

# 共价交联明胶微球支架的制备及成骨细胞相容性研究

占树华<sup>1</sup> 范长江<sup>2</sup> 蔡学昌<sup>1</sup> 刘霞<sup>1</sup> 董作祥<sup>1</sup> 孙鹏<sup>1</sup>

(青岛大学, 山东 青岛 266003 1 附属医院神经外科; 2 转化医学研究院)

**[摘要]** **目的** 制备外观圆整、分散性好、粒径均匀的明胶微球, 构建 EDC 交联明胶微球支架, 探索该支架的成骨细胞相容性, 为构建组织工程化骨奠定基础。**方法** 应用油包水单乳液法制备明胶微球, 筛选合适粒径微球。并用 EDC/NHS 法交联处理微球备用, 将小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 MC3T3-E1 与交联处理的明胶微球共培养作为 EDC 交联明胶微球组; MC3T3-E1 培养于细胞培养板作为标准对照组。于接种培养 1 d 后采用荧光标记的鬼笔环肽进行 F-actin 染色, 培养 1、2、3 d 后, 分别采用活/死细胞荧光染色法及 MTT 法检测细胞增殖情况, 探索 EDC 交联明胶微球支架上成骨细胞黏附、伸展情况及细胞增殖活力。**结果** 制得的明胶微球, 外观圆整, 分散性好, 粒径分布集中。MC3T3-E1 可以黏附于明胶微球支架, 伸展良好, 增殖活跃, 表现出良好的细胞活力。**结论** EDC 交联明胶微球支架具有良好的细胞相容性, 有望成为一种新型的骨组织工程支架以及颅骨缺损修复材料。

**[关键词]** 明胶; 微球体; 组织支架; 成骨细胞; 生物相容性材料; 交联试剂

**[中图分类号]** R318.1; R318.08 **[文献标志码]** A

**PREPARATION OF COVALENTLY CROSS-LINKED GELATIN MICROSPHERE SCAFFOLD AND ITS OSTEOBLAST COMPATIBILITY** ZHAN Shuhua, FAN Changjiang, CAI Xuechang, LIU Xia, DONG Zuoixiang, SUN Peng (Department of Neurosurgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To prepare gelatin microspheres with a smooth surface, good dispersity, and a consistent particle size, to construct covalently cross-linked gelatin microsphere scaffold using EDC and investigate its compatibility with osteoblasts, and to lay a foundation for constructing tissue-engineered bone. **Methods** The water-in-oil single emulsion method was used to prepare gelatin microspheres, and the microspheres with a proper particle size were screened out. The selected microspheres were cross-linked by EDC/NHS. Mouse embryo osteoblast precursor cells (MC3T3-E1) co-cultured with cross-linked gelatin microspheres were selected as covalently cross-linked gelatin microsphere scaffold group, and MC3T3-E1 cells cultured in a cell culture plate were selected as standard control group. Fluorescein-labeled phalloidine was used for F-actin staining at 1 day after seeding, and after 1, 2, and 3 days of culture, live/dead fluorescent staining assay and MTT assay were performed to evaluate cell proliferation, as well as osteoblast adhesion, stretching, and cell proliferation on the covalently cross-linked gelatin microsphere scaffold.

**Results** The gelatin microspheres prepared by the water-in-oil single emulsion method had a smooth surface, good dispersity, and a consistent particle size. MC3T3-E1 cells showed good adhesion to the gelatin microsphere scaffold, with good stretching and viability. **Conclusion** The covalently cross-linked gelatin microsphere scaffold prepared by EDC has good osteoblast compatibility and is expected to become a new type of material for bone tissue engineering scaffold and cranial defect repair.

**[KEY WORDS]** Gelatin; Microspheres; Tissue scaffolds; Osteoblasts; Biocompatible materials; Cross-linking reagents

颅骨缺损是颅脑外伤、外科手术后常见并发症, 颅骨缺损不仅给患者造成痛苦, 同时外观形象也给患者带来心理压力, 颅骨缺损修复具有重要意义。颅骨缺损通常采用不同的修复方法和修复材料, 临床常用的颅骨缺损的修复材料包括自体骨、同种异体骨、异种骨、非金属材料(有机玻璃及骨水泥与硅橡胶)、金属材料(钛网)等<sup>[1-4]</sup>。其中, 自体骨和同种异体骨仍被认为是最理想的骨移植材料, 同时也被称为骨移植的“金标准”。但是, 这些材料由于其来源有限、给供体造成继发损害、可产生免疫排斥反

应、制作成本高及塑形困难等缺陷, 临床应用均不够理想<sup>[5]</sup>。

近年来, 随着再生医学和组织工程学的迅速发展, 探索新型组织工程支架成为研究热点。组织工程材料主要分为天然材料(明胶、海藻酸盐、透明质酸等)<sup>[6-10]</sup>、合成材料(聚己内酯、聚乳酸、聚乙醇酸等)及生物活性陶瓷材料(羟基磷灰石等)3类<sup>[11-14]</sup>。明胶是天然材料的一种, 具有来源广泛、价格低廉、可塑性强、生物相容性高、生物可降解性及亲细胞性强等优点, 成为近年研究的热点。明胶微球具有广泛的表面, 可支持细胞生长, 作为细胞载体, 为细胞提供良好的 3D 生长空间。此外, 明胶微球还具有可注射性, 细胞和支架复合体可直接注射至缺损部

**[收稿日期]** 2019-04-22; **[修订日期]** 2019-05-25

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(21604045, 81671305)

**[通讯作者]** 范长江, Email: fanchangjiang@hotmail.com; 孙鹏,

Email: sunpengqd@163.com

位,操作简单,创伤小<sup>[15]</sup>。MC3T3-E1 因为其培养简单、增殖快、成骨能力稳定,是骨组织工程研究常用的模式细胞<sup>[16]</sup>。所以,本研究应用 MC3T3-E1 作为种子细胞,共价交联明胶微球作为细胞支架,构建细胞/支架复合体,共培养后,以探索共价交联明胶微球支架的细胞相容性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料来源

小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1 由青岛大学附属医院中心实验室提供。

### 1.2 试剂和仪器

DMEM 高糖培养液(以色列 BI 公司),胎牛血清(以色列 BI 公司),胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),B 型牛皮明胶(北京索莱宝科技有限公司),1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羧基琥珀酰亚胺(NHS,上海麦克林生化科技有限公司),iFluor™ 488 phalloidiniFluor™ 488 标记鬼笔环肽(上海翊圣生物科技有限公司),MTT 试剂(美国 Sigma 公司)。

恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司),倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司),荧光显微镜(日本 Nikon 公司),多功能微孔板检测仪(美国伯腾仪器有限公司)。

### 1.3 明胶微球制备

根据以前的方法稍作调整通过油包水单乳液法制备明胶微球<sup>[17-18]</sup>。将含 20 mL 食用油、60 mL 石蜡油的混合液混合均匀。取 20 mL 浓度为 100 g/L 的明胶溶液倒入上述混合油中。将混合物在 60 ℃ 下搅拌 30 min,得到油包水乳液,然后将其迅速转移至冰水混合物中,继续搅拌 30 min。将混合物倒入预冷的 1,4-二氧六环和丙酮溶液中,并交替用 1,4-二氧六环和丙酮洗涤 3 次。随后,用无水乙醇洗涤明胶微球 2 次。再将所得微球放入 60 ℃ 的烘箱中过夜烘干。最后,通过不同孔径的筛网分离干燥明胶微球,筛选直径为 100~300 μm 明胶微球用于后续研究。

将干燥明胶微球悬浮于含有 40 mmol/L EDC 和 100 mmol/L NHS 的体积分数 0.95 乙醇溶液中,室温下置于摇床震荡 6 h。通过离心分离得到交联的微球,并在 10 g/L 的明胶溶液中温育过夜,以除去反应残余的甲基丙烯酸酐。将得到的 EDC 交联的明胶微球用双蒸水洗涤 3 次,并在 60 ℃ 的烘箱中完全干燥。后将 EDC 交联的明胶微球浸泡在

含有 10<sup>6</sup> U/L 青霉素和 1 g/L 链霉素的 PBS 中,置于 4 ℃ 过夜除菌,更换无菌 PBS,并于 4 ℃ 条件下储存备用。

### 1.4 成骨细胞培养

MC3T3-E1 细胞接种于细胞培养皿中,加入含体积分数 0.10 胎牛血清、10<sup>5</sup> U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的高糖 DMEM 培养液,置于 37 ℃、含体积分数 0.05 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养,隔天换液。倒置相差显微镜下观察,待细胞融合达到 70%~80% 时,用胰蛋白酶消化收集细胞用于下一步研究。

### 1.5 细胞支架复合体构建

消化、收集、悬浮、计数细胞,调整细胞密度为 3×10<sup>7</sup> 个/L。微球组细胞支架复合体构建参考相关文献<sup>[19]</sup>。称取微球,用细胞悬液悬浮微球,将细胞微球支架复合体铺到 96 孔板中,其中每孔含有微球 60 mg 及细胞悬液 100 μL(细胞 3 000 个)。将细胞悬液 100 μL/孔铺到 96 孔板作为标准对照组,每孔含有 3 000 个细胞。置于 37 ℃、含体积分数 0.05 CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。

### 1.6 活/死细胞荧光染色

通过活/死细胞荧光染色方法,观察 EDC 交联明胶微球支架组的细胞形态,评估细胞活力。于超净台中将细胞支架复合体转移到 1.5 mL 离心管中,并且用无菌 PBS 洗涤 3 次。随后,加入 1 mL 含有 2 μmol/L 钙黄绿素和 4 μmol/L 碘化丙啶的 PBS 溶液,置于黑暗条件下,于 37 ℃ 孵育 30 min。将 EDC 交联明胶微球支架用 PBS 洗 2 次,于荧光显微镜下观察。

### 1.7 荧光标记鬼笔环肽染色

先用 PBS 清洗细胞及细胞支架复合体,用含有 40 g/L 甲醛的 PBS 溶液进行细胞固定,PBS 清洗。再用含体积分数为 0.001 的 Triton X-100 的 PBS 溶液透膜,PBS 清洗。然后用新鲜配制的 iFluor™ 488 标记鬼笔环肽工作液染色,PBS 清洗。用 DAPI 溶液进行细胞核染色,PBS 清洗。最后荧光显微镜下观察。

### 1.8 MTT 法检测细胞增殖活力

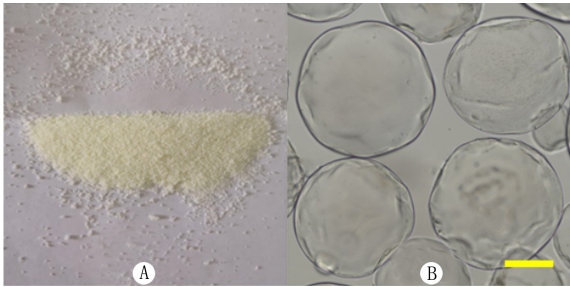
将细胞支架复合体及对照组细胞接种于 96 孔板中,每孔 3 000 个细胞,每组设置 6 个复孔用于 MTT 检测,铺 3 块板,分别于第 1、2、3 天每天取一板用 MTT 方法检测细胞的增殖活力。每孔加入 10 μL MTT(5 g/L),置于培养箱中避光孵育 4 h,然后弃去培养液,每孔加入 DMSO 100 μL,于室温下摇床震荡 10 min,充分溶解甲瓚颗粒,小心地从每

孔中取出100  $\mu$ L 上清液至新的 96 孔板中,注意勿吸入微球。酶标仪检测 490 nm 波长处各孔的吸光度值,分别去掉每组测得的最大值及最小值,用余下 4 个值计算、分析。细胞增殖率计算公式如下:细胞增殖率=(各孔吸光度值/标准对照组第 1 天吸光度值) $\times$ 100%。

2 结 果

2.1 明胶微球表征

大体观下,完全干燥后明胶微球呈淡黄色,表面光滑,分散性好,微球粒径均匀(图 1),筛选出的粒径在 100~300  $\mu$ m 的微球用于实验。筛选出的微球经过交联及灭菌处理后于无菌 PBS 中 4  $^{\circ}$ C 保存备用。



A:完全干燥后明胶微球,大体观;B:EDC 交联明胶微球溶胀后。100 倍,标尺 200  $\mu$ m。

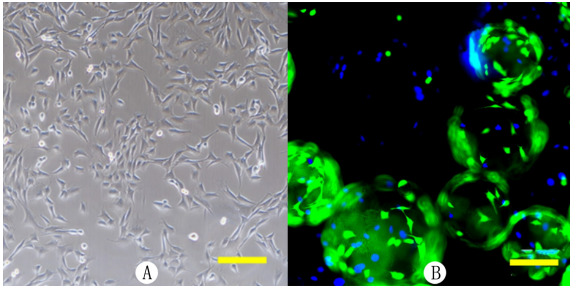
图 1 EDC 交联明胶微球

2.2 细胞形态

显微镜下观察所见,细胞增殖情况良好,成骨细胞呈多形性、长梭形(图 2A)。

2.3 细胞骨架蛋白染色

荧光显微镜下观察,细胞骨架呈绿色,细胞核呈蓝色(图 2B)。成骨细胞贴于明胶微球支架表面生长,细胞伸展良好,部分细胞已长出伪足,而且细胞之间可见连接。



A:倒置相差显微镜下成骨细胞的形态(MC3T3-E1 细胞。100 倍,标尺 200  $\mu$ m);B:细胞骨架蛋白染色结果(鬼笔环肽及 DAPI 染色。100 倍,标尺 200  $\mu$ m)。

图 2 细胞形态和细胞骨架蛋白染色

2.4 细胞活性检测

染色后,在荧光显微镜下,活细胞质显绿色荧

光,死细胞核显红色荧光(图 3)。MC3T3-E1 和 EDC 交联明胶微球支架复合培养后 1 d,MC3T3-E1 于微球表面贴壁生长,细胞伸展呈多形性,在微球间隙有部分死细胞。在培养的第 3 天,细胞明显增多并融合成片状。

2.5 细胞增殖能力

研究结果显示,分组和时间对细胞增殖率无交互影响( $F=0.48, P>0.05$ ),分组对细胞增殖率无明显影响( $F=3.73, P>0.05$ ),时间对细胞增殖率有显著影响( $F=215.33, P<0.001$ )。时间对微球组细胞增殖率有显著影响( $F=813.94, P<0.001$ )。时间对对照组细胞的增殖率有显著性影响( $F=59.83, P<0.001$ )。进一步对时间进行两两比较发现,两组随着时间的延长,细胞的增殖率逐渐增高,第 3 天>第 2 天>第 1 天。见表 1。结果提示细胞在 EDC 交联的微球支架上具有良好的细胞活力,与细胞培养板具有相似的细胞相容性。

表 1 两组细胞增殖率( $n=4, \bar{x} \pm s$ )

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天
对照组	1.00 $\pm$ 0.02	1.24 $\pm$ 0.05	2.06 $\pm$ 0.24
微球组	0.97 $\pm$ 0.02	1.15 $\pm$ 0.03	1.93 $\pm$ 0.05

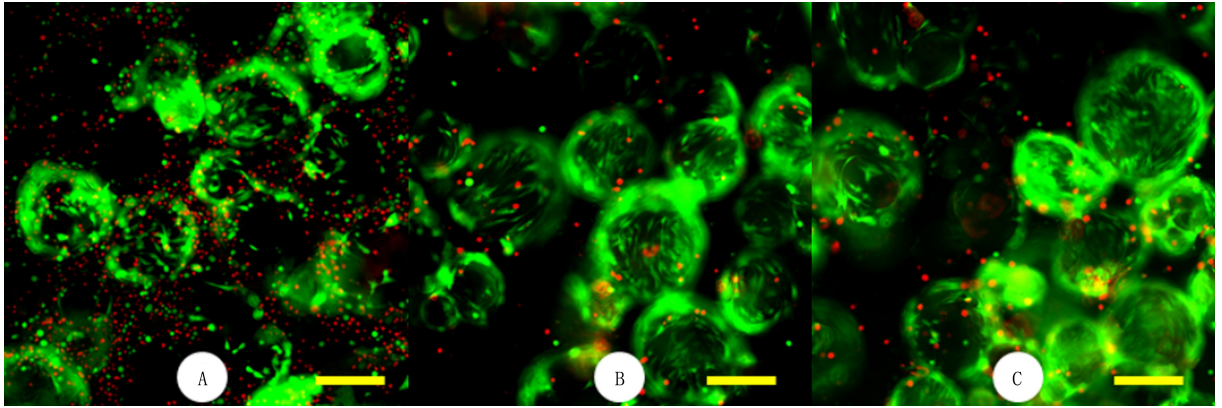
3 讨 论

理想的骨组织工程支架及颅骨缺损修复材料,除了应具备良好的生物相容性、生物可降解性外,还需具有良好的骨诱导性,同时能够参与骨组织的生长与代谢,最终达到修复颅骨缺损的目的。但是传统的颅骨缺损修复材料无法满足理想颅骨修补材料的要求<sup>[20]</sup>。

明胶是一种理化性能良好且体内可自然降解的天然高分子生物材料,且含有的 RGD 序列,有利于细胞黏附<sup>[16,21]</sup>。由于明胶本身具有高亲水性和脆性的特点,所以在应用过程中需要进行交联处理弥补其缺点。常用方法包括化学交联、物理交联和光交联。其中,光交联简单易操作<sup>[22]</sup>,但需要事先预处理,而化学交联较稳定,本研究应用了 EDC 化学交联,使明胶微球具备生物相容性的同时保持稳定性以达到细胞支持的作用,弥补了明胶材料的不足。

油包水单乳液法制备明胶微球,操作简单,条件温和易实现,且整个制备过程耗时较短。该方法制备的明胶微球,显微镜下观察显示,外观圆整、粒径均匀、分散性好,可支持细胞贴壁生长,为种子细胞提供三维的生存空间。此外,明胶微球的球形表面





A:第 1 天;B:第 2 天;C:第 3 天。100 倍,标尺 200  $\mu\text{m}$ 。

图 3 活/死细胞染色结果

增加了细胞的生长空间,利于细胞迁移。表面生长的细胞直接接触细胞外基质,有利于细胞营养物质吸收及代谢废物排出,这些特点都得益于明胶微球的球形结构。

采用 iFluor™ 488 标记的鬼笔环肽,可以与细胞中 F-actin 蛋白结合,发出高亮度、稳定的绿色荧光,指示微丝骨架在细胞中的分布。本实验在细胞接种于微球支架 1 d 后,MC3T3-E1 黏附于微球表面,伸展良好,细胞之间可见连接,表明此微球支架有利于 MC3T3-E1 细胞的黏附。

活/死细胞荧光染色观察微球支架上细胞生长情况。培养 1 d 后,观察到微球支架间隙有一些死细胞,表明 EDC 交联明胶微球支架具有一定的细胞毒性,这种毒性可能是来源于残留的 EDC/NHS,培养 2 d 后,死细胞数量明显减少;培养到第 3 天,活细胞密度明显增大。这表明 EDC 交联明胶微球支架具有良好的细胞相容性。

本研究结果显示,MC3T3-E1 在 EDC 交联明胶微球支架上表现出良好的增殖活性,与在细胞培养板上的增殖活性相似,表明明胶微球支架具有良好的细胞相容性。

综上所述,EDC 交联明胶微球支架可以支持细胞黏附、增殖,并具有良好的细胞相容性,有望成为一种新型颅骨缺损修复支架。本课题组拟进一步研究 EDC 交联明胶微球支架作为骨组织工程支架以及颅骨缺损材料的可行性,为临床治疗大面积颅骨缺损提供实验依据。

### 【参考文献】

[1] KIM J K, LEE S B, YANG S Y. Cranioplasty using autologous bone versus porous polyethylene versus custom-made titanium mesh: A retrospective review of 108 patients[J]. J Korean Neurosurg Soc, 2018,61(6):737-746.

[2] STEFINI R, ESPOSITO G, ZANOTTI B, et al. Use of “custom made” porous hydroxyapatite implants for cranioplasty: Postoperative analysis of complications in 1549 patients[J]. Surg Neurol Int, 2013,4:12.

[3] AITASALO K, KINNUNEN I, PALMGREN J, et al. Repair of orbital floor fractures with bioactive glass implants[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2001,59(12):1390-1395,1396.

[4] VARGAS-SOLALINDE E, HUICHAPA-PADILLA M E, GARZA-CANTÙ D, et al. Bone cement implant as an alternative for orbital floor reconstruction: A case report[J]. Cir Cir, 2017,85(Suppl 1):13-18.

[5] ZANOTTI B, ZINGARETTI N, VERLICCHI A, et al. Cranioplasty: Review of materials[J]. J Craniofac Surg, 2016,27(8):2061-2072.

[6] RAMANATHAN G, THYAGARAJAN S, SIVAGNANAM U T. Accelerated wound healing and its promoting effects of biomimetic collagen matrices with siderophore loaded gelatin microspheres in tissue engineering[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2018,93:455-464.

[7] GHAVIMI S A A, LUNGREN E S, FAULKNER T J, et al. Inductive co-crosslinking of cellulose nanocrystal/chitosan hydrogels for the treatment of vertebral compression fractures [J]. Int J Biol Macromol, 2019,130:88-98.

[8] YAN J X, MIAO Y T, TAN H P, et al. Injectable alginate/hydroxyapatite gel scaffold combined with gelatin microspheres for drug delivery and bone tissue engineering[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016,63:274-284.

[9] CHEN J J, GAO K L, LIU S, et al. Fish collagen surgical compress repairing characteristics on wound healing process in vivo[J]. Mar Drugs, 2019,17(1): E33.

[10] LEE J, LEE S H, KIM B S, et al. Development and evaluation of hyaluronic acid-based hybrid bio-ink for tissue regeneration[J]. Tissue Eng Regen Med, 2018,15(6):761-769.

[11] BAUDEQUIN T, GAUT L, MUELLER M, et al. The osteogenic and tenogenic differentiation potential of C3H10T1/2 (mesenchymal stem cell model) cultured on PCL/PLA electrospun scaffolds in the absence of specific differentiation medium [J]. Materials (Basel), 2017,10(12): E1387.

- [12] STRATTON S, SHELKE N B, HOSHINO K, et al. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering[J]. *Bioact Mater*, 2016,1(2):93-108.
- [13] HUANG W, SHI X T, REN L, et al. PHBV microspheres; PLGA matrix composite scaffold for bone tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2010,31(15):4278-4285.
- [14] ZHONG Q W, LI W H, SU X P, et al. Degradation pattern of porous  $\text{CaCO}_3$  and hydroxyapatite microspheres in vitro and in vivo for potential application in bone tissue engineering[J]. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2016,143:56-63.
- [15] LEE D, HEO D N, NAH H R, et al. Injectable hydrogel composite containing modified gold nanoparticles: Implication in bone tissue regeneration[J]. *Int J Nanomedicine*, 2018,13:7019-7031.
- [16] ZAMANI Y, MOHAMMADI J, AMOABEDINY G, et al. Enhanced osteogenic activity by MC3T3-E1 pre-osteoblasts on chemically surface-modified poly( $\epsilon$ -caprolactone) 3D-printed scaffolds compared to RGD immobilized scaffolds[J]. *Biomed Mater*, 2018,14(1): 015008.
- [17] GONG Y H, SU K, LAU T T, et al. Microcavitary hydrogel-mediated phase transfer cell culture for cartilage tissue engineering[J]. *Tissue Eng Part A*, 2010,16(12):3611-3622.
- [18] SHI X T, SU K, VARSHNEY R R, et al. Sintered microsphere scaffolds for controlled release and tissue engineering[J]. *Pharm Res*, 2011,28(5):1224-1228.
- [19] LAU T T, WANG C M, PNG S W, et al. Genipin-crosslinked microcarriers mediating hepatocellular aggregates formation and functionalities[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2011,96(1):204-211.
- [20] 蒋欣泉. 骨缺损修复生物材料与骨再生[J]. *中华口腔医学杂志*, 2017,52(10):600-604.
- [21] GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ M, ESCOBAR-BARRIOS V A, POZOS-GUILLÉN A, et al. RGD-functionalization of PLA/starch scaffolds obtained by electrospinning and evaluated in vitro for potential bone regeneration[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019,96:798-806.
- [22] ORYAN A, KAMALI A, MOSHIRI A, et al. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018,107(Pt A):678-688.

(本文编辑 耿波 厉建强)

(上接第 267 页)

## [参考文献]

- [1] CAO X, LI J, CAO Y, et al. C3,4 transfer for neurotization of C5,6 nerve roots in brachial plexus injury in a rabbit model[J]. *J Reconstr Microsurg*, 2003,19(4):265-270.
- [2] ROVAK J M, TUNG T H. Traumatic brachial plexus injuries[J]. *Mo Med*, 2006,103(6):632-636.
- [3] WIBERG M, BACKMAN C, WAHLSTRM P, et al. Brachial plexus injuries in adults. Early reconstruction for better clinical results[J]. *Lakartidningen*, 2009,106(9):586-590.
- [4] 杨明杰,史其林,顾玉东. 丛外神经移位治疗臂丛神经损伤的进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2005,19(11): 902-905.
- [5] 顾玉东. 臂丛神经根性撕脱伤治疗近期进展[J]. *中华显微外科杂志*, 2006,29(6):401-402.
- [6] 丁小珩,潘达德,张宏勋,等. 多组神经转位修复臂丛神经上中干损伤[C]/ 中华医学会全国显微外科学术会议暨世界首例断肢再植成功 50 周年庆典. 2013.
- [7] YAMADA S, PETERSON G W, SOLONIUK D S, et al. Coaptation of the anterior rami of C-3 and C-4 to the upper trunk of the brachial plexus for cervical nerve root avulsion[J]. *J Neurosurg*, 1991,74(2):171-177.
- [8] KAWAI H. Nerve surgery of the brachial plexus[M]. Singapore:World Scientific, 2015:136-138.
- [9] TOS P, BATTISTON B, GEUNA S, et al. Tissue specificity in rat peripheral nerve regeneration through combined skeletal muscle and vein conduit grafts[J]. *Microsurgery*, 2000,20(2):65-71.
- [10] NAKAMURA S, MYERS R R. Myelinated afferents sprout into lamina II of L3-5 dorsal horn following chronic constriction nerve injury in rats[J]. *Brain Res*, 1999,818(2):285-290.
- [11] 阿不地合比尔·阿不拉,李平,依力哈木江·吾斯曼,等. 膈神经与肋间神经移位修复臂丛神经根性撕脱伤[J]. *中国组织工程研究*, 2016,20(51):7660-7665.
- [12] 曹鹏克,王伟,李俊明,等. 健侧 C7 神经联合多组神经移位治疗全臂丛神经根性撕脱伤正中神经功能随访[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2015,30(5):449-451.
- [13] 顾立强,裴国献. 周围神经损伤的基础与临床[J]. 北京:人民军医出版社, 2001:160-161.
- [14] 裴彪,全琦,孙逊,等. 周围神经损伤后瓦勒氏变性 & 神经导管的研究与进展[J]. *中国组织工程研究*, 2017,21(10):1596-1603.
- [15] 李月珍,武庚,武杨,等. 坐骨神经瓦勒氏变性大鼠许旺细胞生物学特性及分泌功能变化[J]. *中国组织工程研究*, 2014,18(33):5282-5287.
- [16] 徐筑秋,杨晓楠,祁佐良. 细胞自噬在周围神经损伤及再生中研究进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2017,31(1):122-125.
- [17] 陈泽卡,王沪宁,齐建国. 施万细胞来源的 Toll 样受体在外周神经损伤及修复中的作用和机制[J]. *四川解剖学杂志*, 2013,21(2):54-57.
- [18] 王元元,洪毅,王雪菲,等. 脊髓损伤大鼠远端神经元及骨骼肌的变化[J]. *中国纺织工程研究*, 2014,18(33):5323-5328.
- [19] 王元元,张军卫,洪毅,等. 大鼠胸段脊髓损伤后后肢神经肌肉的自然变化[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2015,25(3):264-273.

(本文编辑 耿波 厉建强)