

## · 论著 ·

# 静电纺丝 PLGA 纳米纤维支架修复猪胆管损伤

毛静芳 李 佳 许蓉蓉 余泽前 杨 扬 周家华

**【摘要】** 目的 观察不同质量比聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)胆总管支架在体外胆汁中降解情况,实验探索可降解支架修复胆道损伤的可行性。方法 用扫描电镜观察不同质量比的 PLGA 纳米纤维膜微观形貌,并测定其短期体外胆汁中降解率。观察其在胆总管 I 期缝合、胆总管切开置入支架和胆管缺损修补手术中的作用。术后观察动物黄疸和胆漏情况和动物自身术前和术后肝酶(ALT、AST、ALP)和血胆红素的变化。进行 Masson 染色和平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、增殖细胞核抗原(PCNA)免疫组化观察肝脏及胆管损伤部位组织病理学改变。结果 PLGA 75/25 和 90/10 两种比例的纤维在胆汁中没有发生明显的降解和变形。胆管缺损修补手术的猪胶原增生程度轻,排列相对有序, $\alpha$ -SMA 免疫组化评分最低,PCNA 免疫组化示胆管缺损区域有新生胆管上皮细胞形成。结论可降解静电纺丝 PLGA 纳米纤维支架能有效支撑和修复胆管缺损。

**【关键词】** 胆管损伤;静电纺丝纳米纤维;聚乳酸;羟基乙酸

**【中图分类号】** R364 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-3685(2012)23-2787-04

**Repair of injured pig bile duct with electrospun PLGA nanofibers scaffolds** MAO Jingfang, LI Jia, XU Rongrong, et al. Department of Surgical Teaching and Research, Nantong Health College of Jiangsu Union Institute, Nantong 226007, CHINA

**【Abstract】 Objective** To study the degradation of common bile duct stent composed of different mass ratios of polylactic acid to glycolic acid(PLGA) in bile in vitro, and to assess the feasibility of intraluminal stent repairing bile duct defect. **Methods** The microstructure of the different mass ratios of PLGA nanofiber membranes was observed with scanning electron microscope, and the degradation rate of nanofiber membranes in bile in a short time was measured. Incidence of jaundice and bile leakage was evaluated and liver enzymes (ALT, AST, ALP) and serum bilirubin were compared before and after repair. Pathomorphologic changes of the anastomoses were observed by HE & Masson staining,  $\alpha$ -SMA, and PCNA immunohistochemistry. **Results** There were no obvious distortion and biodegradation of nanofibers in bile seen with the PLGA ratios of 75 to 25 and 90 to 10. The porcine collagen hyperplasia of bile duct after repair was less with the arrangement being relatively in order. Its  $\alpha$ -SMA positive expression score was lower and PCNA immunohistochemistry showed neo-bile duct epithelial cells proliferation. **Conclusion** Electrospun PLGA nanofibers scaffolds can be used to repair bile duct defect and effectively support bile duct.

**【Key words】** Bile duct injury; Electrospun nanofibers; Polylactic acid; Glycolic acid

[Jiangsu Med J, December 2012, 38(23):2787-2790.]

对于胆道损伤缺损过多的患者,寻找能维护胆管功能的修复材料重建胆管是治疗的最有效手段。无论自体材料还是人工材料替代胆道缺损,动物实验均证实了胆管断端可以出现新生胆管生长,取代或者覆盖移植物,填补缺损、保持胆道的生理连续性<sup>[1,2]</sup>。本研究以生物相容性良好、生物可降解性

的聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)为原料,通过静电纺丝法制备 PLGA 纳米纤维管状支架。评价可降解支架在胆管损伤胆管修复中的作用。

## 材料与amp;方法

### 一、材料

PLGA(济南岱罡生物科技有限公司);实验用小型猪,体重在 20-25 kg,雌雄不限,由南京军区总医院动物实验中心提供和饲养;Hitachi S-3000N 扫描电子显微镜(SEM,日本日立公司)。

基金项目:江苏省卫生厅医学基金项目(H200815)

作者单位:226007 江苏联合职业技术学院南通卫生分院外科教研室(毛静芳);东南大学附属中大医院普通外科(李 佳、许蓉蓉、余泽前、杨 扬、周家华)

通讯作者:周家华 E-mail:zhoujiahua@hotmail.com

## 二、方法

1. PLGA 纳米纤维的制备 将配置好的 PLGA 溶液抽入到配有 12 号不锈钢针头的 5 ml 玻璃注射器中,将针头尖端磨平作为喷针,针尖到收集装置的距离调整为 20 cm。针尖接高压电源正极,接收装置接高压电源负极,喷射电压为 15 kV,溶液流速为 0.5 ml/h。所制备的 PLGA 纳米纤维膜连同铝箔一起放在 70℃ 真空干燥箱中,干燥 2 h。

2. PLGA 纳米纤维的体外降解实验 将三种质量比的 PLGA [聚乳酸 (PLA)/聚羟基乙酸 (PGA) 分别为 50/50、75/25、90/10] 纳米纤维材料,裁成 24 孔培养平板孔径大小,室温干燥 48 h 后称重,并放入孔中,浸泡于新鲜人体胆汁中,放入 37℃ 恒温箱内,每日更换新鲜胆汁。隔日取出每种质量比的纤维膜各 3 片,进行测试及表征。

3. 测试及表征方法 (1) 失重率的测定:采用烘干称重法测定试样降解前后的质量。失重率 =  $(W_0 - W_t) / W_0 \times 100\%$ ; 其中,  $W_0$  为降解前干燥 48 h 质量,  $W_t$  为降解后干燥 48 h 质量。(2) 扫描电镜 (SEM) 测试:在第 14 天将三种不同比例 PLGA 纳米纤维膜表面喷金后,用 SEM 观察其形貌。

4. 手术方法 逐层进腹,暴露肝十二指肠韧带,沿着胆囊管与肝总管汇合处往下,在胰头左侧、十二指肠上方找到一条索状管道,用针筒回抽有少许金黄色胆汁明确即为胆总管并游离胆总管中下段适当长度。方案一:在胆总管前壁纵行切开约 1.0 cm 用 5-0 薇乔直接行原位 I 期缝合胆总管;方案二:胆总管前壁纵行切开约 1.0 cm,于胆总管切口处置入可降解内支架,用 5-0 薇乔直接行胆总管缝合;方案三:保留部分胆管后壁,防止滑脱,胆管壁其余部分缺损,植入支架,仅予薇乔捆绑固定支架两端。胆总管旁放置腹腔引流管并引至腹外固定。

5. 测定术前和术后相关指标 于术前、术后 1 个月时间点抽取实验动物血液样本测定 ALT、AST、ALP、TBil 和 DBil,并比较不同手术方式对实验动物肝功能的影响情况。术后 1 个月处死实验动物,观察腹腔情况,吻合口标本组织常规石蜡包埋、切片,HE 染色。

6. Masson 染色 切片常规脱蜡、水化;天青石蓝染 5 min 水洗, Harris 苏木素染 5 min;丽春红酸性品红液染 5 min, 1% 醋酸快速洗 1 次; 1% 磷钼酸水溶液处理 2 min 至胶原呈淡红色,但肌肉纤维仍呈鲜红色;祛除磷钼酸, 1% 醋酸浸洗片刻;淡绿色色

数秒, 1% 醋酸浸洗片刻;无水酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

7. 免疫组化检测平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 和增殖细胞核抗原 (PCNA) 切片脱蜡,梯度酒精水化,蒸馏水洗 2 min;滴加 1% 甲醇-双氧水 (99 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 室温静置 5 min, PBS 浸泡 3 min  $\times$  3 次;抗原热修复 10 min,冷却至室温, PBS 冲洗 3 min  $\times$  3 次;滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 min,分别滴加一抗 ( $\alpha$ -SMA, PCNA, 1 : 600) 室温孵育 1 h;用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗切片 3 min  $\times$  3 次,滴加聚合物增强剂,室温孵育 10 min, PBS 冲洗 3 min  $\times$  3 次;滴加二抗液于组织上,室温静置 30 min;用 PBS 冲洗切片 3 min  $\times$  3 次,滴加新鲜配置的二氨基联苯胺 (DAB) 显色剂,显微镜下控制显色。显色完全后,用蒸馏水冲洗终止显色;苏木素复染。酒精脱水,中性树脂封片。

## 结 果

测试材料原始呈白色,质地柔韧;降解初期 (6 d) 材料逐渐吸水膨大,质地变硬变脆,形状无明显变化,颜色因胆汁附着呈淡黄色;降解后期 (28 d) 材料表面出现裂痕、小碎片,材料尚保留原有形。

PLGA 纤维膜浸入在胆汁中,随着时间的延长,降解程度加深,部分降解产物溶于胆汁中造成质量损失即失重率。所以失重率的变化可以用来表征材料降解的快慢。降解初期 (6 d) 三种不同质量比的 PLGA 纳米纤维质量变化不大,随后质量减少逐渐加快,由于更易于降解的 PGA 所占比例较大, PLGA 50/50 的质量损失较其他两种比例的材料稍快。实验结果也验证了 PGA 比例越大,吸水性越强,共聚物降解越快。在 2 周时其残留质量为初始质量的 86.44%。PLGA 75/25、PLGA 90/10 纳米纤维的残留质量分别为初始质量的 89.68% 和 91.43%。第 2 周至第 4 周,失重率进一步增加, PLGA 50/50、PLGA 75/25、PLGA 90/10 三种纤维膜的失重率分别增加了 17.27%、12.24%、10.55%。

胆汁中降解 2 周后三种不同比例的 PLGA 纳米纤维微观形貌变化 (见封二图 1), PLGA 75/25 和 90/10 的纳米纤维结构仍然存在,没有发生明显的变形,但 PLGA 50/50 纳米纤维吸水溶胀,同一根纤维粗细极其不均匀,纤维大面积出现断裂甚至因溶蚀出现较大孔洞,其在胆汁中发生了明显的溶解,与其质量损失最明显是相符的。PLGA 75/25 的纳米纤维未见明显的溶解,但纤维表面发生吸水溶胀,纤

维致密紊乱、粗糙,部分纤维出现断裂、粘连,但较 PLGA 50/50 少。PLGA 90/10 的纳米纤维较降解前改变不多,未见明显的溶解及孔洞,表明其降解较其他两种比例的材料缓慢。

所有手术均顺利完成,麻醉效果满意,未出现术中死亡,术后未出现胆漏、黄疸。猪肝功能平均在正常范围之内,术前及术后比较未见明显差异。(1) HE 染色可见手术方案三的胶原纤维合成最少,镜下可见手术缺如部分排列整齐的平滑的单层胆管上皮黏膜,与周围正常胆管上皮细胞形态、排列方式相似,同时可见少量增生腺体,视野中仍可见小块胆管上皮细胞缺损部位。手术方案一组表现为黏膜下固有层成纤维母细胞大量增生,成纤维细胞细胞功能活跃,处于合成状态,细胞外可见大量胶原纤维,胶原增厚明显伴有纤维化,胶原纤维结构杂乱,可见小血管增生、扩张(见封二图 2)。(2) Masson 三色染色可见正常胆管 Masson 染色胶原分布稀疏,排列整齐,小血管壁薄,胆管壁可见少量平滑肌。三组术后 1 个月染色可见胶原纤维大量增生伴有纤维化,排列致密呈结节状,胶原结节中包含高密度的成纤维细胞和致密排列的无定向的胶原纤维。手术方案三的胶原增生程度最轻,排列相对有序;而方案一的胶原纤维增生最为严重,排列紊乱无序,与 HE 染色结果相似(见封二图 3)。(3) 免疫组化: $\alpha$ -SMA 表达于肌成纤维细胞(MFB)胞浆、血管及平滑肌组织。正常胆管表达于管壁少量平滑肌组织(见封二图 4)。手术方案三再生的胆管上皮细胞层通过 PCNA 免疫组化研究,可见原胆管缺损处新生胆管细胞生成,新生胆管上皮细胞形成规则的单层黏膜,与周围组织类似,镜下视野中仍可见小块胆管上皮细胞缺损部位(见封二图 5)。

### 讨 论

组织工程支架的材料研究最多、应用最广的就是脂肪族聚酯,特别是 PLA、PGA 及其共聚物 PLGA。PGA 材料生物相容性较好,适合细胞的黏附和增殖,但是其降解速度过快,体内应用时很快失去力学性能;而 PLA 材料的降解速度较慢,能满足支架在人体内的力学要求,但是其生物相容性较差,不利于细胞的黏附、增殖。故将两者结合,制备出具有高内表面张力和不同机械性能及降解速率的组织工程支架 PLGA。

利用其他技术制备的 PLGA 支架质地相对较硬、脆,易折断,在体内应用时易造成梗阻,而利用静

电纺丝工艺制作的支架管具有一定的三维立体结构和良好的表面活性、高表面积和高孔隙率,有利于细胞的植入、贴附、营养物质的渗入及代谢废物的排出,为细胞的生长、增殖提供了良好的微环境;且支架质地柔软,具备一定的韧性和抗牵拉能力,能提供足够的支撑作用,不易被机械力所折断,完全满足体内应用所需要的可塑性和力学性能。

在组织学应用中,通过改变支架中 PLA、PGA 纤维的组份比例,可以对其在降解过程中的重量、强力等性能变化进行调控,以满足人们对不同降解速率支架的需求。本研究发现 PLGA 50/50 纤维降解速度最快,与相关报道一致<sup>[3]</sup>。通过模拟体内胆汁环境对不同组份比例(PLA/PGA 分别为 50/50、75/25、90/10)的 PLGA 纳米纤维膜的体外降解,发现各种比例的 PLGA 纤维膜的降解的失重率曲线近乎成线性,且符合 PGA 比例越高,材料降解速度越快。PLGA(50/50)降解高峰在 2 周左右,SEM 观察 2 周时纤维大面积出现断裂甚至因溶蚀出现较大孔洞,其在胆汁中发生了明显的溶解。而质量比为 75/25 和 90/10 的 PLGA 降解高峰在 1 个月左右,与胆总管缺损部位的再生速度相一致<sup>[4]</sup>。

手术方案三组在胆道缺损较多的情况下,将缺损胆管与内支架管两端捆绑固定,允许支架中间缺损一段胆管,支架起到桥梁的作用,这样既能起到胆管减压、引流胆汁和支撑胆管的作用,又避免了吻合所产生的张力,该手术方法可行与否关键在于损伤后的胆管能否形成新生组织替代缺损。

动物实验证明了胆管具备一定的再生能力,而胆道替代材料能够促进胆道上皮细胞的增殖,恢复胆道的连续性。Miyazawa 等<sup>[5]</sup>用可生物降解的支架分别与近端胆管和十二指肠吻合替代 3.0 cm 的胆总管缺损,10 周后共聚物消失,其上存在不完全的新生胆管上皮,6 个月时内皮下结缔组织增厚,新生胆管同自体胆总管形态上几乎相同。有研究制备了能特异结合胶原的碱性成纤维细胞生长因子,可与胶原支架材料特异结合形成功能支架材料,建立了猪的部分胆管切除损伤模型,并将功能支架材料应用于胆管损伤修复<sup>[4]</sup>。实验结果提示 4 周左右胆管缺损区域完成胆管上皮的迁移,胶原支架完全降解,12 周时已无法区别手术区域与正常区域,并且对肝功能无明显影响,说明该功能支架能够有效地促进胆管结构和功能的修复。

## · 论 著 ·

## SA4503 对抑郁大鼠海马 CREB 及 BDNF 的影响

严恩石 乔慧芬 杨 春 朱美华 王 宁

**【摘要】** 目的 观察 SA4503 对抑郁大鼠海马环磷酸腺苷应答元件结合蛋白(CREB)及脑源性神经营养因子(BDNF)的影响。方法 雄性 Wistar 大鼠 32 只随机均分为对照组(C 组)和三个剂量 SA4503 组(K<sub>1-3</sub>组)。实验药物干预前 1 d,大鼠强迫游泳 15 min 建立抑郁大鼠模型。药物干预当日,分别腹腔注射 1 ml 等容量的生理盐水(C 组)、SA4503 2.5 mg/kg(S<sub>1</sub>组)、5 mg/kg(S<sub>2</sub>组)、10 mg/kg(S<sub>3</sub>组)。给药 30 min 后将大鼠再次行强迫游泳实验 5 min,记录其不动时间。随后取海马组织测定 CREB 及 BDNF 含量。结果 与 C 组相比,S<sub>1-3</sub>组呈剂量依赖性地减少大鼠强迫游泳不动时间及增加海马 CREB 和 BDNF 表达( $P < 0.05$ )。结论 SA4503 对大鼠的抗抑郁作用可能与前额皮层 CREB 及 BDNF 表达上调有关。

**【关键词】** SA4503;抑郁;海马;环磷酸腺苷应答元件结合蛋白;脑源性神经营养因子

**【中图分类号】** R338 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-3685(2012)23-2790-03

Effects of SA4503 on CREB and BDNF in the hippocampus in rats with depression YAN Enshi, QIAO Hui fen, YANG Chun, et al. Nanjing Brain Hospital, Nanjing 210029, CHINA

**【Abstract】 Objective** To observe the effects of SA4503 on cAMP-response element binding protein(CREB) and brain-derived neurotrophic factor(BDNF) in the hippocampus in rats with depression. **Methods** Forty-two male Wistar rats were equally randomized into 4 groups of S1 (intraperitoneal injection of SA4503 2.5 mg/kg), S2 (intraperitoneal injection of SA4503 5 mg/kg), S3 (intraperitoneal injection of SA4503 10 mg/kg) and C (intraperitoneal injection of normal saline). Depression model of rats was established by being forced to swim for 15 min on the 1<sup>st</sup> day. The drugs were injected intraperitoneally on the 2<sup>nd</sup> day and the rats underwent forced swimming test(FST) at 30 min after injection of drugs. The immobility time of the rats during FST was recorded. The hippocampus was harvested for the determination of CREB and BDNF levels after FST. **Results** Compared to group C, the immobility time of the rats during FST was shortened and the expressions of CREB and BDNF in the hippocampus were increased dose-dependently in groups of S1, S2 and S3 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The anti-depression effect of SA4503 may be related to up-regulating expressions of CREB and BDNF in the hippocampus in rats.

**【Key words】** SA4503; Depression; Hippocampus; cAMP-response element binding protein; Brain-derived neurotrophic factor

[Jiangsu Med J, December 2012, 38(23):2790-2792.]

作者单位:210029 江苏省,南京医科大学附属脑科医院麻醉科  
通讯作者:王 宁 E-mail:wwnn33@yahoo.com.cn

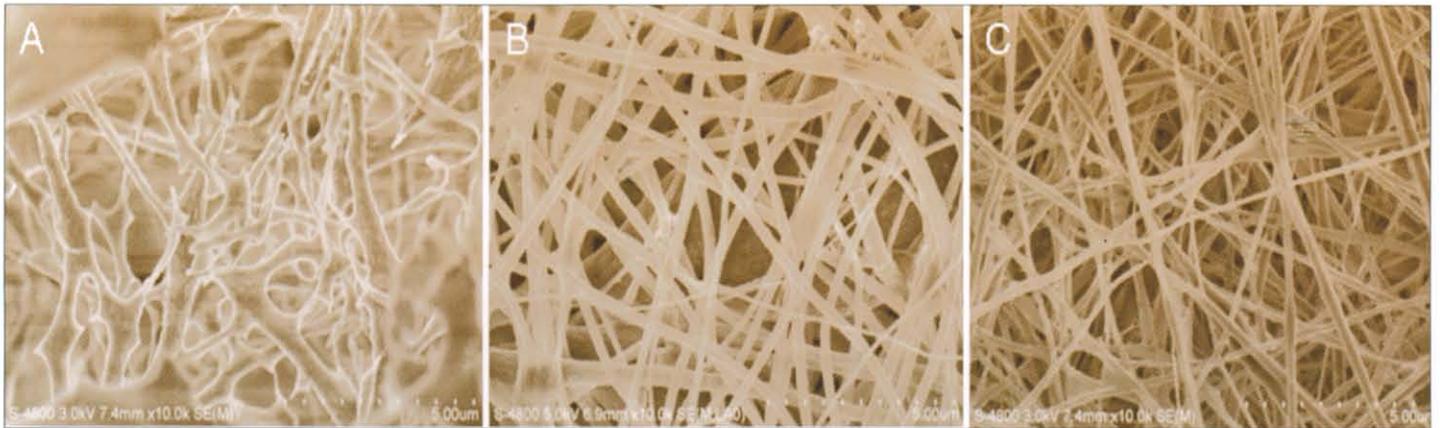
## 参 考 文 献

- [1] Lsmail A, Ramsis R, Sherif A, et al. Use of human amniotic stem cells for common bile duct reconstruction; vascularized support of a free amnion graft[J]. Med Sci Monit, 2009, 15(9): R243-R247.
- [2] Yamamoto K, Yoshioka T, Furuichi K, et al. Experimental study of poly-L-lactic acid biodegradable stents in normal canine bile ducts[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2011, 34(3): 601-608.
- [3] 赵莉,何晨光,高永娟,等. PLGA 的不同组成对支架材料性能的影响研究[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(5): 22-28.
- [4] Li Q, Tao L, Chen B, et al. Extrahepatic bile duct regeneration in pigs using collagen scaffolds loaded with human collagen-binding bFGF[J]. Biomaterials, 2012, 33(17): 4298-4308.
- [5] Miyazawa M, Torri T, Toshimitsu Y, et al. A tissue-engineered artificial bile duct grown to resemble the native bile duct[J]. Am J Transplant, 2005, 5(6): 1541-1547.

(收稿日期:2012-08-05) (供稿编辑:张国楼)

# 静电纺丝 PLGA 纳米纤维支架修复猪胆管损伤

(正文见 2787 页)

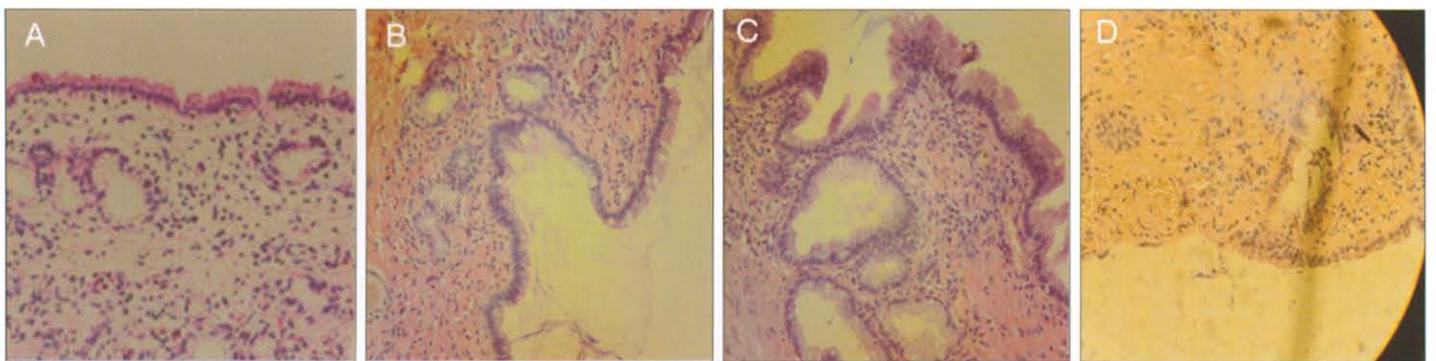


A. PLGA50/50

B. PLGA75/25

C. PLGA90/10

图 1 三种不同比例静电纺丝 PLGA 纳米纤维降解 14 d 后局部微观形貌 (SEM×10000)



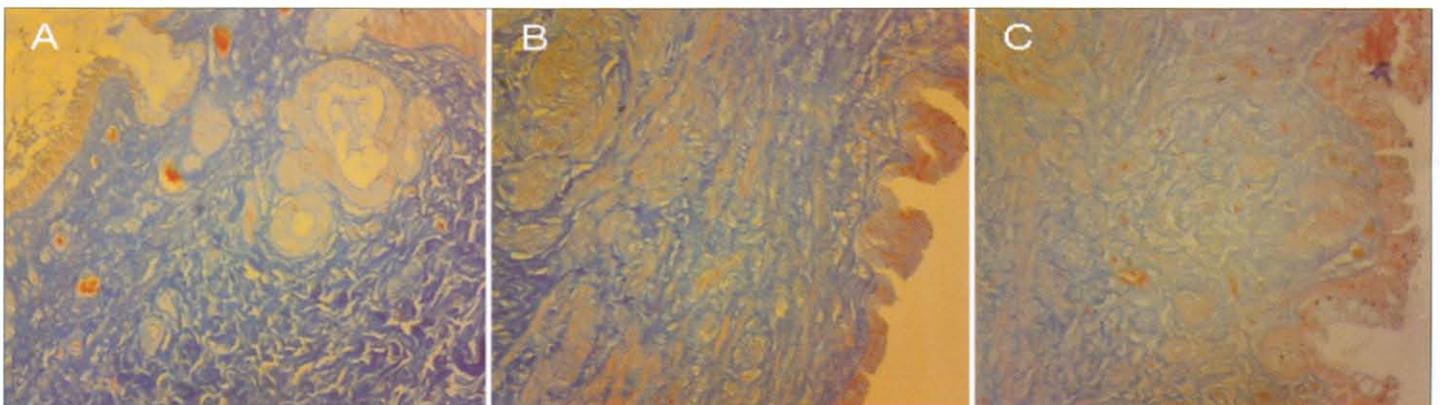
A. 正常胆管

B. 手术方案一

C. 手术方案二

D. 手术方案三

图 2 吻合口胆管术后 1 个月 A-C (HE ×100), D (HE ×40)

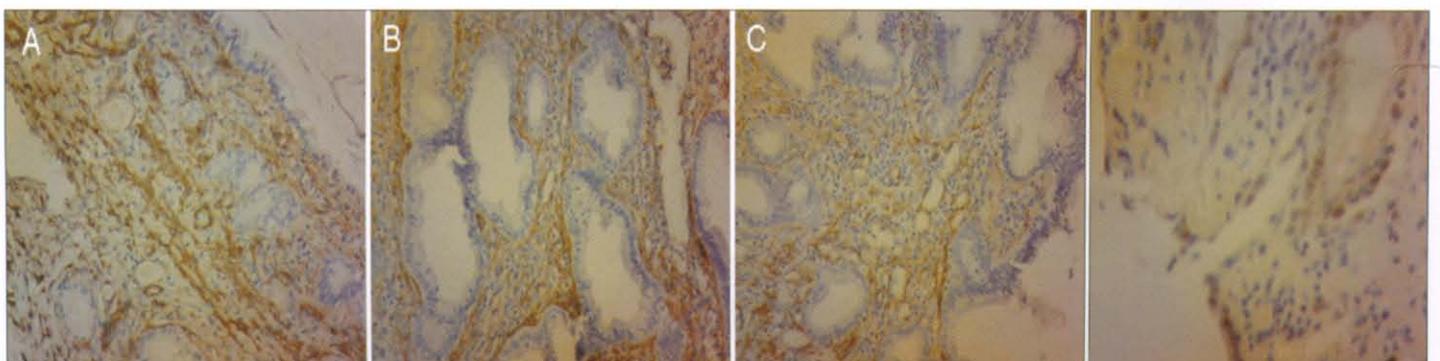


A. 手术方案一

B. 手术方案二

C. 手术方案三

图 3 吻合口胆管术后 1 个月 (Masson 染色 ×100)



A. 手术方案一

B. 手术方案二

C. 手术方案三

图 4 吻合口胆管术后 1 个月 ( $\alpha$ -SMA 免疫组化 ×200)

图 5 吻合口胆管术后 1 个月手术  
方案三的猪胆管 (PCNA 免  
疫组化 ×200)