

脂肪源性干细胞诱导分化的施万样细胞中神经生长因子高表达 对大鼠背根神经节细胞突起生长的促进作用

朱清华^{1,2,3}, 袁 博^{3,4}, 王一伦¹, 任 森¹, 李晓飞¹, 王思邈¹, 甄子萱¹, 付秀美^{1,3}

(1. 承德医学院基础医学院人体解剖学教研室, 河北 承德 067000; 2. 承德医学院基础医学研究所, 河北 承德 067000; 3. 河北省神经损伤与修复重点实验室, 河北 承德 067000; 4. 承德护理职业学院病原生物与免疫教研室, 河北 承德 067000)

[摘要] **目的:** 探讨脂肪源性干细胞(ADSCs)诱导分化的施万样细胞(SCLCs)高表达的神经生长因子(NGF)对大鼠背根神经节(DRG)细胞突起生长的促进作用, 并阐明其作用机制。**方法:** 从SD大鼠附睾旁脂肪中提取ADSCs, 通过成骨诱导、成脂诱导和成软骨诱导鉴定ADSCs的多向分化能力。将ADSCs诱导分化为SCLCs, 并通过免疫荧光法和Western blotting法检测ADSCs和SCLCs中胶质纤维酸性蛋白(GFAP)及S100钙结合蛋白 β (S100 β)表达水平。分离培养大鼠DRG细胞, 采用免疫荧光法检测DRG细胞中Ⅲ类 β 微管蛋白(β Ⅲ-tubulin)以鉴定DRG细胞。将SCLCs与DRG细胞共培养(共培养组), DRG细胞单独培养作为DRG组。利用甲苯胺蓝染色在光学显微镜下观察并测量共培养组和DRG组细胞的突起长度。采用小干扰RNA(siRNA)转染技术敲低NGF, 质粒转染技术过表达NGF, 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测各组细胞中NGF mRNA表达水平, 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测各组细胞上清中NGF蛋白表达水平。将转染后的SCLCs与DRG细胞共培养, 分为对照组、siNC/vector组、NGF敲低组(si-NGF组)和NGF过表达组(oe-NGF组), 观察各组DRG细胞突起的长度。**结果:** 原代ADSCs接种24 h后基本贴壁并留有少量脂滴, 培养3 d后细胞多为短梭形、纺锤状或多角形, 呈旋涡状生长, 增长迅速, 传代后细胞形态均一, 呈长梭形, 鱼群状排列。ADSCs经成脂诱导培养基培养14 d后, 细胞形态由梭形变为扁圆形, 中间可见透亮的圆形脂滴形成, 经油红O染色可见细胞质中的脂滴被染成红色。ADSCs经成骨诱导培养基培养28 d后可见细胞呈沙粒样, 形态模糊, 出现钙化结节, 经茜素红染色后可见钙化结节被红染, 沉积在细胞外基质。ADSCs经成软骨诱导培养基立体培养28 d后可见小米粒大小的软骨球生成, 对软骨球进行冰冻切片, 阿利辛蓝染色后显微镜下可见软骨组织中的酸性黏多糖被染色成蓝色。在荧光显微镜下观察纯化后第3代ADSCs, 可见被异硫氰酸荧光素(FITC)标记为绿色荧光的CD29蛋白表达阳性、被Cy3标记为红色荧光CD44蛋白表达阳性。免疫荧光法, 可见GFAP被FITC标记为绿色荧光, S100 β 被Cy3标记为红色荧光。Western blotting法, 与ADSCs比较, SCLCs高表达S100 β 和GFAP蛋白。原代提取的DRG细胞常规培养6 h后开始贴壁, 培养3 d后细胞胞体发亮呈圆形, 胞体发出两条线状突起。荧光显微镜下观察, 细胞中神经元特异性标志物 β Ⅲ-tubulin呈阳性表达, 表明分离提取的细胞为DRG细胞。与ADSCs比较, SCLCs中NGF蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与DRG组比较, DRG细胞与SCLCs以1:2比例接种时, 共培养组DRG细胞突起长度最高($P<0.05$)。RT-qPCR法, 与si-NC组

[收稿日期] 2024-08-12 [录用日期] 2024-10-04

[基金项目] 河北省科技厅自然科学基金项目(H2021406056); 河北省高等学校科学研究计划项目(ZD2020178); 河北省神经损伤与修复重点实验室开放项目(NJKF-202403); 承德医学院人体解剖与组织胚胎学优势学科资助项目([2023] 22号)

[作者简介] 朱清华(1998—), 女, 河北省保定市人, 在读硕士研究生, 主要从事周围神经再生修复方面的研究。

[通信作者] 付秀美, 教授, 硕士研究生导师(E-mail: fuxiumei2012@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

比较, si-NGF-1、si-NGF-2和si-NGF-3组细胞中NGF mRNA表达水平明显降低 ($P<0.05$), 且siNGF-1敲低效率最好, 后续将采用si-NGF-1进行实验。ELISA法, 与si-NC组比较, si-NGF-1、si-NGF-2和si-NGF-3组细胞上清中NGF水平均降低 ($P<0.05$)。与vector组比较, oe-NGF组细胞中NGF mRNA表达水平升高 ($P<0.05$), 细胞上清中NGF水平升高 ($P<0.05$)。与对照组和siNC/vector组比较, siNGF组DRG细胞突起长度缩短 ($P<0.05$), oe-NGF组DRG细胞突起长度增加 ($P<0.01$)。
结论: ADSCs可以定向分化为SCLCs, 且分化后的细胞高表达NGF; 敲低或过表达NGF可影响DRG细胞突起的生长。

[关键词] 施万样细胞; 神经生长因子; 背根神经节细胞; 脂肪源性干细胞; 周围神经损伤

[中图分类号] R322.8 **[文献标志码]** A

Promotive effect of high expression of nerve growth factor in Schwann-like cells induced by adipose-derived stem cells on growth of rat dorsal root ganglion cell protrusion

ZHU Qinghua^{1,2,3}, YUAN Bo^{3,4}, WANG Yilun¹, REN Miao¹, LI Xiaofei¹, WANG Simiao¹,
ZHEN Zixuan¹, FU Xiumei^{1,3}

(1. Department of Human Anatomy, School of Basic Medical Sciences, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei, China; 2. Institute of Basic Medical Sciences, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei, China; 3. Hebei Provincial Key Laboratory of Nerve Injury and Repair, Chengde 067000, China; 4. Department of Pathogenic Biology and Immunology, Chengde College of Nursing, Chengde 067000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the promotive effect of nerve growth factor (NGF), which is highly expressed in the adipose-derived stem cell (ADSC)-induced Schwann-like cells (SCLCs), on the growth of dorsal root ganglion (DRG) cell processes in the rats, and to clarify its mechanism. **Methods:** The ADSCs were extracted from the epididymal adipose tissue of the SD rats, and their multidirectional differentiation potential was identified through osteogenic, adipogenic, and chondrogenic induction. The ADSCs were induced to differentiate into the SCLCs, and the expression levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100 calcium-binding protein β (S100 β) protein in the ADSCs and SCLCs were detected by immunofluorescence staining and Western blotting methods. The DRG cells were isolated and cultured, and immunofluorescence staining was used to detect the β III-tubulin expression in the DRG cells for identification. The SCLCs were co-cultured with the DRG cells (co-culture group), the single-culture DRG cells were regared as DRG group and toluidine blue staining was used to observe and measure the length of DRG cell processes under the optical microscope in co-culture group and DRG group. Small interfering RNA (siRNA) transfection was used to knock down NGF, and plasmid transfection was used to over-express NGF. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the NGF mRNA expression levels in the cells in various groups; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the NGF protein levels in the cell supernatants. The transfected SCLCs were co-cultured with DRG cells and divided into control group, siNC/vector group, NGF knockdown group (si-NGF group), and NGF over-expression group (oe-NGF group). The lengths of DRG cell processes in various groups were observed. **Results:** The primary ADSCs adhered within 24 h after seeding, with a small number of lipid droplets remaining. After 3 d of culture, the cells were mostly short spindle-shaped, fusiform, or polygonal, growing rapidly in a vortex pattern. After passaging, the cells exhibited a uniform morphology, appearing as long spindles arranged in a fish-school pattern. After

14 d of adipogenic induction, the cell morphology changed from spindle-shaped to flat-round, with translucent lipid droplets forming in the cytoplasm, which were stained red by Oil Red O. After 28 d of osteogenic induction, the cells appeared sand-like with blurred morphology, and calcified nodules were observed, which were stained red by Alizarin Red and deposited in the extracellular matrix. After 28 d of chondrogenic induction in a 3D culture system, millet-sized chondrogenic spheres formed. Frozen sections of the spheres were stained with Alcian Blue, and acidic mucopolysaccharides in the cartilage tissue were stained blue under the microscope. Under the fluorescence microscope, the third-passage purified ADSCs showed positive expression of CD29 [fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled green fluorescence] and CD44 (Cy3-labeled red fluorescence). The immunofluorescence staining results showed that GFAP was labeled with FITC (green fluorescence), and S100 β was labeled with Cy3 (red fluorescence). The Western blotting results showed that compared with ADSCs, the expression levels of S100 β and GFAP proteins in the SCLCs were increased ($P<0.05$). The primary DRG cells began to adhere 6 h after conventional culture, and after 3 d, the cell bodies appeared round and bright, with two linear processes extending from them. Under fluorescence microscope, the cells positively expressed the neuron-specific marker β III-tubulin, confirming that the isolated cells were DRG cells. Compared with the ADSCs, the NGF protein expression level in the SCLCs was increased ($P<0.05$). Compared with DRG group, the length of DRG cell processes in co-culture group was the highest when DRG cells and SCLCs were co-cultured at a 1:2 ratio ($P<0.05$). The RT-qPCR results showed that compared with si-NC group, the expression levels of NGF mRNA in the cell supernatant in si-NGF-1, si-NGF-2, and si-NGF-3 groups were significantly decreased ($P<0.05$), with si-NGF-1 showing the highest knockdown efficiency, which was selected for subsequent experiments. The ELISA results showed that compared with si-NC group, the NGF levels in the cell supernatant of si-NGF-1, si-NGF-2, and si-NGF-3 groups were decreased ($P<0.05$). Compared with Vector group, the expression level of NGF mRNA and NGF protein level in the supernatant in oe-NGF group were increased ($P<0.05$). Compared with control group and siNC/vector group, the length of DRG cell processes in si-NGF group was decreased ($P<0.05$), while the length of DRG cell processes in oe-NGF group was increased ($P<0.05$). **Conclusion:** ADSCs can be directionally differentiated into SCLCs, and the differentiated cells highly express NGF. Knockdown or overexpression of NGF can affect the growth of DRG cell processes.

KEYWORDS Schwann-like cells; Nerve growth factor; Dorsal root ganglion cells; Adipose-derived stem cells; Peripheral nerve injury

周围神经损伤(peripheral nerve injury, PNI)因机械性创伤和医源性干预等多种诱因导致正常神经结构及功能的障碍或缺失,从而引起运动和(或)感觉功能的部分或完全丧失,并伴发神经性疼痛,严重影响患者的生活质量^[1-4]。目前PNI的治疗手段包括自体神经移植、组织工程疗法和神经导管疗法等^[5]。自体神经移植作为治疗PNI的金标准,存在供体来源有限、需二次手术和易形成神经瘤等缺点^[6]。组织工程疗法是将支架材料、种子细胞和生长因子三者结合,是目前研究的热点之一,组织工程疗法解决了自体神经移植供体来源有限等问题,但对于神经营养因子的选择、固定操作和缓释技术、释放动力学及其与再生的关系还有待进一步研究^[7]。神经导管疗法可以消除受体与供体之间

存在的各种差异,成为自体神经移植的一种替代方式,已被临床应用,但是不可降解的导管易形成瘢痕,限制了其临床应用^[5, 8]。因此亟需一种快速有效的方法来修复受损的周围神经。

施万细胞(Schwann cells, SCs)作为周围神经系统的一种主要的神经胶质细胞,在神经冲动传导、轴突发育和维持以及神经损伤后的再生等过程中均发挥了重要作用^[9-10]。当周围神经的纤维或神经元胞体受到刺激性损伤时,远侧断端会发生一系列的组织学退行性改变,表现为轴突和髓鞘的碎裂及溶解,称为溃变^[11-13]。受损的神经元轴突生长,并与溃变前的组织或神经元重新形成突触结构,恢复正常生理功能,完成再生及神经的再支配。在轴突再生过程中,SCs通过多种方式支持轴

突的发育、稳态和修复, 主要包括释放神经营养因子和细胞因子、促进髓鞘生成、分泌细胞外囊泡以支持细胞-细胞或细胞-轴突间的信号传导^[9]。但SCs体外分离、培养和增殖困难, 易被快速增殖的成纤维细胞污染, 无法在短时间内获得大量纯化的SCs^[14-15]。而脂肪源性干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)体外获取培养简单易行、增殖迅速、表型稳定, 且具有多向分化潜能^[16]。本课题组既往研究^[17-18]显示: ADSCs可以诱导分化为施万样细胞(Schwan-like cells, SCLCs), 这在一定程度上解决了SCs体外分离培养和增殖困难等问题, 但关于SCLCs促进受损周围神经的再生修复机制有待进一步探讨。本研究采用酶消化从大鼠附睾旁脂肪中提取ADSCs并将其定向诱导分化为SCLCs, 将SCLCs与背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)细胞共培养, 采用甲苯胺蓝染色法观察SCLCs对DRG细胞突起的作用, 利用小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)和质粒转染技术敲低及过表达神经生长因子(nerve growth factor, NGF), 观察转染后的SCLCs对DRG细胞突起的影响, 为SCLCs应用于周围神经再生修复提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 10只4周龄SPF级健康成年SD雄性大鼠, 体质量130~150 g, 用于分离培养ADSCs; 出生3~5 d的新生SD乳鼠, 用于分离培养DRG细胞, 实验动物购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(辽)2020-0001。I型胶原酶购自美国Invitrogen公司, 杜尔贝科改良Eagle培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)/F-12营养混合物(nutrien mixture F-12, F12)细胞培养基购自美国Gibco公司, 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自武汉普诺赛公司, β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol, β -ME)和全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)购自美国Sigma公司, 佛司可林(forskolin, FSK)购自美国Alexis公司, 重组人神经调节蛋白 β 1(recombinant human neuregulin beta-1, rhNRG- β 1)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和血小板源性生长因子AA(platelet-derived growth factor-AA, PDGF-AA)购自美国PeproTech公司, 兔抗分化簇44(cluster of

differentiation 44, CD44)单克隆抗体、兔抗分化簇29(cluster of differentiation 29, CD29)单克隆抗体、兔抗胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic, GFAP)单克隆抗体和兔抗S100 β 抗体购自美国Abclonal公司, 大鼠脂肪间充质干细胞成脂、成骨和成软骨诱导分化试剂盒购自美国赛业公司, LipofectamineTMiMAX和LipofectamineTM3000购自美国赛默飞世尔科技有限公司, 大鼠NGF酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。BX43荧光显微镜和图像采集系统购自日本Olympus公司, CO₂细胞培养箱购自美国Thermo Fisher Scientific公司, 荧光定量聚合酶链反应监测系统购自杭州博日科技股份有限公司, Tanon全自动发光仪购自上海天能生命科学有限公司。

1.2 ADSCs分离培养、鉴定及多向分化能力检测

参照文献[18], 提取ADSCs。待第3代ADSCs融合度接近70%、100%和90%时分别进行成骨、成脂及成软骨诱导。成骨诱导4周后行茜素红染色, 成脂诱导14 d后行油红O染色, 成软骨诱导在形成1.5~2.0 mm的软骨球后行冰冻切片和阿利辛蓝染色, 观察ADSCs的形态表现和多向分化能力。

1.3 ADSCs定向诱导分化为SCLCs 参照文献[18], 取第3代ADSCs在含有1 mmol·L⁻¹ β -ME的DMEM/F12培养基中培养24 h, 然后更换为含10%FBS和35 μ g·L⁻¹ ATRA的DMEM/F12培养基中培养72 h, 之后更换为诱导培养基(含10%FBS, 5 μ mol·L⁻¹ FSK、5 μ g·L⁻¹ PDGF-AA、10 μ g·L⁻¹ bFGF和200 μ g·L⁻¹ rhNRG- β 1的DMEM/F12培养基)诱导14 d。

1.4 DRG细胞的分离培养及鉴定 参照文献[18]取3~5 d的SD乳鼠DRG并消化为DRG细胞, 接种于多聚赖氨酸包被的培养皿中, 倒置显微镜下观察细胞形态表现。

1.5 免疫荧光法检测3种细胞中相关蛋白表达情况 取生长状态良好的细胞以每孔 1×10^4 个的密度接种于铺有盖玻片的24孔细胞培养板中, 培养2 d后采用4%多聚甲醛固定, 磷酸盐缓冲液(phosphated buffer saline, PBS)浸洗后加入0.1%的Triton-X100透膜20 min, 10%山羊血清封闭液封闭2 h, 加入对应稀释的一抗CD29(1:300)、CD44(1:300)、Ⅲ类 β 微管蛋白(β III-tubulin)(1:500)、GFAP(1:200)和S100 β (1:200)4℃孵

育过夜;次日复温30 min, PBS缓冲液洗涤3次, 分别加入异硫氰酸荧光素(Fluorescein 5-isothiocyanate, FITC) (1:500) 和菁染料3 (cyanine 3, CY3) (1:500) 标记的荧光二抗孵育1 h, DAPI染核后用抗荧光淬灭剂封片, 置于荧光显微镜下观察并拍照。

1.6 甲苯胺蓝染色检测共培养和单独培养DRG细胞的突起长度 单独DRG细胞培养作为DRG组, 将DRG与SCLCs细胞以1:1、1:2、1:4、2:1和4:1的比例接种于6孔细胞培养板中作为不同比例共培养组, 观察DRG细胞突起长度的变化以确定最佳比例。将转染后的SCLCs与DRG细胞以最佳比例共培养, 通过甲苯胺蓝染色在光学显微镜下观察各组DRG细胞突起的变化。每组随机选取3个视野, 每个视野中随机选取5个DRG细胞测量其突起的长度。

1.7 细胞转染制备NGF干扰和过表达SCLCs

取SCLCs消化后接种于培养皿中, 加入无双抗的培养基培养至细胞融合度为60%~90%时, 利用脂质体转染试剂LipofectamineTMiMAX和LipofectamineTM3000分别转染NGF的siRNA及质粒, 并设立相应的阴性对照组。

1.8 SCLCs与DRG共培养体系的分组及其处理

将转染NGF后SCLCs与DRG按照2:1的比例建立共培养体系。实验分为对照组(SCLCs+DRG细胞)、si-NC/vector组(转染空的siRNA/质粒的SCLCs+DRG细胞)、siNGF组(转染si-NGF的SCLCs+DRG细胞)和oe-NGF组(转染NGF质粒的SCLCs+DRG细胞), 培养48 h后收集各组细胞, 测量突起长度。

1.9 ELISA法检测各组细胞上清中NGF水平 将收集的细胞上清样品和标准品按照每孔100 μ L加入相应孔中, 37 $^{\circ}$ C孵育90 min后洗板。加入生物素化抗体继续孵育60 min。洗板后加入酶结合物孵育30 min, 加入显色液孵育15 min后加入终止液, 混匀后立即采用酶标仪于450 nm最大吸收波长和630 nm参考波长处检测各组吸光度(A)值, 绘制标准曲线, 计算细胞上清中NGF水平, 检测各组A值, 绘制标准曲线, 计算细胞上清中NGF水平。

1.10 Western blotting法检测各组细胞中GFAP、S100 β 和NGF蛋白表达水平 将待处理的细胞采用PBS缓冲液洗涤2次, 加入含有蛋白酶抑制剂的裂解液于冰上裂解50 min, 采用细胞刮收集细胞并

以4 $^{\circ}$ C、12 000 $r\cdot\min^{-1}$ 离心20 min, 吸取上清液加入5 $\times$ loading buffer煮沸并保存于-20 $^{\circ}$ C, 用于后续实验。加样品于12% SDS-PAGE进行电泳及转膜。取出PVDF膜快速封闭10 min。加入一抗GFAP (1:1 000)、S100 β (1:1 000) 和NGF (1:1 000) 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 次日于摇床上复温30 min, 含Tween 20的Tris缓冲盐溶液(Tris-buffered saline with Tween 20)溶液漂洗3次, 每次10 min。加入抗兔IgG-HRP (1:10 000), 摇床上孵育50 min, TBST溶液漂洗3次, 每次5 min。采用ECL发光液显示阳性条带。采用Image J软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.11 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)法检测各组SCLCs中NGF mRNA表达水平 通过RNA提取试剂盒提取转染后的细胞总RNA, 经超微量分光光度计检测RNA的浓度和纯度后, 以RNA为模板通过逆转录试剂盒以50 $^{\circ}$ C、15 min, 80 $^{\circ}$ C、5 s在梯度PCR仪中逆转录为cDNA, 将cDNA进行扩增, 以GAPDH为内参对照, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各目的基因mRNA表达水平。引物序列: GAPDH上游引物, 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3', GAPDH下游引物, 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3'; NGF上游引物, 5'-CGCTCTCCTTCACAGAGT-TTT-3', NGF下游引物, 5'-CTGCCTGTACGC-CGATCAAA-3'。

1.12 统计学分析 采用GraphPad Prism 8.0统计软件进行统计学分析。不同比例共培养各组DRG细胞突起长度, 各组SCLCs上清中NGF水平, 各组细胞中GFAP、S100 β 和NGF蛋白表达水平, 各组SCLCs中NGF mRNA表达水平, 转染后各组共培养DRG细胞突起长度均符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用SNK- q 检验; ADSCs和SCLCs组中NGF蛋白表达水平比较采用两独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

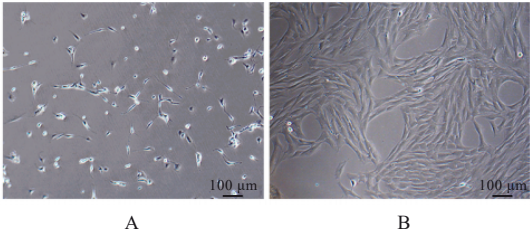
2 结果

2.1 ADSCs的形态表现和多向分化能力 原代ADSCs接种24 h后基本贴壁并留有少量脂滴, 培养3 d后细胞多为短梭形、纺锤状或多角形, 呈漩涡状生长, 增长迅速, 传代后细胞形态均一, 呈长梭形, 鱼群状排列。见图1。ADSCs经成脂诱导培

培养基培养 14 d 后, 细胞形态由梭形变为扁圆形, 中间可见透亮的圆形脂滴形成, 经油红 O 染色可见胞质中的脂滴被染成红色。ADSCs 经成骨诱导培养基培养 28 d 后可见细胞呈沙粒样, 形态模糊, 出现钙化结节, 经茜素红染色后可见钙化结节被红染, 沉积在细胞外基质。ADSCs 经成软骨诱导培养基立体培养 28 d 后可见小米粒大小的软骨球生成, 对软骨球进行冰冻切片, 阿利辛蓝染色后显微镜下可见软骨组织中的酸性黏多糖被染色成蓝色。见图 2。

2.2 ADSCs 中 CD29 和 CD44 蛋白表达情况 在荧光显微镜下观察纯化后第 3 代 ADSCs, 可见被 FITC 标记为绿色荧光的 CD29 蛋白表达阳性、被 Cy3 标记为红色荧光 CD44 蛋白表达阳性。见图 3。

2.3 SCLCs 中 GFAP 和 S100 β 蛋白表达水平 免

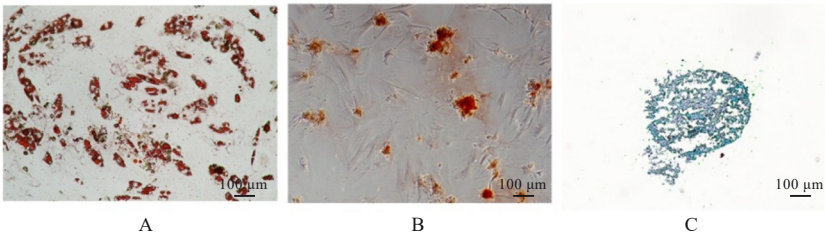


A: Primary ADSCs after cultured for 24 h; B: Primary ADSCs after cultured for 3 rd passages.

图 1 培养不同时间 ADSCs 形态表现

Fig. 1 Morphology of ADSCs after cultured for different time

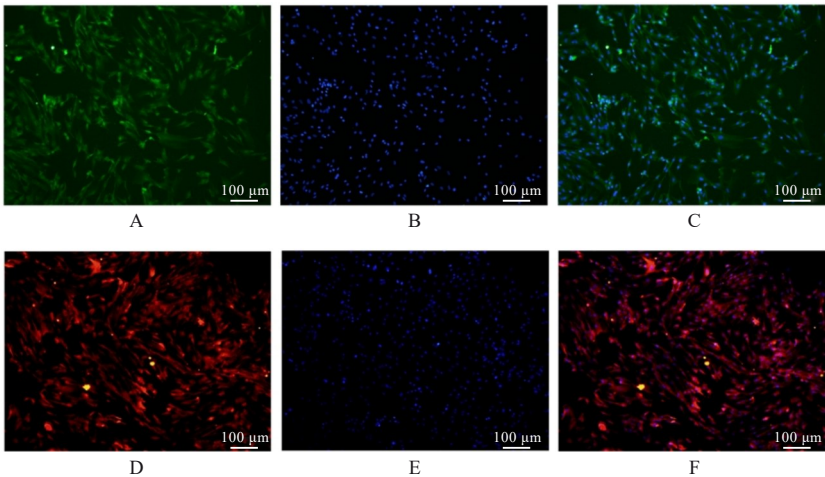
疫荧光染色可见 GFAP 蛋白被 FITC 标记为绿色荧光, S100 β 蛋白被 Cy3 标记为红色荧光。Western blotting 法检测结果显示: 与 ADSCs 比较, SCLCs 高表达 GFAP 和 S100 β 蛋白。见图 4 和 5。



A: Oil red O staining; B: Alizarin red staining; C: Alisin blue staining.

图 2 ADSCs 多向分化形态表现

Fig. 2 Morphology of multidirectional differentiation of ADSCs



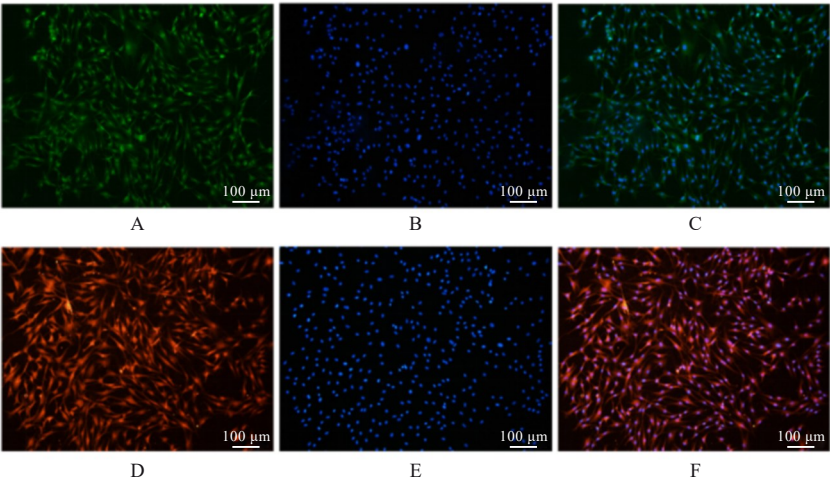
A—C: CD29; D—F: CD44; B, E: DAPI; C, F: Merge.

图 3 免疫荧光法检测 ADSCs 中 CD29 和 CD44 蛋白表达

Fig. 3 Expressions of CD29 and CD44 proteins in ADSCs detected by immunofluorescence assay

2.4 DRG 细胞形态表现和细胞中 β III-tubulin 蛋白表达情况 原代提取的 DRG 细胞常规培养 6 h 后开

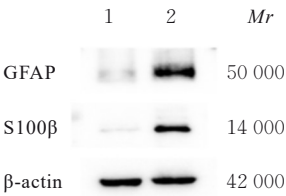
始贴壁, 培养 3 d 后细胞胞体发亮呈圆形, 胞体发出两条线状突起。荧光显微镜下观察, 结果显示:



A—C: GFAP; D—F: S100β; B,E: DAPI; C,F: Merge.

图 4 免疫荧光法检测 SCLCs 中 S100β 和 GFAP 蛋白表达

Fig. 4 Expressions of S100β and GFAP proteins in SCLCs detected by immunofluorescence staining



Lane 1: ADSCs; Lane 2: SCLCs.

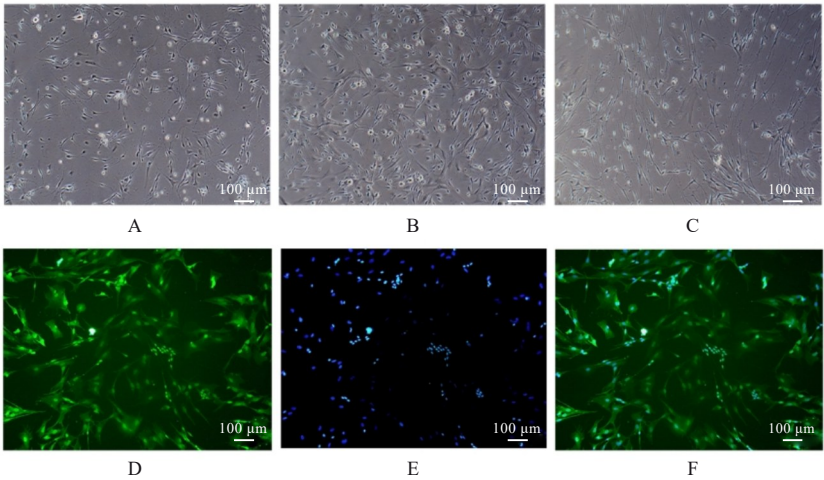
图 5 Western blotting 法检测 SCLCs 中 GFAP 和 S100β 蛋白表达电泳图

Fig. 5 Electrophoregram of expressions of GFAP and S100β proteins in SCLCs detected by Western blotting method

细胞阳性表达神经元特异性标志物 βⅢ-tubulin，表明分离提取的细胞为 DRG 细胞。见图 6。

2.5 ADSCs 和 SCLCs 中 NGF 蛋白表达水平 与 ADSCs 比较，SCLCs 中 NGF 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$)。见图 7。

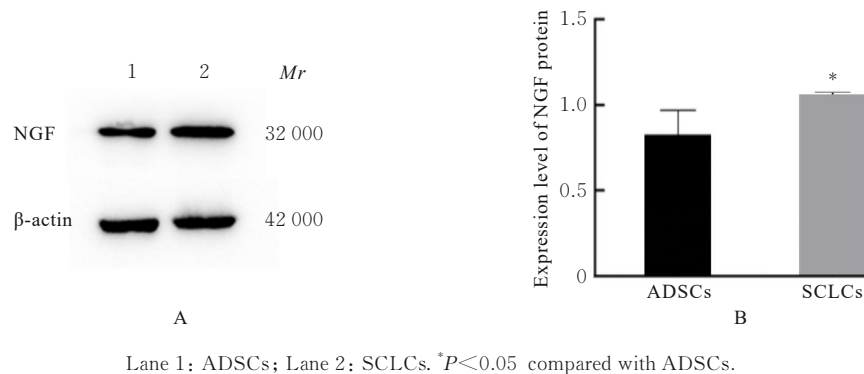
2.6 DRG 与 SCLCs 细胞共培养体系中 DRG 细胞突起长度 与 DRG 组比较，DRG 细胞与 SCLCs 以 1 : 2 的比例接种时，DRG 与 SCLCs 细胞共培养体系中 DRG 细胞突起长度最高 ($P<0.05$)。见图 8。



A: Primary DRG cells after culture for 24 h; B: Primary DRG cells after culture for 48 h; C: Primary DRG cells after culture for 8 d; D: βⅢ-tubulin; E: DAPI; F: Merge.

图 6 DRG 细胞形态表现和细胞中 βⅢ-tubulin 蛋白表达

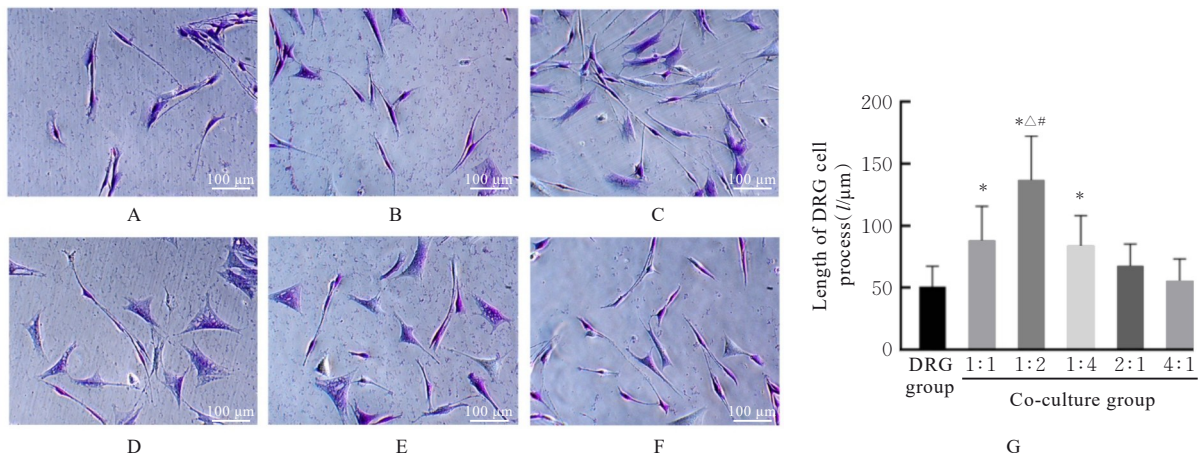
Fig. 6 Morphology of DRG cells and expression of βⅢ-tubulin protein in DRG cells



Lane 1: ADSCs; Lane 2: SCLCs. * $P < 0.05$ compared with ADSCs.

图7 Western blotting法检测SCLCs中NGF蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 7 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expression of NGF protein in SCLCs detected by Western blotting method



A—F: Toluidine blue staining; A: DRG group; B: 1:1 group; C: 1:2 group; D: 1:4 group; E: 2:1 group; F: 4:1 group; G: Histogram (* $P < 0.01$ compared with DRG group; $\triangle P < 0.01$ compared with 1:1 group; $\# P < 0.01$ compared with 1:4 group).

图8 各组DRG细胞突起甲苯胺蓝染色情况和DRG细胞突起长度

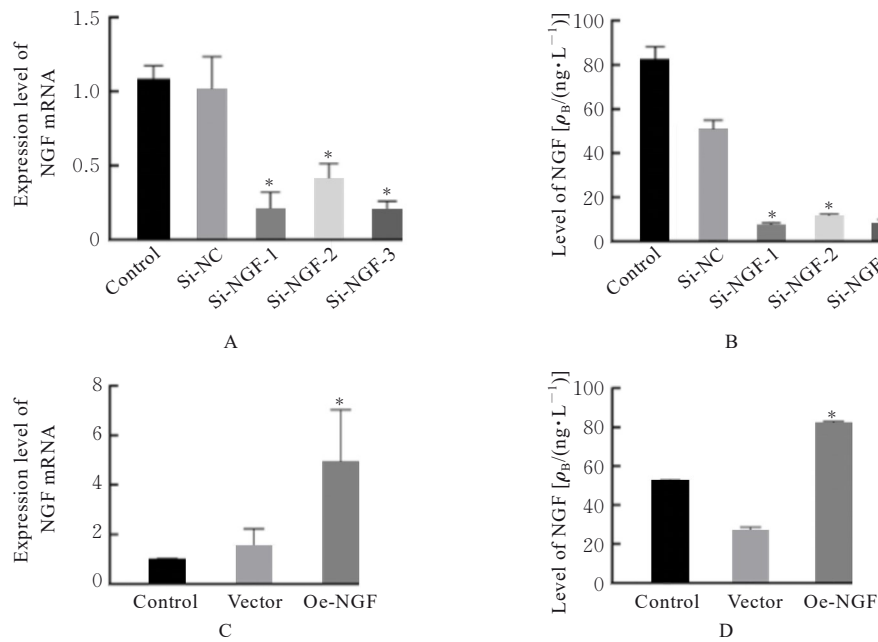
Fig. 8 Toluidine blue staining of DRG cell processes and length of DRG cell processes in various groups

2.7 各组SCLCs中NGF mRNA表达水平和细胞上清中NGF水平 RT-qPCR法检测结果显示: 与si-NC组比较, si-NGF-1、si-NGF-2和si-NGF-3组细胞中NGF mRNA表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 且si-NGF-1敲低效率最好, 以si-NGF-1进行后续实验。ELISA法检测各组细胞上清中NGF水平, 结果显示: 与si-NC组比较, si-NGF-1、si-NGF-2和si-NGF-3组细胞上清中NGF水平均降低 ($P < 0.05$)。与vector组比较, oe-NGF组细胞中NGF mRNA表达水平升高 ($P < 0.05$), 细胞上清中NGF水平升高 ($P < 0.05$)。如图9。

2.8 各组SCLCs与DRG共培养体系中DRG细胞突起长度 与对照组和si-NC/vector组比较, siNGF组DRG细胞突起长度缩短 ($P < 0.05$), oe-NGF组DRG细胞突起长度增加 ($P < 0.01$)。见图10。

3 讨论

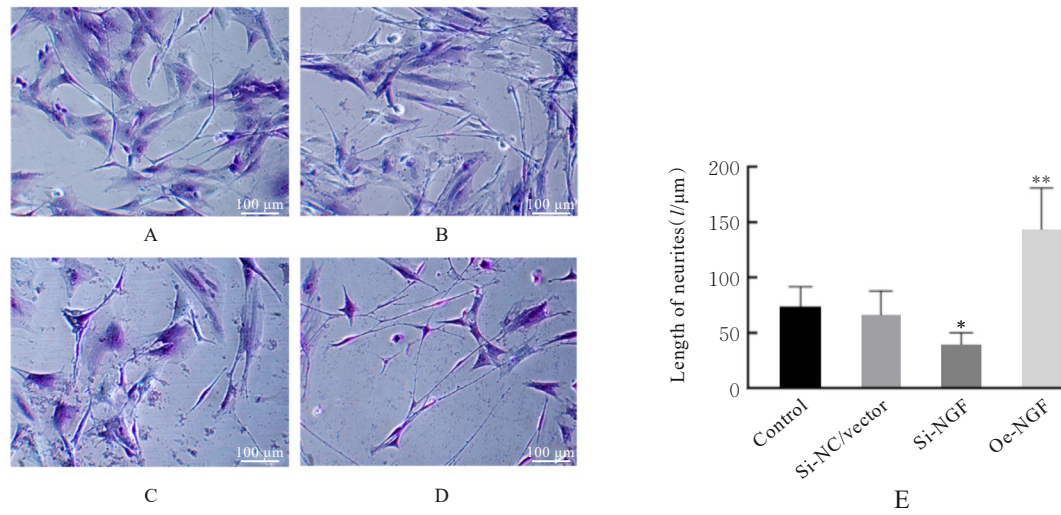
PNI是一种常见的神经障碍疾病, 近年来其发病率逐年升高, PNI患者约占创伤患者的2.8%^[19]。研究^[20-21]显示: 干细胞可通过分泌神经营养因子、改善再生微环境和分化为特定的神经细胞等功能促进周围神经的再生修复。ADSCs因其来源广泛、提取简单和扩增能力强, 现已成为神经再生的理想种子细胞。研究^[22]显示: ADSCs可通过分泌NGF和脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 缓解大鼠坐骨神经纤维轴突肿胀及空泡程度, 恢复大鼠运动功能, 促进周围神经的修复。CASTELNOVO等^[23]发现: ADSCs可诱导分化为SCLCs, 并且通过上调孕激素膜受体 α (membrane progesterone receptor alpha, mPR α) 促进BDNF的表达, 进而促进SCLCs的



A: Knockdown efficiency(* $P<0.01$ compared with si-NC group); B: NGF level after knockdown(* $P<0.01$ compared with si-NC group); C: Over-expression efficiency (* $P<0.01$ compared with vector group); D: NGF level after over-expression(* $P<0.01$ compared with vector group).

图9 各组 SCLCs 中 NGF mRNA 表达水平和细胞上清中 NGF 水平

Fig. 9 Expression levels of NGF mRNA in SCLCs and levels of NGF in cell supernatants in various groups



A: Control group; B: Si-NC/vector group; C: Si-NGF group; D: Oe-NGF group; E: Histogram. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with si-NC/vector group.

图10 转染 NGF 后各组 DRG 细胞突起长度

Fig. 10 Neurites lengths of DRG cells in various groups after transfected with NGF

迁移和分化,从而激活磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 通路,有助于周围神经再生。本研究从大鼠附睾旁脂肪组织中分离 ADSCs,通过其定向分化成脂细胞、成骨细胞和成软骨细胞以及免疫荧光标记其表面抗原 CD29 和 CD44,鉴定提取的

细胞为 ADSCs。采用经典的诱导方法^[24]将其向 SCLCs 诱导分化,通过免疫荧光法和 Western blotting 法测定诱导分化后高表达 SCs 标志物 GFAP 和 S100 β 蛋白,表明诱导成功。

DRG 细胞是体外研究神经突起的理想细胞^[25]。管延军等^[26]将电纺纤维与 SCs 外基质结合通过免

疫荧光法测量 DRG 细胞轴突长度和 SCs 迁移距离, 发现复合材料可以促进 DRG 细胞轴突的生长和 SCs 的迁移速度。张娜等^[27]发现: 微小 RNA-205-5p (microRNA-205-5p, miR-205-5p) 直接靶向泛素样含 PHD 和环指域蛋白 1 (ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1, UHRF1), 过表达 DRG 细胞中的 miR-205-5p 会抑制 UHRF1 的表达, 抑制轴突的再生, 而敲低 DRG 细胞中 miR-205-5p 会促进 DRG 轴突生长。本研究从大鼠脊神经节中提取出 DRG 细胞, 并采用免疫荧光法检测神经元特异性标志物 β III-tubulin, 表明所提取的细胞为 DRG 细胞。传统的单一细胞培养无法满足细胞与细胞之间信号交流, 共培养体系可以模拟体内微环境, 用于研究 2 种或 2 种以上细胞的相互作用及信号交流^[28]。本研究将诱导成功的 SCLCs 与 DRG 细胞共培养以模拟神经微环境, 观察到共培养组细胞的突起长度较 DRG 组明显增加, 表明共培养可以促进 DRG 细胞的突起生长, 且 DRG 与 SCLCs 细胞最适宜的比例为 1:2。

NGF 作为第一个被发现的神经营养因子广受研究者关注, 其在神经发育、功能和周围神经修复过程中发挥重要作用, 刺激神经元存活并促进轴突生长和延长^[29-31]。陈颖秀等^[32]研究表明: 原花青素可以通过提高 NGF 的表达促进 DRG 神经元突起生长。葛根素等中药材和电针均可通过增加 NGF 促进神经元修复及轴突生长, 对周围神经损伤起到修复作用^[33-34]。本研究结果显示: SCLCs 中高表达 NGF 蛋白, 结合共培养实验发现共培养组 DRG 细胞的突起长度较单独培养组明显增加, 推测 SCLCs 中高表达的 NGF 可能促进 DRG 细胞突起的生长。SANG 等^[35]发现: 姜黄素可以促进分泌 NGF, 激活 PI3K/Akt 信号通路, 从而发挥保护神经元的作用; 而敲低 NGF 后, 大鼠体内神经元和体外大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞凋亡数量增加, 姜黄素的抗凋亡作用减弱。燕燕等^[36]研究显示: 过表达 NGF 促进脐血干细胞向神经谱系分化, 移植到帕金森病大鼠中大鼠旋转圈数以及黑质区酪氨酸羟化酶阳性细胞数减少, 改善了帕金森大鼠的症状。郑良良等^[37]发现: 采用过表达 NGF 的脐带血间充质干细胞外泌体治疗大鼠坐骨神经慢性压迫损伤, 可以减少脊髓组织细胞凋亡, 降低炎症反应相关蛋白的表达, 促进修复坐骨神经损伤。为了进一步验证 SCLCs 促进 DRG 细胞突起的生长作用是否与 NGF

有关, 本课题组采用了基因转染技术将携带 NGF 的 si-RNA 和质粒转染至 SCLCs 中, 并将转染后的 DRG 与 SCLCs 细胞共培养, 结果显示: 过表达 NGF 可以进一步促进突起的生长, 而敲低 NGF 后突起的生长受到抑制, 因此本研究初步揭示了 SCLCs 促进 DRG 突起生长的作用与其高表达的 NGF 有关。后续实验将进一步分析 NGF 促进 DRG 细胞突起生长信号转导机制, 以期周围神经损伤的再生修复提供新的思路。

综上所述, 在多因子的联合作用下 ADSCs 可成功诱导分化为 SCLCs, 且 SCLCs 可通过高表达 NGF 促进 DRG 细胞突起的生长, 表明 SCLCs 促进神经再生修复的机制可能源于其分泌的 NGF。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

朱清华参与论文选题、实验设计和论文撰写, 袁博、王一伦、任森、李晓飞、王思邈和甄子萱参与实验数据获取及统计学分析, 付秀美参与课题指导和论文审校。

[参考文献]

- [1] MODRAK M, HASSAN TALUKDER M A, GURGENASHVILI K, et al. Peripheral nerve injury and myelination: potential therapeutic strategies[J]. J Neurosci Res, 2020, 98(5): 780-795.
- [2] DONG S X, FENG S J, CHEN Y Z, et al. Nerve suture combined with ADSCs injection under real-time and dynamic NIR-II fluorescence imaging in peripheral nerve regeneration *in vivo* [J]. Front Chem, 2021, 9: 676928.
- [3] ZHANG S W, HUANG M L, ZHI J C, et al. Research hotspots and trends of peripheral nerve injuries based on web of science from 2017 to 2021: a bibliometric analysis[J]. Front Neurol, 2022, 13: 872261.
- [4] TUSNIM J, KUTUZOV P, GRASMAN J M. *In vitro* models for peripheral nerve regeneration [J]. Adv Healthc Mater, 2024, 13(30): e2401605.
- [5] ZOU X F, ZHANG B Z, QIAN W W, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells in treatment of peripheral nerve injury [J]. World J Stem Cells, 2024, 16(8): 799-810.
- [6] MANKAVI F, IBRAHIM R, WANG H J. Advances in biomimetic nerve guidance conduits for peripheral nerve regeneration[J]. Nanomaterials (Basel), 2023, 13(18): 2528.

- [7] SUN Q N, MOHD ISMAIL Z I, PATAR M N AAB, et al. The limelight of adipose-derived stem cells in the landscape of neural tissue engineering for peripheral nerve injury[J]. *Tissue Cell*, 2024, 91: 102556.
- [8] KONOFAOS P, HALEN J PVER. Nerve repair by means of tubulization: past, present, future[J]. *J Reconstr Microsurg*, 2013, 29(3): 149-164.
- [9] OLIVEIRA J T, YANICK C, WEIN N, et al. Neuron-Schwann cell interactions in peripheral nervous system homeostasis, disease, and preclinical treatment [J]. *Front Cell Neurosci*, 2023, 17: 1248922.
- [10] NAM Y H, PARK S, YUM Y, et al. Preclinical efficacy of peripheral nerve regeneration by schwann cell-like cells differentiated from human tonsil-derived mesenchymal stem cells in C22 mice[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(12): 3334.
- [11] ELBERG G, LIRAZ-ZALTSMAN S, REICHERT F, et al. Deletion of SIRP α (signal regulatory protein- α) promotes phagocytic clearance of myelin debris in Wallerian degeneration, axon regeneration, and recovery from nerve injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 277.
- [12] GOMEZ-SANCHEZ J A, CARTY L, IRUARRIZAGA-LEJARRETA M, et al. Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves[J]. *J Cell Biol*, 2015, 210(1): 153-168.
- [13] 杨溢铎, 国海东, 邵水金, 等. 雪旺细胞促进周围神经再生机制的研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2022, 42(1): 145-148.
- [14] 孙莹莹, 刘玉梅, 刘永昌, 等. 褪黑激素体外对脂肪间充质干细胞增殖及向施万样细胞分化的影响[J]. *中国细胞生物学报*, 2022, 44(7): 1330-1338.
- [15] CAI W X, LIU Y, ZHANG T, et al. GDNF facilitates the differentiation of ADSCs to Schwann cells and enhances nerve regeneration through GDNF/MTA1/Hes1 axis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2024, 753: 109893.
- [16] KHALED M M, IBRAHIUM A M, ABDELGALIL A I, et al. Regenerative strategies in treatment of peripheral nerve injuries in different animal models[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2023, 20(6): 839-877.
- [17] FU X M, TONG Z X, LI Q, et al. Induction of adipose-derived stem cells into Schwann-like cells and observation of Schwann-like cell proliferation [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(2): 1187-1193.
- [18] 杜元良, 任 旺, 刘 琳, 等. 施万细胞样细胞对大鼠背根神经节细胞突起生长和神经生长因子表达的影响及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2022, 48(3): 684-691.
- [19] NOCERA G, JACOB C. Mechanisms of Schwann cell plasticity involved in peripheral nerve repair after injury[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(20): 3977-3989.
- [20] 袁 博, 谢佳忆, 江思瑜, 等. 脂肪干细胞源性外泌体对体外巨噬细胞迁移能力的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2024, 50(3): 718-727.
- [21] MENG F Q, LI C C, XU W J, et al. Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells enhance acellular nerve allografts to promote peripheral nerve regeneration by facilitating angiogenesis [J]. *Neural Regen Res*, 2024.
- [22] 陈思凡, 李宏玲, 王海兰, 等. 脂肪干细胞移植治疗1-溴丙烷所致大鼠周围神经损伤[J]. *中国职业医学*, 2022, 49(4): 374-379.
- [23] CASTELNOVO L F, THOMAS P. Membrane progesterone receptor α (mPr α /PAQR7) promotes migration, proliferation and BDNF release in human Schwann cell-like differentiated adipose stem cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2021, 531: 111298.
- [24] CHING R C, WIBERG M, KINGHAM P J. Schwann cell-like differentiated adipose stem cells promote neurite outgrowth *via* secreted exosomes and RNA transfer[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 266.
- [25] YUAN Q, SUN L, YU H H, et al. Human microvascular endothelial cell promotes the development of dorsal root ganglion neurons *via* BDNF pathway in a co-culture system[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2017, 81(7): 1335-1342.
- [26] 管延军, 许文静, 张 健, 等. 细胞外基质修饰的电纺纤维对施万细胞及神经生长的影响[J]. *解放军医学院学报*, 2022, 43(3): 328-333.
- [27] 张 娜, 左晓霜, 王文慧. miR-205-5p通过抑制UHRF1表达促进大鼠周围神经再生的研究进展[J]. *创伤外科杂志*, 2022, 24(5): 377-385.
- [28] LEISENGANG S, HEILEN L B, KLYMIUK M C, et al. Neuroinflammation in primary cultures of the rat spinal dorsal horn is attenuated in the presence of adipose tissue-derived medicinal signalling cells (AdMSCs) in a co-cultivation model[J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(1): 475-494.
- [29] ZHOU N, XU Z, LI X, et al. Schwann cell-derived exosomes induce the differentiation of human adipose-derived stem cells into schwann cells[J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 8: 835135.
- [30] HSU M N, LIAO H T, TRUONG V A, et al. CRISPR-based activation of endogenous neurotrophic

- genes in adipose stem cell sheets to stimulate peripheral nerve regeneration[J]. *Theranostics*, 2019, 9(21): 6099-6111.
- [31] WAN T, ZHANG F S, QIN M Y, et al. Growth factors: Bioactive macromolecular drugs for peripheral nerve injury treatment - Molecular mechanisms and delivery platforms [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 170: 116024.
- [32] 陈颖秀, 郭映琪, 张惠媚, 等. 原花青素对大鼠背根神经节神经元突起生长的影响[J]. *实用医学杂志*, 2024, 40(10): 1357-1363.
- [33] 刘 震, 袁 庆, 乔 阳. 葛根素对乙醇诱导的原代皮层神经元细胞保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(8): 1599-1600.
- [34] 周泽宇, 马蕴涵, 李佳瑞, 等. 脱细胞异体神经移植联合电针对坐骨神经损伤大鼠脊神经节的保护作用及机制[J]. *解剖学报*, 2024, 55(2): 143-149.
- [35] SANG Q L, SUN D J, CHEN Z H, et al. NGF and PI3K/Akt signaling participate in the ventral motor neuronal protection of curcumin in sciatic nerve injury rat models [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 1146-1153.
- [36] 燕 燕, 崔传举, 王玉香, 等. 神经生长因子过表达治疗帕金森病模型大鼠的效果及其分子机制[J]. *河南医学高等专科学校学报*, 2022, 34(1): 1-5.
- [37] 郑良良, 张 弛. 神经生长因子过表达的人脐带血间充质干细胞来源外泌体修复大鼠坐骨神经慢性压迫损伤的效果及作用机制研究[J]. *中医正骨*, 2021, 33(9): 3-14.