

碱性成纤维细胞生长因子对许旺细胞在小肠黏膜下层支架上黏附及增殖的影响*☆◆

张开伟¹, 肖睿², 段宏¹, 项舟^{1,3}, 李秀群³

Effect of basic fibroblast growth factor on adhesion and proliferation of Schwann cells on small intestinal submucosa scaffold

Zhang Kai-wei¹, Xiao Rui², Duan Hong¹, Xiang Zhou^{1,3}, Li Xiu-qun³

Abstract

BACKGROUND: Schwann cells combined with small intestinal submucosa (SIS) is a feasible way to construct artificial nerve. Basic fibroblast growth factor (bFGF) can promote proliferation of Schwann cells.

OBJECTIVE: To explore the effects of bFGF on adhesion and proliferation of Schwann cells on scaffold of SIS.

METHODS: The second passage of Schwann cells isolated from neonatal SD rats were seeded onto the surface of SIS scaffold and incubated with 50 µg/L bFGF, which served as experimental group. The cultures of SC and SIS without bFGF were used as control. The cell proliferation was measured with MTT assay, and the adhesion of Schwann cells was determined by the rate of cell adhesion; the cell cycle of SC was examined by flow cytometry. The morphology of cells and cell adhesion on SIS were observed by contrast phase microscope, hematoxylin-eosin (HE) staining and scanning electron microscopy.

RESULTS AND CONCLUSION: Absorbance value of SC in experimental group was higher than the control group ($P < 0.05$). The cell adhesion rate was (69.47±3.17)% and (44.58±1.76)% respectively for experimental and control groups ($P < 0.05$). G₂/M+S percentage of SCs was significantly greater in experimental group than the control group ($P < 0.05$). HE staining and microscopy showed that the number of attached cells was more and cell adhesion was better in experimental group compared with the control group at 7 days after culture. bFGF is effective in improving the adhesion and proliferation of SCs on SIS scaffold, and also promoting construction of tissue-engineered nerve conduit based on the combination with SC and SIS.

Zhang KW, Xiao R, Duan H, Xiang Z, Li XQ. Effect of basic fibroblast growth factor on adhesion and proliferation of Schwann cells on small intestinal submucosa scaffold. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(21):3827-3831. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 许旺细胞复合小肠黏膜下层是构建人工神经的可行方法, 碱性成纤维细胞生长因子有促进许旺细胞增殖的作用。

目的: 验证碱性成纤维细胞生长因子对许旺细胞在小肠黏膜下层支架材料表面的细胞增殖及黏附状态的影响。

方法: 将体外分离培养的 2 代 SD 大鼠许旺细胞接种于小肠黏膜下层支架材料上并加入 50 µg/L 的碱性成纤维细胞生长因子复合培养为实验组, 以单纯的许旺细胞复合小肠黏膜下层作为对照组, 分别用 MTT 法测定细胞增殖能力, 细胞黏附率检测细胞在支架上的黏附情况, 用流式细胞仪测定细胞分裂周期, 并用苏木精-伊红染色及描电镜观察细胞形态及与材料的贴附情况。

结果与结论: MTT 显示实验组的细胞增殖吸光度值明显高于对照组 ($P < 0.05$), 实验组的细胞黏附率为(69.47±3.17)%, 对照组为(44.58±1.76)%($P < 0.05$), 细胞周期显示实验组比对照组的 G₂/M+S 期细胞百分含量高($P < 0.05$), 培养 7 d 后的苏木精-伊红染色及扫描电镜显示实验组比对照组材料上聚集的细胞数量多, 细胞形态伸展更明显, 细胞贴附力更好。因此碱性成纤维细胞生长因子可明显地改善许旺细胞在小肠黏膜下层上的增殖及黏附能力, 能促进许旺细胞与小肠黏膜下层支架的复合而构建人工神经导管。

关键词: 碱性成纤维细胞生长因子; 许旺细胞; 小肠黏膜下层; 增殖; 黏附

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.21.007

张开伟, 肖睿, 段宏, 项舟, 李秀群. 碱性成纤维细胞生长因子对许旺细胞在小肠黏膜下层支架上黏附及增殖的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(21):3827-3831. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

许旺细胞是周围神经系统的主要胶质细胞, 具有分泌神经因子、产生细胞外基质、分泌细胞黏附分子、引导轴突再生的功能^[1], 因此是周围神经组织工程中最主要的种子细胞。小肠黏膜下层小肠黏膜下层(small intestinal submucosa, SIS)是一种天然的细胞外基质材料, 在骨科领域已被作为支架材料运用于骨、

肌腱、软骨等人工组织的构建^[2-5]。目前已有少量学者以许旺细胞为种子细胞, 以SIS为支架构建了人工神经^[6-7]。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)对周围神经胶质细胞有促进分裂、增殖、迁移的作用^[8-9]。已有研究发现bFGF能促进许旺细胞在去细胞基膜管支架上的黏附及增殖^[10], 但关于bFGF对许旺细胞在SIS上的生长、增殖、黏附性影响的却有待进一步研究。实验通过观察外源性bFGF对许旺细胞在SIS上的贴附状

¹Department of Orthopaedics, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; ²Department of Orthopaedics, the First People's Hospital of Yibin, Yibin 644000, Sichuan Province, China; ³Division of Stem Cells and Tissue Engineering, State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Zhang Kai-wei☆, Studying for doctorate, Associate chief physician, Department of Orthopaedics, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China zkw1973@yahoo.com.cn

Correspondence to: Xiang Zhou, Doctor, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, Department of Orthopaedics, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; Division of Stem Cells and Tissue Engineering, State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China xiangzhou15@hotmail.com

Supported by: the Key Science and Technology Development Program of Sichuan Province, No. 200803010*

Received: 2010-01-07
Accepted: 2010-03-17

¹四川大学华西医院骨科, 四川省成都市 610041;
²宜宾市第一人民医院骨科, 四川省宜宾市, 644000;
³四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室干细胞与组织工程研究室, 四川省成都市 610041

张开伟☆, 男, 1973年生, 贵州省贵阳市人, 汉族, 华西临床医学在读博士, 副主任医师, 主要从事骨与关节损伤方面的研究。
 zkw1973@yahoo.com.cn

通讯作者: 项舟, 教授, 主任医师, 博士生导师, 四川大学华西医院骨科, 四川省成都市 610041
 xiangzhou15@hotmail.com

中图分类号: R318
 文献标识码: B
 文章编号: 1673-8225 (2010)21-03827-05

收稿日期: 2010-01-07
 修回日期: 2010-03-17
 (20100107018/W/A)

态及增殖活性的观察, 从而为bFGF促进SIS复合许旺细胞构建组织工程神经导管提供实验依据。

1 材料和方法

设计: 随机对照细胞实验。

时间及地点: 实验于2009-01/12在四川大学华西医院干细胞及组织工程实验室完成。

材料: 出生两三天的清洁级SD乳鼠, 由四川大学华西医学中心动物中心提供, 实验过程对动物的处置符合动物伦理学要求。SIS来自健康成年猪的小肠。实验过程中对动物处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[11]。

主要试剂及仪器

试剂及仪器	来源
H-DMEM、胎牛血清、胰酶	GIBCO 公司
II型胶原酶、阿糖胞苷	SIGMA 公司
bFGF	暨南大学生物试剂中心
鼠抗 S-100 单克隆抗体	北京博奥深生物公司
相差显微镜	日本 OLYMPUS 公司
S-520 扫描电镜	日本 HITACHI 公司
酶标板自动读数仪	美国 MOLECULAR DEVICES 公司
流式细胞仪	美国 BINDER 公司

实验方法:

SIS的制备: 取成年猪的新鲜空肠, 刮除黏膜层、浆膜层和肌层。按Abraham的化学方法^[12]进行脱细胞处理后于-70℃冻干, 分别制备成1 cm×1 cm, 0.5 cm×0.5 cm两种规格, 铝塑袋封装, 环氧乙烷消毒备用。

许旺细胞的培养及鉴定: 取新生两三天的SD乳鼠, 引颈处死后取双侧坐骨神经, 去除神经外膜, 分别予2.5 g/L的胰酶、2 g/L的II型胶原酶消化10 min后终止消化, 1 500 r/min离心5 min, 弃其上清液, 予含体积分数为10%胎牛血清的DMEM重悬细胞, 差速贴壁20 min后移入到培养瓶中, 于体积分数为5%CO₂、37℃培养箱中培养24 h后, 加入10⁻⁵ mol/L阿糖胞苷作用24 h以纯化细胞, 隔日换液, 培养6~8 d细胞铺满瓶底后进行传代。取第2代培养的许旺细胞制成细胞爬片, 行S-100荧光免疫细胞化学染色鉴定, 并在电镜下随机选取10个视野计数阳性细胞数, 以阳性细胞百分比表示细胞的纯度。

细胞黏附率测定(沉淀法): 实验组为许旺细胞复合SIS+ bFGF组, 对照组为许旺细胞复合SIS

组。将1 cm×1 cm的SIS材料置于24孔板中, 分别予以PBS液、DMEM液、体积分数10%的胎牛血清预湿处理24 h。取第2代的许旺细胞, 消化、离心后收集细胞并计数。以1×10⁸ L⁻¹的密度接种于SIS上复合培养, 其中实验组每孔加入50 μg/L的bFGF。两组每个时相点均取5个复孔(n=5)。于培养后24 h后轻轻敲打材料, 弃除未黏附的细胞。将材料上的细胞消化后计数, 并计算细胞的黏附率。

$$\text{黏附率} = \frac{\text{黏附细胞数}}{\text{接种细胞数}} \times 100\%$$

许旺细胞复合SIS后细胞增殖活力检测(MTT法): 将0.5 cm×0.5 cm的SIS置于96孔中, 按上述方法以5×10³/孔的密度接种于材料上, 实验组加入bFGF(50 μg/L), 对照组为单纯的细胞复合培养。于培养后1, 3, 5, 7, 9 d每组各取6孔, 弃去培养液, 加入20 μL/孔的MTT液(5 g/L), 继续培养4 h, 吸去原液, 加入200 μL/孔的DMSO。振荡10 min, 在酶标仪上以490 nm波长测定吸光度值(A值)。以时间为横坐标、A₄₉₀值为纵坐标绘制生长曲线。

苏木精-伊红染色: 将复合许旺细胞的SIS材料分别于培养1, 3, 5, 7 d后从孔板中取出, PBS漂洗后, 予苏木素-伊红染色, 观察细胞在SIS上的生长情况。

扫描电镜检测: 将复合许旺细胞的SIS材料于培养7 d后从孔板中取出, PBS漂洗后, 25 g/L戊二醛固定, 梯度乙醇脱水后, 己酸酐戊酯里置换, 自然干燥后, 表面喷金, 扫描电镜观测许旺细胞在SIS的黏附情况。

流式细胞仪检测: 按上述方法以1×10⁸ L⁻¹密度将许旺细胞接种于SIS上于6孔板中培养, 并设不加材料的对照组。每时相点设3个复孔(n=3), 分别于1, 3, 5, 7, 9 d用TNE消化后收集细胞。将标本用流式细胞仪检测许旺细胞的细胞周期, 计算细胞增殖指数(proliferative index, PI)。

$$PI = G_2/M+S \text{ 期细胞百分含量}$$

主要观察指标: ①许旺细胞的鉴定。②细胞增殖活力。③细胞苏木精-伊红染色及扫描电镜观察。④细胞计数及细胞周期。

设计、实施、评估者: 设计为第一、四及通讯作者, 实施为第一、三作者, 评估为第五作者, 均经过系统培训。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 16.0软件进行统计学分析, 采用t检验进行两组均数间的比较, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以P < 0.05为差

异有显著意义。

2 结果

2.1 许旺细胞的荧光免疫细胞化学染色鉴定 许旺细胞胞浆及突起呈绿色，胞核呈蓝色，细胞膜及胞核结构完整，细胞多呈双极状或三角形，排列规整，呈栅栏状或漩涡状，细胞分布均匀，细胞纯度达90%，见图1。

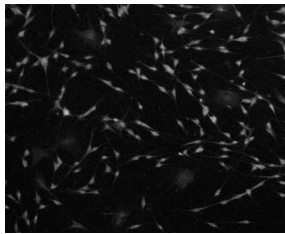


Figure 1 Immunocytochemical staining of Schwann cells (Fluorescence microscope, $\times 200$)
图1 许旺细胞的免疫细胞化学染色 (荧光显微镜, $\times 200$)

2.2 细胞黏附率 按细胞黏附率的计算公式测得两组的细胞黏附率，实验组的细胞黏附率为(69.47 \pm 3.17)%，对照组为(44.58 \pm 1.76)%，两组的细胞黏附率比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.3 细胞增殖活力测定 用测得的A值绘制细胞生长曲线。结果显示实验组在第2~4天，而对照组在3~7 d处于对数生长期，见图2；实验组在第5天，而对照组在第7天分别达到各自的峰值，此后进入平台期，实验组的曲线整体左移，两组在第1天的A值比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。

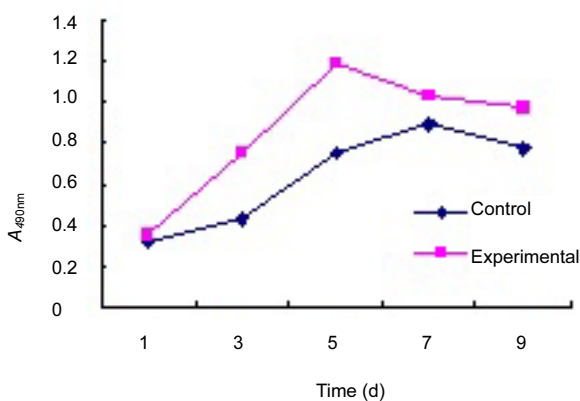
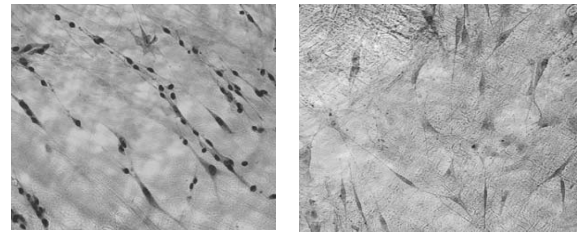


Figure 2 Effect of small intestinal submucosa on the viability of Schwann cells
图2 SIS对许旺细胞活力的影响

2.4 苏木精-伊红染色结果 两组在复合培养1 d后细胞多呈短梭形，突起不明显，细胞数量较少，贴附于材料的边缘生长；实验组在第3天后的细胞数量增多，形态也较对照组展开明显；两组在第5天时细胞之间均相互连接；两组均在3~5 d向材料的中央区域聚集；实验

组第7天细胞突起明显增长，形态多为长双极状，细胞生长的密度更高，细胞数量更多，而对照组的细胞多呈长三角形或长梭形，突起相对较短，见图3。

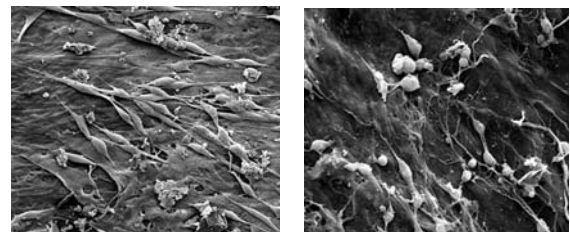


a: Experimental group b: Control group

Figure 3 Histological observation of two groups 7 days after culture of Schwann cells and small intestinal submucosa (HE, $\times 200$)

图3 两组许旺细胞与SIS复合培养7 d后组织学观察 (苏木精-伊红染色, $\times 200$)

2.5 扫描电镜观察结果 复合培养1 d后，两组的细胞散在分布于材料表面，形态不太规则，多呈短梭形，细胞间无明显连接。复合培养3~5 d后，实验组贴附于SIS表面的细胞明显增多，细胞突起增长较对照组更明显，形态展开多呈长梭形双极结构，两组细胞沿着胶原纤维方向延伸，深入于材料的孔隙中。第7天实验组比对照组的细胞沿纤维排列更密集而规整，并可见重叠生长，细胞数量及细胞周围分泌的蛋白颗粒更多，细胞形态拉伸明显且呈长双极状，见图4。



a: Experimental group b: Control group

Figure 4 Scanning electron microscopy observation of two groups 7 days after culture of Schwann cells and small intestinal submucosa ($\times 1200$)

图4 两组许旺细胞与SIS复合培养7 d后SEM观察 (扫描电镜, $\times 1200$)

2.6 细胞计数及细胞周期测定 见表1, 2。

表1 不同时相点细胞计数
Table 1 Cell numbers at different cultural time ($\bar{x} \pm s, n=3, \times 10^5$)

Group	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
Control	0.72 \pm 0.16	1.22 \pm 0.21	1.73 \pm 0.20	1.88 \pm 0.19	1.58 \pm 0.17
Experimental	0.82 \pm 0.22	1.84 \pm 0.25	2.52 \pm 0.31	2.27 \pm 0.28	1.93 \pm 0.25
P	> 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

表2 SIS对许旺细胞周期的影响
Table 2 Effect of small intestinal submucosa on the cell cycle of Schwann cells ($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Group	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
Control	8.63±1.65	9.92±1.83	12.18±2.38	13.07±2.63	10.61±2.28
Experimental	9.34±2.79	12.15±3.03	17.57±3.68	19.53±4.22	15.32±3.02
<i>P</i>	> 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

两组的细胞数量及PI指数均由1~5 d递增, 对照组到7 d时PI指数达到高峰, 而实验组到第5天就已达高峰, 此后两组均呈衰减趋势。实验组第7天的细胞数明显多于对照组($P < 0.05$), 两者在第1天的细胞数及PI指数差异均无显著性意义($P > 0.05$), 但3, 5, 7, 9 d后两者的差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论

神经组织工程的种子细胞在支架材料上的贴附、增殖、迁移是构建人工神经的最基本保证, 而细胞与材料的表面黏附性是细胞增殖及迁移的前提^[13-14]。实验已证实许旺细胞也支撑着支架材料引导神经的再生^[15], 许旺细胞对轴索起营养、保护和支持作用^[16], 是长距离神经缺损后轴突再生的必需条件^[17-18]。因此许旺细胞已被广泛地作为构建人工神经的种子细胞。许旺细胞分泌细胞外基质的功能是影响细胞黏附性的重要因素, 其中层粘连蛋白是细胞外基质中最主要的黏附蛋白, 能为细胞在支架材料上的生长提供较强的黏附性, 并能提高细胞的迁移速度^[19-20]。此外, 细胞与材料的贴附还取决材料的表面形貌、理化特性、及生物活性等因素。

目前的神经组织工程的构建多采用天然材料、高分子合成材料、复合材料等, 但所有的支架材料普遍存在黏附性不理想的欠缺, 直接影响了细胞在支架上的生长、增殖能力。SIS是一种富含胶原并类似于细胞外基质的三维天然生物材料, 交错排列的纤维结构形成了适当的粗糙表面, 有利于细胞的伸展及迁移。SIS还含多种细胞营养因子(如bFGF、TGF等)^[21], 可以促进细胞的增殖及分裂, 因此作为神经组织工程的支架材料具有得天独厚的优势, 然而国内外关于许旺细胞在SIS上的黏附、增殖特性的研究却相对较少。苏琰等^[22]已初步证实了许旺细胞能在小肠黏膜下层上黏附、增殖, 并保持着细胞正常的分泌神经营养因子的功能。即便许旺细胞能分泌细胞黏附分子及各种细胞营养因子, 但毕竟SIS的微观形貌不具备宿主细胞生长的理想多孔状三维结构, 而且SIS上内源性bFGF的含量毕竟有限, 对于影响细胞在材料上增殖的程度仍难以判定, 因此细胞在材料上的黏附、增殖仍有待改善。作者在许旺细胞复合小肠黏膜下层的实验过程中, 确实发现许旺细胞在SIS上的增殖

及黏附率并不满意。鉴于50 μg/L浓度的bFGF对许旺细胞的促增殖作用确实^[10], 因此实验在许旺细胞复合SIS培养过程中, 也以此浓度加入外源性bFGF以观察其对许旺细胞在小肠黏膜下层上的黏附、增殖、迁移等细胞生物行为及功能活性的影响。

实验通过细胞的黏附率测试发现实验组的细胞黏附率高于对照组, 表明bFGF能明显地改善许旺细胞在SIS的黏附性。MTT显示实验组的细胞对数生长期较对照组提前出现, 峰值也较后者提前到达, 培养7 d后的细胞数量仍明显多于对照组, 而且细胞周期也显示实验组的细胞增殖指数较对照组高, PI指数也提前2 d到达, 这说明bFGF能促进许旺细胞在小肠黏膜下层上的增殖, 这也印证了关于bFGF对许旺细胞的S期数量增加有明显促进作用的报道^[23]; 相差显微镜和苏木精-伊红染色发现: 许旺细胞在材料上贴附后, 伴随着细胞数量的增多, 细胞逐渐由材料边缘向中心生长, 细胞形态也逐步伸展, 细胞间形成了连接, 表明两组的许旺细胞在材料上贴附以后, 进行了与增殖同步的迁移过程。实验组在第7天的细胞形态及贴附的细胞数量明显强于对照组, 从侧面反映出bFGF促进了许旺细胞在材料上的增殖及黏附。扫描电镜观察到细胞接种3 d后, 两组的许旺细胞间均以突起相互连接, 到第5天后实验组的细胞突起明显增长呈长双极状, 并沿着SIS的胶原纤维结构纵向伸展并排列成栅栏状, 形成了类似于“Bungner”带的结构^[24], 而对照组的细胞沿纤维的聚集相对较少, 排列也欠规整, 说明bFGF促进了许旺细胞在材料上的成髓鞘趋势, 这对于许旺细胞复合SIS构建人工神经具有重要意义。此外实验组细胞周围的蛋白颗粒分泌明显增多, 而且这些这些颗粒物伴随着细胞的增殖而增长, 因此有可能是细胞分泌的细胞外基质蛋白, 这也提示bFGF可能促进了许旺细胞的分泌功能。关于bFGF增加许旺细胞在SIS上黏附的机制仍不明确, 由于许旺细胞的黏附性和增殖可以通过细胞外信号(如细胞外基质)转导来调控^[25-26], 而bFGF对细胞黏附性的影响是通过细胞表面高亲和性受体(如整合素受体)介导来实现的, 因此作者推测bFGF也可能是通过细胞外基质的整合素受体介导的膜外信号转导来调节细胞在材料上黏附性的。

实验发现bFGF改善了许旺细胞与SIS的亲合性, 提高了细胞在材料上的贴附力, 促进了许旺细胞在SIS上的增殖、迁移, 而且细胞增殖的速度、贴附细胞的数量与细胞在材料上的迁移程度相匹配, 对于许旺细胞复合小肠黏膜下层而构建人工神经起到了体外的介导作用。然而本研究只是从形态学及细胞活性方面阐述bFGF对许旺细胞在SIS上的生长能力的影响, 其确切的机制有待从分子学水平及信号传导等层次来深入地研究。

4 参考文献

- [1] Phillips JB, Bunting SC, Hall SM, et al. Neural tissue engineering: a self-organizing collagen guidance conduit. *Tissue Eng.* 2005;11: 1611-1617.
- [2] Suckow MA, Voytik-Harbin SL, Terill LA, et al. Enhanced bone regeneration using porcine small intestinal submucosa. *J Invest Surg.* 1999;12(5):277-287.
- [3] Pribitkin EA, Ambro BT, Bloeden E, et al. Rabbit ear cartilage regeneration with a small intestinal submucosa graft. *Laryngoscope.* 2004;114(9):1-19.
- [4] Gilbert TW, Stewart-Akers AM, Simmons-Byrd A, et al. Degradation and remodeling of small intestinal submucosa in canine Achilles tendon repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89(3):621-630.
- [5] Gumina S, Patti AM, Vulcano A, et al. Culture of human rotator cuff cells on orthobiologic support (porcine small intestinal submucosa). *Chir Organi di Mov.* 2009;93 Suppl 1:S65-70.
- [6] Su Y, Zhang CQ, Sun LY, et al. *Zhonghua Waike Zazhi.* 2004; 6(10):1136-1139.
苏琰, 张长青, 孙鲁源, 等. 小肠黏膜下层桥接周围神经缺损的实验研究[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2004, 6(10):1136-1139.
- [7] Han TK, Dou QY, Chen F, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2008, 12(49):9635-9638.
韩同坤, 窦庆寅, 陈峰, 等. 复合许旺细胞的猪肠黏膜下层桥接修复周围神经缺损[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(49):9635-9638.
- [8] Dong Z, Sinanan A, Parkinson D, et al. Schwann cell development in embryonic mouse nerves. *J Neurosci Res.* 1999;56:334.
- [9] Watabe K, Fukuda T, Tanaka J, et al. Mitogenic effects of platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta, and heparin-binding serum factor for adult mouse Schwann cells. *J Neurosci Res.* 1994;39(5):525-534.
- [10] Zhou JS, Zhong YX, Xiao YZ. *Zhonghua Waike Zazhi.* 2004; 27(4): 275-277.
周建生, 钟衍学, 肖玉周. 碱性成纤维细胞生长因子对组织工程化外周神经的影响[J]. *中华显微外科杂志*, 2004, 27(4): 275-277.
- [11] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. *Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals.* 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [12] Abraham GA, Murray J, Billiar J, et al. Evaluation of the porcine intestinal collagen layer as a biomaterial. *J Biomed Mater Res.* 2000;51(3):442-452.
- [13] Qin TW, Yang ZM, Cai SX, et al. *Zhongguo Xiufu Zhongjian Waike Zazhi.* 1999, 13(1): 31-37.
秦廷武, 杨志明, 蔡绍哲, 等. 组织工程中细胞与材料的黏附作用[J]. *中国修复重建外科杂志*, 1999, 13(1): 31-37.
- [14] Kim SH, Hoshiba T, Akaike T. Effect of carbohydrates attached to polystyrene on hepatocyte morphology on sugar-derivatized polystyrene matrices. *J Biomed Mater Res A.* 2003;67(4):1351-1359.
- [15] Evans PJ, Mackinnon SE, Levi AD, et al. Cold preserved nerve allografts: Changes in basement membrane, viability, immunogenicity, and regeneration. *Muscle Nerve.* 1998;21:1507-1522.
- [16] Dezawa M, Adachi-Usami E. Role of schwann cells in retinal ganglion cell axon regeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2000; 19(2): 171-204.
- [17] Fansa H, Keilhoff G. Comparison of different biogenic matrices seeded with cultured Schwann cells for bridging peripheral nerve defects. *Neurol Res.* 2004;26: 167.
- [18] Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering current challenges and expanding opportunities. *Scienc.* 2002;(8):295:1009-1014.
- [19] Martini R. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J Neurocytol.* 1994;23(1): 1-28.
- [20] Bryan DJ, Holway AH, Wang KK, et al. Influence of glial growth factor and Schwann cells in bioresorbable guidance channel of peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng.* 2000;6(2):129-138.
- [21] Voytik-Harbin SL, Brightman AO, Kraine MR, et al. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. *J Cell Biochem.* 1997; 67 (4) : 478.
- [22] Su Y, Zhang CQ, Zhang KG, et al. *Zhonghua Waike Zazhi.* 2006;44(24): 1713-1714.
苏琰, 张长青, 张开刚, 等. 小肠黏膜下层组织与许旺细胞生物相容性的体外研究[J]. *中华外科杂志*, 2006, 44(24):1713-1714.
- [23] Peuvre P, Laquerriere A, Paresy M, et al. Establishment of adult rat Schwann cell cultures: effect of bFGF, α -MSH, NGF, PDGF, and TGF- β on cell cycle. *Exp Cell Research.* 1994; 214(2):543-550.
- [24] Siuis N, SchaHer HE, Schulte-Eversum C, et al. Nerve regeneration across a 2 cm gap in the rat median nerve using a resorbable nerve conduit filled with Schwann cells. *J Neurosurg.* 2005;103 (6): 1067-1076.
- [25] Garratt AN, Voiculescu O, Topilko P, et al. A dual role of erbB2 in myelination and in expansion of the schwann cell precursor pool. *J Cell Biol.* 2000;148(5):1035-1046.
- [26] Feltri ML, Graus Porta D, Previtali SC, et al. Conditional disruption of beta1 integrin in schwann cells impedes interactions with axons. *J Cell Biol.* 2002;156(1):199-209.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 四川省宜宾市重点科技计划项目 (200803010)。

利益冲突: 无其他利益冲突。

课题意义: 近几年来以许旺细胞复合小肠黏膜下层构建组织工程化神经取得了较满意的实验效果, 而细胞在支架上的黏附及增殖是影响这种人工神经构建成功与否的关键环节, 关于外源性干预措施促进种子细胞在支架上的黏附及增殖的影响缺乏深入研究。实验发现碱性成纤维细胞生长因子能明显地促进许旺细胞在小肠黏膜下层上的黏附及增殖, 从而为拓宽人工神经导管的构建方法提供了实验依据。

偏倚及不足: 课题关于碱性成纤维细胞生长因子如何在体外改善许旺细胞在材料上的代谢、分泌、黏附及增殖等机制仍缺乏更深层次的研究, 而且关于体内碱性成纤维细胞生长因子对细胞在材料上的影响尚需动物实验来进一步验证。

课题评估的“金标准”: 实验采用的细胞黏附率(沉淀法)、扫描电镜是观测细胞在支架上黏附性的常用检测方法, 所采用的 MTT 及细胞周期检测是评价细胞增殖能力的主要手段, 以上实验技术在文献中均被广泛使用。

提供临床借鉴的价值: 碱性成纤维细胞生长因子促进了许旺细胞在小肠黏膜下层上的体外细胞活性, 为增加体内构建这种人工神经导管的成功率提供了实验基础。