

水凝胶理化特性调控神经干细胞命运 和神经损伤修复的研究进展

王守晔^{1,2} 张磊^{1,2} 葛龙娇^{1,2*} 张润瑞^{1,2*}

¹昆明理工大学, 灵长类转化医学研究院, 省部共建非人灵长类生物医学国家重点实验室, 昆明 650500;

²云南中科灵长类生物医学重点实验室, 昆明 650500)

摘要 水凝胶(hydrogel)是一类极为亲水的高分子材料,可模拟体内神经干细胞所处的细胞外微环境,作为神经干细胞的载体用于干细胞移植疗法。优化水凝胶的理化特性有利于促进移植的神经干细胞的存活、分化和迁移。水凝胶的理化特性包括基质成分、黏弹性、硬度、降解性、导电性以及水凝胶对物理刺激的响应等。该文综述了水凝胶的不同理化特性对神经干细胞命运的影响和水凝胶结合的神经干细胞在中枢神经系统修复中的应用,为通过调节水凝胶理化特性促进中枢神经系统修复提供线索和见解。

关键词 水凝胶;理化特性;神经干细胞;神经损伤修复

Research Progress on the Physicochemical Properties of Hydrogels Regulating the Fate of Neural Stem Cells and the Repair of Neural Injury

WANG Shouye^{1,2}, ZHANG Lei^{1,2}, GE Longjiao^{1,2*}, ZHANG Runrui^{1,2*}

¹State Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; ²Yunnan Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Kunming 650500, China)

Abstract Hydrogel is one type of highly hydrophilic polymer materials that can simulate the extracellular microenvironment of NSCs (neural stem cells), and it can be used as the carrier of NSCs for cell transplantation therapy. Refining the physicochemical properties of hydrogels can promote survival, differentiation and migration of the transplanted NSCs. The physicochemical properties of hydrogels include matrix composition, viscoelasticity, hardness, degradability, conductivity and the response to physical stimuli. Here this paper reviews the role of hydrogel physicochemical properties in NSC fate regulation and the application of hydrogel-carried NSCs in CNS (central nervous system) repair. This review provides clues and insights to promote CNS repair by modulating hydrogel physicochemical characteristics.

Keywords hydrogel; physicochemical properties; neural stem cells; nerve damage repair

随着现代医疗技术的发展,神经损伤的治疗取得了巨大的进展,多种药物使得出血和炎症得以控制,并使患者的疼痛得以减轻,但是其对于神经功能

恢复的促进作用仍十分有限。针对这一现状,干细胞移植治疗神经损伤受到了极大的关注。干细胞移植治疗是将纯化后的干细胞移植到损伤部位,从而

收稿日期: 2022-06-23 接受日期: 2022-09-07

云南省科技厅基础研究计划面上项目(批准号: 202101AT070287)和国家自然科学基金面上项目(批准号: 32070864)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15912557653, E-mail: gelj@lpbr.cn; Tel: 15368160805, E-mail: zhangrr@lpbr.cn

Received: June 23, 2022 Accepted: September 7, 2022

This work was supported by the Science and Technology Program of Yunnan Provincial Department of Science (Grant No.202101AT070287) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32070864)

*Corresponding authors. Tel: +86-15912557653, E-mail: gelj@lpbr.cn; Tel: +86-15368160805, E-mail: zhangrr@lpbr.cn

替换受损细胞,以促进受损组织再生并实现损伤修复。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是指存在于神经系统中,具有分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞能力的多潜能细胞,是神经发生和大脑发育的基础,可作为“种子”细胞参与神经组织再生^[1]。NSCs介导的神经发生对大脑可塑性调节、学习记忆功能的建立有着重要作用。在神经损伤修复过程中,相较于其他类型的干细胞(间充质干细胞和胚胎干细胞),NSCs本身是神经谱系细胞,不需要经历诱导过程。这就在一定程度上降低了干细胞诱导分化不完全造成的成瘤风险。利用NSCs治疗神经损伤比单纯的药物治疗对于神经系统功能的恢复更加有效。近年来,NSCs移植已被用于多种神经系统疾病(如脑外伤^[2]、脑卒中^[3]和帕金森病^[4]等)的临床前研究。虽然移植NSCs或其分化后的神经元可能是治疗中枢神经系统损伤更为有效的方法,但是单纯的NSCs移植治疗效果不佳,这对今后中枢神经系统损伤治疗的临床转化提出了挑战。干细胞治疗在临床转化应用中的障碍主要包括以下几个方面。首先,移植的NSCs在损伤部位的滞留率低^[5]。其次,NSCs所处的病理微环境不能提供充足的氧气、营养、生长因子和细胞因子,不利于细胞的存活和增殖,甚至会导致细胞在体内大量死亡^[6]。最后,只有极少数的NSCs能分化成为具有功能的神经元,多数分化为星形或少突胶质细胞,这极大地限制了NSCs移植介导的神经再生^[7]。为了提升干细胞移植治疗的效果,我们首先要解决移植干细胞的滞留率低和存活率低的问题。应用组织工程可以解决上述问题。组织工程三要素包括种子细胞、生物材料支架和信号分子。组织工程中由具有良好生物相容性、可降解性和可吸收的生物材料构成的3D结构可以为细胞获取营养、生长提供一个良好的微环境。因此,生物材料负载干细胞可以提高干细胞在损伤部位的滞留率和存活率,从而促进治疗效果。

在组织再生领域,干细胞的增殖与分化的调控机制一直是重点研究方向。干细胞的自我更新增殖和分化能力主要受微环境的影响,包括细胞和细胞之间的相互作用、细胞外基质(支架)以及生物活性因子或信号分子等的影响。微环境中影响细胞外基质(支架)的物理因素主要包括:硬度、降解性、黏弹性、导电性;化学因素主要包括:细胞外基质成分的组成及变化,材料表面的化学特性。我们主要

利用生物材料模拟干细胞生存的微环境。因此,用于负载干细胞的生物材料应具有一定的化学和物理稳定性,能够提供细胞生长所需的力学环境,并在其完成使命后可在体内被降解。基于天然细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分构建的水凝胶生物材料与细胞外基质有着类似的理化特性,有助于保持细胞的生物学特性,例如细胞的黏附和迁移。同时水凝胶的高含水量、可调节的孔隙率和合适的溶胀性能,能够允许营养物质快速扩散以支持种子细胞的生长。

综上所述,只有更好地理解细胞外基质(支架)的理化特性如何调控NSCs的命运,我们才能根据损伤修复的需求去设计特定的水凝胶生物材料,从而更好地促进损伤修复。在这篇综述中,我们将从水凝胶的物理和化学特性两个方面(图1),探讨水凝胶构建的微环境如何调控NSCs的增殖、分化、迁移和成熟,以及水凝胶负载的NSCs在中枢神经系统损伤修复中的应用。

1 水凝胶材料的化学特性对神经干细胞的命运调控

组织工程是生物学与工程学相结合的一门学科。组织工程四要素主要包括种子细胞(干细胞)、生物材料(具有机械支持和刺激细胞生长的功能)、细胞与生物材料的整合以及植入物与体内微环境的整合。在传统的组织工程方法中,为了控制组织在3D微环境中的形成,水凝胶材料的选择至关重要。除了定义组织的3D几何形状外,水凝胶材料还可为细胞生存提供微环境(合成临时的细胞外基质),支持细胞附着、增殖、分化和新组织生成^[8-9]。在中枢神经系统中,NSCs生存的细胞外基质的组成成分包括:透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白(laminin)、连接蛋白(nectin)、硫酸软骨素蛋白多糖(chondroitin sulfate proteoglycan, CSPG)和腱生蛋白(Tenascin),随着发育的进行,这些化学成分会发生改变从而会影响NSCs的增殖、分化、迁移和成熟^[10-12]。例如,在发育过程中,ECM中HA的含量会在出生后的第7天达到峰值,随后会逐渐下降;CSPG的含量也会降低;而Tenascin-C会被Tenascin-R所取代,laminin的表达也会逐渐降低直至消失^[10,13-14]。ECM成分的转变影响基质本身微环境的构成,可能造成细胞增殖、分化过程的停滞^[15]。有研究者发现,HA和CD44的相互作用会促进成年海

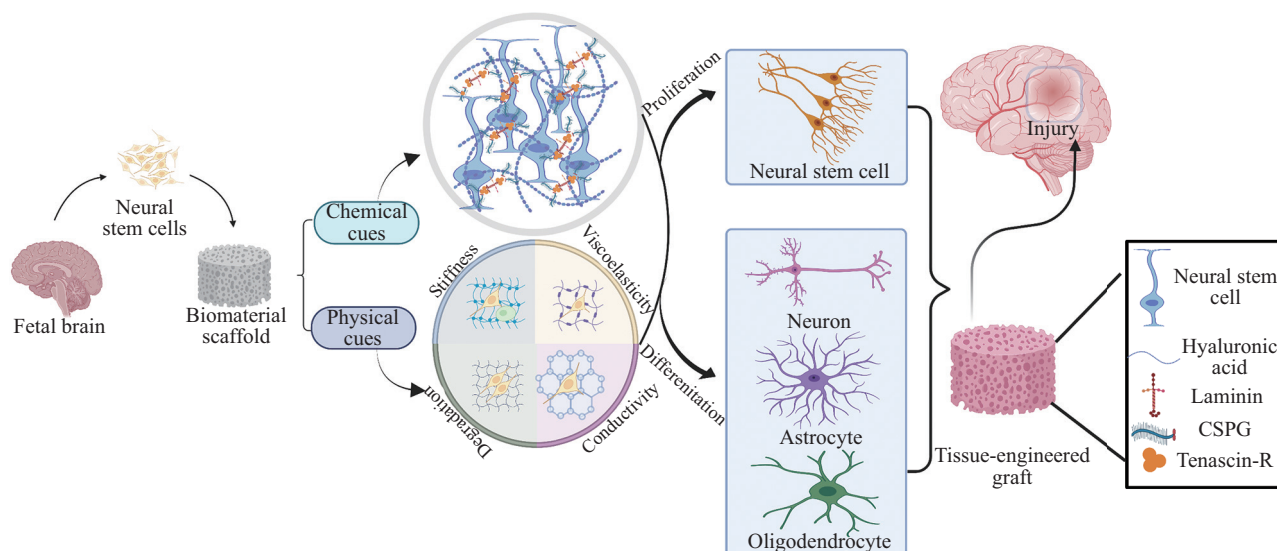


图1 生物支架材料对神经干细胞的影响

Fig.1 Effects of bio-scaffold materials on neural stem cells

马齿状回颗粒下区 (subgranular zone, SGZ) 的 NSCs 进入静息状态。在海马 SGZ 中透明质酸酶降解或 *CD44* 基因表达降低会导致 NSCs 从静息状态转变成激活状态。SU 等^[16]发现, *CD44* 缺失或透明质酸酶处理的野生型 NSCs 表现为神经元成熟延迟。在神经发生早期, 无论在体内还是体外使用软骨素 ABC 酶选择性降解 CSPG, 都会导致 NSCs 的增殖减少并诱导 NSCs 向胶质细胞方向分化, 导致神经元的分化受损。然而外源地添加 CSPG 会通过增强表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR)、JAK/STAT3 和 PI3K/Akt 信号通路而增加 NSCs 的存活率^[17-18]。Tenascin-C 通过上调表皮生长因子和成纤维细胞生长因子信号通路促进神经祖细胞 (neural progenitor cells, NPCs) 的增殖, 而 Tenascin-R 会减少 NPCs 的增殖并使其倾向于分化为胶质细胞^[19-21]。正常状态下, 在富含 laminin 的微环境中, NSCs 会保持相对静息的状态; 当有成纤维生长因子存在时, laminin 会与其相互作用刺激 NSCs 的增殖, 而层粘连蛋白 $\alpha 6 \beta 1$ 受体的缺失会促进 NSCs 的分化^[22-23]。综上, 我们可以发现 ECM 的成分的变化调控 NSCs 的发育过程。因此, 使用内源性 ECM 成分来源的生物材料可更好地模拟 NSCs 增殖、分化、迁移和成熟的微环境。

1.1 天然成分水凝胶材料

天然水凝胶的结构和组分与 ECM 相似, 具有低免疫源性、良好的生物相容性、环境敏感性和生物降解性。最近许多研究应用天然材料来模拟 ECM

的组成, 用于模拟 NSCs 生存的微环境。天然水凝胶材料的最直接的来源方式是通过脱细胞基质方法获取。脱细胞基质是由组织或器官通过去除细胞成分并保留组织或器官的 3D 结构和一些天然纤维成分获得, 如胶原纤维等成分的天然支架; 该支架具有生物活性、生物相容性和非免疫原性。脱细胞基质保留的细胞生长因子 (成纤维细胞生长因子、转化生长因子和肝细胞生长因子) 可以促进种子细胞的生长、迁移、增殖、分化和血管生成。最早的脱细胞基质衍生的水凝胶是用猪小肠黏膜制成的, 可以为体外各种类型细胞的生长和研究提供生物衍生支架^[24]。此外, 猪神经组织衍生的脱细胞基质水凝胶, 可促进背根神经节轴突生长和施旺细胞增殖, 可用作神经引导导管的管腔填充物或施旺细胞的移植载体^[25-27]。猪膀胱组织衍生的水凝胶作为生物活性支架可以支持 NSCs 的增殖、分化和迁移^[28]。目前, 人们大多关注脱细胞基质水凝胶在组织损伤修复中的作用, 对于其在调控细胞命运和行为方面的作用机制还有待进一步研究。

天然水凝胶一部分来源于组织脱细胞基质, 另一部分来源于 ECM 的成分。能够模拟 ECM 的天然水凝胶主要包括琼脂糖、壳聚糖、胶原、纤维蛋白、透明质酸等。这些成分均已被证实可在体外模拟 NSCs 生存的微环境, 从而调控 NSCs 的命运。将多能干细胞封装到海藻酸盐、琼脂糖、壳聚糖混合而成的水凝胶材料中, 可以支持其向神经元和星形

胶质细胞方向分化^[29]。胶原蛋白支架可在损伤部位增强NSCs的活性并促进其迁移^[30]。胶原与小分子结合可促进NSCs在损伤部位形成神经元^[31]。胶原结合结构域修饰的外泌体与间充质干细胞来源的脱细胞ECM结合,构成的天然复合生物材料促进NSCs增殖和神经发生^[32]。使用纤维蛋白的生物墨水将人类多能干细胞衍生的NPCs打印成微球,会显著提高NPCs的细胞活力和多种分化潜能,15天后研究人员即可检测到早期神经元标志物 β -III微管蛋白(β -III tubulin, TUJ1)和中脑标志物叉头框蛋白A2(forkhead box A2, FOXA2),再培养2周还可检测到胶质细胞标志物胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)和少突胶质细胞标志物^[33]。研究发现将NSCs种植在HA水凝胶上,会促进NSCs向少突胶质细胞分化,并改善脊髓损伤导致的运动功能障碍^[34]。交联有laminin的水凝胶促进NSCs在损伤部位滞留,当外源性添加SDF-1 α 时,损伤部位滞留的NSCs会通过SGF-1 α -CXCR4信号通路进行响应而发生迁移,有利于整个损伤区域的修复^[35]。HA和胶原蛋白支架在体外可促进NSCs向成熟神经元的分化^[36]。以上我们总结了天然水凝胶成分在模拟NSCs生存的微环境方面的优势,但天然水凝胶在制备过程中结构和性能的批次差异、稳定性低、机械性能相对较差和降解速度快等缺点也会限制其应用。因此,人们也尝试通过合成手段克服上述缺点。

1.2 合成成分水凝胶材料

与天然水凝胶材料相比,合成水凝胶可以通过不同合成方法修改其成分性质以获得所需的物理、化学性能。例如,可以根据细胞类型调整合成聚合物中的设计参数,以获得合适的孔隙率、网目尺寸和良好的生物相容性,以及可以控制制作工艺以降低最终产品的批次差异。在神经损伤修复中最常用到的合成材料包括:碳纳米管、聚己酸内酯等。纳米碳材料,如碳纳米管(carbon nanotube, CNT)^[37-38]和石墨烯^[39],特别是单壁碳纳米管(single-walled carbon nanotubes, SWNT)因其具有的高导电性,以及其可以在结构、功能上调节神经元电生理而被采用^[40]。SWNT会增强神经元细胞膜之间的信号传输进而促进NSCs向神经元分化^[41-43]。已知CNT已经应用于脊髓再生、脑损伤和中枢神经系统损伤的临床前研究^[44-45]。石墨烯独特的电气和机械性能使它成为神经接口的首选材料。将石墨烯与NSCs共培养发现石墨烯可以支持神

经网络中功能性神经回路的建立,并改善网络中神经性能和电信号,这展示了其作为组织工程中神经接口的巨大潜力^[46]。将类固醇封装在聚- ϵ -己内酯基微球内用于培养多能干细胞,培养20天后可以检测到早期神经元标志物TUJ1。该材料不会对神经突长度和分支产生影响,但是会抑制多能干细胞向星型胶质细胞的分化^[47]。总体而言,合成的水凝胶材料在支持NSCs的增殖、分化行为和治疗神经损伤中具有极大的潜力。虽然合成水凝胶通过合成方法等技术手段克服了天然水凝胶的缺点,也在神经损伤修复中发挥了优势,但其在制备过程中大多要用到自由基引发剂和交联剂,因此也存在一些问题。例如,残留的未反应单体、交联剂或引发剂,可能导致炎症或细胞毒性。总之,天然水凝胶与合成水凝胶都各有优缺点,具体采用哪一种类型的水凝胶需要根据用途和目的进行选择。

2 水凝胶的物理特性对神经干细胞的命运调控

2.1 黏弹性

黏弹性材料的性质介于纯弹性材料和纯黏性材料之间。纯弹性材料(存储模量)其应力和应变线性相关,而纯黏性材料(损失模量)的应力和应变是非线性关系。无论是人体组织还是ECM都具有黏弹性这一机械特性,在受到外部施加的力时会产生变形或蠕变,且变形时表现为应力松弛。已有研究报道了黏弹性对于细胞的增殖、分化、扩散和基质重塑的重要作用。弹性和黏弹性是两种不同的机械反应,但二者对于细胞命运的调控都是通过整合素介导细胞黏附和肌动球蛋白的收缩来实现的^[48]。目前为止关于黏弹性的研究,研究者们大都聚焦于间充质干细胞,对于神经类的细胞的研究相对较少。DARNELL等^[49]使用离子交联的海藻酸钠水凝胶研究硬度、应力松弛和黏附配体密度对NPCs的影响,发现应力松弛差异会导致NPCs的基因表达产生很大差异,如快速应力松弛的水凝胶可以维持NPCs的干性,此外应力松弛还会影响细胞骨架重塑和少突胶质细胞分化相关基因的差异表达,这就说明NPCs的形状和命运受到水凝胶的黏弹性的影响。

2.2 硬度

已有研究表明,细胞外基质的硬度会影响细胞的黏附、增殖、迁移、分化和成熟。ECM的机械

性能在发育和患病过程中会发生改变,其弹性模量(E)从几帕斯卡到几千帕斯卡不等。已有研究证实NSCs可以通过整合素、机械敏感离子通道、G蛋白、第二信使和细胞骨架感知外界微环境的机械变化,还可以将机械信号转化为细胞内的生物信号从而改变NSCs的命运^[50]。在机械信号转导的通路中,较硬的水凝胶比软的水凝胶可以更好地促进细胞产生更高的张力。较硬的水凝胶会激活细胞中的RhoA-ROCK-MLCK信号通路。MLCK(myosin light chain kinase)的激活会促进肌动蛋白的组装。此外,细胞中被激活的Rho相关激酶(Rho-associated kinase, ROCK)会促进黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)的成熟,增强细胞对水凝胶的黏附。这些激酶有利于应力纤维的生长、稳定和收缩,从而激活YAP和TAZ控制神经细胞的分化^[51]。由于二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)水凝胶的硬度范围大,所以常用于研究硬度对细胞的影响。PDMS水凝胶的硬度可在1 kPa到50 kPa范围内变化,多用于模拟大脑基质微环境。1 kPa PDMS上NSCs衍生的神经元的长度比硬基质上的更长,这就说明1 kPa的PDMS更能促进神经元的成熟和神经网络的生成^[52]。当杨氏模量为3.5 kPa时,甲基丙烯酸酯-壳聚糖水凝胶能够促进NPCs的增殖;当杨氏模量为1 kPa时,其会促进神经元和少突胶质细胞的成熟^[53]。上述研究成果显示,我们可以根据对神经损伤修复想要达到的预期效果去构建最适硬度的水凝胶材料。

2.3 降解性

在3D培养中,水凝胶材料的降解性对细胞的命运也会产生显著影响。在不可降解的材料中,由于其内部的线性网络或孔径不会发生变化,细胞的增殖和迁移可能会受到限制;可降解的材料可以通过改变细胞骨架重塑细胞,使其发生迁移和扩散。水凝胶材料降解的快慢决定内部结构的孔隙大小的变化,孔径在100~300 μm 时有利于骨髓间充质干细胞向成骨方向分化,当孔径大于500 μm 时,细胞不易黏附于水凝胶表面且增殖受到抑制。由于单纯的水凝胶材料无法使细胞黏附,人们大多会选择把天然蛋白质或人工合成的肽加入水凝胶材料中以促进细胞在材料上的附着。人工合成的肽比天然蛋白质更具有优势,研究人员可以更加精准地控制材料的降解性或黏附性^[51,54]。在弹性蛋白水凝胶中,NPCs干性的维持与降解性相关,一些干性相关标记物的表达

量会随着水凝胶降解性的增加而显著升高^[55]。已有研究证明,具有可降解性的材料可以促进NPCs分化为神经元和星形胶质细胞。此外,其他的机械信号,如黏附配体密度^[56]、硬度^[57],也会影响细胞的命运。

2.4 导电性

在发育过程中,神经细胞的生长、分化和迁移受到神经元的电导率和形成的突触网络的影响。在神经发育的每个阶段电导率都发挥重要作用,它主要受离子通道的调控,负责调控神经元之间的电信号。由于导电水凝胶材料具有生物相容性好、电性能稳定、制备简单等优点,已被广泛用于组织工程。常用的导电聚合物材料包括聚吡咯(poly pyrrole, PPy)、聚苯胺(polyaniline, PANI)、聚(3,4-乙炔二氧噻吩)[poly(3,4-ethylenedioxythiophene), PEDOT]和石墨烯,这些导电聚合物材料与其他材料联合使用时处于稳定状态^[58]。例如,导电聚合物材料与聚乙二醇、壳聚糖(Cs)等联合使用,可制备成薄膜、水凝胶、支架等不同形式的导电材料^[59-60]。将NSCs培养在PEDOT/Cs凝胶或Cs凝胶支架上,发现前者的 β -tubulin III和GFAP信号均比后者要强^[61]。有报道称导电碳纳米纤维支架与电刺激相结合,不仅可以模拟体内的导电微环境,还可以调节神经细胞的电生理活动,影响细胞的增殖、分化、迁移和神经突生长,为神经组织的修复提供新的治疗思路^[62]。随着材料导电性能的增加,NSCs分化为神经元的能力也随之增强。将单宁酸(tannic acid, TA)与PPy结合制备成的具有高导电性(0.05~0.18 S/cm)和合适机械性能(0.3~2.2 kPa)的聚合物水凝胶可在体外促进NSCs向神经元分化,抑制星形胶质细胞的发育。当电导率为0.18 S/cm时,神经元的数量最多^[63]。对十二烷基苯磺酸盐掺杂的PPy膜进行双相电刺激,可诱导种子NSCs在GFAP⁺的神经胶质上主要形成TUJ1⁺神经元,并增加每个细胞的神经突总长度。氧化石墨烯泡沫(graphene foam, GOF)作为NSCs的导电支架,在滚动过程中产生的低电压可刺激NSCs增殖,加速其分化为神经元(而不是神经胶质细胞)。这些结果表明,GOF可以促进神经组织损伤的修复^[64]。除了导电性外,最近的证据表明,导电材料的几何形状可能也会影响NSCs的命运。

2.5 水凝胶对物理刺激的响应

在上文中我们综述了水凝胶材料自身的物理特性对NSCs的影响。此外,水凝胶材料还可以对环境中的物理刺激作出响应,从而进一步调节神经细胞

的生长和行为。当暴露于温度、光、磁场和超声波的环境刺激时,水凝胶能够改变自身特性,例如溶胀行为、溶胶-凝胶转变、网络结构和机械强度等^[65]。热响应水凝胶是研究最广泛的一类水凝胶,能够响应温度变化而改变其物理特性。在临界溶液温度下,它表现出流体行为,并在高于临界溶液温度时从溶胶转变为凝胶^[66]。热响应水凝胶在小鼠周围神经系统损伤以及脊髓损伤模型中,可以促进NSCs和施旺细胞的增殖,促进神经轴突和髓鞘再生^[67-68]。光敏水凝胶由聚合物网络组成。该网络通过异构化(顺-反、开-闭)、裂解和二聚化的光反应将光照转化为化学信号^[69]。例如,利用光化学将黏附蛋白固定在光敏水凝胶上可在体外促进NSCs的黏附和存活^[70]。磁响应水凝胶通常是由聚合物基质和具有磁响应特性的功能组分组成的复合凝胶。该水凝胶使脂肪来源的干细胞和神经母细胞瘤细胞向神经元样细胞或神经元方向分化的能力增强^[71-72]。相较于上述三种响应性水凝胶,超声响应水凝胶可增强回波信号和超声诊断的准确性,为生物医学成像提供了一个多功能和强大的平台。据报道,基于二氧化硅的纳米材料和非共价交联的水凝胶可通过超声波瞬时解离,并用于神经再生^[73]。

3 水凝胶材料与NSCs结合在损伤的中枢神经系统中的应用

中枢神经系统的损伤主要包括脑损伤和脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)。在大鼠的创伤性脑损伤模型(trumatic brain injury, TBI)中,与单纯移植NSCs到损伤腔中相比,具有水凝胶支架的NSCs在受伤的大脑中存活的更好,有更加显著的治疗优势。另外,层粘连蛋白的支架比纤连蛋白支架能更好地提高NSCs在损伤部位的存活力和迁移率,使得脑损伤大鼠的空间学习能力也得到了改善^[74-75]。2013年一项研究证实,使用自组装肽RADA₁₆接层粘连蛋白衍生的IKVAV水凝胶,在体外可以促进NSCs的黏附和其向神经元的分化。将其移植到大鼠TBI模型中,不但提高了NSCs的存活率而且减少了神经胶质细胞的形成。移植IKVAV水凝胶六周后创伤部位的脑组织再生能力得到了改善^[76]。在脑动脉栓塞模型中,将NSCs包裹在不带有生长因子的聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]微囊中植入损伤部位后,神经支架可以与宿主组织有效整合,还

可以促进移植部位的血管生成^[77-78]。在缺血缺氧的脑损伤中,聚乙醇酸纤维支架可增强神经干/祖细胞(neural stem/progenitor cells, NSPCs)在损伤部位分化为神经元和重塑皮层组织再生的能力,降低宿主的免疫排异反应。透明质酸、明胶、肝素混合水凝胶中负载的NPCs在损伤部位的生存率提高,周围的炎症反应也得以降低^[79-80]。NSCs移植是各种神经退行性疾病细胞替代疗法的首选。加入生物材料也能进一步提高神经退行性疾病的治疗效果。例如,将RADA₁₆-YIGSR(合成自组装肽)纳米纤维与NSCs结合用于大鼠AD疾病模型的治疗,可以促进NSCs在损伤部位的存活,降低A β 水平和凋亡细胞的数量,且使更多的NSCs分化为神经元。在生物材料的作用下,NSCs的移植可以明显提升AD大鼠的认知和学习记忆功能。此外,损伤部位抗炎因子和胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)的分泌量也会增加,促使促炎因子表达量下降。所以,生物材料主要通过提升NSCs的存活率、向神经元分化的能力以及神经元的存活率,最大程度地发挥移植NSCs对AD造成的神经损伤的修复作用^[81]。在脊髓损伤的模型中,无论是啮齿类动物还是非人灵长类动物,移植负载生物材料的NPCs后,运动功能都得到了改善。与脑损伤相似,针对脊髓损伤的修复,干细胞移植辅助生物材料可以提高移植细胞的活性、降低免疫反应和炎症反应,从而促进神经元分化、突触形成和神经功能的恢复^[82-83]。

4 总结与展望

一直以来中枢神经系统损伤后的功能修复都是临床治疗面临的难题。随着细胞疗法与组织工程的逐渐兴起,生物材料与细胞移植相结合在中枢神经系统的损伤修复中显示出极大的潜力。NSCs在体内的命运调控受多重因素的影响,且存在很多未知的影响因素。NSCs的命运不仅受自身因素的调控,还受外部微环境中物理、化学信号的调控。优化的物理、化学条件组合成的微环境能够有效协调NSCs的增殖和分化以及神经元的成熟。细胞外基质化学成分的变化、不同类型的水凝胶的选择都会通过复杂的信号刺激对NSCs的生长发育产生不同程度的影响。水凝胶材料的物理微环境包括黏弹性、硬度、降解性、导电性。水凝胶的黏弹性大多由整合素介导从而对细胞命运进行调控。一般认为软的

水凝胶更利于NSCs的分化,而硬的水凝胶可更好地促进细胞增殖,水凝胶材料和细胞类型的选择不同也可能产生不同的结果。YAP和Rho-Rock-MLC是研究最多的响应基质硬度的信号通路。但是,如何通过调节水凝胶的理化特性促使细胞信号通路特异性地响应微环境变化,从而指导神经干细胞的增殖和分化行为仍有待进一步探索。

这篇综述总结了水凝胶材料的理化特性对NSCs命运的影响。在组织工程中,生物材料与细胞结合已经被广泛应用于各种损伤修复治疗中。合适的物理、化学特性的选择不仅可以为神经干细胞提供适合生存的微环境,还会为损伤修复治疗提供最佳的治疗条件。所以找到干细胞与微环境之间的最佳适配条件将是未来研究的重点。虽然生物材料信号对神经损伤修复的影响仍处于早期阶段,但是随着组织工程的进步,未来终将会找到适于各种干细胞发挥最好修复作用的材料微环境的条件,从而在临床上实现损伤后的功能修复。

参考文献 (References)

- [1] KAZANIS I, LATHIA J, MOSS L, et al. The neural stem cell microenvironment [M]. StemBook, 2008.
- [2] LUO M L, PAN L, WANG L, et al. Transplantation of NSCs promotes the recovery of cognitive functions by regulating neurotransmitters in rats with traumatic brain injury [J]. Neurochem Res, 2019, 44(12): 2765-75.
- [3] ZHANG G L, ZHU Z H, WANG Y Z. Neural stem cell transplantation therapy for brain ischemic stroke: review and perspectives [J]. World J Stem Cells, 2019, 11(10): 817-30.
- [4] YASUHARA T, KAMEDA M, SASAKI T, et al. Cell therapy for Parkinson's disease [J]. Cell Transplant, 2017, 26(9): 1551-9.
- [5] NIE Y, ZHANG K, ZHANG S, et al. Nitric oxide releasing hydrogel promotes endothelial differentiation of mouse embryonic stem cells [J]. Acta Biomater, 2017, 63: 190-9.
- [6] CHOUMERIANOU D M, DIMITRIOU H, KALMANTI M. Stem cells: promises versus limitations [J]. Tissue Eng Part B Rev, 2008, 14(1): 53-60.
- [7] SHEAR D A, TATE M C, ARCHER D R, et al. Neural progenitor cell transplants promote long-term functional recovery after traumatic brain injury [J]. Brain Res, 2004, 1026(1): 11-22.
- [8] LIU X, MA P X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering [J]. Ann Biomed Eng, 2004, 32(3): 477-86.
- [9] HOLZAPFEL B M, RUDERT M, HUTMACHER D W. Scaffold-based bone tissue engineering [J]. Orthopade, 2017, 46(8): 701-10.
- [10] ZIMMERMANN D R, DOURS-ZIMMERMANN M T. Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge [J]. Histochem Cell Biol, 2008, 130(4): 635-53.
- [11] BARROS C S, FRANCO S J, MÜLLER U. Extracellular matrix: functions in the nervous system [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011, 3(1): a005108.
- [12] LONG K R, HUTTNER W B. How the extracellular matrix shapes neural development [J]. Open Biol, 2019, 9(1): 180216.
- [13] NICHOLSON C, SYKOVÁ E. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis [J]. Trends Neurosci, 1998, 21(5): 207-15.
- [14] MARGOLIS R U, MARGOLIS R K, CHANG L B, et al. Glycosaminoglycans of brain during development [J]. Biochemistry, 1975, 14(1): 85-8.
- [15] MOUW J K, OU G, WEAVER V M. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(12): 771-85.
- [16] SU W, FOSTER S C, XING R, et al. CD44 transmembrane receptor and hyaluronan regulate adult hippocampal neural stem cell quiescence and differentiation [J]. J Biol Chem, 2017, 292(11): 4434-45.
- [17] THAM M, RAMASAMY S, GAN H T, et al. CSPG is a secreted factor that stimulates neural stem cell survival possibly by enhanced EGFR signaling [J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15341.
- [18] SIRKO S, VON HOLST A, WIZENMANN A, et al. Chondroitin sulfate glycosaminoglycans control proliferation, radial glia cell differentiation and neurogenesis in neural stem/progenitor cells [J]. Development, 2007, 134(15): 2727-38.
- [19] DOETSCH F, PETREANU L, CAILLE I, et al. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells [J]. Neuron, 2002, 36(6): 1021-34.
- [20] KEREVER A, SCHNACK J, VELLINGA D, et al. Novel extracellular matrix structures in the neural stem cell niche capture the neurogenic factor fibroblast growth factor 2 from the extracellular milieu [J]. Stem Cells, 2007, 25(9): 2146-57.
- [21] LIAO H, HUANG W, SCHACHNER M, et al. Beta 1 integrin-mediated effects of tenascin-R domains EGFL and FN6-8 on neural stem/progenitor cell proliferation and differentiation *in vitro* [J]. J Biol Chem, 2008, 283(41): 27927-36.
- [22] SHEN Q, WANG Y, KOKOVAY E, et al. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions [J]. Cell Stem Cell, 2008, 3(3): 289-300.
- [23] HALL P E, LATHIA J D, CALDWELL M A, et al. Laminin enhances the growth of human neural stem cells in defined culture media [J]. BMC Neurosci, 2008, 9: 71.
- [24] LIN X, ROBINSON M, PETRIE T, et al. Small intestinal submucosa-derived extracellular matrix bioscaffold significantly enhances angiogenic factor secretion from human mesenchymal stromal cells [J]. Stem Cell Res Ther, 2015, 6(1): 164.
- [25] PREST T A, YEAGER E, LOPRESTI S T, et al. Nerve-specific, xenogeneic extracellular matrix hydrogel promotes recovery following peripheral nerve injury [J]. J Biomed Mater Res A, 2018, 106(2): 450-9.
- [26] LIN T, LIU S, CHEN S, et al. Hydrogel derived from porcine decellularized nerve tissue as a promising biomaterial for repairing peripheral nerve defects [J]. Acta Biomater, 2018, 73: 326-38.
- [27] CERQUEIRA S R, LEE Y S, CORNELISON R C, et al. Decellularized peripheral nerve supports Schwann cell transplants and axon growth following spinal cord injury [J]. Biomaterials, 2018, 177: 176-85.
- [28] WANG J Y, LIOU A, REN Z H, et al. Neurorestorative effect of urinary bladder matrix-mediated neural stem cell transplantation

- following traumatic brain injury in rats [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2013, 12(3): 413-25.
- [29] GU Q, TOMASKOVIC-CROOK E, WALLACE G G, et al. 3D bioprinting human induced pluripotent stem cell constructs for *in situ* cell proliferation and successive multilineage differentiation [J]. *Adv Healthc Mater*, 2017, doi: 10.1002/adhm.201700175.
- [30] LIU S, XIE Y Y, WANG L D, et al. A multi-channel collagen scaffold loaded with neural stem cells for the repair of spinal cord injury [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(11): 2284-92.
- [31] YANG Y, FAN Y, ZHANG H, et al. Small molecules combined with collagen hydrogel direct neurogenesis and migration of neural stem cells after spinal cord injury [J]. *Biomaterials*, 2021, 269: 120479.
- [32] ZHAI Y, WANG Q, ZHU Z, et al. Cell-derived extracellular matrix enhanced by collagen-binding domain-decorated exosomes to promote neural stem cells neurogenesis [J]. *Biomed Mater*, 2021, doi: 10.1088/1748-605X/ac4089.
- [33] SHARMA R, SMITS I P M, DE LA VEGA L, et al. 3D bioprinting pluripotent stem cell derived neural tissues using a novel fibrin bioink containing drug releasing microspheres [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 57.
- [34] ZAREI-KHEIRABADI M, SADROSADAT H, MOHAMMAD-SHIRAZI A, et al. Human embryonic stem cell-derived neural stem cells encapsulated in hyaluronic acid promotes regeneration in a contusion spinal cord injured rat [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 148: 1118-29.
- [35] ADDINGTON C P, DHARMAWAJ S, HEFFERNAN J M, et al. Hyaluronic acid-laminin hydrogels increase neural stem cell transplant retention and migratory response to SDF-1 α [J]. *Matrix Biol*, 2017, doi: 10.1016/j.matbio.2016.09.007.
- [36] WANG T W, SPECTOR M. Development of hyaluronic acid-based scaffolds for brain tissue engineering [J]. *Acta Biomater*, 2009, 5(7): 2371-84.
- [37] HUANG Y J, WU H C, TAI N H, et al. Carbon nanotube rope with electrical stimulation promotes the differentiation and maturity of neural stem cells [J]. *Small*, 2012, 8(18): 2869-77.
- [38] MATTSON M P, HADDON R C, RAO A M. Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth [J]. *J Mol Neurosci*, 2000, 14(3): 175-82.
- [39] PARK S Y, PARK J, SIM S H, et al. Enhanced differentiation of human neural stem cells into neurons on graphene [J]. *Adv Mater*, 2011, 23(36): H263-7.
- [40] FABBRO A, BOSI S, BALLERINI L, et al. Carbon nanotubes: artificial nanomaterials to engineer single neurons and neuronal networks [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2012, 3(8): 611-8.
- [41] GORDON T, UDINA E, VERGE V M, et al. Brief electrical stimulation accelerates axon regeneration in the peripheral nervous system and promotes sensory axon regeneration in the central nervous system [J]. *Motor Control*, 2009, 13(4): 412-41.
- [42] CHAO T I, XIANG S, CHEN C S, et al. Carbon nanotubes promote neuron differentiation from human embryonic stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 384(4): 426-30.
- [43] CELLOT G, CILIA E, CIPOLLONE S, et al. Carbon nanotubes might improve neuronal performance by favouring electrical shortcuts [J]. *Nat Nanotechnol*, 2009, 4(2): 126-33.
- [44] MATSUMOTO K, SATO C, NAKA Y, et al. Neurite outgrowths of neurons with neurotrophin-coated carbon nanotubes [J]. *J Biosci Bioeng*, 2007, 103(3): 216-20.
- [45] MALARKEY E B, REYES R C, ZHAO B, et al. Water soluble single-walled carbon nanotubes inhibit stimulated endocytosis in neurons [J]. *Nano Lett*, 2008, 8(10): 3538-42.
- [46] TANG M, SONG Q, LI N, et al. Enhancement of electrical signaling in neural networks on graphene films [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(27): 6402-11.
- [47] AGBAY A, DE LA VEGA L, NIXON G, et al. Guggulsterone-releasing microspheres direct the differentiation of human induced pluripotent stem cells into neural phenotypes [J]. *Biomed Mater*, 2018, 13(3): 034104.
- [48] CHAUDHURI O, COOPER-WHITE J, JANMEY P A, et al. Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour [J]. *Nature*, 2020, 584(7822): 535-46.
- [49] DARNELL M, O'NEIL A, MAO A, et al. Material microenvironmental properties couple to induce distinct transcriptional programs in mammalian stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(36): E8368-E77.
- [50] MARTINAC B. Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 12): 2449-60.
- [51] ZHONG J, YANG Y, LIAO L, et al. Matrix stiffness-regulated cellular functions under different dimensionalities [J]. *Biomater Sci*, 2020, 8(10): 2734-55.
- [52] BLASCHKE S, VAY S U, PALLAST N, et al. Substrate elasticity induces quiescence and promotes neurogenesis of primary neural stem cells-A biophysical *in vitro* model of the physiological cerebral milieu [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2019, 13(6): 960-72.
- [53] LEIPZIG N D, SHOICHET M S. The effect of substrate stiffness on adult neural stem cell behavior [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(36): 6867-78.
- [54] MADL C M, LESAVAGE B L, DEWI R E, et al. Matrix remodeling enhances the differentiation capacity of neural progenitor cells in 3D hydrogels [J]. *Adv Sci*, 2019, 6(4): 1801716.
- [55] MADL C M, LESAVAGE B L, DEWI R E, et al. Maintenance of neural progenitor cell stemness in 3D hydrogels requires matrix remodelling [J]. *Nat Mater*, 2017, 16(12): 1233-42.
- [56] RANGA A, GIRGIN M, MEINHARDT A, et al. Neural tube morphogenesis in synthetic 3D microenvironments [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(44): E6831-E9.
- [57] RAMMENSEE S, KANG M S, GEORGIUOU K, et al. Dynamics of mechanosensitive neural stem cell differentiation [J]. *Stem Cells*, 2017, 35(2): 497-506.
- [58] FAROKHI M, MOTTAGHITALAB F, SAEB M R, et al. Conductive biomaterials as substrates for neural stem cells differentiation towards neuronal lineage cells [J]. *Macromol Biosci*, 2021, 21(1): e2000123.
- [59] CHEN C, RUAN S, BAI X, et al. Patterned iridium oxide film as neural electrode interface: biocompatibility and improved neurite outgrowth with electrical stimulation [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 103: 109865.
- [60] GUPTA P, AGRAWAL A, MURALI K, et al. Differential neural cell adhesion and neurite outgrowth on carbon nanotube and graphene reinforced polymeric scaffolds [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 97: 539-51.
- [61] WANG S, GUAN S, LI W, et al. 3D culture of neural stem cells within conductive PEDOT layer-assembled chitosan/gelatin scaffolds for neural tissue engineering [J]. *Mater Sci Eng C Mater*

- Biol Appl, 2018, 93: 890-901.
- [62] ZHU W, YE T, LEE S J, et al. Enhanced neural stem cell functions in conductive annealed carbon nanofibrous scaffolds with electrical stimulation [J]. *Nanomedicine*, 2018, 14(7): 2485-94.
- [63] ZHOU L, FAN L, YI X, et al. Soft conducting polymer hydrogels cross-linked and doped by tannic acid for spinal cord injury repair [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(11): 10957-67.
- [64] D'ABACO G M, MATTEI C, NASR B, et al. Graphene foam as a biocompatible scaffold for culturing human neurons [J]. *R Soc Open Sci*, 2018, 5(3): 171364.
- [65] FLÉGEAU K, PACE R, GAUTIER H, et al. Toward the development of biomimetic injectable and macroporous biohydrogels for regenerative medicine [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2017, 247: 589-609.
- [66] ZHANG K, XUE K, LOH X J. Thermo-responsive hydrogels: from recent progress to biomedical applications [J]. *Gels*, 2021, doi: 10.3390/GELS7030077.
- [67] LI R, LI Y, WU Y, et al. Heparin-poloxamer thermosensitive hydrogel loaded with bFGF and NGF enhances peripheral nerve regeneration in diabetic rats [J]. *Biomaterials*, 2018, 168: 24-37.
- [68] ZHAO Y Z, JIANG X, LIN Q, et al. Thermosensitive heparin-poloxamer hydrogels enhance the effects of GDNF on neuronal circuit remodeling and neuroprotection after spinal cord injury [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2017, 105(10): 2816-29.
- [69] LI L, SCHEIGER J M, LEVKIN P A. Design and applications of photoresponsive hydrogels [J]. *Adv Mater*, 2019, 31(26): e1807333.
- [70] CAI Z, GAN Y, BAO C, et al. Photosensitive hydrogel creates favorable biologic niches to promote spinal cord injury repair [J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(13): e1900013.
- [71] MIZUTA R, SASAKI Y, KAWASAKI R, et al. Magnetically navigated intracellular delivery of extracellular vesicles using amphiphilic nanogels [J]. *Bioconjug Chem*, 2019, 30(8): 2150-5.
- [72] SANTHOSH M, CHOI J H, CHOI J W. Magnetic-assisted cell alignment within a magnetic nanoparticle-decorated reduced graphene oxide/collagen 3D nanocomposite hydrogel [J]. *Nanomaterials*, 2019, 9(9): 1293.
- [73] GRIMAUDO M A, KRISHNAKUMAR G S, GIUSTO E, et al. Bioactive injectable hydrogels for on demand molecule/cell delivery and for tissue regeneration in the central nervous system [J]. *Acta Biomater*, 2022, 140: 88-101.
- [74] TATE M C, SHEAR D A, HOFFMAN S W, et al. Fibronectin promotes survival and migration of primary neural stem cells transplanted into the traumatically injured mouse brain [J]. *Cell Transplant*, 2002, 11(3): 283-95.
- [75] TATE C C, SHEAR D A, TATE M C, et al. Laminin and fibronectin scaffolds enhance neural stem cell transplantation into the injured brain [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2009, 3(3): 208-17.
- [76] CHENG T Y, CHEN M H, CHANG W H, et al. Neural stem cells encapsulated in a functionalized self-assembling peptide hydrogel for brain tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(8): 2005-16.
- [77] BIBLE E, CHAU D Y, ALEXANDER M R, et al. The support of neural stem cells transplanted into stroke-induced brain cavities by PLGA particles [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(16): 2985-94.
- [78] BIBLE E, QUTACHI O, CHAU D Y, et al. Neo-vascularization of the stroke cavity by implantation of human neural stem cells on VEGF-releasing PLGA microparticles [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(30): 7435-46.
- [79] PARK K I, TENG Y D, SNYDER E Y. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(11): 1111-7.
- [80] ZHONG J, CHAN A, MORAD L, et al. Hydrogel matrix to support stem cell survival after brain transplantation in stroke [J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2010, 24(7): 636-44.
- [81] CUI G H, SHAO S J, YANG J J, et al. Designer self-assemble peptides maximize the therapeutic benefits of neural stem cell transplantation for Alzheimer's disease via enhancing neuron differentiation and paracrine action [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(2): 1108-23.
- [82] ROSENZWEIG E S, BROCK J H, LU P, et al. Restorative effects of human neural stem cell grafts on the primate spinal cord [J]. *Nat Med*, 2018, 24(4): 484-90.
- [83] KOFFLER J, ZHU W, QU X, et al. Biomimetic 3D-printed scaffolds for spinal cord injury repair [J]. *Nat Med*, 2019, 25(2): 263-9.