新型纳米支架对神经干细胞生物行为及相关基因表达的影响

https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.2363
投稿日期：2020-02-17
送审日期：2020-02-26
采用日期：2020-03-20
在线日期：2020-08-20
中图分类号：
R459.9；R-331；R318
文章编号：
2095-4344(2021)04-00532-05
文献标识码：A

周继辉[1]，姚 猛[2]，王岩松[2]，李新志[1]，周 游[1]，黄 卫[1]，陈文瑶[1]

文章快速阅读：

制备纳米纤维膜
利用静电纺织技术制备平行排列及交错排列的纳米纤维膜

细胞增殖
采用 MTT 法检测细胞增殖，流式细胞仪检测细胞增殖周期变化，实时定量 PCR 技术检测 Bcyclin D1 及 CDK2 基因表达

接种细胞
将神经干细胞分别接种于两种排列的纳米纤维膜上

细胞分化
免疫组化分析细胞神经元分化率

文章特点—
△制备以胶原为原料的纤维定向平行排列及交错排列纳米纤维膜，从细胞及分子水平探寻纳米纤维膜与神经干细胞相互作用的机制。

文题释义：
MTT实验：是一种公认的检测生物材料细胞相容性的方法，吸光度值反映纳米支架对细胞数量的影响，可以判断支架的细胞毒性及对细胞增殖的影响。
Bcyclin与CDK基因：CDK在细胞周期的调控中占据核心地位，其表达水平增高促进细胞增殖；Bcyclin能够增高CDK的表达水平，通过对CDK正性调节促进细胞的增殖；细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子能够降低CDK的表达水平，抑制细胞的增殖。

摘要
背景：利用纳米技术制备的支架可形成与天然生物体内基底膜结构相似的表面结构，对种子细胞的行为进行有效调节。
目的：观察平行与交错排列纳米纤维膜对神经干细胞增殖及分化等生物学行为的影响。
方法：以Ⅰ型胶原为材料，利用静电纺织技术制备平行排列纳米纤维膜与交错排列的纳米纤维膜。将新生大鼠神经干细胞接种于两种纳米纤维膜表面，以单独的细胞培养为对照，采用MTT法检测细胞增殖，流式细胞仪检测细胞增殖周期变化，免疫组化分析细胞神经元分化率，实时定量PCR技术检测Bcyclin D1及CDK2基因表达。
结果与结论：①平行排列组、交错排列组培养1，3，5，7，9 d的细胞增殖吸光度值均高于对照组($P < 0.05$)，平行排列组培养3，5，7，9 d的细胞增殖吸光度值高于交错排列组($P < 0.05$)；②平行排列组、交错排列组增殖期细胞比率高于对照组($P < 0.05$)，并且平行排列组高于交错排列组($P < 0.05$)；③免疫组化显示，3组细胞的神经元分化率比较差异无显著性意义($P > 0.05$)；④实时定量PCR技术检测显示，平行排列组、交错排列组Bcyclin D1及CDK2基因表达量高于对照组($P < 0.05$)，并且平行排列组高于交错排列组($P < 0.05$)；⑤结果表明，平行及交错排列纳米纤维膜可促进神经干细胞的增殖，对细胞分化无明显影响，能够从基因表达水平调节神经干细胞的生物学行为。
关键词：材料；基因；支架；纳米；干细胞；细胞增殖；分化；神经

Influence of novel nanoscaffolds on biological behaviors of neural stem cells and the related gene expression

Zhou Jihui[1], Yao Meng[2], Wang Yansong[2], Li Xinzhi[1], Zhou You[1], Huang Wei[1], Chen Wenyao[1]
[1]Department of Orthopedics, Affiliated Renhe Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443001, Hubei Province, China; [2]Department of Spine Surgery, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Zhou Jihui, MD, Chief physician, Department of Orthopedics, Affiliated Renhe Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443001, Hubei Province, China
Corresponding author: Yao Meng, Professor, Department of Spine Surgery, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Co-corresponding author: Wang Yansong, Professor, Department of Spine Surgery, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

[1]三峡大学附属仁和医院骨科，湖北省宜昌市 443001；[2]哈尔滨医科大学附属第二医院脊柱外科，黑龙江省哈尔滨市 150086
第一作者：周继辉，男，1974 年生，黑龙江省哈尔滨市人，汉族，2012 年哈尔滨医科大学毕业，博士，主任医师，主要从事脊髓组织工程研究。
通讯作者：姚猛，教授，哈尔滨医科大学附属第二医院脊柱外科，黑龙江省哈尔滨市 150086
通讯作者：王岩松，教授，哈尔滨医科大学附属第二医院脊柱外科，黑龙江省哈尔滨市 150086
https://orcid.org/0000-0002-2646-5343 (周继辉)
引用本文：周继辉，姚猛，王岩松，李新志，周游，黄卫，陈文瑶 . 新型纳米支架对神经干细胞生物行为及相关基因表达的影响 [J]. 中国组织工程研究，2021，25(4):532-536.

Abstract

BACKGROUND: The scaffold made by nanotechnology may have a similar surface structure to basement membrane of natural organism, which can effectively regulate the behavior of seed cells.

OBJECTIVE: To observe the effects of parallel and staggered nanofiber membranes on the proliferation and differentiation of neural stem cells.

METHODS: The parallel and staggered nanofiber membranes were prepared using electrostatic spinning technology with type I collagen as raw material. Neural stem cells of newborn rats were seeded on the surface of two kinds of nanofiber membranes. Cell culture alone was used as control. Cell proliferation was detected by MTT assay. Cell proliferation cycle was detected by flow cytometry. Cell differentiation rate was detected by immunohistochemistry. The gene expression of Bcyclin D1 aned CDK2 was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The absorbance values of cell proliferation of parallel arrangement group and staggered arrangement group at 1, 3, 5, 7 and 9 days were higher than that of the control group (P < 0.05). The absorbance value of cell proliferation of parallel arrangement group was higher than that of staggered arrangement group at 3, 5, 7 and 9 days (P < 0.05). (2) Cell differentiation rate in the parallel arrangement group and the staggered arrangement group was higher than that in the control group (P < 0.05), and that in the parallel arrangement group was higher than that in the staggered arrangement group (P < 0.05). (3) Immunohistochemistry showed that there was no significant difference in neuronal differentiation rate among the three groups (P > 0.05). (4) Real-time quantitative polymerase chain reaction demonstrated that the expression of Bcyclin D1 and CDK2 was higher in the parallel arrangement group and staggered arrangement group was higher than in the control group (P < 0.05); and the expression was higher in the parallel arrangement group than in the staggered arrangement group (P < 0.05). (5) The results confirmed that parallel and staggered nano tissue engineering can promote the proliferation of neural stem cells, but has no significant effect on cell differentiation, and can regulate the biological behavior of neural stem cells from the level of gene expression.

Key words: materials; gene; scaffold; nano; stem cells; cell proliferation; differentiation; nerve

How to cite this article: *ZHOU JH, YAO M, WANG YS, LI XZ, ZHOU Y, HUANG W, CHEN WY. Influence of novel nanoscaffolds on biological behaviors of neural stem cells and the related gene expression. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2021;25(4):532-536.*

0 引言 Introduction

应用组织工程修复脊髓损伤是近年来的研究热点，将种子细胞与支架材料有机结合达到修复的目的。支架材料对种子细胞生物行为的影响至关重要，通过技术改进优化支架的性能是众多学者追求的目标。组织工程对支架材料的机械性能及组织相容性均有较高的要求。目前的支架材料根据来源及性能大致分为：天然材料、非降解合成材料及可降解合成材料3种，天然材料生物相容性较好，但其理化性能需要提高；合成材料组织相容性往往不尽人意。与正常脊髓相比，现有的支架材料无论从理化性能还是生物性能方面均存在较多不足，还未研制出与天然脊髓立体结构与理化性能类似的支架材料，通过先进的制备技术改善天然材料的性能是切实可行的研究方向。

纳米技术精确性更高，可控性更强，使支架的制备技术及性能得到了飞跃，可形成与天然生物体内基底膜结构相似的表面结构，对种子细胞的行为进行有效调节，在脊髓组织工程中的应用前景十分广阔 [1-2]。已经证实脊髓源性神经干细胞是优质的种子细胞，实验以胶原为原料，应用电纺丝技术精确调整纤维直径及走向制备新型脊髓纳米组织工程支架，检测其对神经干细胞增殖及分化等生物学行为的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计　体外细胞学观察实验。

1.2 时间及地点　实验于 2010 年 3 月至 2011 年 4 月在哈尔滨医科大学附属第二医院实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 主要试剂　Ⅰ型胶原蛋白、1，1，1，3，3，3－六氟代−2−丙醇、BrdU(SigmaeAldrich，美国)；巢蛋白 (Nestin1 ∶ 500) 多克隆抗体、BrdU (1 ∶ 100) 多克隆抗体、山羊抗兔 IgG 二抗 (TRITC 标记) 及山羊抗鼠 IgG 二抗 (FITC 标记)、0.01% 木瓜蛋白酶、0.01% 脱氧核糖核酸酶 (Sigma，美国)；DMEM/F12 (Invitrogen，CA)；0.13% 胰蛋白酶 (Invitrogen，美国)；表皮生长因子、胎牛血清 (Chemicon，美国)；碱性成纤维细胞生长因子 (Chemicon，CA)；0.002% 肝素 (Stem cell Technology)。

1.3.2 实验动物　新生 SD 大鼠，平均体质量 10.26 g，清洁级，由哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物中心提供。

1.4 实验方法

1.4.1 平行纳米纤维膜及交错纳米纤维膜的制备　参照前期实验方法制备纳米纤维膜 [3]。原料为Ⅰ型胶原蛋白，溶剂为 1，1，1，3，3，3－六氟代－2－丙醇，二者质量体积比为 8%，制备装置由接地电极、输液泵和高电压电源组成。溶液在 7 000 V 电压作用下，以 0.5 mL/ h 的速率在输液泵中推注，通过平板收集器收集交错排列的胶原纤维，通过鼓状收集器收集平行排列的胶原纤维，收集过程中转速为 3 000 r/min，收集后的纤维膜在室温并真空条件下自然干燥 12 h。

1.4.2 神经干细胞的培养和鉴定　新生 SD 大鼠经乙醇浸泡消毒，取出脊髓并剥离脊膜，在完全培养液中剪碎，培养液含体积分数 0.02% 胎牛血清、10 μg/L 碱性成纤维细胞生长因子、20 μg/L 表皮生长因子及 0.002% 的肝素，基质为 DMEM/F12[4]。每两三天半量换液，每 5−7 d 进行机械分离传代。以鼠抗 BrdU (1 ∶ 100) 多克隆抗体及兔抗巢蛋白 (Nestin 1 ∶ 500) 多克隆抗体作为检测一抗，以山羊抗兔 IgG (TRITC 标记) 及山羊抗鼠 IgG (FITC 标记) 为二抗，对神经干细胞进行双标免疫组化鉴定。

1.4.3 MTT 法检测纳米纤维膜的生物相容性　随机取 96 孔板，随机分为对照组、平行膜组、交错膜组、空白组，每组 8 孔。将平行及交错纳米纤维膜紫外线消毒后以完全细胞培养液溶胀，无菌条件下放置于细胞培养板的孔底，将传代的神经干细胞制成单细胞悬液，对照组、平行膜组、交错膜组每孔中加入细胞浓度为 $1×10^8$ L^{-1} 的神经干细胞悬液 100 μL，空白组各孔中加入细胞培养液。每日观察细胞状态，每 2 d 于每孔加入约 20 μL 培养液。培养的第 1，3，5，7，9 天各取 4 块 96 孔板进行 MTT 实验 , 在分光光度计上选择波长 490 nm 读取吸光度值。

1.4.4 神经干细胞与纳米支架共培养 将平行及交错纳米纤维膜裁剪成适当尺寸，紫外线消毒，加入细胞培养液使其充分溶胀，无菌条件下置于 25 mL 培养瓶的底面；将 4.0-5.0 mL 传代后的神经干细胞单细胞悬液，加于培养瓶中，细胞浓度为 1×10^8 L^{-1}。每两三天半量更换培养液，六七天后进行后续实验。

1.4.5 细胞周期检测 细胞与支架共培养 7 d 后，洗脱纳米纤维膜表面的细胞，收集细胞，以预冷的 0.01 mol/L PBS 清洗，以 1 mL 预冷的体积分数 70% 乙醇固定。恒温冰箱内放置 12 h，离心后 PBS 再次清洗 1 次，1 g/L 核糖核酸酶处理后用碘化丙啶 (PI) 染液 (50 mg/L) 避光染色 30 min，流式细胞仪检测与细胞周期相关的 DNA 含量，每组实验重复 4 次。

1.4.6 免疫组化检测 细胞与支架共培养 7 d 后，取 3 块 12 孔培养板，对照组、平行膜组、交错膜组各一块，在培养孔中置入涂布 0.01% 多聚赖氨酸的盖玻片。适当吹打神经干细胞悬液，使神经球和单个细胞比率为 1 ∶ 1 左右，向每孔中加入 100 μL 比率适当的神经干细胞悬液，再加入 100 μL 诱导分化液 (含体积分数 1% 胎牛血清的完全培养液)，在 37 ℃、体积分数 5%CO_2 条件下诱导分化 1 周，视每日观察情况加入适量诱导分化液，分化后进行免疫荧光组化鉴定，每孔加入兔抗微管相关蛋白 2(MAP2) 单克隆抗体 (1 ∶ 100) 100 μL。4 ℃ 孵育过夜，再加入异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记山羊抗兔 IgG (1 ∶ 100)37 ℃孵育 2 h，以 33258 进行细胞核染色，封固后在荧光显微镜下观察，选择理想的的视野照相，收集资料。每组细胞随机选取 10 个 200 倍视野，分化细胞数占总细胞数的比率即为分化率。

1.4.7 实时定量 PCR 检测相关基因表达 细胞与支架共培养 7 d 后提取 RNA，进行反转录，定量 PCR 检测，先进行引物测试，再进行正式实验，二者条件相同，引物均需进行模板水对照。引物为 Cyclin D1(上游引物：5′ GGA GTG TGG TGG CCG CGA TG 3′； 下游引物：5′ CGG AGG CAG TCC GGG TCA CA3′) 及 CDK2 (上游引物：5′TCT CAC CGT GTC CTG CAC CGA 3′；下游引物：5′GGC CCT GCG GGT CAC CAT TTC 3′)。正式实验时反应体系由 5 μL SYBR Green PCR Master Mix (Roche)、3 μL cDNA(1 ∶ 20 稀释)、上游引物及下游引物各 0.15 μL (1 μmol/L) 组成。无模板控制以纯净水替代 cDNA，qPCR 反应步骤如下：95 ℃变性 10 min，进行循环 40 次，每循环先以 95 ℃作用 15 s，退火和延伸 1 min(60 ℃)，使用 GAPDH 和 HPRT 为内参。Ct(Cyclethreshold) 值代表反应体系中荧光信号强度达到域值时所经过的反应循环数，$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 代表了实验组细胞目的基因表达与对照组细胞目的基因表达的差异倍数。实验重复 4 次。

1.5 主要观察指标 平行与交错排列纳米纤维膜对神经干细胞增殖与分化的作用。

1.6 统计学分析 以 SPSS 16.0 统计学软件急性统计处理，计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用方差分析，$P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 纳米纤维膜的表征 前期实验经扫描电镜观察并应用专用图像计算系统 (哈尔滨林业大学提供) 进行测量，平行纳排列米纤维膜的纤维直径为 (694±157) nm，纤维排列方向大致平行；交错排列纳米纤维膜纤维直径为 (785±177) nm，纤维排列方向纵横交错。

2.2 神经干细胞的培养与鉴定 脊髓源性神经干细胞初次接种后多单个存在，呈圆形，一两天仍以单个细胞为主 (图 **1A**)，可聚集形成不规则的细胞团，经吹打即可散开。3 d 后细胞分裂增殖形成神经球，呈椭圆形悬浮于培养液中，不易吹散，边界清晰，5-7 d 神经球经增殖明显，细胞数可达数百个 (图 **1B**)，中心细胞因营养供应不良出现坏死表现，进行机械传代后细胞单个或以较小神经球的形式存在，传代后增殖速度无明显变化。

传代后的脊髓源性神经干细胞在标记后，在荧光显微镜下即可见明亮的绿色荧光，又可见明亮的橙红荧光，2 种荧光可合成于同一细胞，说明神经干细胞表达神经干细胞的特有标志物 Nestin，同时表达 BrdU。

加入诱导分化液 1 h 后，即可发现单个神经干细胞及神经球开始贴壁，细胞增大变形，边缘伸出突起，随时间推移，贴壁分化的细胞逐渐增多，7 d 左右分化完全 (图 **1C**)。

2.3 细胞增殖实验结果 MTT 检测显示，平行排列组、交错排列组培养 1，3，5，7，9 d 的细胞增殖吸光度均高于对照组 ($P < 0.05$)，平行排列组培养 3，5，7，9 d 的细胞增殖吸光度高于交错排列组 ($P < 0.05$)，见**表 1**。

表 1 | 各组培养不同时间点神经干细胞吸光度值的比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 | **Comparison of absorbance value of neural stem cells of each group at different time points**

培养时间	对照组	平行排列组	交错排列组	*F* 值	*P* 值
第 1 天	0.24±0.09	0.33±0.01	0.36±0.01	137.027	< 0.05
第 3 天	0.43±0.02	0.72±0.02	0.58±0.01	360.037	< 0.05
第 5 天	0.70±0.02	0.87±0.02	0.70±0.02	115.685	< 0.05
第 7 天	0.80±0.02	0.97±0.01	0.89±0.01	155.905	< 0.05
第 9 天	0.90±0.01	0.94±0.01	0.92±0.02	36.412	< 0.05

2.4 细胞周期检测结果 对照组、交错排列组及平行排列组处于增殖期 ($S+G_2$) 的细胞比率分别为 (5.8±1.7)%，(9.5±1.4)%，(11.8±1.6)%， 见**图 2**；3 组间增殖期细胞比率比较差异有显著性意义 (F=2 123.917，$P < 0.05$)，平行排列组及交错排列组增殖期细胞比率明显大于对照组 (F=1 910.51，$P < 0.05$)，平行排列组大于交错排列组 (F=600，$P < 0.05$)。

2.5 细胞分化率检测结果 对照组、平行排列组及交错排列组细胞分化为神经元的比率分别为 (12.47±2.34)%，(12.65±2.20)%，(12.44±2.51)%，3 组间比较差异无显著性意义 (F=0.001，$P > 0.05$)，见**图 3**，**4**。

2.6 实时定量 PCR 检测结果 平行排列组、交错排列组 Bcyclin D1 及 CDK2 基因表达量高于对照组 ($P < 0.05$)，并且平行排列组高于交错排列组 ($P < 0.05$)，见**图 5**。

3 讨论 Discussion

脊髓损伤修复是近年来的研究热点，目前的临床治疗手段难以获得满意效果，多数研究仍处于基础研究阶段。脊髓组织工程需要种子细胞与支架材料有机结合，优化再生环境，重建脊髓组织，达到修复目的。近年来纳米技术在组织工程学中得到广泛应用，纳米支架材料的性能得到了实质性优化[5]。

胶原是良好的组织工程支架原料，应用纳米技术制备或处理后不仅使生物材料的机械性能得到优化，对种子细胞的调节作用也有很大改善[6-7]。电子纺丝技术的精确性更高，可控性更强，逐渐成为制备纳米级支架的首选方法[8]，使纳米支架制备技术及性能得到了飞跃[9]。天然的生物体内基底膜结构大多是以胶原构成的纳米级三维拓扑结构，静电纺丝技术制备的纳米纤维膜与天然生物体内基底膜结构相似[10]。

通过优选原料及制备技术，采用电子纺丝技术制备以Ⅰ型胶原为原料的纳米组织工程支架，电镜表征测试证明该纳米纤维膜膜纤维排列方向符合设计需要，纤维直径属于纳米级支架范畴，新型纳米纤维膜符合实验设计要求。

良好的性能是优质组织工程用支架的先决条件[11]，前期实验显示该纳米纤维支架具有良好的物理学特性与生物相容性[3]。此次实验进一步检测其对神经干细胞的增殖及分化的影响，通过基因表达水平检测揭示其作用原理。

MTT 实验是一种公认的检测生物材料细胞相容性的方法[12]，吸光度值反映纳米支架对细胞数量的影响，可以判断支架的细胞毒性及对细胞增殖的影响。共培养 3 d 以后，平行及交错排列纳米纤维膜表面的神经干细胞吸光度值均显著高于对照组，平行排列组吸光度值明显高于交错排列组，说明新型纳米支架可促进神经干细胞的增殖，平行排列纳米纤维膜的促进作用更加显著。流式细胞技术进一步分析了这种变化，在纳米纤维膜表面细胞处于增殖期的比率更高，平行排列组细胞增殖显著优于交错排列组。由此可以判定新型纳米支架能够有效促进神经干细胞增殖，纤维平行排列纳米支架促进增殖的作用更强。

神经干细胞的增殖行为主要受细胞周期调控因子的控制，包括细胞外和细胞内因子[13]。CDK 在细胞周期的调控中占据核心地位[14]，其表达水平增高促进细胞增殖；Bcyclin 能够增高 CDK 的表达水平[15]，通过对 CDK 正性调节促进细胞的增殖；细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子能够降低 CDK 的表达水平，抑制细胞的增殖，3 者共同构成了细胞增殖周期的调控基础[16]。基因表达水平检测显示，与纳米纤维支架共培养神经干细胞的 Bcyclin D1 及 CDK2 基因表达量明显增高，说明新型纳米支架通过改变神经干细胞的基因表达水平促进其增殖。

神经干细胞分化研究也是目前的研究热点，向神经元方向的分化是神经结构修复及功能恢复的关键[17-18]，许多研究致力于提高其分化成神经元的比率。神经干细胞定向分化主要由其自身基因进行调控，外界环境信号通过特定途径传入胞内，通过基因表达变化调控其分化行为[19]。决定神经干细胞分化的因素很多，各因素之间的相互作用方式也十分复杂，是目前的研究热点和待解决的难题[20-21]。作者期望所制备的纳米组织工程支架能够通过细胞微环境的改变提高神经干细胞分化为神经元的比率，但纳米纤维膜表面神经干细胞分化为神经元的能力并无明显增强，说明所制备的支架提供的微环境并未改变神经干细胞内源性调控因子，通过纳米技术改变神经细胞的分化能力还有待进一步研究，这也将是下一步实验重点研究的方向之一。

新型平行及交错排列纳米组织工程支架的生物学性能良好，可促进神经干细胞的增殖，对细胞分化无显著影响，能够从基因表达水平调节神经干细胞的生物学行为。

作者贡献：姚猛、王岩松进行实验设计，实验实施为周继辉、刘玉刚，实验评估为姚猛、王岩松，资料收集为周继辉，周继辉成文，周继辉审校并对文章负责。

经费支持：该文章未接受任何经费支持。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明：该文统计学方法已经哈尔滨医科大学生物统计学专家审核。

4 参考文献 References

[1] 孙佳慧，林欣怡，邹剑龙，等．神经组织工程技术治疗脊髓损伤的研究进展 [J]. 解剖学研究 ,2016,38(6):480-483.

[2] 张文龙，祁全．组织工程支架在脊髓损伤治疗的研究进展 [J]. 中国矫形外科杂志 ,2014,22(4):320-323.

[3] 周继辉，姚猛，王岩松，等．新型脊髓纳米组织工程支架的组织相容性 [J]. 中国组织工程研究 ,2013,17(21):3854-3861.

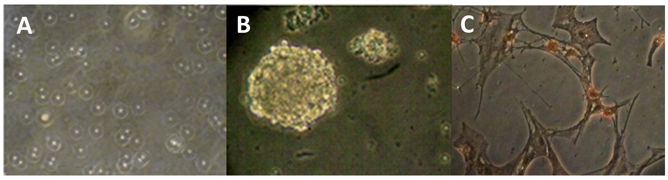
[4] HOU BR, JIANG C, WANG ZN, et al. Exosome-mediated crosstalk between microglia and neural stem cells in the repair of brain injury. Neural Regen Res. 2020;15(6):1023-1024.

[5] SUN X, BAI Y, ZHAI H, et al. Devising micro/nano-architectures in multi-channel nerve conduits towards a pro-regenerative matrix for the repair of spinal cord injury.Acta Biomater.2019;86:194-206.

[6] JØRGENSEN V, SLETTAHJELL HB, SKAVBERG ROALDSEN K, et al. Carboxy terminal collagen crosslinks as a prognostic risk factor for fall-related fractures in individuals with established spinal cord injury.Spinal cord. 2019;57(11):985-991.

[7] LIU XY, LIANG J, WANG Y, et al. Diffusion tensor imaging predicting neurological repair of spinal cord injury with transplanting collagen/chitosan scaffold binding bFGF.J Mater Sci.2019; 30(11):123.

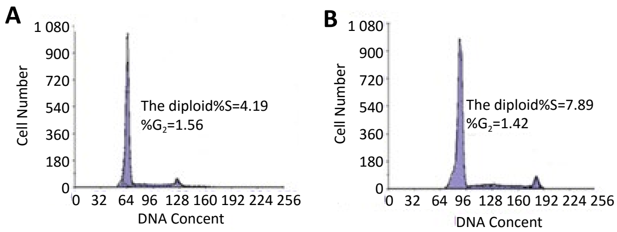
[8] HUANG J, ZHOU X, SHEN Y, et al. Asiaticoside loading into polylactic-co-glycolic acid electrospun nanofibers attenuates host inflammatory response and promotes M2 macrophage polarization.J Biomed Mater Res A.2020;108 (1):69-80.

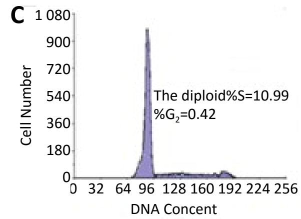


图注：A 为培养第 1 天的神经干细胞，多单个存在，呈圆形 (×60)；B 为培养第 7 天的神经干细胞，神经球经增殖明显，细胞数可达数百个 (×40)；C 为诱导分化的神经干细胞，细胞增大变形，边缘伸出突起 (×20)

图 1 | **神经干细胞的培养与分化**

Figure 1 | **Culture and differentiation of neural stem cells**

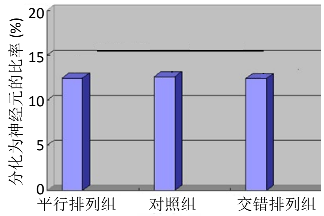




图注：A–C 分别为对照组、交错排列组及平行排列组，3 组对应的处于 $S+G_2$ 期细胞比率分别为 (5.8±1.7)%，(9.5±1.4)%，(11.8±1.6)%，组间两两比较差异均有显著性意义 (P < 0.05)

图 2 | **各组细胞增殖周期检测结果**

Figure 2 | **Results of cell cycle in each group**



图注：3 组间比较差异无显著性意义 (P > 0.05)

图 3 | **各组神经干细胞分化为神经元的比率**

Figure 3 | **Differentiation ratio into neurons from neural stem cells of each group**

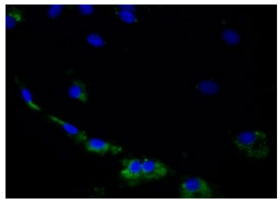
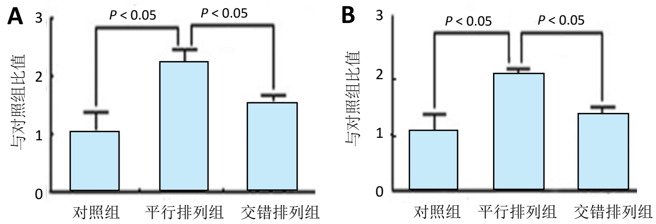


图 4 | **神经干细胞向神经元的分化 (荧光显微镜，×200)**

Figure 4 | **Neuronal differentiation from neural stem cells (fluorescence microscope, ×200)**



图注：A 为 Bcyclin D1 基因；B 为 CDK2 基因

图 5 | **各组神经干细胞 Bcyclin D1 及 CDK2 基因表达量**

Figure 5 | **Expression of Bcyclin D1 and CDK2 genes in neural stem cells of each group**

[9] XIE J, MACEWAN MR, SCHWARTZ AG, et al. Electrospun nanofibersforneural tissue engineering.Nanoscale.2010;2(1):35-44.

[10] CHRISTENSON EM, ANSETH KS, VAN DEN BEUCKEN JJ, et al. Nanobiomaterial applications in orthopedics.J Orthop Res.2007;1:11-22.

[11] SARACINO GA, CIGOGNINI D, SILVA D, et al. Nanomaterials design and tests for neural tissue engineering.Chem Soc Rev.2013;42(1):225-262.

[12] YOUSEFI F, LAVI ARAB F, JAAFARI MR, et al. Immunoregulatory, proliferative and anti-oxidant effects of nanocurcuminoids on adipose-derived mesenchymal stem cells.EXCLI J.2019;18:405-421.

[13] KOBAYASHI T, PIAO W, TAKAMURA T, et al. Enhanced lysosomal degradation maintains the quiescent state of neural stem cells.Nat Commun.2019;10(1):5446.

[14] MOHAN A, ASAKURA A. CDK inhibitors for muscle stem cell differentiation and self-renewal.J Phys Fit Sports Med.2017;6(2):65-74.

[15] VAN DEN HEUVEL S. Cell-cycle regulation.WormBook.2005:1-16.

[16] URBACH A, WITTE OW. Divide or Commit- Revisiting the Role of Cell Cycle Regulators in Adult Hippocampal Neurogenesis.Front Cell Dev Biol. 2019;7:55.

[17] ANAM MB, AHMAD SAI, KUDO M, et al. Akhirin regulates the proliferation and differentiation of neural stem cells/progenitor cells at neurogenic niches in mouse brain.Dev Growth Differ.2020;62(2):97-107.

[18] SANDQUIST EJ, SAKAGUCHI DS. Adult neural stem cell plasticity. Neural Regen Res. 2019;14(2):256-257.

[19] HU YY, ZHENG MH, CHENG G, et al. Notch signaling contributes to the maintenance of both normal neural stem cells and patient-derived glioma stem cells.BMC Cancer.2011;11:82.

[20] CHEN YT, TSAI MJ, HSIEH N, et al. The superiority of conditioned medium derived from rapidly expanded mesenchymal stem cells for neural repair.Stem Cell Res Ther.2019;10(1):390.

[21] CUI Y, YIN Y, XIAO Z, et al. LncRNA Neat1 mediates miR-124-induced activation of Wnt/β-catenin signaling in spinal cord neural progenitor cells.Stem Cell Res Ther.2019;10(1):400.