

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

人參皂甘配合生醫材料的應用對組織修護之評估

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC89-2314-B-039-024-M08

執行期間： 89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

計畫主持人：陳悅生

共同主持人：姚俊旭、曾永輝

計畫參與人員：吳俊賢、侯庭鏞、江素瑛

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：中國醫藥學院中國醫學研究所

中 華 民 國 90 年 10 月 31 日

人參皂甘配合生醫材料的應用對組織修護之評估

計畫編號：NSC89-2314-B-039-024-M08

執行期間：89年8月1日至90年7月31日

計畫主持人：陳悅生

共同主持人：姚俊旭、曾永輝

計畫參與人員：吳俊賢、侯庭鏞、江素瑛

執行單位：中國醫藥學院中國醫學研究所

一、中文摘要

為了探討人參皂甘 Rb₁ 在動物體內對神經再生的影響，在矽膠管內以膠原蛋白為基質，加入神經生長因子及人參皂甘 Rb₁，再利用此神經管對截斷的大鼠坐骨神經做一接合，以觀察其對大鼠周圍神經再生的影響。同時也利用 PC12 細胞株做體外細胞實驗，觀察人參皂甘 Rb₁ 與是否能增強神經生長因子引發的神經突突出。

實驗結果發現，PC12 細胞株神經突出會隨神經生長因子濃度的上升而增加，但人參皂甘 Rb₁ 無法增強神經生長因子引發的神經突突出。動物實驗結果則顯示人參皂甘 Rb₁ 可加強神經生長因子促進神經再生之能力，但人參皂甘 Rb₁ 並無法增強外源性神經生長因子的作用。

關鍵字：周圍神經再生，矽膠管，神經生長因子，人參皂甘 Rb₁，膠原蛋白

Abstract

The effects of mixture of collagen, nerve growth factor and ginsenoside Rb₁ filled in silicon rubber tubes on regeneration of severed rat sciatic nerves were investigated in this study. We also studied if Rb₁ could enhance the NGF-induced neurite outgrowth of PC12 cell line. As a result, we found that the proportion of PC12 cell neurite outgrowth was in direct proportion to the concentration of NGF, but GRb₁ couldn't enhance the NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cell line. In the in-vivo observation, the present study suggested that GRb₁ could enhance the growth-promoting capability of NGF on regenerating peripheral nerve, but GRb₁ couldn't enhance the action of exogenous NGF.

Keywords: Nerve regeneration; Silicone tube; Nerve growth factor; Ginsenoside Rb₁; Collagen

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)，laminin and fibronectin 的混合物等等^[9, 10]。此外，Takemoto (1984)在雞胚的背根神經結與腰部的交感神經結的組織培養實驗中發現，人參皂素(ginseng saponin)可以增強 NGF 的作用^[11]。其中又以 GRb₁ (ginsenoside Rb₁, GRb₁)的效果最佳^[11-14]。為了進一步探討在動物體內 GRb₁ 對神經再生的影響，我們在矽膠管內填入以膠原蛋白為基質的 NGF 及 GRb₁ 混合試劑，對截斷的大鼠坐骨神經做一接合，藉以觀察其對大鼠周圍神經再生的作用。同時我們也利用 PC12 細胞株做體外細胞實驗，觀察 GRb₁ 與 NGF 的交互作用及其對 PC12 細胞株神經突突出(neurite outgrowth)的影響。

三、結果

NGF 可以引發 PC12 細胞株神經突突

出，神經突突出的比率，隨 NGF 濃度的上升而增加。GRb₁ 本身不能引發 PC12 細胞株神經突突出，而且 GRb₁ 無法促進 NGF 引發的 PC12 細胞株神經突突出。

動物實驗中，以神經管縫合大鼠截斷的坐骨神經，其間距為 15 mm，在六星期後，觀察是否有再生神經通過神經管。五組實驗動物中，僅控制組無再生神經通過，其他各組的成功率為 Collagen 組 40%；Collagen+NGF (C+N)組 66.7 %；Collagen+NGF+GRb₁ (C+N+G) 組 33.3 %；Collagen+ GRb₁ (C+ G)組 33.3 %。觀察切片 Schwann 細胞的形態，做為再生神經組織成熟與否的依據，並且對切片內髓鞘化軸突的數目與面積做定量的分析。結果為 C+N 組的再生神經最成熟；C+ G 組的再生神經也已成熟；Collagen 組的再生神經較不成熟；C+N+G 組的再生神經最不成熟。

四、討論

細胞實驗中 PC12 細胞株的神經突突出的現象，隨 NGF 濃度的上升而增加，符合之前的報告。在 NGF 濃度為 10 ng/ml 時，神經突突出>1 CBD 的比率是 11%。若 GRb₁ 有增進 NGF 的作用，那麼 PC12 細胞在 NGF 濃度為 10 ng/ml 的情況下，神經突突出大於 1 CBD 的比率須大於 11 %，但不同 GRb₁ 濃度的實驗結果，與對照組比較後，在統計學上沒有明顯差別。所以在 PC12 細胞株的實驗中，GRb₁ 沒有增進的 NGF 的作用；而且 GRb₁ 本身也不能增進 PC12 細胞的神經突突出的現象。

過去的研究發現，在細胞或組織培養中，不論中樞神經系統或是周圍神經系統的神經組織，人參皂素能增強 NGF 的作用，尤其是 GRb₁, GRd 等^[11-13]。但是人參皂素本身，無法增加神經元的生存率或促進神經突突出的現象。PC12 細胞株的實驗中發現，GRb₁ 不能增進 PC12 細胞的神經突突出，也沒有增進的 NGF 的作用。就這差異，推論如下：不同於 PC12 細胞株，神經組織除了神經元以外，尚有支持細胞(神經膠細胞或 Schwann 細胞)或白血球存

在，在神經組織的實驗中，人參皂素增進 NGF 的作用可能與這些細胞有關。可以進一步將 PC12 細胞與支持細胞共同培養，觀察在此情況下，GRb₁ 是否能增強 NGF 的作用。

動物實驗的目的是為了探討神經管內所添加促神經再生物質的作用。而備製添加神經刺激物質的神經管，在實驗的初期有兩項因素須要克服：

一、藥物滲出。最初動物實驗設計，只要觀察 NGF 與 GRb₁ 兩個因素，所將藥物溶於 PBS 溶液中，並注入矽膠管內。結果發現藥物無法穩定的留在管內，且無論在手術前或手術後將藥物注入矽膠管中，藥物常有滲出情形。參考矽膠管內添加物質的研究報告^[15-17]並且了解細胞外基質或基底層有保存神經營養因子的特性後，決定以膠原蛋白與藥物相混合的方式，配合凝膠作用，將此混合物注入矽膠管，以確保藥物在手術過程中會留在矽膠管。當 Vitrogen[®] 膠原蛋白的濃度大於 1 mg/ml 時，都可在凝膠作用後形成膠狀，矽膠管內膠的溶度為 1.35 mg/ml。

二、藥物的濃度。矽膠管內徑 1.5 mm，間距 15 mm，容積為 26.5 μl。所以藥物劑量在先天上已經受到管內容積限制。那麼藥物濃度應該多少較為恰當？從先前實驗中，提供了 NGF 10 ng/ml 與 GRb₁ 30 μM 的濃度，是 GRb₁ 增強 NGF 的作用最明顯的濃度^[11-13]。這個濃度比例，就是論文中 GRb₁ 與 NGF 濃度的參考。Santos (1998)以濃度為 2.2 μg/ml 的 NGF 劑量，在術後的四星期內，每日施打 0.3 ml，使藥物由皮下經一特製的細管流到大鼠坐骨神經縫合處(直接斷端縫合)附近^[6]。上述方式每日的 NGF 劑量為 0.66 μg。本研究中以矽膠管內填藥物的方式進行，最後決定 NGF 濃度 5 μg/ml，GRb₁ 濃度 15 mM 細胞實驗濃度的 500 倍作為管中藥物的濃度。每管注入 26.5 μl 的藥量相當於 NGF 0.13 μg, GRb₁ 0.39 m mole。

動物實驗中，將間距定為 15 mm 是為了突顯管內添加物質的作用。這個方法

也被許多學者應用，Danielsen (1986)在矽膠管內添加甲狀腺素，使再生軸突成功地長過 15 mm 的距離^[18]。在 Control 組中，矽膠管內不含任何物質，結果發現該組截斷的大鼠坐骨神經均無法再生通過 15 mm 的間距。這個結果符合矽膠管接合術中“關鍵的神經間距(10 mm)”的論點。

動物實驗中，Collagen 組、C+N 組、C+N+G 組與 C+G 組都有再生神經生成，成功率各為 Collagen 組 40 %；C+N 組 66.7 %；C+N+G 組 33.3 %；C+G 組 33.3 %。但是，各組再生神經組織切片的類型卻不相同。C+N 組與 C+G 組的多已長出髓鞘化軸突，但 C+N 組再生神經組織的結構較 C+G 組成熟。Collagen 組與 C+N+G 組的切片中均無髓鞘化軸突。其中，C+N+G 組的切片結構相似，呈現數層向心狀排列的纖維母細胞圍繞著纖維橋的核心區，尚未形成血管、Schwann 細胞、軸突、神經外膜、圍神經膜與神經內膜；而 Collagen 組，切片的組織形態的差異較大。膠原蛋白、NGF 已被認為是有助於周邊神經再生的神經刺激物質，但是 GRb₁ 的角色則是未知。依動物實驗結果推論，以膠原蛋白為基質的前題下，膠原蛋白、NGF 與 GRb₁ 都能影響大鼠坐骨神經的再生，而且因各組的組織形態的各俱特色，認為其影響神經再生的機轉可能不同。

另外，在動物實驗中，髓鞘化軸突面積百分比與髓鞘化軸突密度，C+N 組與 C+G 組差異不大；但是 C+N 組明顯高於 Collagen 組或 C+N+G 組，可以認為膠原蛋白與 NGF 混合試劑的對神經再生的作用，優於膠原蛋白試劑或是膠原蛋白 NGF 與 GRb₁ 的混合試劑。而且 C+N 組與 C+G 組的髓鞘化軸突平均面積的差異，無統計學上的意義。雖然膠原蛋白、NGF 與 GRb₁ 的混合試劑的對神經再生的作用不佳，但是膠原蛋白與 GRb₁ 的混合試劑對再生神經有正面的意義。軸突或神經斷傷後，Schwann 細胞會分泌 NGF，所以我們不能認定在周邊神經再生的過程中，GRb₁ 沒有增進 NGF 的作用。

C+N 組與 C+G 組神經再生組織成

熟，但是，C+N+G 組的再生神經組織最不成熟，在此大膽地提出，可能是 NGF GRb₁ 混合試劑濃度過高所致，而抑制了 Schwann 細胞與再生軸突。

NGF 於神經再生的作用機轉，目前已有較清楚了解。在組織培養中，人參皂素增強 NGF 促神經突突出的作用，其機轉仍不是很明確。在雞胚胎神經節的組織培養中，NGF 產生神經纖維的作用，會被 colchicine 和 vinblastin 拮抗。而 GRb₁ 可以使 NGF 免於 colchicine 的抑制作用，卻增加了 vinblastin 對 NGF 的拮抗作用。所以 Takemoto 推論，GRb₁ 改變細胞膜的特性，影響神經節的神經元對 colchicine 和 vinblastin 的攝取^[11]。Salim (1997)從雜合反應發現 GRb₁ 增加基底核 choline acetyltransferase 和 trkA 信息核糖核酸 (mRNA) 的表現，並且也增加海馬體中 NGF mRNA 的表現^[19]。在周圍神經再生方面，GRb₁ 對 NGF 的影響機轉目前仍然未知。周圍神經斷傷後，影響神經再生的因素有環境因素和神經元本身的狀況，GRb₁ 是否作用在環境因素上，如影響 Schwann 細胞或巨噬細胞；還是作用神經元上，例如增加神經營養因子的作用，或改變細胞膜的特性，這值得進一步探討。

這次實驗，C+N+G 組的神經再生組織，不如 C+N 組與 C+G 組成熟，就結果而言，可能讀者會誤認為 GRb₁ 不能增加 NGF 的作用，但是，周圍神經再生的過程中，Schwann 細胞會分泌 NGF，所以無法為此下定論。然而，矽膠管內填 NGF，其對大鼠而是外源性的 NGF，所以依動物實驗的結果，認為 GRb₁ 無法增強外源性 NGF 的作用。

五、計畫成果自評

實驗結果已達到計劃書中之目標。同時，本實驗成功的利用動物模式證明人參皂甘 Rb₁ 可加強神經生長因子促進神經再生之能力的結果為世界首見，此結果已匯整投稿中。

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.
- [11] Takemoto Y, Ueyama T, Saito H, Horio S, Sanada S, Shoji J, Yahara S, Tanaka O, Shibata S. Potentiation of nerve growth factor-mediated nerve fiber production in organ cultures of chicken embryonic ganglia by ginseng saponins: structure-activity relationship. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 32(8):3128-33, 1984.
- [12] Himi T, Saito H, Nishiyama N. Effect of ginseng saponins on the survival of cerebral cortex neurons in cell cultures. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 37(2):481-4, 1989.
- [13] Nishiyama N, Cho SI, Kitagawa I, Saito H. Malonylginsenoside Rb₁ potentiates nerve growth factor (NGF)-induced neurite outgrowth of cultured chick embryonic dorsal root ganglia. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 17(4):509-13, 1994.
- [14] Saito H, Suda K, Schwab M, Thoenen H. Potentiation of the NGF-mediated nerve fiber outgrowth by ginsenoside Rb₁ in organ cultures of chicken dorsal root ganglia. *Japanese Journal of Pharmacology*. 27(3):445-51, 1977.
- [15] Rosen JM, Padilla JA, Nguyen KD, Siedman J, Pham HN. Artificial nerve graft using glycolide trimethylene carbonate as a nerve conduit filled with collagen compared to sutured autograft in a rat model. *Journal of Rehabilitation Research & Development*. 29(2):1-12, 1992.
- [16] Chen YS, Hsieh CL, Tsai CC, Chen TH, Cheng WC, Hu CL, Yao CH. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials*. 21(15):1541-7, 2000.
- [17] Woolley AL, Hollowell JP, Rich KM. First place--Resident Basic Science Award 1990. Fibronectin-laminin combination enhances peripheral nerve regeneration across long gaps. *Otolaryngology - Head & Neck Surgery*. 103(4):509-18, 1990.
- [18] Danielsen N, Muller H, Pettmann B, Williams LR, Davis GE, Engvall E, Manthorpe M, Varon S. Rat amnion membrane matrix as a substratum for regenerating axons from peripheral and central neurons: effects in a silicone chamber model. *Brain Research*. 467(1):39-50, 1988.
- [19] Salim KN, McEwen BS, Chao HM. Ginsenoside Rb₁ regulates ChAT, NGF and trkA mRNA expression in the rat brain. *Brain Research. Molecular Brain Research*. 47(1-2):177-82, 1997.