如下特点: ①通过正常的生理途径能被完全降解吸收, 以免组织在修复后受到压迫和影响物质交换; ②吸收速度和组织再生的速度相符; ③诱导和促进轴突生长, 且无毒性, 无抗原性和无致肿瘤性; ④良好的物理性能, 在神经和肌腱生长时提供支持, 避免压迫神经和肌腱; ⑤良好的通透性, 利于物质交换, 又能防止瘢痕组织长入; ⑥易于加工制成适合不同缺损组织要求的形状和长度。

影响神经和肌腱再生的生物活性物质包括: 神经生长因子, 成纤维细胞生长因子, 类胰岛素样生长因子, 转化生长因子 β 1 和抗凋亡基因 bcl-2 等。其他外源性促进再生因素包括: 电刺激、高压氧、免疫抑制剂。VAP 是从鹿茸中提取的活性多肽, 由 68 个氨基酸组成, 分子量 7200 Dal, 外观呈微黄白色粉末, 溶于水。鹿茸里含有丰富的蛋白质、氨基酸, 其中氨基酸含量高达 50.13%, 种类达 17 种以上, 富含磷脂、胆固醇、多胺类、硫酸软骨素 A、雌酮、神经鞘磷脂、神经节苷脂、雌二醇、IGF、前列腺素 PGE1、PGE2、PGF1a、PGF1、神经酰胺及钙、磷、镁等 20 种元素。鹿茸的药理作用广泛: 能促进 RNA 和蛋白质合成, 提高免疫功能, 明显促进创伤面愈合^[6-7]。

基于以上资料, 采用静电纺丝方法制备担载 VAP 的 PLGA 纤维, 作为生物降解的组织引导管和防粘连隔离材料, 用于肌腱组织修复。肌腱横断实验结果表明, PLGA 纤维在 4 周时, 大部分被降解吸收。VAP/PLGA 纤维具有隔离、屏障作用, 防止或减轻肌腱与周围组织粘连; 同时, 通过缓慢释放 VAP 的药理作用直接渗透到损伤局部发挥药效, 促进肌腱愈合。因此, VAP/PLGA 纤维可以应用于肌腱、神经等多种组织引导再生重建, 作用更直接、有效。

参考文献

- [1] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.1715—1716.
- [2] 费起礼, 俞跃庭. 聚乳酸薄膜预防肌腱粘连的研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 1992, 6: 65—67.
- [3] 甘志华, 景退斌, 张忠文, 等. 生物降解聚合物膜的制备及防肌腱粘连作用[J]. 应用化学, 1997, 14(2): 84—86.
- [4] 张仲文, 徐萃香, 周莉. 聚己内酯/聚乳酸薄膜防治肌腱粘连的实验研究[J]. 中华骨科杂志, 1998, 18 (11): 692—694.
- [5] 陈建华, 姜保国, 傅中国, 等. 屈肌腱损伤后愈合早期粘连功耗变化的实验研究[J]. 中华外科杂志, 2005, 43(8): 206—208.
- [6] 周秋丽, 王丽娟. 鹿茸多肽对实验性骨折的治疗作用及机制研究[J]. 白求恩医科大学学报, 1999, 5: 586—588.
- [7] 翁梁, 周秋丽, 王丽娟. 鹿茸多肽促进表皮和成纤维细胞增殖及皮肤创伤愈合[J]. 药学报, 2001, 36(11): 817—820.