

## 梯度沉积内皮细胞衍生物纳米纤维调控施万细胞行为

姚丽婕<sup>1,2</sup>, 阎玉莹<sup>1,2</sup>, 陈思宇<sup>1,2</sup>, 王元非<sup>2</sup>, 吴桐<sup>2</sup><https://doi.org/10.12307/2026.302>

投稿日期: 2025-01-26

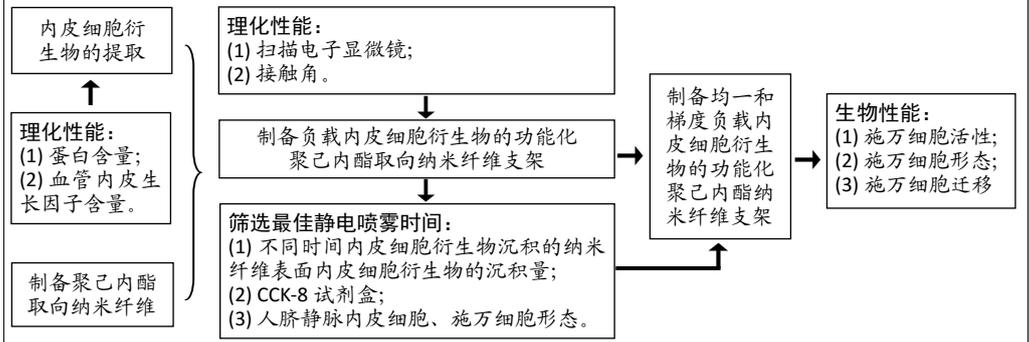
采用日期: 2025-04-08

中图分类号:

R459.9; R318.08; R654.3

文献标识码: A

文章快速阅读: 梯度沉积内皮细胞衍生物纳米纤维对施万细胞行为的影响



## 文题释义:

**施万细胞:** 周围神经再生过程中最重要的功能细胞, 能够支持受损神经元的存活、促进轴突再生和髓鞘重建、提供多种神经营养因子、减轻炎症反应。

**内皮细胞衍生物:** 从人脐静脉内皮细胞中提取, 以微粒形式存在, 含有血管内皮生长因子和生物活性蛋白质, 能够为细胞提供营养物质、黏附位点和方向指引。

## 摘要

**背景:** 在周围神经修复过程中施万细胞发挥着关键作用, 施万细胞分泌的神经营养因子和迁移形成的细胞桥能够为神经轴突延伸提供必要的营养物质和地形线索。纳米纤维的高比表面积有利于药物和生物活性物质的释放, 同时为细胞黏附、铺展及增殖提供足够的空间, 这对于神经组织的快速修复具有重要意义。

**目的:** 探索具有拓扑结构的沉积有内皮细胞衍生物微粒的聚己内酯取向纳米纤维对施万细胞行为的调控。

**方法:** 采用低温冻干技术将人脐静脉内皮细胞条件培养基制备成功能化内皮细胞衍生物, 检测其血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)和蛋白含量。通过静电纺丝和静电喷雾技术制备沉积和未沉积ECd微粒的PCL取向纳米纤维。通过扫描电子显微镜和水接触角测量表征纳米纤维的形貌和亲水性。通过人脐静脉内皮细胞和施万细胞的增殖和生长情况确定ECd的最佳沉积时间, 最终构建均一和单向线性梯度沉积内皮细胞衍生物微粒的PCL取向纳米纤维。

**结果与结论:** ①通过冷冻干燥技术成功制备了内皮细胞衍生物, 其含有丰富的血管内皮生长因子和蛋白; ②PCL纳米纤维具有良好的取向结构, 纤维直径为700±150 nm, 等离子体处理后的PCL纳米纤维具有超亲水性; ③ECd微粒均匀沉积于纤维表面, 不仅未影响PCL纳米纤维的取向结构, 同时能够以凸起方式为细胞提供接触诱导; ④CCK-8检测结果显示, ECd微粒的最佳沉积时间为10 min, 能够显著促进人脐静脉内皮细胞和施万细胞在PCL纳米纤维上的增殖; ⑤免疫荧光染色结果表明, 人脐静脉内皮细胞和施万细胞能够沿纤维的取向结构生长; ⑥单向线性梯度沉积ECd微粒的PCL取向纳米纤维能够有效促进施万细胞的定向迁移。

**关键词:** 静电纺丝; 静电喷雾; 内皮细胞衍生物; 施万细胞; 细胞迁移; 周围神经组织

## Nanofibers with gradient deposition of endothelial cell derived matrix particles modulate the behavior of Schwann cells

Yao Lijie<sup>1,2</sup>, Yan Yuying<sup>1,2</sup>, Chen Siyu<sup>1,2</sup>, Wang Yuanfei<sup>2</sup>, Wu Tong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong Province, China; <sup>2</sup>Medical Research Center, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China

Yao Lijie, Master, School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong Province, China

**Corresponding author:** Wu Tong, PhD, Professor, Doctoral/Master Supervisor, Medical Research Center, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Tissue repair is a multifaceted process involving several components, including cell proliferation, cell migration, and angiogenesis. In the process of peripheral nerve repair, the migration of SCs play a pivotal role. By migrating to form cell bridges and secreting neurotrophic factors, SCs provide essential nutrients and topographical cues for axon extension. As axons continue to extend and form myelin sheaths under the guidance of SCs, the recovery of peripheral nerve function is promoted.

<sup>1</sup> 青岛大学基础医学院, 山东省青岛市 266071; <sup>2</sup> 青岛大学附属医院医学研究中心, 山东省青岛市 266000

第一作者: 姚丽婕, 女, 2000年生, 山西省临汾市人, 汉族, 硕士, 主要从事生物医用材料方面的研究。

通讯作者: 吴桐, 博士, 教授, 博士/硕士生导师, 青岛大学附属医院医学研究中心, 山东省青岛市 266000

<https://orcid.org/0009-0004-8341-8003> (姚丽婕)

基金资助: 山东省自然科学基金项目(ZR2021YQ17), 项目负责人: 吴桐

引用本文: 姚丽婕, 阎玉莹, 陈思宇, 王元非, 吴桐. 梯度沉积内皮细胞衍生物纳米纤维调控施万细胞行为[J]. 中国组织工程研究, 2026, 30(00):000-000.



**OBJECTIVE:** To explore the effect of poly(caprolactone) (PCL) aligned nanofibers with topologically deposited ECd particles on the behavior of SCs.

**METHODS:** The collected HUVECs conditioned medium was subjected to freeze-drying using low temperature lyophilization to obtain functionalized ECd, which was then assayed for VEGF and protein content. PCL aligned nanofibers undeposited and deposited with ECd particles were prepared using electrospinning and electrospay techniques. The morphology and hydrophilicity of the nanofibers were characterized using scanning electron microscopy and water contact angle measurement. The optimal deposition time of ECd was determined by evaluating the proliferation and morphology of HUVECs and SCs. Based on these findings, PCL aligned nanofibers with uniform and unidirectional linear gradient deposition of ECd particles were constructed and inoculated with SCs. SCs activity was detected by CCK-8 kit, and fluorescence staining was used to observe SCs morphology and directional migration.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Following the culturing of HUVECs at a specified density, the cell culture medium was subjected to centrifugation, resulting in the isolation of ECd through freeze-drying. The analysis of the kit revealed the presence of VEGF and protein in ECd; (2) Characterization experiments showed that the PCL fibers had a well aligned structure, and the fiber diameter was  $700\pm 150$  nm. After plasma treatment, the PCL aligned nanofibers were superhydrophilic; (3) ECd was uniformly deposited on the surface of the fibers in the form of particles, which not only did not affect the oriented structure of PCL nanofibers, but at the same time could provide contact induction for cells in a raised manner; (4) CCK-8 assay showed that PCL aligned nanofibers deposited with ECd particles for 10 min significantly promoted the proliferation of HUVECs and SCs; (5) Immunofluorescence staining showed that HUVECs, SCs grew along the oriented structure of the fibers compared to controls; (6) The results showed that PCL aligned nanofibers with unidirectional linear gradient deposition of ECd particles did not reduce the activity of SCs and were able to promote the directional migration of SCs compared to the other groups.

**Key words:** Electrospinning; Electrospay; Endothelial cell derived matrix; SCs; Cell migration

**How to cite this article:** YAO LJ, YAN YY, CHEN SY, WANG YF, WU T. Nanofibers with gradient deposition of endothelial cell derived matrix particles modulate the behavior of Schwann cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2026;30(00):0000-0000.

## 0 引言 Introduction

细胞具有对外界各种物理或化学线索做出反应的能力, 这些线索包括可扩散生物分子的梯度, 生物蛋白和细胞外基质的刚度<sup>[1]</sup>。地形线索是外界环境所提供的最为关键的物理信号之一, 细胞在与外界环境接触时, 能够感知到地形的物理特性, 并将这些信号转化为细胞内的生化反应<sup>[2]</sup>。通过这些反应, 细胞调整自身行为, 如改变迁移方向、速度或方式。此外, 地形线索还可以与生化线索相结合, 共同调控细胞的行为<sup>[3, 4]</sup>。例如沉积密度梯度重组人酸性成纤维细胞生长因子的取向 PCL 纳米纤维能够促进轴突生长和髓鞘化<sup>[5]</sup>。

在周围神经损伤后, 施万细胞的定向迁移在神经修复过程中发挥着至关重要的作用<sup>[6]</sup>。神经损伤后, 施万细胞会通过分裂和增殖, 形成“Büngner”带。这种带状结构能够引导轴突沿着特定方向生长, 确保再生轴突能够正确地连接到目标组织<sup>[7, 8]</sup>。此外, 施万细胞能够分泌多种神经营养因子, 促进受损神经元的修复和再生<sup>[9]</sup>。在神经组织工程中, 如何通过地形线索和生化信号高效地指导施万细胞的行为值得关注。

周围神经修复过程还伴随着血管生成、髓鞘形成和轴突再生<sup>[7]</sup>。其中, 血管生成尤为重要, 它能够为神经再生提供必要的初始微环境支持, 而血管内皮生长因子作为血管生成过程中的关键因子, 诱导新生血管形成, 为神经修复提供生化信号<sup>[10]</sup>。血管小生境不仅为损伤部位提供持续的氧气和营养供应, 而且支持施万细胞的存活、增殖和功能发挥<sup>[9]</sup>。静电纺纳米纤维能够模拟天然细胞外基质, 为细胞提供地形线索从而引导细胞的定向迁移和轴突的定

向延伸<sup>[11-12]</sup>。纳米纤维的高比表面积有利于药物和生物活性物质的释放, 同时为细胞的黏附、铺展及增殖提供足够的空间, 这对于神经组织的快速修复具有重要意义<sup>[13-15]</sup>。通过调整静电纺丝的参数、溶液浓度等可以精确控制纤维的拓扑结构。其中, 取向纳米纤维提供的地形线索能够引导细胞沿着纤维的方向快速迁移和生长<sup>[16]</sup>。此外, 静电喷雾技术能够将含有药物或生物活性物质的溶液转化为微粒, 在空间上形成浓度梯度, 为药物递送、细胞培养和组织工程等领域提供有力支持<sup>[17-19]</sup>。综上, 微粒与纳米纤维结合构筑的三维结构能够为神经组织的再生和修复提供良好的微环境, 为神经细胞行为调控和干细胞分化提供物理、化学和生物等多重诱导信号。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 单组之间的差异比较选择 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。

**1.2 时间及地点** 实验于 2023 年 11 月至 2024 年 12 月在青岛大学松山校区及青岛大学附属医院西海岸院区医学研究中心完成。

### 1.3 材料

**1.3.1 细胞** 人脐静脉内皮细胞、大鼠施万细胞由青岛大学先进生物材料与再生医学课题组细胞冻存库提供。

**1.3.2 主要试剂和仪器** 六氟异丙醇、罗丹明 B、二氯甲烷 (上海麦克林生化科技股份有限公司); 聚己内酯、猪皮 I 型明胶和多聚赖氨酸溶液 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 静电纺丝机 (中国永康乐业); 真空等离子设备 (北京欧倍尔科学仪器有限公司);

胎牛血清 (德国 PAN 公司); 高糖 DMEM 培养基、青霉素 - 链霉素溶液 (武汉普诺赛生命科技有限公司); 0.25% 胰酶消化液 (北京兰杰柯科技有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒、DAPI 溶液 (北京索莱宝科技有限公司); 细胞计数试剂盒 -8(CCK-8)(美国 GlpBio 公司); Phalloidin-iFluor 488 试剂 (英国 Abcam 公司); 人血管内皮生长因子酶联免疫吸附测定试剂盒 (中国江莱生物科技有限公司); 冷冻干燥机 (宁波新芝冻干设备有限公司); 水接触角测量仪 (德国 TanteC 公司); 扫描电镜 (日本 Regulus8100 公司); 二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司); 酶标仪 (美国 Thermo 公司); 荧光显微镜 (美国 Echo 公司)。

#### 1.4 实验方法

**1.4.1 细胞培养** 采用含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的高糖 DMEM 培养基培养人脐静脉内皮细胞和施万细胞, 每天进行换液, 每 2 天传代一次。两种细胞均选择冻存后第 2 代用于后续实验。

#### 1.4.2 ECd 的制备及成分测定

**ECd 的制备:** 从人脐静脉内皮细胞中提取 ECd。具体来说, 将生长状态良好的人脐静脉内皮细胞以  $5 \times 10^5$  个 / 瓶的密度接种于 30 mL 高糖 DMEM 培养基中。培养 3 天后, 收集人脐静脉内皮细胞条件培养基, 以 1 000 rpm 速度离心处理 5 min 后获得上清液。将上清液置于  $-80^\circ\text{C}$  保存 24 h 后进行冷冻 ( $-55^\circ\text{C}$ ) 干燥 1 天。处理得到 ECd, 将 ECd 置于  $-80^\circ\text{C}$  超低温冰箱保存备用。

**血管内皮生长因子含量的测定:** 根据购买的人血管内皮生长因子的酶联免疫吸附测定试剂盒说明书进行血管内皮生长因子的测定。首先, 使用试剂盒中通用稀释液对标准品进行倍比稀释, 即浓度分别为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.12 和 0 pg/mL。样品为含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基、人脐静脉内皮细胞条件培养基、ECd 水溶液 (5 mg/mL)。将样品或不同浓度标准品加入酶标板内, 每孔 100  $\mu\text{L}$ 。盖上封板膜后于  $37^\circ\text{C}$  孵育 60 min 后, 弃去酶标板内液体, 直接加入生物素化抗体工作液 100  $\mu\text{L}$  于在  $37^\circ\text{C}$  中进行孵育。温育 60 min 后, 移除酶标板内液体并进行 3 次洗涤, 每孔加入 300  $\mu\text{L}$  洗涤液。之后每孔加入 100  $\mu\text{L}$  酶结合物工作液, 并温育 30 min。温育后吸走酶标板内液体, 每孔加入 300  $\mu\text{L}$  洗涤液重复洗涤 3 次, 加入底物, 每孔

90  $\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  下避光孵育 15 min。15 min 后每孔加入 50  $\mu\text{L}$  终止液, 使用酶标仪立即检测在 450 nm 处的吸光度值, 根据标准曲线计算出 ECd 中血管内皮生长因子的含量。

**蛋白含量的测定:** 使用购买的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白含量的测定。首先, 以试剂盒中 BSA 蛋白作为标准品, 使用 PBS 对标准品进行稀释, 即浓度分别为 5、4、2、1、0.5、0 mg/mL。样品分别为含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基、人脐静脉内皮细胞条件培养基。BCA 试剂与  $\text{Cu}^{2+}$  试剂按体积比 50 : 1 配制成工作液, 充分混匀。将配制好的工作液以 200  $\mu\text{L}$  / 孔的密度加入到 96 孔板中, 每组 3 个重复。之后每孔加入 50  $\mu\text{L}$  标准品或样品。将 96 孔板于  $37^\circ\text{C}$  孵育 15 min, 使用酶标仪检测在 562 nm 处的吸光度值, 根据标准曲线计算出 ECd 中蛋白的含量。

#### 1.4.3 PCL 取向纳米纤维的制备与表征

**PCL 取向纳米纤维的制备:** 采用静电纺丝技术制备 PCL 纳米纤维。将 PCL 溶于六氟异丙醇中, 配制成终浓度为 10 wt% 的静电纺丝溶液。通过 22 号针头以 1 mL/h 的速度推动注射器; 将铝箔纸包覆在滚筒 (3 000 rpm) 上, 作为静电纺纳米纤维的接收装置。针头与滚筒之间施加 15 kV 的直流电压, 接收距离为 15 cm, 接收时间为 2.5 h。

**PCL 取向纳米纤维的表征:** 将制备的 PCL 取向纳米纤维喷金 20 s, 电压 10 kV, 使用扫描电子显微镜观察纳米纤维的形态与直径, 使用 ImageJ 软件测量和分析图像以计算纤维平均直径。

#### 1.4.4 ECd 微粒在 PCL 取向纳米纤维上的沉积与表征

**ECd 微粒的沉积:** 采用静电喷雾技术, 将 ECd 以微粒形式沉积于 PCL 取向纳米纤维表面。首先, 将 ECd 以 1 : 1 体积比溶于明胶水溶液中, 制得 ECd、明胶浓度均为 5 wt% 的静电喷雾混合溶液。之后, 使用真空等离子设备 (对 PCL 取向纳米纤维表面进行改性处理, 使纤维由疏水变为亲水, 然后使用浓度为 0.1 mg/mL 多聚赖氨酸溶液包被过夜,  $37^\circ\text{C}$  烘干。在静电喷雾过程中, PCL 取向纳米纤维作为接收装置, 针头与接收装置之间施加 20 kV 的直流电压, 推注速度为 0.3 mL/h, 接收距离为 10 cm。ECd 微粒的沉积时间分别为 10 min、20 min、30 min, 并用于后续参数筛选。

**ECd 微粒的表征:** 为了可视化 ECd 微粒在 PCL

纳米纤维表面的分布情况，在静电喷雾溶液中加入 1 mg/mL 罗丹明 B，使用上述方法获得在 PCL 纳米纤维表面沉积的 ECd 微粒。使用尼康正置显微镜观察纤维表面 ECd 微粒的分布情况，使用扫描电子显微镜观察沉积 ECd 微粒的 PCL 取向纳米纤维的形态。

**1.4.5 纳米纤维的亲水性** 将等离子体处前后的 PCL 与经等离子体处理后沉积 ECd 的 PCL 取向纤维置于载玻片上，使用水接触角测量仪将超纯水 (5  $\mu\text{L}$ ) 滴于纤维表面，测量水滴和纤维表面的接触角。

**1.4.6 ECd 最佳沉积时间** 通过静电纺丝和静电喷雾技术制备沉积 ECd 微粒 0、10、20、30 min 的 PCL 取向纳米纤维并置于 24 孔板中，分别记为 PCL、PCL-ECd1、PCL-ECd2、PCL-ECd3，以空白玻片作为对照，将人脐静脉内皮细胞、施万细胞以  $5 \times 10^3$  个 / 孔的密度接种于上述样品上，分别加入含体积分数 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基 400  $\mu\text{L}$ ，每组 3 个重复，置于  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。

**不同 PCL-ECd 纳米纤维表面 ECd 的沉积量：**首先对上述制备的不同 PCL-ECd 纳米纤维进行裁剪，大小为  $5 \times 8$  cm，使用二氯甲烷和超纯水对其进行溶解，其中二氯甲烷与超纯水按体积比 1 : 1 配制。待不同 PCL-ECd 纳米纤维溶解后，使用购买的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白含量的测定。BCA 试剂与  $\text{Cu}^{2+}$  试剂按体积比 50 : 1 配制成工作液，充分混匀。将配制好的工作液每孔 200  $\mu\text{L}$  加入 96 孔板，每组 3 个重复。之后每孔加入 50  $\mu\text{L}$  不同 PCL-ECd 纳米纤维溶解后的溶液。将 96 孔板于  $37^\circ\text{C}$  孵育 15 min，使用酶标仪检测在 562 nm 处的吸光度值，根据标准曲线计算出不同 PCL-ECd 纳米纤维表面 ECd 的沉积量。

**不同 PCL-ECd 纳米纤维对人脐静脉内皮细胞、施万细胞增殖的影响：**在第 1、3、5 天时，用含体积分数 10% 的 CCK-8 新鲜培养基替代原有的细胞培养基。 $37^\circ\text{C}$  避光孵育 2 h 后，每孔吸取 100  $\mu\text{L}$ ，使用酶标仪测量在 450 nm 处吸光度值，每组 3 个重复。

**不同 PCL-ECd 纳米纤维对人脐静脉内皮细胞、施万细胞形态的影响：**按上述分组与人脐静脉内皮细胞、施万细胞培养 3 天后，使用 4% 细胞组织固定液固定细胞 30 min，用 PBS 洗涤 2 次，然后用 0.1% Triton X-100 渗透 10 min，1% 牛血清白蛋白封闭 1 h，加入 Phalloidin-iFluor 488 染料孵育 30 min。随后，用 DAPI 染色封固剂封固，置于倒置荧光显微镜下观察细胞形态。

**1.4.7 单向线性梯度 ECd 的制备** 使用上述静电喷雾参数，在 ECd 混合溶液中加入 1 mg/mL 罗丹明 B，将载玻片划分为 5 个相同大小的区域并在载玻片上方覆盖遮挡板。通过改变遮挡板的覆盖区域即由覆盖 4 个区域逐步递减至覆盖 0 个区域以改变静电场分布，从而获得 ECd 微粒的梯度沉积，最终产生 ECd 微粒的单向线性梯度，通过 ImageJ 软件测量载玻片上不同区域的平均相对荧光强度。

**1.4.8 PCL-ECd 纳米纤维调控施万细胞实验** 通过静电纺丝和静电喷雾技术分别制备未沉积、均一与单向线性梯度沉积 ECd 微粒的 PCL 取向纳米纤维，分别记为 PCL、均一沉积组和梯度沉积组，以空白玻片作为对照，样品放置于 6 孔板中进行实验。

**施万细胞活性实验：**将施万细胞以  $2.5 \times 10^4$  个 / 孔的密度接种于上述不同样品上，分别加入 2 mL 含 1% 体积分数胎牛血清的高糖 DMEM 培养基，每组 3 个重复，置于  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。第 3 天用 CCK-8 体积分数为 10% 的新鲜培养基替代细胞培养基， $37^\circ\text{C}$  避光孵育 2 h 后，每孔吸取 100  $\mu\text{L}$  使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度值。细胞活性 = 实验组吸光度值 / 对照组吸光度值  $\times 100\%$ 。

**施万细胞的形态实验：**按上述分组与施万细胞培养后，固定、破膜、封闭后加入 Phalloidin-iFluor 488 染料孵育 30 min。随后，用 DAPI 染色封固剂封固，置于倒置显微镜下观察细胞形态。

**施万细胞的迁移实验：**在每个样品上距离左侧 5 mm 的位置放置聚二甲基硅氧烷矩形模具，左边的空白区域用于细胞种植。施万细胞以  $1 \times 10^5$  个 / 孔的密度接种于种植区，待细胞粘附后，移除细胞迁移模具，加入 3 mL 含 1% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基，每组 3 个重复。3 天后，样品进行固定、破膜、封闭后，加入 Phalloidin-iFluor 488 染料孵育 30 min，最后用 DAPI 进行封片。使用正置荧光显微镜对样品进行观察、成像。通过 ImageJ 软件对各组细胞迁移总数以及迁移区中的细胞数目进行统计和计算。

**1.5 主要观察指标** 纳米纤维取向性，ECd 均一与梯度的沉积以及其对施万细胞活性、形貌和迁移的影响。

**1.6 统计学分析** 数据采用 SPSS 软件进行分析，统计数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较选择 t 检验分析，多组间比较采用单因素方差分析。所有实验均重复

3次以上,  $P < 0.05$  表示差异有显著性意义。文章统计学方法已通过青岛大学生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

**2.1 ECd 的制备及成分测定** ECd 的制备流程见图 1A。与对照组 ( $15.77 \pm 0.25$ ) pg/mL 相比, 内皮细胞条件培养基和 ECd 中 VEGF 含量均显著增加, 含量分别为 ( $218.84 \pm 11.90$ ) pg/mL 和 ( $138.89 \pm 3.79$ ) pg/mL (图 1B)。蛋白含量检测结果显示, 与对照组 ( $0.92 \pm 0.01$ ) mg/mL 相比, 内皮细胞条件培养基和 ECd 均明显增加, 含量分别为  $3.14 \pm 0.11$  mg/mL 和  $3.16 \pm 0.11$  mg/mL (图 1C)。

**2.2 PCL 取向纳米纤维的表征** 如图 2A 所示, PCL 纳米纤维具有良好的取向性, 能够为细胞增殖、迁移提供良好的地形引导。纤维直径达到纳米级别, 即  $700 \pm 150$  nm (图 2B)。

**2.3 ECd 在 PCL 取向纳米纤维膜上的沉积与表征** 如图 2C 所示, PCL 取向纳米纤维膜上的 ECd 以微粒形式沉积, 且纤维保持良好的取向性, 表明沉积 ECd 微粒的 PCL 纳米纤维能够同时为细胞提供地形线索和生物信号。如图 2D 所示, 罗丹明 B 标记的 ECd 能够以微粒方式均匀分布于 PCL 取向纳米纤维膜上 (见图 2D)。

**2.4 PCL 纳米纤维的亲水性** 如图 3 所示, 未经等离子体处理的 PCL 取向纳米纤维的接触角为  $128.78 \pm 2.78^\circ$ , 具有疏水性; 经等离子体处理后, 未沉积与沉积 ECd 微粒的 PCL 取向纳米纤维均具有超亲水性, 接触角为  $0^\circ$ 。

### 2.5 ECd 最佳沉积时间

**2.5.1 不同 PCL-ECd 纳米纤维表面 ECd 的沉积量** 通过静电纺丝和静电喷雾技术制备了沉积 ECd 微粒 10、20、30 min 的 PCL 取向纳米纤维, 分别记为 PCL-ECd1、PCL-ECd2、PCL-ECd3。为了观察不同 PCL-ECd 纳米纤维表面 ECd 的含量, 对其 ECd 中的蛋白含量进行了研究。与 PCL-ECd1 ( $0.11 \pm 0.01$  mg/mL) 相比, PCL-ECd2、PCL-ECd3 中蛋白含量均显著增加 ( $P < 0.001$ ), 含量分别为  $0.23 \pm 0.07$  pg/mL 和  $0.37 \pm 0.02$  mg/mL; 同时, PCL-ECd3 中蛋白含量显著高于 PCL-ECd2 ( $P < 0.05$ )。因此, 随着沉积时间增加, ECd 在 PCL 纳米纤维表面的沉积量增加 (图 4)。

**2.5.2 人脐静脉内皮细胞增殖情况** CCK-8 结果显示, 与对照组相比, 第 1 天和第 3 天 PCL-ECd1 组的

人脐静脉内皮细胞增殖无明显降低, 与 PCL-ECd2、PCL-ECd3 组细胞的增殖相比均显著增加 ( $P < 0.05$ )。第 5 天 PCL-ECd1 组的人脐静脉内皮细胞的增殖与 PCL、PCL-ECd2、PCL-ECd3 组相比均显著增加 ( $P < 0.01$ ) (图 5)。

**2.5.3 施万细胞增殖情况** 如图 6 所示, 第 5 天时 PCL-ECd1 组与对照组相比, 有统计学差异, 已在图中进行标注。施万细胞的增殖与 PCL-ECd2、PCL-ECd3 组细胞的增殖相比均显著增加 ( $P < 0.05$ ), 该结果与人脐静脉内皮细胞增殖相似。

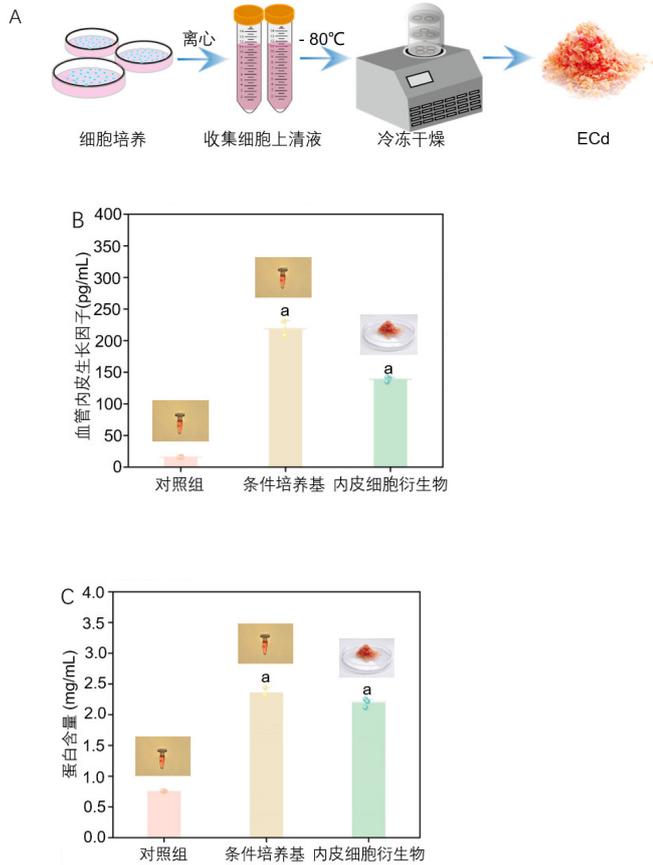
**2.5.4 人脐静脉内皮细胞和施万细胞在不同 PCL-ECd 表面的生长情况** 如图 7 所示, 人脐静脉内皮细胞、施万细胞与各组样品培养 3 天后的荧光显微图片显示, 与对照组相比, 在未沉积与沉积 ECd 微粒的 PCL 取向纳米纤维膜上细胞沿着纤维的方向生长。根据人脐静脉内皮细胞、施万细胞增殖结果和生长形貌, 最终选取 ECd 微粒沉积时间为 10 min。

**2.6 ECd 微粒的单向线性梯度结果** 上述实验结果表明适当的 ECd 沉积可以促进细胞增殖。根据上述沉积时间, 通过改变载玻片的遮挡范围, 即载玻片的遮挡范围依次为四个区域、三个区域、两个区域、一个区域和无载玻片遮挡区域, 使每个区域 ECd 的沉积量逐渐减少最终获得 ECd 微粒单向线性梯度的沉积, 制备流程见图 8A。在罗丹明 B 标记的 ECd 微粒单向梯度涂层的 PCL 取向纳米纤维膜上, 荧光强度逐渐增加, 并且最高侧的荧光强度约为最低侧的 40 倍, 表明在取向 PCL 纳米纤维上成功地沉积了 ECd 线性梯度 (图 8B)。如图 8C 所示, 荧光显微照片显示以罗丹明 B 标记的 ECd 微粒在 PCL 取向纳米纤维膜上的均一与单向线性梯度沉积。

**2.7 沉积 ECd 微粒的 PCL 取向纳米纤维对施万细胞的调控**

**2.7.1 施万细胞的活性结果** CCK-8 检测显示, 与对照组相比, 均一与梯度组施万细胞的活性 ( $98.09 \pm 0.03\%$ 、 $100.65 \pm 0.02\%$ ) 均无显著降低; PCL 组施万细胞的活性 ( $93.49 \pm 0.024\%$ ) 显著降低, 但所有组细胞的活性均大于标准化细胞活力 ( $70\%$ )<sup>[20]</sup> (图 9)。

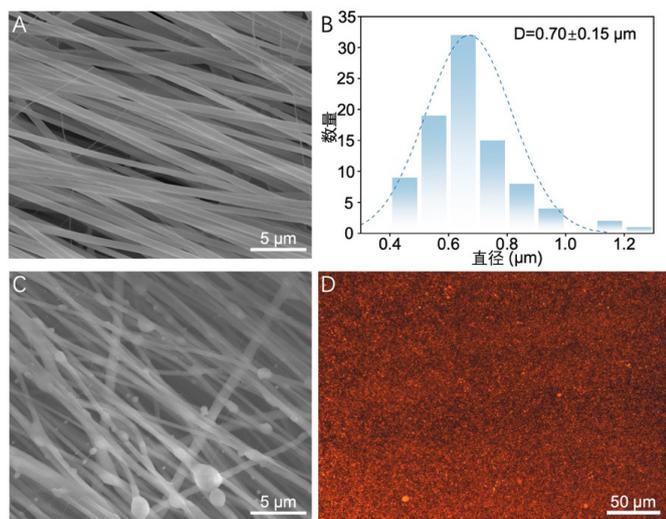
**2.7.2 施万细胞的形态结果** 施万细胞与各组样品培养 3 天后, 荧光显微图片结果显示, 与对照组相比, 在 PCL 取向纳米纤维膜与沉积 ECd 微粒的 PCL 取向纳米纤维膜上细胞沿着纤维的方向生长, 且生长状态良好, 见图 10。



图注: A 为人脐静脉内皮细胞特定培养后通过低温冷冻干燥后获得 ECd; B 为 ECd 中血管内皮生长因子含量的测定结果; C 为 ECd 中蛋白含量的测定结果, 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.001$ 。

图 1 | ECd 的制备流程及表征

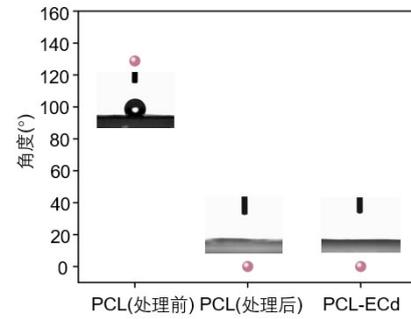
Figure 1 | Preparation and distribution of ECd



图注: A 为 PCL 取向纳米纤维的扫描电镜图片; B 为 PCL 取向纳米纤维的直径统计; C 为沉积 ECd 微粒的 PCL 取向纳米纤维的扫描电镜图片; D 为载有罗丹明 B 的 ECd 微粒通过静电喷雾方式均匀分布于载玻片。

图 2 | PCL 取向纳米纤维的微观形貌和 ECd 的沉积

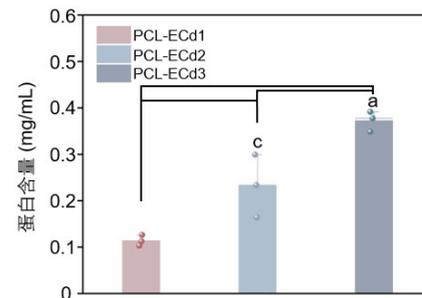
Figure 2 | Microscopic morphology of PCL aligned nanofibers and deposition of ECd



图注: 未经等离子体处理的 PCL 纤维具有疏水性; 等离子体处理 90 s 后, 未沉积与沉积 ECd 微粒的 PCL 取向纳米纤维均具有超亲水性。

图 3 | 等离子体处理前后的 PCL 与经等离子体处理后沉积 ECd 的 PCL 取向纤维的接触角

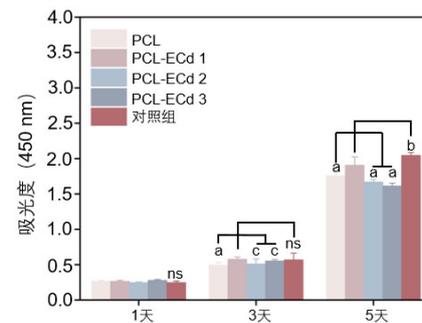
Figure 3 | Water contact angle of PCL before and after plasma, PCL oriented fibers deposited with ECd by plasma



图注: 不同 PCL-ECd 纳米纤维表面 ECd 中蛋白含量的测定结果, 与 PCL-ECd3 相比, <sup>a</sup> $P < 0.001$ ; 与 PCL-ECd2 相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

图 4 | 不同 PCL-ECd 纳米纤维表面 ECd 中蛋白含量

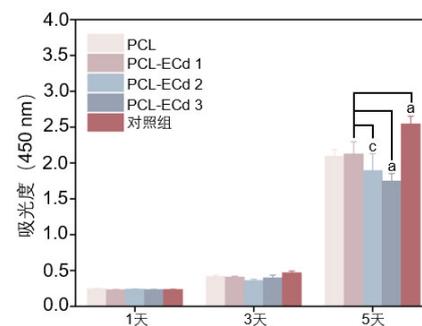
Figure 4 | Protein content in ECd on the surface of different PCL-ECd nanofibers



图注: 人脐静脉内皮细胞在第 1、3、5 天的 CCK-8 检测结果, PCL-ECd1 与其他组相比, <sup>a</sup> $P < 0.001$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

图 5 | 沉积不同时间 ECd 的 PCL 取向纳米纤维对人脐静脉内皮细胞增殖的影响

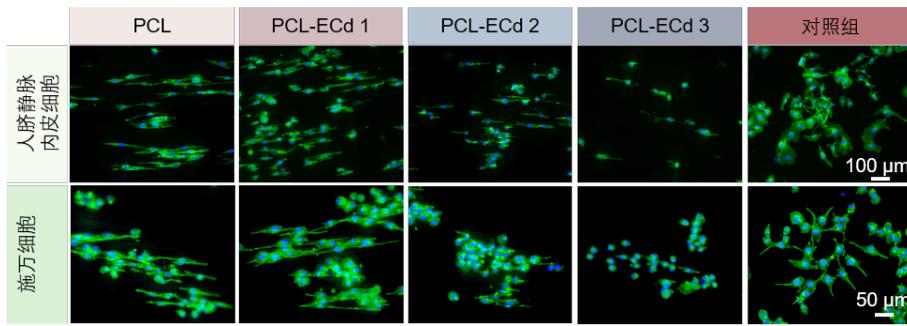
Figure 5 | Effect of PCL aligned nanofibers deposited with ECd on the proliferation of HUVECs



图注: 施万细胞在第 1、3、5 天的 CCK-8 检测结果, 与 PCL-ECd2 相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与 PCL-ECd3 相比, <sup>a</sup> $P < 0.001$ 。

图 6 | 沉积不同时间 ECd 的 PCL 取向纳米纤维对施万细胞增殖的影响

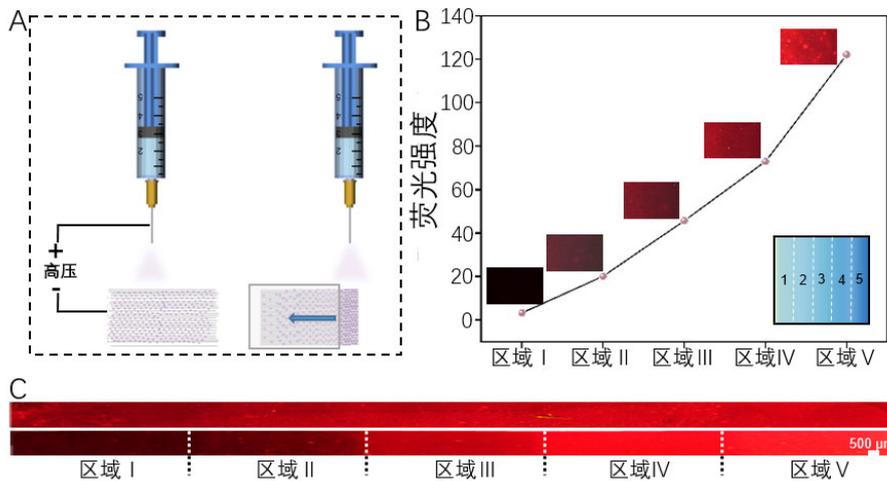
Figure 6 | Effect of PCL aligned nanofibers deposited with ECd on the proliferation of SCs



图注：人脐静脉内皮细胞、施万细胞免疫荧光染色图，绿色代表细胞骨架，蓝色代表细胞核。

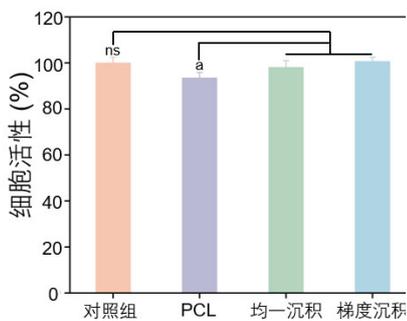
图7 | 沉积不同时间 ECd 的 PCL 取向纳米纤维对人脐静脉内皮细胞、施万细胞形态的影响

Figure 7 | Effect of PCL aligned nanofibers deposited with ECd on the morphology of HUVECs, SCs



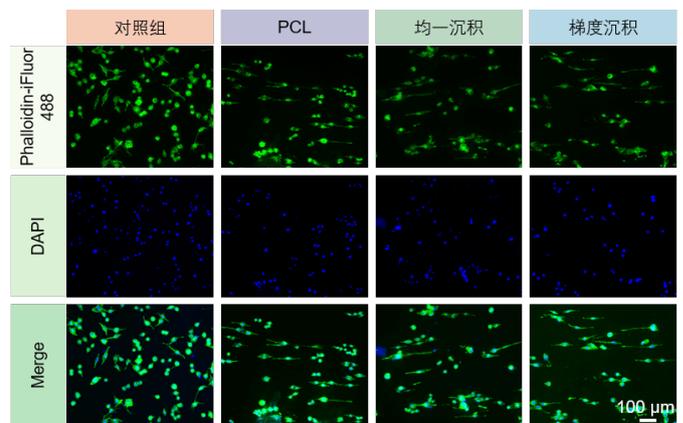
图注：A 为通过静电喷雾获得 ECd 均一与梯度沉积的示意图；B 为梯度沉积中，每个区域的荧光强度；C 为 ECd 均一与梯度沉积的显微图片，B、C 均以罗丹明 B 标记 ECd。

图8 | ECd 的均一与梯度沉积  
Figure 8 | Uniform and gradient deposition of ECd



图注：施万细胞的 CCK-8 检测结果，与对照组相比， $P > 0.05$ ；与 PCL 组相比， $^a P < 0.001$ 。

图9 | 均一与梯度沉积 ECd 的 PCL 取向纳米纤维对施万细胞活性的影响  
Figure 9 | Effect of uniform and gradient deposition of PCL aligned nanofibers with ECd on SCs activity



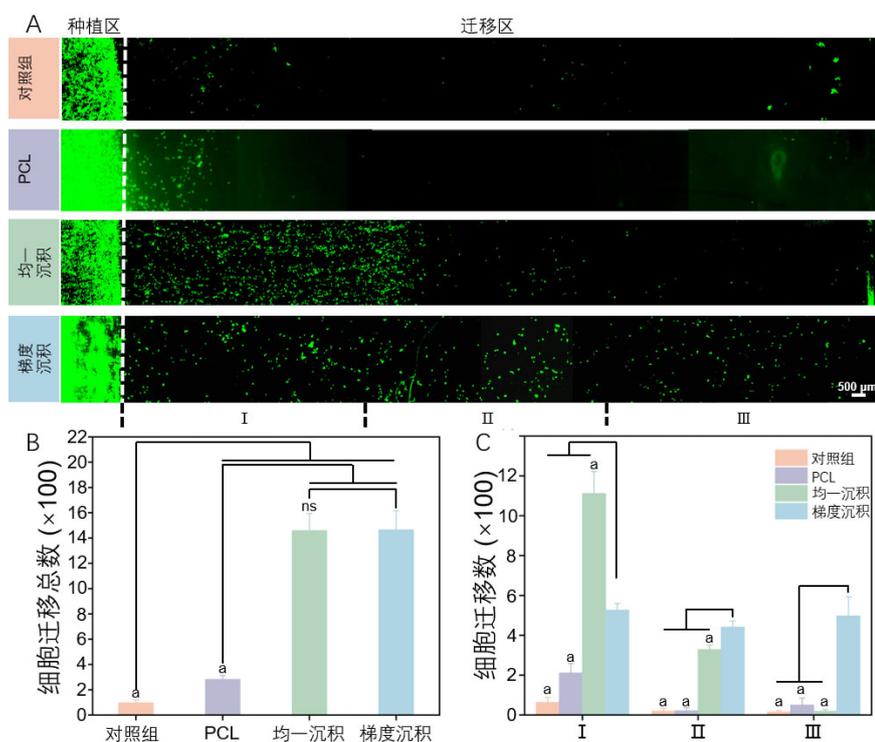
图注：施万细胞在不同组样品上培养 3 天后的细胞形态。  
图10 | 均一与梯度沉积 ECd 的 PCL 取向纳米纤维对施万细胞形态的影响

Figure 10 | Effect of uniform and gradient deposition of PCL aligned nanofibers with ECd on the morphology of SCs

**2.7.3 施万细胞的迁移结果** 如图 11A 所示, 免疫荧光染色结果显示, 与对照组相比, 均一沉积和梯度沉积组施万细胞均有不同程度的迁移, Gradient 组能够迁移至最远的位置。经量化统计分析, 与对照组相比, 均一沉积和梯度沉积组施万细胞迁移总数均有显著增加 ( $P < 0.001$ ); 均一沉积和梯度沉积组施万细胞迁移总数无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 然而与 PCL 组相比细胞迁移总数明显增加 ( $P < 0.001$ )。将迁移区平分为三个区域, 在迁移 I 区, 梯度沉积组与均一沉积组比较有统计学差异。施万细胞的迁移数量明显高于对照组和 PCL 组 ( $P < 0.001$ ); 在迁移 II、III 区, 梯度沉积组施万细胞的迁移数量显著高于对照组、PCL 组与均一沉积组 ( $P < 0.01$ ), 见图 11B-C。因此, ECd 的单向线性梯度可以驱使施万细胞迁移更远。这种效应可能归因于梯度形成的物理和化学信号, 蛋白质的均一沉积会使生化信号在微环境中相对均匀分布, 细胞接收到的信息较为一致, 可能引起细胞整体上向某一特定方向迁移; 而梯度沉积会造成生化信号在空间上的不均匀分布, 细胞通过在不同位置获取不同信号以满足行为需求, 从而影响细胞迁移的方向和速度 [21, 22]。

### 3 讨论 Discussion

周围神经损伤已成为最常见的神经系统损伤之一, 影响着全球数百万病人 [23]。周围神经损伤能够导致运动和感觉功能障碍甚至造成残疾, 给患者和家属带来极大的心理负担 [24]。因此, 有效促进周围神经损伤后的神经修复已成为临床研究的重点。周围神经损伤后, 神经再生微环境重塑非常重要 [25, 26]。神经修复早期, 血管生成在周围神经损伤修复过程中扮演着至关重要的角色 [27], 其作用体现在再生神经血管生态位的重建, 以及提供充足的氧气和营养支持。有研究表明, 通过在损伤部位给予如 NGF、BDNF、VEGF 等营养因子, 以及为缺损部位的细胞提供充足的氧气、葡萄糖等可以改善神经再生微环境 [28, 29]。此外, 一项研究发现内皮细胞在不同细胞密度条件下培养后所获得的条件培养基对背根神经节轴突生长的促进作用存在显著差异, 造成这种差异的原因可能与内皮细胞分泌因子的浓度密切相关 [30]。因此, 本研究从神经再生初期的微环境出发, 首先通过培养人脐静脉内皮细胞制备了 ECd, 其富含 VEGF 和蛋白, 它们能够提供营养物质以改善神经再生微环境, 从而促进神经损伤的修复。



图注: A 为施万细胞迁移的免疫荧光染色图; B 为施万细胞在迁移区域的总数, 与对照组、PCL 组相比,  $^{\#}P < 0.001$ ; 与均一沉积组相比,  $P > 0.05$ ; C 为施万细胞在每个迁移区域的数量, 与其他组相比,  $^{\#}P < 0.001$ 。

图 11 | 均一与梯度沉积 ECd 的 PCL 取向纳米纤维对施万细胞迁移的影响  
Figure 11 | Effect of uniform and gradient deposition of PCL aligned nanofibers with ECd on the migration of SCs

静电纺丝技术与其他技术相比因其操作简单、成本低和可调性强,在组织修复与再生研究中备受关注<sup>[31, 32]</sup>。PCL是组织工程支架的基础材料之一,因其为疏水性合成聚合物,因此表面不利于细胞初期粘附<sup>[33]</sup>。然而,材料表面具有亲水性对细胞的粘附和生长至关重要<sup>[34]</sup>。等离子体处理技术通过改变材料表面化学结构与形貌,增强亲水性,促进细胞粘附和生长,满足不同组织修复需求。过去,组织工程支架主要由单一材料构成,如天然材料、高分子聚合物<sup>[28, 35]</sup>。单一材料的使用具有一定的缺陷。为满足组织工程的功能化需求,目前更多支架采用了材料与蛋白相结合的方式<sup>[36]</sup>。本研究使用等离子体对PCL表面进行改性使其具有超亲水性,并将PCL取向纳米纤维与ECd结合,通过扫描电子显微镜和荧光显微镜能够观察到PCL纳米纤维的取向结构和ECd的均匀沉积。通过将沉积ECd的PCL纳米纤维与细胞共培养表明适当的ECd沉积可以促进细胞增殖,可能是由于蛋白质沉积密度过高、浓度达到过饱和状态,以及细胞与基质间的粘附效率较低所致<sup>[37]</sup>。

与中枢神经系统不同,周围神经系统具有一定的自我修复潜能,这主要归因于施万细胞显著的可塑性<sup>[38]</sup>。在周围神经修复过程中,由于神经两个断端之间缺损距离较长而无法有效传递信号,因此促进施万细胞进行长距离的迁移是改善周围神经功能、促进周围神经修复的一项关键策略。本研究通过静电纺丝和静电喷雾技术制备沉积ECd微粒的PCL取向纳米纤维,其中PCL取向纳米纤维作为基础材料具有良好的生物相容性和生物可降解性,为施万细胞生长提供地形线索;然后,ECd微粒作为纤维表面的二级结构为施万细胞迁移提供接触诱导。细胞的迁移具有趋化性和趋触性,细胞能够感知周围环境中的化学信号以及细胞外基质的梯度方向,驱动细胞与表面受体结合并引发细胞内部信号传递从而使细胞沿着这一方向发生定向迁移<sup>[39, 40]</sup>。这种化学信号和细胞外基质通常可以是各种蛋白、多糖、药物或多肽等,它们为细胞提供一个有利微环境<sup>[41]</sup>。通过神经营养和神经保护作用从而为施万细胞形成“Büngner”带提供所需的营养物质<sup>[42]</sup>。本研究通过改变电场分布获得单向线性梯度ECd微粒的修饰,引导施万细胞定向迁移。荧光显微镜拍摄结果可见施万细胞在ECd微粒修饰的纤维膜上有明显的细胞

迁移现象,同时在ECd微粒单向线性梯度修饰的纤维膜上细胞能够迁移至更远的距离。

然而,这项研究仍有一些局限性。本研究已初步证明ECd中含有VEGF和蛋白,而对于所含蛋白的类型并未进行分析,因此,未来的研究可以聚焦于ECd中所含的多糖、蛋白,包括胶原蛋白、糖胺聚糖等,对其成分进行蛋白质组学分析,从而能够针对性研究<sup>[43, 44]</sup>。轴突再生也是周围神经修复过程中重要的一环<sup>[45]</sup>,本研究进行了沉积ECd微粒的PCL取向纳米纤维对施万细胞迁移调控的初步探索,尚未进一步验证其对轴突再生的潜在促进作用。该研究主要通过细胞实验为ECd促进施万细胞迁移提供了一些基本的见解。未来的研究仍需要对ECd调控神经细胞的具体作用机制做进一步阐述,同时进行动物水平的研究以更好地了解血管微环境与神经间的相互作用。

综上所述,本研究制备的PCL取向纳米纤维具有良好的细胞相容性、有序的取向结构和超亲水性等多功能性。ECd富含VEGF和多种蛋白,通过静电喷雾技术能够以微粒方式附着于纤维表面。这种创新性的结合能够促进人脐静脉内皮细胞、施万细胞的增殖和施万细胞定向迁移,为周围神经的修复与再生领域开辟了新的途径。

**致谢:** 感谢青岛大学松山校区及青岛大学附属医院医学研究中心西海岸院区提供的实验平台。

**作者贡献:** 姚丽婕负责材料制备与表征、免疫荧光染色、论文撰写以及数据和文章的校对,阎玉莹、陈思宇负责细胞培养和文章的校对,王元非和吴桐负责课题设计及论文的定稿。

**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。

**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。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:** 该文章撰写遵守了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。

## 4 参考文献 References

- [1] SHARIFI M, KAMALABADI-FARAHANI M, SALEHI M, et al. Recent advances in enhances peripheral nerve orientation: the synergy of micro or nano patterns with therapeutic tactics. *J Nanobiotechnology*. 2024;22:194.
- [2] WANG X, CHEN S, CHEN X, et al. Biomimetic multi-channel nerve conduits with micro/nanostructures for rapid nerve repair. *Bioact Mater*. 2024;41:577-596.

- [3] XUE J, WU T, LI J, et al. Promoting the Outgrowth of Neurites on Electrospun Microfibers by Functionalization with Electrospayed Microparticles of Fatty Acids. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2019;58:3948-3951.
- [4] HAN Q, GUAN W, SUN S, et al. Anisotropic topological scaffolds synergizing non-invasive wireless magnetic stimulation for accelerating long-distance peripheral nerve regeneration. *Chem Eng J.* 2024;496:153809.
- [5] JIN B, YU Y, LOU C, et al. Combining a Density Gradient of Biomacromolecular Nanoparticles with Biological Effectors in an Electrospun Fiber-Based Nerve Guidance Conduit to Promote Peripheral Nerve Repair. *Adv Sci (Weinh).* 2023;10:e2203296.
- [6] MOTTA CMM, ENDRES KJ, WESEMLOTIS C, et al. Enhancing Schwann cell migration using concentration gradients of laminin-derived peptides. *Biomaterials.* 2019;218:119335.
- [7] WU P, TONG Z, LUO L, et al. Comprehensive strategy of conduit guidance combined with VEGF producing Schwann cells accelerates peripheral nerve repair. *Bioact Mater.* 2021;6:3515-3527.
- [8] CERQUEIRA SR, LEE YS, CORNELISON RC, et al. Decellularized peripheral nerve supports Schwann cell transplants and axon growth following spinal cord injury. *Biomaterials.* 2018;177:176-185.
- [9] HUANG Y, YE K, HE A, et al. Dual-layer conduit containing VEGF-A-Transfected Schwann cells promotes peripheral nerve regeneration via angiogenesis. *Acta Biomater.* 2024;180:323-336.
- [10] MA T, HAO Y, LI S, et al. Sequential oxygen supply system promotes peripheral nerve regeneration by enhancing Schwann cells survival and angiogenesis. *Biomaterials.* 2022;289: 121755.
- [11] TANG J, WU C, CHEN S, et al. Combining Electrospinning and Electrospaying to Prepare a Biomimetic Neural Scaffold with Synergistic Cues of Topography and Electrotransduction. *ACS Appl Bio Mater.* 2020;3:5148-5159.
- [12] XUE J, PISIGNANO D, XIA Y. Maneuvering the Migration and Differentiation of Stem Cells with Electrospun Nanofibers. *Adv Sci (Weinh).* 2020;7:2000735.
- [13] JI E, SONG YH, LEE J K, et al. Bioadhesive levan-based coaxial nanofibrous membranes with enhanced cell adhesion and mesenchymal stem cell differentiation. *Carbohydr Polym.* 2025; 354:123337.
- [14] QIAN J, LIN Z, LIU Y, et al. Functionalization strategies of electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Smart Mater Med.* 2021;2:260-279.
- [15] LI Y, GE Z, LIU Z, et al. Integrating electrospun aligned fiber scaffolds with bovine serum albumin-basic fibroblast growth factor nanoparticles to promote tendon regeneration. *J Nanobiotechnology.* 2024;22:799.
- [16] WANG Q, ZHANG S, JIANG J, et al. Electrospun radially oriented berberine-PHBV nanofiber dressing patches for accelerating diabetic wound healing. *Regen Biomater.* 2024;11:rbae063.
- [17] ZHOU Z, LIN Y, LIU N, et al. Gradient coating of extracellular matrix derived from endothelial cells on aligned PCL nanofibers for rapid endothelialization. *Front Bioeng Biotechnol.* 2024;12:1527046.
- [18] ZHANG X, GUO M, GUO Q, et al. Modulating axonal growth and neural stem cell migration with the use of uniaxially aligned nanofiber yarns welded with NGF-loaded microparticles. *Mater Today Adv.* 2023;17:100343.
- [19] XUE J, WU T, QIU J, et al. Accelerating Cell Migration along Radially Aligned Nanofibers through the Addition of Electrospayed Nanoparticles in a Radial Density Gradient. *Part Part Syst Charact.* 2022;39(4):2100280. .
- [20] BLACK BJ, ECKER M, STILLER A, et al. In vitro compatibility testing of thiol-ene/acrylate-based shape memory polymers for use in implantable neural interfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2018;106:2891-2898.
- [21] XUE J, WU T, QIU J, et al. Promoting Cell Migration and Neurite Extension along Uniaxially Aligned Nanofibers with Biomacromolecular Particles in a Density Gradient. *Adv Funct Mater.* 2020; 30.
- [22] WU T, XUE J, LI H, et al. General Method for Generating Circular Gradients of Active Proteins on Nanofiber Scaffolds Sought for Wound Closure and Related Applications. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10:8536-8545.
- [23] DAI Y, LU T, LI L, et al. Electrospun Composite PLLA-PPSB Nanofiber Nerve Conduits for Peripheral Nerve Defects Repair and Regeneration. *Adv Healthc Mater.* 2024;13:e2303539.
- [24] PATEL DK, WON SY, JUNG E, et al. Recent progress in biopolymer-based electrospun nanofibers and their potential biomedical applications: A review. *Int J Biol Macromol.* 2025; 293: 139426.
- [25] ROBLES KN, ZAHRA FT, MU R, et al. Advances in Electrospun Poly( $\epsilon$ -caprolactone)-Based Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering. *Polymers (Basel).* 2024;16(20):2853.
- [26] SNYDER Y, TODD M, JANA S. Substrates with Tunable Hydrophobicity for Optimal Cell Adhesion. *Macromol Biosci.* 2024;24:e2400196.
- [27] KIM K, YANG J, LI C, et al. Anisotropic structure of nanofiber hydrogel accelerates diabetic wound healing via triadic synergy of immune-angiogenic-neurogenic microenvironments. *Bioact Mater.* 2025;47:64-82.
- [28] LIU H, PUIGGALÍ-JOU A, CHANSORIA P, et al. Filamented hydrogels as tunable conduits for guiding neurite outgrowth. *Mater Today Bio.* 2025;31:101471.
- [29] LIU S, SIMIŃSKA-STANNY J, YAN L, et al. Bioactive ECM-mimicking nerve guidance conduit for enhancing peripheral nerve repair. *Mater Today Bio.* 2024;29:101324.
- [30] GRASMAN JM, KAPLAN DL. Human endothelial cells secrete neurotrophic factors to direct axonal growth of peripheral nerves. *Sci Rep.* 2017;7:4092.
- [31] ZHOU Z, LIU N, ZHANG X, et al. Manipulating electrostatic field to control the distribution of bioactive proteins or polymeric microparticles on planar surfaces for guiding cell migration. *Colloids Surf B.* 2022;209:112185.
- [32] ZHENG T, WU L, SUN S, et al. Co-culture of Schwann cells and endothelial cells for synergistically regulating dorsal root ganglion behavior on chitosan-based anisotropic topology for peripheral nerve regeneration. *Burns Trauma.* 2022;10:tkac030.
- [33] YAO X, XUE T, CHEN B, et al. Advances in biomaterial-based tissue engineering for peripheral nerve injury repair. *Bioact Mater.* 2025;46:150-172.
- [34] HUANG J, LI J, LI S, et al. Netrin-1-engineered endothelial cell exosomes induce the formation of pre-regenerative niche to accelerate peripheral nerve repair. *Sci Adv.* 2024;10: eadm8454.
- [35] 宋凯凯, 张锴, 贾龙. 周围神经系统损伤的微环境与修复方式 [J]. *中国组织工程研究*, 2021,25(4): 651-656.
- [36] WEI Y, ZHOU X, LI Z, et al. Genetically Programmed Single-Component Protein Hydrogel for Spinal Cord Injury Repair. *Adv Sci (Weinh).* 2025;12(10):e2405054.
- [37] NING X, WANG R, LIU N, et al. Three-dimensional structured PLCL/ADM bioactive aerogel for rapid repair of full-thickness skin defects. *Biomater Sci.* 2024;12:6325-6337.
- [38] XU W, WU Y, LU H, et al. Injectable hydrogel encapsulated with VEGF-mimetic peptide-loaded nanoliposomes promotes peripheral nerve repair in vivo. *Acta Biomater.* 2023;160:225-238.
- [39] HUANG J, ZHANG G, LI S, et al. Endothelial cell-derived exosomes boost and maintain repair-related phenotypes of Schwann cells via miR199-5p to promote nerve regeneration. *J Nanobiotechnology.* 2023;21:10.
- [40] XIA B, LV Y. Dual-delivery of VEGF and NGF by emulsion electrospun nanofibrous scaffold for peripheral nerve regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018;82:253-264.
- [41] SENGUPTA S, PARENT CA, BEAR JE. The principles of directed cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22:529-547.
- [42] IDRISOVA KF, ZEINALOVA AK, MASGUTOVA GA, et al. Application of neurotrophic and proangiogenic factors as therapy after peripheral nervous system injury. *Neural Regen Res.* 2022; 17:1240-1247.
- [43] MENEZES R, VINCENT R, OSORNO L, et al. Biomaterials and tissue engineering approaches using glycosaminoglycans for tissue repair: Lessons learned from the native extracellular matrix. *Acta Biomater.* 2023;163:210-227.
- [44] BARIK D, SHYAMAL S, DAS K, et al. Glycoprotein Injectable Hydrogels Promote Accelerated Bone Regeneration through Angiogenesis and Innervation. *Adv Healthc Mater.* 2023;12:e2301959.
- [45] CHU X L, SONG X Z, LI Q, et al. Basic mechanisms of peripheral nerve injury and treatment via electrical stimulation. *Neural Regen Res.* 2022;17:2185-2193.