

去细胞同种异体神经支架种植许旺细胞的体外培养*

兰学文

In vitro culture of Schwann cells on acellular allogenic nerve scaffold

Lan Xue-wen

Department of Orthopaedics, Third Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530031, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Lan Xue-wen ★, Master, Department of Orthopaedics, Third Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530031, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
lxwxw1221@163.com

Received: 2010-06-23
Accepted: 2010-08-06

Abstract

BACKGROUND: Previous study has investigate the influence of compound enzyme digestion and differential adherence method on culture of Schwann cells, and alkylphenol polyoxyethylene (Triton X-100) preparation for allogenic nerve scaffold.

OBJECTIVE: To prepare an allogenic nerve scaffold using chemical extraction method and culture Schwann cells with the scaffold *in vitro*.

METHODS: The bilateral sciatic nerves of Wistar rats were treated with 30 g/L trinitrotoluene and 40 g/L sodium deoxycholate for extractions. The middle piece of the extracted samples and the un-extracted samples was harvested for hematoxylin-eosin staining, S-100 and laminin immunohistochemical staining, as well as transmission electron microscope observation. Trypsin and collagenase were used to separate Schwann cells from the double sciatic nerves and brachial plexus of SD fetal rats. Highly purified Schwann cells were achieved with differential adherence and Arab-c to eliminate fibroblast. Finally the Schwann cells were injected into the acellular nerve scaffold and the consequence studies were performed by transmission electron microscope and scanning electron microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: The cells and myelin sheath were removed and basal membrane component was preserved in the sciatic nerve after extraction procedure of trinitrotoluene and sodium deoxycholate. The electron microscopy showed that the extracted nerves are composed of empty basal lamina tubes and collagen fibers between tubes. The residual S-100 protein in nerves was significantly reduced along with the increasing times of extraction, scaffold structure was destroyed after repeated extractions. Acellular allogenic nerve scaffold fits for the growth of Schwann cells, and can transform to align *in vitro*. Chemical extraction that uses the detergents of Triton X-100 and deoxycholate is an ideal method to prepare nerve scaffold with biomimetic structure, by the method cells can be removed from the sciatic nerve of Wistar rats while the basal lamina component preserved in the acellular nerve. Allogenic nerve scaffold populated Schwann cells may be an ideal substance to repair the nerve defect after injuries.

Lan XW. In vitro culture of Schwann cells on acellular allogenic nerve scaffold. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(51):9522-9526. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 前期的研究中分别探讨了使用复合酶消化法及差速贴壁法对许旺细胞培养的影响以及聚氧乙烯辛烷基酚 (Triton X-100) 制备同种异体神经支架。

目的: 通过化学萃取法制备同种异体神经支架, 并将培养的许旺细胞与支架进行体外结合培养。

方法: 取 Wistar 大鼠双侧坐骨神经, 运用 30 g/L 三硝基甲苯和 40 g/L 脱氧胆酸钠分别萃取 1, 2 和 3 次, 在萃取神经和未萃取神经的中段取材, 行苏木精-伊红染色, S-100 及 Laminin 免疫组织化学染色及透射电镜检测。取 SD 胎鼠坐骨神经及臂丛神经, 使用复合酶消化, 差速贴壁及 Arab-c 抑制成纤维细胞生长的培养方法获得大量高纯度的许旺细胞。再把许旺细胞注入同种异体神经支架内, 并行透射电镜及扫描电镜观察。

结果与结论: 用三硝基甲苯和脱氧胆酸钠萃取后, 坐骨神经内细胞和髓鞘被清除, 神经基底膜被保留。电镜下可见萃取后的神经由空的神经基底膜管和管之间的胶原纤维构成。萃取次数增加后, 神经内残留的 S-100 蛋白显著减少, 但反复萃取后支架结构受破坏。去细胞同种异体神经支架适合许旺细胞体外生长, 并有迁移排成行的特性。结果提示, 用三硝基甲苯和脱氧胆酸钠萃取 2 次可去除细胞而保留神经基底膜管, 是制备具有仿生结构神经支架的理想方法。神经支架种植许旺细胞后可能成为一种理想的神经缺损修复材料。

关键词: 化学萃取; 神经支架; 许旺细胞; 去细胞; 同种异体; 人工神经

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.51.005

广西医科大学第三附属医院骨科, 广西壮族自治区南宁市 530031

兰学文 ★, 男, 1977 年生, 广西壮族自治区柳州市人, 壮族, 2006 年广西医科大学毕业, 硕士, 主要从事神经组织工程学实验研究。
lxwxw1221@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)51-09522-05

收稿日期: 2010-06-23
修回日期: 2010-08-06
(20100623014/W·Y)

兰学文. 去细胞同种异体神经支架种植许旺细胞的体外培养 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(51):9522-9526. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

理想的人工神经是以具有良好生物相容性的材料为载体, 与有活性的细胞(许旺细胞等)结合而成的具有特定三维结构和生物活性的复合体, 引导再生神经生长到远侧神经残端, 抑制神经瘤形成和纤维瘢痕组织长入, 产生营养因子在

神经缺损区聚集。一般说来, “人工神经”是由支架材料和种子细胞、细胞外基质以及诱导和促进生长的因子等几部分组成的有机统一体。

关于人工神经支架, 目前多采用可生物降解的人工合成材料如聚乳酸^[1]、聚羟基乙酸等^[2]。这些材料制成的人工神经支架的物理性能、生物性能及其形态结构与正常的体内周围神经相比, 尚有很大的差距。Dumont等^[3]首先采用化

学萃取法制备出异体神经去细胞基膜管,与体外培养的自体许旺细胞相结合,成功地修复了Wistar大鼠坐骨神经缺损。本实验通过苏木精-伊红染色、免疫组织化学染色及透射电镜观察,研究新鲜神经与化学萃取后的神经支架组织形态学异同点,并通过许旺细胞与神经桥接物的混合培养进行了体外实验。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 实验于2005-09/2006-06在广西医科大学中心实验室(BSL-2)完成。

材料: SPF级Wistar大鼠,体质量200~250 g,两三个月龄,雌雄不限,用于萃取坐骨神经。SPF级生后1~3 d SD乳鼠,用于提取许旺细胞。实验动物均由广西医科大学动物实验中心提供(许可证号: scxk桂200320003)。

主要试剂、药品及仪器:

主要试剂、药品及仪器	来源
高糖 DMEM 培养基	美国 GIBCO 公司
胎牛血清	杭州四季青生物有限公司
胰蛋白酶、胶原酶	美国 HYCLONE 公司
谷氨酰胺液	SIGMA 公司
青霉素,链霉素	山东鲁抗医药公司
Triton X-100(三硝基甲苯)、Sodium Deoxycholate(脱氧胆酸钠)	上海生物工程有限公司
9、S-100 A4 Ab-8、Laminin Ab-1、HRP-Polymer-Goat anti-Rabbit IgG	福州迈新生物技术公司
二氧化碳培养箱	美国 Thermo Forma 公司
透射电子显微镜(H-500 型)	日本日立
扫描电子显微镜(日本电子 JSM-T300 型)	日本
倒置相差显微镜(Axiovert25 型)	德国 Zeiss 公司
病理图像分析仪(DMR+Q550 型)	德国 Leica

实验方法:

细胞培养: 联合使用复合酶消化法及差速贴壁法。

将生后1~3 d的SD乳鼠断颈致死浸入体积分数75%乙醇5 min,取双侧坐骨神经及臂丛神经。放入D-Hank's液中,洗去血污,剥去外覆结缔组织,剪碎成糊状。加入3 g/L胶原酶2 mL及2.5 g/L胰蛋白酶1 mL,混匀入37 °C水浴箱中消化15~20 min,消化过程中注意用吸管轻轻吹打混匀。加入完全培养基4 mL终止消化。800 r/min离心5 min,弃上清液后,加含体积分数20%胎牛血清的高糖DMEM培养液。吸管轻轻吹打匀细胞为悬浊液,分置于覆有已干燥的0.5%多聚赖氨酸的培养瓶中于37 °C、体积分数为5%CO₂培养箱中孵化30 min后,换瓶再培养30 min。以差速贴壁法贴附走大部分成纤维细胞,未贴壁的多为许旺细胞。吸出悬浊液入另一培养瓶置于培养箱中培养24 h后,许旺细胞将于三四天内在其

表面生长成一密集单层。如培养过程中发现成纤维细胞比率大于10%时,可加入含Arab-c(5×10⁻⁵ mg/L)的培养液24 h再换成前正常培养液。每2 d更换1次培养液,首次全量换液,以后半量换液,必要时可传代培养。培养后的许旺细胞用抗S-100标记计算纯度。

去细胞神经支架的制备: Wistar大鼠,引颈处死法致死。取鼠大腿后内侧纵形切口,显露双侧坐骨神经,从出盆处锐性切取坐骨神经20 mm。参照Dumont和Sondell化学萃取制备去细胞神经基膜管的方法^[3-4],在此基础上作些改进。神经萃取前先在显微手术器械下剪去表面的脂肪组织和部分神经外膜,置蒸馏水中振荡、漂洗6 h。萃取时将神经放入体积分数3%的Triton X-100水溶液中静置12 h,然后在蒸馏水中漂洗3次,再放入40 g/L的脱氧胆酸钠水溶液中室温下振荡24 h,最后在蒸馏水中漂洗3次,如此一个循环为萃取1次。将萃取2次的去细胞神经作为桥接物,放入含有青霉素和链霉素的PBS液中,经⁶⁰Co射线10 kGy剂量照射后,4 °C冰箱保存备用。分别于萃取神经和新鲜神经的中段取15 mm组织,用体积分数4%甲醛和2.5%戊二醛固定。体积分数4%甲醛固定的标本常规石蜡包埋,行苏木精-伊红染色、S-100蛋白和Laminin蛋白免疫组织化学染色,用病理图像分析仪对免疫组织化学切片作定量分析。25 g/L戊二醛固定的标本,经脱水,树脂包埋后作超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,透射电子显微镜下观察神经的超微结构。

许旺细胞与去细胞神经支架的体外结合: 把培养达到一定数量纯度(> 92%)的许旺细胞以一定浓度(10⁹ L⁻¹)在超净工作台内用100 μL玻璃筒不锈钢针头微量进样器注入神经桥接物内,大体观察可见神经桥接物膨胀。注射后将桥接物置入细胞培养瓶内,放入37 °C,体积分数为5%CO₂培养箱2 h。再加入适量含体积分数20%胎牛血清高糖DMEM液,培养1, 2, 3, 4, 5, 6 d后通过扫描及透射电镜观察细胞在桥接物内生长情况。

主要观察指标: ①许旺细胞的培养结果。②去细胞神经支架制作结果。③许旺细胞与去细胞神经支架结合结果。

设计、实施、评估者: 为本文作者,经过科研培训。

2 结果

2.1 许旺细胞培养结果 经过复合酶消化,差速贴壁及Arab-C抑制成纤维细胞生长培养后,许旺细胞5~7 d可以长满培养瓶。在相差显微镜下可见许旺细胞呈长梭形或椭圆形,两极有细长的突起。许旺细胞间突起相互连接似平行排列,并可见“肩并肩”现象。而少量的成纤维细胞形态呈不规则的多角形,胞体及核均较许旺细胞大。长满瓶底时,还可呈椭圆形的细胞成

簇分布,突起不明显,有时呈旋涡状,见图1。

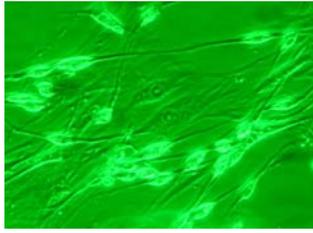


Figure 1 On 6 d of the culture, Schwann cells had a vigorous growth (×200)
图1 在细胞培养的第6天,许旺细胞生长旺盛(×200)

经S-100细胞免疫组织化学染色后,用照相机取景框计数得细胞纯度92%以上,见图2。

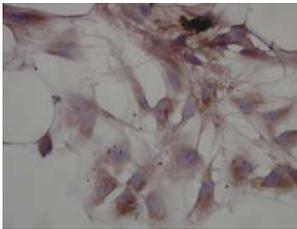


Figure 2 Schwann cells in S-100 immunohistochemical staining (×400)
图2 许旺细胞 S-100 免疫组织化学染色(×400)

2.2 去细胞神经支架制备结果

大体观察:肉眼见新鲜鼠坐骨神经有一定柔韧性,蒸馏水浸泡后肿胀变硬,不易弯曲。经化学萃取后的去细胞神经直径和长度无明显变化,质软而有韧性、乳白色、半透明状。

显微结构:①苏木精-伊红染色:未萃取的新鲜神经可见神经轴突、许旺细胞、束膜细胞、成纤维细胞以及散在分布的血管;萃取2次后上述细胞消失,神经着色较淡。去细胞神经纵切片中神经内膜呈波浪状纵形排列成管状空隙,横切片中神经内膜形成的不规则圆形空腔,周边可见到神经束膜和外膜。萃取1次的神经内见少量细胞碎屑,而萃取3次后神经的结构较新鲜神经散乱。②S-100免疫组织化学染色:新鲜神经、萃取1次和2次的神经,其S-100阳性反应面积分别为 (256.36 ± 27.12) , (83.16 ± 18.20) 和 $(23.18 \pm 5.60) \mu\text{m}^2$,三者之间差异有显著性意义($P < 0.05$),而神经萃取3次后S-100染色阴性。③Laminin免疫组织化学染色:新鲜正常神经可见黄染的许旺细胞基底膜包绕在髓鞘外周。去细胞神经的横切面可见圆形和椭圆形的管状结构,黄染的许旺细胞基底膜形成不规则的圆形空腔,髓鞘结构消失。纵切面可见部分管壁塌陷,正常神经结构消失,黄染的许旺细胞基底膜则被保留,呈波浪状纵形排列,见图3。

超微结构:透射电镜下正常神经可观察到神经内膜、髓鞘、神经纤维间基质、许旺细胞等神经超微结构。去

细胞神经的髓鞘、细胞等结构均消失,整个视野由神经纤维间基质、神经内膜和基底膜形成的圆形不规则空腔,构成腔壁的胶原纤维横切面呈颗粒状。

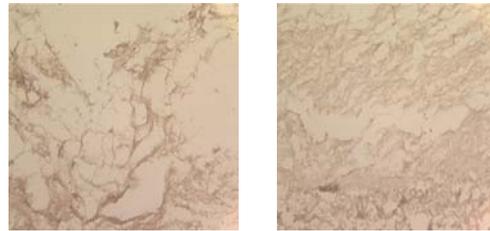


Figure 3 The cross-section and longitudinal section of the nerve with the second extraction by Laminin immunohistochemistry (×400)
图3 Laminin 免疫组织化学萃取2次神经的横切面及纵切面(×400)

2.3 许旺细胞与去细胞神经支架的体外培养 把培养好的许旺细胞消化后注入去细胞神经支架中,注入后当天及第2天桥接物蜡片苏木精-伊红染色发现细胞在其内成团,第3天细胞分散生长,第四五天细胞较整齐排列。通过透射电镜观察,平均约每14~16个细胞中有一个成纤维细胞,许旺细胞在透射电镜下形状规则圆或椭圆形,核内染色质均匀,膜表面光滑,而成纤维细胞则形状不规则,核内染色质不均匀,细胞膜表面粗糙不整有毛刺样突起,见图4。

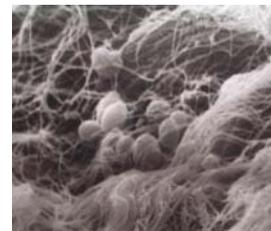


Figure 4 On 1 d, Schwann cells distributed in stacks (×1 800)
图4 第1天许旺细胞成堆分布(×1 800)

通过扫描电镜观察,椭圆形的许旺细胞在支架上聚集吸附生长,还可在神经纤维间的胶原丝上附着,见图5。



Figure 5 On 5 d, Schwann cells distributed in arrays (×1 800)
图5 第5天许旺细胞整齐排列(×1 800)

3 讨论

3.1 去细胞神经支架制备的原理 支架是人工神经的重要组成部分。以天然的神经干为原料,将细胞及其内容物清除干净,仅保留细胞外基质和纤维骨架,就可获得与天然神经结构一致的无细胞支架。

Sondell等^[4]使用三硝基甲苯和脱氧胆酸钠对大鼠周围神经作萃取处理,可将神经组织内的细胞全部溶解,而神经基底膜管及基膜管外周的胶原成分则被完整保留下来。作者参照Sondell的方法对鼠坐骨神经作萃取处理,具体包括以下步骤:①剪去神经表面的结缔组织,有利于药物的渗透和细胞内容物的洗脱。②用蒸馏水浸泡神经,使细胞在低渗环境下破裂。③用三硝基甲苯溶液浸泡神经,溶解细胞膜上的脂质,使细胞崩解。④用蒸馏水反复漂洗神经,洗脱已溶解的细胞成分。⑤用脱氧胆酸钠溶液浸泡神经,进一步溶解细胞中的脂类、蛋白质等,故能有效去除神经髓鞘和其它细胞内容物。⑥用蒸馏水反复漂洗神经,将溶于脱氧胆酸钠的细胞成分彻底洗脱出来。⑦最后,封装后⁶⁰Co照射进一步降低免疫反应和灭菌。郭树章等^[5-6]也使用类似方法去除脊髓支架中的细胞成分和髓鞘成分。

作者通过组织学观察发现萃取后神经干内所有细胞,包括许旺细胞、束膜细胞、成纤维细胞、血管的内皮细胞和平滑肌细胞均已消失,髓鞘、轴突被清除,而基底膜管、神经束膜等纤维性支架得以完整保留。天然神经纤维支架由神经基底膜管、神经内膜、神经束膜、神经外膜以及结缔组织构成,基底膜管包绕神经轴突^[7]。萃取1次后神经内尚残留少量细胞碎屑,萃取3次又破坏了神经的支架结构,故制备大鼠的去细胞神经支架以萃取2次为宜。虽然萃取2次后仍有S-100蛋白残留,但含量比新鲜神经和萃取1次的神经均显著减少。化学萃取长段粗大神经时很难避免细胞碎片残留,衷鸿宾等^[8]通过提高萃取药剂的浓度和延长蒸馏水浸浴时间的方法,萃取2次后获得的人类10 cm长的去细胞尺神经也有少量的髓鞘崩解碎片。如能将长神经分成数段或将粗神经分为数条神经束再萃,也许可以减少细胞碎片的残留。

3.2 去细胞神经支架的优越性

去细胞神经支架具有完全仿真的结构:目前临床上修复周围神经缺损的材料一般是自体周围神经。但是自体神经移植存在着:①供区的神经损伤。②如损伤神经是较粗大神经,则难以找到与之相匹配的供移植神经。③神经-效应器失配及效应器的失用性萎缩等缺陷。人们在动物实验中相继使用硅胶管^[9]、静脉^[10]、骨骼肌^[11]、聚乳酸^[1]、聚羟基乙酸等天然或人工合成材料作为支架桥接神经缺损^[2]。这些支架材料有一定的缺点,如:桥接距离短,桥接物的生物特性、物理特性与正常神经相距

甚远,不具有仿生性,不能修复受损伤的周围神经达到解剖与生理功能的完全恢复。实验在苏木精-伊红染色及Laminin免疫组织化学染色纵切片中可见呈波浪状纵形排列的管状空隙,横切片见不规则圆形管腔,周边均见神经外膜及束膜,直观地显示了去细胞神经是由空的神经基底膜管和管之间的胶原纤维构成,这种结构为神经细胞的附着提供了比较理想的三维空间。

去细胞神经支架具有较低免疫原性:脱细胞技术在构建组织工程化膀胱^[12]、小肠^[13]、心瓣膜^[14]、肌肉^[15]、周围神经等方面已有广泛应用^[16],并被证明免疫排斥反应轻微,而同种异体神经移植的主要问题是免疫排斥反应问题。Albert于1885年首先报道两例同种异体神经移植,因免疫排斥反应而失败,1954年Sanders证实许旺细胞是宿主免疫反应的最主要靶,1967年Gupta证实髓鞘是引起排斥反应的主要成分。近年来的研究表明移植免疫的核心问题是组织相容性复合体。周围神经组织相容性复合体的表达产物主要存在于许旺细胞膜表面,构成了许旺细胞的膜抗原,是产生移植免疫的主要原因^[17]。化学萃取法制备周围神经去细胞基膜管,消除细胞、髓鞘等结构及其崩解的碎片,具有较低免疫原性。国生辉等^[18]将化学萃取两次后的兔坐骨神经包埋于大鼠肌肉组织中观察三四周,未见明显排斥反应,提示神经萃取2次后免疫原性已基本消失。

去细胞神经支架与机体有良好相容性:神经支架在脱细胞的同时,保存了完整的许旺细胞基膜管结构。基膜管的主要成分是层粘连蛋白、纤维粘连蛋白、四型胶原等细胞外基质,具有促进细胞黏附、迁移和再生轴突生长,引导神经再生的作用。王建云等^[19]将F344来源的许旺细胞种植在SD大鼠去细胞神经支架上,细胞可很好地黏附在支架上,并沿支架爬行、迁移,形成类似Bünger带的结构。其他科研工作者在这方面也进行了大胆的探索,获得了一些有意义的结论^[20-22],同时去细胞神经制备方法的研究也取得了明显进步^[23-26]。化学去细胞神经在神经再生及功能恢复过程中的作用研究较多^[27-31],但与此过程有密切联系的组织相容性问题仍须进一步探索。

3.3 许旺细胞与去细胞神经支架的体外结合 肌肉来源的基膜管结构上存在一些盲管,理论上会一定程度妨碍神经轴突的再生;而经化学萃取所得的基膜管结构有良好的空间间隙结构和弹性,使得微注射法植入纯化的自体许旺细胞能较容易。有学者用Gelatin或ECM凝胶和细胞混合后再注入,细胞与凝胶混合后延缓了细胞在基膜管内的迁移速度。王建云等^[19]通过初步的实验对比认为基膜管本身结构上即有Gelatin和ECM凝胶功能,所以将细胞与培养基相混合后注入桥接物内比较理想。本实验在体外混合培养的结果显示神经纤维经化学萃取后所得的桥接物可作为细胞生长的支架,许旺细胞在其内良好生长并迁移成行排列。为许旺细胞种植后桥接

物植入体内形成Bünger带,促进轴突再生提供了很好的研究基础。但体内生长情况及许旺细胞是否有明显的促神经生长作用,有待于紧接下一步试验的证实。

结论:用三硝基甲苯和脱氧胆酸钠萃取新鲜神经2次制备的同种异体神经移植物,去除细胞而保留以许旺细胞基底膜管为主、以神经束膜和外膜的基质为外套的完整的三维立体支架,具有良好的仿生性和组织相容性,含有促进受损神经再生的生物活性物质,可作为桥接周围神经缺损的移植物及许旺细胞种植的支架材料,是制备神经支架的理想方法。

神经支架种植许旺细胞后在体外混合培养的结果显示神经经过化学萃取后可作为细胞生长的支架,许旺细胞在其内良好生长并迁移成行排列。可作为神经支架种植许旺细胞后植入体内形成Bünger带,促进轴突再生的研究基础,有待于下一步试验的研究证实。

4 参考文献

- Luciano RM, de Carvalho lavaglia CA, de Rerende Duek EA. Preparation of bioabsorbable nerve guide tube. *Artif Organs*. 2000; 24(3):206-208.
- Keeley RD, Nguyen KD, Stephanides MJ, et al. The artificial nerve graft: a comparison of blended elastomer/hydrogel with polyglycolic acid conduits. *J Reconstr Microsurg*. 1991;78(2):93-100.
- Dumont CE, Hente VR. Enhancement of axon growth by detergent-extracted nerve grafts. *Transplantation*. 1997; 63(9):1210-1215.
- Sondell M, Lunborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Res*. 1998; 795(1):44-54.
- Guo SZ, Ren XJ, Jiang T, et al. *Zhongguo Jiaoxing Waike Zazhi*. 2007, 15(3):226-228.
郭树章,任先军,蒋涛,等.脱细胞脊髓天然支架的制备及形态学观察[J]. *中国矫形外科杂志*, 2007, 15(3):226-228.
- Guo SZ, Ren XJ, Jiang T, et al. *Disan Junyi Daxue Xuebao*. 2007, 29(13):1313-1315.
郭树章,任先军,蒋涛,等.脱细胞脊髓支架的成分分析[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(13):1313-1315.
- Vleggeert-Lankamp C L. The role of evaluation methods in the assessment of peripheral nerve regeneration through synthetic Conduits: a systematic review. *Laboratory investigation. J Neurosurg*. 2007; 107(6):1168-1189.
- Zhong HB, Lu SB, Hou SX, et al. *Zhonghua Waike Zazhi*. 2003; 41(1):60-63.
衷鸿宾,卢世璧,侯树勋,等.人类去细胞同种异体神经移植物化学萃取方法的研究[J]. *中华外科杂志*, 2003, 41(1):60-63.
- Williams LR, Longo FM, Powell HC, et al. Spatial/2temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: Parameters for a bioassay. *J Comp Neurol*. 1983; 218(4):460-470.
Zou PL, Yang MF, Zhao FY, et al. *Zhonghua Xianwei Waike Zazhi*. 2001; 24(2):124-126.
周佩兰,杨明富,赵凤仪,等.静脉体基底膜许旺细胞和NGF复合移植桥接神经缺损的实验研究[J]. *中华显微外科杂志*, 2001, 24(2):124-126.
- Feneley MR, Fawcett JW, Keynes RJ. The role of Schwann cells in the regeneration of peripheral nerve axons through muscle basal lamina grafts. *Exp Neurol*. 1991; 114(4):275-285.
- Bolland F, Cardenas DD, Svircev J N. Spinal cord injury: a comprehensive review. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2007; 18(4):651-679.
- Knight RL, Wilcox HE, Korossis SA, et al. Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering [J]. *Biomaterials*. 2007; 28(2):1061-1070.
- Conconi M T, Nico B, Mangieri D, et al. Angiogenic response induced by acellular aortic matrix in vivo. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004; 281(2):1303-1307.
- Zhong H, Chen B, Lu S, et al. Nerve regeneration and functional recovery after a sciatic nerve gap is repaired by an acellular nerve allograft made through chemical extraction in canines. *J Reconstr Microsurg*. 2007; 23(8):479-487.
- Kajbafzadeh AM, Payabvash S, Salmasi AH, et al. Time-dependent neovasculogenesis and regeneration of different bladder wall components in the bladder acellular matrix graft in rats. *J Surg Res*. 2007; 139(2):189-202.
- Trumble TE, Shon FG. The physiology of nerve transplantation. *Hand Clin*. 2001; 16(1):105-122.
- Guo SH, Jin Y, Zhang YJ, et al. *Yati Yasui Yaozhoubingxue Zazhi*. 2005; 15(5):255-258.
国生辉,金岩,张勇杰,等.化学萃取异种组织工程化神经支架的方法和组织学研究[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2005, 15(5):255-258.
- Wang JY, Liu XL, Zhu JK, et al. *Zhonghua Xianwei Waike Zazhi*. 2002; 25(3):189-191.
王建云,刘小林,朱家恺,等.化学萃取同种异体神经种植许旺细胞的体外实验[J]. *中华显微外科杂志*, 2002, 25(3):189-191.
- Jiang CQ, Hu J, Xiang JP, et al. *Zhonghua Shouwaikue Zazhi*. 2005, 21(6):372-374.
江长青,胡军,向剑平,等.猕猴组织工程化周围神经移植物的实验研究[J]. *中华手外科杂志*, 2005, 21(6):372-374.
- Xu YB, Hu J, Yang GS, et al. *Zhonghua Xianwei Waike Zazhi*. 2005; 8(2):136-138.
许扬滨,胡军,杨光诗,等.用去细胞同种异体神经构建称猴组织工程化神经的实验研究[J]. *中华显微外科杂志*, 2005, 8(2):136-138.
- Niu XF, Liu XL, Hu J, et al. *Zhongguo Xiufu Zhongjian Waike Zazhi*. 2009; 23(2):235-238.
牛晓峰,刘小林,胡军,等.大鼠化学去细胞异体神经再血管化的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2009, 23(2):235-238.
- Hu J, Zhu QT, Liu X L, et al. Repair of extended peripheral nerve lesions in rhesus monkeys using acellular allogenic nerve grafts implanted with autologous mesenchymal stem cells. *Exp Neurol*. 2007; 204(2):658-666.
- Wang D, Liu XL, Zhu JK, et al. Bridging small-gap peripheral nerve defects using acellular nerve allograft implanted with autologous bone marrow stromal cells in primates. *Brain Res*. 2008; 1188:44-53
- Zhu QT, Zhu JK, Lai YR, et al. *Zhonghua Xianwei Waike Zazhi*. 2004; 27(1):35-38.
朱庆棠,朱家恺,赖英荣,等.去细胞组织工程化神经支架的制备与形态学研究[J]. *中华显微外科杂志*, 2004, 27(1):35-38.
- Han JH, Chen JW, Zhao BH, et al. Preparation of acellular nerve grafts triton X-100. *Neural Regen Res*. 2006, 1(7):654-657.
- Zhong H, Chen B, Lu S, et al. Nerve regeneration and functional recovery after a sciatic nerve gap is repaired by an acellular nerve allograft made through chemical extraction in canines. *J Reconstr Microsurg*. 2007, 23(8):479-487.
- Shen N, Jin Y, Zhang YJ, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2006; 10(20):84-85.
沈楠,金岩,张勇杰,等.去细胞周围神经移植物的制备及生物相容性评测[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2006, 10(20):84-85.
- Cui Y, Zhang XY, Zhang T. *Zhonghua Xianwei Waike Zazhi*. 2007; 30(1):28-30.
崔勇,张信英,张涛.冻干去细胞同种异体神经种植类许旺细胞修复坐骨神经缺损的实验研究[J]. *中华显微外科杂志*, 2007, 30(1):28-30.
- Hudson TW, Zawko S, Deister C, et al. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng*. 2004, 10(11-12):1641-1651.
- Sun XH, Dou WB, Tong XJ, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2006; 10(29):19-21.
孙晓红,窦文波,佟晓杰,等.许旺细胞与脱细胞神经移植物共培养在周围神经损伤修复中的作用[J]. *中国组织工程与临床康复*, 2006, 10(29):19-21.

来自本文课题的更多信息——

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 实验研究目的就是通过动物实验所获得的经验、数据,为组织工程化人工神经修复周围神经缺损的临床应用奠定基础。

课题评估的“金标准”: 目前无公认的“金标准”,目前试验还主要是停留在形态学观察的阶段。

设计或课题的倚倚与不足: 实验设计了将许旺细胞与去细胞神经支架的体外结合,但许旺细胞在神经支架内生物活性如何,许旺细胞是否有明显的促神经生长作用,体外结合后与受体的生物相容性如何有待于紧接下一步试验的研究证实。

提供临床借鉴的价值: 神经支架种植许旺细胞后在体外混合培养的结果显示神经经过化学萃取后可作为细胞生长的支架,许旺细胞在其内良好生长并迁移成行排列。可作为神经支架种植许旺细胞后植入体内形成 Bünger 带,促进轴突再生的研究基础。