

## 脂肪源性干细胞联合脱细胞支架对坐骨神经损伤大鼠脊神经节的保护作用及其机制

于晓敏<sup>1</sup>, 朱清华<sup>2</sup>, 王一伦<sup>2</sup>, 任森<sup>2</sup>, 刘子嘉<sup>2</sup>, 余泳仪<sup>2</sup>, 杜元良<sup>3</sup>, 刘东慧<sup>2</sup>, 郭森<sup>2</sup>, 付秀美<sup>2,4</sup>

(1. 承德医学院临床技能教学中心, 河北承德 067000; 2. 承德医学院基础医学院人体解剖学教研室, 河北承德 067000; 3. 承德医学院附属医院骨外科, 河北承德 067000; 4. 河北省神经损伤与修复重点实验室, 河北承德 067000)

**[摘要]** **目的:** 观察脂肪源性干细胞(ADSC)联合脱细胞支架(AS)对坐骨神经损伤(SNI)大鼠脊神经节超微结构和睫状神经营养因子(CNTF)、Janus激酶2(JAK2)、磷酸化JAK2(p-JAK2)、信号转导与转录激活因子3(STAT3)和磷酸化STAT3(p-STAT3)蛋白及mRNA表达的影响, 阐明ADSC联合AS对SNI大鼠脊神经节的保护作用及其可能机制。**方法:** 分离培养大鼠ADSC并检测其多向分化潜能。制备大鼠AS, 将ADSC注入至AS中构建组织工程神经。36只大鼠随机分为对照组、模型组、AS组和ADSC+AS组。对照组大鼠常规饲养, 不进行任何处理, 其余各组大鼠采用切除右侧坐骨神经10 mm的方法建立SNI模型, 模型组不再处理, AS组和ADSC+AS组大鼠分别将AS和构建的组织工程神经桥接于损伤神经的两断端处。术后6周, 采用透射电镜观察各组大鼠脊神经节超微结构, 免疫荧光法检测各组大鼠脊神经节中CNTF、p-JAK2和p-STAT3蛋白表达水平, 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测各组大鼠脊神经节中CNTF、JAK2和STAT3 mRNA表达水平。**结果:** 原代ADSC培养7 d, 倒置显微镜下可见数量较多、体积较大且呈长梭形的细胞, 类似簇状或旋涡状排列; 油红O染色镜下可见细胞中红色的脂滴, 茜素红染色镜下可见钙化结节, 表明分离培养的细胞具有多向分化能力。与正常神经组织比较, 大鼠AS中DNA水平明显降低( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 模型组大鼠脊神经节中细胞核膜凹凸不平, 呈锯齿状改变, 胞质内细胞器数目减少, 线粒体肿胀、嵴断裂或缺失, 结构不清晰; CNTF蛋白和mRNA表达水平均明显降低( $P < 0.01$ ), p-JAK2和p-STAT3蛋白表达水平均明显升高( $P < 0.01$ ), JAK2和STAT3 mRNA表达水平均明显升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较, AS组大鼠脊神经节中细胞核膜锯齿状改变明显减轻, 胞质中细胞器数量增加, 线粒体肿胀减轻; ADSC+AS组大鼠脊神经节中细胞核膜趋向完整, 细胞器数量增加, 线粒体肿胀和空泡化明显减轻; AS组和ADSC+AS组大鼠脊神经节中CNTF蛋白和mRNA表达水平均明显升高( $P < 0.01$ ), p-JAK2和p-STAT3蛋白表达水平均明显降低( $P < 0.01$ ), JAK2和STAT3 mRNA表达水平明显降低( $P < 0.01$ )。与AS组比较, ADSC+AS组大鼠脊神经节中CNTF蛋白和mRNA表达水平均明显升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), p-JAK2和p-STAT3蛋白表达水平均明显降低( $P < 0.01$ ), JAK2和STAT3 mRNA表达水平明显降低( $P < 0.01$ )。**结论:** ADSC联合AS应用可改善SNI大鼠脊神经节超微结构, 其机制可能与ADSC联合AS应用可增加脊神经节中CNTF表达、降低JAK2/STAT3信号通路活化有关。

**[关键词]** 脂肪源性干细胞; 脱细胞支架; 睫状神经营养因子; Janus激酶2; 信号转导与转录激活

[收稿日期] 2025-01-12

[录用日期] 2025-02-12

[基金项目] 河北省科技厅自然科学基金项目(H2021406056); 河北省教育厅高等学校科学技术研究项目(ZD2020178); 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); 承德医学院大学生创新创业训练计划项目(2022136, 2024074)

[作者简介] 于晓敏(1973—), 女, 河北省承德市人, 副教授, 医学硕士, 主要从事神经损伤和修复方面的研究。

[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.

因子3信号通路; 脊神经节

[中图分类号] R322.85 [文献标志码] A

## Protective effect of adipose-derived stem cells combined with acellular scaffolds on dorsal root ganglion in rats with sciatic nerve injury and its mechanism

YU Xiaomin<sup>1</sup>, ZHU Qinghua<sup>2</sup>, WANG Yilun<sup>2</sup>, REN Miao<sup>2</sup>, LIU Zijia<sup>2</sup>, YU Yongyi<sup>2</sup>,  
DU Yuanliang<sup>3</sup>, LIU Donghui<sup>2</sup>, GUO Sen<sup>2</sup>, FU Xiumei<sup>2,4</sup>

(1. Clinical Skills Teaching Center, Chengde Medical University, Chengde 067000, China; 2. Department of Human Anatomy, School of Basic Medical Sciences, Chengde Medical University, Chengde 067000, China; 3. Department of Bone Surgery, Affiliated Hospital, Chengde Medical University, Chengde 067000, China; 4. Key Laboratory of Nerve Injury and Repair, Hebei Province, Chengde 067000, China)

**ABSTRACT** **Objective:** To observe the effects of adipose-derived stem cells (ADSC) combined with acellular scaffold (AS) on the ultrastructure of dorsal root ganglion and the protein and mRNA expression levels of ciliary neurotrophic factor (CNTF), Janus kinase 2 (JAK2), phosphorylated JAK2 (p-JAK2), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and phosphorylated STAT3 (p-STAT3) in the rats with sciatic nerve injury (SNI), and to clarify the protective effect of ADSC combined with AS on dorsal root ganglion in the SNI rats and its possible mechanism. **Methods:** The rat ADSCs were isolated and cultured and their multidirectional differentiation potential was detected. The AS of rats was prepared, and ADSCs were injected into the AS to construct tissue-engineered nerve. A total of 36 rats were randomly divided into control group, model group, AS group, and ADSC+AS group. The rats in control group were routinely fed, and the rats in other groups were used to establish the SNI models by resecting 10 mm of right sciatic nerve. The rats in model group received no further treatment, while the rats in AS group and ADSC+AS group were bridged with AS and the constructed tissue-engineered nerve at the two ends of the injured nerve, respectively. At 6 weeks after surgery, transmission electron microscope was used to observe the ultrastructure of dorsal root ganglion of the rats in various groups; immunofluorescence method was used to detect the protein expression levels of CNTF, p-JAK2, and p-STAT3 in dorsal root ganglion of the rats; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the mRNA expression levels of *CNTF*, *JAK2*, and *STAT3* in dorsal root ganglion of the rats in various groups. **Results:** After 7 d of primary ADSC culture, a large number of large and long spindle-shaped cells were observed under the inverted microscope, arranged in clusters or whirlpools; red lipid droplets were observed with oil red O staining under microscope, and calcified nodules were observed with Alizarin red staining under microscope, indicating that the isolated and cultured cells had multidirectional differentiation ability. Compared with normal nerve tissue, the level of DNA in AS of rats was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, the nuclear membrane of dorsal root ganglion cells in model group was uneven and serrated, the number of organelles in the cytoplasm was decreased, mitochondria were swollen with broken or missing cristae and unclear structure; the CNTF protein and mRNA expression levels were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), the p-JAK2 and p-STAT3 protein expression levels were significantly increased ( $P < 0.01$ ), and the *JAK2* and *STAT3* mRNA expression levels were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, the serrated change of nuclear membrane of the dorsal root ganglion cells in AS group was significantly alleviated, the number of organelles in the cytoplasm was increased, and mitochondrial swelling was reduced; in ADSC+AS group, the nuclear membrane of dorsal root ganglion cells tended to be intact,

the number of organelles was increased, and mitochondrial swelling and vacuolization were significantly reduced; the CNTF protein and mRNA expression levels in the dorsal root ganglion in AS group and ADSC+AS group were significantly increased ( $P<0.01$ ), the p-JAK2 and p-STAT3 protein expression levels were significantly decreased ( $P<0.01$ ), and the JAK2 and STAT3 mRNA expression levels were significantly decreased ( $P<0.01$ ). Compared with AS group, the CNTF protein and mRNA expression levels in ADSC+AS group were significantly increased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), the p-JAK2 and p-STAT3 protein expression levels were significantly decreased ( $P<0.01$ ), and the JAK2 and STAT3 mRNA expression levels were significantly decreased ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** The application of ADSC combined with AS can improve the ultrastructure of dorsal root ganglion in the SNI rats, and the mechanism may be related to the increased CNTF expression and decreased activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway in the dorsal root ganglion by ADSC combined with AS application.

**KEYWORDS** Adipose-derived stem cells; Acellular scaffold; Ciliary neurotrophic factor; Janus kinase 2; Signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway; Dorsal root ganglion

周围神经损伤(peripheral nerve injury, PNI)是指周围神经干或其分支因挤压、割裂、肿瘤、药物和代谢紊乱等造成的损伤,常导致感觉和运动功能部分或完全丧失<sup>[1]</sup>。小于3 mm的神经损伤可采用损伤断端相互吻合的方法进行修复,长距离的神经损伤因不能直接吻合而成为临床治疗的难点<sup>[2]</sup>。传统治疗长距离PNI的方法主要是自体神经移植,但自体神经移植存在供体来源选择受限、供区因失去神经支配而导致功能障碍以及二次手术修复等问题<sup>[3]</sup>。因此制备组织工程化神经成为修复长距离PNI的研究热点。脂肪源性干细胞(adipose-derived stem cell, ADSC)是从脂肪组织中分离且具有多向分化潜能的一类干细胞<sup>[4]</sup>。ADSC因其来源广泛、分离培养操作简单、体外扩增能力强且迅速、衰老慢和免疫原性低等特点,成为种子细胞的主要来源<sup>[5]</sup>。脱细胞支架(acellular scaffold, AS)是本课题组采用化学除垢剂法制备、并经实验证明的修复长距离神经缺损的良好支架<sup>[6]</sup>。本课题组前期研究<sup>[7-8]</sup>证实:AS与ADSC联合可通过增加坐骨神经传导速度和波幅、增加胫前肌湿重比率、促进神经营养因子表达和改善脊髓神经元的形态结构等进而发挥促进损伤神经再生修复的作用。但关于二者联合对于脊神经节的保护作用及其机制尚未见相关报道。

脊神经节是脊神经后根与前根汇合成脊神经前形成的梭形膨大部分,其内含有假单极神经元,是感觉神经元胞体所在的部位,其功能状态与损伤神经的再生修复密切相关<sup>[9]</sup>。Janus激酶(Janus kinase, JAK)/信号转导与转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)信号通路(JAK/STAT)是细胞内信号转导通路,

参与了细胞分化、增殖、凋亡、免疫调节和炎症等多种病理生理过程<sup>[10]</sup>。研究<sup>[11]</sup>显示:JAK/STAT信号通路参与了PNI及再生修复的信号网络调控,但其具体作用机制有待进一步揭示。本研究采用ADSC联合AS构建组织工程神经用以桥接损伤的坐骨神经,观察脊神经节的超微结构,检测脊神经节中睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)、磷酸化JAK2(phosphorylated JAK2, p-JAK2)/JAK2和磷酸化STAT3(phosphorylated STAT3, p-STAT3)/STAT3蛋白及mRNA表达水平,进一步阐明ADSC联合AS促进损伤神经再生以及保护脊神经节的作用及其机制,为组织工程神经的临床转化与应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、主要试剂和仪器** SPF级健康SD大鼠55只购于北京华阜康科技有限公司,实验动物生产合格证号:SCXK(京)2019-0008,实验动物使用许可证号:SYXK(冀)2022-002。10只体质量为80~120 g的雄性SD大鼠用于ADSC的分离培养和鉴定;9只体质量为250~280 g的雄性SD大鼠用于AS制备;36只雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组、AS组和ADSC+AS组,每组9只。本研究经过承德医学院实验动物管理和伦理委员会批准,批准文号:CDMULAC-20221005,实验过程及操作均符合国家有关实验动物的管理和使用规定。DMEM/F12培养基购于美国Genview公司,0.25%胰蛋白酶-EDTA和I型胶原酶购于美国Invitrogen公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购于以色列BI公司,地塞米松、茜素红、

$\beta$ -甘油磷酸钠和维生素C购于美国Sigma公司, 兔抗p-JAK2抗体、兔抗p-STAT3抗体和Cy3标记山羊抗兔IgG荧光二抗购于美国Abclonal公司, 抗荧光淬灭封片液购于上海碧云天生物技术公司, ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒购于南京Vazyme生物技术公司。BX43荧光显微镜购自日本Olympus公司, FQD-96A荧光定量PCR检测系统购于杭州博日科技股份有限公司。

### 1.2 原代ADSC的分离培养及其分化能力检测

采用2%戊巴比妥钠( $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )腹腔注射麻醉大鼠10只, 无菌条件下分离获取双侧附睾旁的脂肪组织, 充分清洗并剪碎。采用0.1% I型胶原酶消化获取组织45~60 min, 后加入含10% FBS DMEM/F12培养基终止消化, 置于200目滤网进行过滤,  $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 获取细胞沉淀。向沉淀中加入适量含10% FBS DMEM/F12培养液, 制成单细胞悬液, 接种于25 mL培养皿中, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 的孵育箱内进行培养, 倒置显微镜下观察细胞的生长情况。48 h后第1次换液, 然后根据细胞生长情况每2~3 d换液1次。当细胞铺满皿底约80%时, 采用0.25%胰蛋白酶-EDTA消化, 按1:2比例进行传代培养。选取第3代ADSC, 检测其向脂肪细胞和成骨细胞的分化能力, 将细胞密度调整为每毫升 $1\times 10^5$ 个细胞, 接种于带有无菌盖玻片的6孔细胞培养板上, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 孵育箱内进行培养。当细胞生长到约80%融合时, 分别更换为成脂诱导培养液, 培养10~14 d后进行油红O染色, 镜下观察红染的脂滴, 证明其可以向脂肪细胞进行分化; 更换为成骨诱导培养液, 培养25~28 d后进行茜素红染色, 镜下观察钙化的结节, 证明其可以向成骨细胞分化。

**1.3 大鼠AS制备** 按照参考文献[12-13]中的方法制备AS。采用2%戊巴比妥钠( $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )腹腔注射麻醉9只大鼠。在无菌条件下仔细分离并切取双侧坐骨神经15 mm, 放于专用容器中进行脱细胞处理。蒸馏水中浸浴12 h, 加入4.0% Triton X-100的溶液中消化12 h, 蒸馏水漂洗坐骨神经3 h, 加入3%脱氧胆酸钠溶液, 于脱色摇床上以每分钟100次的速率持续振荡12 h, 重复以上步骤1次, 蒸馏水漂洗坐骨神经过夜, 放于含有抗生素的 $0.01\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。将正常神经和制备的AS用组织研磨仪充分研磨后采用DNA含量提取试

剂盒进行组织DNA提取, 超微量分光光度计测定DNA水平, 与正常神经比较差异有统计学意义, 证实AS制备成功。

**1.4 组织工程神经构建** 将ADSC调至密度为每毫升 $1\times 10^6$ 个细胞, 使用微量注射器取25  $\mu\text{L}$  ADSC细胞悬液, 从AS的一端注射, 当微量注射器后退时在等距离的4个点注入等量细胞, 然后放于培养皿中, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 孵育箱中培养72 h后可移植吻合到ADSC+AS组大鼠损伤神经的两断端处。

**1.5 大鼠坐骨神经损伤(sciatic nerve injury, SNI)模型的制备、动物分组和处理** 选取36只大鼠随机分为对照组、模型组、AS组和ADSC+AS组, 每组9只。对照组大鼠常规饲养, 不进行任何处理。其余各组大鼠切除右侧坐骨神经10 mm建立SNI模型, 待模型成功建立后模型组大鼠不再进行其他处理, AS组大鼠将AS桥接于损伤神经的两断端处, ADSC+AS组大鼠将制备好的组织工程神经端-端缝合于损伤神经的两断端处。各组大鼠术后局部注射抗生素, 进行抗感染治疗, 治疗时间为6周。

### 1.6 透射电镜观察各组大鼠脊神经节超微结构

每组随机取3只大鼠, 采用2%戊巴比妥钠( $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )麻醉大鼠, 经心脏依次灌注生理盐水、多聚甲醛和戊二醛的混合液, 取出与坐骨神经相连接的脊神经节。将其切成 $1\ \text{mm}\times 1\ \text{mm}\times 1\ \text{mm}$ 大小的组织块, 依次经3.1%戊二醛固定2 h、PBS缓冲液漂洗、1%锇酸行后固定、梯度丙酮脱水和环氧树脂包埋, 行超薄切片, 铀、铅双染, 置于H-7650型透射电镜下观察各组大鼠脊神经节超微结构。

**1.7 免疫荧光法检测各组大鼠脊神经节中CNTF、p-JAK2和p-STAT3蛋白表达水平** 每组随机选取3只大鼠, 采用2%戊巴比妥钠( $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )腹腔注射麻醉大鼠。左心室依次灌注生理盐水和4%多聚甲醛后, 取出与坐骨神经相连接的脊神经节组织。放于4%多聚甲醛溶液中固定24 h, 浸于20%、30%蔗糖溶液中脱水, OCT包埋, 制作冰冻切片。切片经 $0.01\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS缓冲液漂洗3次后滴加0.2% Triton X-100透膜15 min,  $0.01\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS缓冲液漂洗3次, 置于 $0.01\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸-柠檬酸钠抗原修复液微波修复8 min,  $0.01\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS缓冲液漂洗, 加入山羊血清 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭1 h, 滴加一抗CNTF抗体(1:200)、p-JAK2抗体(1:100)和p-STAT3(1:200), 放于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过

夜。第2天取出切片复温10~15 min,经 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS缓冲溶液充分漂洗后加入Cy3山羊抗兔IgG(1:400)于 $37^\circ\text{C}$ 避光孵育1 h, $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS缓冲液漂洗后滴加抗荧光淬灭封片液进行封片,置于荧光显微镜下观察并采集图像。采用Image J软件检测目的蛋白平均荧光密度,以平均荧光密度代表目的蛋白表达水平。

### 1.8 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)法检测各组大鼠脊神经节中CNTF、JAK2和STAT3 mRNA表达水平

每组随机选取3只大鼠,采用2%戊巴比妥钠( $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )腹腔注射麻醉大鼠。左心室灌注生理盐水,取出与坐骨神经相连接的脊神经节组织。采用RNA isolater提取总RNA,测定样品纯度和浓度,使用FQD-96A荧光定量PCR仪,按照ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒说明书操作,检测目的基因mRNA表达水平。引物设计见表1。PCR反应条件: $95^\circ\text{C}$ 、30 s预变性; $95^\circ\text{C}$ 、10 s, $60^\circ\text{C}$ 、30 s,共40个循环; $95^\circ\text{C}$ 、15 s, $60^\circ\text{C}$ 、60 s, $95^\circ\text{C}$ 、15 s,熔解。以GAPDH为内参,每组设3个重复,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因mRNA表达水平。

1.9 统计学分析 采用GraphPad Prism 8软件进行统计学分析。各组大鼠脊神经节中CTNF、p-JAK2/JAK2和p-STAT3/STAT3蛋白及mRNA表达水

表1 PCR引物序列

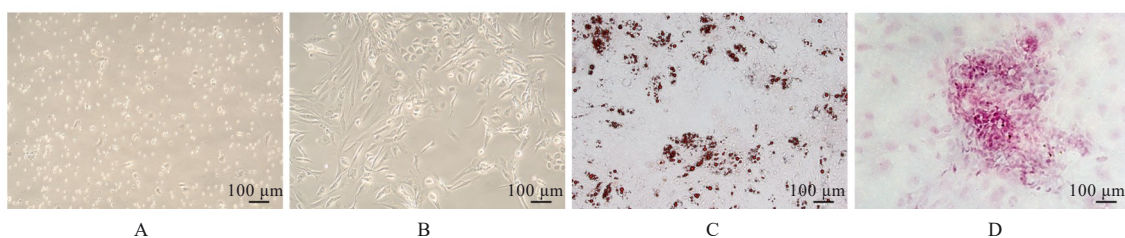
Tab.1 Primer sequences of RT-qPCR

Primer	Sequence(5'-3')
CNTF	Forward GGAGTTAATGGTGCTTCTGGAA
	Reverse GCGAATGGCTACATCTGCTTA
JAK2	Forward GCTCCTCTCCTTGACGACTT
	Reverse TACCTTATCCGCTTCCGAGTTA
STAT3	Forward GCAGGATGGCTCAGTGGAA
	Reverse GCTTGATTCTTCCGAGGTTGT
GAPDH	Forward GGAGCGTGGCTACTCTTTTG
	Reverse GGCTGGAAGAGTGTCTCAGG'

平均符合正态分布,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Bonferroni-t检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 ADSC形态学表现和多向分化能力 原代培养1 d,镜下观察可见少量的单一排列的细胞,呈短梭形(图1A)。继续培养至7 d,胞体明显增加,细胞呈长梭形或者杆状,排列呈簇状或者旋涡状(图1B)。油红O染色后镜下可见红染的脂滴(图1C),表明ADSC具有向脂肪细胞分化的能力;茜素红染色镜下可见钙化结节(图1D),表明ADSC具有向成骨细胞分化的能力。



A: Primary ADSC after culture for 24 h; B: Primary ADSC after culture for 7 d; C: Oil red O staining of ADSC; D: Alizarin red staining of ADSC.

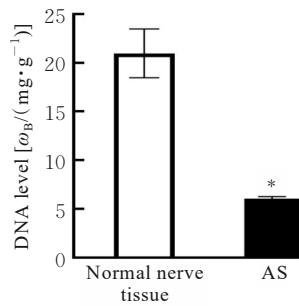
图1 ADSC形态表现及多向分化能力

Fig.1 Morphology and multidirectional differentiation ability of ADSC

2.2 大鼠正常神经组织和AS中DNA水平 与正常神经组织比较,大鼠AS中DNA水平明显降低( $P<0.01$ ),表明本研究制备的AS具有良好的脱离细胞效果。见图2。

2.3 各组大鼠脊神经节的超微结构 透射电镜观察结果显示:对照组大鼠脊神经节中细胞核呈椭圆形,核膜清晰,染色质丰富且分布均匀,胞质内线粒体、

粗面内质网和高尔基体等细胞器清晰可见。模型组大鼠脊神经节中细胞核膜凹凸不平、呈锯齿状改变,胞质内细胞器数量明显减少,粗面内质网脱颗粒现象明显,核糖体散在于胞质中,线粒体肿胀、体积增大、可见嵴断裂及部分嵴消失致中间形成的空白区域。与模型组比较,AS组和ADSC+AS组大鼠脊神经节中细胞核膜较清晰且趋向完整,仍可见肿胀的线



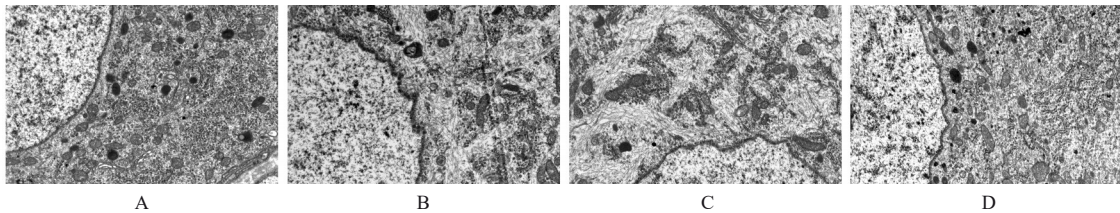
\* $P < 0.01$  compared with normal nerve tissue.

图2 大鼠正常神经组织和AS中DNA水平

Fig. 2 DNA levels in normal nerve tissue and AS

粒体, 粗面内质网结构相对较清晰, 其中ADSC+AS组大鼠脊神经节脱颗粒现象明显减轻。见图3。

**2.4 各组大鼠脊神经节中CNTF、p-JAK2和p-STAT3蛋白表达水平** CNTF、p-JAK2和p-STAT3蛋白阳性表达物主要位于脊神经节的胞质, 被标记为红色荧光。与对照组比较, 模型组大鼠脊神经节中CNTF蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ ), p-JAK2和p-STAT3蛋白表达水平均明显升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, AS组和ADSC+AS组大鼠脊神经节中CNTF蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), p-JAK2和p-STAT3蛋白表达水平均明显降低 ( $P < 0.01$ )。与AS组比较, ADSC+AS组大鼠脊神经节中CNTF蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), p-JAK2和p-STAT3蛋白表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图4和5。



A: Control group; B: Model group; C: AS group; D: ADSC+AS group.

图3 各组大鼠脊神经节超微结构 ( $\times 20\ 000$ )

Fig. 3 Ultrastructures of dorsal root ganglion of rats in various groups ( $\times 20\ 000$ )

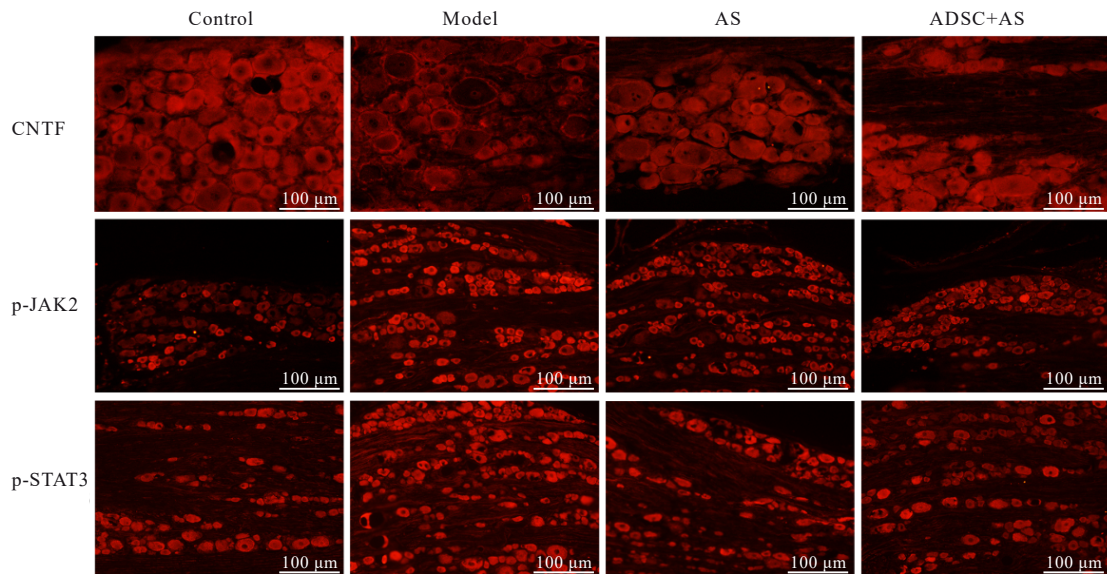
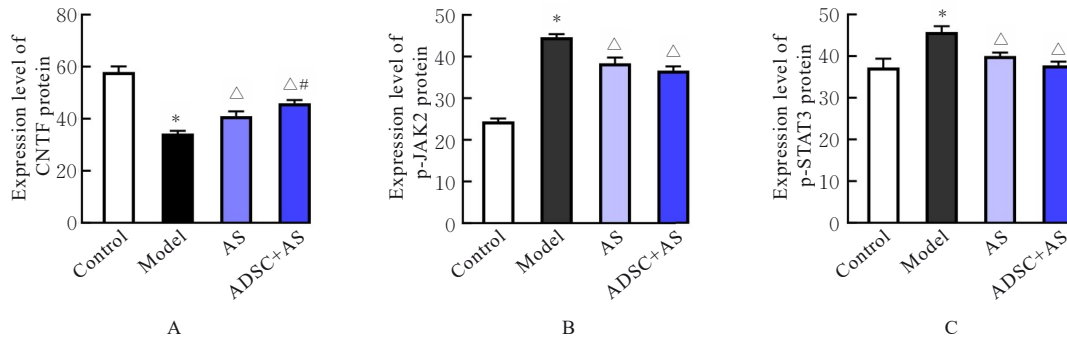


图4 免疫荧光法检测各组大鼠脊神经节中CNTF、p-JAK2和p-STAT3蛋白表达情况

Fig. 4 Expressions of CNTF, p-JAK2, and p-STAT3 proteins in dorsal root ganglion of rats in various groups detected by immunofluorescence assay

**2.5 各组大鼠脊神经节中CNTF、JAK2和STAT3 mRNA表达水平** 与对照组比较, 模型组大鼠脊神经节中CNTF mRNA表达水平明显降低 ( $P <$

$0.01$ ), JAK2和STAT3 mRNA表达水平均明显升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, AS组和ADSC+AS组大鼠脊神经节中CNTF mRNA表达水平明显



\* $P < 0.01$  compared with control group;  $\Delta P < 0.01$  compared with model group; # $P < 0.05$  compared with AS group.

图5 各组大鼠脊神经节中CNTF、p-JAK2和p-STAT3蛋白表达水平

Fig. 5 Expression levels of CNTF, p-JAK2, and p-STAT3 proteins in dorsal root ganglion of rats in various groups

升高 ( $P < 0.01$ ), *JAK2* 和 *STAT3* mRNA 表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。与 AS 组比较, ADSC+AS 组大鼠脊神经节中 *CNTF* mRNA 表达

水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), *JAK2* 和 *STAT3* mRNA 表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表2 各组大鼠脊神经节中CNTF、JAK2和STAT3 mRNA表达水平

Tab. 2 Expression levels of CNTF, JAK2 and STAT3 mRNA in dorsal root ganglion of rats in various groups ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Group	CNTF mRNA	JAK2 mRNA	STAT3 mRNA
Control	1.000 0 $\pm$ 0.000 0	1.000 0 $\pm$ 0.000 0	1.000 0 $\pm$ 0.000 0
Model	0.439 0 $\pm$ 0.047 9*	2.943 0 $\pm$ 0.137 0*	2.656 0 $\pm$ 0.131 9*
AS	0.601 0 $\pm$ 0.074 7 $\Delta$	2.463 0 $\pm$ 0.068 5 $\Delta$	2.272 0 $\pm$ 0.035 8 $\Delta$
ADSC+AS	0.856 0 $\pm$ 0.035 0 $\Delta$ #	2.075 0 $\pm$ 0.054 9 $\Delta$ #	1.910 0 $\pm$ 0.049 2 $\Delta$ #

\* $P < 0.01$  compared with control group;  $\Delta P < 0.01$  compared with model group; # $P < 0.01$  compared with AS group.

### 3 讨论

组织工程疗法是治疗PNI的新兴疗法,其中种子细胞和支架材料是2个核心要素。ADSC因具有来源丰富、体外分离培养容易操作、增殖速度快等优势成为神经组织工程的理想细胞之一。近年来研究<sup>[12-15]</sup>显示:ADSC可通过分泌神经营养因子、促进神经突起生长以及促进髓鞘生成等在PNI与再生修复过程中发挥重要作用。本研究通过酶法从大鼠附睾旁脂肪组织分离培养ADSC,其形态较均一,并具有成骨和成脂分化的干细胞特性,证明成功获得ADSC。

周围神经横断损伤发生后,神经纤维的连续性遭到破坏,可导致轴突断裂、神经元胞体死亡以及神经传导功能障碍。上述病理变化也将累及损伤神经近端神经元,影响其存活、凋亡、生长和分化等过程。DELIBAŞ等<sup>[16]</sup>采用电子显微镜观察并评价了不同类型SNI后大鼠背根神经节组织中的细胞精细结构改变,结果显示:横断损伤组的感觉神经元胞

体发生了染色质溶解反应,出现了自噬空泡,导致了尼氏体位置、聚集状态及排列方式的变化,呈现核糖体结构分散、糙面内质网结构断裂等现象。李安特等<sup>[9]</sup>通过尼氏染色观察到SNI大鼠脊神经节细胞胞体明显缩小,细胞核出现偏位或移位现象,尼氏体溶解,结构不完整,着色浅且着色不均一,数量明显减少;给予电针和脱细胞异体神经移植物的联合治疗后,脊神经节细胞形态结构比较规整,尼氏体呈较规则的斑块状、着色较均一,偶见核移位现象,尼氏体的数量显著增多。本研究采用透射电子显微镜观察了各组大鼠脊神经节的超微结构,结果显示:ADSC+AS组大鼠脊神经节中细胞核膜相对较清晰完整、糙面内质网脱颗粒现象以及线粒体肿胀和空泡化现象明显减轻,表明ADSC与AS联合应用可改善脊神经节的形态结构。其机制一方面可能是AS在损伤神经的近端和远端之间建立起有效的神经再生通道,保证了神经的连续性和轴浆流动的顺利进行;另一方面源于ADSC旁分泌的神

经营养因子, 高表达的神经营养因子通过再生通道逆行运输到脊神经节的胞体, 促进近端轴突的生长和延伸, 使得近端神经元胞体与再生轴突之间建立突触连接, 阻止了细胞的凋亡, 从而发挥了保护作用。

神经细胞的功能状态与神经营养物质的支持密不可分。研究<sup>[17]</sup>显示: PNI后损伤残端释放的神经营养因子是决定细胞存活和死亡的主要因素。CNTF是神经调节细胞因子家族成员之一, 主要分布于神经系统的施万细胞和星形胶质细胞中, 对细胞存活、分化有重要的调节作用<sup>[18]</sup>。研究<sup>[19-21]</sup>显示: CNTF可通过上调合成神经生长因子的相关蛋白、对抗兴奋性氨基酸引起的兴奋毒性、抑制细胞凋亡、调节细胞内外钙和镁等离子平衡发挥保护神经元的作用。FU等<sup>[7]</sup>研究表明: ADSC和施万样细胞中高表达的CNTF可为脊髓运动神经元提供营养, 减少神经元的死亡, 进而促进受损神经的再生修复。BEHTAJ等<sup>[22]</sup>将CNTF共价固定在聚癸二酸丙醇甘油酯 (polyglycerol sebacate, PGS) /聚己内酯 (poly caprolactone, PCL) 支架表面, 发现CNTF不仅可促进视网膜节细胞神经突的生长, 还可为轴突生长提供定向引导。PORZIONATO等<sup>[23]</sup>发现: 加载了CNTF的氧化聚乙烯醇神经导管可引导损伤区域的神经轴突再生, 有助于再生轴突与靶器官之间形成突触连接, 从而提高轴突的传导功能, 并能为靶器官提供营养支持。本研究采用免疫荧光法和RT-qPCR法检测了大鼠脊神经节中CNTF蛋白和mRNA表达水平, 结果显示: ADSC与AS联合应用可上调大鼠脊神经节中CNTF表达。提示CNTF表达上调与ADSC+AS组脊神经节的功能状态有密切关联, 在AS建立的神经再生通道下, 顺向的轴浆运输促进了CNTF等神经营养因子的分泌; 同时高表达的CNTF能够运输到脊神经节的胞体, 营养并保护神经元, 使其维持在功能状态, 从而为轴突再生提供营养支持, 以促进神经再生。

为了进一步阐明ADSC与AS联合应用保护脊神经节的机制, 本研究检测JAK2/STAT3信号通路中p-JAK2/JAK2及p-STAT3/STAT3蛋白和mRNA表达水平。JAK/STAT信号通路由酪氨酸激酶相关受体、JAK和STAT组成, 细胞因子与相应受体结合后引起细胞膜上受体分子的二聚化从而激活JAK激酶, 活化的JAK与STAT结合形成JAK-STAT二聚体, 使STAT蛋白发生磷酸化修饰, 随后磷酸化的STAT以二聚体的形式进入细

胞核内与特定的DNA元件相结合, 激活或者抑制靶基因转录, 从而发挥生物学效应<sup>[24]</sup>。研究<sup>[25-26]</sup>显示: 周围神经在轴索横断损伤后, JAK/STAT信号转导被激活, 该过程与神经细胞的存活以及神经再生的过程紧密相关。PAN等<sup>[27]</sup>研究发现: exendin-4可通过激活JAK/STAT通路促进施万细胞的增殖和迁移, 从而促进周围神经再生。另有研究<sup>[28]</sup>显示: JAK/STAT信号通路参与了PNI后成纤维细胞瘢痕形成的过程, p-STAT3和STAT3在瘢痕组织中高表达, 导致瘢痕组织形成加速, 阻碍轴突再生。本研究结果显示: 模型组大鼠脊神经节中p-JAK2和p-STAT3蛋白及mRNA表达水平明显升高, 提示SNI激活了JAK2/STAT3信号通路, 高表达的p-JAK2和p-STAT3在组织中积聚, 导致轴突再生受阻。经过ADSC与AS联合治疗6周后, p-JAK2和p-STAT3的蛋白及mRNA的表达水平明显降低, 提示在ADSC与AS联合作用下, JAK2/STAT3信号通路活化降低, 对轴突再生的抑制作用减弱, 这也可能是其发挥保护脊神经节作用的机制之一。

综上所述, 本研究中ADSC与AS联合构建的组织工程神经为神经再生提供了良好的通道, 使轴浆运输顺利进行, 从而改善了脊神经节的超微结构, 其机制可能与ADSC联合AS应用可增加脊神经节中CNTF表达、降低JAK2/STAT3信号通路活化有关。

#### 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:

于晓敏参与论文选题、实验设计和论文撰写, 朱清华、王一伦、任森、刘子嘉、余泳仪、杜元良、刘东慧和郭森参与实验操作、数据整理及统计学分析, 付秀美参与课题指导、实验设计和论文审校。

#### [参考文献]

- [1] 刘业祖, 刘如恩. 脱细胞基质水凝胶治疗周围神经损伤的研究进展[J]. 华西医学, 2024, 39(7): 1145-1150.
- [2] 王乃玉. 雷帕霉素-单氧基聚乙二醇-丙交酯乙交酯共聚物(Rapa-mPEG-PLGA)膜促周围神经损伤后修复与再生[D]. 长春: 吉林大学, 2022.
- [3] PEREIRA C, LAZAR S V, WANG A J. Bioengineering approaches for nerve graft revascularization: Current concepts and future directions[J]. WIREs Mech Dis, 2023, 15(4): e1609.

- [4] 程潮江. 脂肪间质干细胞促进麻风溃疡创面愈合的实验研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2021.
- [5] YI S, ZHANG Y, GU X K, et al. Application of stem cells in peripheral nerve regeneration[J]. *Burns Trauma*, 2020, 8: tkaa002.
- [6] 李 想, 毕佳璇, 孙秋霞, 等. 脑源性神经营养因子通过PI3K/Akt信号通路促进大鼠坐骨神经再生修复的研究[J]. *中国医科大学学报*, 2023, 52(1): 51-56.
- [7] FU X M, WANG Y, FU W L, et al. The combination of adipose-derived schwann-like cells and acellular nerve allografts promotes sciatic nerve regeneration and repair through the JAK2/STAT3 signaling pathway in rats[J]. *Neuroscience*, 2019, 422: 134-145.
- [8] 付秀美, 王荣良, 杨海艳, 等. 脂肪源性干细胞对大鼠坐骨神经功能恢复的影响[J]. *承德医学院学报*, 2016, 33(6): 451-453.
- [9] 李安特, 周泽宇, 马蕴涵, 等. 电针联合脱细胞异体神经移植对坐骨神经损伤大鼠脊神经节的保护机制[J]. *针刺研究*, 2023, 48(4): 372-377.
- [10] LIU J, WANG F P, LUO F M. The role of JAK/STAT pathway in fibrotic diseases: molecular and cellular mechanisms[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(1): 119.
- [11] XIN P, XU X Y, DENG C J, et al. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 80: 106210.
- [12] PODSEDNIK A, CABREJO R, ROSEN J. Adipose tissue uses in peripheral nerve surgery[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(2): 644.
- [13] LI X L, XU H, LI C C, et al. Biological characteristics of tissue engineered-nerve grafts enhancing peripheral nerve regeneration[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 215.
- [14] ARIF F, RAHMAN M F, KHAN C F. Adipose derived stem cells for the peripheral nerve regeneration: review of techniques and clinical implications[J]. *J Pak Med Assoc*, 2023, 73(Suppl 1)(2): S148-S154.
- [15] ZHANG Z Q, ZHANG M Y, SUN Y Y, et al. Effects of adipose derived stem cells pretreated with resveratrol on sciatic nerve regeneration in rats[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 5812.
- [16] DELIBAŞ B, KAPLAN S. The histomorphological and stereological assessment of rat dorsal root ganglion tissues after various types of sciatic nerve injury [J]. *Histochem Cell Biol*, 2024, 161(2): 145-163.
- [17] CARVALHO C R, CHANG W, SILVA-CORREIA J, et al. Engineering silk fibroin-based nerve conduit with neurotrophic factors for proximal protection after peripheral nerve injury[J]. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10(2): e2000753.
- [18] HU Z S, DENG N, LIU K L, et al. CNTF-STAT3-IL-6 axis mediates neuroinflammatory cascade across schwann cell-neuron-microglia[J]. *Cell Rep*, 2020, 31(7): 107657.
- [19] YUAN Y S, YU F, ZHANG Y J, et al. Changes in proteins related to early nerve repair in a rat model of sciatic nerve injury[J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(8): 1622-1627.
- [20] CHENG X Q, LIANG X Z, WEI S, et al. Protein microarray analysis of cytokine expression changes in distal stumps after sciatic nerve transection [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(3): 503-511.
- [21] MA F K, WANG H M, YANG X S, et al. Controlled release of ciliary neurotrophic factor from bioactive nerve grafts promotes nerve regeneration in rats with facial nerve injuries[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2022, 110(4): 788-796.
- [22] BEHTAJ S, KARAMALI F, NAJAFIAN S, et al. Ciliary neurotrophic factor mediated growth of retinal ganglion cell axons on PGS/PCL scaffolds [J]. *Biomed Mater*, 2024, 19(2). DOI:10.1088/1748-605X/ad1bae.
- [23] PORZIONATO A, BARBON S, STOCCO E, et al. Development of oxidized polyvinyl alcohol-based nerve conduits coupled with the ciliary neurotrophic factor[J]. *Materials*, 2019, 12(12): 1996.
- [24] 吴 莉. BMSCs与单核细胞联合移植促进面神经修复及MR活体示踪[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2016.
- [25] WU Q F, XIE J T, ZHU X L, et al. Runt-related transcription factor 3, mediated by DNA-methyltransferase 1, regulated Schwann cell proliferation and myelination during peripheral nerve regeneration *via* JAK/STAT signaling pathway [J]. *Neurosci Res*, 2023, 192: 1-10.
- [26] CHENG H F, BAI J, ZHOU X Y, et al. Electrical stimulation with polypyrrole-coated polycaprolactone/silk fibroin scaffold promotes sacral nerve regeneration by modulating macrophage polarisation [J]. *Biomater Transl*, 2024, 5(2): 157-174.
- [27] PAN B, HUO T Q, HU Y Z, et al. Exendin-4 promotes schwann cell proliferation and migration *via* activating the jak-STAT pathway after peripheral nerve injury[J]. *Neuroscience*, 2020, 437: 1-10.
- [28] 闫庭翰. 7,8-二羟基香豆素对周围神经损伤后JAK/STAT通路的影响[D]. 通辽: 内蒙古民族大学, 2023.