

综述

自组装纳米纤维支架在神经组织工程中的应用进展

张伟, 李明, 傅强

(第二军医大学附属长海医院骨科 200433 上海市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.08.22

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2010)-08-0700-03

神经系统损伤后由于局部生理环境改变, 胶质瘢痕形成, 使得神经无法穿越损伤区域而使神经再生困难^[1], 进而造成感觉、运动功能的丧失, 或者神经性疼痛。神经组织工程是目前神经损伤治疗的一个重要手段, 方法是将神经细胞种植于适宜生长的生物材料后, 移植至受损神经组织, 修复被破坏的神经组织。生物支架材料在神经组织工程中起重要作用。其中自组装多肽纳米纤维支架 (self-assembling peptide nanofiber scaffold, SAPNS) 由于具有生物可降解性和良好的生物相容性而越来越多地用于神经系统损伤的修复。SAPNS 具有较高的表面积/容积比率, 结构与天然的细胞外基质 (ECM) 相似, 可以为细胞的粘附、迁移、增殖和分化的功能提供更为有利的环境^[2], 因此在神经组织工程中有良好的应用前景。现就 SAPNS 在神经组织工程中的应用综述如下。

1 SAPNS 的形成机制及理化特性

自组装现象普遍存在于自然界中, 许多生物大分子如 DNA、酶、病毒分子, 通过自组装过程形成高度组织化、信息化和功能化的复杂结构。自组装是一种常用的制造纳米纤维的方法, 其过程由非共价键如范德华力、氢键或静电力介导^[3]。大量的研究表明很多蛋白质或肽类可以产生非常稳定的、有序排列的有着显著规律性的纳米结构^[4-7], 其结构与天然的细胞外基质相似。新形成的多肽纳米纤维支架 (peptide nanofiber scaffold, PNS) 不仅具有原来大分子的生物学功能, 而且具有更高的生物学活性^[8]。这些肽类分子可以分解为无毒的、可被邻近细胞生长或修复过程利用的天然左旋氨基酸。因此, 自组装纳米支架可为细胞提供真正与天然细胞外基质类似的三维微环境^[9], 利于损伤神经的修复。

目前研究证实 SAPNS 是一种理想的基质材料^[10]。自组装形成纳米纤维材料的多肽是经过设计修饰的两亲性分子, 其头部是亲水活性多肽片断, 中间是几个小的氨基酸, 使活性多肽有足够空间, 且引入负电荷以避免分子间

自发聚集, 尾部是疏水的烷基链。SAPNS 亲水性的活性多肽位于纳米纤维材料表面, 疏水性基团位于纳米纤维材料内部, 这就决定了纳米材料具有高生物活性。自组装多肽序列的活性区域是水溶性的, 可溶解于水溶液中, 它主要参与溶液周围环境相互作用。有研究表明, pH 值和温度可影响自组装形成的 PNS 的物理化学性状和形态学特性^[11]。

SAPNS 类似于天然纳米材料, 具有纳米材料天然的特性。SAPNS 在神经组织工程中作为支架材料其结构上有明显的优势。肖峰等^[12]自组装合成含有 IKVAV (异亮氨酸-赖氨酸-缬氨酸-丙氨酸-缬氨酸) 多肽序列的纳米纤维材料, 电镜显示寡肽自组装为凝胶, 形成编织状纳米纤维网络, 纤维直径 3~5nm, 长度 100~1500nm, 多个细小的单个纳米纤维可合并成为 25~65nm 的多股纤维, 且随着寡肽浓度的增加, 形成的纳米纤维排列越紧密。此外, 研究表明 SAPNS 含水量高, 表面积大, 利于营养物质、活性分子和氧气等向材料深部弥散, 且这种纳米材料孔隙率高, 有利于种子细胞向材料内部迁移和增殖, 模拟了体内细胞的生长环境^[13]。所有这些优点使根据功能设计的自组装纳米纤维支架在再生医学^[14-17]和神经再生研究中前景广阔。

2 SAPNS 体外实验研究

精氨酸-丙氨酸-天冬氨酸 (RAD)16- I 和 RAD16- II 是利用自组装多肽纳米支架 (SAPNSs) 培养神经细胞时应用最多的多肽^[18, 9, 18-20]。Holmes 等^[18]利用固相法合成出 RAD16- I 和 RAD16- II。将寡肽溶解于 PBS 后调整溶液 pH 值和离子浓度, 能形成肉眼可见的疏松自组装多肽材料。高分辨率扫描电子显微镜观察示 RAD16- I 和 RAD16- II 交织成网状的纤维结构, 纤维直径为 10~20nm。自组装多肽材料中含有 RAD 序列, 其结构与天然细胞外基质中为细胞粘附受体提供结合位点的 RGD 序列 (Arg-Gly-Asp) 相似。Holmes 等^[18]证实有几种类型的神经元细胞在 RAD-16 自组装多肽支架上生长, 包括鼠 PC12 细胞、出生后 7d 小鼠小脑和海马的原代细胞和取自新生小鼠的新鲜神经元细胞。对于 PC12 细胞, 在 NGF 的作用下 24h 可见沿自组装多肽支架有广泛的轴突生长。在自组装多肽支架培养中也可见原代细胞的轴突延伸。除了对神经细胞的生长起到支撑作用之外, 根据 FM1-43 染色阳性结果, 自组装多肽支架还可以提高鼠海马神经元功能性突触

第一作者简介: 男 (1971-) 医学博士, 研究方向: 脊柱外科, 创伤外科

电话: (021) 81873396 E-mail: 401spine@gmail.com

通讯作者: 李明 E-mail: limingch@21cn.com

的形成。Semino 等^[19]报道了利用 RAD16-I 自组装多肽支架建立的三维细胞捕获系统来培养原代鼠海马细胞。5-溴脱氧尿核苷(BrdU)和神经胶质酸性蛋白(GFAP)染色显示在自组装多肽支架中培养 1 周可见神经胶质细胞和神经元的移行和增殖。并且实验显示在海马组织切片和自组装多肽支架界面处有神经祖细胞的存在;与对照组采用基础的海马组织切片培养技术相比,经过 3d 培养,细胞迁移入自组装多肽支架的数量明显升高。这些结果显示自组装多肽支架可能是支持神经组织生长和再生的良好的基质材料。

在另一项研究中,合成了含有不同功能序列包括 RGD 和层粘连蛋白衍生序列 (GFLGFPT 和 BMHP) 的 RAD16 自组装多肽支架,用以培养成年大鼠的神经干细胞^[20]。在培养的第 7 天评价细胞的分化情况,发现在 RAD16-BMHP1 和 RAD16-BMHP2 自组装多肽支架上有大量的细胞表达神经细胞标记物,如 β -微管蛋白和星形胶质细胞标记物 GFAP。另外,当在单纯的自组装多肽支架中培养时,更多的细胞保持未分化状态。这项研究表明,自组装多肽支架与其功能性序列相结合才能成为三维神经细胞培养和神经修复的理想工具。

异亮氨酸-赖氨酸-缬氨酸-丙氨酸-缬氨酸(IKVAV)是另外一种在 SAPNSs 神经再生研究中常用的自组装多肽,可以促进和引导轴突的生长^[21,22]。Silva 等^[23]在 IKVAV 自组装多肽上培养鼠类的神经祖细胞(NPCs)以研究细胞在体外环境下的分化。在培养的第 1 天和第 7 天,支架诱导产生一种选择性分化,即促进细胞向神经元细胞分化而抑制向星形细胞分化。邹枕玮等^[23]应用自组装 IKVAV 多肽纳米支架与鼠背根神经节神经元细胞(DRGc)联合培养,发现自组装 IKVAV 多肽纳米支架能降低神经元的死亡率,并诱导轴突的发生和生长,具有支架及生物活性双重作用。其作用机制可能是通过 IKVAV 与神经细胞表面的 LBP110(层粘连蛋白结合蛋白,laminin-binding protein,分子量 110kD)结合后通过信号传导上调细胞内 c-fos 基因的表达,从而促进细胞的生长和轴突的延长^[24,25]。

3 SAPNS 体内实验研究

除了体外实验之外,动物模型已经被用来观察 SAPNSs 治疗中枢神经系统损伤的可能性。Guo 等^[26]用成年大鼠的 Schwann 细胞和分离自海马组织的胚胎神经干细胞(NPCs)培养的 RAD16-I 自组装多肽支架移植入脊髓横断的成年大鼠体内。移植后 6 周,支架与宿主组织整合良好,在移植体和损伤部位之间没有明显的间隙。另外可以观察到大量的宿主细胞移行入支架,移植体内有丰富的血管形成。Schwann 细胞和 NPCs 在移植后 6 周仍然存活,一些 Schwann 细胞发育成熟为管状形态,有些 NPCs 分化成神经元细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞。免疫标记结果显示与空白的多肽支架相比有更多的轴突长入携带有 Schwann 和 NPCs 的多肽自组装支架。

对于中枢神经系统的修复,星形胶质细胞的形成是脊髓损伤后轴突再生的主要障碍,因此,抑制胶质瘢痕的形成对于轴突再生至关重要^[1,27,28]。Tysseling-Mattiace 等^[29]证明了在脊髓损伤后利用 IKVAV 自组装多肽支架抑制胶质瘢痕形成并促进轴突延伸生长的可能性。雌性大鼠的脊髓用放置于硬膜外改良的动脉瘤夹压迫 1min。之后,自组装多肽溶液在伤后 24h 注入。治疗后 5 周和 11 周,接受 IKVAV 自组装多肽支架治疗的动物星形胶质瘢痕的形成明显减少;相反,接受含谷氨酸-谷氨酰胺-丝氨酸(EQS)序列的多肽治疗的动物损伤区域星形胶质瘢痕没有减少,EQS 序列无生物活性且不能帮助神经细胞分化和轴突的生长^[30]。损伤后 10d,IKVAV 自组装多肽治疗组邻近损伤的部位少突胶质细胞的死亡率降低。损伤后 9 周 BBB 评分^[30]显示,IKVAV 自组装多肽治疗组与 EQS 多肽治疗组、空白注射组和葡萄糖注射组相比功能恢复良好。

Ellis-Behnke 等^[31]证明了利用 SAPNSs 修复大脑损伤的可行性。他们在大鼠的中脑制造一 1.5mm 深、2.0mm 宽的刀刺伤,SAPNS 溶液用于损伤区域;3d 后观察到有致密突起穿越 SAPNS 治疗的损伤区域,而损伤后未经治疗的动物损伤区空洞形成且无轴突再生。他们还证明了 SAPNSs 在提高视束损伤再生的有效性。在上丘(SC)处横断视束后,将 SAPNSs 溶液注入损伤区域,组织学结果显示 SAPNSs 治疗组的动物在 30、45、90d 时均有穿越损伤区域的组织再连接。治疗后 90d 行为学测试显示实验组 75%的视觉功能恢复,而用生理盐水治疗的对照组没有恢复。该实验对于利用设计的多肽支架提高轴突的再生以促进 CNS 功能恢复的可能性提供了有力支持。

4 结语

由于 SAPNS 对神经细胞有良好的细胞相容性和三维立体结构,能诱导轴突的再生和延长,具有支架及生物活性双重作用;同时其纤维结构与细胞生长的自然环境相似,有良好的表面活性和生物可降解性,可以为神经细胞提供合适的物理环境以控制细胞功能。因此逐渐成为神经组织工程中修复神经损伤强有力的工具。但多肽自组装技术仍然存在形成不可控制大孔隙和机械性不稳定的三维结构等局限性^[32]。与传统组织工程技术相比,自组装要求更为复杂的过程和技术,因此其生产效率较低^[33]。另外,纤维支架形态如何影响神经细胞的形态和功能还需要深入细致的研究,与目的细胞的类型相匹配的纳米纤维理想的尺寸仍待阐明。相信随着组织工程技术的快速发展,对 SAPNS 进一步的认识和对其功能的改进,这些具有生物功能性的自组装纳米纤维支架可以成为直接可植入物和神经组织工程必需的基础神经细胞生物研究平台。

5 参考文献

1. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair[J]. Brain Res Bull, 1999, 49(6): 377-391.

2. Liang DH, Hsiao BS, Chu B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, 59(14): 1392–1412.
3. Zhang SG. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(10): 1171–1178.
4. Fandrich M, Fletcher MA, Dobson CM. Amyloid fibrils from muscle myoglobin [J]. *Nature*, 2001, 410(6825): 165–166.
5. Lynn DG, Meredith SC. Review: model peptides and the physicochemical approach to β -amyloids [J]. *J Struct Biol*, 2000, 130(2–3): 153–173.
6. Shtilerman MD, Ding TT, Lansbury PT. Molecular crowding accelerates fibrillization of α -synuclein; could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(12): 3855–3860.
7. Reches M, Porat Y, Gazit E. Amyloid fibril formation by pentapeptide and tetrapeptide fragments of human calcitonin [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(38): 35475–35480.
8. Silva GA, Czeisler C, Niece KL, et al. Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers [J]. *Science*, 2004, 303(5662): 1352–1355.
9. Gelain F, Bottai D, Vescovi A, et al. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for adult mouse neural stem cell 3-dimensional cultures [J]. *PLoS ONE*, 2006, 1(1): e119.
10. Holmes TC, Lacelle SD, Su X, et al. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 97(12): 6728–6733.
11. Ye Z, Zhang H, Luo H, et al. Temperature and pH effects on biophysical and morphological properties of self-assembling peptide RADA16-[J]. *J Pept Sci*, 2008, 14(2): 152–162.
12. 肖峰, 吴永超, 郑启新, 等. 含 IKVAV 肽自组装成凝胶的实验 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(22): 4352–4354.
13. Jackson AR, Yuan TY, Huang CY, et al. Effect of compression and anisotropy on the diffusion of glucose in annulus fibrosus [J]. *Spine*, 2008, 33(1): 1–7.
14. Rosenblatt G, Perelman N, Katzir E, et al. Acylated ascorbate stimulates collagen synthesis in cultured human foreskin fibroblasts at lower doses than does ascorbic acid [J]. *Connect Tissue Res*, 1998, 37(3–4): 303–311.
15. Firth A, Aggeli A, Burke JL, et al. Biomimetic self-assembling peptides as injectable scaffolds for hard tissue engineering [J]. *Nanomedicine (London, England)*, 2006, 1(2): 189–199.
16. Kokkoli E, Mardilovich A, Wedekind A, et al. Selfassembly and applications of biomimetic and bioactive peptide-amphiphiles [J]. *Soft Matter*, 2006, 2(12): 1015–1024.
17. Madurantakam PA, Cost CP, Simpson DG, et al. Science of nanofibrous scaffold fabrication: strategies for next generation tissue-engineering scaffolds [J]. *Nanomedicine*, 2009, 4(2): 193–206.
18. Holmes TC, Lacelle SD, Su X, et al. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6728–6733.
19. Semino CE, Kasahara J, Hayashi Y, et al. Entrapment of migrating hippocampal neural cells in three-dimensional peptide nanofiber scaffold [J]. *Tissue Eng*, 2004, 10(3–4): 643–655.
20. Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Kobayashi H. Proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells using self-assembled peptide amphiphile nanofibers [J]. *Biomed Mater*, 2006, 1(1): 8–15.
21. Kam L, Shain W, Turner JN, et al. Axonal outgrowth of hippocampal neurons on micro-scale networks of polylysine-conjugated laminin [J]. *Biomaterials*, 2001, 22(10): 1049–1054.
22. Powell SK, Rao J, Roque E, et al. Neural cell response to multiple novel sites on laminin-1 [J]. *J Neurosci Res*, 2000, 61(3): 302–312.
23. 邹枕玮, 吴永超, 郑启新, 等. 自组装 IKVAV 多肽纳米支架及其对背根神经节神经元细胞的作用 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2007, 17(6): 450–453.
24. Kibbey MC, Jucker M, Weeks BS, et al. β -Amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90(21): 10150–10153.
25. Chalazonitis A, Tennyson VM, Kibbey MC, et al. The alpha 1 subunit of laminin-1 promotes the development of neurons by interacting with LBP110 expressed by neural crest-derived cells immunoselected from the fetal mouse gut [J]. *J Neurobiol*, 1997, 33(2): 118–138.
26. Guo J, Su H, Zeng Y, et al. Reknitting the injured spinal cord by self-assembling peptide nanofiber scaffold [J]. *Nanomedicine*, 2007, 3(4): 311–321.
27. Shearer M, Fawcett J. The astrocyte/meningeal cell interface—a barrier to successful nerve regeneration? [J]. *Cell Tissue Res*, 2001, 305(2): 267–273.
28. Bradbury EJ, Moon LDF, Popat RJ, et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury [J]. *Nature*, 2002, 416(6881): 636–640.
29. Tysseling-Mattiace VM, Sahni V, Niece KL, et al. Self-assembling nanofibers inhibit glial scar formation and promote axon elongation after spinal cord injury [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(14): 3814–3823.
30. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability [J]. *J Neurotraum*, 1996, 13(7): 343–359.
31. Ellis-Behnke RG, Liang YX, You SW, et al. Nano neuro knitting: peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return of vision [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(13): 5054–5059.
32. Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(24): 4353–4364.
33. Ma ZW, Kotaki M, Inai R, et al. Potential of nanofiber matrix as tissue engineering scaffolds [J]. *Tissue Eng*, 2005, 11(1–2): 101–109.

(收稿日期: 2010-05-11 修回日期: 2010-06-12)

(本文编辑 彭向峰)