

基质细胞衍生因子1对转染CXCR4基因支气管上皮细胞的增殖和定向趋化作用**

刘 军, 任开明, 石文君

Effects of stromal cell derived factor-1 on the proliferation and directional migration of bronchial epithelial cells transfected by CXCR4 gene

Liu Jun, Ren Kai-ming, Shi Wen-jun

Shengjing Hospital
Affiliated to China
Medical University,
Shenyang 110004,
Liaoning Province,
China

Liu Jun★, Master,
Associate professor,
Shengjing Hospital
Affiliated to China
Medical University,
Shenyang 110004,
Liaoning Province,
China
junliu110@163.com

Supported by:
Scientific Research
Foundation Program
of Higher Education
Institutes of Liaoning
Province, No.
L2010636*

Received: 2011-12-02
Accepted: 2012-02-25

中国医科大学附
属盛京医院, 辽宁
省沈阳市
110004

刘军★, 男, 1974
年生, 辽宁省大连
市人, 汉族, 1998
年中国医科大学
毕业, 硕士, 副教授,
主要从事支气管
替代物的研究。
junliu110@
163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2012)24-04476-05

收稿日期: 2011-12-02
修回日期: 2012-02-25
(20110802002/NL-S)

Abstract

BACKGROUND: A key problem of study on tracheal prosthesis is to cover the tracheal mucosa and recover its function. Stromal cell derived factor-1/CXCR4 pathway plays an important role in accelerating tissue repair.

OBJECTIVE: To investigate the effects of stromal cell derived factor-1 on the proliferation and directional migration of bronchial epithelial cells transfected by CXCR4 gene.

METHODS: CXCR4 lentiviral vector was constructed and transfected into human bronchial epithelial cells. In the blank group, cells were not infected with any virus. In the control group, cells were infected with non-transfected lentiviral vectors. In the experimental group, cells were infected with CXCR4 lentiviral vectors. CXCR4 lentiviral vectors-transfected and common human bronchial epithelial cells were processed with different concentrations of stromal cell derived factor-1 (1 μmol/L, 100, 10, 1, 0.1, 0 nmol/L).

RESULTS AND CONCLUSION: CXCR4 lentiviral vector was successfully constructed. CXCR4 protein expression was low in the normal human bronchial epithelial cells. CXCR4 mRNA and protein expression was high in the CXCR4 gene-transfected human bronchial epithelial cells. With increasing concentration of stromal cell derived factor-1, absorbance was gradually increased in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). This suggests that stromal cell derived factor-1 promotes the proliferation and directional migration of bronchial epithelial cells transfected by CXCR4 gene.

Liu J, Ren KM, Shi WJ. Effects of stromal cell derived factor-1 on the proliferation and directional migration of bronchial epithelial cells transfected by CXCR4 gene. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(24): 4476-4480.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 早期的诱导替代物表面的气管黏膜上皮覆盖并恢复其功能, 是气管替代物研究中的关键问题。基质细胞衍生因子 1/CXCR4 通路在加快组织修复中发挥重要作用。

目的: 观察基质细胞衍生因子 1 对转染 CXCR4 基因支气管上皮细胞的增殖和定向趋化作用。

方法: 构建 CXCR4 慢病毒表达载体并转染人支气管上皮细胞。实验分为 3 组, 空白组: 未感染任何病毒的细胞组; 对照组: 感染未转染 CXCR4 的慢病毒细胞组; 实验组: 转染 CXCR4 慢病毒表达载体的细胞组。将消化好的病毒感染的人支气管上皮细胞和普通支气管上皮细胞悬液以不同浓度基质细胞衍生因子 1 (1 μmol/L, 100 nmol/L, 10 nmol/L, 1 nmol/L, 0.1 nmol/L, 0 nmol/L) 处理。

结果与结论: 实验成功构建了 CXCR4 慢病毒表达载体。正常人支气管上皮细胞的 CXCR4 蛋白基础表达较低。转染 CXCR4 的人支气管上皮细胞中 CXCR4 mRNA 和蛋白都有较高水平的表达, 且随着基质细胞衍生因子 1 浓度增加, 其吸光度逐渐增加, 并呈浓度依赖性 ($P < 0.05$)。提示基质细胞衍生因子 1 增强了转染其受体 CXCR4 基因支气管上皮细胞的增殖作用和定向迁移能力。

关键词: 基质细胞衍生因子 1; 趋化因子; 支气管上皮细胞; 基因; 转染

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.24.022

刘军, 任开明, 石文君. 基质细胞衍生因子 1 对转染 CXCR4 基因支气管上皮细胞的增殖和定向趋化作用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(24): 4476-4480. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

气管组织工程技术是近年来气管替代研究的热点。缺乏完整的上皮覆盖被认为是替代物瘢痕形成和管腔狭窄的重要因素, 新生上皮的爬行速度是一个必须考虑的关键问题。近年来有关调控趋化因子基质细胞衍生因子1/CXCR4通路修复受损组织的研究逐渐增多^[1-4], 但在支气管上皮细胞的表达和损伤修复作用尚未见报道。实验通过构建CXCR4慢病毒表达载体并转染支气管上皮细胞, 观察基质细胞衍生因子1对支气管上皮细胞的增殖和趋化迁移作用。为今后提高气管上皮细胞的迁移能力及移植效率提供了新思路 and 实验依据, 并为进一步开展体内动物实验的相关研究提供了实验基础。

1 材料和方法

设计: 随机分组设计, 对比观察。

时间及地点: 实验于2010-06/2011-03在中国医科大学盛京医院实验中心完成。

材料: 人支气管上皮(human bronchi epithelial, HBE)细胞购自中国医学科学院肿瘤研究所。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
pGEM-T 和 FUGW 载体	Promega 公司
Trizol 和转染试剂 Lipofectamine2000	Invitrogen 公司
限制性内切酶 Age I、EcoR I 和 T ₄ DNA 连接酶	NEB 公司
CXCR4 质粒	Origene 公司
SDF-1	R&D 公司
兔抗人抗体	武汉博士德公司
Transwell 小室	Coring 公司
梯度 PCR 仪	TAKARA 公司
稳压 DNA 电泳仪	BioRad 公司

实验方法:

HBE细胞制备: 无菌条件下切除的人无瘤供体肺组织, 解剖出气管, 联合应用酶消化和刷洗法获得支气管上皮细胞。

人正常支气管上皮CXCR4的表达: 切取3个肺切除标本中残端无病变的支气管环, 苏木精-伊红染色和SP法观察CXCR4的表达情况。

CXCR4慢病毒载体的构建和包装: 从含有CXCR4基因的质粒克隆模板中, 利用PCR克隆目的基因。将目的基因纯化后与克隆载体进行连接, 选择酶切鉴定和测序正

确的克隆进行双酶切、纯化定向连接或重组到表达载体上, 其产物转化细菌感受态细胞, 对长出的克隆进行酶切鉴定, 证明目的基因已经连入到表达载体上。将构建好的融合蛋白表达载体进行超纯去内毒素抽提, 获得包装好的慢病毒载体。

HBE细胞中CXCR4 mRNA和蛋白的检测: 分别采用实时荧光定量PCR和Western blot。HBE细胞经胰酶消化后按 4×10^5 /孔接种6孔板, 混匀后于37℃、体积分数为5%CO₂条件下培养24 h, 然后分为3组: 未感染任何病毒的细胞组(空白组)、感染未转染CXCR4的慢病毒细胞组(对照组)、转染CXCR4慢病毒表达载体的细胞组(实验组)。对照组和实验组待细胞融合度达30%时, 加入稀释后的病毒, 3 d后免疫荧光显微镜观察慢病毒上报告基因GFP的表达情况, 感染5 d后使用Trizol按说明抽提总RNA, 感染7 d后收集细胞蛋白。空白组同法提取RNA。各组取2 μg总RNA, 反转录成cDNA, 分别用CXCR4引物和GAPDH引物进行荧光定量PCR。所有标本均重复检测3次, 并用图像定量分析软件进行分析, 结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 $[\Delta Ct = CXCR4 \text{ 平均 } Ct \text{ 值} - GAPDH \text{ 平均 } Ct \text{ 值}, \Delta\Delta Ct = \Delta Ct(CXCR4) - \Delta Ct(\text{calibrator})]$ 。对照组和实验组将收集的细胞蛋白终浓度调整为2 g/L, 蛋白按20 μg上样, 进行SDS-PAGE电泳并转移到PVDF膜上, 分别加CXCR4和GAPDH一抗及相应二抗, ECL显色后进行X射线显影。

MTT法测定基质细胞衍生因子1对于CXCR4基因转染后细胞的增殖作用: 将消化好的病毒浸染的HBE细胞和普通HBE细胞悬液以 10^4 /孔接种于96孔培养板中, 每孔体积为200 μL。培养24 h, 待培养细胞贴壁后, 吸去培养液, 不同浓度基质细胞衍生因子1(1 μmol/L, 100 nmol/L, 10 nmol/L, 1 nmol/L, 0.1 nmol/L, 0 nmol/L)处理细胞, 每组设4孔。继续培养48 h后, 每孔加入MTT溶液20 μL, 37℃继续孵育4 h后, 每孔加入150 μL二甲基亚砜, 微量振荡器上振荡10 min, 选择490 nm波长, 在酶标仪上测定各孔A值。

Transwell小室观察HBE细胞的定向迁移: 制备HBE单细胞悬液, 浓度为 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 锥虫蓝检测细胞活力>95%。Transwell小室的上室加入100 μL细胞悬液, 下室为趋化因子基质细胞衍生因子1溶液500 mL, 终浓度分别为0, 1, 3, 10, 30, 100, 300 nmol/L。将小室置于37℃、体积分数为5%CO₂细胞培养箱中培养24 h。在高倍镜下($\times 400$)随机取5个视野计数附着于聚碳酸酯膜下表面的细胞, 取平均数。

主要观察指标: 免疫组织化学检测正常HBE细胞中

的CXCR4蛋白表达; 实时荧光定量PCR和Western blot检测转染CXCR4的HBE细胞中CXCR4 mRNA和蛋白表达; MTT法和Transwell实验观察基质细胞衍生因子1对转染细胞的增殖作用和定向迁移情况。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 15.0软件完成统计处理, 计量资料进行 t 检验及单因素方差分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 正常支气管上皮CXCR4蛋白的表达 正常人支气管黏膜上皮的细胞膜和胞浆未见明显红色的CXCR4染色, 其CXCR4的基础表达可能较低, 见图1。

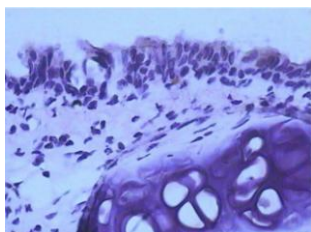
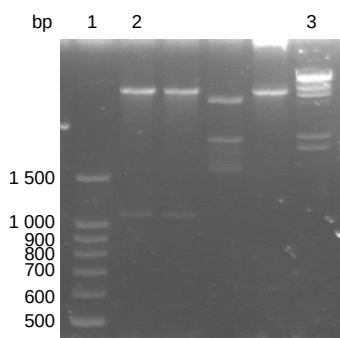


Figure 1 Ciliated columnar epithelial cells from the normal bronchi (Immunohistochemical SP, $\times 400$)
图1 正常支气管的纤毛柱状上皮细胞(免疫组织化学 SP, $\times 400$)

2.2 慢病毒克隆载体的PCR鉴定和测序结果 经过筛选的阳性克隆菌落, 提取质粒后进行PCR鉴定。含有插入CXCR4片段的质粒经PCR扩增后, 可在1 100 bp左右处发现与目的基因大小一致的条带, 而没有连接入CXCR4片段的空载体只有2 500 bp大小的单一条带。取PCR鉴定阳性的克隆进行测序, 测序结果显示含有与设计的CXCR4的核苷酸序列完全一致的序列, 见图2。



1: 100 bp marker; 2: positive clone; 3: λ DNA/ $Hind$ III marker

Figure 2 FUGW-CXCR4 enzymatic digestion (Age I + Eco R I) electrophoretogram
图2 FUGW-CXCR4 酶切鉴定(Age I + Eco R I)电泳图

2.3 HBE细胞中CXCR4 mRNA和蛋白检测结果 空白组、对照组、实验组的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分别为1, 1.117 3, 5.004 9, 实验组与其他2组相比, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。对照组和实验组的CXCR4蛋白灰度值分别为2 222, 3 914, 其与GAPDH灰度值(分别为5 329, 5 017)的比值分别为0.417 0, 0.780 1, 两组相比, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。免疫荧光显微镜下可见大量的集落呈绿色荧光, 说明细胞中有慢病毒的包装, 并且GFP激发的CXCR4绿色荧光主要表达在细胞膜, 见图3。



Figure 3 Green fluorescence mainly appears in the cell membrane as shown by immunofluorescence microscope ($\times 400$)

图3 免疫荧光显微镜观察绿色荧光主要表达在细胞膜($\times 400$)

2.4 MTT法检测支气管上皮细胞的增殖活力 空白组和实验组随着基质细胞衍生因子1浓度增加, 吸光度都逐渐增加。当基质细胞衍生因子1增加为100 nmol/L和1 000 nmol/L时, 实验组的吸光度值明显增加, 分别为0.445, 0.519, 相比低浓度组0.1 nmol/L和1 nmol/L时的0.223, 0.283, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 见表1。

表1 各组支气管上皮细胞吸光度比较
Table 1 Absorbance of human bronchial epithelial cells in each group ($\bar{x} \pm s$)

Stromal cell derived factor-1 concentration (nmol/L)	Experimental group	Blank group
1 000	0.519 $\pm$ 0.095	0.386 $\pm$ 0.029
100	0.445 $\pm$ 0.060	0.355 $\pm$ 0.037
10	0.396 $\pm$ 0.059	0.332 $\pm$ 0.025
1	0.283 $\pm$ 0.045	0.254 $\pm$ 0.049
0.1	0.223 $\pm$ 0.021	0.193 $\pm$ 0.032
0	0.162 $\pm$ 0.015	0.176 $\pm$ 0.030

2.5 HBE 细胞的定向迁移结果 没有转染 CXCR4 的气管上皮细胞仅有少量 HBE 细胞到达膜的背面, 随着基质细胞衍生因子 1 浓度增加, 迁移的 HBE 细胞数量没有明显变化。实验组下室没有加入基质细胞衍生因子 1 时, 有较少细胞穿过微孔膜到达膜的背面, 在下室加入不同浓度的基质细胞衍生因子 1 时, 12 h 后有较多的 HBE 细胞穿过微孔膜; 当加入的基质细胞衍生因子 1

浓度为 300 nmol/L 时穿过微孔膜的 HBE 细胞数显著高于对照组和未加入基质细胞衍生因子 1 时穿过微孔膜的 HBE 细胞数($P < 0.05$); 实验组穿过微孔膜的 HBE 细胞数呈基质细胞衍生因子 1 浓度依赖性($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 不同浓度 SDF-1 作用各组迁移的上皮细胞数
Table 2 Number of human bronchial epithelial cells after treatment with different concentrations of stromal cell derived factor-1 ($\bar{x} \pm s, n$)

Group	Number of human bronchial epithelial cells
Control	34.8 $\pm$ 2.3
Experimental	
0 nmol/L	32.8 $\pm$ 2.2
1 nmol/L	42.8 $\pm$ 2.8
3 nmol/L	47.6 $\pm$ 6.2
10 nmol/L	57.8 $\pm$ 3.3
30 nmol/L	62.4 $\pm$ 5.0
100 nmol/L	89.8 $\pm$ 4.7
300 nmol/L	100.0 $\pm$ 4.8

3 讨论

气管组织工程技术是近年来气管替代研究的热点, 其中上皮再生是最具挑战性的难题之一。要构建一个有活性的组织工程化气管, 其黏膜上皮的功能, 尤其是纤毛运动能力的恢复也是一个必须考虑的问题。组织工程气管不是简单的管道移植, 必须达到功能上的替代^[5-6]。此外, 长节段的气管缺损存在管腔中央狭窄的问题, 替代物中央管腔内上皮再生不良是造成狭窄的主要原因, 缺乏完整的上皮覆盖被认为是瘢痕形成和管腔狭窄的重要因素。如何早期诱导替代物表面的气管黏膜上皮覆盖并恢复其功能, 尤其是上皮爬行的速度是一个值得研究的问题^[7-8]。

基质细胞衍生因子1是具有较强趋化作用的细胞因子, 通过与其特异性受体CXCR4相互作用, 激活G蛋白偶联的蛋白激酶C途径, 随后再激活其下游与黏附相关的酪氨酸激酶和细胞外信号调节激酶(ERK)等信号分子, 对机体的代谢、基因表达、细胞分化和增殖起重要的调节作用。基质细胞衍生因子1/CXCR4通路在定向趋化、迁移和募集修复细胞到达创面参与创伤愈合的过程中发挥重要作用^[9-10]。

近年来CXCR4被认为是一种新的干细胞表面标记物, 除了造血干细胞外, 其他类型的组织定向干细胞(TCSCs)如骨骼肌卫星细胞、神经元干细胞、肝卵圆细胞、内皮细胞等都功能性地表达。本实验免疫组织化学结果显示: 正常气管黏膜上皮的CXCR4表达较低, 其原因可能有: ①正常气管上皮细胞或气管上皮干细胞的CXCR4基础表达较低。②CXCR4是跨膜蛋

白受体, 主要在细胞膜表达, 本实验使用的免疫组织化学方法或抗体不能检测或真实反映气管上皮细胞的CXCR4表达情况, 应该从mRNA水平或蛋白表达水平检测其表达情况。③没有CXCR4的功能细胞-干细胞的表达, 可能表明气管上皮细胞中存在的干细胞含量较低, 其新生的上皮细胞可能来自血液中的原始干细胞。

慢病毒是近几年发展起来的基因工程载体, 是一种具有自我失活功能、无免疫反应的高效基因传递工具, 其容纳外源性目的基因片段大、宿主范围广泛、重组机会低、可将所携带的目的基因整合到宿主染色体中并稳定长期表达, 安全性较好。实验成功构建了CXCR4慢病毒表达载体并完成了病毒的包装, 通过慢病毒载体转染后, 气管上皮细胞CXCR4在mRNA水平和蛋白水平都有较高的表达^[11-12]。

在MTT实验中发现, 基质细胞衍生因子1对CXCR4基因转染组和未转染组支气管上皮细胞的增殖活力都随着其浓度的增加而逐渐增强, 当浓度大于100 nmol/L时, 两组高浓度的A₄₉₀值都明显高于低浓度组的, 差异有显著性意义。在相同的基质细胞衍生因子1浓度时, 两组差异无显著性意义, 并且没有转染CXCR4基因的支气管上皮细胞的增殖活力也有基质细胞衍生因子1浓度增强效应, 这表明支气管上皮细胞表面可能也有微量的CXCR4基础表达。如果继续增加基质细胞衍生因子1浓度, 可能加大两组间的差异, 有待进一步实验验证。

趋化实验中可以观察到, 在下室没有加入趋化因子基质细胞衍生因子1时, 有很少的细胞穿过微孔膜到达膜的背面, 在下室加入浓度为30 nmol/L的基质细胞衍生因子1时, 12 h后较多的上皮细胞穿过微孔膜。当基质细胞衍生因子1的浓度加大为100 nmol/L时, 穿过微孔膜的细胞明显增加。未经过CXCR4基因修饰的支气管上皮细胞向基质细胞衍生因子1趋化的细胞数目明显少于CXCR4基因修饰后的支气管上皮细胞, 即使在基质细胞衍生因子1较低的浓度时, 这种差异也很明显, 随基质细胞衍生因子1浓度的加大, 向基质细胞衍生因子1趋化的细胞数目逐渐增多。以上结果说明基质细胞衍生因子1/CXCR4信号轴具有定向趋化支气管上皮细胞的作用, 且和基质细胞衍生因子1的浓度相关。

总之, 实验结果显示, 支气管上皮细胞的CXCR4基础表达较低, 通过慢病毒载体转染后可上调CXCR4表达(在mRNA水平和蛋白水平都有较高的表达)。基质

细胞衍生因子1增强了其特异受体CXCR4基因转染后支气管上皮细胞的增殖活力和定向趋化能力。实验结果为今后提高气管上皮细胞的迁移能力及移植效率提供了新思路 and 实验依据。

4 参考文献

- [1] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(18):10344-10349.
- [2] Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, et al. Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis. *Blood*. 2000;96(13):4142-4151.
- [3] Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*. 2000;95(11):3289-3296.
- [4] Gao C, Li Y. SDF-1 plays a key role in the repairing and remodeling process on rat allo-orthotopic abdominal aorta grafts. *Transplant Proc*. 2007;39(1):268-272.
- [5] Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*. 2008;372(9655):2023-2030.
- [6] Ruszymah BH, Chua K, Latif MA, et al. Formation of in vivo tissue engineered human hyaline cartilage in the shape of a trachea with internal support. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2005;69(11):1489-1495.
- [7] Shi WJ, Zhang SN, Han Y, et al. *Zhonghua Waike Zazhi*. 2003;10(3):56-59.
石文君,张苏宁,韩云,等.用犬肺组织瓣重建气管的实验研究和临床应用[J].*中华外科杂志*,2003,10(3):56-59.
- [8] Grillo HC. Tracheal replacement: a critical review. *Ann Thorac Surg*. 2002;73(6):1995-2004.
- [9] Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R, et al. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia*. 2004;18(1):29-40.
- [10] Juarez J, Bendall L, Bradstock K. Chemokines and their receptors as therapeutic targets: the role of the SDF-1/CXCR4 axis. *Curr Pharm Des*. 2004;10(11):1245-1259.
- [11] Sinn PL, Sauter SL, McCray PB Jr. Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production. *Gene Ther*. 2005;12(14):1089-1098.
- [12] Young LS, Searle PF, Onion D, et al. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol*. 2006;208(2):299-318.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 辽宁省教育厅高等学校科研基金资助项目(L2010636)。

作者贡献: 第一、三作者进行实验设计, 实验实施为第一作者, 实验评估为第三作者, 资料收集为第二作者, 第一作者成文, 第二作者审核, 第一作者对文章负责。

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。

文章要点: 除气管上皮细胞外, 其他结构细胞如软骨细胞的 CXCR4 mRNA 基础表达状况如何? 影响表达的因素是什么? 气管损伤、修复的动物模型是否有基质细胞衍生因子1 mRNA 及蛋白水平的高表达? 仍需从分子、细胞及整体水平对基质细胞衍生因子 1/CXCR4 通路及气管损伤、修复进行系统和深入的研究。

外国专家修饰的医学英语句型: “神经细胞核固缩较前减轻, 细胞水肿不明显, 团状胶质细胞增生较前增多”

中文	修饰前的英文	修饰后的英文
神经细胞核固缩较前减轻, 细胞水肿不明显, 团状胶质细胞增生较前增多。	Swelling of neurons was not obvious. Compared to 6-hour post injury group, there was milder nuclear condensation of neurons and increased proliferation of glial cells.	There was no evidence of neuronal swelling. There was reduced nuclear condensation in neurons and increased glial cell proliferation when compared to the 6-hour post injury group.
透射电镜下微血管未见明显形态学改变; 轴索髓鞘肿胀, 鞘板层松散、分离。	Under TEM, there was no significant morphologic change on the microvessels. The myelin sheath swelled, lamellar structure became was loose and disconnected.	Under TEM, no significant morphological changes were detected in microvessels. However, the lamellar structure of the swollen myelin sheaths was loose and disconnected.