

聚吡咯/聚乳酸生物材料联合骨髓基质细胞移植 治疗脊髓损伤的基础研究

Raynald^{1,2}, 舒兵³, 黄华⁵, 周俊峰⁴, 孙晓丹⁴, 秦川¹, 安沂华^{2,3,*}

(1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021; 2. 中国人民武装警察部队总医院, 北京 100039; 3. 首都医科大学北京三博脑科医院, 北京 100093; 4. 清华大学材料学科与工程系, 北京 100084; 5. 首都医科大学北京市神经外科研究所, 北京 100050)

【摘要】 目的 研究聚吡咯 (polypyrrole, PPy)/聚乳酸 (PLA)/骨髓基质细胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs) 复合治疗脊髓损伤的可行性, 并探讨其可能机制。**方法** 制备聚吡咯/聚乳酸支架材料。从大鼠骨髓中分离、培养 BMSCs; 制作大鼠脊髓全横断模型, 在 T8 水平脊髓头尾端完全横断脊髓, 用虹膜剪刀去除长度约 2.5 mm 的脊髓组织。根据植入材料的不同将实验分为 PPy/PLA 组、PPy/PLA/BMSCs 组及损伤组, 损伤组无材料及细胞植入。术后 6 周处死大鼠, 观察不同移植组体内轴突和血管生长情况。**结果** 免疫荧光、电镜及 qPCR 结果证实复合移植可以显著促进轴突和血管生长, 同时也提供了神经保护作用。**结论** PPy/PLA/BMSCs 可以促进大鼠脊髓损伤修复, 其机制可能包括材料支架作用和 BMSCs 在体内促进血管生成, 改善局部的微环境, 因此促进新轴突生长而保护局部的神经元。

【关键词】 聚吡咯/聚乳酸; 骨髓基质细胞; 脊髓损伤; 移植

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 08-0032-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.007

Experimental research on PPy/PLA/BMSCs to treat spinal cord injury

Raynald^{1,2}, SHU Bing³, HUANG Hua⁵, ZHOU Junfeng⁴, SUN Xiaodan⁴, QIN Chuan¹, AN Yihua^{2,3,*}

(1. Institute Laboratory Animal Science, CAMS&PUMC, Beijing 100021, China; 2. The General Hospital of the Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039; 3. Capital Medical University, Beijing Sanbo Brain hospital, Beijing 100050; 4. School of Materials Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084; 5. Capital Medical University, Beijing Neurosurgical Institute, Beijing 100050)

【Abstract】 Objective To investigate the feasibility of using polypyrrole/poly(lactic acid) (PPy/PLA) combined with bone marrow stromal cells to treat spinal cord injury. **Methods** The PPy/PLA scaffold material was prepared. BMSCs were extracted from rat bone marrow and cultured and expanded in vitro. Rat spinal cord was completely transected, after which PPy/PLA or PPy/PLA/BMSCs were transplanted. Six weeks later, rats were sacrificed, the growth of axons and blood vessels of the different groups was analyzed, and the therapeutic effects of cells, materials, and the combined transplantation were assayed. **Results** Immunofluorescence and electron microscopy showed that the combination of PPy/PLA/BMSCs not only promoted axonal and vascular growth, but also provided neuroprotective effects. **Conclusions** PPy/PLA/BMSC combined therapy can repair injured nerves after spinal cord injury. Based on these result, we conclude that

[基金项目] 国家自然科学基金 (81571165)。

[作者简介] Raynald (1985—), 男, 博士生, 研究方向: 神经修复。E-mail: raynald_liu@163.com

[通信作者] 安沂华 (1970—), 男, 研究员, 主任医师。E-mail: riveran@163.com

PPy/PLA and BMSCs can provide axonal regeneration and neuroprotection by promoting vascular formation.

【Keywords】 PPy/PLA; bone marrow stromal cell; spinal cord injury; transplantation

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)可能会导致损伤节段以下机体感觉和运动功能丧失,目前尚没有有效的治疗措施。脊髓损伤的治疗方法包括手术、药物和康复等,可以对神经功能的缺失有一定的改善作用,然而这些治疗手段并不能从根本上解决脊髓损伤的问题,近年来神经再生研究发展迅速,为 SCI 带来了新的希望。随着组织工程学技术的发展,采用复合生物材料移植治疗 SCI 也得到了很多关注。聚吡咯(polypyrrole, PPy)作为导电生物材料由于其具有较好组织相容性被用于制作生物支架。而骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)在修复中枢神经系统中有着重要的作用^[1],最近的研究发现电刺激可以促进细胞增殖分化从而促进组织再生^[2-3]。本研究尝试利用骨髓基质细胞作为种子细胞,聚吡咯/聚乳酸(Polypyrrole/Poly Lactic Acid, PPy/PLA)材料作为支架,研究干细胞联合导电材料支架在 SCI 中的修复作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 27 只,雌性,体重 200 ~ 220 g, 10 周龄。购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2012-0001]。实验在北京市神经外科研究所动物实验设施内进行[SYXK(京)2013-0009]。

1.2 主要试剂及仪器

10% 胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶(含 EDTA)、DMEM/F12、TritonX-100(Invitrogen);N,N-二甲基甲酰胺(DMF,北京化工厂);聚吡咯纳米颗粒粉末(国药集团);二氯甲烷(DCM,北京化工厂);聚乳酸(山东省医疗器械研究所);NF 抗体(Abcam);PBS 缓冲液(GIBCO);NeuN 抗体(Abcam);荧光标记二抗 TRITC(Jackson ImmunoResearch);RT 试剂盒(Invitrogen);RNA 提取试剂盒(Promega);荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystem 7500 Fast);微量紫外分光光度计(NanoDrop 2000 C);手术显微镜(上海精密仪器厂, SXP-1C);倒置相差荧光显微镜(ZEISS, Axio Observer A1);超声波细胞破碎仪超声(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

选取 200 g 成年大鼠,摘除双侧股骨。经过抗凝处理的大鼠骨髓 5 mL,将用密度梯度离心法分离骨髓基质细胞,室温 1500 r/min,离心 10 min,弃上清,沉淀物用 PBS 洗涤再离心 2 次后,将细胞重悬(密度为 4×10^7 /mL)于 DMEM + 10% 胎牛血清的完全培养基中,置培养箱培养(37℃、5% CO₂);每 3 ~ 4 d 进行换液;细胞生长至 80% 融合,用 0.25% 胰蛋白酶(含 EDTA)消化,继续传代培养。

1.3.2 聚吡咯/聚乳酸材料的制备

将聚吡咯纳米颗粒粉末分散于 N,N-二甲基甲酰胺中得到质量体积浓度为 5.6% 的聚吡咯悬浮液。使用超声波细胞破碎仪超声至聚吡咯颗粒均匀分散,然后搅拌过夜。聚乳酸以质量体积浓度为 18.75% 的浓度溶于二氯甲烷。将聚吡咯悬浮液滴加到聚乳酸溶液中,直至 DMF:DCM = 1:2。继续搅拌 24 h 得到混合均匀的聚吡咯/聚乳酸静电纺丝前驱液。向聚乳酸溶液中加入 DMF 溶液直至 DMF:DCM = 1:2,则可以得到聚乳酸静电纺丝前驱液。

1.3.3 动物分组

SD 大鼠 27 只,随机分为 3 组,每组 9 只,分别为单纯损伤组(对照组)、PPy/PLA 移植组、PPy/PLA/BMSCs 移植组。

1.3.4 制作脊髓全横断模型

大鼠腹腔注射水合氯醛(0.4 mL/100 g)麻醉后,常规无菌操作,暴露 T7~9 节段脊髓,在 T8 水平脊髓头尾端完全横断脊髓,用虹膜剪刀去除长度约 2.5 mm 脊髓组织,确保损伤脊髓头尾端完全离断。将 PPy/PLA 复合导电材料和培养的 BMSCs 移植到脊髓损伤区域后,进行逐层缝合;对于单纯 PPy/PLA 组大鼠不移植 BMSCs;对单纯损伤组大鼠不移植 PPy/PLA 复合导电材料和 BMSCs,其后依次逐层缝合。

1.3.5 免疫荧光染色

脊髓全横断 6 周后,采用心脏灌注固定(固定液:4% 中性多聚甲醛),以损伤中心为中点,取出长度约 2 cm 的脊髓组织,4% 中性多聚甲醛固定 2 h,其后冰冻切片(片厚 15 μm),进行免疫荧光染色。所使用的一抗分别为:Nf(1:200)、NeuN(1:200)。具体的染色方法:0.01 mol/L PBS 浸泡 20 min;TritonX-100 室温 30 min,0.01 mol/L PBS 洗 3 次,每

次 5 min;滴加正常羊血清封闭液封闭非特异性反应,37℃ 30 min 后弃去封闭液,直接加一抗(NF、NeuN)40℃ 过夜;取加一抗的脊髓标本,放置室温 10 min;PBS 洗 3 次后免疫荧光染色加 1:100 TRITC 荧光标记二抗,室温避光 5 h, PBS 洗 3 次,每次 5 min,用荧光封片剂封片,荧光显微镜下观察。

1.3.6 损伤部位形态学评价

大鼠存活 6 周后处死,分别采用共聚焦显微镜和电镜,观察 3 组大鼠,明确脊髓损伤局部新生轴突是否存在,记录形态是否存在差别。

1.3.7 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)

检测脊髓中的血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、Caspase3、Casp3 转录情况,抽提各组细胞总 RNA,微量紫外分光光度计测定 RNA,确定 A260 与 A280 比值在 1.8 ~ 2.0。qPCR 逆转录法合成 cDNA,应用 RT 试剂盒根据 primerbank 进行引物合成,设计 VEGFA、Casp3 及内参基因 GAPDH 引物。VEGFA 上游引物:5'-CCAGGCTGCACCCACGACAG-3',下游引物:5'-TCATTGCAGCAGCCCGCAC-3',扩增长度 192 bp;Casp3 上游引物:5'-ACTGGAAGCCGAACTCTT CATCA-3',下游引物:5'-GGAAGTCGGCCTCCAC TGGTATC-3',扩增长度 127 bp;GAPDH 上游引物:5'-TGGAGTCTACTGGCGTCTT-3',下游引物:5'-TGTCATATTTCTCGTGTTCA-3',扩增长度 138 bp。

1.4 统计学方法

运用 SPSS 17.0 进行统计分析,实验数据用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,统计方法采用 *t* 检验,以

$P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 免疫荧光与定量 PCR 评价局部形态

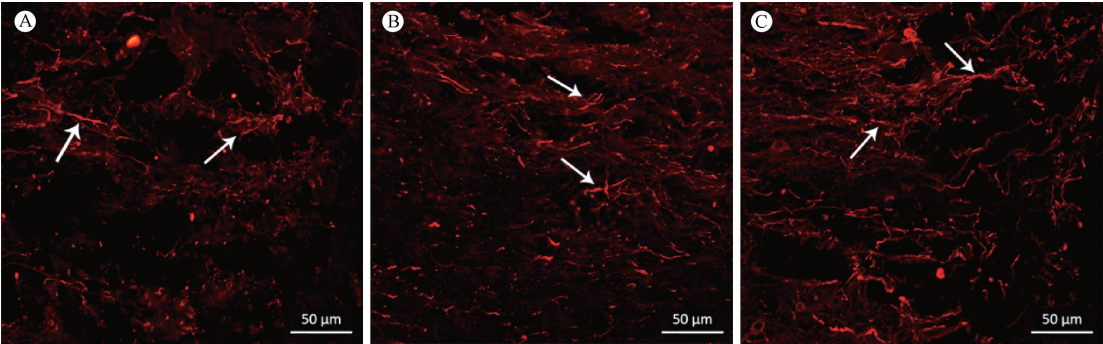
在脊髓损伤区域 6 周后,可见 NF 阳性表达的细胞(图 1)。大鼠移植 PPy/PLA/BMSCs 组(521.4 + 58.97)显示 NF 阳性明显多于 PPy/PLA(475.6 + 35.01)与对照组(404.9 + 31.12)。在损伤区域,可见 NeuN 阳性的细胞(图 2A ~ C)。大鼠移植 PPy/PLA/BMSCs 组(35.81 + 6.01)显示 NeuN 阳性明显多于 PPy/PLA(30.11 + 4.61)与对照组(19.42 + 3.8)(图 3)。

2.2 VEGFA、Casp3 基因表达

脊髓损伤区域内,PPy/PLA 组和 PPy/PLA/BMSCs 组中的转录 VEGFA mRNA 量和转录 Casp3 mRNA 量在术后 6 周明显高于对照组。(图 4)

2.3 电镜评价损伤局部形态

采用半薄切片投射电镜,观察术后 6 周损伤区域的脊髓组织,单纯脊髓损伤组可见大量的成纤维细胞(白色箭头),有较多胶原成分分布于成纤维细胞之间,可见较多胶原瘢痕,胶原瘢痕组织为成纤维细胞与胶原共同形成,新生髓鞘少见(黑色箭头),生长欠佳。在 PPy/PLA 与 PPy/PLA/BMSCs 移植组,移植区域可见到新生有髓神经纤维(图 5)。损伤后 6 周,PPy/PLA/BMSCs 移植组(12.96 + 1.74)的轴突数量大于 PPy/PLA(8.19 + 1.62)与对照组(4.59 + 1.19),差异有显著性($P < 0.01$)。(见图 6)

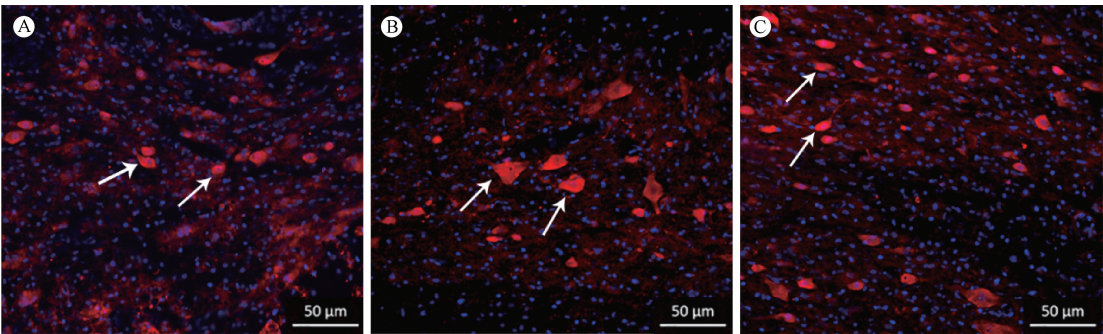


注:A:对照组(全横断);B:PPy/PLA 纳米纤维支架组;C:PPy/PLA 纳米纤维支联合 BMSCs 组。

图 1 各组损伤后 6 周 NF 免疫荧光染色阳性表达

Note. A: Control group (Complete transection). B: PPy/PLA nanofibrous scaffold group. C: PPy/PLA nanofibrous scaffold combined with BMSCs group.

Figure. 1 NF immunofluorescence staining 6 weeks after operation in each group

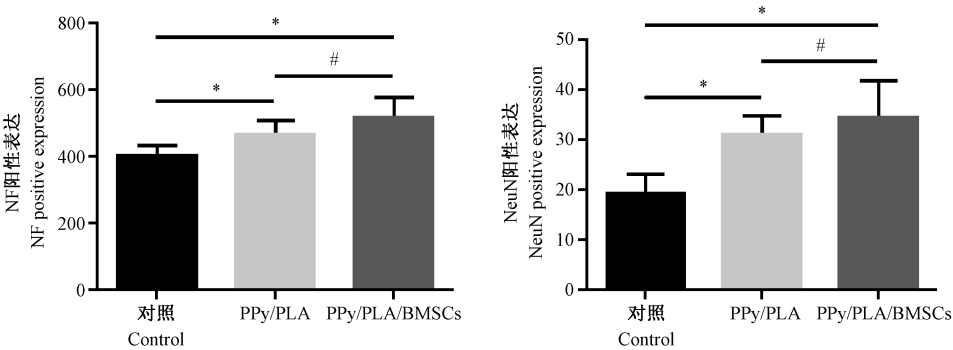


注;A:对照组(全横断);B:PPy/PLA 纳米纤维支架组;C:PPy/PLA 纳米纤维支联合 BMSCs 组。

图 2 各组损伤后 6 周 NeuN 免疫荧光染色阳性表达

Note. A: Control group (Complete transection). B: PPy/PLA nanofibrous scaffold group. C: PPy/PLA nanofibrous scaffold combined with BMSCs group.

Figure. 2 NeuN immunofluorescence staining 6 weeks after operation in each group



注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与 PPy/PLA 组比较, # $P < 0.05$ 。下同。

图 3 损伤后 6 周各组的 NF 与 NeuN 免疫荧光表达定量

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the PPy/PLA group, # $P < 0.05$. The same below.

Figure. 3 Quantification of NF and NeuN immunofluorescence expression 6 weeks after operation in each group

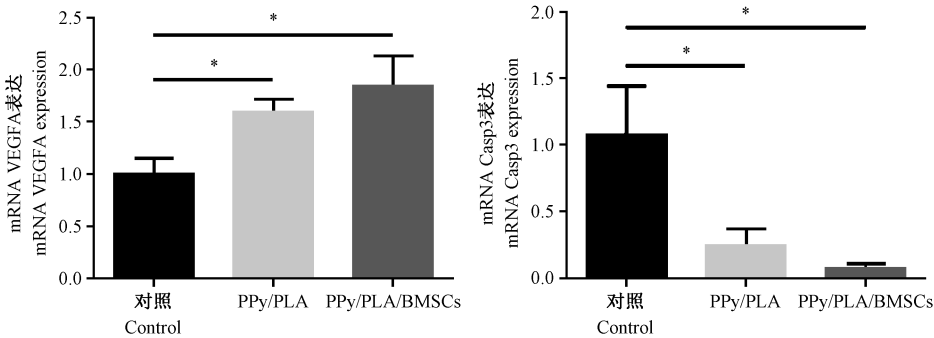


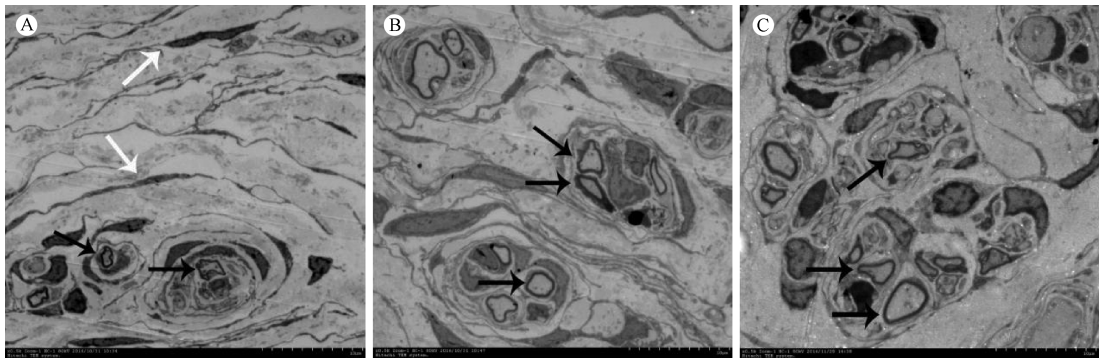
图 4 各组术后 VEGFA, Casp3 表达

Figure. 4 Expression of VEGFA and Casp3 6 weeks after operation in each group

3 讨论

有研究表明,脊髓损伤后给与电刺激能促进损伤部位的神经修复,而导电高分子材料可以为这种神经修复方式提供电传导的介质,而且可以在电刺激的同时结合其他诱导因素促进神经修复^[4]。目

前应用于组织工程的很多聚合物不具备或具有较低的传导电信号的能力,因而其对神经功能的恢复能力有限。具有导电性的材料能提高材料与种子细胞以及神经组织的相容性,增强材料对种子细胞以及神经组织的支持作用。PPy 具有良好的细胞相容性和电传导性能,但是单纯的 PPy 易碎且不能降



注:A:对照组(全横断);B:PPy/PLA 纳米纤维支架组;C:PPy/PLA 纳米纤维支架联合 BMSCs 组;轴突(黑色箭头);成纤维细胞(白色箭头)。

图 5 TEM 新轴突生长在各组损伤后 6 周

Note. A: Control group (Complete transection); B: PPy/PLA nanofibrous scaffold group; C: PPy/PLA nanofibrous scaffold combined with BMSCs group. Axon (black arrow). Fiber cells (white arrow).

Figure. 5 TEM image of new axon formation in each group 6 weeks after operation

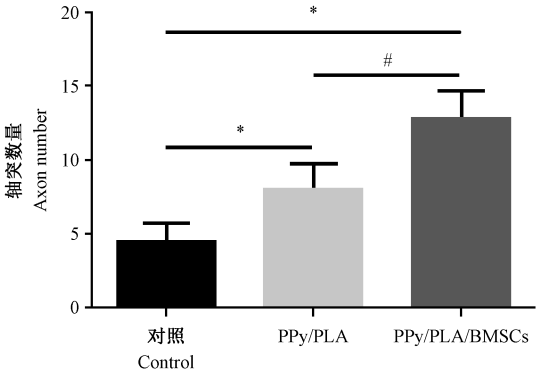


图 6 损伤后 6 周各组的轴突定量

Figure. 6 Quantification of axon quantity 6 weeks after operation in each group

解,而 PLA 是可降解性聚合物。作为细胞移植的载体已被体外实验证实,PC12 细胞、施万细胞和嗅鞘细胞均可在 PPy 表面良好地存活和生长^[5-8]。因此本研究合成 PPy 与 PLA 支架材料。PPy/PLA 复合支架促进神经再生,且由于其本身可生物降解的特性,无需有创干预取出移植物。本研究团体近期的研究也证实施万细胞和人脐带间充质干细胞在 PPy/PLA 支架上能够很好地生长和存活^[2-3]。这些研究与前期关于 PPy 材料良好组织相容性的研究相一致^[9-10]。BMSCs 具有多向分化、自我更新和分泌营养因子的潜能。许多研究已证明,BMSCs 治疗中枢神经系统损伤具有巨大潜力,能通过促进自我修复和新血管生成等多种途径来修复中枢神经系统损伤。因此,本实验联合使用 PPy/PLA 支架材料与 BMSCs 治疗大鼠脊髓损伤并探讨其治疗的机制。

脊髓损伤导致感觉和运动功能丧失。这由于损伤导致的原发性神经元的损害,以及损伤后的复杂病理生理改变影响了局部微环境产生了继发性损害,从而阻碍轴突再生和延伸。脊髓损伤后自发的轴突再生能力有限。国内外诸多研究表明,引导再生的轴突穿过损伤间隙与远端是治疗脊髓损伤的主要策略^[11-12]。PPy/PLA 可降解生物材料促进周围神经再生的研究前期已有相关报道,Xu 等^[4]使用 PPy/PDLLA 修复大鼠坐骨神经,为以后的神经工程研究带来希望。然而该材料在中枢神经系统中的研究尚鲜有报道。本研究免疫荧光检测结果显示损伤大鼠在接受 PPy/PLA 及 PPy/PLA/BMSCs 移植后较对照组显示出更多的 NF 阳性信号。而电镜结果显示 PPy/PLA 及 PPy/PLA/BMSCs 移植后较对照组轴突数量更多。qPCR 结果显示 PPy/PLA/BMSCs 组较 PPy/PLA 及对照组的 Nefh 和 Tubulin 表达增加。这些数据表明组织工程支架本身能够促进再生,而结合 BMSCs 移植治疗也能够支持和优化损伤部位的再生。

损伤局部的改变,例如水肿、炎症反应、细胞死亡、脊髓脱髓鞘、血管破坏等,会影响功能恢复。如何改善这些变化对于功能恢复有巨大支持作用。血管再生是神经再生的重要因素。前期研究揭示血管再生可能与神经突再生、轴突再生和神经保护相关^[12-15]。而 Mihardha 等^[16]报道了 PPy 材料的血管生成作用。本研究 qPCR 检测显示 PPy/PLA 和 PPy/PLA/BMSC 治疗组较对照组具有更高的 VEGF 表达。此外,免疫荧光检测显示 PPy/PLA 和 PPy/PLA/BMSC 组 NeuN 阳性表达较对照组多。qPCR

检测显示 Casp3 在 PPy/PLA 和 PPy/PLA/BMSC 组低表达。这些数据显示血管生成和神经保护在促进神经生长中发挥重要作用。

综上所述,应用 PPy/PLA/BMSCs 在治疗中枢神经系统损伤方面具有很大的潜能,有望成为神经修复新的治疗策略。其机制可能是 PPy/PLA/BMSCs 促进血管生成改善微环境并同时给予局部损伤区域神经保护。

参考文献:

- [1] Lu P, Wang Y, Graham L, et al. Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury [J]. Cell, 2012, 150(6):1264 – 1273.
- [2] Zhou JF, Wang YG, Cheng L, et al. Preparation of polypyrrole-embedded electrospun poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering [J]. Neural Regen Res, 2016, 11(10):1644 – 1652.
- [3] Zhou JF, Cheng L, Sun XD, et al. Neurogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells on aligned electrospun polypyrrole/polylactide composite nanofibers with electrical stimulation [J]. Front Mater Sci, 2016, 10(3): 260 – 269.
- [4] Xu H, Holzwarth JM, Yan Y, et al. Conductive PPy/PDLLA conduit for peripheral nerve regeneration [J]. Biomaterials, 2014, 35(1):225 – 235.
- [5] Qi F, Wang Y, Ma T, et al. Electrical regulation of olfactory ensheathing cells using conductive polypyrrole/chitosan polymers [J]. Biomaterials, 2013, 34(7):1799 – 1809.
- [6] Schmidt CE, Shastri VR, Vacanti JP, et al. Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(17):8948 – 8953.
- [7] Lee JY, Bashur CA, Goldstein AS, et al. Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications [J].

Biomaterials, 2009, 30(26):4325 – 4335.

- [8] Forciniti L, Ybarra J, Zaman MH, et al. Schwann cell response on polypyrrole substrates upon electrical stimulation [J]. Acta biomater, 2014, 10(6):2423 – 2433.
- [9] Chopp M, Zhang XH, Li Y, et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation [J]. Neuroreport, 2000, 11(13):3001 – 3005.
- [10] Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs): Role as Guardians of Inflammation[J]. Mol Ther, 2012, 20(1): 14 – 20.
- [11] Neubauer D, Graham JB, Muir D. Nerve grafts with various sensory and motor fiber compositions are equally effective for the repair of a mixed nerve defect[J]. Exp Neurol, 2010, 223(1): 203 – 206.
- [12] Gu X, Ding F, Williams DF. Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration [J]. Biomaterials, 2014, 35(24): 6143 – 6156.
- [13] Sondell M, Sundler F, Kanje M. Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor [J]. Eur J Neurosci, 2000, 12(12): 4243 – 4254.
- [14] Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor rescues HN33 neural cells from death induced by serum withdrawal [J]. J Mol Neurosci, 2000, 14(3):197 – 203.
- [15] Kermer P, Klöcker N, Labes M, et al. Insulin-like growth factor-I protects axotomized rat retinal ganglion cells from secondary death via PI3-K-dependent Akt phosphorylation and inhibition of caspase-3 In vivo [J]. J Neurosci, 2000, 15;20(2):2 – 8.
- [16] Mihardja SS, Sievers RE, Lee RJ. The effect of polypyrrole on arteriogenesis in an acute rat infarct model [J]. Biomaterials, 2008, 29(31):4205 – 4210.

[收稿日期]2018 – 02 – 07