



鹿茸干细胞对大鼠坐骨神经损伤的再生修复作用*

叶子豪¹, 李吉萍², 王东旭², 汪 珍², 任 晶², 郭倩倩^{1,2**}, 李春义^{1,2**}

1. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 2. 长春科技学院鹿茸科学与产品技术研究所, 长春 130600

摘要: 为探讨鹿茸干细胞对大鼠坐骨神经损伤的修复作用, 选择30只雄性SD大鼠, 制备大鼠坐骨神经损伤模型, 随机分为3组: 鹿茸干细胞(ASC)移植组, 大鼠骨髓间充质干细胞(rBMSC)移植组和生理盐水(对照组), 每组各10只。干细胞移植组通过尾静脉注射 1×10^6 个细胞(重悬于生理盐水)进行治疗, 对照组注射同等剂量的生理盐水。分别于治疗后第7, 21天取材检测。行为学观察与足迹分析检测神经功能恢复, 组织学染色评估大鼠坐骨神经病理学变化与患侧腓肠肌萎缩恢复情况, 免疫荧光染色与RT-qPCR检测坐骨神经再生相关因子(NF200, c-Jun, Periaxin, MPZ与Krox20)的表达。术后3周, 与对照组相比, 干细胞移植组大鼠坐骨神经功能情况和神经再生情况均出现明显改善, 其中ASC移植组效果更显著。坐骨神经功能指数(SFI)结果显示, 术后第21天, ASC移植组SFI值显著优于rBMSC移植组与对照组; 术后第21天, 对照组的患侧腓肠肌的湿重比、肌纤维面积显著低于干细胞移植组; 组织学染色结果显示, ASC移植组再生神经纤维数目显著增多, 排列规则, NF200表达量显著升高; 术后第7天, RT-qPCR结果显示, 与对照组相比, ASC移植显著增强c-Jun、Periaxin、MPZ与Krox20基因表达。首次基于鹿茸神经能够周期性再生这一生物学现象, 探究鹿茸干细胞对大鼠神经再生修复的作用, 明确了ASC移植显著促进大鼠坐骨神经损伤后的再生修复及其运动功能恢复, 效果优于rBMSC移植组。

关键词: 鹿茸; 干细胞; 坐骨神经损伤; 再生修复作用

中图分类号: S825

文献标志码: A

文章编号: 1007-7448(2024)03-0178-10

引文格式: 叶子豪, 李吉萍, 王东旭, 等. 鹿茸干细胞对大鼠坐骨神经损伤的再生修复作用[J]. 经济动物学报, 2024, 28(3): 178-187.

DOI: 10.13326/j.jea.2024.1979

Effects of Antler Stem Cells on Regeneration and Repair of Sciatic Nerve Injury in Rats*

YE Zihao¹, LI Jiping², WANG Dongxu², WANG Zhen², REN Jing², GUO Qianqian^{1,2**},

LI Chunyi^{1,2**}

1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Institute of Antler Science and Product Technology, Changchun Sci-Tech University, Changchun 130600, China

Abstract: To investigate the repairing effect of antler stem cells on sciatic nerve injury in rats, 30 male SD rats were prepared to create sciatic nerve injury model and randomly divided into three groups: antler stem cell (ASC) transplantation group, rat bone marrow mesenchymal stem cell (rBMSC)

* 基金项目: 吉林省自然科学基金项目(YDZJ202201ZYTS435), 国家自然科学基金区域联合基金项目(U20A20403), 吉林省发展和改革委员会项目(2023C040-9)

作者简介: 叶子豪, 男, 硕士研究生, 主要从事鹿茸干细胞研究。

收稿日期: 2024-07-15

** 通信作者: 郭倩倩, E-mail: gqqice@163.com; 李春义, E-mail: lichunyi1959@163.com

transplantation group and saline control group, with 10 rats in each group. The stem cell transplantation group was treated by injecting 1×10^6 cells (suspended with normal saline) into the tail vein, while the control group was given the same dose of normal saline. Samples were collected at day 7 and day 21 after treatment. Behavioral observation and footprint analysis were conducted to detect the recovery of nerve function. Histological staining was used to evaluate the pathological changes of sciatic nerve and the recovery of gastrocnemius atrophy on the affected side. The expression levels of NF200, c-Jun, Periaxin, MPZ and Krox20 related to sciatic nerve regeneration were detected by immunofluorescence staining and RT-qPCR. The results showed at 3 weeks after surgery, sciatic nerve function and nerve regeneration were significantly improved in the stem cell transplantation group compared with those in the control group, and the effect was more significant in the ASC transplantation group. SFI data showed that at 3 weeks after surgery, the SFI value of ASC group was significantly better than that of rBMSC group and control group. At 21 days after surgery, the wet-weight ratio and muscle fiber area of gastrocnemius of the affected side of the control group were significantly lower than those of the stem cell transplantation group, and the rBMSC transplantation group was significantly lower than that of the ASC transplantation group. Histological staining results showed that the number of regenerated nerve fibers in ASC transplantation group increased significantly, the arrangement was regular, and the expression level of NF200 increased significantly. At day 7 after surgery, RT-qPCR results showed that ASC transplantation significantly enhanced c-Jun, Periaxin, Mpz and Krox20 gene expression compared with those in the control group. Based on the biological phenomenon that antler nerve can regenerate periodically, this study is the first time to explore the effect of antler stem cells on nerve regeneration and repair in rats, and confirmed that ASC transplantation significantly promoted the regeneration and repair of sciatic nerve injury and the recovery of motor function in rats, and the effect was even better than that of rBMSC transplantation group.

Key words: antler; stem cell; sciatic nerve injury; regeneration and repair

周围神经系统(Peripheral nervous system, PNS)损伤是一种临床常见病和高发病,在世界范围内有数百万人患病,通常会导致长期的神经功能障碍^[1]。其中,坐骨神经损伤是最典型的一种,通常表现为疼痛、麻木、感觉丧失、运动功能障碍等功能受损,以及肌肉萎缩、肌张力下降、肢体瘫痪等,预后差,严重影响患者的生活质量^[2]。目前,除了手术重建之外,PNS损伤没有显著有效的治疗手段^[3]。低效和缓慢的神经再生是导致PNS损伤后运动、感觉和自主功能全部或部分丧失的主要原因,因此,探索一种安全、高效的再生疗法,促进神经再生修复是现阶段再生医学亟需解决的问题^[4]。

鹿茸是目前发现的唯一能够周期性完全再生的哺乳动物器官,其中包括神经、血管、软骨和皮肤的完全再生^[5]。鹿茸神经来源于颞颥和眼眶上分支的感觉神经,每年春天伴随着鹿茸再生的启动,神经再生也随之开始,在鹿茸快速生长期,鹿茸神经的再生速度可以达到2 cm/d,这与周围神

经最大生长率1 mm/d形成鲜明对比;秋季,随着茸皮的干枯脱落,鹿茸神经退回到角柄,进入休眠状态,直到第2年春天再生信号启动新一轮的神经再生^[6]。鹿茸神经循环再生的这一独特性在哺乳动物中是绝无仅有的。对鹿茸再生内在机制的研究发现,鹿茸再生的组织基础是角柄骨膜,骨膜剔除试验证实,缺乏角柄骨膜导致鹿茸不能再生,鹿茸神经再生失败,由此确定角柄骨膜细胞在神经再生中发挥着重要作用,有可能通过旁分泌作用诱导鹿茸神经的快速再生。本课题组前期通过单细胞测序、体内体外分化示踪等技术已经证明了角柄骨膜细胞的干细胞属性,定义为鹿茸干细胞(Antler stem cells, ASCs)。与其他间充质干细胞类似,ASCs能够进行多谱系分化,包括成骨、成软骨以及生成脂肪细胞,本课题组前期研究显示,ASCs能分化成神经样细胞,并能够促进人神经瘤母细胞(SK-N-SH)分化,由此推测,ASCs具有促进神经再生修复的作用。因此,本研究在活体水

平探讨 ASCs 对周围神经损伤修复的治疗作用,以期 PNS 的治疗提供新的思路和治疗策略^[7-12]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 成年健康雄性 SD 大鼠 30 只, 6~8 周龄, 150~180 g, 试验手术前适应饲养 7 d。

1.1.2 试验材料 主要试剂: 改良 Masson 三色染色试剂盒(北京, 索莱宝); 碘伏(山东, 益家康); 乙醇(国药集团); 苏木素-伊红染色试剂盒(北京, Solarbio); 德新康牌 75% 乙醇消毒液医用(山东, 德新康); DMEM 培养基(美国, Thermo fisher); 总 RNA 提取试剂盒(北京天根); 免疫显色试剂盒(UltraSensitive SP 鼠/兔, 福州, 迈新); 定量 PCR 专用反转录试剂盒(日本, TaKaRa); 荧光定量 PCR 试剂盒(北京, 全式金); NF200 抗体(美国, Abcam)。

仪器: HS-1000 自动组织脱水机(中国浙江, 华速); BN-802A 石蜡包埋机(中国湖北, 贝诺); RM2255 石蜡切片机(德国, Leica); BN-803A 生物组织摊片烤片机(中国湖北, 贝诺); MY-CD5026P 电压力锅(中国佛山, 美的); M8 数字扫描显微成像系统(德国, Precipoint); 荧光显微镜(美国, Thermo fisher); 荧光定量 PCR 仪(赛默飞世尔科技)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的复苏及传代 ASCs 与 rBMSCs 细胞系来源于吉林省鹿茸生物学重点实验室的细胞库^[13]。细胞的复苏: 完全培养基的配置为 1% 双

抗+10%胎牛血清。从液氮罐中取出需要复苏的细胞, 放入水浴锅中使其快速溶解, 离心重悬后将细胞转移至 75 mL 培养瓶中, 加入 10 mL 完全培养基。

细胞的传代: 取培养至 72 h 细胞形态良好、分布均匀且长满单层的细胞进行传代培养。弃掉上清液, 使用 PBS 冲洗 3 次, 加入 1 mL 胰酶放入培养箱中消化 3 min, 待细胞皱缩变圆、细胞间隙增大时吸去胰酶, 用手敲打培养瓶。加入 2 mL 完全培养基, 轻轻吹打, 将细胞悬液以 1:2 的比例进行传代^[14]。

1.2.2 大鼠坐骨神经损伤模型的建立 大鼠经 10% 水合氯醛(30 mg/kg)腹腔注射麻醉, 局部备皮, 碘伏常规消毒皮肤, 行右侧大腿后外侧切口, 于右侧梨状肌下缘下约 8 mm 处, 游离坐骨神经并用特定止血钳挤压坐骨神经^[15], 每次挤压 8 s, 持续 4 次, 每次间隔 10 s。造成 1 个约 4 mm 的挤压伤。逐层缝合, 再用碘伏消毒。在术后大鼠的伤口处涂抹青霉素以防其术后感染(100 万单位), 然后放置于室温(24~26 °C), 提供充足的食物和水, 并保证在清洁环境下进行行为观察^[16]。

1.2.3 干细胞移植治疗 将模型制备成功的大鼠随机分成 3 组: ASC, rBMSC, 对照(生理盐水), 每组 10 只, 分别于术前 1 d, 术后 3, 5 d 使用尾静脉注射方法进行细胞移植, 每只细胞移植量为 1×10^6 个细胞/次, 对照组注射同等剂量的生理盐水(图 1)。

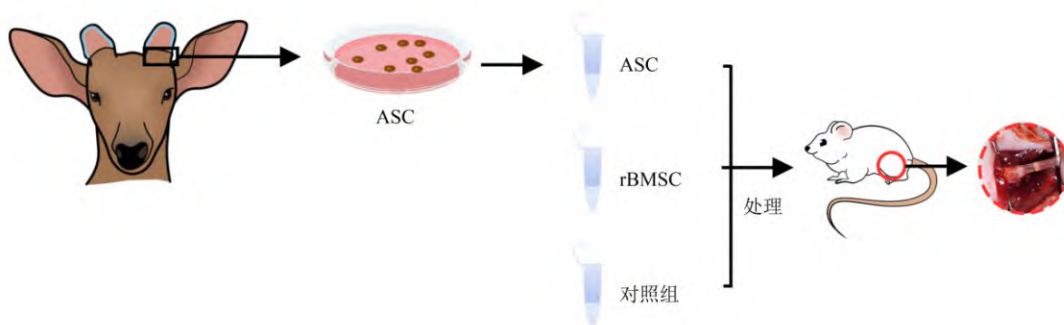


图 1 大鼠坐骨神经损伤模型的构建与干细胞移植治疗模式图

Fig. 1 A schematic of the creation of sciatic nerve injury model in rat and the therapy of stem cell transplantation

术后 7, 21 d, 每组随机处死 5 只大鼠, 取正、患侧腓肠肌, 4% 多聚甲醛固定, 进行组织学染色及分析。术后 7 d 取坐骨神经液氮速冻, 放入 -80 °C 冰箱保存, 提取 RNA 后, 进行 RT-qPCR 检测坐骨神经再生相关因子, 术后 21 d 取 3 只大鼠

坐骨神经放入 4% 多聚甲醛固定, 进行组织学染色及分析。

1.2.4 坐骨神经功能指数(SFI) 将大鼠的后爪刷满墨汁, 让大鼠在白纸(长 1.5 m, 宽 0.5 m)上行走, 每只大鼠至少收集 5 个完整的足印。将这些

数据代入公式, SFI 值为“-100”表示坐骨神经的完全挤压或者横断, 为“0”则代表正常的坐骨神经。正常大鼠为(N), 坐骨神经受损伤大鼠为(E), 相关参数: 整个脚底长(PL, 从脚尖到脚跟的全部距离), 脚趾展宽(TS, 从第1到第5脚趾的距离), 脚趾展宽(IT, 第2至第4脚趾之间的距离)^[17-18]。SFI 计算公式: $SFI = -109.5 \times (E_{TS} - N_{TS}) / N_{TS} - 38.3 \times (E_{PL} - N_{PL}) / N_{PL} + 13.3 \times (E_{IT} - N_{IT}) / N_{IT} - 8.8$ 。

1.2.5 腓肠肌湿重比的检测 剪开大鼠后肢背侧皮肤, 找到腓肠肌的上缘并用镊子夹住, 于腓肠肌起点和跟腱止点处切断, 完整地分离出腓肠肌后, 立即拍照、称重并记录。计算患侧/健侧的腓肠肌湿重比(Wet weight ratio of gastrocnemius muscle, WWRG)。比值接近1, 说明患侧腓肠肌的萎缩情况越轻, 神经功能恢复越好^[19]。

1.2.6 大鼠坐骨神经及腓肠肌 HE 染色 取出固定好的大鼠坐骨神经及腓肠肌, 放入自动脱水机脱水后用二甲苯透明, 石蜡包埋。组织切片后(5 μm)进行 HE 染色。具体方法: 二甲苯脱蜡 14 min, 100% 乙醇浸泡 10 min, 95% 乙醇浸泡 6 min, 80% 乙醇浸泡 2 min, 70% 乙醇浸泡 2 min, 蒸馏水冲洗 3 min, 苏木素染液染色 5 min, 1% 盐酸乙醇溶液分色 15 s, 自来水反蓝 5 min, 70% 乙醇浸泡 5 min, 80% 乙醇浸泡 5 min, 浸入伊红染液染色 3 min, 95% 乙醇 2 min, 100% 乙醇 6 min, 二甲苯透明 10 min, 中性树胶封片^[20]。

1.2.7 大鼠坐骨神经免疫荧光 取大鼠坐骨神经进行脱水包埋后切片, 参照本文“1.2.6”。切片

后进行免疫荧光染色: 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇浸泡, PBS 冲洗 3 min×3 次, 热激法抗原修复, PBS 冲洗 3 min×3 次, 封闭液封闭 30 min, 一抗 NF200 (Neurofilament-200, 1:100) 4 °C 孵育过夜, PBS 冲洗 3 min×3 次, 绿色荧光标记的二抗 IgG (1:200), 37 °C 孵育 1 h (避光), PBS 冲洗 3 min×3 次, DAPI 复染, 水性封片剂封片, 荧光显微镜拍照^[21-22]。

1.2.8 大鼠腓肠肌 Masson 染色 在患侧腓肠肌测量其湿重比后, 将腓肠肌浸入 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 进行 Masson 三色染色。严格按照改良 Masson 三色染色试剂盒(北京索莱宝)说明书进行操作。将染色后的切片置于显微镜下拍照, 用 Image J 图像分析软件, 计算各组肌肉中肌纤维面积。

1.2.9 大鼠坐骨神经 RT-qPCR 以 Trizol 法提取坐骨神经组织总 RNA, 按照总 RNA 提取试剂盒(北京天根)说明书, 测定 RNA 浓度和纯度后, 利用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 然后根据荧光定量试剂盒说明书进行 qPCR 检测。反应体系: 10 μL 2×SYBR Green Master Mix, 上、下游引物各 0.5 μL, 1 μL cDNA 模板, 8 μL DEPC 水, 共 20 μL。反应条件: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 15 s, 共 40 次循环; 最后 72 °C 延伸 16 s, 4 °C 保存。以 *Gapdh* 作为内参基因进行归一化处理, 进行 3 次重复试验, 引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 RT-qPCR Primer Sequences

目的基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
<i>Gapdh</i>	GTGCACTGCCAGCCTCGTCTCATAG	TTTGTCAACAAGAGAAGGCAGCCCT
<i>c-Jun</i>	GCCACCGAGACCGTAAAGAA	TAGCACTCGCCCAACTTCAG
<i>Krox20</i>	TGGGCGAGGGACACACTGA	GCCTGGGATCCGGCTGTTGG
<i>Mpz</i>	AGGACTCCTCGAAGCGCGGG	GCCAGCTTTGCTGCTTCGGC
<i>Periaxin</i>	CTGGGGAAGCGGGTTGCTG	GGCTTGCTCTCAGCCCCTGC

1.3 数据统计

使用 2^{-ΔΔCt} 法进行 RT-qPCR 数据分析, 应用 Graph Prism 9 分析数据差异性并制图, 采用 *T*-test 或 One-way ANOVA 进行检验, “*”表示 *P*<0.05; “**”表示 *P*<0.01; “***”表示 *P*<0.001; “****”表示 *P*<0.000 1。

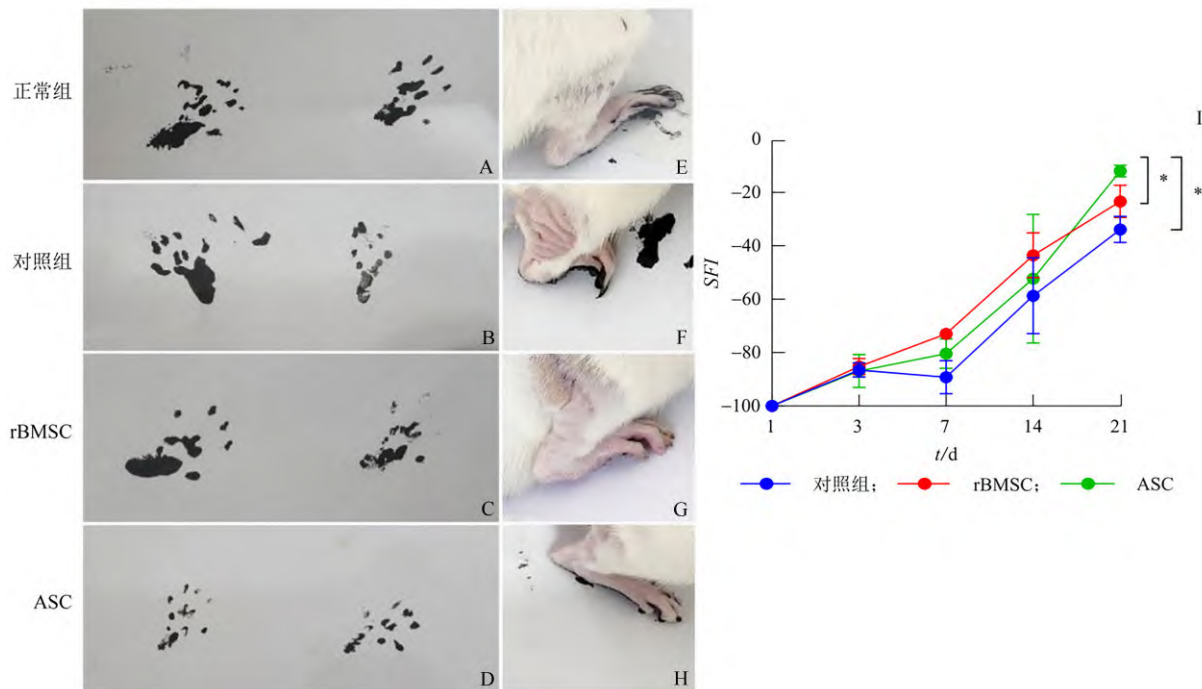
2 结果与分析

2.1 ASCs 促进大鼠运动功能恢复

为了评估 ASCs 是否有助于大鼠恢复神经损伤后运动功能, 于术后 1, 3, 7, 14, 21 d 收集大鼠的行走轨迹并评估。由图 2 可见, 观察大鼠术后

21 d 的步态可见,对照组大鼠的患足处于足趾卷曲状态,行走时脚掌不能完全着地;rBMSC 组大鼠患侧脚掌形态足趾可以舒展,但脚掌也不能完全着地,行走时脚趾受力不均匀;ASC 组大鼠接近未受损大鼠足趾形态,患足能够展开平铺于地板。*SFI* 结果显示(图 2-I),术后 3 d 3 组 *SFI* 值均略微升高;术后 7 d,ASC 组与 rBMSC 组显著升高,对照

组升高缓慢;术后 14 d,ASC 组和 rBMSC 组 *SFI* 值高于对照组;术后 21 d,ASC 组与 rBMSC 组 *SFI* 值更接近于 0,显著高于对照组 ($P<0.05$),其中 ASC 组与 rBMSC 组相比,ASC 组 *SFI* 值升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。由此可见,ASC 组促进大鼠运动功能恢复的能力显著高于对照组与 rBMSC 组。



A~D. 术后 21 d 采集的大鼠足印;E~H. 术后 21 d 大鼠脚步恢复情况;I. 大鼠坐骨神经功能恢复指标 *SFI* 变化情况。rBMSC 组为大鼠骨髓间充质干细胞移植组;ASC 组为鹿茸干细胞移植组。下图同

图 2 大鼠运动功能指数

Fig. 2 Rat motor function index

2.2 ASCs 减轻肌肉萎缩

术后 21 d, 观察术后大鼠腓肠肌萎缩恢复情况可见,对照组手术侧的腓肠肌萎缩程度增大,肌肉体积明显减少,ASC 与 rBMSC 组手术侧腓肠肌萎缩程度较对照组有明显减轻,肌肉萎缩程度较小,体积明显大于对照组(图 3-A)。术后 3 周(图 3-C),ASC 与 rBMSC 组的患侧腓肠肌的湿重比显著高于对照组 ($P<0.01$),ASC 与 rBMSC 两组之间差异不显著。HE 和 Masson 染色结果显示(图 4),ASC 与 rBMSC 组损伤侧肌纤维的总面积明显高于对照组,ASC 与 rBMSC 组虽然差异不显著,但 ASC 组肌纤维总面积平均值高于 rBMSC 组。研究结果表明,被挤压的神经可能会导致其所控制的肌肉萎缩。在所有组中,ASC 组的肌肉萎缩程度明显减轻,可见 ASC 具有良好的神经功能修复潜

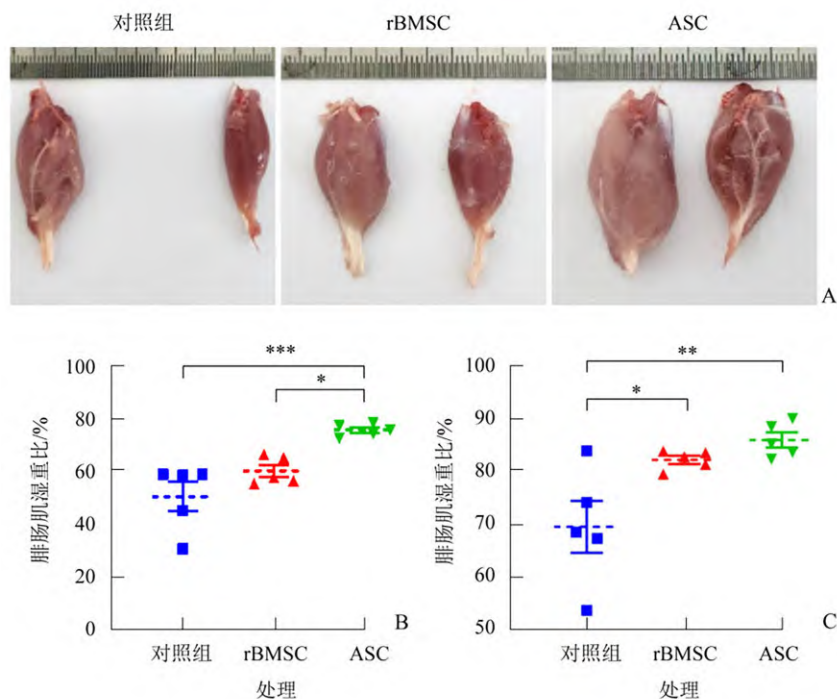
力,从而促进运动功能的恢复(图 4)。这些统计数据表明,ASC 可以预防坐骨神经挤压损伤后的肌肉萎缩,ASC 比 rBMSC 在神经修复方面更具优势。

2.3 ASCs 促进神经修复

组织学染色评估神经损伤后恢复情况,HE 染色结果显示(图 5-A),未受损神经纤维排列致密有序,术后 21 d,对照组神经纤维紊乱稀少、呈不连续状,与对照组相比,ASC 与 rBMSC 移植组神经纤维增多,轮廓清晰,排列规则,更接近于未受损神经组织。神经丝蛋白 200(NF200)是反映神经功能,检测轴突再生状况的一个间接指标,通过免疫荧光染色检测了 NF200 的表达情况。染色结果显示(图 5-B),正常组 NF200 阳性区致密并且排列规律,对照组 NF200 阳性染色稀少并且排列不

规律。ASC 和 rBMSC 组的 NF200 比对照组的阳性神经纤维分布更密集。ASC 和 rBMSC 移植能够有

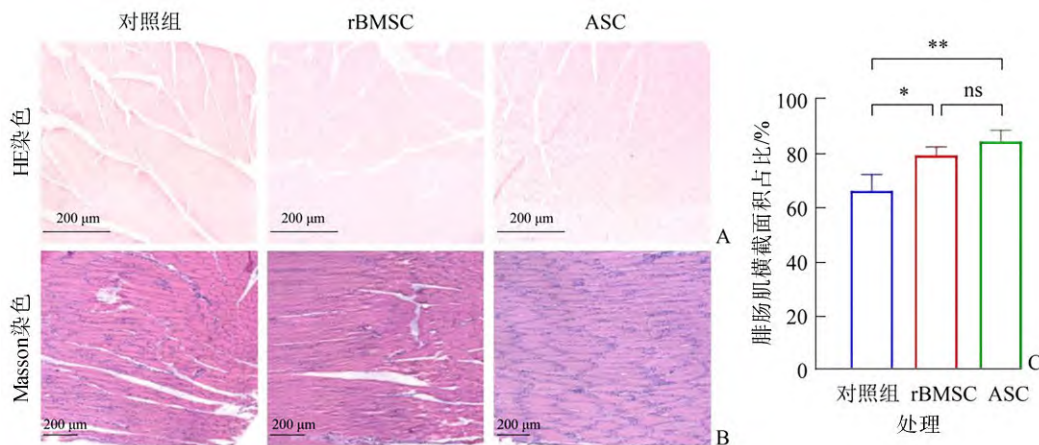
效地促进神经损伤后再生修复,ASC 对神经的修复和再生的作用更明显。



A. 术后21 d收集大鼠正、患侧腓肠肌;B. 术后第7天大鼠正、患侧腓肠肌湿重比;C. 术后21 d大鼠正、患侧腓肠肌湿重比

图3 大鼠腓肠肌湿重比

Fig. 3 Wet weight ratio of rat gastrocnemius muscle



A. 术后21 d大鼠患侧腓肠肌HE染色;B. 术后21 d大鼠患侧腓肠肌Masson染色;C. 腓肠肌横截面积百分比

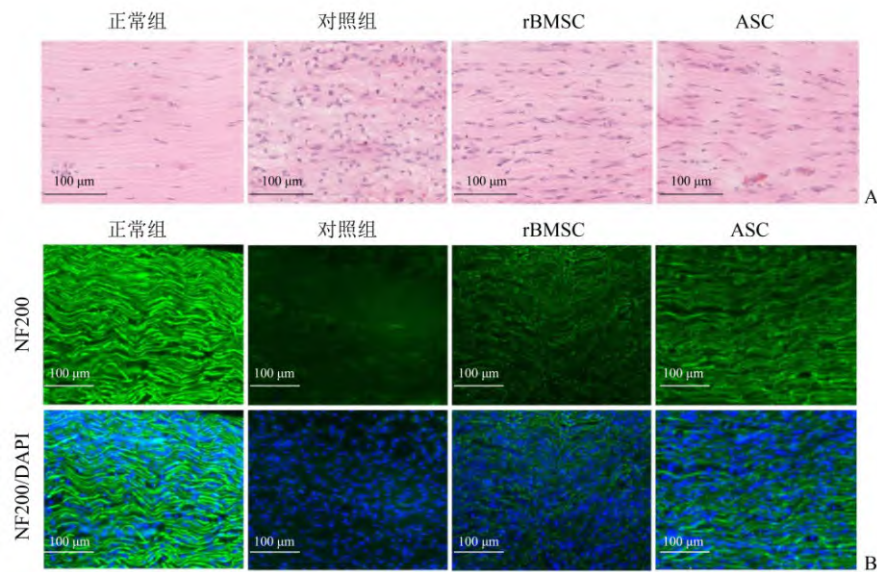
图4 大鼠患侧腓肠肌组织学染色

Fig. 4 Histological staining of the affected gastrocnemius muscle in rats

2.4 ASCs促进神经再生相关基因表达

RT-qPCR检测神经再生相关基因表达,结果显示,与对照组(1.00 ± 0.01)相比,ASC和rBMSC组c-Jun基因表达显著升高,ASC组mRNA表达量最高(2.94 ± 0.35),与rBMSC组相比差异显著($P < 0.05$);髓鞘再生相关基因Periaxin,MPZ与

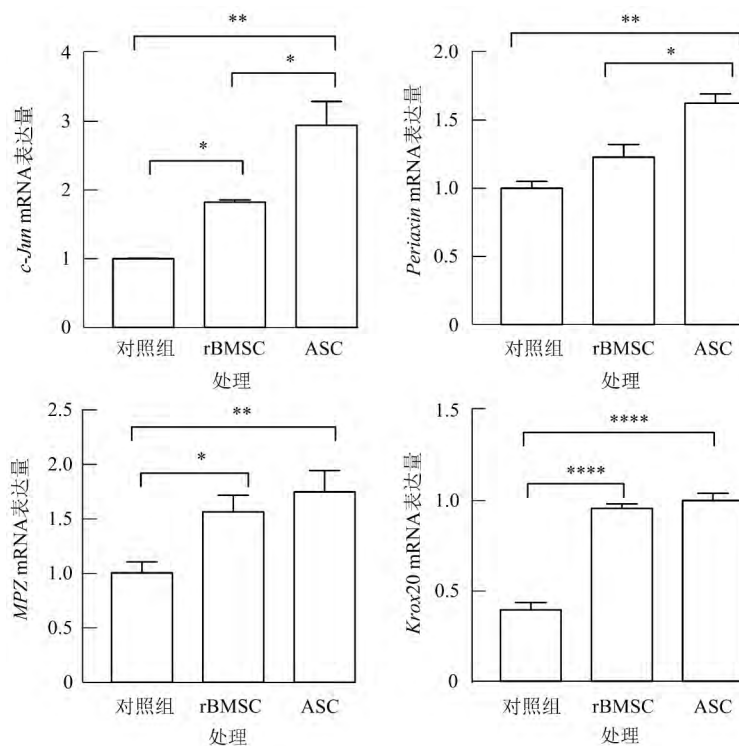
Krox20表达量,ASC组与rBMSC组均显著高于对照组,其中Periaxin基因mRNA表达量ASC组高于rBMSC组,差异有统计学意义(图6)。ASC能够显著促进神经再生相关基因表达,从而发挥促进神经再生修复作用。



A. 大鼠坐骨神经 HE 染色; B. 大鼠坐骨神经 NF200 免疫荧光

图 5 大鼠患侧坐骨神经组织学染色

Fig. 5 Histological staining of the sciatic nerve on the affected side of rats

图 6 *c-Jun*, *Periaxin*, *MPZ*, *Krox20* 基因表达水平Fig. 6 *c-Jun*, *Periaxin*, *MPZ*, *Krox20* gene expression level

3 讨论

周围神经系统疾病给患者带来了难以置信的负担,并极大地降低了他们的生活质量。目前还没有无副作用的有效修复神经损伤的方法,由于缺乏必要的前体细胞和神经细胞的快速凋亡以及

再生速度缓慢,修复受损的周围神经是现阶段医学领域的一大挑战。在过去的10年,间充质干细胞(MSCs)的研究取得了巨大的进展,干细胞在组织再生中的应用越来越广泛。骨髓间充质干细胞首先在成人骨髓的抽吸液中被发现,具有自我增殖能力,并能够在体外分化成多种谱系细胞。据

报道,骨髓源性干细胞(BMSCs)和脂肪组织源性干细胞(ADSCs)都具有通过激活 Notch/Wnt/SHH 通路在体外分化为神经元样/雪旺细胞样细胞的能力,但由于这些干细胞来源有限,限制了其在神经再生修复中的广泛应用^[23-29],因此,探索其他更有效的干细胞进行替代治疗成为了研究热点。

鹿茸干细胞的发现给神经疾病带来了新的希望。鹿茸是哺乳动物中唯一能够完全再生的附属器官,每年能够完成神经、血管、软骨等的完全再生^[30-31]。鹿茸的神经包含髓和无髓2种,这些神经在鹿茸中多与血管并行,GFAP免疫染色发现,鹿茸的神经轴突由雪旺细胞伴随或包裹成鞘,神经纤维束被纤维束膜所包裹。鹿茸神经从角柄的感觉神经断端再生,角柄的感觉神经来源于三叉神经的颧颞分支和眶上分支。每年秋天,茸皮枯死、脱落,鹿茸神经的轴突断端保存于角柄血管层,保持休眠状态,等待下一年春天的再生信号。在鹿茸快速生长期,鹿茸神经的再生速度能够达到2 cm/d,这在哺乳动物中是绝无仅有的,因此揭示诱导鹿茸神经快速再生的因子与机制,对开发神经损伤的治疗策略有重大意义^[32]。课题组前期通过骨膜移植试验证实,角柄骨膜是鹿茸包括鹿茸神经再生组织的基础,角柄骨膜细胞被鉴定为介于胚胎干细胞与成体干细胞之间的间充质干细胞,定义为鹿茸干细胞(Antler stem cells, ASCs),ASCs来源于神经嵴,具有与神经细胞相似的特征,并且鹿茸神经能够快速再生,这些说明鹿茸干细胞在诱导神经损伤后再生修复中可能具有巨大的应用潜力。

前期研究发现,ASCs培养液处理人的神经瘤母细胞(SK-N-SH),能够显著促进细胞分化,再生神经轴突。而鹿体细胞,即脸部骨膜细胞,却没有这种促进作用(未发表),说明ASCs具有刺激神经生长、分化的特性。在本研究中,进一步在活体水平探讨了ASCs对大鼠周围神经挤压伤的修复作用,大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone marrow mesenchymal stem cells, rBMSCs)作为阳性对照。组织学结果显示,与对照相比,ASCs与rBMSCs治疗后再生神经纤维数目增多,排列规则,而对照组再生神经纤维排列紊乱且数目减少,说明ASCs与rBMSCs对大鼠神经损伤有促进修复作用。SFI作为评估周围神经损伤模型中功能恢复的最重要的

指标之一,是检测大鼠坐骨神经损伤模型神经功能恢复的金标准。在本研究中,术后第7天开始,ASCs与rBMSCs治疗后SFI显著提高,术后第21天,ASCs治疗组显著高于对照组与rBMSCs,表明大鼠坐骨神经功能恢复优于其他2组。腓肠肌是受坐骨神经支配的最重要的肌肉之一。当神经功能受损时,腓肠肌因去神经支配而发生蛋白质降解和肌细胞萎缩,同时发生结缔组织增生。随着神经功能的恢复和神经的再支配,肌肉萎缩可以停止和逆转。湿重比统计与肌纤维面积评估结果显示,ASCs治疗组肌肉萎缩有所延缓,且肌纤维面积大于对照组与rBMSCs治疗组。因此,本研究从活体水平验证了ASCs具有良好的促神经再生作用,表明ASCs是神经再生的理想细胞来源。

雪旺细胞(Schwann cells, SCs)是周围神经系统的支持细胞,可以分化为髓鞘,并能够增殖、迁移到受损神经区域远端,在神经受损后转化为修复型雪旺细胞,对于维持周围神经损伤后再生发挥重要作用。c-Jun作为维持雪旺细胞修复表型的关键因子,能维持雪旺细胞的修复表型,并且能通过激活下游基因转录促进损伤后的轴突再生^[33-37]。本研究发现,与对照组相比,ASCs与rBMSCs移植组能显著提高c-Jun基因的表达,并且ASCs与rBMSCs两组之间,ASCs升高更显著,说明ASCs可能通过上调c-Jun信号通路诱导周围神经再生。

髓鞘作为周围神经系统的重要组成部分,损伤后再生情况对神经功能的恢复也起着关键作用。髓磷脂零蛋白(MPZ)是周围神经髓磷脂的主要结构蛋白;Periaxin是一种雪旺细胞中特异表达的支架蛋白,参与髓鞘成熟与稳定。Periaxin基因敲除小鼠髓鞘纤维可正常发育,但雪旺细胞在神经发育过程中的伸长程度受损,导致节间距离减小,降低神经传导速度,影响运动功能。同样,Krox20在外周神经髓鞘形成过程中是一种重要的转录因子,Krox20部分地调节胆固醇/脂质生物合成基因的表达。通过qPCR技术检测了3种髓鞘再生相关基因的表达情况,发现ASCs移植显著上调了3种基因mRNA的表达量,由此推测,ASCs可能通过上调MPZ, Periaxin与Krox20基因表达促进周围神经损伤后髓鞘再生,有助于神经功能恢复。

综上,本研究通过构建大鼠坐骨神经挤压损伤模型,证实了ASCs能够通过激活c-Jun信号通路、上调*MPZ*,*Periaxin*与*Krox-20*表达水平,从而促进坐骨神经损伤再生修复,显著提高大鼠坐骨神经损伤后功能恢复。但ASCs调控坐骨神经损伤再生修复的内在机制尚不清楚,后续研究将积极探讨ASCs发挥作用的机制,由于干细胞移植受免疫原性的限制,深入探讨ASCs通过哪些旁分泌因子发挥促神经再生作用将对临床治疗周围神经损伤具有重要意义。

参考文献:

- [1] Zhang Y J, Luo H L, Zhang Z Q, et al. A nerve graft constructed with xenogeneic acellular nerve matrix and autologous adipose-derived mesenchymal stem cells [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(20): 5312-5324.
- [2] Berrocal Y A, Almeida V W, Gupta R, et al. Transplantation of Schwann cells in a collagen tube for the repair of large, segmental peripheral nerve defects in rats [J]. *Journal of Neurosurgery*, 2013, 119(3): 720-732.
- [3] Yu T H, Xu Y X, Ahmad M A, et al. Exosomes as a promising therapeutic strategy for peripheral nerve injury [J]. *Current Neuropharmacology*, 2021, 19(12): 2141-2151.
- [4] Liu G M, Wang X K, Shao G X, et al. Genetically modified Schwann cells producing glial cell line-derived neurotrophic factor inhibit neuronal apoptosis in rat spinal cord injury [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 9(4): 1305-1312.
- [5] 李春义. 鹿茸完全再生机制研究进展 [J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25(1): 1-10.
- [6] 孟庆玲, 郑明显. 鹿茸在民族医学中的应用特点及现代药理学作用 [J]. *中国民族医药杂志*, 2021, 27(5): 49-51.
- [7] 鲁晓萍, 王大涛, 孙红梅, 等. 鹿茸发育的组织来源及其相互作用机制研究进展 [J]. *特产研究*, 2014, 36(1): 61-63.
- [8] 褚文辉, 王大涛, 鲁晓萍, 等. 基于干细胞的器官再生研究模型-鹿茸 [J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(45): 7961-7967.
- [9] Li C Y, Harper A, Puddick J, et al. Proteomes and signalling pathways of antler stem cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30026.
- [10] Wang D T, Berg D, Ba H X, et al. Deer antler stem cells are a novel type of cells that sustain full regeneration of a mammalian organ-deer antler [J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(6): 443.
- [11] 郝瑞峰, 申长虹. 骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导的研究现状 [J]. *天津医科大学学报*, 2007, 13(1): 129-131.
- [12] Fan B Y, Li C, Szalad A, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes ameliorate peripheral neuropathy in a mouse model of diabetes [J]. *Diabetologia*, 2020, 63(2): 431-443.
- [13] Guo Q Q, Zheng J J, Lin H B, et al. Conditioned media of Deer antler stem cells accelerate regeneration of alveolar bone defects in rats [J]. *Cell Proliferation*, 2023, 56(5): e13454.
- [14] 唐雪, 马海田. 一种改良的鸡胚原代肝细胞的分离培养方法 [J]. *南京农业大学学报*, 2008, 31(4): 154-156.
- [15] 姚阳, 车敏, 滕松龄, 等. miR-124 在大鼠坐骨神经损伤后的表达及对雪旺细胞增殖与迁移的影响 [J]. *解剖科学进展*, 2020, 26(2): 158-161.
- [16] Mimura T, Dezawa M, Kanno H, et al. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats [J]. *Journal of Neurosurgery*, 2004, 101(5): 806-812.
- [17] Jahromi M, Razavi S, Seyedebrahimi R, et al. Regeneration of rat sciatic nerve using PLGA conduit containing rat ADSCs with controlled release of BDNF and gold nanoparticles [J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2021, 71(4): 746-760.
- [18] Nie X, Zhang Y J, Tian W D, et al. Improvement of peripheral nerve regeneration by a tissue-engineered nerve filled with ectomesenchymal stem cells [J]. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2007, 36(1): 32-38.
- [19] 王琳, 裴双, 郭斌, 等. 骨髓间充质干细胞来源的外泌体用于大鼠脊髓损伤修复的初步探索 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(5): 862-869.
- [20] Luo H B, Xu C S, Liu Z W, et al. Neural differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells with human brain-derived neurotrophic factor gene-modified in functionalized self-assembling peptide hydrogel in vitro [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(3): 2828-2835.
- [21] Ren Z W, Wang Y, Peng J, et al. Role of stem cells in the regeneration and repair of peripheral nerves [J]. *Reviews in the Neurosciences*, 2012, 23(2): 135-143.
- [22] Zhang Q Z, Nguyen P, Xu Q L, et al. Neural progenitor-like cells induced from human gingiva-derived mesenchymal stem cells regulate myelination of schwann cells in rat sciatic nerve regeneration [J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2017, 6(2): 458-470.
- [23] Du W J, Chi Y, Yang Z X, et al. Heterogeneity of proangiogenic features in mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord, and placenta [J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2016, 7(1): 163.
- [24] Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(5): 1294-1301.
- [25] 刘铨, 杜斌, 高丽丽, 等. 右归饮干预激素性股骨头坏死大鼠骨髓间充质干细胞的自噬及命运 [J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(1): 20-25.
- [26] Corfas G, Velardez M O, Ko C P, et al. Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2004, 24(42): 9250-9260.

- [27] Li D, Huang S, Zhu J L, et al. Exosomes from miR-21-5p-increased neurons play a role in neuroprotection by suppressing Rab11a-mediated neuronal autophagy *in vitro* after traumatic brain injury[J]. Medical Science Monitor, 2019, 25: 1871-1885.
- [28] Walsh S K, Kumar R, Grochmal J K, et al. Fate of stem cell transplants in peripheral nerves[J]. Stem Cell Research, 2012, 8(2): 226-238.
- [29] Walsh S, Midha R. Practical considerations concerning the use of stem cells for peripheral nerve repair[J]. Neurosurgical Focus, 2009, 26(2): E2.
- [30] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 336-337.
- [31] 张琦, 杨春, 孙胜楠, 等. UC法和exoEasy法提取鹿茸间充质干细胞外泌体的比较[J]. 吉林农业大学学报, 2024, 46(1): 140-147.
- [32] 王大涛. 鹿茸干细胞的鉴定以及鹿茸再生关键调控基因的筛选[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [33] 李东海, 周安宁. 周围神经损伤后局部应用神经生长因子对骨折早期愈合的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2014, 17(22): 68-69.
- [34] Wakefield A E, Ho S Y, Li X G, et al. The use of lipid-coated microbubbles as a delivery agent of 7 beta-hydroxycholesterol in a radiofrequency lesion in the rat brain[J]. Neurosurgery, 1998, 42(3): 592-598.
- [35] 吕鹤, 袁云. 神经生长因子与周围神经疾病[J]. 神经损伤与功能重建, 2013, 8(6): 394-396.
- [36] 徐莉. 神经生长因子的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(1): 131-134.
- [37] Liu Y R, Liu Q, Tian Y. Meta-analysis of mNGF therapy for peripheral nerve injury: a systematic review [J]. Chinese Journal of Traumatology, 2012, 15(2): 86-91.