

# 中南大学湘雅医学院



## 医学科学研究与设计作业

题目：重组人促红细胞生成素(rh—EPO)促进周围神经缺损修复的研究

班级：临床医学(八)1004班

姓名：吴接蕾

学号：2204100424

电话：14789853869

邮箱：wujielei0224@163.com

2013年11月

# 重组人促红细胞生成素

## (rh—EP0) 促进周围神经缺损修复的研究

### ● 研究三要素

研究对象：SPF级雌性SD大鼠

研究因素：促红细胞生成素（erythropoietin, EP0）

研究指标：神经功能指数(评估神经电生理以及动作电位传导速度)、组织学结构(Loyes染色和免疫组织化学染色)

### ● 立项依据

#### 1. 国内外研究现状及分析

周围神经缺损临床上十分常见，其致残率高。每年全球范围内新增加的创伤患者中，合并神经损伤的约占1.5%—4.5%。根据最新数据，我国每年新增约65万—90万周围神经损伤病例。因此，如何恢复损伤周围神经的连续性和功能成为迫切需要解决的难题。目前治疗神经断裂伴有神经缺损的金标准是自体神经移植替代<sup>[1]</sup>。但依然存在供体缺乏以及供体神经支配区功能障碍等缺陷，因此自体神经的替代载体成为研究的热点。

随着生物组织工程研究的快速发展，甲壳素导管作为神经替代载体的重要作用日益被认识和接受。甲壳素是一种高分子生物材料<sup>[2]</sup>，是构成生物细胞外基质的主要成分，又称为几丁质，其基本组成单位是乙酰氨基葡萄糖，属于多糖类物质，在自然界中广泛存在。几丁质脱酰胺50%以上时就降解成壳聚糖<sup>[3]</sup>。壳聚糖及其衍生物对人体无毒无刺激无免疫原性，且具有良好的生物组织相容性以及可降解性，在人体内最终被降解为氨基葡萄糖而被吸收，可以作为组织工程神经的理想替代材料，已经在国内外生物医学的各个领域得到广泛应用<sup>[4]</sup>。几丁质以及其衍生物可以明显促进周围神经修复。首先，它能够促进神经生长，抑制成纤维细胞增生，能有效预防神经瘤的形成，避免周围组织

与再生神经粘连，为神经再生提供支架并且具有细胞依附的作用；其次，它还能够促进内皮细胞再生，并促进新生毛细血管的生成和再通，为再生神经轴突提供营养支持<sup>[5]</sup> Rosales-

Cortes等<sup>[6]</sup>研究表明：甲壳素作为自体神经替代材料在神经修复过程中对机体无毒无刺激无免疫原性无溶血反应，因此几丁质导管用于神经缺损不会引起严重的机体排斥反应。

促红细胞生成素（erythropoietin, EPO）作为一种造血生长因子，于1948年由Bonsdor 和JaIsvisto首先发现，它能促进红系细胞的增生、分化，促进红细胞系祖细胞的成熟。1983年Lin 等成功分离并克隆了人EPO，它定位于7号染色体长臂22区。1985年利用基因重组技术生产出重组人红细胞生成素（recombinant human erythropoietin, rHuEPO），并广泛应用于临床治疗各种原因所致的贫血，取得了很好的效果。1994年Masuda等首先在体外培养的鼠胚胎脑细胞中发现了细胞自身分泌的EPO。近年来的研究发现，EPO及EPOR在脑、脊髓及周围神经系统中都有广泛表达，如神经元、神经胶质细胞、血管内皮细胞、海马细胞、脊髓和Schwann细胞等。有实验证明，EPO和它的受体在脑缺血、缺氧和贫血时表达上调，暗示它有内源性神经保护作用<sup>[7]</sup>。最新研究研究发现周围神经损伤后，促红细胞生成素受体在Schwann细胞内表达增加<sup>[8]</sup>；在坐骨神经损伤动物模型中使用rh—EPO后观察发现损伤处Schwann细胞的数量较对照组明显增加，并且研究发现EPO能刺激雪旺Schwann氏细胞的体外增殖<sup>[9]</sup>，因此猜测其能促进周围神经缺损结构和功能的恢复。

## 2. 研究意义

本实验旨在以坐骨神经缺损模型大鼠为材料，以甲壳素导管为载体，将研究重组人促红细胞生成素（rh—EPO）混入聚乳酸—聚乙醇酸（PLGA）中，制成实验试剂微球，可以确保其在局部长期发挥稳定药效作用，以研究rh—EPO修复周围神经的作用。探讨甲壳素和rh—EPO对周围神经修复作用机制，为治疗周围神经损伤与缺损提供科学的依据。

### 3. 参考文献

- [1] 李平生, 林国叶, 何向阳, 等. 周围神经损伤的修复治疗 [J]. 中国骨伤杂志, 2005, (11): 32. 34.
- [2] 陈国奋, 顾立强. FKS06加速周围神经损伤修复后的功能叨. 中华手外科杂志 [J]. 2002, 18(2): 113 • 115.
- [3] 谢峰, 李青峰, 等. 神经导管修复周围神经损伤的临床应用 [J]. 整形再造外科杂志, 2004, 1(3): 144—146.
- [4] Watchmaker GP, Mackinnon SE. Advance in peripheral nerve repair[J]. Clin Plastic Surg, 1997, 24(1): 63—73.
- [5] Moon LD, Asher RA, Rhodes KE, et al. Relationship between sprouting axons, proteoglycans and glial cells following unilateral nigrostriatal axotomy in the adult rat [J]. Neuroscience, 2002, 109(1): 101-117.
- [6] 姜保国, 吉田泰二. 周围神经小间隙动脉桥接后的组织学观察 [J]. 中华手外科杂志, 1998, 14(1): 50-52.
- [7] Juul S. Erythropoietin in the central nervous system, and its use to prevent hypoxic-ischemic brain damage, Acta Paediatr, 2002, 438: 36-42.
- [8] 叶晓生, 张世民. 周围神经趋化性再生及临床应用研究进展 [J]. 国际骨科杂志, 2009, 30(5): 278-283.
- [9] Sakurai M, Abe K Hayashi T, et al. Adenovirus-mediated glial cell line-derived neurotrophic factor gene delivery reduces motor neuron injury after transient spinal cord ischemia in rabbits [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000, 120(6): 1 148—1 157.

### ●项目的研究内容、研究目标, 以及拟解决的关键科学问题

#### 1. 研究内容

- ①参照已有研究成果, 运用文献方法制备大鼠双侧坐骨神经缺损模型 (1cm缺损) 以及可吸收甲壳素神经再生室

- ②遵循对照原则，对各组进行相应处理，实验组注入rh-EPO  
PLGA微球20 μ L；对照组注入PLGA微球20 μ L；空白组注入生理盐水20 μ L。
- ③分别对术后大鼠进行神经功能指数(评估神经电生理以及动作电位传导速度)  
、组织学结构(Loyes染色和免疫组织化学染色)分析

2. 研究目标

- ①对实验中所得数据进行分析，探究rh—  
EPO对周围神经损伤的修复作用，为临床治疗周围神经损伤提供一个新思路
- ②探究周围神经损伤的修复的作用机制

3. 拟解决的关键问题

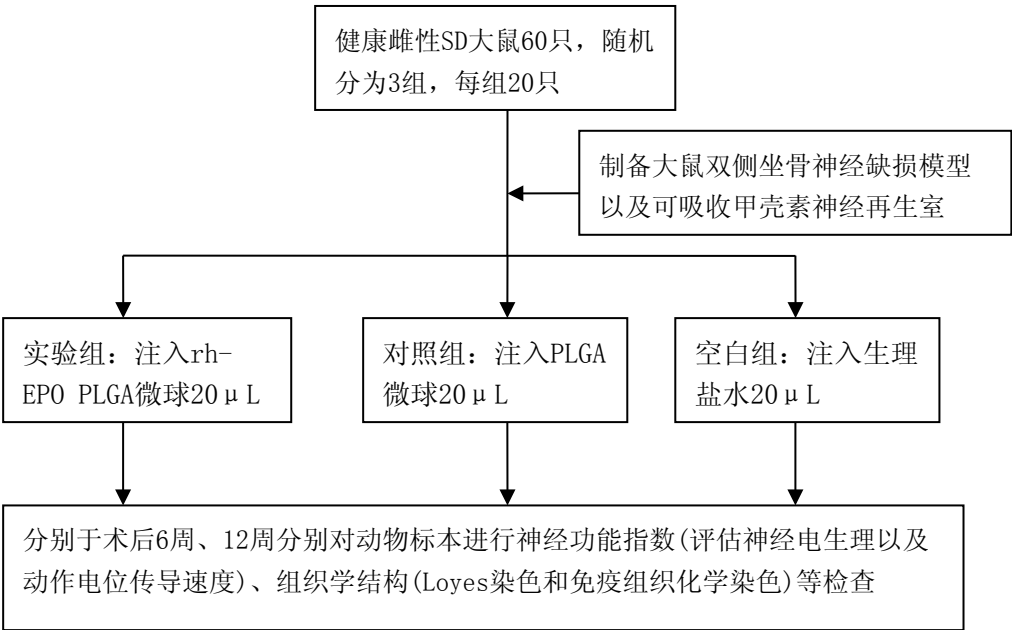
EPO对周围神经损伤的修复机理尚未阐明，是本次实验探究的关键所在。

●拟采取的研究方案及可行性分析

1. 拟采取的技术方法

本实验拟采用显微手术、神经电生理检测、Loyes氏神经标本染色、S-  
100免疫组织化学染色等主要实验技术。

2. 技术路线



### 3. 研究方案

#### 3.1 实验材料制备

##### 3.1.1 甲壳素神经导管的制备

将适量甲壳素粉溶解于含7%氯化锂(LiCl)的二甲基乙酰胺(ME2NAC)混合液中,配制成浓度为3.5%的甲壳素胶状物。用直径2mm的玻璃棒均匀沾取甲壳素胶状物,立即放入含有纯丙酮的容器中固定成形,脱出玻璃棒后即得壁厚约0.3~0.5mm的甲壳素导管。统一将甲壳素导管制备成长约12mm的规格,于蒸馏水中漂洗48h后,密封浸泡于75%酒精中备用。

##### 3.1.2 rh-EP0 PLGA微球的制备

室温下将1ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>加入到实验用聚乳酸-聚乙醇酸(PLGA) (50: 50) 150ml中,搅拌至充分溶解,形成油相。称取NaCl 20mg和聚乙烯醇10mg,并加入双蒸水至2ml,水浴至50℃-70℃,常温条件下冷却制成浓度为5%的聚乙烯醇溶液,将其加入到油相中,高速搅拌至形成初乳。再加入8ml浓度为5%聚乙烯醇溶液,室温下充分搅拌至CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>完全挥发,离心机分离,并用无菌三蒸水离心洗涤3次。常规4℃冰箱保存。微量注射器加入rh-EP0制备成rh-EP0 PLGA微球备用。

#### 3.2 实验方法

##### 3.2.1 实验动物分组

60只健康雌性SD大鼠随机分为3组,每组20只。A组为实验组。B组为对照组, C组为空白组。

##### 3.2.2 动物模型制作

根据分组取SPF级健康雌性SD大鼠,称重后,按400mg / kg的剂量给予10%的水合氯醛,行腹腔内注射麻醉。固定后沿双侧股骨向臀部行外侧切口,长约2cm。钝性分离出坐骨神经至胫腓分叉处,充分显露坐骨神经,在梨状肌下缘近端7mm处向远端造成约1cm神经缺损。显微镜下用9 / 0无创缝合线吻合神经断端于制备好的甲壳素两端,导管内各套入约1mm,中间留约1cm间隙,形成神经再生室。实验组再生室内微量注射器注入rh-EP0 PLGA微球20 μ L; 对照组再生室内注入PLGA微球20 μ L; 空白组再生室内注入生

理盐水20 μL。局部置入少许青霉素预防感染。3 / 0丝线逐层关闭切口。术后禁食8小时后，分笼饲养。

### 3.3 术后标本检测

#### 3.3.1 神经电生理检测

术后每组于6周和12周分别随机选取10只大鼠，按400mg / kg的剂量给予10%的麻醉后，放大10倍手术显微镜下显露双侧坐骨神经。用生物信号采集系(AS B240U)检测大鼠再生神经传导速度。方法如下：

2枚刺激电极(双极保护电极)分别置于再生神经组织的近心侧和远心端，其间保留大约1cm的间距，并进行两次有效的电刺激。2枚记录电极以45度角斜向插入胫前肌或腓肠肌肌腹中部。电刺激以弱电流连续单刺激的方式进行，以能引出动作电位为准，刺激频率为1HZ，记录并描记出动作电位的波形。根据测得的刺激电极间的距离和两次刺激的潜伏期，推算出运动神经的传导速度(NCV)。计算公式为：神经的传导速度(NCV)=冲动传导距离(L) / 两次冲动传导潜伏期的差值(t1—t2)。

#### 3.3.2 Loyes氏染色(特殊染色)：

术后6周和12周的神经组织标本行Loyes氏法染色。采用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统对特殊染色结果作图像分析。

#### 3.3.3 s—100免疫组织化学染色

术后6周和12周的神经组织标本行S-100免疫组织化学法染色。Image-Pro Plus 6.0图像分析系统对S-100免疫组织化学染色结果作图像分析。

## 4. 可行性分析

- ①实验所用的动物为SPF级雌性SD大鼠，材料便宜，较易获得。
- ②实验操作较为简单，实验处理也不复杂。
- ③实验过程中的各项指标检查的仪器和药物也是能广泛获得的。

## 5. 特色与创新性分析

本实验想法的创新点在于，我们综合我们的猜想和已有的科研成果，在明确了EPO对中枢神经系统的保护、营养和再生的作用下，提出探究EPO对周围神经系统修复可能具有的作用。本实验联合应用组织工程学技术、外科技术和神

经营养因子，以甲壳素导管为载体应用rh—

EP0修复周围神经，这是以往所少有的。同时本实验通过甲壳素导管联合rh—

EP0对大鼠坐骨神经缺损及其作用的研究为临床应用其治疗周围神经损伤提供依据，也为临床治疗周围神经损伤提供一个新思路。

## ●年度研究计划及预期研究结果

### 1. 年度研究计划

①2014年2月，完成坐骨神经损伤大鼠模型的建立，进行实验处理后，分组饲养。  
。

②2014年4月，处理后6周，首次对大鼠进行神经功能指数(评估神经电生理以及动作电位传导速度)、组织学结构(Loyes染色和免疫组织化学染色)等检查。

③2014年6月，处理后12周，再次对大鼠进行神经功能指数(评估神经电生理以及动作电位传导速度)、组织学结构(Loyes染色和免疫组织化学染色)等检查。

④2014年6月，完成实验并整理实验数据进行分析。

### 2. 实验预期结果

①6周后甲壳素导管内有新生组织生产，甲壳素导管未完全吸收，可见新生毛细血管；12周后可见甲壳素导管被大部分吸收，还可见大量毛细血管。

②实验组再生神经的传导速度和显微数量均优于对照组和空白组。对照组和空白组的再生神经传导速度和纤维数量差别无统计学意义。