

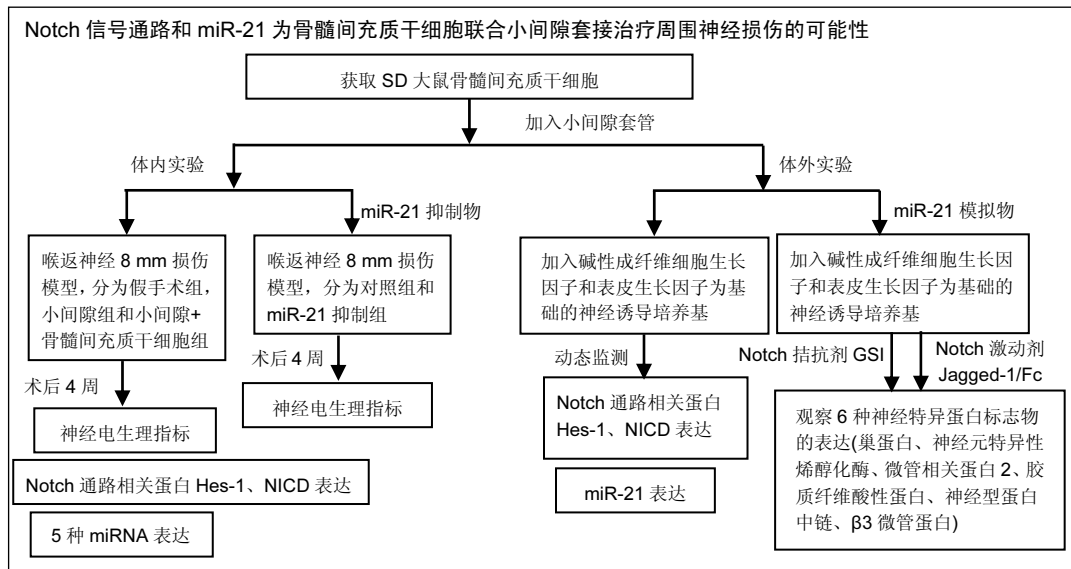
Notch信号通路和miR-21在周围神经损伤修复中的交互作用机制

杨凯云, 孙佩佩, 武文亮, 刘海春(山东大学齐鲁医院骨外科, 山东省济南市 250012)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0931

ORCID: 0000-0003-1862-2812(刘海春)

文章快速阅读:



杨凯云, 女, 1987 年生, 山东省烟台市人, 汉族, 2012 年山东大学毕业, 硕士, 研究实习员, 主要从事骨基础相关研究。

通讯作者: 刘海春, 博士, 副主任医师, 山东大学齐鲁医院骨外科, 山东省济南市 250012

中图分类号: R394.2

文献标识码: A

稿件接受: 2018-03-05



文题释义:

Notch 信号通路: Notch 是一类跨细胞膜受体蛋白, 当其与受体结合并水解时, 产生称为 Notch 胞内域的结构, 作为转录因子调节目标基因表达。Notch 信号通路在周围神经修复过程中的作用已经受到广泛关注。同时, Notch 信号通路也被报道在维持干细胞特性以及介导数种干细胞向特定细胞系分化过程中均发挥重要作用。

微小 RNA: 是一类小分子的非编码单链 RNA, 其长度 20-25 个核苷酸。这些小 RNA 能够与特定的 mRNA 结合, 调控或阻断蛋白编码基因的表达, 控制其最终成为蛋白的过程。近年来, 学者们发现其在骨髓间充质干细胞的多样化表达进程中具有重要调控作用, 这种作用既可体现在转录水平上, 又在转录后调控中得到显现, 其中主要在转录后水平负性调控靶基因的表达。

摘要

背景: 神经损伤修复是外科临床和基础研究的主要热点之一。小间隙套管治疗周围神经损伤的作用在前期研究中已经得到证实, 但详细机制未能明确。同时 Notch 信号通路和微小 RNA 系统逐渐成为该领域的潜在热点, 但二者的相关作用尚未得到明确报道证实。

目的: 观察携带骨髓间充质干细胞的小间隙套管对周围神经损伤的治疗作用, 探究 Notch 信号通路和 miR-21 在治疗过程中的相互作用关系。

方法: 体内实验中制造 SD 大鼠喉返神经 8 mm 缺损模型, 分为假手术组、小间隙组和小间隙+骨髓间充质干细胞组, 治疗后测定电生理结果, Western blot 测定 Notch 信号通路和微小 RNA 表达情况。体外实验中在小间隙套管内培养骨髓间充质干细胞并行神经元方向诱导, 通过改变 Notch/miR21 表达情况, 检测神经标记物的表达情况, 分析骨髓间充质干细胞活性变化。

结果与结论: 神经染色和肌电图结果均确认了骨髓间充质干细胞的治疗效果。在骨髓间充质干细胞向神经细胞分化过程中, Notch 信号表达明显增强, miR-21 表达明显上调。通过进一步调控两因素表达发现, 人为激活 Notch 信号或使 miR-21 过表达后骨髓间充质干细胞向神经分化的能力明显增强, 抑制 Notch 信号后, 骨髓间充质干细胞神经分化能力减弱, 同时 miR-21 的促进作用失效。发现 Notch 信号通路和 miR-21 为骨髓间充质干细胞联合小间隙套接治疗周围神经损伤可能的重要促进机制, 其中 Notch 信号通路具有更高级别的促进或抑制作用等级。

关键词:

喉返神经; 周围神经损伤; 小间隙套接; miR-21; Notch 通路; NICD; Hes-1; 骨髓基质干细胞; 干细胞

主题词:

受体; Notch; 微 RNAs; 周围神经; 组织工程

基金资助:

山东省重点研发计划(2017GSF218047)

Yang Kai-yun, Master, Research assistant, Department of Orthopedics, Shandong University Qilu Hospital, Jinan 250012, Shandong Province, China

Corresponding author: Liu Hai-chun, M.D., Associate chief physician, Department of Orthopedics, Shandong University Qilu Hospital, Jinan 250012, Shandong Province, China

Interactions of Notch signaling pathway and miR-21 in peripheral nerve repair

Yang Kai-yun, Sun Pei-pei, Wu Wen-liang, Liu Hai-chun (Department of Orthopedics, Shandong University Qilu Hospital, Jinan 250012, Shandong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Nerve injury repair is one of the major surgical hot spots in clinical and basic research. Small-gap sleeve method has been confirmed to have therapeutic effects on peripheral nerve injuries, but the detailed mechanism is unclear. The Notch signaling pathway and the microRNA system have gradually become potential hotspots in this field, but their interactions have not yet been clearly reported.

OBJECTIVE: To observe the performance of bone marrow mesenchymal stem cells-packed small-gap sleeve in the treatment of peripheral nerve injuries and to explore the interactions of Notch signaling pathway and miR-21 during the repair process.

METHODS: Models of 8 mm-recurrent laryngeal nerve defects were made in Sprague-Dawley rats and randomly divided into three groups: sham operation group, small-gap sleeve group and combined group (small-gap sleeve carrying bone marrow mesenchymal stem cells). After transplantation, neuroelectrophysiological results were measured, and the expression of Notch signal and miR-21 was determined by western blot assay. Bone marrow mesenchymal stem cells cultured in a small-gap sleeve undertook neuronal induction. By changing the expression of Notch/miR21, we detected the expression of neural markers and analyzed the activity of bone marrow mesenchymal stem cells.

RESULTS AND CONCLUSION: Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells had therapeutic effects on peripheral nerve injuries as confirmed by neurostaining and electromyogram. During the neural differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells, the expressions of Notch signal and miR-21 were significantly increased. Activation of Notch signal or miR-21 overexpression could strengthen the neural differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells, while inhibition of Notch signal weakened the neural differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells, and miR-21 lost its promotion effect. Overall, Notch signaling pathway and miR-21 are considered to promote the therapeutic effects of bone marrow mesenchymal stem cells combined with small-gap sleeve for peripheral nerve injuries, in which Notch signaling pathway has stronger promotion or inhibition roles.

Subject headings: Receptors, Notch; MicroRNAs; Peripheral Nerves; Tissue Engineering

Funding: the Key Research and Development Program of Shandong Province, No. 2017GSF218047

0 引言 Introduction

临床工作中经常可见由周围神经损伤所引发的长期、严重的功能障碍, 其外科修复是公认的治疗难点之一^[1-2]。自体神经移植多年来是外科手术治疗的金标准, 但有限的神经供体来源导致往往需要牺牲正常的神经功能。近年来, 许多组织工程学方法在修复周围神经损伤取得了广泛进展, 其中小间隙套接法是广泛接受的方法之一^[3-5]。

骨髓间充质干细胞既可以分泌多种促神经生长因子, 又能促进神经纤维和髓鞘的自身修复^[6]; 同时还有能力直接分化成类神经元细胞, 接受神经信号并具备初步神经电生理功能^[7-8], 因此被广泛应用于神经损伤研究中。Notch 信号通路系统和微小RNA(miRNA)是周围神经损伤研究中新出现的热点对象^[9-12]。作者观察miRNA以及Notch信号通路在骨髓间充质干细胞填充的小间隙套接治疗技术中的作用, 探索二者的相互调节机制, 为周围神经损伤治疗的进一步深入研究提供理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞形态学、分子生物学观察实验。

1.2 时间及地点 2016年1至11月在山东大学齐鲁医院口腔医学研究所实验室完成。

1.3 材料 健康成年雄性SD大鼠80只, 鼠龄4-6周, 体重200-230 g, 由山东大学医学院动物实验中心提供, 许可证号SCXK(鲁)20130009。实验经山东大学齐鲁医院伦理审查委员会审核, 审批号KYLL-2016-134。

实验用主要试剂及仪器: Western-Blot相关一抗、二抗购自美国Abcam公司; PVDF膜购自美国Merck公司; SDS-PAGE凝胶试剂盒购自碧云天生物技术研究所; 实时

PCR各引物由北京赛百盛公司合成; 实时PCR检测套装购自美国Promega公司; Jagged-1/Fc购自美国Enzo公司; γ -分泌酶抑制剂(γ -secretase inhibitor, GSI)购自美国Selleck公司; miR-21模拟物及抑制物由上海生工生物技术公司设计并生产, 转染采用Lipofectamine 2000™试剂盒; 壳聚糖小间隙套管由北京大学人民医院提供, 制备方法参考文献^[13-14]。肌电图观测系统为NDI-200P型肌电诱发电位仪, 购自上海海神公司。

1.4 方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞获取 用氯胺酮和甲苯噻嗪腹腔注射处死3只SD大鼠, 游离并取出股骨及胫骨, 用含有胎牛血清、谷氨酰胺、青霉素及链霉素的无菌DMEM缓冲液冲洗, 消毒并去除杂质组织。分别将两骨的骨髓端去除, 应用DMEM完全培养基反复冲洗骨髓腔获得骨髓细胞悬液, 将该悬液全部接种于细胞培养瓶(25 cm²)中。将所有培养瓶静置培养于培养箱中, 保持体积分数5% CO₂, 温度维持37 °C。24 h换液, 观察生长状态, 48 h贴壁细胞长满到75%以上代, PBS冲洗2遍后, 加入无血清培养基, 用细胞刮刀轻轻刮起细胞, 吹打几次, 800 r/min离心10 min, 体积分数10%胎牛血清, 50 mg/L巨噬细胞集落刺激因子的 α -mem培养液重悬细胞, 按照1:3的比例传代。待细胞长满75%后刮起细胞, 灌注小间隙套管, 灌注细胞数为1×10⁸。

1.4.2 填充骨髓间充质干细胞的小间隙套管对体内周围神经损伤治疗作用 将45只大鼠随机分为对照组、小间隙组和小间隙+骨髓间充质干细胞组, 各15只。对照组: 实施假手术, 暴露喉返神经组织, 仅切开神经外膜并行缝合; 小间隙组: 在同一水平利刃切除部分喉返神经造成8 mm神经缺损, 切除神经后即刻应用单纯小间隙套管连接断端;

小间隙+骨髓间充质干细胞组：同方法切除喉返神经造成8 mm缺损，切除神经后即刻应用填充骨髓间充质干细胞的小间隙套管连接断端，将损伤两端神经外膜与小间隙套管边缘缝合固定。

损伤后4周行神经电生理检查，分别对比观测两组甲杓肌神经诱发电位波幅及传导速度恢复情况，通过环甲膜刺入甲杓肌，以观察到肌电为准。刺激电极为一对单极针电极，将其搭于喉返神经近段，负极置于远端，地极刺入胸骨前皮下。肌电图观测参数为刺激强度0.2 mA，波宽0.1 ms，扫描速度1 ms/DIV，0.1 mV/DIV。

随后处死大鼠，获取损伤部位神经组织，Western Blot染色检测Notch信号通路相关蛋白Hes-1和NICD的表达情况：利用细胞裂解液收集组织中蛋白成分，按照BCA法测定蛋白样品浓度，采取SDS-PAGE凝胶电泳将蛋白转移至PVDF膜上，用5%脱脂奶粉摇床常温封闭2 h。用抗Hes1和抗NICD的一抗稀释液稀释一抗，放入相应PVDF膜，4℃孵育过夜，次日加入HRP标记的羊抗兔IgG，室温孵育1 h。最后应用ECL发光液完成蛋白表达结果显影，利用影像分析软件记录结果。实验以 β -actin作为内对照结果。

综合参考文献[11-12]，实时PCR筛查miR-21、miR-133b、miR-221、miR-222和miR-16五种miRNA的表达情况。利用TRIzol试剂盒自组织中提取总RNA，应用反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA，将获得的cDNA加入实时PCR系统，按照变性-退火-延伸三步法完成40个循环。反应结束后，根据扩增曲线和溶解曲线判断反应质量，用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法鉴定相应miRNA的表达量，与正常对照组对照分析统计学意义。

1.4.3 骨髓间充质干细胞体外诱导分化中miRNA和Notch通路变化 将骨髓间充质干细胞依次加入以诱导前培养基(胎牛血清+2% B27+20 μ g/L碱性成纤维细胞生长因子+20 μ g/L表皮生长因子+100 U/mL青霉素+100 g/L链霉素)和诱导培养基(胎牛血清+10% 胎牛血清+2% B27+10 μ g/L碱性成纤维细胞生长因子+10 μ g/L表皮生长因子+100 U/mL青霉素+100 g/L链霉素)中，置于体外小间隙套管内培养，每24 h Western Blot染色检测Hes-1和NICD代表的Notch信号通路表达变化(方法同1.4.2)，实时PCR检测miR-21表达变化(方法同1.4.2)，自更换为诱导培养基日起连续测量7 d。

1.4.4 干预miR-21和Notch通路功能对骨髓间充质干细胞影响 预先用miR-21模拟物转染部分骨髓间充质干细胞，将其分为miR-21阳性或阴性细胞，诱导分化后在分别加入Jagged-1/Fc嵌合蛋白(Notch 1通路激动剂，500 μ g/L)或 γ -分泌酶抑制剂GSI(Notch 1通路拮抗剂，1 μ mol/L)处理细胞，Western Blot测定巢蛋白、神经元特异性烯醇化酶、微管相关蛋白2、胶质纤维酸性蛋白、神经型蛋白中链、 β 3微管蛋白六种神经细胞活性标志物的表达情况(方法同1.4.2)。 β -肌动蛋白在测量中作为内对照。

为评估抑制miR-21对骨髓间充质干细胞治疗作用的影响，另取30只SD大鼠随机分为两组。同上文方法重复建立神经损伤模型，将未用miR-21抑制剂处理的骨髓间充质干细胞填充小间隙套管植入神经损伤处作为对照组，将应用miR-21抑制剂转染后的骨髓间充质干细胞填充套管作为miR-21抑制组。术后4周通过活体电生理检查比较两组间神经传导速度及动作电位波幅的差异(方法同1.4.2)。

1.5 主要观察指标 ①电生理指标结果；②Hes-1和NICD表达变化；③miR-21表达变化；④神经细胞活性标志物的表达变化。

1.6 统计学分析 实验应用 $\bar{x}\pm s$ 形式描述所有数据，采用SPSS 13.0统计软件(美国IBM公司)处理及分析数据结果。应用t检验完成两组间数据分析，应用单因素方差分析完成多组间数据分析，Fisher最小显著差检验进一步完成多组间两两比较过程。应用非参数检验分析不符合正态分布或方差不齐的资料。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义，显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 填充骨髓间充质干细胞的小间隙套管对体内周围神经损伤治疗作用实验中小间隙组和小间隙+骨髓间充质干细胞组各有1只大鼠在实验终点前不明原因死亡，分别给予补充实验补齐。评估抑制miR-21对骨髓间充质干细胞治疗作用影响的实验中30只大鼠全部成活至实验终点。

2.2 填充骨髓间充质干细胞的小间隙套管对大鼠喉返神经损伤治疗作用

2.2.1 神经电生理结果 如图1所示，损伤后4周小间隙组神经传导速度和动作电位幅度均显著低于对照组，而小间隙+骨髓间充质干细胞组神经传导速度和动作电位幅度均显著高于小间隙组，接近对照组水平，说明小间隙+骨髓间充质干细胞组的治疗效果优于小间隙组。

2.2.2 实时PCR结果 实验选取miR-21等5种微小RNA家族成员作为检测靶点，检测了微小RNA在大鼠离体后神经组织中的异位表达情况。结果显示各组miR-221、miR-222、miR-133b和miR-16表达水平接近，对照组和小间隙组miR-21表达水平接近，而小间隙+骨髓间充质干细胞组中miR-21表达水平明显高于其他2组(图2)。

2.2.3 Western Blot检测 实验选取Hes-1和NICD作为指标以观察Notch信号通路在大鼠离体后神经组织中的表达情况。如图3所示，其中小间隙组两种蛋白的表达量稍高于对照组，差异无显著性意义；小间隙+骨髓间充质干细胞组两种蛋白的表达量明显高于其他2组。

2.3 miR-21和Notch信号通路的表达变化观察

2.3.1 miR-21和Notch信号通路表达动态测定 在体外条件下将骨髓间充质干细胞加入小间隙套管中进行神经元方向诱导分化，连续测量结果可见miR-21的表达量随时间逐

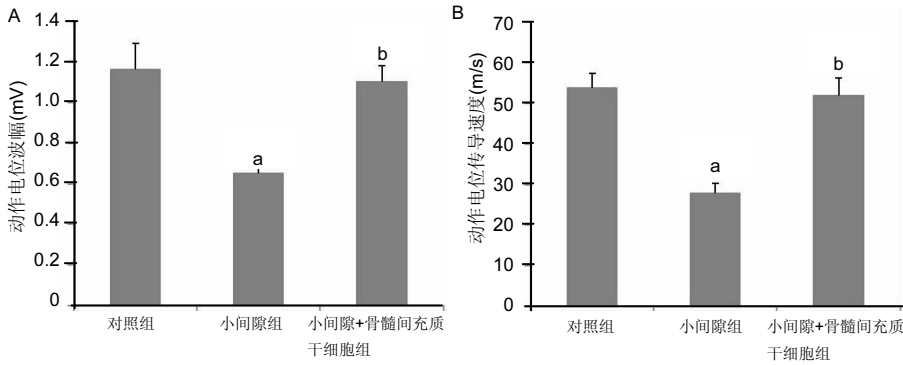


图1 骨髓间充质干细胞充填的小间隙套接治疗对喉返神经损伤大鼠喉返神经电生理功能的影响

Figure 1 Effect of bone marrow mesenchymal stem cells-packed small-gap sleeve on neuroelectrophysiological function of rats with recurrent laryngeal nerve defect

图注: 图中 A 为动作电位波幅; B 为动作电位传导速度。与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与小间隙组相比, ^b $P < 0.05$ 。

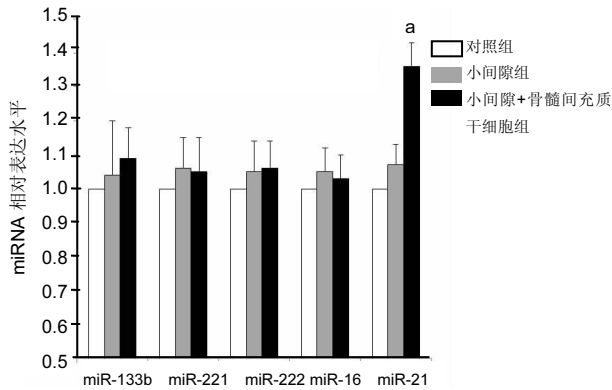


图2 骨髓间充质干细胞充填的小间隙套接治疗对喉返神经损伤大鼠再生神经组织中 5 种 miRNA 表达水平的影响

Figure 2 The expression of five neural restoration-related miRNAs in rats with recurrent laryngeal nerve defect after treatment with bone marrow mesenchymal stem cells-packed small-gap sleeve

图注: 与对照组和小间隙组相比, ^a $P < 0.05$ 。

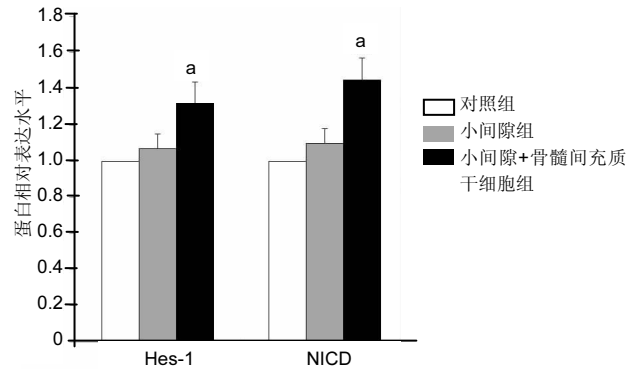


图3 骨髓间充质干细胞充填的小间隙套接治疗对喉返神经损伤大鼠再生神经组织中 Notch 通路相关蛋白 Hes-1 和 NICD 的表达水平的影响

Figure 3 The expression of Hes-1 and NICD related to Notch signaling pathway in rats with recurrent laryngeal nerve defect after treatment with bone marrow mesenchymal stem cells-packed small-gap sleeve

图注: 与对照组和小间隙组相比, ^a $P < 0.05$ 。

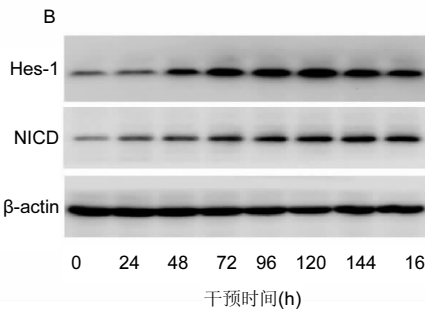
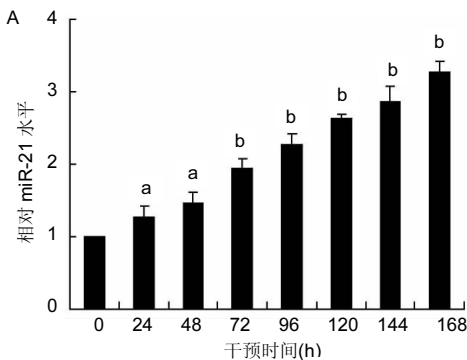


图4 体外诱导情况下 miR-21(A)和 Notch 通路相关蛋白(B)的动态表达情况

Figure 4 The dynamic expression of miR-21 and Notch signaling pathway-related proteins during *in vitro* induction of bone marrow mesenchymal stem cells

图注: 与 0 h 相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

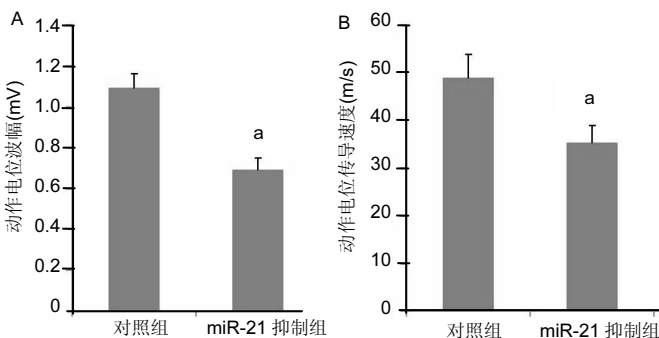


图6 抑制 miR-21 表达对干细胞+小间隙疗法治疗效果的影响

Figure 6 Effect of miR-21 knockdown on neural restoration after treatment with bone marrow mesenchymal stem cells-packed small-gap sleeve

图注: 图中 A 为动作电位波幅; B 为动作电位传导速度。与对照组相比, ^a $P < 0.05$ 。

渐增加(图4A); Notch信号通路代表物Hes-1和NICD的表达亦随时间逐渐增强(图4B),其中Hes-1的表达峰值出现于120 h时间点, NICD的表达峰值出现于144 h时间点。

2.3.2 过表达miR-21条件下干预Notch信号通路的改变观察 实验首先证实了在骨髓间充质干细胞中加入神经分化诱导剂后,其表达6种神经相关蛋白的能力明显增强。随后,在此体系中分别应用预先用miR-21模拟物转染的骨髓间充质干细胞使其过表达miR-21,或加入Notch通路激动剂使Notch信号通路被激活,2种条件下骨髓间充质干细胞表达6种蛋白的能力均得到明显上调(图5A)。如果在miR-21转染后的骨髓间充质干细胞体系中继续加入Notch通路抑制剂,则对6种蛋白的表达能力产生了明显的中和或抑制作用(图5B),说明Notch通路具有凌驾于miR-21之上的否决作用。

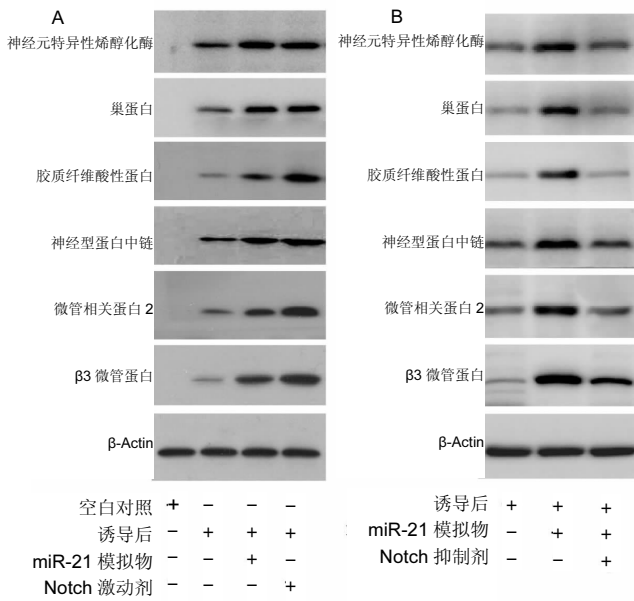


图5 过表达 miR-21 条件下激活或拮抗 Notch 信号通路后神经标志物的表达情况

Figure 5 Effect of miR-21 overexpression or modulation of Notch signaling pathway on the expression of neural markers

图注：图中 A 为应用 miR-21 模拟物和 Notch1 通路激动剂 Jagged-1/Fc 的情况；B 为应用 miR-21 模拟物和 Notch1 通路拮抗剂 GSI 的情况。

2.3.3 抑制miR-21对治疗作用的影响 将miR-21抑制剂处理的骨髓间充质干细胞填充套管后重复2.1内容中的体内实验，损伤后4周行神经电生理检查，结果miR-21抑制组神经传导速度与动作电位波幅均较对照组明显降低(图6)。

3 讨论 Discussion

近年来，小间隙人工神经套管在周围神经损伤领域取得了大量的基础研究成果，在临床研究中也得到了初步应用，但与传统治疗方法相比优势仍十分有限，因此利用干细胞或其他技术强化其治疗效果，并深入探索其内在理论机制，是一种必然的研究方向。实验将骨髓间充质干细胞载入小间隙套管后治疗周围神经损伤获得了有效的强化治疗效果，改善了修复后神经组织形态，提高了神经信号的传导能力。同时实验发现Notch信号通路活化和miR-21表达上扬在这一过程中可能发挥了重要作用，Notch信号通路具有更高级别的促进或抑制作用强度。

近年来，Notch信号通路在周围神经损伤领域受到广泛关注，实验结果确认了Notch信号通路激活在所采用的治疗方案中的作用，其相关机制可能有两方面：①许旺细胞是周围神经损伤修复过程的核心成分之一，而Notch通路激活是这一过程中许旺细胞表型发生改变的重要特征^[15]。NICD的表达在横断后的周围神经组织中显著升高，而对其进行干扰最终可以导致神经髓鞘再生过程无法进行^[16]。反之，如果人为提高许旺细胞内NICD的表达量，可以观察到神经损伤后许旺细胞迅速进入去分化进程^[17]。因此许旺细胞的

最终活化可能是治疗方案产生明显效果的机制之；②Notch信号通路可以介导数种干细胞分化过程，并且对于维持干细胞特性发挥重要作用^[18-19]。文献证实，Notch信号通路在神经系统中可以介导间充质干细胞的神经元方向分化，进而促进损伤后的神经功能恢复过程^[20]。在Notch信号通路被激活后，细胞内开始进行Notch蛋白的切割清除过程，随后引导NICD进入细胞核，在转录层面进一步调节Notch相关目标及基因的表达，如Hes-1、细胞周期蛋白依赖性激酶2和p21^[21]，因此Notch信号通路活化可认为是治疗方案中骨髓间充质干细胞充分发挥作用的原因之一。

研究中同时筛选了数种miRNA的表达情况，最终发现miR-21的表达在骨髓间充质干细胞组中明显升高。miRNA是一种单链内源性小分子RNA，主要在转录后水平阶段调控目标基因的表达^[22-24]。在神经元的发育和分化过程中，miR-200家族被确认具有关键性调控作用^[25]。在神经保护和修复过程中，miR-21也被发现具有重要作用：如miR-21表达上调与颅脑损伤后神经逻辑功能的恢复具有明显相关性^[26]；miR-124可以促进骨髓间充质干细胞分化成神经元样细胞，并促进脊髓损伤后的功能恢复^[27]；miR-21和miR-222可以通过抑制TIMP3以减少坐骨神经损伤后背根神经节的坏死，改善神经功能^[28]。实验进一步发现在体外骨髓间充质干细胞向神经组织诱导分化过程中，miR-21随时间进展表达浓度逐渐升高，证明了其在骨髓间充质干细胞的分化过程中也起到重要作用。同时，该过程中Notch信号通路活性也逐渐升高，证明了二者形成了某种相互作用的关系。

作者在最后重点探索了分别干预Notch通路和miR-21的功能对骨髓间充质干细胞神经方向分化的影响，结果显示应用Notch信号通路系统激活剂激活Notch信号通路系统，或应用miR-21模拟物提高miR-21表达，两过程均可以促进骨髓间充质干细胞的神经系统分化。该结果证明二者任一方的启动均可产生促进骨髓间充质干细胞分化的作用，同时也可能存在某种协同作用。添加Notch信号通路拮抗剂后，骨髓间充质干细胞的神经系统分化活性明显减弱。在另一条件下，应用miR-21抑制物处理骨髓间充质干细胞可以抑制骨髓间充质干细胞+小间隙套管疗法的治疗作用。该结果从另一方面证实二者任一方的抑制均可减弱骨髓间充质干细胞的神经修复活性。另一重要发现是抑制Notch信号通路活性后，不但可以单独抑制骨髓间充质干细胞的神经元样分化作用，同时miR-21高表达所介导的激活作用同样可以被减弱甚至中和。这说明Notch信号通路在否决效应上具有更强者miR-21的作用机制。前期文献报道可查得Notch和miR-21在Notch趋向急性T细胞型淋巴瘤母细胞白血病中以及结直肠癌发生过程中存在交互作用^[29-30]，但实验结果是二者在周围损伤领域交互作用的首次报道，这种交互作用有可能在周围神经损伤领域具有尚未发现的重要研究价值，值得后续研究进一步探索深入。

综上所述，研究证实了Notch信号通路和miR-21在骨

髓间充质干细胞联合小间隙套管治疗周围神经损伤疗效中具有重要作用,二者任一方单独均可产生促进或抑制作用。研究首次证实在Notch信号通路和miR-21发生交互作用时,Notch信号通路具有更高级别的促进或抑制作用强度。这些结论为周围损伤领域进一步的理论机制研究提供了一个具有吸引力的参考方向。

作者贡献: 第一作者和通讯作者构思并设计实验,第一作者和第二作者共同分析文献资料并完成基础实验,第一作者与第三作者进行统计学分析并起草文稿,经通讯作者审核,第一作者及通讯作者对本文负责。

经费支持: 该文章接受了“山东省重点研发计划(2017GSF218047)”的资助。但是所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经山东大学齐鲁医院伦理审批委员会批准,批准号为 KYLL-2016-134。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在氯胺酮和甲苯噻嗪麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE 指南)。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am.* 2000; 25(3):391-414.
- [2] Zujovic V, Bachelin C, Baron-Van Evercooren A. Remyelination of the central nervous system: a valuable contribution from the periphery. *Neuroscientist.* 2007;13(4):383-391.
- [3] Gerth DJ, Tashiro J, Thaller SR. Clinical outcomes for Conduits and Scaffolds in peripheral nerve repair. *World J Clin Cases.* 2015;3(2): 141-147.
- [4] Pabari A, Lloyd-Hughes H, Seifalian AM, et al. Nerve conduits for peripheral nerve surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2014;133(6):1420-1430.
- [5] Kehoe S, Zhang XF, Boyd D. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy. *Injury.* 2012;43(5):553-572.
- [6] Wislet-Gendebien S, Laudet E, Neirinckx V, et al. Mesenchymal stem cells and neural crest stem cells from adult bone marrow: characterization of their surprising similarities and differences. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(15):2593-2608.
- [7] Croft AP, Przyborski SA. Generation of neuroprogenitor-like cells from adult mammalian bone marrow stromal cells in vitro. *Stem Cells Dev.* 2004;13(4):409-420.
- [8] Lopez-Verrilli MA, Caviedes A, Cabrera A, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes from different sources selectively promote neuritic outgrowth. *Neuroscience.* 2016;320:129-139.
- [9] Woodhoo A, Alonso MB, Droggiti A, et al. Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nat Neurosci.* 2009;12(7):839-847.
- [10] Yanjie J, Jiping S, Yan Z, et al. Effects of Notch-1 signalling pathway on differentiation of marrow mesenchymal stem cells into neurons in vitro. *Neuroreport.* 2007;18(14):1443-1447.
- [11] Zou D, Chen Y, Han Y, et al. Overexpression of microRNA-124 promotes the neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Neural Regen Res.* 2014;9(12):1241-1248.
- [12] Zhao Y, Jiang H, Liu XW, et al. MiR-124 promotes bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into neurogenic cells for accelerating recovery in the spinal cord injury. *Tissue Cell.* 2015;47(2): 140-146.
- [13] Zhang P, Xue F, Kou Y, et al. The experimental study of absorbable chitin conduit for bridging peripheral nerve defect with nerve fasciculi in rats. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2008;36(4):360-371.
- [14] Yu K, Zhang C, Wang Y, et al. The protective effects of small gap sleeve in bridging peripheral nerve mutilation. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2009;37(6):257-264.
- [15] Wang J, Zhang P, Wang Y, et al. The observation of phenotypic changes of Schwann cells after rat sciatic nerve injury. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2010;38(1):24-28.
- [16] Wang J, Ren KY, Wang YH, et al. Effect of active Notch signaling system on the early repair of rat sciatic nerve injury. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2015;43(6):383-389.
- [17] Yang T, Liu LY, Ma YY, et al. Notch signaling-mediated neural lineage selection facilitates intrastriatal transplantation therapy for ischemic stroke by promoting endogenous regeneration in the hippocampus. *Cell Transplant.* 2014;23(2):221-238.
- [18] Chuang JH, Tung LC, Lin Y. Neural differentiation from embryonic stem cells in vitro: An overview of the signaling pathways. *World J Stem Cells.* 2015;7(2):437-447.
- [19] Xing Y, Chen X, Cao Y, et al. Expression of Wnt and Notch signaling pathways in inflammatory bowel disease treated with mesenchymal stem cell transplantation: evaluation in a rat model. *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6:101.
- [20] Xu H, Miki K, Ishibashi S, et al. Transplantation of neuronal cells induced from human mesenchymal stem cells improves neurological functions after stroke without cell fusion. *J Neurosci Res.* 2010;88(16):3598-3609.
- [21] Osathanon T, Manokawinchoke J, Nowwarote N, et al. Notch signaling is involved in neurogenic commitment of human periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2013;22(8): 1220-1231.
- [22] Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, et al. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* 2006;20(5): 515-524.
- [23] Guo Q, Chen Y, Guo L, et al. miR-23a/b regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells. *Bone Res.* 2016;4:16022.
- [24] Foshay KM, Gallicano GI. Small RNAs, big potential: the role of MicroRNAs in stem cell function. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2007;2(4): 264-271.
- [25] Pandey A, Singh P, Jauhari A, et al. Critical role of the miR-200 family in regulating differentiation and proliferation of neurons. *J Neurochem.* 2015;133(5):640-652.
- [26] Ge XT, Lei P, Wang HC, et al. miR-21 improves the neurological outcome after traumatic brain injury in rats. *Sci Rep.* 2014;4:6718.
- [27] Zhao Y, Jiang H, Liu XW, et al. MiR-124 promotes bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into neurogenic cells for accelerating recovery in the spinal cord injury. *Tissue Cell.* 2015;47(2): 140-146.
- [28] Zhou S, Zhang S, Wang Y, et al. MiR-21 and miR-222 inhibit apoptosis of adult dorsal root ganglion neurons by repressing TIMP3 following sciatic nerve injury. *Neurosci Lett.* 2015;586:43-49.
- [29] Junker F, Chabloz A, Koch U, et al. Dicer1 imparts essential survival cues in Notch-driven T-ALL via miR-21-mediated tumor suppressor Pcdcd4 repression. *Blood.* 2015;126(8):993-1004.
- [30] Xiong Y, Zhang YY, Wu YY, et al. Correlation of over-expressions of miR-21 and Notch-1 in human colorectal cancer with clinical stages. *Life Sci.* 2014;106(1-2):19-24.