

骨髓间充质干细胞诱导为类许旺细胞的细胞外基质促进周围神经损伤后轴突再生

<https://doi.org/10.12307/2022.006>赵来赫¹, 夏冰², 马腾², 高捷勃³, 李胜友², 高雪⁴, 郑毅¹, 胡广文³, 罗卓荆², 黄景辉²

投稿日期: 2020-10-20

送审日期: 2020-10-23

采用日期: 2020-12-25

在线日期: 2021-05-08

中图分类号:

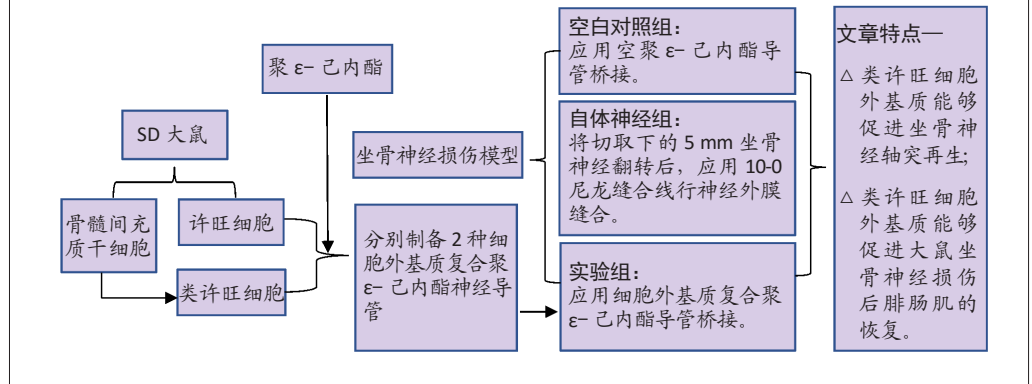
R459.9; R394.2; R722.14+4

文章编号:

2095-4344(2022)01-00033-07

文献标识码: A

文章快速阅读:



文题释义:

骨髓间充质干细胞诱导的许旺细胞: 骨髓间充质干细胞经碱性成纤维细胞生长因子、血小板衍生生长因子等诱导因子诱导分化为形态功能与许旺细胞类似的细胞。

细胞外基质: 由细胞分泌到细胞外间质中的大分子物质, 构成复杂的网架结构, 支持并连接组织结构, 调节组织的发生和细胞的生理活动。

摘要

背景: 既往研究发现许旺细胞及骨髓间充质干细胞诱导的类许旺细胞可以促进外周神经损伤后轴突的再生及功能恢复, 但由于许旺细胞来源有限而限制了其应用, 而且类许旺细胞外基质用于周围神经损伤的治疗鲜有报道。

目的: 探讨类许旺细胞外基质是否有助于周围神经损伤后的神经修复。

方法: 提取SD大鼠许旺细胞和骨髓间充质干细胞, 将骨髓间充质干细胞诱导分化为类许旺细胞, 并进行细胞鉴定和制备细胞外基质, 在体外环境下将背根神经节神经元和背根神经节组织块接种于细胞外基质上, 观察神经轴突生长情况。制备SD大鼠坐骨神经缺损模型, 分别用自体神经、类许旺细胞外基质复合聚ε-己内酯导管(诱导组)、许旺细胞外基质复合聚ε-己内酯导管(许旺组)桥接, 观察坐骨神经轴突再生及腓肠肌恢复情况。

结果与结论: ①与骨髓间充质干细胞比较, 类许旺细胞p75^{NTR}明显表达($P < 0.05$), 许旺细胞纯度为(95.20±4.63)%; ②类许旺细胞外基质和许旺细胞外基质能够在体外环境下促进背根神经节神经元与组织块神经轴突的生长; ③体内实验中自体神经组再生神经纤维连贯且排列有序; 诱导组和许旺组再生神经纤维贯通缺损区域, 与自体神经组类似; ④结果表明, 类许旺细胞和许旺细胞的细胞外基质能够促进周围神经损伤后轴突再生及修复, 为周围神经损伤提供了一种新的来源方便的无细胞疗法。

关键词: 干细胞; 骨髓间充质干细胞; 诱导; 类许旺细胞; 许旺细胞; 细胞外基质; 外周神经损伤

Extracellular matrix of Schwann-like cells induced by bone marrow mesenchymal stem cells promotes axonal regeneration after peripheral nerve injury

Zhao Laihe¹, Xia Bing², Ma Teng², Gao Jianbo³, Li Shengyou², Gao Xue⁴, Zheng Yi¹, Hu Guangwen³, Luo Zhuojing², Huang Jinghui²

¹Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China; ²First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China; ³Health Company of PLA 32117, Linjiang 134600, Jilin Province, China; ⁴Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi Province, China

Corresponding author: Luo Zhuojing, MD, Chief physician, Professor, First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Co-corresponding author: Huang Jinghui, MD, Associate chief physician, Associate professor, First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

¹空军军医大学, 陕西省西安市 710032; ²空军军医大学第一附属医院, 陕西省西安市 710032; ³解放军 32117 部队卫生连, 吉林省临江市 134600; ⁴西北大学, 陕西省西安市 710069

第一作者: 赵来赫, 男, 1994 年生, 辽宁省本溪市人, 汉族, 2018 年空军军医大学毕业, 医师, 主要从事骨科及神经再生方面的研究。

通讯作者: 罗卓荆, 博士, 主任医师, 教授, 空军军医大学第一附属医院, 陕西省西安市 710032

共同通讯作者: 黄景辉, 博士, 副主任医师, 副教授, 空军军医大学第一附属医院, 陕西省西安市 710032

<https://orcid.org/0000-0002-1574-2256> (赵来赫)

基金资助: 国家自然科学基金(81730065), 项目负责人: 罗卓荆; 国家自然科学基金(81672148), 项目负责人: 黄景辉; 国家自然科学基金(81802143), 项目负责人: 马腾

引用本文: 赵来赫, 夏冰, 马腾, 高捷勃, 李胜友, 高雪, 郑毅, 胡广文, 罗卓荆, 黄景辉. 骨髓间充质干细胞诱导为类许旺细胞的细胞外基质促进周围神经损伤后轴突再生 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(1):33-39.



Abstract

BACKGROUND: Previous studies have found that Schwann cells and bone marrow mesenchymal stem cells-derived Schwann cells can promote axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. However, the shortage of Schwann cells limited its application. Schwann-like cells-derived extracellular matrix is rarely reported in the treatment of peripheral nerve injury.

OBJECTIVE: To investigate whether Schwann-like cells-derived extracellular matrix contributes to nerve repair after peripheral nerve injury.

METHODS: Schwann cells and bone marrow mesenchymal stem cells were extracted from SD rats and the latter were induced into Schwann-like cells, then both were identified to prepare extracellular matrix. *In vitro*, dorsal root ganglion neurons and dorsal root ganglion tissue blocks were seeded on extracellular matrix to observe the growth of dorsal root ganglion axons. The sciatic nerve defect models of SD rats were established. The sciatic nerve axon regeneration and gastrocnemius muscle recovery were observed by using autologous nerve, Schwann-like cells-derived extracellular matrix composite poly(ϵ -caprolactone) conduit (induction group) and Schwann cells-derived extracellular matrix composite poly(ϵ -caprolactone) conduit (Schwann group) respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The expression of p75^{NTR} in Schwann-like cells was significantly higher than that in bone marrow mesenchymal stem cells ($P < 0.05$). The purity of Schwann cells was (95.20±4.63)%. (2) Schwann-like cells-derived extracellular matrix and Schwann cells-derived extracellular matrix could promote the growth of nerve axons in dorsal root ganglion tissue block *in vitro*. (3) *In vivo* experiment, regenerated nerve fibers in autologous nerve group were continuous and orderly arranged; regenerated nerve fibers in induction group and Schwann group penetrated through the defect area, similar to that in the autologous nerve group. (4) The results showed that Schwann-like cells-derived extracellular matrix and Schwann cells-derived extracellular matrix could promote axon regeneration and repair after peripheral nerve injury, which provided a new and convenient cell-free therapy for peripheral nerve injury.

Key words: stem cells; bone marrow mesenchymal stem cells; induction; Schwann-like cells; Schwann cells; extracellular matrix; peripheral nerve injury

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81730065 (to LZJ), No. 81672148 (to HJH), No. 81802143 (to MT)

How to cite this article: ZHAO LH, XIA B, MA T, GAO JB, LI SY, GAO X, ZHENG Y, HU GW, LUO ZI, HUANG JH. Extracellular matrix of Schwann-like cells induced by bone marrow mesenchymal stem cells promotes axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(1):33-39.

0 引言 Introduction

周围神经是一种脆弱且无保护的组织, 可因各种物理损伤而受损, 包括道路交通事故、建筑事故、自然灾害、战争损害、运动损伤、药物注射损伤和电损伤^[1-3]。周围神经损伤会破坏中枢神经系统和靶器官之间的信息传递, 从而导致运动、感觉或自主神经功能紊乱, 进而失去正常的肢体功能, 甚至导致永久性的残疾。在损伤后, 周围神经会获得一定的自身修复能力, 通常以 1-3 mm/d 的速度再生^[4]。然而, 周围神经损伤后的功能恢复有限, 对于神经间隙较大的严重损伤, 需借手术修复^[5-6]。目前, 对于周围神经损伤后未丢失神经组织或者是短节段缺失的, 常用的手术方法是端端缝合(神经联合缝合)^[7]。长节段缺损则需要植入神经移植植物或神经导管, 以帮助建立再生通道^[8-9]。植入从身体其他部位采集的神经移植植物可获得优越的再生效果, 是目前公认的金标准技术^[10-13]。现代临床通常使用显微外科手术进行自体神经移植^[14], 尽管取得了不错的进展, 但会导致供体区域的神经功能缺失而限制了其应用。长节段的缺损仍需要生物方法来增强神经再生和改善损伤后的功能, 因此, 寻找外周神经修复的替代方案仍是研究的重点。影响神经再生修复的关键因素是损伤处轴突再生的速度和残存的许旺细胞数量及增殖分化能力^[15]。

在周围神经损伤修复过程中, 许旺细胞分泌神经营养因子而对轴突再生发挥作用^[16], 也参与重建受损轴突微环境和引导再生轴突延伸等^[17]。但由于许旺细胞来源有限、体外培养时间较长、增殖速度较慢、纯化难度大, 用于细胞移植则较为困难^[18]。骨髓间充质干细胞是从成年后的动物骨髓中分裂和分化而来, 体外培养和纯化较容易, 来源方便^[19], 在适当条件下可分化为许旺细胞, 且已有文献报道其经诱导后与许旺细胞具有类似的功能, 可用于修复外周神经损伤^[20-23]。许旺细胞外基质已被报道具有很好的促神经修复效果^[24], 而对于骨髓间充质干细胞诱导分化而来的类许旺细胞外基质是否具有相同的修复功能, 则尚未见报道。

在当今再生医学研究中, 通常采用生物支架连接神经残端^[25], 其可作为运送药物和生长因子的载体。目前的研究发现脱细胞处理后的细胞外基质不仅可以保留原组织结构, 还存留大量的生长活性因子, 尤其利于细胞的增殖分化, 是比任何人工合成材料都理想的生物材料^[26]。该研究旨在探讨骨髓间充质干细胞诱导分化的类许旺细胞与许旺细胞分泌的细胞外基质是否有助于周围神经损伤修复并比较二者修复效果。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 2019年3月至2020年8月在空军军医大学西京医骨科实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 选取 12 d 龄雄性 SD 大鼠用于提取骨髓间充质干细胞, 1 d 龄 SD 大鼠用于提取背根神经节和许旺细胞; 体内实验选用雄性 SD 大鼠 40 只, 体质量 (220±10) g, 6-8 周龄。所有大鼠均由空军军医大学实验动物中心提供, SPF 级, 饲养环境适宜, 饮水和食物充足, 昼夜节律受灯光调节。该实验经空军军医大学动物实验伦理委员会批准 (KY20172005-1), 动物许可证号: SCXK(陕)2019-001。

1.3.2 实验主要试剂 蛋白提取试剂盒 (Solarbio); 胰蛋白酶 (Solarbio); 左旋多聚赖氨酸 (Sigma); Triton X-100 (Solarbio); BCA 蛋白定量试剂盒 (Solarbio); 青霉素-链霉素 (Solarbio); 磷酸盐缓冲液 (Gibico); 聚 ϵ -己内酯 (Sigma); 多聚甲醛 (Solarbio); 牛血清白蛋白 (Solarbio); β -巯基乙醇 (Sigma); 福司可林 (Calbiochem); 胎牛血清 (Gibico); 全反式维甲酸 (Sigma); 碱性成纤维细胞生长因子 (Peprotech); 血小板衍生生长因子 (Peprotech); 重组人神经调节蛋白 β 1 (Minneapolis); B27 (Gibico); 神经生长因子 (R & D systems); 谷氨酰胺 (Gibico); 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (MCE); 内参 Actin (Abcam); NF160 鼠单克隆抗体 (Abcam); 兔抗大鼠 S100 β 单克隆抗

体 (Abcam); β -tubulin-III 鼠单克隆抗体 (Abcam); 鼠抗大鼠 p75^{NTR} 单克隆抗体 (Abcam); NeuN 兔单克隆抗体 (Abcam); 山羊抗兔二抗 (Proteintech, Alex Fluor 488); 山羊抗兔二抗 (Proteintech, Alex Fluor 594); 山羊抗鼠二抗 (Proteintech, Alex Fluor 488); 山羊抗鼠二抗 (Proteintech, Alex Fluor 594); DMEM/F12(DMEM 和 Ham's F12 的 1 : 1 混合物) 培养基 (HyClone)。

1.3.3 实验主要仪器 培养瓶 (Thermo); 台式离心机 (湖南湘仪); 电泳仪 (北京六一); 石蜡切片机 (LEICA); 化学凝胶成像仪 (Bio-Rad); 荧光显微镜 (Zeiss); 转膜仪 (北京六一); 共聚焦显微镜 (Nikon); 扫描电子显微镜 (Zeiss)。

1.4 实验方法

1.4.1 许旺细胞的提取培养和纯化及骨髓间充质干细胞诱导分化为类许旺细胞 取 1 d 内的新生 SD 乳鼠, 雌雄不限, 从椎旁剪断坐骨神经近端及小腿后的神经远端, 用 0.25% 胰酶加 II 型胶原酶置于 37 °C 孵箱消化 30 min 后终止消化, 离心后加入含体积分数为 10% 胎牛血清, 2 mmol/L 福司可林、20 mg/L 牛垂体提取物、青霉素 - 链霉素的 DMEM/F12 许旺细胞培养基于 37 °C 孵箱培养, 得到许旺细胞。

取 12 d 龄雄性 SD 大鼠, 取出股骨和胫骨, 剪去干骺端, 用注射器吸取含体积分数为 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基缓慢插入一端, 从另一端冲出骨髓, 将细胞悬液种于培养瓶, 吸除血块, 置于 37 °C 细胞孵箱中培养, 得到骨髓间充质干细胞, 待细胞融合度达到 90% 传代, 第 3 代时进行类许旺细胞诱导。诱导方法: 加入含 1 mmol/L β - 巯基乙醇的无血清 α -MEM 培养基, 培养 1 d 后用 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4) 清洗, 再加入含体积分数为 10% 胎牛血清、35 μ g/L 全反式维甲酸的 α -MEM 培养基, 培养 3 d 后用 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4) 清洗, 再加入含 5 μ mol/L 福司可林、10 μ g/L 碱性成纤维细胞生长因子、5 μ g/L 血小板衍生生长因子, 200 μ g/L 重组人神经调节蛋白 β 1、体积分数为 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基培养 7 d, 得到类许旺细胞^[27]。

许旺细胞的培养及鉴定

| | |
|---------|--|
| 细胞来源: | 大鼠坐骨神经 |
| 原代培养方法: | 酶消化法培养 |
| 基础培养基: | DMEM/F12 培养基 |
| 添加材料: | 基础培养基中添加了体积分数为 10% 胎牛血清, 2 mmol/L 福司可林、20 mg/L 牛垂体提取物、青霉素 - 链霉素 |
| 原代培养时间: | 原代细胞培养 1 d 开始换液, 之后 3 d 换液 1 次, 培养 3 d 开始传代 |
| 细胞传代: | 细胞融合至 80% 用 0.25% 胰酶消化传至下 1 代, 按 1 : 2 比例传代, 约 3 d 传 1 代, 共传 3 代 |
| 细胞鉴定: | 采用免疫荧光染色鉴定 |
| 伦理学批准: | 该实验经过空军军医大学动物实验伦理委员会批准 |

1.4.2 类许旺细胞和许旺细胞的鉴定 类许旺细胞经 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 清洗, 用凯基全蛋白提取试剂盒提取蛋

白, BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 确定上样量。根据被检测蛋白分子质量 43-75 kD 确定分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 5%, 电泳后转聚偏二氟乙烯膜 75 min, 5% 牛血清白蛋白室温封闭 2 h, 10 min \times 3 的 TBST 摇床清洗, 加入一抗 p75^{NTR}、actin(1 : 500)4 °C 摇床过夜, 回收一抗, 10 min \times 3 的 TBST 摇床清洗, 室温孵育配制好的二抗山羊抗鼠 (1 : 2 000) 1 h, 回收二抗, 10 min \times 3 的 TBST 摇床清洗, 凝胶成像仪进行显影, 用 Image Lab 4.0 进行灰度分析, 计算 p75^{NTR} 蛋白表达量, 鉴定类许旺细胞。

纯化的原代许旺细胞培养 7 d 进行免疫荧光染色, 用 40 g/L 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS(0.01 mol/L, pH 7.4) 清洗 3 遍, 0.3% TritonX-100 室温破膜 20 min, 3% 牛血清白蛋白室温封闭 1.5 h, 孵育混合一抗 S100 β (1 : 250), p75^{NTR} (1 : 200)4 °C 过夜, 孵育混合二抗 (1 : 400, 山羊抗兔 Alex Fluor 594, 山羊抗鼠 Alex Fluor 488)1 h, PBS(0.01 mol/L, pH 7.4) 清洗 3 遍, DAPI(5 mg/L) 室温孵育 8 min 后封固, 荧光显微镜拍照, 计数 S100 β 和 p75^{NTR} 双阳性细胞数量及 DAPI 阳性细胞数量, 并计算许旺细胞纯度。

1.4.3 细胞外基质的制备 类许旺细胞形成后加入含 50 mg/L 抗坏血酸的诱导培养基 (含 5 μ mol/L 福司可林、10 μ g/L 碱性成纤维细胞生长因子、5 μ g/L 血小板衍生生长因子, 200 μ g/L 重组人神经调节蛋白 β 1、体积分数为 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基) 培养 10-12 d, 待培养板底部出现白色膜状物, 加入含 20 mmol/L NH₄OH、1%Triton X-100 的 PBS 进行脱细胞处理 5-10 min, 得到脱细胞的细胞外基质, 保持湿润, 放于 4 °C 冰箱保存备用。

许旺细胞达 90% 融合后传代, 第 3 代时加入含 50 mg/L 抗坏血酸、体积分数为 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养 10-12 d, 待培养板底部出现白色膜状物, 加入含 20 mmol/L NH₄OH、1%Triton X-100 的 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4) 进行脱细胞处理 5-10 min, 得到脱细胞的细胞外基质^[28], 保持湿润, 放于 4 °C 冰箱保存备用。

1.4.4 细胞外基质对背根神经节的作用 取新生 1 d 的 SD 乳鼠, 雌雄不限, 在显微镜下用显微镊取出位于椎间孔中的背根神经节, 提取的背根神经节用 0.25% 胰酶加 IV 型胶原酶置于 37 °C 孵箱消化 1 h 后终止消化, 然后放入离心机以 1 790 r/min 转速离心 5 min, 弃上清, 再次加入含体积分数为 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基吹打后重复上述操作, 然后加入背根神经节神经元培养基 (含 2% B27、50 μ g/L 神经生长因子、2 mmol/L 谷氨酰胺、青霉素、链霉素的 Neurobasal 培养基) 吹打重悬。该实验分为 3 组: 经左旋多聚赖氨酸包被的对照组, 类许旺细胞外基质包被的诱导组, 许旺细胞外基质包被的许旺组。将制备好的背根神经节神经元细胞悬液接种于预先包被的 24 孔板中, 每孔 1 000 个细胞, 24 h 后观察贴壁情况, 3 d 后进行免疫荧光染色, 40 g/L 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS(0.01 mol/L, pH 7.4) 清洗 3 遍, 0.2% Triton 室温破膜 15 min, 3% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h, 孵

育一抗 β -tubulin-III (1 : 200)、NeuN (1 : 400), 4 °C 冰箱过夜, 孵育二抗 (1 : 400, 山羊抗鼠 Alex Fluor 594, 山羊抗兔 Alex Fluor 488) 1 h, PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 清洗 3 遍, 封固后进行荧光显微镜拍摄, 并测量最长轴突长度。

提取新生 1 d 的 SD 乳鼠, 在显微镜下用显微镊取出位于椎间孔中的背根神经节, 用显微剪剪碎组织约 1 min, 胰酶和 II 型胶原酶消化 5 min, 用显微镊夹取圆润规则的组织块放进预先包被好的 48 孔中, 稍加背根神经节神经元培养基 (含 2% B27、50 μ g/L 神经生长因子、2 mmol/L 谷氨酰胺、青霉素、链霉素的 Neurobasal 培养基) 浸润组织块, 24 h 后再加相同培养液没过组织块, 3 d 后进行 β -tubulin-III (1 : 200) 免疫荧光染色, 仔细观察背根神经节形态以及轴突生长状况, 测定 5 条最长神经轴突长度并且计算均值, 计算组织块的神经轴突总面积 / 组织块面积。

1.4.5 聚 ϵ -己内酯导管制备 配制甲醇、氯仿 (1 : 4) 混合物, 将 30 g 聚 ϵ -己内酯颗粒溶解其中, 制备 30% 的聚 ϵ -己内酯电纺丝溶液。在注射器中填充 10 mL 聚 ϵ -己内酯电纺丝溶液, 设置注射泵的流速为 10 mL/h, 静电纺丝系统设置施加电压为 9.0 kV, 注射器针头与集电器间距为 15 cm, 平行并垂直于针头放置一根不锈钢细棒 (长 10 mm, 直径 1.5 mm) 作为收集器, 保持细棒匀速旋转状态 (1 000 r/min), 制备聚 ϵ -己内酯导管。将第 2 代许旺细胞或诱导的类许旺细胞用胰酶消化后, 离心, 重悬, 接种到 6 孔板中, 每孔 1×10^6 个, 将聚 ϵ -己内酯导管浸入细胞悬液中, 24 h 后加入抗坏血酸 (50 mg/L) 制备细胞外基质复合聚 ϵ -己内酯导管, 第 12 天用含 20 mmol/L NH_4OH , 1% Triton X-100 的 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 脱细胞, 制备成脱细胞外基质复合聚 ϵ -己内酯导管^[25]。

1.4.6 细胞外基质对坐骨神经损伤的修复作用 选取 SD 大鼠 40 只, 腹腔注射 3% 戊巴比妥钠溶液, 麻醉后切开左后肢皮肤, 钝性分离皮下组织, 暴露左侧坐骨神经, 用眼科剪取出一段后留下 5 mm 的神经缺损, 制成大鼠坐骨神经缺损模型。将制备好的模型大鼠随机分为 4 组: 对照组应用只填充生理盐水的聚 ϵ -己内酯导管桥接; 自体神经组将剪下的 5 mm 神经翻转后, 用 10-0 尼龙缝合线缝合神经外膜; 许旺组应用许旺细胞外基质复合聚 ϵ -己内酯导管桥接; 诱导组应用类许旺细胞外基质复合聚 ϵ -己内酯导管桥接。饲养 4 周后取坐骨神经组织进行免疫荧光检测以及取腓肠肌进行 Masson 染色。

1.4.7 免疫荧光法观察大鼠坐骨神经轴突的生长情况 取左侧坐骨神经用石蜡包埋后行纵向切成厚度为 15 μ m 组织切片。组织切片在抗原修复后, PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 清洗 3 次, 每次 5 min, 室温下在含有 0.3% Triton X-100 和 3% 牛血清白蛋白的封闭溶液中孵育 60 min, 在湿盒中滴加鼠抗 NF160 单克隆抗体 (1 : 200) 4 °C 孵育过夜, PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 将切片清洗 3 次, 每次 5 min, 滴加山羊抗鼠二抗 (1 : 400, Alex Fluor 488) 室温孵育 1 h, PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 清洗 3 次, 每次 5 min, 封固后通过共聚焦显微镜观察。

1.4.8 苏木精-伊红染色观察大鼠腓肠肌生长情况 取术侧和健侧腓肠肌, 称质量, 计算各组大鼠术侧 / 健侧肌肉质量的比值, 即为腓肠肌湿质量比值。将左侧腓肠肌用石蜡包埋后横向切成 10 μ m 组织切片, 然后进行 Masson 染色, 每组在显微镜下随机取 6 个视野, 用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析肌纤维横断面积。

1.5 主要观察指标 ①许旺细胞的鉴定结果与纯度, 类许旺细胞的鉴定结果; ②背根神经节神经元最长轴突长度; ③背根神经节组织块的神经轴突总面积 / 组织块面积及 5 根最长轴突平均长度; ④聚 ϵ -己内酯材料上细胞生长情况及细胞外基质覆盖情况; ⑤各组大鼠坐骨神经缺损区轴突再生情况; ⑥各组大鼠坐骨神经损伤后腓肠肌的生长恢复情况。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 和 SPSS 22.0 进行统计学分析。所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 t 检验和单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验动物模型选用 SD 大鼠 40 只, 分为 4 组, 每组 10 只。所有大鼠均存活, 可进入后续的实验分析。

2.2 类许旺细胞和许旺细胞的鉴定结果 骨髓间充质干细胞诱导分化为类许旺细胞后进行 p75^{NTR} 蛋白检测, 见图 1。与骨髓间充质干细胞比较, 类许旺细胞 p75^{NTR} 明显表达 (2.587 \pm 0.370 vs. 1 \pm 0, $P < 0.05$), 骨髓间充质干细胞诱导成类许旺细胞后表达许旺细胞标志性蛋白, 可进行下一步实验。许旺细胞经纯化培养后进行 p75^{NTR} 和 S100 β 双标免疫荧光染色及 DAPI 染色, 见图 2。S100 β 和 p75^{NTR} 双染阳性的细胞鉴定为许旺细胞, 实验中许旺细胞的纯度为 (95.2 \pm 4.63)%。

2.3 类许旺细胞外基质和许旺细胞外基质促进背根神经节神经元及背根神经节组织块神经轴突的生长 与对照组 (126.30 \pm 16.25) μ m 比较, 诱导组 [(239.60 \pm 13.36) μ m, $P < 0.01$] 和许旺组 [(336.50 \pm 6.08) μ m, $P < 0.001$] 背根神经节神经元最长轴突长度显著增加, 但是诱导组的背根神经节神经元生长效果不如许旺组 ($P < 0.01$), 见图 3。同时, 与对照组 (2.493 \pm 0.246) 比较, 许旺组 (4.160 \pm 0.117, $P < 0.01$) 和诱导组 (3.750 \pm 0.164, $P < 0.05$) 神经轴突总面积 / 组织块面积显著增加, 许旺组组织块神经轴突总面积 / 组织块面积大于诱导组, 但差异无显著性意义。许旺组 [(2 732.0 \pm 217.1) μ m, $P < 0.01$] 和诱导组 [(2 438.0 \pm 277.5) μ m, $P < 0.01$] 5 根最长轴突长度均值大于对照组 (1 017.0 \pm 16.4) μ m, 许旺组 5 根最长轴突长度均值大于诱导组, 但差异无显著性意义, 见图 4。以上数据表明, 在体外条件下, 类许旺细胞外基质和许旺细胞外基质均能够促进轴突生长, 且促进程度相似。

2.4 聚 ϵ -己内酯材料支持细胞生长及细胞外基质覆盖 聚 ϵ -己内酯材料纺丝纤维致密缠绕, 细胞在聚 ϵ -己内酯表面生长增殖, 细胞外基质覆盖整个聚 ϵ -己内酯表面, 见图 5。扫描电镜图像可见聚 ϵ -己内酯材料能够为细胞提供黏附增殖

的位点,在抗坏血酸的作用下细胞能够形成大量细胞外基质覆盖聚 ϵ -己内酯表面。上述结果表明单纯聚 ϵ -己内酯及复合细胞外基质的聚 ϵ -己内酯具有良好的生物相容性。

2.5 类许旺细胞外基质和许旺细胞外基质促进大鼠坐骨神经的再生修复 自体神经组再生的神经纤维连贯并且排列有序;诱导组和许旺组神经再生情况明显优于对照组,且再生神经纤维也贯通缺损区域,与自体神经组相类似,诱导组促神经再生作用与许旺组相似,见图 6。自体神经组肌肉湿质量比 $[0.710 \pm 0.038]$ 和平均肌纤维面积百分比 $[(92.33 \pm 1.76)\%]$ 均大于对照组 $[0.286 \pm 0.040, P < 0.01; (49.00 \pm 1.73)\%, P < 0.001]$;许旺组 $[0.623 \pm 0.023, P < 0.01; (76.33 \pm 3.84)\%, P < 0.01]$ 和诱导组 $[0.560 \pm 0.035, P < 0.01; (71.33 \pm 3.48)\%, P < 0.01]$ 也高于对照组,诱导组促恢复效果低于许旺组。以上结果表明,在体内条件下类许旺细胞外基质和许旺细胞外基质都能够促进坐骨神经的再生和腓肠肌的恢复,但是类许旺细胞外基质促腓肠肌功能恢复在一定程度上弱于许旺细胞外基质。

3 讨论 Discussion

外周神经损伤通常会导致损伤部位远端的神经纤维与神经轴突离断,随后远端神经发生退行性变,使周围的靶器官发生去神经,进而丧失功能^[29]。与中枢神经相比,外周神经具有较好的再生能力^[30]。这种差异的部分原因不仅是由于瓦勒氏变性过程中在远端残端发生的细胞和分子变化,也是由于切除轴突的外周神经元具有转换到再生状态的内在能力^[31]。然而这种再生能力有限,仍然需要尽快建立神经连接通道,否则可能导致肢体功能丧失。在长节段缺损发生时,需要将神经移植或神经导管植入间隙区域,以帮助建立再生通道^[8-9]。虽然自体神经移植是目前公认的金标准技术^[10-13],但术后去神经区的功能会减退,因此探索生物方法来增强神经再生和改善损伤后的功能以及再生修复机制仍是目前研究的重点。许旺细胞沿轴突排列形成 Büngner 带,如果再生的轴突在较短的时间内到达远端残端,神经功能就有可能恢复^[32]。否则,严重慢性许旺细胞变性可能会发生在远端残端,并阻碍再生^[33]。许旺细胞移植疗法已被证明有效,但是由于体外培养许旺细胞再移植较困难^[18],目前的研究也在积极寻求可替代的方案。

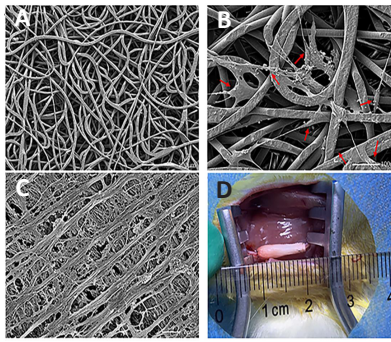
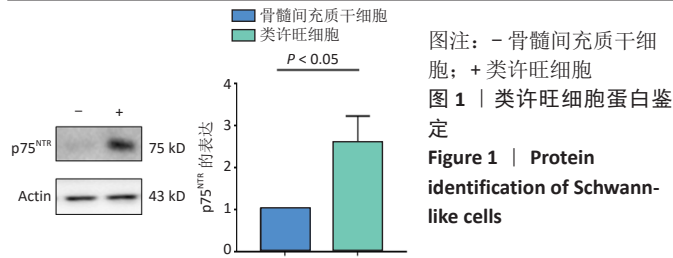
骨髓间充质干细胞来源广泛^[19],在适当条件下可分化为许旺细胞。目前已有文献报道了类许旺细胞、许旺细胞分别联合支架修复大鼠坐骨神经缺损,发现均有很好的治疗效果^[20-23]。细胞进入体内后的重要作用就是分泌细胞因子以及细胞外基质,进而促进患区组织增殖修复。细胞外基质是细胞分泌的蛋白、多糖等大分子组成的复杂网格状结构,包含层粘连蛋白、纤连蛋白、胶原蛋白等,能够促进细胞增殖、分化,支持细胞重要信号在周围神经系统中的传递^[34]。在外周神经系统中,许旺细胞分泌细胞外基质并形成基底膜包裹在轴突周围,能抵抗分解并引导生长锥向远端延伸^[35-36]。有文献报道许旺细胞的细胞外基质可调节神经轴突生长^[37]。因

此,作者大胆猜测类许旺细胞外基质对于神经损伤修复也具有重要的作用。目前对于类许旺细胞外基质的研究尚未见报道,因此课题组尝试制备了类许旺细胞和许旺细胞外基质并通过体外接种神经元和组织块的方法观察和比较两者的促神经生长作用,在体内则通过检测坐骨神经修复程度和腓肠肌恢复程度判断两种细胞外基质的作用。

该研究中细胞外基质的制备源于细胞膜片的制作,细胞通过物理手段刺激增殖和细胞外基质的分泌形成致密膜片结构,这种膜片由于组分与组织结构相似,形态也不受支架的限制,因此成为很好的组织工程材料,应用于包括骨、软骨、牙周韧带、视神经等在内的多个再生领域,以修复各种受损组织^[38],但是在修复过程中不可避免地应用大量细胞膜片,细胞的堆叠可导致细胞代谢废物排出困难以及营养物质供应的问题^[39]。膜片脱细胞后则可以只剩细胞外基质,避免了这些问题,同时保留了重要的蛋白,且由于没有细胞结构,所以又常表现为免疫耐受,一定厚度又赋予了它相应的弹性和较好的机械强度,同时能激活细胞内信号通路,因此脱细胞外基质成为了一种前景广阔的疗法^[40]。聚 ϵ -己内酯在内等一系列神经支架材料的出现为神经损伤修复提供了宽广的思路和应用前景,复合了细胞外基质或营养因子的支架材料更是展现了极佳的应用前景,有望替代自体神经移植^[41-42]。

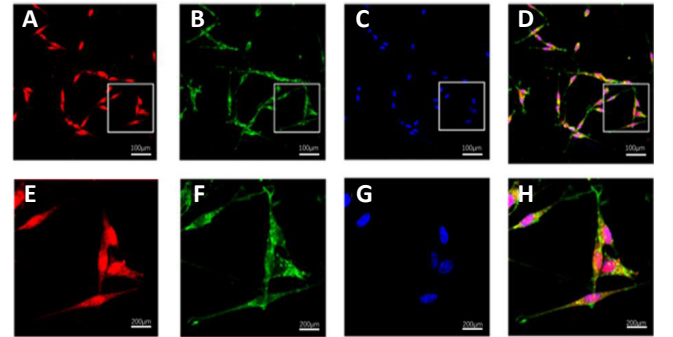
许旺细胞来源于轴突的髓鞘,功能强大但来源有限且增殖缓慢;类许旺细胞可来自于骨髓间充质干细胞,干细胞增殖迅速,来源广泛,易于培养,适合体外大规模扩增诱导,类许旺细胞又具有与许旺细胞相似的形态和功能,利用抗坏血酸制备细胞外基质后,比较了二者促神经再生的能力,与对照组相比,两种细胞外基质上背根神经节神经元的轴突长度明显增加,组织块轴突长度或轴突面积百分比都明显增大,诱导组在数值上低于许旺组,这表明诱导组也具有很好的促进背根神经节神经元生长的作用,尽管效果与许旺组有一定差距。另外,自体神经组再生神经纤维连贯且排列有序;诱导组和许旺组神经再生情况明显优于对照组,再生神经纤维贯通缺损区域,与自体神经组类似,这表明在体内条件下类许旺细胞外基质和许旺细胞外基质同样能够促进坐骨神经再生,且两者分别复合聚 ϵ -己内酯材料具有相近的术后恢复效果,这为解决许旺细胞来源或自体神经移植带来的问题提供了一种替代的解决方案。值得注意的是,两种细胞外基质功能相近,表明两种细胞外基质中具有蛋白水平上的共性,诱导组与许旺组的差异揭示了其在蛋白水平上的差异,这也为其他探讨分子机制的研究打下基础。

骨髓间充质干细胞诱导分化来的类许旺细胞外基质体外具有很好的促进神经元生长的效果,且可以在体外大量扩增培养,这是许旺细胞无法比拟的巨大优势,两者对体内神经修复效果相似,可媲美自体神经修复效果,显示了类许旺细胞外基质在组织工程领域应用的潜力,为寻找具有许旺细胞功能且来源方便的新材料提供理论依据,也为未来组织工程学提供新的思路。



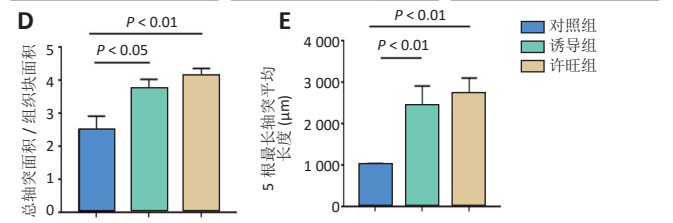
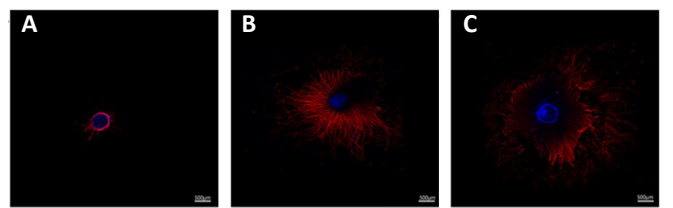
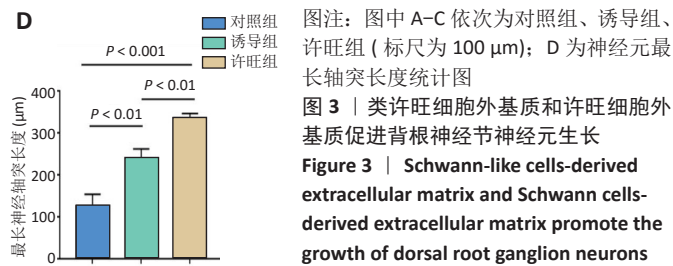
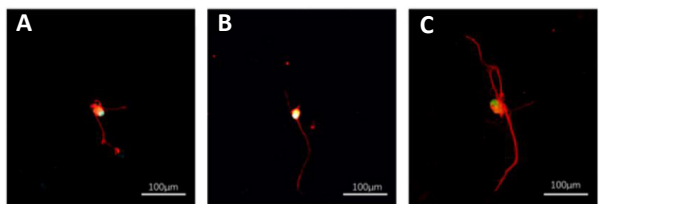
图注：图中A为聚ε-己内酯材料表面扫描电镜图(×200)；B为细胞初始接种在聚ε-己内酯材料上的生长情况，箭头所示为细胞结构(×500)；C为细胞在聚ε-己内酯材料上形成细胞外基质(×5 000)；D为手术植入聚ε-己内酯导管图

图5 | Poly(ε-caprolactone) materials support cell growth, extracellular matrix formation and coverage
Figure 5 | Poly(ε-caprolactone) materials support cell growth, extracellular matrix formation and coverage

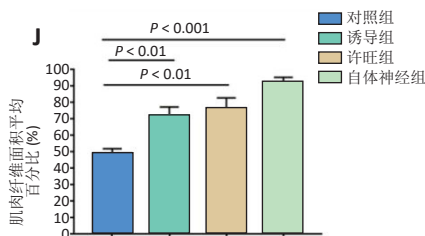
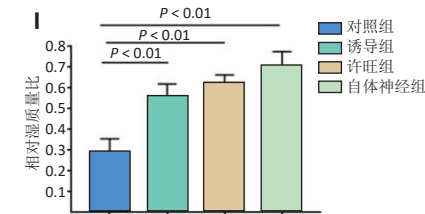
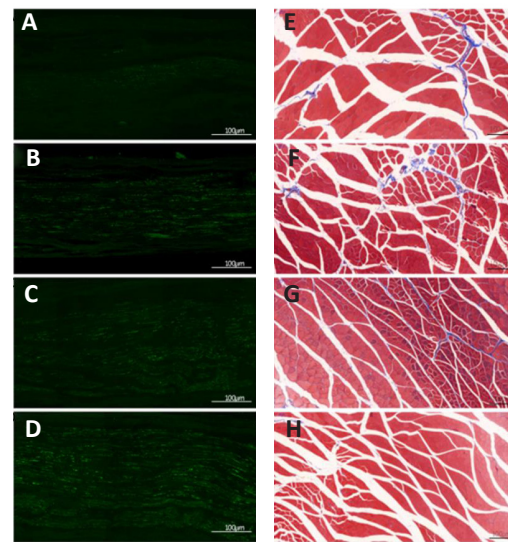


图注：图中A-C为S100β染色(红)、p75^{NTR}染色(绿)、DAPI染色(蓝)(标尺为100 μm)；D为3种染色重叠图(标尺为100 μm)；E-H分别为A-D图方框区域的放大图(标尺为200 μm)

图2 | 许旺细胞免疫荧光染色鉴定
Figure 2 | Immunofluorescence identification of Schwann cells



图注：图中A-D为大鼠坐骨神经损伤4周后神经组织NF160特异性免疫荧光染色(标尺为100 μm)，依次为对照组、诱导组、许旺组、自体神经组；E-H为大鼠坐骨神经损伤4周后腓肠肌Masson染色(标尺为100 μm)，依次为对照组、诱导组、许旺组、自体神经组；I-J为肌肉湿质量比和平均肌纤维面积百分比
图6 | 类许旺细胞外基质和许旺细胞外基质促进坐骨神经和腓肠肌的恢复
Figure 6 | Schwann-like cells-derived extracellular matrix and Schwann cells-derived extracellular matrix promote the recovery of sciatic nerve and gastrocnemius muscle



图注：图中A-D为大鼠坐骨神经损伤4周后神经组织NF160特异性免疫荧光染色(标尺为100 μm)，依次为对照组、诱导组、许旺组、自体神经组；E-H为大鼠坐骨神经损伤4周后腓肠肌Masson染色(标尺为100 μm)，依次为对照组、诱导组、许旺组、自体神经组；I-J为肌肉湿质量比和平均肌纤维面积百分比

图6 | 类许旺细胞外基质和许旺细胞外基质促进坐骨神经和腓肠肌的恢复
Figure 6 | Schwann-like cells-derived extracellular matrix and Schwann cells-derived extracellular matrix promote the recovery of sciatic nerve and gastrocnemius muscle

作者贡献: 实验设计为罗卓荆、黄景辉、赵来赫; 实验实施为赵来赫、夏冰、马腾; 实验评估为高捷勃、李胜友、高雪; 资料收集为郑毅、胡广文。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(81730065, 81672148, 81802143)”的资助。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。

机构伦理问题: 实验方案经空军军医大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 KY20172005-1。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。

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: 文章统计学方法已经通过空军军医大学第一附属医院生物统计学专家审核。

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 4.0”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

- FEINBERG JH, NADLER SF, KRIVICKAS LS. Peripheral nerve injuries in the athlete. *Sports Med.* 1997;24(6):385-408.
- GU X, DING F, YANG Y, et al. Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. *Prog Neurobiol.* 2011;93(2):204-230.
- NOBLE J, MUNRO CA, PRASAD VS, et al. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma.* 1998;45(1):116-122.
- GUTTMANN E, GUTTMANN L, MEDAWAR PB, et al. The rate of regeneration of nerve. *Exp Biol.* 1942;19:14-44.
- LEE SK, WOLFE SW. Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg.* 2000;8(4):243-252.
- LI R, LIU Z, PAN Y, et al. Peripheral nerve injuries treatment: a systematic review. *Cell Biochem Biophys.* 2014;68(3):449-454.
- MATSUYAMA T, MACKAY M, MIDHA R. Peripheral nerve repair and grafting techniques: a review. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2000;40(4):187-199.
- FLORES AJ, LAVERNIA CJ, OWENS PW. Anatomy and physiology of peripheral nerve injury and repair. *Am J Orthop (Belle Mead NJ).* 2000; 29(3):167-173.
- SIEMIONOW M, BRZEZICKI G. Chapter 8: Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol.* 2009;87: 141-172.
- JIANG X, LIM SH, MAO HQ, et al. Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits. *Exp Neurol.* 2010;223(1): 86-101.
- MILLES H. Techniques for nerve grafting. *Hand Clin.* 2000;16(1):73-91.
- MILLES H, MEISL G, BERGER A. The interfascicular nerve-grafting of the median and ulnar nerves. *J Bone Joint Surg Am.* 1972;54(4): 727-750.
- MILLES H, MEISL G, BERGER A. Further experience with interfascicular grafting of the median, ulnar, and radial nerves. *J Bone Joint Surg Am.* 1976;58(2):209-218.
- MOZAFARI R, KYRYLENKO S, CASTRO MV, et al. Combination of heterologous fibrin sealant and bioengineered human embryonic stem cells to improve regeneration following autogenous sciatic nerve grafting repair. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2018;24:11.
- 高红伟, 安荣泽, 王兆杰. 周围神经损伤修复功能评价方法的研究进展 [J]. *中国医学创新*, 2014,11(6):146-148.

- 郭英, 范艳茹, 周慧芳, 等. 雪旺细胞对周围神经损伤修复的研究进展 [J]. *继续医学教育*, 2019,33(1):113-115.
- JESSEN KR, MIRSKY R, LLOYD AC. Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(7):a020487.
- 曲巍, 蒋华军, 李登军, 等. 成年鼠坐骨神经雪旺细胞体外培养的实验研究 [J]. *实用手外科杂志*, 2008,22(1):30-32.
- CHEN CJ, OU YC, LIAO SL, et al. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Exp Neurol.* 2007;204(1):443-453.
- MAHAY D, TERENGI G, SHAWCROSS SG. Growth factors in mesenchymal stem cells following glial-cell differentiation. *Biotechnol Appl Biochem.* 2008;51(Pt 4):167-176.
- KEILHOFF G, GOIHL A, STANG F, et al. Peripheral nerve tissue engineering: autologous Schwann cells vs. transdifferentiated mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 2006;12(6):1451-1465.
- SHIMIZU S, KITADA M, ISHIKAWA H, et al. Peripheral nerve regeneration by the in vitro differentiated-human bone marrow stromal cells with Schwann cell property. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;359(4): 915-920.
- HOU SY, ZHANG HY, QUAN DP, et al. Tissue-engineered peripheral nerve grafting by differentiated bone marrow stromal cells. *Neuroscience.* 2006;140(1):101-110.
- GU Y, ZHU J, XUE C, et al. Chitosan/silk fibroin-based, Schwann cell-derived extracellular matrix-modified scaffolds for bridging rat sciatic nerve gaps. *Biomaterials.* 2014;35(7):2253-2263.
- 邹多宏, 刘衍钊, 邓立方. 局部微环境、干细胞及生物支架材料之间相互影响在再生医学中的作用 [J]. *中华生物医学工程杂志*, 2015, 21(5):387-393.
- KWOK JC, DICK G, WANG D, et al. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol.* 2011;71(11):1073-1089.
- 宗海斌, 李爱国, 董玉珍. 骨髓间充质干细胞分化的类施万细胞对大鼠脊髓损伤的作用 [J]. *广东医学*, 2012,33(22):3384-3386.
- 赵宝辉. Triton X-100 制备去细胞神经移植体的实验研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2005.
- 姜南, 张志雄, 李俊莹, 等. 大鼠坐骨神经离断后细胞增殖、迁移与凋亡在近远端神经片段的表达研究 [J]. *中国实验诊断学*, 2019, 23(8):1430-1433.
- 何新泽, 王维, 呼铁民, 等. 周围神经损伤的修复: 理论研究与技术应用 [J]. *中国组织工程研究*, 2016,20(7):1044-1050.
- 蒋沛然, 王志萍. 模式生物神经轴突再生的研究进展 [J]. *浙江大学学报 (医学版)*, 2020,49(4):500-507.
- DAS KK, SRIVASTAVA AK. Nerve conduits as replacements of autografts in peripheral nerve surgery: Still a work in progress. *Neurol India.* 2019; 67(Supplement):S115-S117.
- FANG X, ZHANG C, ZHANG C, et al. Reactivation of Denervated Schwann Cells by Embryonic Spinal Cord Neurons to Promote Axon Regeneration and Remyelination. *Stem Cells Int.* 2019;2019:7378594.
- XING H, LEE H, LUO L, et al. Extracellular matrix-derived biomaterials in engineering cell function. *Biotechnol Adv.* 2020;42:107421.
- YU WM, YU H, CHEN ZL. Laminins in peripheral nerve development and muscular dystrophy. *Mol Neurobiol.* 2007;35(3):288-297.
- CHEN TJ, KUKLEY M. Glutamate receptors and glutamatergic signalling in the peripheral nerves. *Neural Regen Res.* 2020;15(3):438-447.
- CHEN ZL, STRICKLAND S. Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J Cell Biol.* 2003;163(4):889-899.
- ZURINA IM, PRESNIAKOVA VS, BUTNARU DV, et al. Tissue engineering using a combined cell sheet technology and scaffolding approach. *Acta Biomater.* 2020;113:63-83.
- 余一凡, 王婷, 金石峰, 等. 细胞膜片技术在组织修复中的研究进展 [J]. *中国美容整形外科杂志*, 2020,31(5):318-321.
- KHALILI M, ASADI M, KAHROBA H, et al. Corneal endothelium tissue engineering: An evolution of signaling molecules, cells, and scaffolds toward 3D bioprinting and cell sheets. *J Cell Physiol.* 2021;236(5): 3275-3303.
- YI S, XU L, GU X. Scaffolds for peripheral nerve repair and reconstruction. *Exp Neurol.* 2019;319:112761.
- CARVALHO MS, SILVA JC, UDANGAWA RN, et al. Co-culture cell-derived extracellular matrix loaded electrospun microfibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;99:479-490.

(责任编辑: MZH, ZN, JY)