

• 组织工程与细胞培养 •

聚赖氨酸修饰丝素蛋白膜对神经干细胞生长和分化的影响

赵晓阳¹, 邓立志², 邓宇斌³, 万勇¹, 张黎明²

1 中山大学附属第一医院 脊柱外科, 广东 广州 510080

2 中山大学 材料科学与工程学院, 广东 广州 510080

3 中山大学附属第七医院 骨科研究中心, 广东 深圳 518107

赵晓阳, 邓立志, 邓宇斌, 等. 聚赖氨酸修饰丝素蛋白膜对神经干细胞生长和分化的影响. 生物工程学报, 2018, 34(10): 1650-1659.

Zhao XY, Deng LZ, Deng YB, et al. Effect of poly (L-lysine) modified silk fibroin film on the growth and differentiation of neural stem cells. Chin J Biotech, 2018, 34(10): 1650-1659.

摘要: 利用聚赖氨酸修饰丝素蛋白膜, 观察其对神经干细胞 (NSCs) 生长及分化的影响, 为中枢神经系统损伤修复材料的选择提供实验基础和理论依据。文中首先制备聚赖氨酸修饰的丝素蛋白膜, 并通过核磁共振图谱和紫外-可见光谱进行验证。NSCs 分别接种在单纯丝素蛋白膜 (Silk)、聚赖氨酸修饰的丝素蛋白膜 (Silk-PIL) 和多聚赖氨酸 (PLL) 上进行培养, 分别在 1、3、5、7 d 时用 CCK-8 检测 NSCs 增殖活性。在第 7 天时, 用免疫荧光染色检测 NSCs 分化情况, Western blotting 和 TUNEL 检测细胞凋亡水平, Real-time PCR 检测脑源性神经营养因子 (BDNF) mRNA 水平。结果表明, 核磁共振图谱和紫外-可见光谱证明聚赖氨酸成功地接枝到了丝素蛋白膜上, CCK-8 检测显示: 从第 3 天开始一直到第 7 天, NSCs 在 Silk-PIL 上的增殖活性要显著高于 Silk 组 ($P < 0.05$), 而与 PLL 组无显著性差异 ($P > 0.05$)。免疫荧光观察显示, NSCs 在 Silk-PIL 上分化成神经元的细胞显著多于 Silk 组 ($P < 0.05$), 而与 PLL 组无显著性差异, 3 个组之间分化为星型胶质细胞的数量并无显著性差异。Western blotting 和 TUNEL 检测结果表明 Silk-PIL 组 NSCs 凋亡程度显著小于 Silk 组 ($P < 0.05$), 但与 PLL 组无显著性差异 ($P > 0.05$)。RT-PCR 结果显示, NSCs 在 Silk-PIL 和 PLL 组的 BDNF mRNA 表达水平显著高于 Silk 组 ($P < 0.05$)。结果表明, 聚赖氨酸修饰的丝素蛋白膜能够促进 NSCs 的增殖活性并减少 NSCs 细胞凋亡, 同时促进 NSCs 向神经元方向分化, 有望成为新型组织工程支架材料搭载 NSCs 移植修复中枢神经系统损伤。

关键词: 神经干细胞, 聚赖氨酸丝素蛋白膜, 生物材料, 细胞分化

Received: January 8, 2018; Accepted: April 18, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81472069).

Corresponding authors: Yong Wan. Tel/Fax: +86-20-87332200; E-mail: yongwan65@163.com

Liming Zhang. Tel/Fax: +86-20-84112354; E-mail: ceszhlm@mail.sysu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 81472069) 资助。

Effect of poly (L-lysine) modified silk fibroin film on the growth and differentiation of neural stem cells

Xiaoyang Zhao¹, Lizhi Deng², Yubin Deng³, Yong Wan¹, and Liming Zhang²

¹ Department of Spine Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

² School of Materials Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

³ Scientific Research Center and Department of Orthopedic, the Seventh Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, Guangdong, China

Abstract: In order to provide a basic theory for the materials of repairing central nervous system injury, we have studied the growth and differentiation of neural stem cells (NSCs) on poly (L-lysine) modified silk fibroin film. First, we used poly (L-lysine) to modify silk fibroin film and confirmed by UV-vis and ¹H NMR spectra. Then NSCs were isolated and seeded on the silk fibroin film (Silk group), poly (L-lysine) (PLL group) and poly (L-lysine) modified Silk fibroin film (Silk-PIL group). The proliferation of NSCs was evaluated by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay on days 1, 3, 5 and 7 after seeding. Immunofluorescence was used to analyze the differentiation of NSCs at the 7th day. The levels of apoptosis were detected by Western blotting and TUNEL. The mRNA level of brain derived neurotrophic factor (BDNF) was identified by real-time PCR. UV-vis and ¹H NMR spectra confirmed that poly (L-lysine) was successfully grafted onto the silk fibroin film. From the 3rd day after seeding to the 7th day, the CCK-8 test showed that proliferation rate of NSCs in the Silk-PIL was significantly higher than Silk group ($P < 0.05$) but had no significant difference compared with PLL group ($P > 0.05$). Immunofluorescence staining displayed that more NSCs in Silk-PIL group were differentiated into neuron compared with Silk group ($P < 0.05$), however, there was no significant difference compared with PLL group ($P > 0.05$). The number of NSCs differentiated into astrocytes was not significantly different between the three groups. Western blotting and TUNEL test presented that the degree of apoptosis of NSCs in the Silk-PIL group was significantly lower than Silk group ($P < 0.05$). RT-PCR exhibited that mRNA level of brain derived neurotrophic factor (BDNF) of NSCs was higher in Silk-PIL group compared with Silk group ($P < 0.05$) but had no significant difference compared with PLL group ($P > 0.05$). Thus, poly (L-lysine) modified silk fibroin film could promote the proliferation of NSCs and reduce NSCs apoptosis. Furthermore, it also can enhance the differentiation of NSCs into neurons. It is expected to become a new type of tissue engineering scaffold carrying NSCs to repair central nervous system injury.

Keywords: neural stem cells, poly (L-lysine) modified silk fibroin film, biomaterials, cell differentiation

神经干细胞 (Neural stem cells, NSCs) 具有向神经元和胶质细胞分化的能力^[1], 在中枢系统损伤疾病 (例如脊髓损伤、脑梗死等) 中移植 NSCs 可以与宿主损伤的组织整合, 替代丢失的细胞, 宿主神经元可以与移植神经干细胞分化的神经元形成突触连接, 重建局部神经环路, 在利用 NSCs 移植治疗大鼠脊髓损伤实验中, 可观察到大鼠不同程度的运动功能恢复^[2-3]。然而神经干细胞移植治疗面临一大障碍, 即移植的 NSCs 有限的神经元分化率与较低的存活率的问题^[4]。

丝素蛋白 (Silk) 作为天然生物材料具有良好的生物相容性^[5], 其最终的降解产物是可被身体吸收的氨基酸和寡肽^[6]。在许多研究中, 将丝素

蛋白作为生物材料支架能够促进嗅鞘细胞和干细胞生长和分化^[7-9]。然而丝素蛋白大部分为惰性蛋白, 细胞对其黏附能力不强, 导致其作为搭载细胞的生物材料支架作用受限。

左旋聚赖氨酸 (poly(L-lysine)), PLL) 不仅可以提供细胞的黏附位点, 其本身还具有正电荷可以促进细胞的黏附、增殖和分化, 已有实验表明将 PLL 与水凝胶相连可以促进神经细胞的黏附并提高细胞活力^[10-11]。

综上所述, 我们结合两种材料的优势, 用聚赖氨酸修饰丝素蛋白膜, 并以 NSCs 作为种子细胞, 观察其在聚赖氨酸修饰的丝素蛋白膜上的生长和分化情况, 寻找适合中枢神经组织工程的

支架材料, 为中枢神经损伤后的再生和修复提供实验基础和依据。

1 材料与方法

1.1 材料合成部分

1.1.1 原料与试剂

桑蚕茧 (*Bombyx mori* silkworm Cocoon), 购自南宁东桑西移丝绸有限公司; 碳酸钠、乙酸乙酯、碳酸氢钠、无水硫酸镁、溴化钾、四氢呋喃均为分析纯, 购自广州化学试剂厂; N ϵ -苄氧羰基-L-赖氨酸 (N ϵ -Carbobenzoxy-L-lysine), 二(三氯甲基)碳酸酯 (三光气), 二甲基亚砜 (99.7%, Extra Dry, with molecular sieves, Water \leq 50 ppm), 均购自萨恩化学技术(上海)有限公司; 除四氢呋喃使用前经金属钠回流除水外, 其余均直接使用。

1.1.2 测试方法

^1H NMR 测试: 端基为 N-Boc-苄胺的聚赖氨酸苄酯 (B-Aniline-PLL) 溶于氘代三氟乙酸 (CF_3COOD) 和氘代氯仿 (CDCl_3) 混合溶剂 (V (CF_3COOD): V (CDCl_3)=15:85), 浓度为 10 mg/mL。脱保护的带苄胺端基的聚赖氨酸 (Aniline-PIL)、丝素蛋白 (Silk) 和丝素蛋白-聚赖氨酸接枝物 (Silk-PIL) 冻干样品溶于重水, 样品浓度为 10 mg/mL, 利用 400 M 超导核磁共振谱仪 Bruker AVANCE 400 (Bruker Co., Switzerland) 对样品结构进行 ^1H NMR 表征。

UV-vis 测试: 用紫外-可见双光束分光光度计 (TU-1901, 北京普析通用) 测量再生丝素蛋白水溶液与接枝聚赖氨酸丝素溶液的 UV-vis 吸收光谱, 扫描范围: 300–600 nm。

GPC 测试: 利用凝胶渗透色谱仪 Waters Breeze GPC (Waters Co., USA) 测量分子量以及分子量分布系数。实验条件: 选用 Waters ultrastyrigel 色谱柱和 2417 型示差检测器, 流动相为色谱级 DMF (含 0.01 mol/L LiBr), 柱温为 50 $^\circ\text{C}$, 流速为

1 mL/min。

扫描电镜 (SEM) 观察: 用扫描电镜 (OXFORD, Quanta400F) 检测制备的丝蛋白膜表面结构。

1.1.3 再生丝素原液的制备

按浴比 1:50 将蚕茧加入 0.02 mol/L 的碳酸钠溶液中, 煮沸 30 min, 用去离子水漂洗, 上述步骤重复两遍, 然后用温水漂洗两次, 拧干扯松, 鼓风干燥箱 60 $^\circ\text{C}$ 干燥。按 15% (W/V) 的比例将丝素蛋白溶于 9.3 mol/L 的 LiBr 溶液, 60 $^\circ\text{C}$ 溶解 1 h, 装入截留分子量为 3 500 Da 的纤维素透析袋, 25 $^\circ\text{C}$ 透析 3 d, 每 6 h 换一次水, 然后置于 pH 为 9 的硼酸缓冲液透析 1 d, 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

1.1.4 带苄胺端基的聚赖氨酸 (Aniline-PIL) 的合成

将 5.0 g N ϵ -苄氧羰基-L-赖氨酸分散于 50 mL 经 NaH 除水处理的四氢呋喃, 氩气保护下, 加热至 55 $^\circ\text{C}$, 加入 3.5 g 三光气, 反应 1 h, 旋蒸除去溶剂, 加入 100 mL 乙酸乙酯溶解, 用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤 3 次, 分离出有机相, 用无水硫酸镁干燥 24 h, 过滤后旋蒸除去乙酸乙酯, 得到 N ϵ -苄氧羰基赖氨酸-N-羧基环内酸酐 (zLL-NCA)。

将 1.6 g 单体 N ϵ -苄氧羰基赖氨酸-N-羧基环内酸酐溶于 30 mL DMF, 加入 73 mg 的引发剂 N-Boc-苄胺, 单体与引发剂的比例 ([M0]/[I0]) 为 30, 通氮气保护, 25 $^\circ\text{C}$ 反应 3 d, 反应结束, 装入截留分子量为 3 500 Da 的纤维素透析袋, 去离子水中透析 2 d 除去 DMF, 得到端基为 N-Boc-苄胺的聚 N ϵ -苄氧羰基赖氨酸 (B-Aniline-PzLL)。冰浴下, 按照 100 mg/mL TFA 的浓度将 B-Aniline-PzLL 溶于三氟乙酸, 滴加 1/3 三氟乙酸体积的氢溴酸, 滴加完毕后撤去冰浴, 室温反应 2 h, 旋蒸除去三氟乙酸和氢溴酸, 加适量去离子水溶解, 用 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液中和多余的酸, 透析 3 d, 冻干得到带苄胺端基的聚赖氨酸 (Aniline-PIL), 反应路线 (图 1A)。

1.1.5 聚赖氨酸修饰丝素蛋白的制备

将 40 mg 带苯胺端基的聚赖氨酸 (Aniline-PIL), 溶于 2.5 mL 纯水, 加入 1.25 mL 对甲苯磺酸一水合物 (0.10 mmol) 溶液, 滴加 1.25 mL 的亚硝酸钠 (0.05 mmol) 水溶液, 反应 10 min, 上述溶液混合均在冰浴中进行, 加入 20 mL 经硼酸缓冲液透析处理的再生丝素蛋白水溶液, 冰水浴中反应 30 min, 装入截留分子量为 8 000 Da 的纤维素透析袋, 纯水中透析 3 d 除去盐和未反应的聚赖氨酸, 每半天换一次水 (图 1B)。

1.1.6 聚赖氨酸修饰丝素蛋白膜的制备

取 2 mL 1.1.5 制备的聚赖氨酸修饰丝素蛋白水溶液加入 24 孔板, 40 °C 鼓风干燥箱干燥 12 h, 加入 80% 的乙醇水溶液, 放置 20 min 诱导丝素蛋白构象变化, 去掉溶剂, 自然干燥, 得到稳定不水溶的聚赖氨酸修饰的丝素蛋白膜, 用于后续细胞实验。

1.2 细胞实验部分

1.2.1 神经干细胞 (NSCs) 的分离、培养和鉴定

实验中采取孕 16–18 d 胚胎 SD 大鼠脑组织 (中山大学实验动物中心, 广州, 中国) 在 Hanks 平衡盐溶液中机械切割和分离脑组织, 并将细胞悬液以 1 000 r/min 离心 5 min。弃上清, 细胞沉淀稀释成单细胞悬液。将细胞接种于培养瓶 (Corning) 中, 用 DMEM/F12 培养基 (含有 2% B27 (Gibco), 1% 青霉素/链霉素, 1% L-谷氨酰胺 (Gibco), 20 ng/mL 成纤维细胞生长因子-2 (FGF-2) (Peprotech) 和 20 ng/mL 表皮生长因子 (EGF) (Peprotech)) 在 37 °C、5% CO₂ 中培养。用 Accutase 酶 (Millipore) 每周消化传代。这项研究中均使用第 3 代 NSC 进行实验, 实验之前用免疫荧光进行神经干细胞鉴定。

1.2.2 CCK-8 检测

第 2 代神经干细胞球用 Accutase 酶消化分解为单个细胞, 并种植于预先用丝素蛋白膜 (Silk)、

聚赖氨酸修饰丝素蛋白膜 (Silk-PIL) 和多聚赖氨酸 (PLL) 包被好的 24 孔板 (Corning) 中, 每孔的细胞密度为 1×10^5 cells/mL, 每孔总体积为 1 mL, 在 37 °C、5% CO₂ 中培养。分别在 1、3、5、7 d 时加入 10 μ L CCK8 试剂 (Jangsu KeyGEN BioTECH Corp., Ltd), 37 °C 避光孵育 3 h, 之后将上清液吸入至 96 孔板中在 450 nm 波长下进行吸光度 (OD) 值测定, 使用空白对照孔调零, OD 值相对于空白对照组越高表明细胞活力越好, 反之则越差。实验重复 3 次。

1.2.3 NSCs 诱导分化

第 2 代神经干细胞球用 Accutase 酶消化分解为单个细胞, 并种植于预先用丝素蛋白膜 (Silk)、多聚赖氨酸 (PLL) 和聚赖氨酸修饰丝素蛋白膜 (Silk-PIL) 包被好的 24 孔板 (Corning, Acton, MA) 中, 每孔的细胞密度为 1×10^5 cells/mL, 每孔总体积为 1 mL, 在 37 °C、5% CO₂ 中培养。24 h 之后, 将原来培养基吸出, 换分化培养基 (无 EGF 和 FGF) 培养 1 周。

1.2.4 免疫荧光染色分析

诱导 NSCs 分化 1 周后, 将 24 孔板中的细胞 ($n=3$) 上清液吸去, 用 PBS 洗 3 遍, 每次 5 min, 之后加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 用 PBS 洗 3 遍, 每次 5 min。分别以 0.3% Triton X-100 透膜和 10% 山羊血清封闭 30 min, 去除血清, 以适当浓度一抗孵育, 4 °C 过夜。次日将标本复温, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 用荧光二抗于常温下避光孵育 1 h。去除荧光二抗, PBS 洗 2 次, 以 DAPI (Thermo Fisher) 染核 15 min。PBS 洗 2 次, 将标本置于荧光显微镜下观察。所用一抗如下: 神经干细胞标志物 Nestin (1 : 200, CST)、SOX2 (1 : 200, CST)、新生神经元标志物 β 3-tubulin (1 : 200, CST)、成熟神经元标志物 MAP2 (1 : 200, CST)。所用二抗如下: FTIC 标记羊抗兔或羊抗小鼠抗体 (1 : 200)。

1.2.5 Western blotting 分析

神经干细胞分别在不同处理组上培养 7 d 后进行蛋白提取 ($n=3$)。用 RIPA (Santa Cruz) 进行裂解, 提出的蛋白用 BCA (Beyotime) 法测其浓度, 统一蛋白上样量为 20 μg , 蛋白样品利用 SDS-PAGE (10% Bis-Tris Gel) 进行电泳分离, 并转移至 PVDF 膜, 以 5% BSA 进行封闭, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 对应二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 最后以加强化学发光法显影 (ECL system, Millipore)。所用一抗如下: Bax (1 : 1 000, CST)、Bcl-2 (1 : 1 000, CST)、GAPDH (1 : 1 000, CST)。各蛋白水平以 GAPDH 作为参照。

1.2.6 TUNEL 分析

采用 TUNEL 染色法 (Roche, Basel, Swiss) 检测 NSCs 在不同处理组上培养 7 d 的细胞凋亡情况。先用 4% 多聚甲醛在室温下固定 10 min, 用 PBS 洗两次, 每次 10 min, 接着用 0.2% Triton X-100 进行透膜 30 min, 用 PBS 洗 2 次, 加 TUNEL 试剂避光 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 之后用 PBS 再洗 2 次, 加 DAPI 染核 15 min。荧光显微镜下观察, 凋亡细胞分布区域随机选取 5 个不重叠视野, 计数阳性细胞数 (显红色荧光)。

1.2.7 Real-time PCR 分析

脑源性神经营养因子 (Brain derived neurotrophic factor, BDNF) 是神经干细胞分泌的一种营养因子, 对神经细胞的增殖、分化、存活有重要的影响。神经干细胞分别在不同处理组上培养 7 d 后, 用 RT-PCR 技术检测两组神经干细胞 BDNF mRNA 水平, 具体操作见 RNA 提取试剂盒 (TaKaRa)、PrimeScript RT Reagent Kit 和 SYBR Green PCR Master Mix (TaKaRa) 说明书, 引物序列见表 2。

1.3 统计分析和制图

所有的统计数据用 SPSS 16.0 和 GraphPad Prism 6 进行统计分析和制图, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Bonferroni 检验。 $*P < 0.05$ 为显著, $**P < 0.01$ 为极显著。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Primer name	Primer sequence (5'-3')
GAPDH	Forward TGACGCTGGGGCTGGCATTG
	Reverse GGCTGGTGGTCCAGGGGTCT
BDNF	Forward TCTGTAATCGCCAAGGTG
	Reverse ATGCTGGAAGGTAATGTG

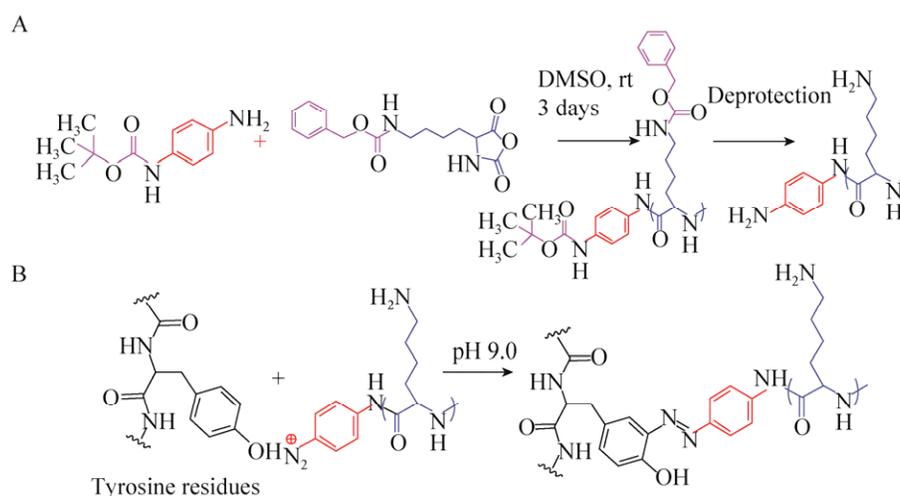


图 1 聚赖氨酸修饰丝素蛋白合成图

Fig. 1 Synthesis of Aniline-PIL modified silk. (A) Synthetic road map of Aniline-PIL. (B) Synthetic road map of Aniline-PIL modified silk.

2 结果与分析

2.1 聚赖氨酸修饰的丝素蛋白膜的合成

图 2A 是丝素蛋白与经聚赖氨酸修饰的丝素蛋白水溶液的紫外-可见光谱图,两相比较,经聚赖氨酸修饰的丝素蛋白水溶液在 352 nm 发生强紫外吸收,393 nm 处出现一个肩峰,这两处的紫外吸收由酪氨酸残基与苯胺基团偶联形成的偶氮苯结构造成^[12],说明聚赖氨酸成功通过化学偶联的办法接枝到丝素蛋白骨架上。图 2B 是丝素蛋白和经聚赖氨酸修饰丝素蛋白的核磁共振谱图,与纯的丝素蛋白比较,经聚赖氨酸修饰的丝素蛋白在 δ 3.00 附近出现属于聚赖氨酸重复单元中残基上亚甲基的质子化学位移。与丝素蛋白和经聚赖氨酸修饰丝素蛋白溶液的紫外-可见光谱的数据一同说明,聚赖氨酸通过酪氨酸残基与苯胺的反应成功接枝到丝素蛋白上。扫描电镜观察显示,丝素蛋白膜呈纤维状三维立体结构,纤维分布均匀,孔隙大小为 5–30 μm (图 2C)。

2.2 神经干细胞的鉴定及增殖活性分析

所用细胞经免疫荧光检测均表现为 Nestin 和 SOX2 阳性 (图 3A),提示所用细胞为 NSCs。NSCs

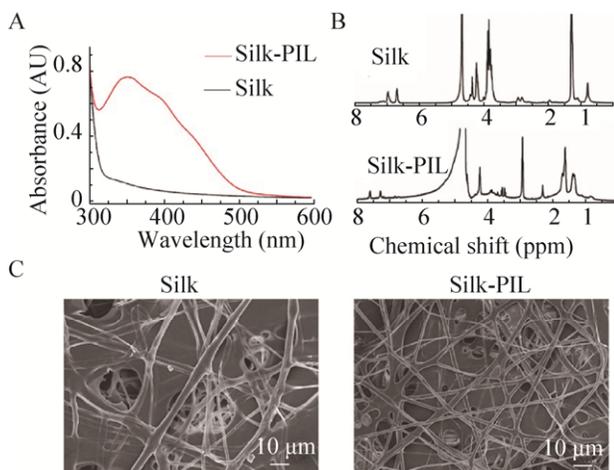


图 2 丝素蛋白膜与经聚赖氨酸修饰的丝素蛋白膜的检测和观察

Fig. 2 UV-vis spectra and ^1H NMR spectra of Silk and Silk-PIL. (A) UV-vis spectra of Silk and Silk-PIL. (B) ^1H NMR spectra of Silk and Silk-PIL. (C) Observation of Silk and Silk-PIL by SEM.

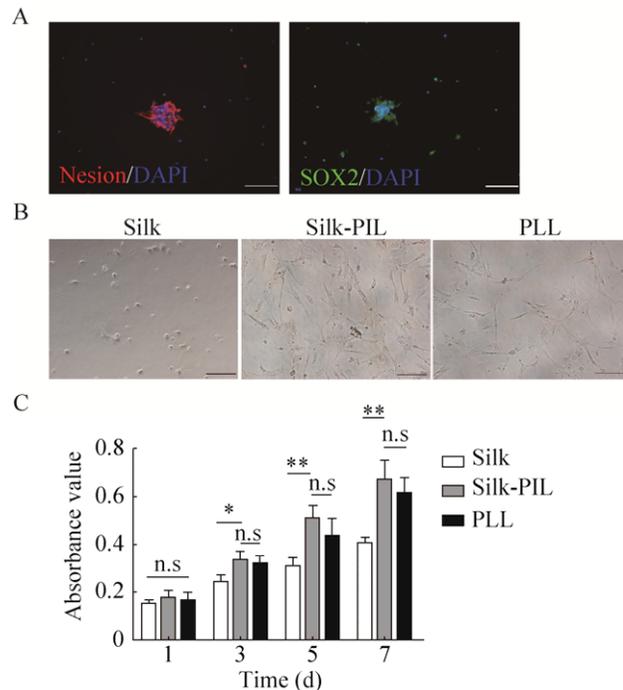


图 3 NSCs 的鉴定和不同材料上 NSCs 增殖能力检测

Fig. 3 Identification of NSCs and proliferation of NSCs in different materials. (A) Immunofluorescent detection of NSCs. (B) NSCs were cultured on the 7th day in different groups. (C) Proliferation of NSCs in different materials detected by CCK-8. Scale bar=100 μm . * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, n.s.: no significant difference.

在不同处理组上生长 7 d (图 3B)。CCK-8 法检测结果显示,第 1 天时 Silk 组 (0.150 ± 0.017), PLL 组 (0.163 ± 0.036) 与 Silk-PIL 组 (0.176 ± 0.03) 的神经干细胞增殖能力无明显差异 ($P = 0.582$),但随着时间推移,第 3 天、第 5 天、第 7 天 3 组 CCK-8 检测结果显示, Silk+PIL 组 (0.335 ± 0.039 、 0.511 ± 0.055 、 0.671 ± 0.078) 相比于 Silk 组 (0.242 ± 0.030 、 0.305 ± 0.036 、 0.408 ± 0.022),细胞增殖能力显著提高 ($P = 0.032$, $P = 0.006$, $P = 0.005$),而相比于 PLL 组 (0.319 ± 0.031 、 0.435 ± 0.074 、 0.615 ± 0.063) 并无显著性差异 (图 3C)。

2.3 免疫荧光检测 NSCs 分化

在不同材料上诱导 NSCs 分化 7 d 后,用免疫荧光的方法检测 NSCs 分化成神经元 (包括新生神经元和成熟神经元) 和星型胶质细胞的面积 (图 4A),实验结果表明, Silk-PIL 组中新生神经

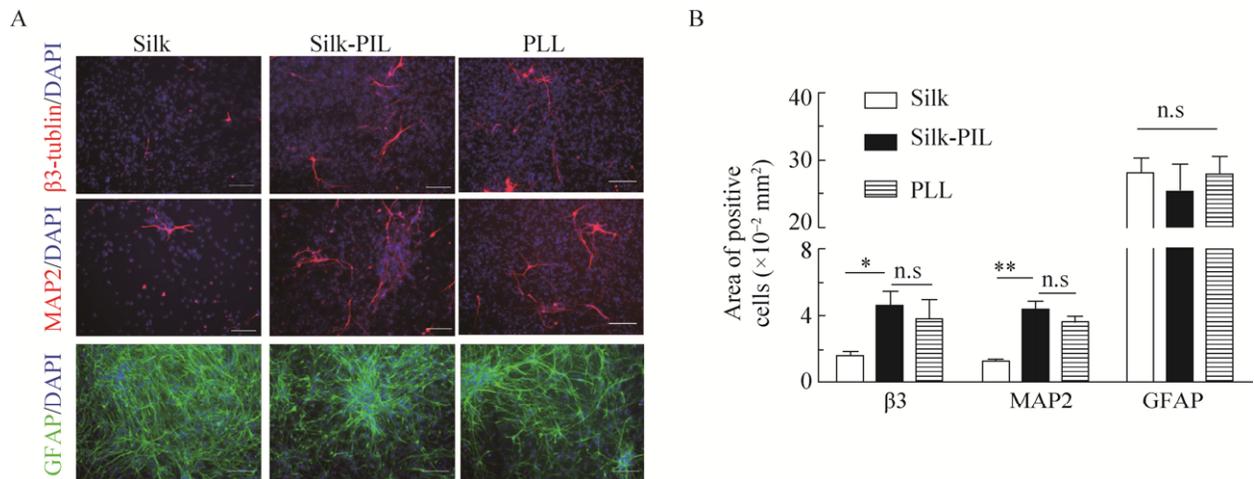


图4 免疫荧光检测 NSCs 在不同材料上的分化

Fig. 4 Analysis the differentiation of NSCs in different materials by immunofluorescence. (A) The expression of different neural markers was detected by immunofluorescence. (B) Count of the positive area of different neural markers in different group. Scale bar=100 μm.

元标志物 β3-tubulin 阳性的细胞面积显著高于 Silk 组 ($P=0.034$), 对于成熟神经元标志物 MAP2 来说, Silk-PIL 组中阳性细胞面积显著高于 Silk 组 ($P=0.009$), 而相对于 PLL 组, 无论是新生神经元标志物 β3-tubulin 还是成熟神经元标志物 MAP2, 两组之间并无显著性差异 ($P=0.541$; $P=0.347$)。三组星形胶质细胞标志物 GFAP 的阳性面积并无显著性差异 ($P=0.753$) (图 4B)。

2.4 Western blotting、TUNEL 和 Real-time PCR 分析

TUNEL 检测结果表明, Silk 组的凋亡细胞数量要明显多于 Silk-PIL 和 PLL 组 ($P=0.04$) (图 5A、D)。Bax 为细胞内促凋亡蛋白, 其表达量增高可导致细胞发生凋亡, Bcl-2 为胞内抑制凋亡蛋白, 其表达量增高可抑制细胞发生凋亡, Bax/Bcl-2 的高低可反映细胞凋亡程度的高低^[13]。在此实验中, NSCs 分别在 Silk、PLL 和 Silk-PIL 上培养 7 d 后, Western blotting 检测了 Bax 和 Bcl-2 的表达水平 (图 5A)。Silk 组 Bax/Bcl-2 水平显著高于 Silk-PIL 组 ($P=0.024$) (图 5B、C), 证明 Silk 组的 NSCs 细胞凋亡程度较 Silk-PIL 组高, Silk-PIL 与 PLL 组之间 Bax/Bcl-2 水平无显著性差

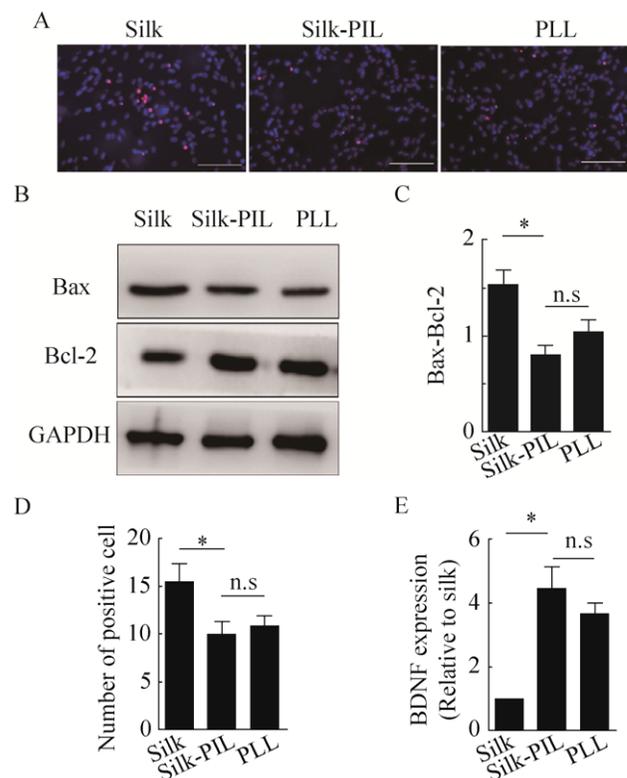


图5 TUNEL 检测凋亡细胞 (A、D)、凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达 (B、C) 和神经营养因子 BDNF mRNA 表达情况 (E)

Fig. 5 TUNEL and Western blotting analysis of the levels of apoptotic cells (A,D) and Bax/Bcl-2 apoptosis-related protein (B,C). The levels of BDNF mRNA was detected by Q-PCR(D). Scale bar=100 μm.

异。通过 Real-time PCR 发现 Silk-PIL 和 PLL 组 NSCs 中 BDNF 的 mRNA 表达量显著高于 Silk 组 ($P=0.03$) (图 5E)。

3 讨论

正如许多研究所述, NSCs 能够自我更新, 可以分化为神经元和神经胶质细胞, 这种性质可以使其补充中枢系统损伤后神经元和胶质细胞的缺失^[14], 从而形成有功能的神经回路, 其次, 在中枢神经系统损伤后, NSCs 也能够分泌诸多营养因子 (如 BDNF、NT-3 等), 为神经和轴突再生提供良好的生存环境^[15], 综上, NSCs 是中枢神经后移植修复的种子细胞。但如前文所述, NSCs 也有其自身的缺点, 如向神经元分化少、存活率低等, 因此如何用适合的材料携带 NSCs 并促进 NSCs 在其上的存活和向神经元分化是亟待解决的问题。

研究表明, 理想的组织工程材料应具备以下几个特性^[16]: 1) 具有良好的强度和理化性质; 2) 材料来源广泛且易加工成型, 可塑性强; 3) 具有良好的生物相容性, 其自身及降解产物对细胞和机体无毒性, 不会或较少引起炎症和免疫排斥反应; 4) 生物降解速率与组织再生速率相匹配, 最终可被充分吸收或安全排出体外; 5) 良好的表面相容性, 有足够的细胞吸附能力, 支持细胞的黏附、生长、增殖、分化。

丝素蛋白是从蚕丝中提取的天然的高分子纤维蛋白, 具有良好的理化特征和生物性能^[17-18]。丝素被用作缝合线后, 现在又被重新审视作为一种有广泛应用潜能的生物材料而焕发新生。

有研究者认为丝素蛋白具有以下优点: 机械强度高、良好的生物相容性、生物降解性缓慢、制备方法多样易得、能够支持多种细胞的黏附、分化和生长^[19-21]。已有研究实验将丝素蛋白作为成骨、韧带、肌腱、血管的组织工程支架, 取得了良好的效果^[22]。但丝素蛋白也有其自身的缺

点, 其主要成分为惰性蛋白, 作为细胞载体与细胞黏附力较弱。

在此项研究中, 我们用 NSC 作为种子细胞, 并用聚赖氨酸修饰丝蛋白, 增加丝蛋白中带正电荷的基团, 增加其对细胞的粘附性, 观察其对 NSCs 增殖和分化的影响。经 CCK-8 检测结果显示, NSCs 在用聚赖氨酸修饰的丝蛋白膜上细胞活力增殖速度显著高于未经修饰的丝蛋白膜, Western blotting 检测也表明 NSCs 在聚赖氨酸修饰的丝蛋白膜上促凋亡蛋白 Bax 与抑凋亡蛋白 Bcl-2 比值显著低于单纯丝蛋白组, 证明 NSCs 在聚赖氨酸修饰的丝蛋白膜上细胞凋亡更少, 存活率更高。免疫荧光检测 NSCs 分化结果表明, NSC 在聚赖氨酸修饰的丝蛋白膜上分化的神经元数量显著多于其在单纯丝蛋白膜上的神经元数量, 这表明聚赖氨酸修饰的丝蛋白膜能够促进 NSCs 向神经元方向分化。不仅如此, RT-PCR 结果提示, NSC 在用聚赖氨酸修饰的丝蛋白膜上 BDNF mRNA 水平更高。BDNF 作为一种神经营养因子可以促进神经生长, 增加神经细胞的存活率, 并且也有实验证明, BDNF 能够促进神经干细胞向神经元方向分化, 但向胶质细胞方向分化影响不大, 这或许是导致 NSCs 在聚赖氨酸修饰的丝蛋白膜上分化的神经元数量显著多于其在单纯丝蛋白膜上的神经元数量而胶质细胞数量却没有差异的原因之一^[23-24]。同时, 实验组 Silk-PIL 在材料上的形态、数量、黏附性与 PLL 组无显著差异, 说明多聚赖氨酸修饰的丝素蛋白能为 NSCs 的黏附和生长分化提供良好的生长表面。

应用丝蛋白膜作为修复神经损伤材料也有其相对的局限性: 比如丝蛋白的 β 折叠结晶易被破坏, 降低了其力学性能^[25]; 其次, 体内实验表明将丝蛋白作为神经修复材料在体内降解速度较为缓慢^[26-27], 神经系统中并无丝蛋白成分, 将其作为基质材料, 在体内的效果需要进一步观察。尽

管此研究表明用聚赖氨酸修饰的丝蛋白膜可以促进 NSCs 增殖并促进其向神经元方向分化, 但其中的机制还需进一步探究。如果进一步将其作为一种理想的细胞移植支架, 尚需观察其移植体内的生物学效应, 只有对此材料进行全面和综合的实验分析评价, 才能为其在神经再生领域的应用提供可靠的实验依据。

REFERENCES

- [1] Mothe AJ, Tator CH. Advances in stem cell therapy for spinal cord injury. *J Clin Invest*, 2012, 122(11): 3824–3834.
- [2] Lai BQ, Wang JM, Duan JJ, et al. The integration of NSC-derived and host neural networks after rat spinal cord transection. *Biomaterials*, 2013, 34(12): 2888–2901.
- [3] Garbossa D, Boido M, Fontanella M, et al. Recent therapeutic strategies for spinal cord injury treatment: possible role of stem cells. *Neurosurg Rev*, 2012, 35(3): 293–311.
- [4] Yang ZY, Duan HM, Mo LH, et al. The effect of the dosage of NT-3/chitosan carriers on the proliferation and differentiation of neural stem cells. *Biomaterials*, 2010, 31(18): 4846–4854.
- [5] Bhardwaj N, Kundu SC. Chondrogenic differentiation of rat MSCs on porous scaffolds of silk fibroin/chitosan blends. *Biomaterials*, 2012, 33(10): 2848–2857.
- [6] Minoura N, Tsukada M, Nagura M. Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial. *Biomaterials*, 1990, 11(6): 430–434.
- [7] Qian YQ, Shen YX, Lu ZF, et al. Biocompatibility of silk fibroin nanofibers scaffold with olfactory ensheathing cells. *Chin J Repar Construct Surg*, 2009, 23(11): 1365–1370 (in Chinese).
钱玉强, 沈忆新, 陆政峰, 等. 嗅鞘细胞与丝素蛋白纳米纤维生物相容性研究. *中国修复重建外科杂志*, 2009, 23(11): 1365–1370.
- [8] Cho SY, Yun YS, Kim ES, et al. Stem cell response to multiwalled carbon nanotube-incorporated regenerated silk fibroin films. *J Nanosci Nanotechnol*, 2011, 11(1): 801–805.
- [9] Pecci-Lloret MP, Vera-Sánchez M, Aznar-Cervantes S, et al. Analysis of the adherence of dental pulp stem cells on two-dimensional and three-dimensional silk fibroin-based biomaterials. *J Craniofac Surg*, 2017, 28(4): 939–943.
- [10] Rao SS, Han N, Winter JO. Polylysine-modified PEG-based hydrogels to enhance the neuro-electrode interface. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2011, 22(4/6): 611–625.
- [11] Cai L, Lu J, Sheen V, et al. Promoting nerve cell functions on hydrogels grafted with poly(L-lysine). *Biomacromolecules*, 2012, 13(2): 342–349.
- [12] Murphy AR, St John P, Kaplan DL. Modification of silk fibroin using diazonium coupling chemistry and the effects on hMSC proliferation and differentiation. *Biomaterials*, 2008, 29(19): 2829–2838.
- [13] Chen NN, Wei FX, Wang L, et al. Tumor necrosis factor alpha induces neural stem cell apoptosis through activating p38 MAPK pathway. *Neurochem Res*, 2016, 41(11): 3052–3062.
- [14] Kim SU, Lee HJ, Kim YB. Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases. *Neuropathology*, 2013, 33(5): 491–504.
- [15] De Feo D, Merlini A, Laterza C, et al. Neural stem cell transplantation in central nervous system disorders: from cell replacement to neuroprotection. *Curr Opin Neurol*, 2012, 25(3): 322–333.
- [16] Hutmacher DW, Schantz T, Zein I, et al. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J Biomed Mater Res*, 2001, 55(2): 203–216.
- [17] Mauney JR, Cannon GM, Lovett ML, et al. Evaluation of gel spun silk-based biomaterials in a murine model of bladder augmentation. *Biomaterials*, 2011, 32(3): 808–818.
- [18] Sun BB, Zhou ZF, Wu T, et al. Development of nanofiber sponges-containing nerve guidance conduit for peripheral nerve regeneration *in vivo*. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(32): 26684–26696.
- [19] Xie MK, Xu YM. A new development of silk fibroin scaffolds in tissue engineering. *Chin J Tissue Eng Res*, 2012, 16(43): 8105–8110 (in Chinese).
谢敏凯, 徐月敏. 丝素蛋白材料在组织工程中的新进展. *中国组织工程研究*, 2012, 16(43): 8105–8110.

- [20] Zhu CL, Huang J, Xue CB, et al. Skin derived precursor Schwann cell-generated acellular matrix modified chitosan/silk scaffolds for bridging rat sciatic nerve gap. *Neurosci Res*, 2017, doi: 10.1016/j.neures.2017.12.007.
- [21] Xiao DD, Wang Q, Yan H, et al. Adipose-derived stem cells-seeded bladder acellular matrix graft-silk fibroin enhances bladder reconstruction in a rat model. *Oncotarget*, 2017, 8(49): 86471–86487.
- [22] Li G, Li Y, Chen GQ, et al. Silk-based biomaterials in biomedical textiles and fiber-based implants. *Adv Healthc Mater*, 2015, 4(8): 1134–1151.
- [23] Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, et al. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci*, 2001, 21(17): 6706–6717.
- [24] Shimazaki T, Arsenijevic Y, Ryan AK, et al. A role for the POU-III transcription factor Brn-4 in the regulation of striatal neuron precursor differentiation. *EMBO J*, 1999, 18(2): 444–456.
- [25] Jin Y, Hang YC, Luo J, et al. *In vitro* studies on the structure and properties of silk fibroin aqueous solutions in silkworm. *Int J Biol Macromol*, 2013, 62: 162–166.
- [26] Catto V, Farè S, Cattaneo I, et al. Small diameter electrospun silk fibroin vascular grafts: Mechanical properties, *in vitro* biodegradability, and *in vivo* biocompatibility. *Mater Sci Eng C*, 2015, 54: 101–111.
- [27] Kim UJ, Park J, Kim HJ, et al. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials*, 2005, 26(15): 2775–2785.

(本文责编 陈宏宇)