

网络出版时间:2022-04-19 13:29 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220415.1514.024.html

改良透明质酸水凝胶控释脑源性神经营养因子对大鼠胚胎神经干细胞生长、分化和凋亡的影响

王震,张香路,李阳,阮铭喧,黄斐

摘要 目的 研究改良透明质酸(HA)水凝胶控释脑源性神经营养因子(BDNF)对大鼠胚胎神经干细胞(rFNSCs)生长、分化及凋亡的影响。方法 实验以大鼠胚胎神经干细胞为研究对象,将实验分为3组,分别为空白对照组[rFNSCs与聚乳酸乙醇酸(PLGA)和HA共培养]、条件对照组(rFNSCs与BDNF-PLGA和HA共培养)、实验组(rFNSCs与BDNF-PLGA和改良HA水凝胶即Dex-HA共培养)。采用ELISA法检测控释支架中BDNF的释放曲线;Live/Dead实验检测各组中的rFNSCs凋亡情况;CCK-8法检测rFNSCs与水凝胶共培养后的细胞增殖活性;免疫细胞化学染色法检测不同组中rFNSCs的分化情况。结果 ELISA法结果显示水凝胶对BDNF的控释可以持续14 d。Live/Dead实验显示实验组中rFNSCs凋亡数低于空白对照组和条件对照组。CCK-8实验表明,三组中实验组rFNSCs细胞增殖活性最强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。免疫细胞化学染色结果表明,与空白对照组和条件对照组相比,实验组水凝胶在体外能促进rFNSCs向神经元分化,减少向星形胶质细胞的分化,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 改良HA水凝胶控释BDNF可以促进rFNSCs的生长、分化并减少其凋亡。

关键词 透明质酸水凝胶;胚胎神经干细胞;脑源性神经营养因子

中图分类号 R 394.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)05-0805-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.025

目前脊髓损伤的治疗仍然面临着很大的挑战,主要原因是脊髓损伤内部的神经干细胞分化效率低^[1],神经生长因子的缺乏以及损伤部位产生炎症的微环境^[2-3]。组织工程技术将神经干细胞支架与药物或生长因子结合来克服这些问题。透明质酸(hyaluronic acid, HA)因具有非免疫原性,良好的生物相容性^[4],而广泛用作脊髓损伤修复的生物材料。但HA降解速度过快,不支持细胞黏附^[5-6],因

此需对HA进行改良,用己二酸二酰肼(adipic dihydrazide, ADH)对HA修饰,然后与葡聚糖(dextran, Dex)接枝。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是脊髓损伤实验中最常用的生长因子,它可以促进神经干细胞的增殖,神经轴突的生长,并诱导神经干细胞分化为神经元^[7],然而,BDNF半衰期短,很难保持长期的活性^[8]。聚乳酸乙醇酸[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]作为受控细胞因子的释放载体,能有效维持细胞因子的活性,延长其作用时间^[9]。该研究制备了改良HA水凝胶控释BDNF的微环境,首先,将BDNF包覆在PLGA微球中制备BDNF-PLGA微球,然后用改良的HA与微球进行混合,形成BDNF-PLGA/Dex-HA微环境,最后探讨大鼠胚胎神经干细胞(rat fetal neural stem cells, rFNSCs)与BDNF-PLGA/Dex-HA微环境共培养对rFNSCs的生长、分化及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 孕14 d的Sprague-Dawley(SD)大鼠3只,清洁级,300~320 g,由安徽医科大学实验动物中心提供。实验以大鼠胚胎神经干细胞为研究对象,将实验分为3组:空白对照组为rFNSCs与PLGA和HA共培养;条件对照组为rFNSCs与BDNF-PLGA和HA共培养;实验组为rFNSCs与BDNF-PLGA和改良的透明质酸水凝胶即Dex-HA共培养。

1.2 主要试剂及仪器 HA钠盐(分子量:1.5~2.0 Mu,化妆品级,≥99.5%)购自山东福瑞达生物科技有限公司;除非另有说明,实验中使用的BDNF和高碘酸钠(NaIO_4 , ≥99%)和氯化铁六水合物($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ≥98%)均购自美国Sigma-Aldrich公司。DMEM/F12培养基、B27和胎牛血清(美国Gibco公司);表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, b-FGF)(美国Pepro-Tech公司);巢蛋白(Nestin)多克隆抗体、羊抗兔Alexa fluor 488(英国Abcam公司); β III微管蛋白(β III-tubulin)单克隆

2022-03-17 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81601974);安徽省转化医学研究院科研基金(编号:2021zhyc-c53)

作者单位:安徽医科大学第四附属医院骨科,合肥 230012

作者简介:王震,男,硕士研究生;

黄斐,男,副主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: huangfei3738@126.com

抗体、星形胶质细胞特异性蛋白(GFAP)多克隆抗体和少突胶质细胞特异性蛋白(CNPase)单克隆抗体(美国 Chemicon 公司);驴抗兔 Alexa fluor 594(美国 Sigma - Aldric 公司);大鼠 ELISA 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);细胞活力检测试剂盒(CCK-8)(日本同仁化学研究所);酶标仪(美国 ThermoFisher 公司);倒置荧光显微镜、BX-51 免疫荧光显微镜(日本 Olympus Corporation 公司)。

1.3 BDNF-PLGA 微球的合成 将 200 mg PLGA (75/25,分子量:4~15 ku)溶解在 2 ml 的二氯甲烷中,10 μ g 的 BDNF 溶于 1 ml 牛血清白蛋白,将两种溶液混合。然后,将 10 ml 聚乙烯醇(PVA,1%)缓慢加入到混合物中超声混匀,加入 80 ml PVA (0.3%),搅拌 12 h 以去除二氯甲烷。最终的乳状液用蒸馏水洗涤,离心,冷冻干燥,得到负载 BDNF 的 PLGA 微球。

1.4 氧化葡聚糖(ODex)的产生和 HA-ADH 的合成 ODex 的产生:将 1 g Dex 溶于 20 ml 蒸馏水中,加入 2 ml NaIO_4 (100 mg/ml),于室温避光搅拌反应 12 h。然后加入乙二醇终止反应。将所得溶液用纤维素管(截留分子量为 7~12 ku)在去离子水中透析 3 d,之后冷冻干燥处理。

HA-ADH 的合成:将 100 mg HA 溶解于 25 ml 蒸馏水中,再加入 8 倍量的 ADH,磁力搅拌 4 h。将 100 mg EDC 和 132 mg HoBt 溶解在 2 ml 的 50% DMSO 溶液中,形成羧基活性基团,后用酰肼基团对 HA 进行修饰,调节 HA-NHNH₂ 溶液的 pH 至 6.8 持续反应 4 h,将 pH 调至 7.0 完成反应。最后在 100 mmol/L NaCl、25% EtOH/H₂O 和去离子水中透析 3 d, -50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下冷冻干燥,获得冻干的 HA-ADH 粉。

1.5 构建 BDNF-PLGA/Dex-HA 及 BDNF-PLGA/HA 水凝胶 将 20 mg BDNF-PLGA 微球加入 1 ml 2% HA-ADH 和 0.5 ml 6% ODex 混合溶液中,轻轻搅拌混合物,以 24 孔板作为圆柱形模具,制成 BDNF-PLGA/Dex-HA 水凝胶微环境。同样的办法构建 BDNF-PLGA/HA 水凝胶。

1.6 rFNSCs 的分离、培养及鉴定 rFNSCs 的分离:将 Sprague-Dawley (SD) 大鼠用 10% 水合氯醛麻醉后,无菌条件下取出大鼠大脑皮质放入预冷的 DMEM/F12 培养液中,用剪刀将组织块剪成 1 mm³ 大小,收集于离心管中,D-Hank's 液清洗 2 次。然后加入 0.25% 的 trypsin-EDTA 和 DNAase 100 μ l 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下消化 10 min,加入胎牛血清终止消化,并用

吸管反复吹打,然后通过 200 目滤网制成单细胞悬液,将悬液在 1 000 r/min 离心 5 min,获得 rFNSCs 后进行原代及继代培养。

rFNSCs 培养:将分离的 rFNSCs 接种在低吸附培养皿上,加入含有 2% B27、20 ng/ml EGF 和 b-FGF 的 DMEM/F12 培养液重悬,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 7 d 以上,传代 3~4 次后,用于进一步实验。

rFNSCs 鉴定:将神经球放置在涂有 0.1% 多聚赖氨酸和 Nestin(神经干细胞的标志物)的玻璃片上,用免疫细胞化学染色方法进行 rFNSCs 的鉴定。体外分化时,加入 DMEM/F12 与 2% B27 的分化培养基分化 3 d,免疫细胞化学鉴定神经元。

1.7 水凝胶中 BDNF 的释放 用 ELISA 法测定 BDNF 的释放量。将 rFNSCs 接种于 BDNF-PLGA/Dex-HA 水凝胶支架中作为实验组,将 100 ml BDNF-PLGA/Dex-HA 水凝胶加入到 10 ml 无菌 PBS 中,按照 ELISA 试剂盒说明进行检测。在每个设定的时间点(1~14 d)每天收集样本的上清液,计算累积释放率。将 rFNSCs 接种于 BDNF-PLGA/HA 水凝胶支架中作为条件对照组,并在相同时间点检测 BDNF 浓度。所有实验均重复 3 次,取每个时间点上的 3 个数值求平均值。

1.8 细胞增殖实验 将三组的水凝胶放在超净工作台中,紫外灭菌过夜。取 96 孔板,分别加入空白对照组、条件对照组和实验组的水凝胶 50 μ l 至 96 孔板中,将 rFNSCs 细胞按 1×10^5 个/ml 的密度接种于 96 孔板中。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养 1、3、7 d 后,将 CCK-8 试剂按照 10 μ l/孔加入到培养板中并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 条件下孵育 4 h。酶标仪测量孔板中的溶液在 450 nm 处的吸光度(A)值。

1.9 Live/Dead 实验 采用 Live/Dead 实验检测不同水凝胶中 rFNSCs 的活力。首先将每组的凝胶样品分别放置于培养板底部,然后将 1×10^3 个 rFNSCs 种植于凝胶上,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 条件下培养 72 h,用 2 μ mol/L Calcein-AM 和 4 μ mol/L EthD-1 于黑暗环境中常温下染色 30 min,然后 PBS 洗涤 2 次,在共聚焦显微镜下观察各组凝胶接触的细胞生长情况。活细胞呈现绿色,死细胞呈现红色。

1.10 水凝胶对神经干细胞分化潜能的影响 为探讨 rFNSCs 在三组水凝胶中的分化程度,将在三组水凝胶中培养 7 d 的 rFNSCs 用 4% 甲醛室温固定 30 min,再用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 中渗透 15 min,在含 1% BSA 室温封闭 2 h。加入一抗 rFNSCs

标志物 Nestin 抗体(1:250)、神经元标志物 β III-tubulin 抗体(1:100)、神经胶质细胞标志物 GFAP 抗体(1:400)、少突胶质细胞标志物 CNPase(1:200),于4℃孵育过夜。样品用PBS洗涤3次后,分别用二抗山羊抗鼠 IgG 偶联 Alexa-Fluor488(1:500)和驴抗兔 IgG(1:800)偶联 Alexa-Fluor594(1:500)二抗室温避光孵育2h后,用DAPI染色细胞核后,用共聚焦显微镜采集图像。

1.11 统计学处理 用SPSS 22.0统计软件处理数据,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(ANOVA)结合LSD后检验确定显著性水平。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 水凝胶中 BDNF 的释放 水凝胶中 BDNF 的释放如图1所示,实验组改良的水凝胶与条件对照组水凝胶有相似的14 d控释和持续释放的特性,这两种水凝胶的 BDNF 释放曲线可分为三个阶段。实验组水凝胶中的 BDNF 释放曲线在前6 d呈线性缓释,释放率达到20.07%。第7~12天,样品的释放速率均匀增加,第12天样品中 BDNF 的累积释放率达到86.97%。在第13天与第14天,BDNF 的积累释放速率平均为88.52%和88.57%,趋于平稳。至于条件对照组水凝胶,BDNF 在前4 d相对稳定,第5~11天,BDNF 的释放率增加,第11天 BDNF 的释放率达到85.31%,第12~14天,BDNF 的积累释放量达到平衡。

2.2 rFNSCs 的鉴定 在图2A中,大多数分离的细胞主要以神经球的形式生长,其形态符合 rFNSCs 鉴定的金标准。免疫细胞化学结果显示神经球对 Nestin 呈阳性反应(图2B),因此悬浮神经球可以认为是 rFNSCs。

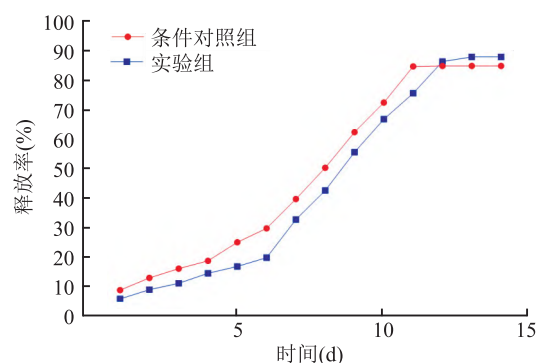


图1 BDNF 的释放曲线

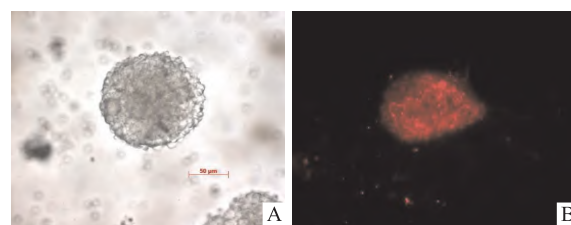


图2 rFNSCs 的原代培养和鉴定 $\times 200$
A:rFNSCs 无血清培养3 d;B:Nestin 抗体染色

2.3 rFNSCs 与水凝胶共培养 将 rFNSCs 按 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 接种入三组的水凝胶上共培养。如图3,培养3 d后在扫描电镜下观察 rFNSCs 的微观形态,可

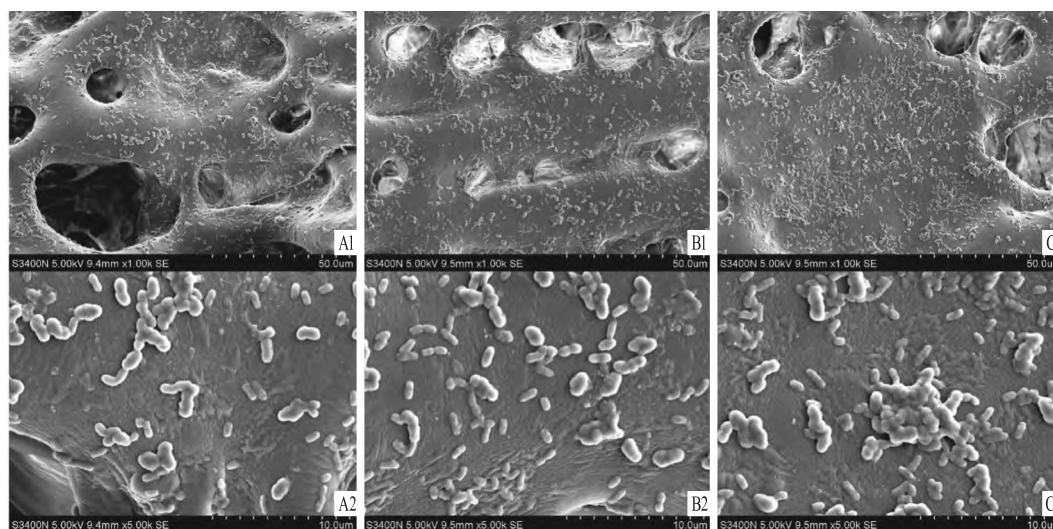


图3 rFNSCs 在不同环境中的培养

A:rFNSCs 与空白对照组水凝胶培养3 d;B:rFNSCs 与条件对照组水凝胶共培养3 d;C:rFNSCs 与实验组水凝胶共培养3 d;1: $\times 200$; 2: $\times 1000$

见实验组水凝胶中 rFNSCs 相对于空白对照组和条件对照组中 rFNSCs 增殖较多,且 rFNSCs 在水凝胶中细胞维持了良好的形态,提示 rFNSCs 与水凝胶具有良好的相容性。

2.4 细胞增殖实验 为了评价改良的 HA 水凝胶形成微环境能否支持 rFNSC 的生长,在实验的第 1、3、7 天用 CCK-8 检测细胞增殖活性。结果如图 4 所示,在相同的培养时间条件下,实验组第 3 天的细胞增殖活性高于空白对照组 ($F = 4.282, P < 0.05$),第 7 天时,实验组细胞增殖活性高于空白对照组和条件对照组 ($F = 15.240, P < 0.05$),且条件对照组也高于空白对照组 ($P < 0.05$),表明实验组改良的 HA 水凝胶对 rFNSC 细胞增殖具有促进作用。

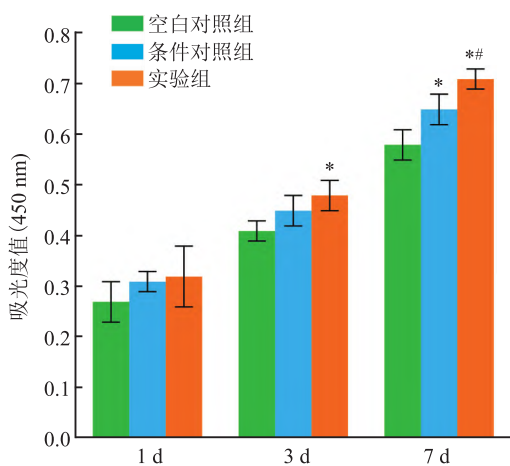


图 4 CCK-8 法检测不同培养组中 rFNSCs 的增殖活性
与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与条件对照组比较: # $P < 0.05$

2.5 细胞活力分析 不同组的细胞活性在第 3 天用 Live/Dead 实验进行评估,其中活细胞染成绿色,死细胞染成红色。共聚焦结果显示,与空白对照组相比,条件对照组与实验组的细胞凋亡数目明显降低,且实验组死亡数目最少(图 5C)。由此可见,实验组水凝胶可以降低 rFNSCs 的凋亡。



图 5 不同培养环境中 rFNSCs 细胞的活/死荧光染色 $\times 200$

A: rFNSCs 与空白对照组水凝胶培养 3 d; B: rFNSCs 与条件对照组水凝胶共培养 3 d; C: rFNSCs 与实验组水凝胶共培养 3 d

2.6 rFNSCs 在水凝胶中的分化情况 通过免疫组织化学研究制备改良 HA 水凝胶控释 BDNF 对 rFNSCs 分化的影响,并统计其中各种细胞所占比例。其中,神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞类型细胞数目分别通过神经元特异性蛋白 β III-tubulin、少突胶质细胞特异性蛋白 CNPase 和星形胶质细胞特异性胶质纤维酸性蛋白 GFAP 的阳性表达数目来评估。与空白对照组及条件对照组相比,实验组 β III-tubulin 阳性率升高 ($F = 30.418, P < 0.05$)、GFAP 阳性率降低 ($F = 28.381, P < 0.05$),且条件对照组较空白对照组 GFAP 阳性率降低 ($P < 0.05$)。三组 CNPase 阳性率变化差异无统计学意义见图 6、7。由此可见,实验组改良 HA 水凝胶控释 BDNF 可以提高 rFNSCs 向神经元的分化,降低向星形胶质细胞分化,对于向少突胶质细胞的分化效果无明显差异。

3 讨论

由于脊髓损伤区域周围不利的微环境,空洞和纤维胶质瘢痕的形成,神经系统中分化成熟神经元自我修复能力的缺乏,以及缺乏合适的生长刺激因子,导致脊髓损伤的有效治疗非常有限^[10]。目前,针对脊髓损伤后功能恢复的方法有干细胞移植、生物材料及神经营养因子的植入,但研究^[11]表明,单纯的干细胞、单纯的生物材料及单纯的神经营养因子移植并不能使脊髓损伤后神经元恢复,但是由于干细胞具有多向分化潜能^[12],组织工程支架可以为其提供支持,神经营养因子则可以促进干细胞的分化,因此三者联合起来移植便成为了研究的热点。

相关研究^[13]表明 HA 经过化学修饰及与 Dex 接枝可以降低 HA 的降解速度,提高其机械性能及增强神经细胞的黏附性能,为细胞提供了适宜细胞黏附及生长的微环境。

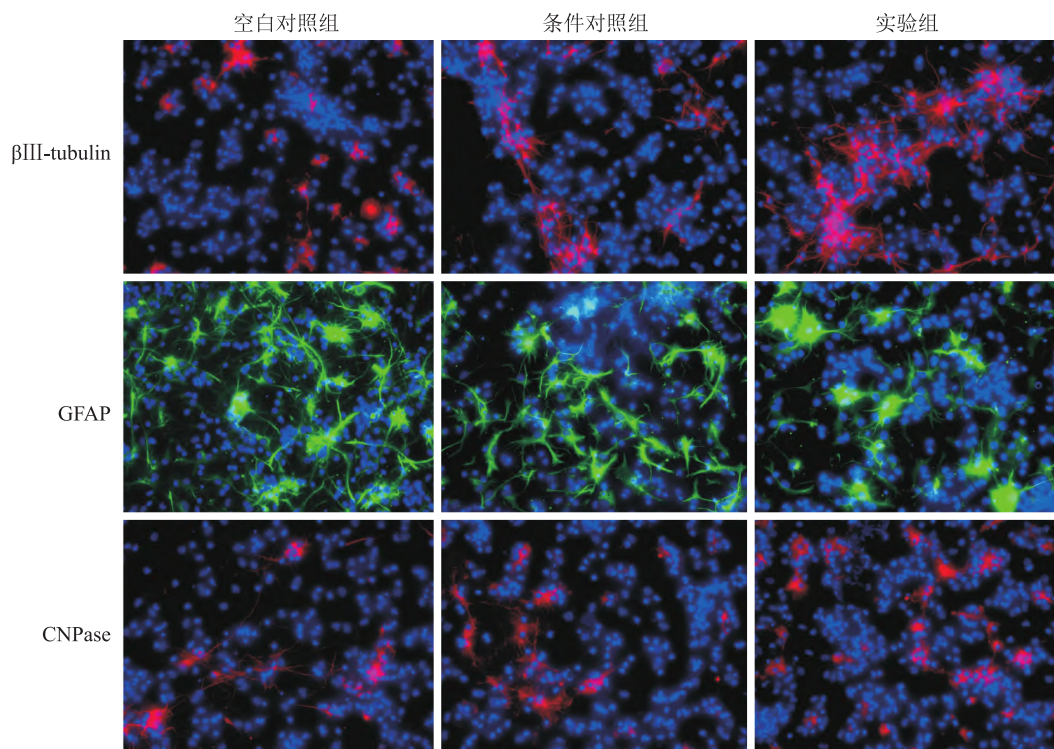
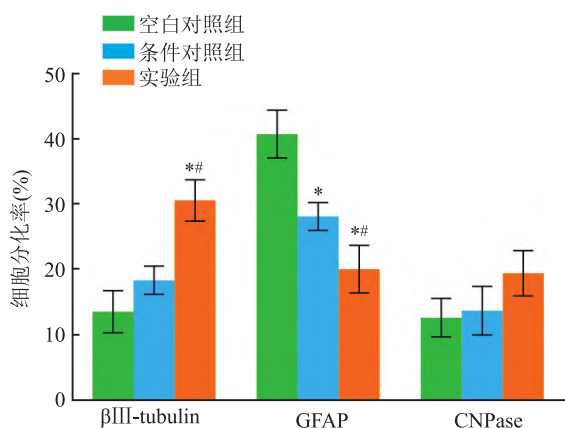


图6 不同环境中 rFNSCs 分化的共聚焦显微镜图像 ×400

图7 不同组中 rFNSCs 分化的百分比
与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与条件对照组比较: # $P < 0.05$

神经营养因子可以提高神经元的存活率,促进轴突再生。BDNF 是脊髓损伤实验中最常用的神经营养因子。研究^[14]表明,外源性的 BDNF 可以促进损伤部位轴突的再生,髓鞘的形成,以及诱导损伤部位神经干细胞的增殖。PLGA 作为受控的细胞因子释放载体,能有效维持细胞因子的活性。本研究中将改良的 HA (Dex-HA) 与控释 BDNF 的微球结合, BDNF 在水凝胶释放结果显示实验组的累计释放率在开始阶段和中期阶段略低于条件对照组的,这是由于从 PLGA 微球中释放 BDNF 后, BDNF 从水凝胶

基质中向外释放。由于实验组的 Dex-HA 相对于条件对照组的 HA 更稳定,不易被水解,所以实验组相对于条件对照组在前中期累计释放率低,后期累计释放率高。且实验组中 BDNF 的释放,在前中期阶段快速释放,在后期的阶段缓慢释放,可以有效保护细胞因子的生物活性,这种释放方式为神经干细胞的生长和分化形成局部有效浓度。将 rFNSCs 接种到三组水凝胶共培养 3 d 后在扫描电镜下观察 rFNSCs 的微观形态,可见实验中 rFNSCs 相对于空白对照组和条件对照组中 rFNSCs 增殖较多,主要原因是实验组水凝胶相对稳定且利于细胞黏附,可以给 rFNSCs 提供一个良好的生长微环境。同时可以看到 rFNSCs 在水凝胶中细胞维持了良好的形态,与水凝胶具有良好的相容性。在 CCK-8 细胞增殖实验中,实验组相对于空白对照组与条件对照组吸光度增加 ($P < 0.05$),表明本研究所制备的 BDNF-PLGA/Dex-HA 中 rFNSCs 的活性要高于在 BDNF/HA 水凝胶和 BDNF-PLGA/HA 水凝胶中的。Live/Dead 实验表明实验组相对于空白对照组及条件对照组可以减少 rFNSCs 凋亡,提高其活力,主要原因是 Dex-HA 相对于 HA 的降解速度减缓了,机械性能及对神经细胞的黏附性能增加了,为 rFNSCs 提供了稳定的

适宜生长的微环境。在免疫细胞化学染色实验中,实验组相对于空白对照组和条件对照组能提高 rFNSCs 分化成神经元的比例,减少 rFNSCs 分化成星形胶质细胞的比例。

综上所述,改良的 HA 水凝胶的多孔结构为 rFNSCs 的生长、增殖及细胞黏附提供了良好的三维微环境,且其控释 BDNF 可以促进 rFNSCs 向神经元的分化,减少了向星形胶质细胞的分化,解决了脊髓损伤区域神经元缺乏及胶质瘢痕形成的问题。该研究为后期相关动物实验研究奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] Khaing Z Z, Seidlits S K. Hyaluronic acid and neural stem cells: implications for biomaterial design[J]. *J Mater Chem B*, 2015,3(40):7850-66.
- [2] Penas C, Guzman M S, Verdu E, et al. Spinal cord injury induces endoplasmic reticulum stress with different cell-type dependent response[J]. *J Neurochem*, 2007,102(4):1242-55.
- [3] Liu S, Sandner B, Schackel T, et al. Regulated viral BDNF delivery in combination with Schwann cells promotes axonal regeneration through capillary alginate hydrogels after spinal cord injury[J]. *Acta Biomater*, 2017,60:167-80.
- [4] Wang R, Yang H, Khan A R, et al. Redox-responsive hyaluronic acid-based nanoparticles for targeted photodynamic therapy/chemotherapy against breast cancer[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2021, 598:213-28.
- [5] Lapcik L J A L, Lapcik L, De Smedt S, et al. Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications[J]. *Chem Rev*, 1998,98(8):2663-84.
- [6] Hahn S K, Jelacic S, Maier R V, et al. Anti-inflammatory drug delivery from hyaluronic acid hydrogels[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2004,15(9):1111-19.
- [7] Liang W, Han Q, Jin W, et al. The promotion of neurological recovery in the rat spinal cord crushed injury model by collagen-binding BDNF[J]. *Biomaterials*, 2010,31(33):8634-41.
- [8] Nagahara A H, Tuszynski M H. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011,10(3):209-19.
- [9] Wen Y, Yu S, Wu Y, et al. Spinal cord injury repair by implantation of structured hyaluronic acid scaffold with PLGA microspheres in the rat[J]. *Cell Tissue Res*, 2016,364(1):17-28.
- [10] Blesch A, Tuszynski M H. Spinal cord injury: plasticity, regeneration and the challenge of translational drug development[J]. *Trends Neurosci*, 2009,32(1):41-47.
- [11] Markmee R, Aungsuchawan S, Pothacharoen P, et al. Effect of ascorbic acid on differentiation of human amniotic fluid mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells[J]. *Heliyon*, 2019,5(7):e2018.
- [12] 童 伟,宋旆文,申才良,等. BMSC-CM 通过抑制 Notch1 信号通路促进神经干细胞的有效分化[J]. *安徽医科大学学报*, 2019,54(12):1835-40.
- [13] 曹璐娟,施 瑜,陈荆晓,等. 透明质酸-葡聚糖超分子水凝胶的制备及其细胞包载性能研究[J]. *中国药科大学学报*, 2014,45(3):307-13.
- [14] Brock J H, Rosenzweig E S, Blesch A, et al. Local and remote growth factor effects after primate spinal cord injury[J]. *Neurosci*, 2010,30(29):9728-37.

Effect of modified hyaluronic acid hydrogel controlled release of brain derived neurotrophic factor on growth, differentiation and apoptosis of embryonic neural stem cells in rats

Wang Zhen, Zhang Xianglu, Li Yang, Ruan Mingxuan, Huang Fei

(Dept of Orthopedics, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230012)

Abstract Objective To investigate the effect of modified hyaluronic acid (HA) hydrogel-controlled release brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on the growth, differentiation, and apoptosis of rat embryonic neural stem cells (rFNSCs). **Methods** The experiment took rat embryonic stem cells as the research object. The experiments were divided into three groups, blank control group [rFNSCs co-cultured with poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and HA], conditional control group (rFNSCs co-cultured with BDNF-PLGA and HA), and experimental group (rFNSCs co-cultured with BDNF-PLGA and modified hyaluronic acid hydrogel that is Dex-HA). ELISA was used for detecting the release curve of BDNF in the controlled-release scaffold. The Live/Dead assay detected the apoptosis of rFNSCs in each group, CCK-8 experiment was used to test the cell proliferation activity of rFNSCs after

网络出版时间:2022-04-19 13:30 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220415.1514.025.html

◇临床医学研究◇

基于 Monaco 计划系统的最小子野面积设置值 对宫颈癌调强放疗计划的影响

刘娜¹, 张明军^{1,2}, 吴翠娥³, 费振乐⁴, 刘苓苓⁵, 李兵兵⁵, 李洁⁵

摘要 **目的** 探究基于 Monaco 计划系统的最小子野面积 (MSA) 在宫颈癌静态调强放疗计划中的最优设置值, 以提高宫颈癌放疗计划精确性。**方法** 回顾性收集 10 例宫颈癌患者, 使用 Monaco 治疗计划系统设计固定五个射野静态调强计划, MSA 分别为 1、2、4、10、20、50、80 和 100 cm², 每个患者得到 8 个放疗计划。以 MSA 为 2 cm² 的放疗计划为对照组, 比较其他 MSA 设置值的放疗计划, 在其他优化目标函数和约束条件相同前提下, 只改变 MSA 设置值, 利用方差分析和事后比较的统计学方法来研究 MSA 对放疗计划产生的影响。**结果** 当 MSA 在 10~20 cm² 范围内, 与对照组相比, 靶区和危及器官的剂量变化不明显, 但是机器跳数和子野数目

开始下降。当 MSA 从 50 cm² 开始, 与对照组相比, 靶区内最大剂量 (D_{2%}) 和平均剂量 (D_{mean}) 均增加, 均匀性指数 (HI) 和适形性指数 (CI) 开始变差。除了小肠平均剂量 D_{mean} 随 MSA 变化不大外, 其余危及器官受量都随着 MSA 增大而不同程度地增加 ($P < 0.05$); 机器跳数和子野数目总体随着 MSA 增大而减少。**结论** 在基于 Monaco 治疗计划系统宫颈癌静态调强计划的设计中, MSA 设置值的最佳范围为 10~20 cm²。

关键词 宫颈癌; 最小子野面积; 调强计划; Monaco; 剂量学
中图分类号 R 815.2; R 737.33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)05-0811-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.026

2022-03-09 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1908085MH262); 2019 年度医学物理与技术安徽省重点实验室开放基金 (编号: LMPT201907)

作者单位: ¹ 安徽医科大学生物医学工程学院, 合肥 230032

安徽医科大学第二附属医院² 肿瘤科、³ 肿瘤放疗中心, 合肥 230601

⁴ 中国人民解放军联勤保障部队第九〇一医院放疗科, 合肥 230031

⁵ 中国科学院合肥肿瘤医院放疗中心, 合肥 230031

作者简介: 刘娜, 女, 硕士研究生;

张明军, 男, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: mjzhang2006@hotmail.com

2020 年全球癌症统计报告显示宫颈癌在全球女性的发病率和病死率中均排第四位, 在宫颈癌的治疗中, 放疗在局部控制率和生存率等方面均取得疗效^[1-2]。在宫颈癌的治疗中, 调强放射治疗 (intensity modulated radiation therapy, IMRT) 相比于 3D 适形放射治疗 (three-dimensional conformal radiotherapy, 3D-CRT) 有更好的剂量学优势, 不仅可以使靶区剂量分布合理、降低正常器官受照剂量, 而且可以减轻肠道术后毒性反应^[3-4]。IMRT 通过逆向计划进行调节优化, 可以达到最佳剂量分布^[5]。但是静态调强计划会使得子野数目增多, 子野形状复杂, 机

coculture with hydrogel. The differentiation ratios of rFNSCs in different groups were detected by immunocytochemical staining. **Results** ELISA result showed that the controlled-release scaffold could release BDNF for 14 days. Live/Dead result showed the number of rFNSCs apoptotic in experimental group was less than blank control group and conditional control group. CCK-8 experiment result showed that the cell proliferation activity of rFNSCs in the experimental group was showed stronger survivability than blank control group and conditional control group. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). Moreover, immunocytochemical staining showed that the experimental group hydrogel could promote the neuronal differentiation of rFNSCs and reduce their differentiation into astrocytes in vitro compared with the blank control group and the conditional control group. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** modified hyaluronic acid hydrogel controlled release brain-derived neurotrophic factor can promote the growth and differentiation of rFNSCs and reduce their apoptosis.

Key words hyaluronic acid hydrogel; neural stem cells; brain-derived nerve growth factor