

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

中醫藥配合組織工程於神經再生的應用與評估

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-039-014-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中國醫藥大學中國醫學研究所

計畫主持人：陳悅生

計畫參與人員：王海亭

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 14 日

中醫藥配合組織工程於神經再生的應用與評估

計劃編號：NSC91-2320-B-039-014

執行期間： 91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

計畫主持人：陳悅生

共同主持人：姚俊旭

計畫參與人員：王海亭

執行單位：中國醫藥大學中國醫學研究所

一、中文摘要

要突破生醫材料於神經再生的應用，組織工程相關技術的研發是勢在必行的。其中，中醫藥配合組織工程於神經科學的研發，勢必是未來相關研究的主軸之一。此報告乃針對具神經細胞保護功能之中藥，包含人參皂甘 (ginsenoside)、黃耆皂甘 (astragaloside) 及銀杏葉酯 (bilobalide) 對 Schwann cell 的生化作用進行探討，並利用體外 Schwann cell 培養之方式，以 Schwann cell 的分子標的物進行藥性及藥效評估。

關鍵字：組織工程；神經再生；中醫藥

Abstract

To further study the applications of biomaterials on nerve regeneration, developing novel techniques in tissue engineering is necessary. Among which, combining Chinese medical science with tissue engineering can be seen a major trend in studies of neuroscience. In this study, we tried to examine the biochemical effects of several herbal extracts, such as ginsenoside, astragaloside, and bilobalide, on

Schwann cells. We also studied the markers in cultured Schwann cells treated with aforementioned herbal extracts. We therefore are able to determine the optimal concentration of a certain herbal extract(s) on promoting the differentiation of Schwann cells, which can be used in our future research associated with nerve regeneration in-vivo.

Key Words: Tissue engineering; Nerve regeneration; Chinese medicine

二、緣由與目的

神經管接合術^[1-4]是將神經兩斷端手術縫合於一圓管的兩端，並利用此圓管來導引及支持再生神經纖維成長。現在已經有許多不同的生物材料用來製作神經管^[5-7]，矽膠管(silicone tube)就是其中之一。矽膠製神經管具有高生物適應性及透明及高柔軟度等優點，近年來已大量使用於神經再生與修復的研究中^[8]。另外，在神經管內添加刺激神經再生的物質，能使管中再生的神經在較短的時間內，跨過神經間距完成再生。常使用的神經再生刺激物質有：神經生長因子(nerve growth factor, NGF)，膠原蛋白

(collagen), 昆布氨酸(laminin)及纖維網蛋白(fibronectin)的混合物等等^[9,10]。除此之外, 要突破生醫材料於神經再生的應用, 組織工程相關技術的研發是勢在必行的。其中, 中醫藥配合組織工程於神經科學的研發, 勢必是未來相關研究的主軸之一。此結論報告為針對具神經細胞保護功能之中藥, 包含人參皂甘(ginsenoside)、黃耆皂甘(astragaloside)及銀杏葉酯(bilobalide)對 Schwann cell 的生化作用進行探討, 並利用體外 Schwann cell 培養之方式, 以 Schwann cell 的分子標的物進行藥性及藥效評估。

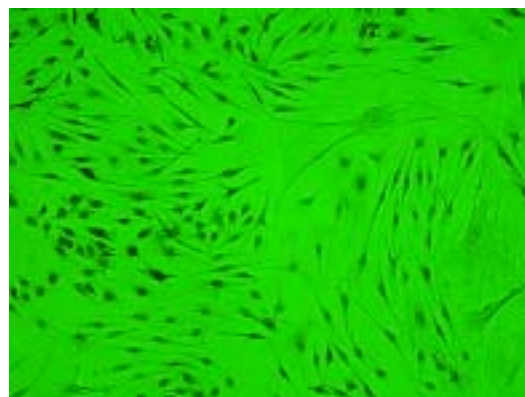
三、結果

實驗過程所遇問題及解決方法

1. 起初做這個實驗時使用的是 150-200 g 的 SD rat, 在細胞數量上一直無法有明顯的增加。解決方法: a. 增加老鼠的隻數, b. 使用出生 3 天的小鼠, c. 使用出生 3-5 天的小鼠; 其中則以 c. 的方法可以獲得較多數量的細胞數。
2. 原本是使用 coated collagen 的培養皿, 培養數天後都會出現污染的狀況, 發現因為在中和 collagen 的過程很難達到無菌, 所以在培養過程中很容易出錯, 後來改用 coated Poly-L-lysine 的培養皿就不會有此種狀況, 且細胞數也有明顯的增加。
3. 添加有絲分裂促進劑若依照 paper 的劑量會有抑制的狀況, 降低劑量來測試細胞增生的狀況以便找出最佳濃度。

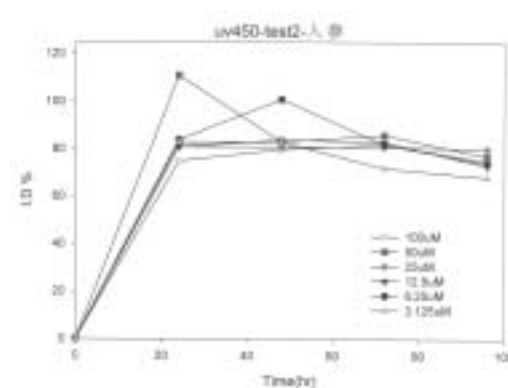
經修改部分實驗步驟後, 本組成功的

培養及純化出 Schwann cells, 經 S-100 染色並在倒立式顯微鏡下觀察, 細胞體呈菱形, 核為橢圓形, 胞體兩側有兩個細長突起。相較於細胞體為扁平, 不規則形、核圓型, 胞體有兩個或多個短突起的纖維母細胞, 之間的型態相差甚多 (圖一)。



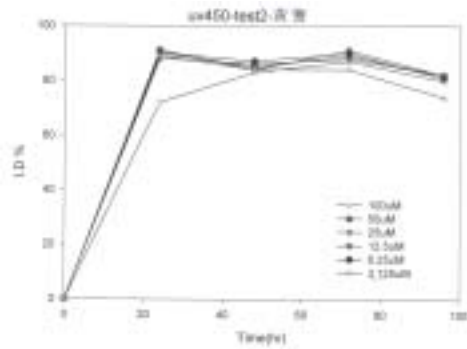
圖一: Schwann cell 細胞體為菱形, 核為橢圓形, 胞體兩側有兩個細長突起。纖維母細胞胞體則為扁平, 不規則形、核圓型, 胞體有兩個或多個短突起的細胞

圖二則為黃耆、銀杏和人參標準品加入培養基, 再經 XTT 測定之結果。

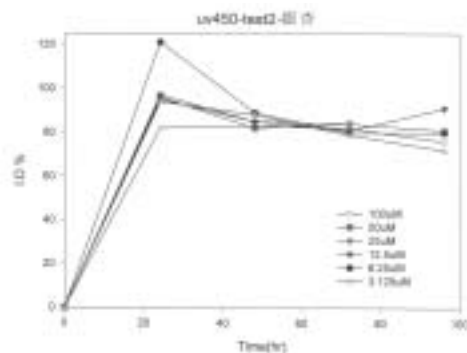


(a)

圖二: (a)人參、(b)黃耆、(c)銀杏標準品加入培養基, 再經 XTT 測定之結果



(b)



(c)

結果發現，人參及銀杏在 24 小時作用時間內均有一最佳濃度，分別為 50 μM 及 6.25 μM ，對 Schwann cell 增生有促進作用。黃耆則在觀察期中，對 Schwann cell 增生並無促進作用。

四、討論

在神經管中添加刺激神經再生的物質，會使再生神經在較短的時間內跨過截斷神經間距，而到達遠斷端。這些物質包括例如膠原蛋白、昆布氨酸及纖維網蛋白等等。除了單純的利用生醫材料配合投遞不同的神經刺激藥物來促進神經再生外，組織工程應用於神經科學技術的開發與應用，愈發受研究界重視，其中又以本實驗中

所純化之 Schwann cell 與材料結合的概念被認為最為可行。這是由於 Schwann cell 具有相當促進神經再生的能力，於是將 Schwann cell 植於受損的神經組織中，來促進神經再生的方法已被廣泛的運用。在確定各中藥成分及其對 Schwann cell 產生最佳促進增生濃度之後，本組於 92 年國科會計劃中則利用 collagen 來包覆由大鼠分離培養的 Schwann cell 及已確認之中藥，並將此混合物填入矽膠神經管中來接合大鼠的截斷坐骨神經。同時，為了確認 Schwann cell 及中藥成分對神經再生的促進作用，計劃中加長截斷坐骨神經的間距至 1.5 公分，並於實驗期 8 星期後針對再生神經的型態及其電生理功能來評估結果。此連續兩年期的實驗結果除了可以評估何種中藥可以促進 Schwann cell 的活化程度，而達到增強受損神經再生的能力之外，在動物實驗中更能進一步的確認利用中藥作為 Schwann cell 之 neurotrophin 的可行性。總結，此次計劃中最主要的目的是希望能結合組織工程、生醫材料及藥物釋放等技術，期能對神經修復技術的開發能有所突破，以造福神經損傷之患者。

五、計畫成果自評

實驗結果已達到計劃書中之目標。

六、參考文獻

- [1] Rosen JM, Pham HN, Abraham G, Harold L, Hentz VR. Artificial nerve graft compared to autograft in a rat model. *Journal of Rehabilitation Research & Development*. 26(1):1-14. 1989.
- [2] Lundborg G, Kanje M. Bioartificial nerve grafts. A prototype. *Scandinavian Journal of Plastic & Reconstructive Surgery & Hand Surgery*. 30(2):105-10. 1996.
- [3] Hoppen HJ, Leenslag JW, Pennings AJ, van der Lei B, Robinson PH. Two-ply biodegradable nerve guide: basic aspects of design, construction and biological performance. *Biomaterials*. 11(4):286-90, 1990.
- [4] Nicoli AN, Perego G, Cella GD, Maltarello MC, Fini M, Rocca M, Giardino R. Effectiveness of a bioabsorbable conduit in the repair of peripheral nerves. *Biomaterials*. 17(10):959-62, 1996.
- [5] Borkenhagen M, Stoll RC, Neuenschwander P, Suter UW, Aebischer P. In vivo performance of a new biodegradable polyester urethane system used as a nerve guidance channel. *Biomaterials*. 19(23):2155-65, 1998.
- [6] Santos X, Rodrigo J, Hontanilla B, Bilbao G. Evaluation of peripheral nerve regeneration by nerve growth factor locally administered with a novel system. *Journal of Neuroscience Methods*. 85(1):119-27, 1998.
- [7] Rodriguez FJ, Gomez N, Perego G, Navarro X. Highly permeable polylactide-caprolactone nerve guides enhance peripheral nerve regeneration through long gaps. *Biomaterials*. 20(16):1489-500, 1999.
- [8] Fields RD, Le Beau JM, Longo FM, Ellisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. [Review] [506 refs] *Progress in Neurobiology*. 33(2):87-134, 1989.
- [9] 胡正利：針刺及電針對經矽膠管修護之截斷大鼠坐骨神經再生影響的評估。中國醫藥學院 碩士論文，台中，2000。
- [10] Chen YS. Development of a multiple-lumen nerve cuff utilizing growth stimulant for controlled regeneration. Dissertation in Iowa State University, 1998.