



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103127494 A

(43) 申请公布日 2013.06.05

(21) 申请号 201310077323.6

A61K 31/375(2006.01)

(22) 申请日 2013.03.11

(71) 申请人 上海神因生物科技有限公司

地址 200032 上海市徐汇区肇家浜路 446 弄  
2 号楼 1001H

(72) 发明人 朱剑虹 朱炯明 高华嵩

(74) 专利代理机构 上海开祺知识产权代理有限公司 31114

代理人 费开逵

(51) Int. Cl.

A61K 38/55(2006.01)

A61K 47/42(2006.01)

A61P 25/00(2006.01)

A61K 38/19(2006.01)

A61K 38/18(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

一种神经再生生物胶及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明公开了一种神经再生生物胶及其制备方法和用途,所述的神经再生生物胶由纤维蛋白素原、NaCl 和凝血酵素及 12 种神经营养因子组成;所述的纤维蛋白素原、凝血酵素和 NaCl 构成基础支持基质。经体外细胞试验和动物试验验证,本发明的生物胶能够促进神经元的再生和髓内延伸,增加受损与正常的神经突触联系。该生物胶中的多种神经营养因子对神经元的再生和延伸、突触联系的建立、血管的形成具有重要作用,能进一步用于临床修复脊髓神经损伤,治疗脊髓损伤患者,并逐步应用于其它中枢神经系统疾病,如脑组织损伤及视神经损伤等。

1. 一种神经再生生物胶,其特征在于,由纤维蛋白素原,0.8% (w/v) NaCl 和凝血酵素以及 12 种神经营养因子组成;其中纤维蛋白素原的浓度为 5 ~ 40mg/ml,凝血酵素浓度为 2.5 ~ 25u/ml;所述的纤维蛋白素原、凝血酵素和 NaCl 构成基础支持基质。

2. 根据权利要求 1 所述的神经再生生物胶,其特征在于,所述的 12 种神经营养因子及其终浓度分别如下表所示:

序号	名称	终浓度
1	脑源性神经营养因子 BDNF	10 ~ 100ug/ml
2	睫状神经营养因子 CNTF	5 ~ 20ug/ml
3	神经营养素-3NT-3	10 ~ 100ug/ml
4	血小板衍生生长因子 PDGF-AA	5 ~ 20ug/ml
5	胰岛素样生长因子-1IGF-1	5 ~ 20ug/ml
6	表皮生长因子 EGF	5 ~ 20ug/ml
7	酸性成纤维细胞生长因子 FGF1	5 ~ 20ug/ml
8	碱性成纤维细胞生长因子 FGF2	5 ~ 20ug/ml
9	胶质细胞源神经营养因子 GDNF	5 ~ 20ug/ml
10	Shh sonic hedgehog	5 ~ 20ug/ml
11	钙蛋白酶抑制剂 MDL28170	10 ~ 100uM
12	维生素 C Vitamin-C	5 ~ 10ug/ml。

3. 权利要求 1 所述的神经再生生物胶的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

以纤维蛋白素原为主体,计量加入含 NaCl 的去离子水中,并依次加入 12 种神经生长因子,配制成溶液,最后加入凝血酵素,即制得神经再生生物胶。

4. 权利要求 1 所述的神经再生生物胶在制备促进神经元生长、阻滞神经元生长抑制因子、神经保护、维持细胞活力以致恢复神经元的传导功能制剂中的应用。

5. 权利要求 1 所述的神经再生生物胶在制备治疗脊髓损伤后神经修复药物中的应用。

## 一种神经再生生物胶及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明属生物组织工程和医用材料领域,涉及一种神经再生生物胶及其制备方法和用途,具体涉及一种含有多种神经营养因子的神经再生生物胶及其制备方法和在脊髓损伤后神经修复治疗中的应用。

### 背景技术

[0002] 中枢神经损伤如严重的脊髓创伤主要表现为截瘫和四肢瘫,研究显示,受损伤脊髓自身神经元之间尚不能在全横断处形成突触来修复神经传导通路,迄今临床尚未有有效的治疗方法。有研究报道在脊髓损伤处髓内移植成体干细胞、诱导性多潜能干细胞和胚胎干细胞等方式在脊髓损伤处形成新的神经元,由此建立突触联系,可以起到桥接及功能中继的功能,使其恢复神经传导的功能。上述移植通常需要考虑以下因素:损伤的严重程度,移植时间窗,移植细胞来源及诱导阶段,营养、支持基质及辅助治疗等。为了实现这种试验性治疗目标,研究者需首先选择合适干细胞的神经营养生长基质,然后在其基础上构建具有神经传导功能的人工神经网络,用于桥接脊髓损伤处,从而起到修复损伤处的神经通路中继站作用。

[0003] 目前临床上主要选用的神经营养生长基质主要有:1)天然生物来源材料包括明胶、胶原等,能在一定程度上促进脊髓结构和功能的恢复,但因为天然材料支架本身结构的无序性和机械性能差,移植到体内起导向轴突再生作用效果差;2)普通凝胶,能够在脊髓损伤空洞处起填充作用,促进轴突再生,减少星形胶质细胞增生形成的疤痕,但不能较好的介导再生轴突穿越损伤区域,尤其缺乏机械强度,且不能提供神经再生所需的各种基础物质;3)生物组织工程材料中的可降解高分子材料,其最大优点是生物相容性好,降解产物易于吸收而不产生炎症反应,但是用于体内神经损伤修复实验时,降解后会产生酸性物质,且在置入过程中容易造成新的损伤等,因此移植干细胞在分化及与未损伤处神经元突触联系的建立效果不理想。

[0004] 纤维蛋白素原(fibrinogen)及凝血酵素(thrombin)具有良好的生物组织相容性,无毒、无刺激性,在生物医用领域得到了日益广泛的应用。有研究将二者混合于适当的溶液之中,形成可用于神经修复的生物胶,但所述生物胶受制于以下因素:纤维蛋白含有的多个细胞群黏附位点对于神经再生非常重要,生物胶中纤维蛋白素原、凝血酵素的含量,NaCl 的浓度,影响基质的孔隙率及孔径等均会影响再生神经元的生长及延伸。

[0005] 研究表明,在发育中或成年的 CNS (central nervoussystem,中枢神经系统)内植入胚胎神经组织,通过其中的神经干细胞或分裂后的年幼神经元替换病伤死亡神经元,并重建神经通路及其功能。胚胎或新生动物的 NSCs (neural stem cells,神经干细胞)数量较多,且组织免疫原性较低,用于移植后不易被宿主排斥。有研究报道从动物胚胎的神经组织中分离出具有多潜能的 NSCs,并成功将其移植至脊髓损伤、脑组织及视神经损伤处,观察到它们能在宿主内存活、迁移并分化为神经元;但在这种条件下,移植的 NSCs 多数分化为神经胶质细胞,仅少数分化为神经元,且分化的神经元向髓外生长不能在髓内实现长距

离延伸及与受体神经元的突触联系,其原因与脊髓损伤后的神经元再生及髓内延伸的局部微环境有关。

### 发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种神经再生生物胶及其制备方法和用途,具体是提供一种含有多种神经营养因子的神经再生生物胶及其制备方法和在脊髓损伤后神经修复治疗中的应用。本发明的生物胶克服了现有临床治疗脊髓损伤中的不足,为脊髓损伤后的神经元再生及髓内延伸提供最佳的局部微环境,更好地促进受损脊髓神经通路及其功能的修复,进一步治疗脊髓创伤性疾病。

[0007] 为了达到以上目的,本发明采用以下技术方案来实现。

[0008] 所述的神经再生生物胶,由纤维蛋白素原(fibrinogen)、NaCl、凝血酵素(thrombin)及多种神经营养因子组成;其中所述的纤维蛋白素原、NaCl 和凝血酵素构成基础支持基质。

[0009] 具体而言,本发明所述的神经再生生物胶,由纤维蛋白素原,0.8% (w/v)NaCl 和凝血酵素以及 12 种神经营养因子组成;其中纤维蛋白素原的浓度为 5 ~ 40mg/ml,凝血酵素浓度为 2.5 ~ 25u/ml。

[0010] 所述的 12 种神经营养因子及其终浓度如下表 1 所示。

[0011] 表 1

[0012]

序号	名称	终浓度
1	脑源性神经营养因子(BDNF)	10 ~ 100ug/ml
2	睫状神经营养因子(CNTF)	5 ~ 20ug/ml
3	神经营养素-3 (NT-3)	10 ~ 100ug/ml
4	血小板衍生生长因子(PDGF-AA)	5 ~ 20ug/ml
5	胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)	5 ~ 20ug/ml
6	表皮生长因子(EGF)	5 ~ 20ug/ml
7	酸性成纤维细胞生长因子(FGF1)	5 ~ 20ug/ml
8	碱性成纤维细胞生长因子(FGF2)	5 ~ 20ug/ml
9	胶质细胞源神经营养因子(GDNF)	5 ~ 20ug/ml
10	Shh (sonic hedgehog)	5 ~ 20ug/ml
11	钙蛋白酶抑制剂(MDL28170)	10 ~ 100uM

12	维生素 C (Vitamin-C)	5 ~ 10ug/ml
----	-------------------	-------------

[0013] 所述的神经再生生物胶采用以下方法制备而成：以纤维蛋白素原为主体，计量加入含 NaCl 的去离子水中，并依次加入如上表 1 所示的各种神经生长因子，配成溶液，最后加入凝血酵素，即形成本发明的神经再生生物胶。

[0014] 体外细胞实验表明，本发明的神经再生生物胶一方面能够提供细胞生长所需的支持基质，使干细胞能够有效的于其中进行生长分化，并提供利于细胞间建立联系的空间基础。另一方面，各种细胞因子还能够有效的促进神经干细胞的增殖，促进细胞间联系的增加。能够为神经元的再生和分化提供基础支持的合适微环境，并具有促进神经元生长、阻滞神经元生长抑制因子、神经保护、维持细胞活力以致恢复神经元的传导功能的作用，最终可以促进 NSCs 的增殖分化，帮助神经元的损伤修复，达到神经功能的恢复的目的。

[0015] 进一步，将获取的 NSCs 悬浮于本发明的神经再生生物胶中，进行动物脊髓损伤治疗试验，通过采用本发明的该含有多种神经营养因子的导向性网络样生物胶促进受损伤的脊髓神经通路修复试验，结果显示，单纯生物胶注射治疗组，术后运动评分较注射 PBS 组高，术后免疫荧光染色提示神经元再生情况良好，广泛突触联系建立，结合 NSCs 移植组脊髓标本免疫荧光染色结果提示神经干细胞分化增殖良好，超越损伤区域向未损伤节段生长，无明显髓外生长，未致瘤。临近未损伤阶段的神经元向损伤部位生长。由此说明：本发明的含有多种神经营养因子的神经再生生物胶能够促进受损神经元的再生，为移植神经干细胞的分化及生长提供良好的基础生长基质，促进了分化的神经元的增殖以及在髓内的延伸，并与受体的神经元建立了广泛的突触联系，并促进了实验动物的功能恢复。

[0016] 另外，在单独使用本发明的生物胶治疗脊髓损伤动物试验中，结果还显示本发明的生物胶能够促进移植神经元的内源性再生和髓内延伸，增加受损与正常神经突触联系，建立与未受损神经元的突触联系，从而形成一种具有功能的人工神经网络支架。

[0017] 上述试验结果表明：本发明的神经再生生物胶中的多种神经营养因子对神经元的再生和延伸、突触联系的建立、血管的形成具有重要作用，能进一步用于临床修复脊髓神经损伤，治疗脊髓损伤患者，并逐步应用于其它中枢神经系统疾病，如脑组织损伤及视神经损伤等。

#### 附图说明

[0018] 图 1 为实施例 1 中神经干细胞细胞在 ABCD 四组不同试验组中的生长情况。

[0019] 图 2 为实施例 2 中各组 BBB 评分结果。

[0020] 图 3 为轴突再生情况。

#### 具体实施方式

[0021] 以下结合具体实施例进一步详细描述本发明的技术方案，但所述实施例不限制本发明的保护范围。最后应当说明的是，以下实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的精神和范围，其均应涵盖在本发明的权利要求范围内。

[0022] 本发明以下实施例中所用试剂如无特殊说明,均由生物试剂公司购得。

[0023] 实施例 1 低浓度的神经再生生物胶的制备

[0024] 去离子水加入 NaCl 配置成 0.8% (w/v) 的 NaCl 溶液 10ml, 滤头过滤, 纤维蛋白素原 50mg 溶解于其中, 依次加入下表 2 所示的各神经营养因子, 最后再加入凝血酵素 25u, 即制得本发明的神经再生生物胶, 其中纤维蛋白原的终浓度为 5mg/ml, 凝血酵素终浓度为 2.5u/ml。该生物胶配置后约 2 小时形成, 粘稠度低、机械强度略低, 适于体外细胞培养。

[0025] 表 2

[0026]

序号	名称	终浓度
1	脑源性神经营养因子 BDNF	10ug/ml
2	睫状神经营养因子 CNTF	5ug/ml
3	神经营养素 -3NT-3	10ug/ml
4	血小板衍生生长因子 PDGF-AA	5ug/ml
5	胰岛素样生长因子 -1IGF-1	5ug/ml
6	表皮生长因子 EGF	5ug/ml
7	酸性成纤维细胞生长因子 FGF1	5ug/ml
8	碱性成纤维细胞生长因子 FGF2	5ug/ml
9	胶质细胞源神经营养因子 GDNF	5ug/ml
10	Shh sonic hedgehog	5ug/ml
11	钙蛋白酶抑制剂 MDL28170	10uM
12	维生素 C Vitamin-C	5ug/ml

[0027] 实施例 2 高浓度的神经再生生物胶的制备

[0028] 去离子水加入 NaCl 配置成 0.8%(w/v) 的 NaCl 溶液 10ml, 滤头过滤, 纤维蛋白素原 400mg 溶解于其中, 依次加入下表 3 所示各神经营养因子, 最后再加入凝血酵素 250u, 即得本发明的神经再生生物胶, 其中纤维蛋白原的终浓度为 40mg/ml, 凝血酵素终浓度为 25u/ml。该生物胶配置后约 15 分钟形成, 粘稠度高, 机械强度较高, 孔隙率较大, 较易固定于注射部位, 适于活体(动物 / 人类) 脊髓损伤部位的注射。

[0029] 表 3

[0030]

序号	名称	终浓度
----	----	-----

1	脑源性神经营养因子 BDNF	100ug/ml
2	睫状神经营养因子 CNTF	20ug/ml
3	神经营养素-3 NT-3	100ug/ml
4	血小板衍生生长因子 PDGF-AA	20ug/ml
5	胰岛素样生长因子-1 IGF-1	20ug/ml
6	表皮生长因子 EGF	20ug/ml
7	酸性成纤维细胞生长因子 FGF1	20ug/ml
8	碱性成纤维细胞生长因子 FGF2	20ug/ml
9	胶质细胞源神经营养因子 GDNF	20ug/ml
10	Shh sonic hedgehog	20ug/ml
11	钙蛋白酶抑制剂 MDL28170	100uM
12	维生素 C Vitamin-C	10ug/ml

[0031]

[0032] 实施例 3 体外细胞试验

[0033] 1、神经干细胞的制备及培养

[0034] 选用 14-16 天 SD 孕鼠,用 10% 水合氯醛按 0.32ml/100g 体重腹腔麻醉后处死。常规消毒、开腹、取出胎鼠,并置于 4℃ PBS 液中。无菌条件下,取出胎脑后,剥除颅骨及脑膜,解剖显微镜下仔细分离出皮层组织和海马组织。剪碎组织,木瓜蛋白酶和 DNase 消化,吹打,过滤,成单细胞,然后接种在包被有 Laminin 的培养板中培养,培养基为 DMEM/F12,添加细胞因子 B27、EGF、bFGF、LI 进行培养。此后每 5-7 天机械分离克隆传代一次,根据细胞生长速度和培养液的 pH 变化,3-5 天半量换液。连续传代 4 次以上,直至去除所有死细胞、细胞碎片和不规则细胞团块,形成规则的神经球。进行克隆分析,取神经球用 EDTA 和机械消化法至大部分呈单细胞悬液。

[0035] 2、实验分组

[0036] 待神经干细胞情况稳定后,将其传代后以相同数量级约  $10^5$  个加入以下四种不同的培养基中进行培养。

[0037] A 组:培养基:DMEM/F12,添加细胞因子 B27、EGF、bFGF。向 DMEM/F12 培养液 97ml 中加入 EGF2mg、FGF22mg、N2supplement1ml 和 B27supplement2ml、L- 谷氨酰胺 0.4mmol,配成 100ml 神经干细胞培养液。

[0038] B 组:去离子水加入 NaCl 配置成 0.8% (w/v) 的 NaCl 溶液,滤头过滤,纤维蛋白原 5mg/ml 溶解于其中,再加入凝血酶素 2.5u/ml。将上述液体 1ml 加入培养皿中,并加入常

规 A 组所述培养基。

[0039] C 组:培养皿中加入 A 组所述培养基,并加入以下所述浓度配比的神经营养因子:BDNF10ug/ml, CNTF5ug/ml, NT-310ug/ml, PDGF-AA5ug/ml, IGF-15ug/ml, EGF5ug/ml, FGF15ug/ml, FGF25ug/ml, GDNF5ug/ml, Shh5ug/ml, MDL2817010uM, Vitamin-C5ug/ml。

[0040] D 组:去离子水加入 NaCl 配置成 0.8% (w/v) 的 NaCl 溶液,滤头过滤,纤维蛋白素原溶解于其中,终浓度 5mg/ml。并依次加入以下各种神经营养因子,其中 BDNF10ug/ml, CNTF5ug/ml, NT-310ug/ml, PDGF-AA5ug/ml, IGF-15ug/ml, EGF5ug/ml, FGF15ug/ml, FGF25ug/ml, GDNF5ug/ml, Shh5ug/ml, MDL2817010uM, Vitamin-C5ug/ml,最后再加入凝血酶素 2.5u/ml,配成溶液。将上述溶液 1ml (或实施例 1 所制的生物胶)加入培养皿中,并加入常规 A 组所述培养基。

[0041] 3、荧光染色

[0042] 培养 5 天后,将上述 4 个试验组分别通过 GFP 免疫细胞荧光染色,研究不同培养基中神经干细胞的增殖分化情况并进一步鉴定培养细胞的神经干细胞特性。

[0043] 3.1 NSCs 培养

[0044] 取胎龄为 14-16 天的孕 SD 大鼠海马和脑皮质细胞经悬浮培养 3-5 天后,有部分细胞聚集成团,形成神经球,即为原代神经球克隆。随时间延长,细胞不断进行分裂,神经球逐渐变大,神经球结构更为致密。少数较大的 NSCs 成孤立状,呈单个的细胞形态,形态规则而且折光性强,高倍镜下观察细胞无突起,细胞细胞核较大并且饱满。于细胞培养 7-10 天时,显微镜下观察可见大量的神经球存在,直径大小不等,呈圆形或椭圆形,较大的神经球粗测直径可达 120-150um。在神经生长因子和培养添加剂的作用下,原代神经球形成率在 40-50%。在无血清非分化培养条件下,NSCs 很快就可以贴附在培养瓶上,失去球体的形态,并伸出伪足样细胞突起。继续培养 1 周时就有许多神经细胞从神经球向外迁徙,并分化为带有许多突起的神经元样或星形胶质细胞样的细胞。细胞生长至 7 天左右时,培养瓶中有大量的神经球形成,此时可以进行 NSCs 的传代培养。采用 1:2 的传代方法,将原代神经球吹打成单个细胞的悬液再进行培养。传代后约 5-7 天又有约 40% 的神经球形成,传代后神经球与原代形成的神经球形态大致相同,神经球的生长情况与原代神经球一样,一般 5-7 天可传代一次。将细胞悬浮于上述 ABCD 四种不同培养基中进行培养。

[0045] 3.2 试验结果

[0046] 培养结果如图 1 所示,四种培养基中 NSCs 皆增殖良好,部分聚集成神经球样生长。B 组较 A 组无明显区别, C 组及 D 组细胞生长情况较 A 组、B 组好,细胞分布更为均匀,细胞之间联系更为广泛及密切,其中 D 组尤为明显。相同的 NSCs 于不同培养基中进行培养,随着支持基质的出现及优选的神经营养因子的增加,NSCs 的增殖及空间分布情况得到改善,细胞间的联系增加。由此说明,本发明的含有多种神经营养因子的神经再生生物胶,一方面不但可以提供细胞生长所需的支持基质,使干细胞能够有效的在其中进行生长分化,并提供利于细胞间建立联系的空间基础;另一方面,各种细胞因子还能够有效的促进神经干细胞的增殖,促进细胞间联系的增加。

[0047] 实施例 4 动物试验

[0048] 1、NSCs 制备及培养

[0049] 如实施例 3 所述方法获得生长情况稳定的 NSCs,消化、离心后,37℃恒温水浴中备



用。

#### [0050] 2、制作纤维蛋白基质

[0051] 去离子水加入NaCl配置成0.8%(w/v)的NaCl溶液,滤头过滤,纤维蛋白素原40mg/ml溶解于其中,并依次加入表3所述的各种神经营养因子,配成溶液,其中BDNF100ug/ml, CNTF20ug/ml, NT-3100ug/ml, PDGF-AA100ug/ml, IGF-120ug/ml, EGF20ug/ml, FGF120ug/ml, FGF220ug/ml, GDNF20ug/ml, Shh20ug/ml, MDL28170100uM, Vitamin-C10ug/ml, 37℃恒温水浴中备用。凝血酶素25u/ml于注射前加入溶液中,37℃恒温静置15min可完成聚合,即得本发明的神经再生生物胶(或直接使用实施例2制备的高浓度神经再生生物胶)。

#### [0052] 3、大鼠脊髓横断模型的制作

[0053] 3.1 实验动物:成年雄性健康SD大鼠,体重200-250g。

[0054] 3.2 手术器械:显微手术剪、镊子、手术刀、血管钳、缝线等和解剖显微镜。

[0055] 3.3 主要试剂:PBS, 10%水合氯醛,无水乙醇。

[0056] 3.4 操作过程:10%水合氯醛以0.32ml/100g体重腹腔麻醉,固定于操作架,常规消毒,背部脱毛剂脱毛,先定位T12,位于大鼠背部最下端的肋骨缘横对处,然后向上依次定位T8-10;手术刀片分离背部的肌肉,暴露棘突和椎旁的肌肉,然后顺次剥离椎旁的肌肉,暴露T8-10段的棘突和椎板;显露T8-10的椎间隙,剪除T9椎板及其上下的关节突,暴露脊髓,显微剪剪断一侧脊髓。根据分组情况予以注射相关试剂。止血后,逐层缝合,腹腔注射庆大霉素2000单位进行抗菌治疗。注意术后护理,术后七天内给予膀胱按摩,帮助排尿。

#### [0057] 4、实验分组

[0058] 将48只SD大鼠T9节段做脊髓半横断模型,平均分为四组,A组为单纯损伤组,注射PBS液10u1;B组为损伤后单纯移植神经干细胞组,PBS液10u1,含有细胞数量约 $10^5$ 个;C组为损伤后单纯注射上述步骤2制得的本发明的神经再生生物胶组(或实施例2制得的生物胶),量约10u1;D组为移植悬浮于上述步骤2制得的本发明的神经再生生物胶(或实施例2制得的生物胶)的神经干细胞组。

[0059] 将上述四组分别注射至损伤处,量约10u1,其中含有细胞数量约 $10^5$ 个。术后严密观察大鼠情况,并进行适当的护理,每周进行BBB运动评分(Basso-Beattie-Bresnahan scores),于术后第6周、第7周、第8周,分三批处死大鼠,取脊髓标本行Nestin、GFAP等免疫荧光染色后,于荧光显微镜及电镜下观察神经元的再生及延伸情况,结果参看图2。术后B、C、D组大鼠肢体活动评分较对空白对照组高,其中D组恢复情况最佳,部分评分可达8分以上。术后标本显微镜观察提示D组移植神经干细胞分化增殖良好,髓内超越损伤区域向上下未损伤节段生长,实现了较长距离的生长。图3为轴突再生情况,可以看出:A组无明显轴突,D组轴突再生情况较其它组明显,且延伸距离长,最长约8mm,并与正常神经元建立广泛突触联系,无明显髓外生长,未致瘤;临近未损伤阶段的神经元向损伤部位生长。B组亦有神经干细胞分化增殖,但明显少于D组,且细胞分布情况不均匀,部分向髓外生长。A组有少量散在神经元再生穿越损伤区域,C组神经元再生情况较A组明显,并部分与未损伤神经元建立了突触联系。

[0060] 上述试验结果表明:本发明的含有多种神经营养因子的神经再生生物胶能够促进受损神经元的再生,为移植神经干细胞的分化及生长提供良好的空间导向性基础生长基质,使干细胞在基质内实现髓内定向生长,促进了分化的神经元的增殖以及在髓内的延伸,

并与受体的神经元建立了广泛的突触联系,并促进了实验动物的功能恢复。单独使用本发明的生物胶治疗脊髓损伤实验动物,能促进神经元的内源性再生和髓内延伸,增加受损与正常的神经突触联系,建立与未受损神经元的突触联系,从而形成一种具有功能的人工神经网络支架。

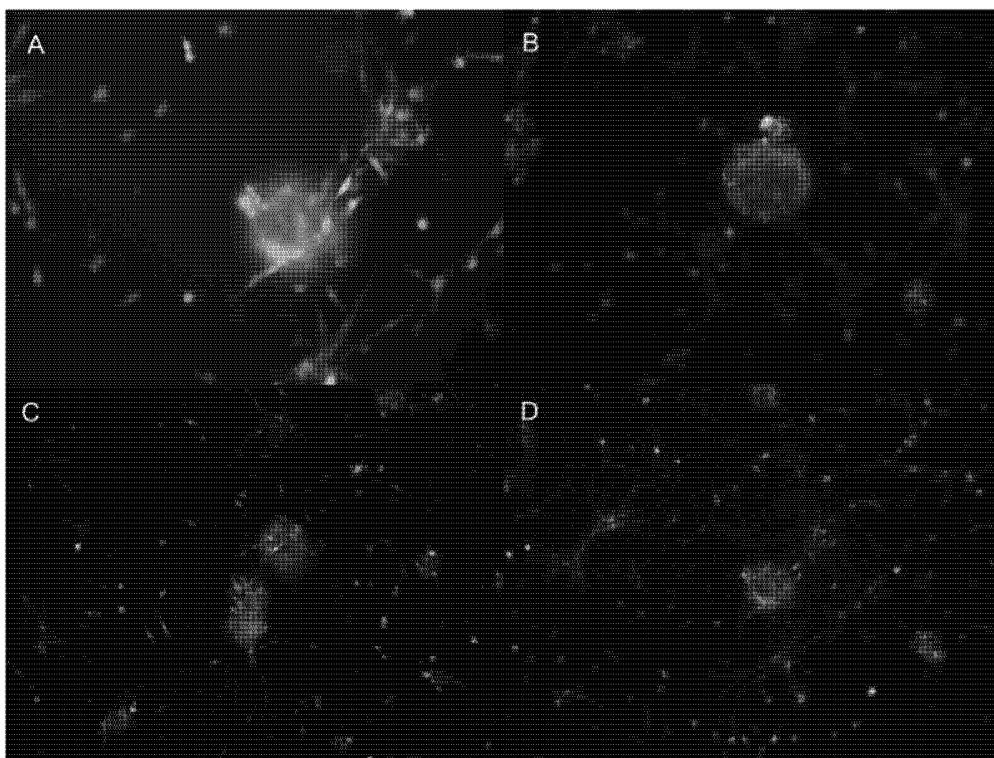


图 1

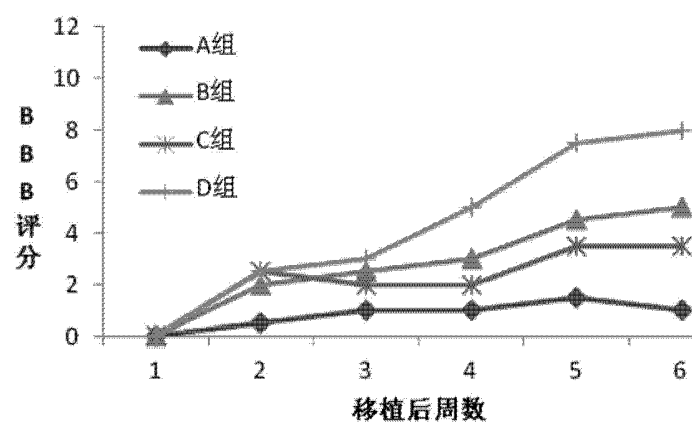


图 2

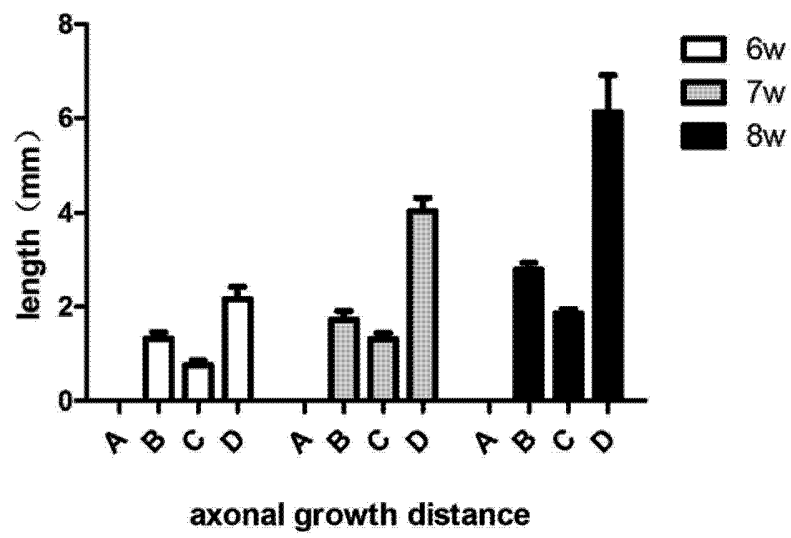


图 3