

· 脂肪源性干细胞与组织工程专题论著 ·

脂肪来源干细胞促进大鼠坐骨神经再生机制研究

宋起滨¹ 王哲² 王宇令¹ 李杨¹ 林爽¹

【摘要】 目的 探讨高分子神经套管负载大鼠自体脂肪源性干细胞(ADSCs)对大鼠坐骨神经损伤修复的作用。方法 提取 10 只 SD 大鼠腹股沟区 ADSCs 作为实验组,另选择 10 只 SD 大鼠作为对照组,制作单侧坐骨神经 5.0 mm 缺损模型。术后 12 周应用神经电生理检测,腓肠肌湿重和组织学观察,分析评价神经再生效果。结果 术后 12 周,实验组存活 7 只,对照组存活 8 只,实验组坐骨神经传导速率为(12.39 ± 0.71) ms,对照组为(8.13 ± 0.87) ms,其差异有统计学意义($P < 0.05$);腓肠肌湿重比率实验组为 47.69 ± 0.24 ,对照组为 35.77 ± 0.73 ,其差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组有髓神经纤维数量较少,呈散在分布;实验组有髓神经纤维数量较多,有神经束膜形成。结论 ADSCs 对于 SD 大鼠周围神经生长有促进作用。

【关键词】 脂肪源性干细胞;SD 大鼠;周围神经缺损模型;PLGA 神经套管

Study of the regenerative mechanism of adipose-derived stem cells on SD rats with sciatic nerve defects

SONG Qi-bin, WANG Zhe, WANG Yu-ling, LI Yang, LIN Shuang. (Department of Plastic Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

【Abstract】 Objective To explore the efficacy of the application of poly lactic co glycolic acid (PLGA) nerve tube loaded with adipose-derived stem cells in the repair of sciatic nerve defects in SD rats. Methods The adipose-derived stem cells were extracted from 10 SD rats as an experimental group. Another 10 SD rats were selected as the control group. A 5.0 mm defect model of the unilateral sciatic nerve of SD rats was made. Twelve weeks after operation, the effect of nerve regeneration was evaluated through electroneurophysiological examination, histological observation, and gastrocnemius wet weight. Results After 12 weeks, 7 rats from the experimental group and 8 rats from the control group survived. The sciatic nerve conduction rate was (12.39 ± 0.71) ms in the experimental group, and (8.13 ± 0.87) ms in the control group. The wet weight ratio of the gastrocnemius muscle was (47.69 ± 0.24) in the experimental group and (35.77 ± 0.73) in the control group. All differences were statistically significant. The number of myelinated nerve fibers were less and scattered in the control group. A larger number of myelinated nerve fibers and nerve fascicles formed in the experimental group. Conclusion ADSCs can promote the growth of the peripheral nerve in SD rats.

【Key words】 Adipose-derived stem cells; SD rats; Peripheral nerve defect model; PLGA nerve tube

创伤等原因导致的周围神经损伤缺损长度大于 30 mm,通常无法通过游离和屈曲体位的方法直接缝合^[1]。如果是重要部位的神经损伤,临床上通常选择身体次要部位的神经进行桥接移植,如腓肠神经、前臂外侧皮神经和隐神经等,也有选择带血管肌肉的复合组织移植进行神经缺损的治疗,但是此方法会增加二次创伤,因此,有必要探索新型的生物活性材料用于周围神经缺损的修复^[2]。一些高分子和脱细胞基质神经套管材料,已经在临床应用于修复神经缺损,如聚乳酸羟基乙酸(poly lactic co glycolic acid, PLGA)神经导管以其优越的性能受到学者们的重视且已被临床广泛应用,但这些材料缺乏

生物活性,不能进一步发挥促进神经再生的功能^[3-5]。脂肪源性干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)以其多向分化潜能和旁分泌功能,目前已经显现出具有促进周围神经再生的特质^[6-8],以神经套管作为载体,填充 ADSCs 作为活性成分是可行的方法。2016 年,中国医科大学附属盛京医院整形科初步探讨了在 SD 大鼠坐骨神经缺损模型中,应用 PLGA 高分子材料负载自体 ADSCs 促进周围神经生长的效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料 选取清洁级 SD 大鼠 20 只,雄性,体质量 250~300 g(中国医科大学动物实验中心提供),随机选择 10 只用于提取大鼠腹股沟 ADSCs(排除提取 ADSCs 后死亡的例数),并作为实验组;10 只作为对照组。PLGA 高分子神经修复套管(烟台隽秀生物科技有限公司)。

1.2 大鼠 ADSCs 悬液获取 采用陈军等^[9]方法提

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7040.2017.12.005

基金项目:辽宁省博士启动基金(20131142);辽宁省教育厅科学技术研究项目(LK201602)

作者单位:中国医科大学附属盛京医院(1.整形科;2.病理科),
辽宁 沈阳 110004

取 ADSCs 悬液, 首先无菌切取 SD 大鼠腹股沟区皮下脂肪组织, 以眼科剪于培养皿中充分剪碎脂肪组织, 获泥状颗粒约 10 ml, 加入 4 倍体积的 0.1% I 型胶原酶, 于 37℃ 恒温振荡箱内消化 60 min; 加入 2 倍体积的 PBS 缓冲液稀释洗涤, 1500 r/min 离心 5 min, 去上清, 再加入 PBS 液重悬细胞再次离心, 重复此步骤 2 次; 使用 70 μ m 滤网过滤后, 加入含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基重悬细胞, 并移入 50 ml 培养瓶中, 置于 37℃、体积分数为 5% CO₂ 培养箱中, 培养 24 h 后更换培养液, 弃去未贴壁的悬浮细胞; 传代培养, 收集 ADSCs 至 1×10^5 数量后, 溶入 0.1 ml 生理盐水, 配置成 1×10^6 /ml ADSCs 悬液备用(图 1)。

1.3 大鼠坐骨神经缺损模型制作 大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 0.3 ml/100 g 麻醉, 于大鼠左侧股后部正中切口钝性分离肌肉, 显露坐骨神经, 自梨状肌下缘 5.0 mm 处切断坐骨神经, 任其两端自然回缩并适当截取, 获得 5.0 mm 神经缺损。实验组及对照组均采用直径 1.5 mm 高分子神经套管桥接吻合, 实验组在封闭吻合前于套管内注射 10⁶/ml ADSCs 悬液 0.1 ml(图 2)。缝合肌肉覆盖移植物后, 缝合皮肤。饲养 12 周后, 应用神经电生理检测、实验侧与健侧腓肠肌湿重比率测定和组织学观察 3 种方法来评估术后神经再生情况。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表采用 *t* 检验比较两组之间差异, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经电生理检测 采用神经电生理检测复合动作电位的神经传导速度、阈强度和最大振幅。术后 12 周, 各组动物经腹腔注射 10% 水合氯醛 0.3 ml/100 g 麻醉, 显露坐骨神经和腓肠肌, 将记录电极刺入腓肠肌的中点内。倾斜刺入深度约为 10 mm, 刺激电极置于桥接体近端吻合口上 1.5 mm (A 点) 及远端吻合口下 1.5 mm (B 点) 处, 地线夹在大鼠足底部。刺激方式为正方波刺激, 波宽为 1 ms, 从 0 mV 开始增大刺激强度, 直至出现最大反应波幅为止。先测 B 点, 再测 A 点。记录激发动作电位, 标记两波形波峰间的位置并保存记录。整个测定过程中不断滴加 37℃ 生理盐水, 保持神经和电极的温度和湿度。实验组坐骨神经传导速度为 (12.39 ± 0.71) m/s, 对照组为 (8.13 ± 0.87) m/s, 见表 1。

2.2 腓肠肌湿重比率测定

各组大鼠神经电生理测定后, 完整取出健侧及患侧腓肠肌, 于精密天平上称出腓肠肌湿重, 然后

表 1 各组神经电生理检查结果

组别	传导速度(m/s)	潜伏期(ms)	波幅(mV)
对照组(n=7)	8.13 ± 0.87	1.82 ± 0.06	3.12 ± 0.19
实验组(n=8)	12.39 ± 0.71	1.37 ± 0.06	6.15 ± 0.47

计算出腓肠肌湿重比率。腓肠肌体积和重量损失越少, 说明其神经恢复越好。实验组腓肠肌湿重比率为 47.69 ± 0.24 , 对照组为 35.77 ± 0.73 。

$$\text{腓肠肌湿重比率} = \frac{\text{患侧腓肠肌湿重}}{\text{健侧腓肠肌湿重}} \times 100\%$$

2.3 组织学观察 延伸切取移植物和两端 1.5 mm 神经组织, 戊二醛固定后, 置于 4% 四氧化锇溶液中, 室温固定 2 h, 乙醇梯度脱水, 丙酮置换, 环氧树脂包埋。其中实验组 2 例、对照组 3 例因移植物感染及缝线脱位, 神经没有长入神经套管, 检测中予以排除。符合条件的取材截取远侧端神经套管内的神经进行横截面切片, 应用 1% 甲苯胺蓝溶液染色, 光镜观察。对照组有髓神经纤维数量较少, 呈散在分布; 实验组有髓神经纤维数量较多, 有神经束膜形成(图 3)。

3 讨论

3.1 神经套管材料选择及作用 组织工程技术在解决周围神经缺损方面进行了很多有意义的尝试, 包括应用 PLGA 制作立体支架种植种子细胞、异体动脉脱细胞化处理、石墨烯聚乳酸和胶原蛋白明胶复合体等。在套管材料的选择上, 考虑到应用产品化的材料更加方便, 以及前期有一定的研究基础, 因此本实验选择的 PLGA 是乙交酯和丙交酯按一定比例聚合而成的生物相容性良好的生物可降解材料。PLGA 广泛应用于医学领域, 用于组织工程移植, 具有很好的生物安全性。PLGA 在体内可通过酯键水解断链降解成为 CO₂ 和水, 其内壁的孔隙有利于 ADSCs 种子细胞黏附, 在局部微环境下向神经髓鞘的构成细胞施万细胞分化, 其如石墨烯聚乳酸和胶原蛋白明胶复合体等, 有望在将来成为新的 ADSCs 载体材料^[9-12]。

3.2 ADSCs 促进周围神经再生机制 ADSCs 是来源于脂肪组织的干细胞, 其提取方便, 具有广泛的应用前景。ADSCs 有较大的内质网和细胞核, 与骨髓来源干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 相比有更高的产出率。ADSCs 与 BMSCs 同属间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs), 均能够分化为中胚层来源的多种组织细胞。目前研究表明, ADSCs 能够促进周围神经损伤的修复; 体外实验证实, ADSCs 可以在体外诱导向施万细胞或其他神经细胞分化, 而且 ADSCs 可能通过旁分泌功能分泌多

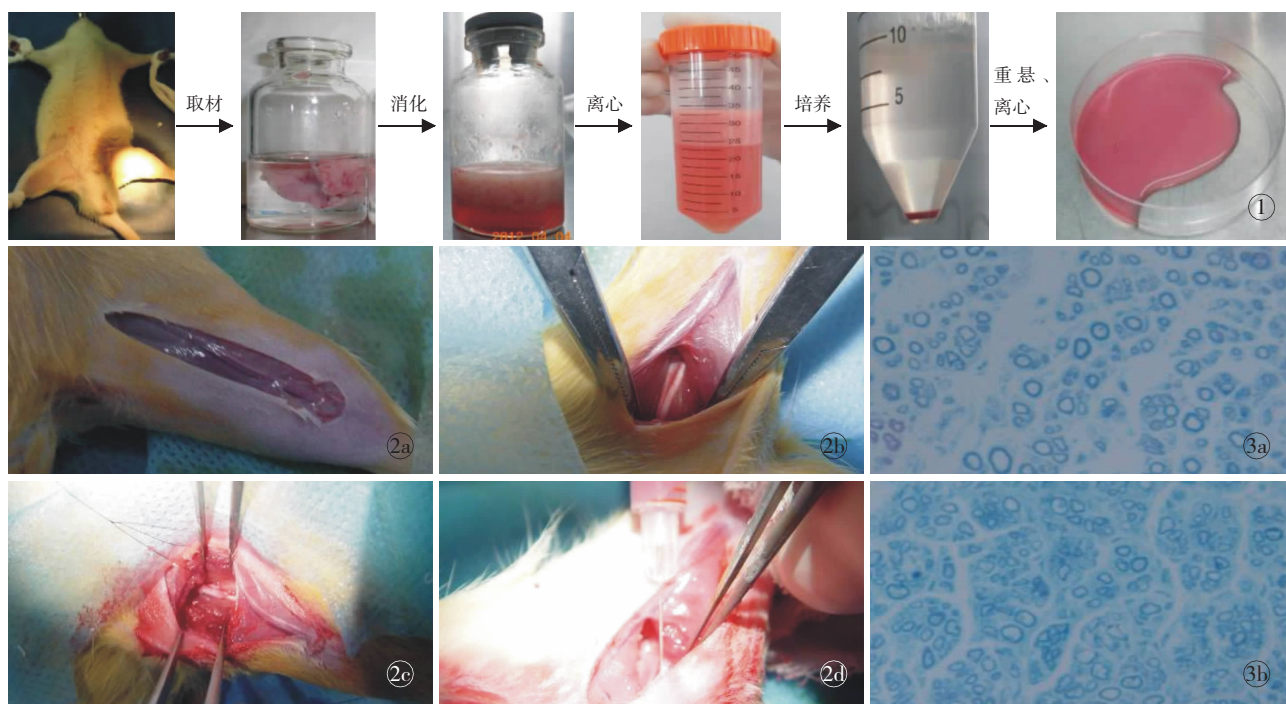


图1 大鼠腹股沟区脂肪 ADSCs 悬液的获取 图2 大鼠坐骨神经缺损修复模型 a. 皮肤切口 b. 显露大鼠坐骨神经 c. 神经套管桥接 d. ADSCs 注入套管 图3 大鼠坐骨神经再生甲苯胺蓝溶液染色($\times 200$) a. 对照组 b. 实验组

种细胞因子,促进神经轴突及髓鞘细胞的生长^[13-15]。

3.3 临床应用方式及前景 神经套管的修复方式对于周围神经缺损是很好的解决方案,不仅能够避免自体神经移植造成的二次损伤,而且随着医用高分子材料和干细胞组织工程技术的进展,将来很可能克服免疫排斥的问题,成为产业化的神经修复产品。本实验应用 PLGA 神经套管构建 ADSCs 的载体,初步表明其对于 SD 大鼠的坐骨神经修复有一定的促进作用,而且避免了腓肠肌的失神经萎缩。下一步的研究将在支架材料的选择以及结构负载方式上进一步研究,如设计具有导电性的高分子材料-可吸收金属复合体等,有望解决周围神经缺损的修复难题。

参考文献:

- [1] 徐立静,张澜,呼和,等. 周围神经损伤修复方式的研究进展[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2016,19(22):118-120.
- [2] 陈军,沈华. 神经导管内支架修复周围神经缺损的研究应用与进展[J]. 中国组织工程研究, 2017,21(8):1273-1279.
- [3] 阿不来提·阿不拉,楚古丽克·巴叶尔,艾尔肯·热合木吐拉,等. 多孔胶原神经导管联合向类雪旺细胞诱导的脂肪间充质干细胞修复大鼠坐骨神经缺损[J]. 中华手外科杂志, 2016, 32(5):382-384.
- [4] 赵斌,马信龙,孙晓雷,等. 改良脱细胞神经支架复合脂肪干细胞裸鼠皮下异位构建组织工程化周围神经的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2016,33(11):2446-2450.
- [5] 朱德志,王伯琨. 骨髓间充质干细胞与新型神经导管复合材料修复周围神经缺损[J]. 中国组织工程研究, 2015,(45): 7320-7324.
- [6] 张孙富,王斌. 合成可生物降解神经导管修复损伤周围神

- 经:生物相容性好[J]. 中国组织工程研究, 2015,(25):4054.
- [7] 黄婷婷,刘玉梅,张自强,等. 干细胞在周围神经损伤修复中的应用进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2016,32(10):945-948.
- [8] 李文媛,王莹,李智刚,等. KLF7 联合脂肪源性干细胞对小鼠坐骨神经缺损后轴突再生的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2016,33(7):580-583.
- [9] 陈军,王静,张兆锋,等. PLGA 神经导管联合 ADSCs 与自体神经组织修复大鼠坐骨神经缺损的实验研究[J]. 中国美容医学, 2017,26(3):60-66.
- [10] 郭巍,李岩,段会全,等. 白细胞介素-6 诱导 Wistar 大鼠雪旺细胞中周围神经髓鞘蛋白 22 表达的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2016,33(11):2599.
- [11] 刘天丹,张保朝,郝明亮. 胶原蛋白-明胶复合支架材料修复周围神经缺损[J]. 中国组织工程研究, 2017,21(2):286-290.
- [12] 吴飞,邓明,杨越,等. 复合脂肪源性干细胞的 VPA/PRGD 组织工程神经修复大鼠坐骨神经缺损的实验研究[J]. 中华显微外科杂志, 2017,40(4):353-357.
- [13] Reichenberger MA, Mueller W, Hartmann J, et al. ADSCs in a fibrin matrix enhance nerve regeneration after epineurial suturing in a rat model[J]. Microsurgery, 2016,36(6):491-500.
- [14] Abbas OL, Borman H, Uysal CA, et al. Adipose-derived stem cells enhance axonal regeneration through cross-facial nerve grafting in a rat model of facial paralysis[J]. Plast Reconstr Surg, 2016,138(2):387-396.
- [15] Hu F, Zhang X, Liu H, et al. Neuronally differentiated adipose-derived stem cells and aligned PHBV nanofiber nerve scaffolds promote sciatic nerve regeneration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017,489(2):171-178.

(收稿日期:2017-09-13)

本文引用格式:宋起滨,王哲,王宇令,等. 脂肪来源干细胞促进大鼠坐骨神经再生机制研究[J]. 中国美容整形外科杂志, 2017,28(12): 720-722.DOI:10.3969/j.issn.1673-7040.2017.12.005.