



电刺激联合导电微沟槽促干细胞成神经分化*

但晓强^{1)**} 董单娟^{1,2)**} 吕永钢^{1)***}

⁽¹⁾ 武汉纺织大学纺织新材料与先进加工全国重点实验室, 武汉 430200;

⁽²⁾ 重庆大学生物工程学院力学生物学与再生医学实验室, 重庆 400044)

摘要 **目的** 周围神经损伤是临床常见疾病, 可影响靶器官功能调控, 进而导致机体功能障碍, 严重损伤甚至可致终身残疾。因此, 如何有效促进损伤周围神经的组织形态与功能重建, 已成为当前亟待解决的关键科学问题。本研究仿生模拟周围神经的高度取向结构及电生理特性, 在细胞水平上探究电刺激 (electrical stimulation, ES) 联合取向导电基质用于修复损伤周围神经的可行性与有效性。**方法** 以具有微沟槽图案的硅片为模板, 制备不同宽度的聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 取向微沟槽基底 (宽度分别为 0、5、10 和 20 μm)。进一步采用软刻蚀技术, 在基底上构建石墨烯基导电图案化基底 (graphene-based conductive patterned substrates, GCPSs), 并根据沟槽宽度依次命名为 GCPS 0、GCPS 5、GCPS 10 和 GCPS 20, 系统考察取向微沟槽结构和 ES 对间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 生物学行为的影响。**结果** 取向微沟槽 PDMS 基底可支持 MSCs 长期生长, 引导细胞沿沟槽方向定向排列, 并促使细胞形态向神经样细胞转化, 表现出诱导 MSCs 向神经谱系分化的能力。GCPSs 对 MSCs 具有良好的细胞相容性, MSCs 在其上的增殖呈时间依赖性, 且微沟槽宽度对细胞增殖无明显影响。ES 联合 GCPSs 对 MSCs 向特异性神经谱系分化的诱导效果受 ES 强度 (0、10、20 和 50 mV/cm) 及微沟槽宽度的共同调控, 其中低强度 ES (10 或 20 mV/cm) 联合 GCPS 10 可显著促进 MSCs 的成神经分化。**结论** 本研究证实, “取向拓扑结构+ES” 联合策略可有效促进 MSCs 成神经分化, 并有望加速周围神经损伤的修复过程。

关键词 电刺激, 取向结构, 石墨烯, 导电基质, 神经分化

中图分类号 Q66, N39

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0372

CSTR: 32369.14.pibb.20260372

周围神经损伤是一种临床常见疾病, 会导致肢体功能发生障碍, 严重影响患者的生活质量。世界范围内周围神经损伤的患病率约占人口的 2%~10%, 对周围神经修复后的恢复程度感到满意的比例不足 42%^[1]。损伤的周围神经具有一定的自我再生和修复能力, 其恢复的时间和程度与损伤严重程度密切相关, 且存在个体差异; 对于长距离神经缺损通常需要手术干预。目前, 自体神经移植仍被认为是临床治疗神经缺损的金标准, 但其固有缺点如供体有限、供区损伤和尺寸不匹配等限制了其临床应用^[2]。因此, 开发一种可以有效促进周围神经损伤再生与修复的治疗策略至关重要。

在自然的周围神经再生过程中, 包括组织结构特征、细胞间相互作用、可溶性因子和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 等在内的组织微环境为细胞行为和组织功能的调节提供了一系列生化和

物理因子^[3]。设计能够模拟天然周围神经微环境的功能性生物支架, 在促进周围神经再生方面具有巨大潜力。天然 ECM 具有丰富的微/纳米尺度的拓扑结构, 可调控细胞的黏附及其他生命活动。基质材料的拓扑结构主要包括表面结构 (如表面图案化和粗糙度等)、孔径大小与分布、排列有序性和尺寸大小等。微/纳米尺度拓扑结构对神经再生的研究主要在图案化的二维基质材料上进行, 特别是具有取向微沟槽结构的基质材料, 良好的“接触引导”效应使其对细胞的生物学行为调控和神经突的再生与延伸更具有优势^[4]。微图案表面 (特别是

* 国家自然科学基金 (U23A2070) 资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 027-59367809, E-mail: yglvbme@163.com; yglv@wtu.edu.cn

收稿日期: 2026-07-09, 接受日期: 2026-09-08

沟槽结构)的尺寸对干细胞分化率和神经突的取向性有直接联系^[5]。小尺寸可以诱导细胞高度有序排列,但也会导致较低的细胞分化率,阻碍了神经突的发育;较大的尺寸可以得到相对大的神经元密度,但会改变神经突的有序排列,使得神经突有较大的概率逃离其引导通道^[6]。构建适宜尺寸的微沟槽图案可以实现更好的细胞分化和有序排列的神经突起,推动图案化技术应用于神经导管的构建以实现神经再生。

电信号是维持机体生物活性的基础。周围神经损伤后,内源性生物电微环境的稳态被破坏,从而产生电场,引起施万细胞(Schwann cells, SCs)和巨噬细胞等再生相关细胞向受损区域迁移^[7],并可调节电兴奋性细胞的活性,对于SCs的增殖和分化、干细胞向神经细胞的分化等具有重要意义^[8-9]。外源性电刺激(electrical stimulation, ES)作为辅助治疗手段为加速周围神经损伤的再生进程作出重要贡献^[10-12]。导电神经导管(nerve guide conduits, NGCs)可以维持其桥接两断端神经间电信号的完整,从而创建利于神经再生的电学微环境^[13]。目前,常用来制备导电支架的材料主要有导电聚合物和碳基无机材料。导电聚合物是主链具有共轭 π 键结构的高分子材料,聚吡咯(polypyrrole, PPy)、聚苯胺(polyaniline, PANI)和聚(3,4-乙二氧基噻吩)(poly(3,4-ethylenedioxythiophene), PEDOT)具有良好的生物相容性,是制备神经支架最常用的导电聚合物^[14-16]。但导电聚合物在多数溶剂中溶解性差、不易加工、质地硬、不可降解,不适于单独用于制备神经支架,常将导电聚合物与其他天然生物材料或可降解聚合物进行复合。石墨烯是一种由单层碳原子紧密排列形成的二维材料,碳原子的强原子相互作用使得其结构非常稳定,且具有优异的物理、化学和结构性能,如高力学强度、高导电性、较高的比表面积和化学纯度等^[17]。作为生物医学领域的新型材料,石墨烯及其衍生物被寄予厚望,为开发用于药物和基因递送的纳米载体、新型生物传感器、细胞成像和癌症治疗以及细胞培养提供了独特的机会^[18-20]。Kim等^[21]在化学气相沉积法制备的单层石墨烯膜上接种间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),发现石墨烯可以诱导早期神经生成相关基因表达上调,认为石墨烯调节了细胞-ECM或细胞-细胞间的相互作用,从而促进了MSCs的神经分化和神经突的生长。Hu等^[22]利用

还原氧化石墨烯(reduced graphene oxide, rGO)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和甲基丙烯酸化明胶(methacrylated gelatin, GelMA)开发了一种仿生大蓝闪蝶鳞翅微观结构的导电支架,该支架能够促进PC12细胞和神经嵴干细胞(neural crest stem cells, NCSCs)神经突的生长和定向延伸,由该支架制备的NGCs可以有效促进大鼠10 mm坐骨神经缺损的再生和运动功能的恢复,说明石墨烯基复合材料对于周围神经损伤的修复具有潜在的应用价值。综上,尽管外源性ES已被证实能够促进神经细胞增殖、分化、迁移及轴突延伸,但其与仿生取向结构及导电微环境联合应用时的共同效应与作用机制尚待深入探究。因此,如何将周围神经的取向结构特征与电生理微环境进行有效整合,并进一步阐明拓扑结构和ES共同调控细胞命运及神经突生长的作用规律,是周围神经组织工程领域亟须关注的科学问题。

鉴于周围神经组织中神经纤维的高度取向排列结构和电生理特性,设计具有取向结构和电活性的生物支架不仅可以提供结构和力学支撑,还可以用于调节细胞/组织的生物学行为和功能。同时,模拟周围神经损伤诱导的生物电场,外源性ES可以进一步调节周围神经再生过程中的细胞/组织行为,如细胞迁移、增殖、分化、神经营养因子的分泌和轴突延伸等^[23],进而加速周围神经损伤的再生,是一种有效的辅助治疗手段。本文选取典型的取向结构——平行排列微沟槽,考察基底形貌对MSCs生物学行为的影响。进一步,制备电功能化的取向微沟槽基底,联合体外ES,以期构建一种同时模拟神经结构和电生理特性的仿周围神经再生微环境,可以促进MSCs向神经谱系特异性分化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

聚- ϵ -己内酯(poly- ϵ -caprolactone, PCL)($M_n=70\,000\sim90\,000$)、L-谷氨酰胺、碳酸氢钠、二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)、三氯(1H,1H,2H,2H-全氟辛基)硅烷(trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl) silane)购自美国Sigma-Aldrich;石墨烯(片径:0.5~5 μm ;厚度:~0.8 nm;单层率:~80%;纯度:~99%(质量百分比);比表面积:500~1 000 m^2/g ;电阻率: $\leq 0.3\,\Omega\cdot\text{cm}$)购自南京先丰纳米;低糖杜尔贝科改良伊格尔培养

基 (low glucose Dulbecc's modified Eagle medium, L-DMEM) 培养基粉末、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco; MTS (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxymethoxyphenyl) -2- (4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium) 购自美国 Promega; 六氟异丙醇 (hexafluoroisopropanol, HFIP) 购自美国 DuPont; Sylgard® 184 Silicone Elastomer Kit 购自美国 Dow Corning; 钙黄绿素 (Calcein AM) (C3099)、碘化丙啉 (propidium iodide, PI) (P3566)、罗丹明标记鬼笔环肽 (R415)、Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔二抗 (A-1034) 购自美国 Invitrogen; 第一链 cDNA 合成试剂盒 (K1622) 购自美国 Thermo Scientific; 神经丝蛋白 M (neurofilament M, NF-M) 抗体 (AB1987)、GFAP 抗体 (MAB-360) 购自美国 Millipore; Tuj1 抗体 (MRB-435P) 购自美国 Covance; Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠二抗 (A0428)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (C1002) 购自碧云天; 神经生长因子- β (nerve growth factor- β , NGF- β) 酶联免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (bsk00129)、BDNF ELISA 试剂盒 (bsk00075)、胶质细胞源性神经生长因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) ELISA 试剂盒 (bsk00091) 购自博奥森; 总 RNA 提取试剂盒 (DP419) 购自天根; SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (RR820A) 购自 Takara; 引物序列购自上海英潍捷基; 多聚甲醛购自成都科隆; 胰蛋白酶、乙二胺四乙酸 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)、牛血清蛋白 (albumin bovine serum, BSA)、Triton X-100 购自索莱宝; 亚克力胶水、浓盐酸、氢氧化钠、氯仿购自川东化工; 青霉素、链霉素购自华北制药; 胶原 (I 型) 购自上海物竞; 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 购自中杉金桥。

1.2 实验细胞

大鼠骨髓源 MSCs 取自 4 周龄无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级 Sprague-Dawley 大鼠 (武汉华联科生物技术有限公司) 的股骨和胫骨, 该动物实验得到武汉华联科生物技术有限公司实验动物福利与伦理委员会的批准 (HLK-20260506-001)。引颈处死大鼠, 75% 酒精浸泡 10~15 min, 在无菌条件下分离出大鼠后肢股骨和胫骨, 除去表面肌肉等组织, 用 10 ml 注射器吸取

L-DMEM+10% FBS 培养液反复冲洗骨髓腔至其发白。然后用移液器反复吹打至单细胞悬液, 分装于 2 个 T25 细胞培养瓶中, 标记为第 0 代细胞 (标记为 P0)。通过更换培养液逐步去除漂浮的造血系细胞可获得较为纯化的 MSCs。细胞置于 37°C、5% CO₂ 和饱和湿度的细胞培养箱中培养。48 h 后更换培养液, 之后每 3 d 更换一次培养液。待细胞融合度为 80%~90% 时, 用 0.25% 胰酶消化液消化细胞并以 1:3 进行传代培养。实验中采用第 3 代 (标记为 P3) 和第 4 代 (标记为 P4) 细胞。

1.3 微沟槽图案化硅片的制备

本文所使用的微沟槽图案化硅片, 委托辽宁省微纳米技术及系统重点实验室的微纳加工平台加工制备。基底采用 4 英寸单晶硅圆片, 通过光刻工艺在其表面制备出平行排列的微沟槽结构。图案化区域在硅片上的总体分布如图 S1 所示, 该区域由对称分布的 4 部分组成, 其中①、②和③为图案化区域, 均采用平行排列的微沟槽构型, 沟槽深度一致为 3 μm , 三者的沟槽宽度/脊宽分别为 5 μm /5 μm 、10 μm /10 μm 和 20 μm /20 μm ; ④为未加工的空白对照区域。采用工具显微镜对图案化硅片的表面形貌进行观察, 并利用表面轮廓仪对其形貌参数进行表征与测量。

1.4 微沟槽图案化 PDMS 基底的制备

首先, 采用三氯 (1H,1H,2H,2H-全氟辛基) 硅烷溶液对硅片进行疏水化表面处理。随后, 将 Sylgard® 184 硅橡胶弹性体试剂盒中的 PDMS 预聚物与固化剂按 10:1 的质量比充分混合均匀, 经真空脱气 30 min 后, 缓慢浇注于处理后的硅片表面, 再次真空脱气, 并于 70°C 条件下固化 6 h。待冷却至室温后, 将固化后的 PDMS 基底从硅片上剥离, 并根据需要裁剪至合适尺寸。根据表面结构类型命名。平面结构为 PDMS 0, 微沟槽宽度为 5 μm 、10 μm 和 20 μm 的样品依次记为 PDMS 5、PDMS 10 和 PDMS 20。

1.5 软刻蚀法制备 GCPSs

本研究采用软刻蚀技术中的复制模塑法制备 GCPSs。首先, 将 400 mg I 型胶原与 400 mg PCL 共同溶解于 10 ml HFIP 中, 配制成质量分数为 8% (质量体积比) 的胶原/PCL 混合溶液。随后, 根据课题组前期研究结果^[24] 加入占胶原与 PCL 总质量 1.0% 的石墨烯粉末, 于室温下持续搅拌 3 d, 确保其完全分散均匀, 制得石墨烯/胶原/PCL 悬液。以不同微沟槽尺寸的图案化 PDMS 印章 (PDMS 0、

PDMS 5、PDMS 10及PDMS 20)为模具,将上述悬液浇注其上,经 -20°C 预冷冻2 h后,再真空冷冻干燥2 h,即可复制得到相应的图案化复合膜。以PDMS 0、PDMS 5、PDMS 10和PDMS 20为印章制备的石墨烯/胶原/PCL膜分别命名为GCPS 0、GCPS 5、GCPS 10和GCPS 20。以PDMS 0为印章制备的胶原/PCL膜命名为PS 0。

1.6 PDMS基底和GCPSs性能表征

将样品剪裁为 $10\text{ mm}\times 10\text{ mm}$ 的正方形,以导电胶固定于样品台上。在进行扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)(Nova NanoSEM 400, FEI公司,美国)观察前,对样品表面进行喷金处理,加速电压设定为5 kV,用以表征PDMS基底及GCPSs的表面形貌。

采用接触角测量仪(JY-PHa,金和仪器,中国),以静态水接触角评价GCPSs的亲水性。将 $5\text{ }\mu\text{l}$ 超纯水缓慢滴加于基底表面,静置10 s后拍摄液滴形态并测量接触角。每种基底至少选取3个独立样品,每个样品表面至少测量3个不同位置。

为评价GCPSs的导电性能,构建了一组含发光二极管(light emitting diode, LED)的串联电路,外加恒定电压4.5 V。使用鳄鱼夹连接单个GCPS样品两端,接通电路后观察LED是否点亮。同时,考察同种GCPS在叠加不同层数后接入电路时的LED发光情况。

电导率采用四探针法进行测量。使用吉利特4200-SCS型半导体特性分析系统(4200-SCS, Keithley, 美国),参照生产商提供的应用说明(编号2475),采用范德堡法测量电阻率,进而计算电导率。GCPSs样品尺寸为 $10\text{ mm}\times 10\text{ mm}$,样品厚度通过游标卡尺多次测量至少40层叠加样品的总厚度,取其平均值作为单层厚度。在显微镜下将4个探针分别接触样品边界4个独立位置,由系统测量相邻探针间的电压,依据围绕样品的8组测量结果推算出电导率。

1.7 细胞培养

在细胞接种前,首先对PDMS基底进行氧等离子体处理,以改善其表面亲水性。随后,将PDMS基底及GCPSs置于75%乙醇中浸泡2 h,再经紫外灯照射30 min进行灭菌处理,之后用PBS漂洗3次,最后以L-DMEM培养基孵育30 min。

选用P3~P4的MSCs,当细胞融合度达80%~90%时,以0.25%胰蛋白酶溶液进行消化。消化后的细胞经离心、重悬及计数后,以 $3\times 10^3/\text{cm}^2$ 的密

度接种于各基底表面。将接种后的培养板置于 37°C 、5% CO_2 及饱和湿度的细胞培养箱中培养,每3 d更换一次培养基。

1.8 Live/Dead染色

细胞接种后第7天和第14天,吸除孔内培养基,用PBS洗涤以去除未贴壁的漂浮细胞。随后加入含 $2\text{ }\mu\text{mol/L}$ Calcein AM和 $4\text{ }\mu\text{mol/L}$ PI的染色工作液,于避光条件下孵育30 min。孵育结束后,以PBS清洗样品,采用倒置荧光显微镜(IX71, Olympus, 日本)观察并拍摄细胞染色图像。

1.9 细胞骨架染色

首先吸去培养基,用PBS洗涤以去除未黏附细胞,随后加入4%多聚甲醛于室温固定细胞30 min,经PBS清洗3次、5 min/次后,以0.25% Triton X-100溶液室温透膜10 min,再经PBS清洗3次、5 min/次;随后用1% BSA溶液于 37°C 封闭30 min, PBS清洗3次后,加入 $200\text{ }\mu\text{l}$ /孔鬼笔环肽工作液(稀释比例1:30),室温避光孵育1 h,吸去染液并用PBS清洗3次;最后加入DAPI染液室温避光孵育10 min, PBS清洗3次后,于倒置荧光显微镜(IX71, Olympus, 日本)下观察并采集图像。

1.10 MTS实验

参照文献[25]方法评估GCPSs对MSCs的细胞毒性。将各基底浸泡于不含血清和抗生素的L-DMEM培养基中,于 37°C 细胞培养箱中孵育24 h,收集得到各基底浸提液。将MSCs以 1×10^4 个/孔的密度接种于96孔板中,采用含10% FBS的L-DMEM培养基进行培养。24 h后吸去原培养基, PBS清洗后,分别加入各基底浸提液,继续培养24 h。随后吸去浸提液, PBS清洗,加入 $100\text{ }\mu\text{l}$ /孔MTS反应液,同时设置仅含MTS反应液的空白对照孔。将培养板置于培养箱中孵育2 h,取出后用酶标仪(Model 680, Bio-Rad, 美国)测定各孔在490 nm波长处的吸光度值。

为考察GCPSs对MSCs增殖的影响,将各基底置于24孔细胞培养板中,并以 $3\times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度接种MSCs。分别在培养6 h、1 d、3 d、5 d及7 d后,吸去培养基, PBS洗涤以去除漂浮细胞,加入 $320\text{ }\mu\text{l}$ /孔MTS反应液,置于培养箱中孵育2 h。随后每孔取 $100\text{ }\mu\text{l}$ 反应液转移至96孔板中,利用酶标仪(Model 680, Bio-Rad, 美国)检测490 nm波长下的吸光度值。

1.11 体外ES

体外ES平台为实验室自行搭建, 其结构如图1所示。该平台以100 mm培养皿为载体, 内部平行固定两个间距为20 mm的平板电极, 用于形成水平电场。具体制作步骤如下: 将两块高度为15 mm的薄亚克力板以亚克力胶水垂直粘贴于培养皿底部, 两板平行放置, 间距为20.5 mm, 固定亚克力板侧边与培养皿壁交接处, 形成一矩形空腔。随后, 将两片316L医用不锈钢板(长85 mm、高5 mm、厚0.1 mm)分别贴合于空腔内侧的亚克力板表面, 构成平板电极, 并以导线连接电极并引出至培养皿外部。在空腔内浇注约2 mm厚的PDMS预混液(质量比10:1), 于70℃固化, 以固定电极并密封导线接口。导线采用AWM 2468 24AWG排线中的单股线, 每股含11根镀锡铜丝, 外覆聚

氯乙烯绝缘层。平台使用前经清洗、超纯水浸泡2 h、烘干后, 再以 ^{60}Co - γ 射线(25 kGy)辐照灭菌, 备用。

GCPSs接种细胞24 h后, 小心将各基底转移至体外ES平台中。需特别注意, 电场方向须与基底表面微沟槽方向保持一致。关于电场强度参数的设计, 已有研究表明, 在高导电石墨烯基纤维支架的条件下, 10~50 mV/cm的电场梯度即可激活间充质干细胞的迁移与神经向分化应答^[26]。ES通过直接数字频率合成(direct digital synthesis, DDS)信号发生器(TGF6000, 数英仪器, 中国)施加, 参数设置为: 正脉冲, 频率2 Hz, 场强分别为0(对照)、10、20或50 mV/cm, 刺激10 min/d, 每3 d更换一次培养基。ES持续作用3 d或7 d后进行后续检测。

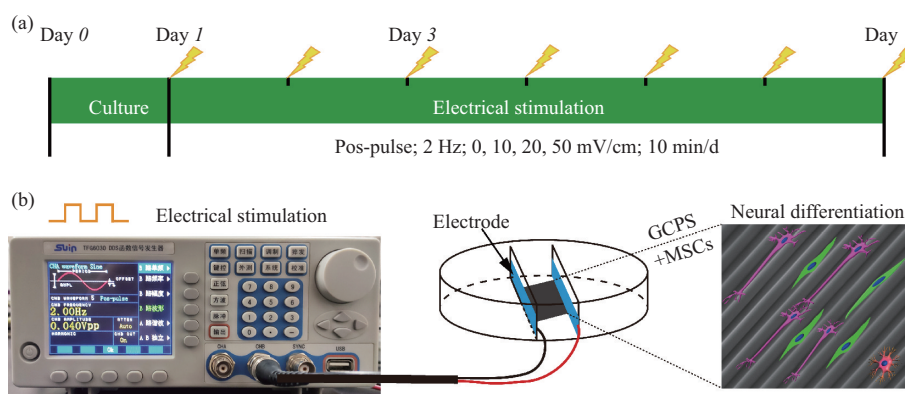


Fig. 1 Experiment schedule and the ES platform *in vitro*

(a) The experiment schedule. (b) The ES platform *in vitro*.

1.12 RT-qPCR

总RNA提取采用试剂盒进行。基底材料加入裂解液充分振荡并静置10 min, 经氯仿抽提、无水乙醇沉淀后, 将上清转移至RNA吸附柱, 依次经去蛋白质液和漂洗液洗涤, 最后用RNase-Free水洗脱, 获得总RNA。所得RNA经超微量分光光度计(NanoDrop2000, Thermo Scientific, 美国)测定浓度及纯度后, 用于反转录或于-80℃保存。

采用RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit合成第一链cDNA, 以1 μg 总RNA为模板, 与oligo(dT)₁₈引物混合后于65℃孵育5 min, 冰上冷却; 随后加入逆转录反应液, 于42℃孵育60 min, 70℃加热5 min终止反应, 所得cDNA备用。

实时荧光定量PCR采用SYBR法进行, 引物由上海英潍捷基公司合成(表S1)。将cDNA模

板、引物及SYBR预混液配制成10 μl 反应体系, 于实时PCR仪上进行扩增: 95℃预变性30 s, 40个循环(95℃5 s, 60℃30 s), 最后进行熔解曲线分析。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因相对表达量。

1.13 免疫荧光染色

吸去培养基并以PBS洗涤以去除未贴壁细胞, 用4%多聚甲醛室温固定细胞30 min, PBS清洗3次、5 min/次; 随后以0.25% Triton X-100溶液室温透膜10 min, PBS清洗3次; 再用1% BSA于37℃封闭30 min, PBS清洗3次。封闭后, 加入100 μl /孔一抗稀释液, 置于湿盒中4℃孵育过夜, 次日室温复温30 min, PBS清洗3次; 随后加入100 μl 相应荧光标记二抗, 37℃避光孵育1 h, PBS清洗3次; 最后加入DAPI稀释液室温避光染色10 min, PBS清洗3次后, 于倒置荧光显微镜

(IX71, Olympus, 日本) 下观察并拍照, 并统计阳性细胞率, 进行定量比较, 标记阳性细胞率=标记阳性细胞数/DAPI 总细胞核数。本实验使用的一抗及稀释比例为: 兔抗 Tuj1 (1:2 000)、兔抗 NF-M (1:500)、小鼠抗 GFAP (1:1 000); 二抗及稀释比例为: Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 (1:1 000)、Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 (1:500)。

1.14 ELISA 试验

ES 作用 3 d 后, 收集各孔细胞培养基于无菌离心管中, 以 3 000 r/min 离心 20 min, 取上清, 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测各样品总蛋白质浓度。将 BCA 试剂 A 与 B 按 50:1 的体积比混匀配制成工作液; 将标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20 μ l 加入 96 孔板标准品孔中, 并用标准品稀释液补足至 20 μ l, 对应浓度依次为 0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/L; 样品孔中加入 2 μ l/孔样品和 18 μ l/孔 PBS。37°C 孵育 30 min 后, 于 562 nm 处测定吸光度, 根据标准曲线及稀释倍数计算样品总蛋白质浓度。

采用 ELISA 试剂盒检测神经营养因子 NGF- β 、BDNF 和 GDNF 的分泌水平, 按照博奥森 ELISA 试剂盒说明书操作。将梯度浓度标准品、空白及待测样品分别加至酶标包被板相应孔中, 样品孔中先加 40 μ l 样品稀释液, 再加 10 μ l 待测样品, 混匀后加入 50 μ l/孔酶标试剂 (空白孔除外), 封板后于 37°C 孵育 30 min; 弃去孔内液体, 洗涤 5 次并拍干; 随后依次加入显色剂 A 和 B 各 50 μ l, 混匀后于 37°C 避光显色 10 min, 加入 50 μ l 终止液终止反应。采用酶标仪 (Model 680, Bio-Rad, 美国) 双波长读数, 以 450 nm 吸光度减去 630 nm 吸光度作为最终值, 取复孔均值。根据标准品浓度及其对应吸光度拟合标准曲线, 换算出各样品中目标因子的浓度。

1.15 数据处理与统计分析

所有实验均至少重复 3 次, 结果以平均值 $\pm$ 标准误差表示。采用 Origin 8.0 进行统计分析, 组间差异通过单因素方差分析 (one-way ANOVA) 结合 Tukey 事后检验进行评估。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 微沟槽图案的制备与表征

图案化硅片的几何构型与尺寸参数如图 2a~d

所示, 图中清晰展示了不同特征尺寸图案在硅片表面的整体分布情况。采用工具显微镜与表面轮廓仪对各类图案的微观结构进行观测, 并对其关键尺寸进行定量测量。每种图案随机选取 8 个测量点位, 结果表明, 微沟槽/脊的宽度实测值与设计值 (5、10、20 μ m) 基本吻合, 而各尺寸图案的沟槽深度普遍略高于设定值 3 μ m, 且随沟槽宽度增大, 深度偏差呈增大趋势。但经统计比较, 不同宽度微沟槽间的深度值未见显著差异。

以所制备的微沟槽图案化硅片为模板, 转制得到 PDMS 基底, 采用 SEM 观察各基底表面形貌 (图 2e)。PDMS 0 表面呈现高度平整的微观结构, 而 PDMS 5、PDMS 10 及 PDMS 20 表面均显示出平行排列的微沟槽图案。当沟槽宽度较小时, 沟槽内壁与底部并非完全垂直, 推测可能与图案化硅片在加工过程中的精度限制有关。

2.2 微沟槽图案对 MSCs 行为的影响

首先, 采用 Live/Dead 细胞染色法评估微沟槽 PDMS 基底上 MSCs 的存活状态。培养至第 7 天时, 各基底表面细胞分布均匀, Calcein AM 标记的活细胞数量相近, 而 PI 标记的死细胞数量均较少 (图 S2), 表明经氧等离子体处理后的 PDMS 表面具有良好的细胞黏附与生长支持能力。培养至第 14 天时, 各基底上死细胞比例仍维持较低水平, 但总细胞数量较第 7 天未显著增加, 此时细胞已基本达到融合状态。此外, 值得注意的是, PDMS 10 与 PDMS 20 基底上 Calcein AM 标记的细胞数量低于其余两组, 推测可能与微沟槽结构诱导的细胞定向排列有关, 使细胞呈现更为延伸的形态。上述结果提示, 微沟槽 PDMS 基底能够支持 MSCs 的长期生长。

为观察微沟槽结构对 MSCs 的排列与延伸的引导作用, 采用罗丹明标记的鬼笔环肽对各 PDMS 基底上的 MSCs 进行细胞骨架染色 (图 S3)。在 PDMS 0 表面, MSCs 呈随机分布; 而在带有微沟槽的 PDMS 基底上, 细胞则沿沟槽方向定向排列。其中, PDMS 10 与 PDMS 20 基底上的单个细胞被限制在同一沟槽内, 呈现出细长的形态, 相比之下, PDMS 5 基底上的单个细胞常横跨多个沟槽与脊, 表现出更为铺展的形态特征。此外, 培养至第 7 天时, 微沟槽 PDMS 基底上已有个别细胞呈现出典型的神经样细胞形态。培养至第 14 天时, 各沟槽 PDMS 基底上的细胞均沿沟槽方向有序生长, 且细胞延伸程度较第 7 天更为显著, 呈更加细长的形

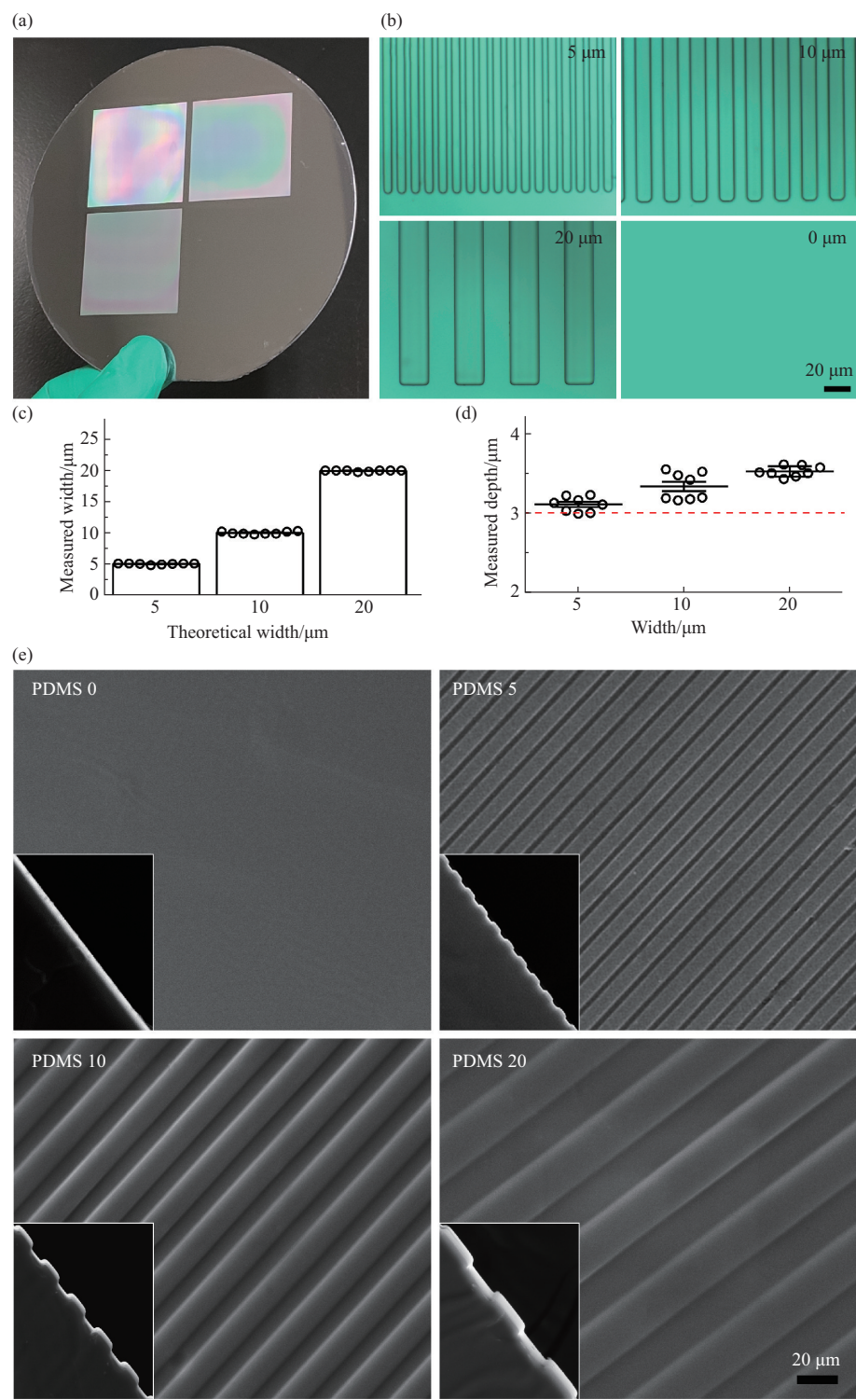


Fig. 2 Geometry of micro-grooved patterns and SEM images of PDMS substrates

(a) Image of a patterned 4-inch silicon wafer. (b) Microscope images of micro-grooved patterns on the silicon wafer. (c) Widths of micro-grooves on the silicon wafer. (d) Depths of micro-grooves on the silicon wafer. Take two points on each side of the each pattern for measurement, a total of 8 points. (e) SEM images of micro-grooved PDMS substrates (the insert is the cross section SEM of each PDMS substrate).

态。同时，神经样细胞数量在各组中均有增加，其中PDMS 10与PDMS 20基底上的神经样细胞数量

明显多于PDMS 5组。
微沟槽结构对MSCs成神经分化的影响如图S4

所示。培养至第7天时, PDMS 0组MSCs未检测到神经元标志物NF-M的表达, PDMS 5组呈弱阳性表达, PDMS 20组NF-M表达水平高于PDMS 5组, 但仍低于PDMS 10组。在胶质细胞/SCs标志物GFAP的检测中, PDMS 0组仅见极微弱表达, 而各微沟槽PDMS基底上GFAP表达均显著升高, 其中PDMS 10组与PDMS 20组之间无明显差异, 但两者均高于PDMS 5组。培养至第14天时, 各组PDMS基底上NF-M与GFAP的表达水平均有所上升。就NF-M而言, PDMS 5组与PDMS 10组的表达量高于PDMS 20组, 而各微沟槽组之间GFAP表达水平未见显著差异。上述结果表明, 在未添加化学诱导因子或生长因子的条件下, 仅依赖基底表面

的微沟槽拓扑结构即可在一定程度上诱导MSCs向神经谱系方向分化。然而, 目前体系中细胞培养时间较长, 且神经谱系特异性尚不理想。因此, 后续可考虑对微沟槽基底进行电功能化修饰, 以期进一步优化并增强其对MSCs成神经分化的促进效果。

2.3 GCPSs性能表征

以PDMS为模板, 采用软刻蚀技术成功制备了石墨烯/胶原/PCL微沟槽图案化导电基底。SEM图像(图3a)显示, GCPS 0表面平整, 而GCPS 5、GCPS 10及GCPS 20表面均呈现平行排列的微沟槽结构, 沟槽宽度与理论设计值吻合, 表明软刻蚀法可有效用于导电微沟槽基底的构建。

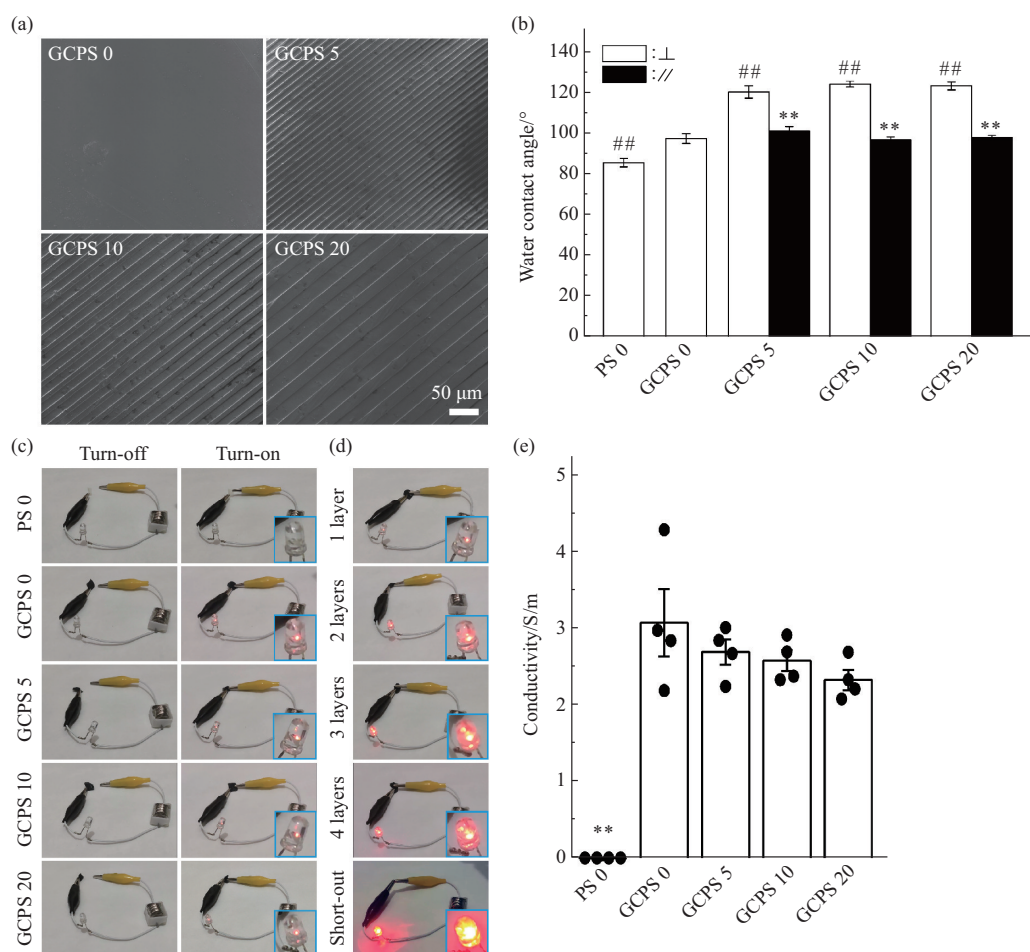


Fig. 3 Characterization of GCPSs

(a) SEM images of GCPSs. (b) Water contact angles of GCPSs. ⊥ indicated a water drop perpendicular to the microgroove orientation and // indicated a water drop parallel to the microgroove orientation. ** $P < 0.01$ indicated significant difference compared with the ⊥ group from the same substrate, ## $P < 0.01$ indicated significant difference compared with the GCPS 0 group in the same direction. (c) Turn-on LED through different substrates. (d) Turn-on LED through GCPS 20 with different layers. (e) The conductivity of each substrate. ** $P < 0.01$ indicated significant difference compared with the GCPS 0.

以不含石墨烯的平面基底 PS 0 (仅含胶原与 PCL) 为对照, 考察石墨烯对亲水性的影响。GCPS 0 的水接触角显著大于 PS 0 (图 3b)。对于微沟槽基底, GCPS 5、GCPS 10 和 GCPS 20 沿沟槽方向的水接触角均显著小于其垂直方向, 表现出各向异性润湿行为。在相同方向上, 三者水接触角无显著差异, 表明所考察的微米级沟槽宽度范围对基底亲水性无明显影响。

为直观评估 GCPSs 的导电性能, 将各基底分别接入含 LED 的串联电路中。非导电的 PS 0 接入电路后 LED 未发光, 而所有 GCPSs 基底接入后 LED 均成功点亮, 且发光强度无明显差异 (图 3c), 表明微沟槽宽度对基底导电性影响较小。进一步以 GCPS 20 为例进行多层叠加实验, 发现随着叠加层数增加, LED 亮度逐渐增强 (图 3d), 说明基底厚度对其导电能力具有一定影响。进一步, 采用四探针法对各基底的电导率进行定量检测 (图 3e)。PS 0 的电导率仅为 $(3.90 \pm 0.80) \times 10^{-6}$ S/m, 而引入石墨烯后, GCPS 0 的电导率显著提升至 (3.08 ± 0.44) S/m。GCPS 5、GCPS 10 和 GCPS 20 的电导率分别为 (2.70 ± 0.17) 、 (2.58 ± 0.14) 和 (2.33 ± 0.13) S/m, 各微沟槽基底间无显著差异。上述结果表明, 石墨烯的掺入可赋予基底良好的导电性能, 且本研究所制备的 GCPSs 基底导电性优良, 微沟槽宽度对导电性无明显影响。

2.4 GCPSs 细胞相容性检测

为评价 GCPSs 的生物相容性, 首先制备各基底浸提液并检测其对 MSCs 的细胞毒性。各尺寸 GCPSs 组的细胞活力无显著差异, 且均与 PS 0 及传统组织培养板 (tissue culture polystyrene, TCPS) 组的细胞活力相当, 均达到 TCPS 组细胞活力的 95% 以上 (图 4a), 表明石墨烯掺杂的导电基底对 MSCs 无细胞毒性, 且微沟槽尺寸不影响细胞活力。

进一步检测 GCPSs 对 MSCs 增殖的影响 (图 4b)。细胞接种 6 h 后, GCPS 0 上的细胞数量显著低于 PS 0 和 TCPS, GCPS 5 和 GCPS 10 与 GCPS 0 无显著差异, 且均低于 GCPS 20, 提示 GCPS 0、GCPS 5 和 GCPS 10 上初始细胞黏附数量较少。培养 1 d 后, 各 GCPSs 上的细胞数量仍低于 PS 0 和 TCPS, 但不同微沟槽尺寸基底之间无显著差异, 表明 GCPSs 的沟槽宽度对 MSCs 增殖无明显影响。

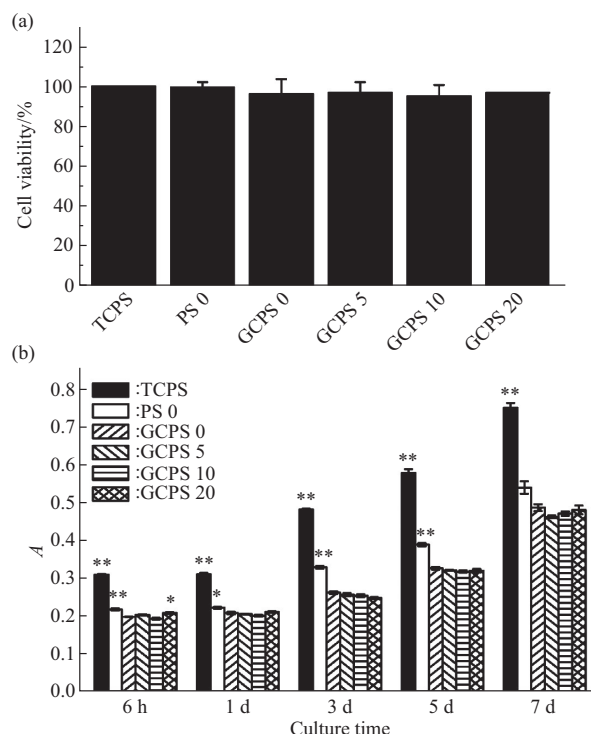


Fig. 4 Cytocompatibility of GCPSs

(a) Cytotoxicity of GCPSs on MSCs. (b) Proliferation of MSCs cultured on GCPSs. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ indicated significant difference compared with the GCPS 0 group at the same time point.

2.5 ES联合GCPSs对MSCs成神经分化的影响

为阐明 ES 联合 GCPSs 促进 MSCs 神经分化的潜在机制, 进一步检测了神经相关基因及蛋白质表达水平的变化。在未施加 ES、未加 ES 时, 各 GCPSs 组神经干细胞蛋白 (*Nestin*)、 β -微管蛋白 (neuronal class III β -tubulin, *Tuj1*)、神经丝蛋白 M (neurofilament M, *NF-M*) 和神经胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, *GFAP*) 基因表达相较于 PS 0 组有增高的趋势, 但并不显著 (图 5), 提示导电基底自身促 MSCs 向神经方向分化作用比较有限。ES 作用 3 d 后, 相同导电基底上, 不同 ES 组之间基因表达水平没有显著变化, 在相同 ES 强度下, GCPS 5、GCPS 10 和 GCPS 20 组的 4 种基因表达差异不明显。免疫荧光染色结果 (图 6) 显示, 平面基底上荧光标记的细胞呈随机分布, 而微沟槽基底上细胞沿沟槽方向有序排列。ES 作用 3 d 时, 各基底上 *Tuj1* 表达虽较弱, 但均高于各自未加 ES 组, 且随着 ES 强度 (10、20、50 mV/cm) 提高, GCPSs 基底上 *Tuj1* 表达量逐渐增加; 值得

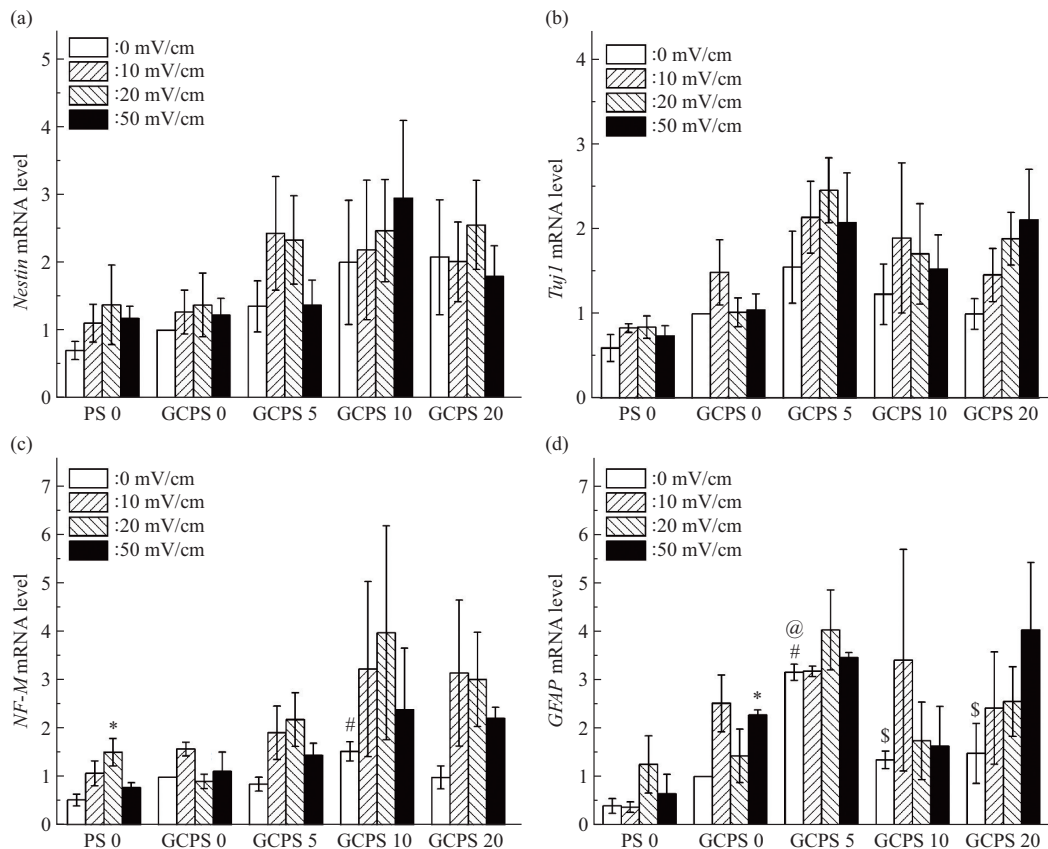


Fig. 5 Gene expression levels of neural markers *Nestin*, *Tuj1*, *NF-M* and *GFAP* in MSCs on GCPs after ES for 3 d

(a) *Nestin* mRNA expression level in MSCs on GCPs after ES for 3 d. (b) *Tuj1* mRNA expression level in MSCs on GCPs after ES for 3 d. (c) *NF-M* mRNA expression level in MSCs on GCPs after ES for 3 d. (d) *GFAP* mRNA expression level in MSCs on GCPs after ES for 3 d. * $P < 0.05$ indicated significant difference compared with the 0 mV/cm group on the same substrate. # $P < 0.05$ indicated significant difference compared with the PS 0 group under the same ES intensity. @ $P < 0.05$ indicated significant difference compared with the GCPs 0 group under the same ES intensity. \$ $P < 0.05$ indicated significant difference compared with the GCPs 5 group under the same ES intensity.

注意的是, GCPs 10组在10 mV/cm ES作用下即可达到其他组在更高强度ES下才获得的*Tuj1*表达水平。*GFAP*表达方面,各基底在ES作用3 d后均高于未加ES组, GCPs 5和GCPs 10组的*GFAP*表达量在相同ES强度下均高于GCPs 0组,但GCPs 20组的*GFAP*表达量却低于同强度下的GCPs 5和GCPs 10组。同时阳性细胞率统计结果(图S5)也表明GCPs微沟结构和ES均能够提高MSCs中*NF-M*阳性细胞比例,例如在GCPs 5基底上,50 mV/cm ES能够显著促进MSCs向*Tuj1*阳性神经元样细胞方向分化,而且这种促进作用明显强于0、10和20 mV/cm,且GCPs 10+10 mV/cm同样表现出较高的*Tuj1*阳性细胞率,说明ES对MSCs神经分化的促进作用具有明显的基底依赖性,而非简单的电刺激强度依赖性。而单纯ES作用于PS 0平面基底,对*GFAP*阳性细胞比例的促进作用有限,且在10和20 mV/cm ES强度下,相比于PS 0,

GCPs 0、GCPs 5、GCPs 10、GCPs 20显著提高了*GFAP*阳性细胞比例,说明导电基底能明显增强ES作用。

ES作用7 d后,神经相关基因表达水平如图7所示。在10 mV/cm和20 mV/cm的ES强度下, GCPs 0、GCPs 5、GCPs 10及GCPs 20组*Nestin*、*Tuj1*和*NF-M*基因表达量均高于相同ES条件下的PS 0组。然而,当ES强度升至50 mV/cm时,各GCPs组的基因表达量并未超过低强度ES下的水平;此强度下,各组*Nestin*和*Tuj1*表达无显著差异,而*NF-M*表达量随沟槽宽度增大呈下降趋势。此外,PS 0组及各GCPs组的*GFAP*表达量在50 mV/cm ES下亦显著低于同种基底在10 mV/cm和20 mV/cm ES下的表达量。值得关注的是,施加ES后,成熟神经标记物*NF-M*和*GFAP*的表达量均大幅上升。与未加ES的GCPs 0组相比,在10 mV/cm和20 mV/cm ES作用下, GCPs 5、

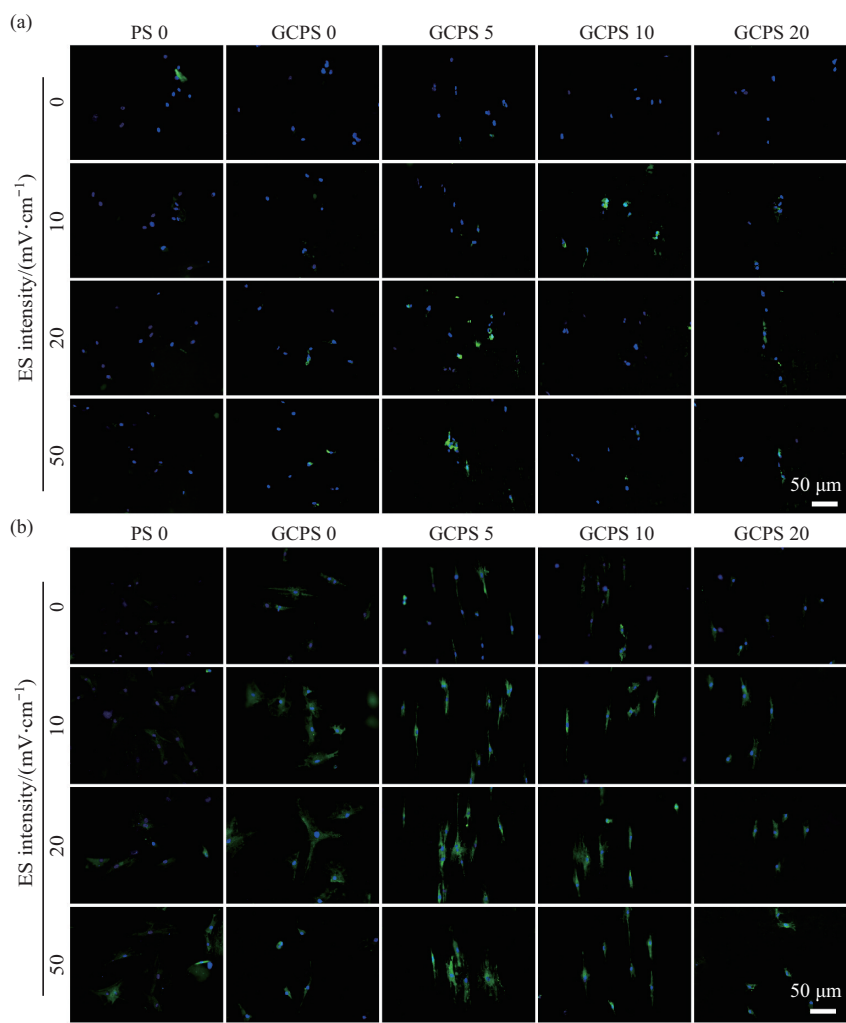


Fig. 6 Neural differentiation of MSCs cultured on GCPSs after 3 d of ES
(a) Tuj1 (green). (b) GFAP (green). Cell nuclei were stained with DAPI (blue).

GCPS 10 和 GCPS 20 组 *NF-M* 表达上调均超过 60 倍, GCPS 5 和 GCPS 10 组 *GFAP* 表达上调均超过 10 倍。在 50 mV/cm ES 作用下, 尽管各 GCPSs 组 *NF-M* 和 *GFAP* 表达量仍高于未加 ES 的 GCPS 0 组, 但均低于同基底在低强度 ES 下的表达水平。上述结果表明, ES 作用 7 d 时, 低强度 (10 mV/cm) 和中强度 (20 mV/cm) ES 可有效促进神经标记物基因的表达, 而高强度 (50 mV/cm) ES 的促进作用则相对减弱。

NF-M 和 *GFAP* 的免疫荧光染色结果如图 8 所示。在相同 ES 强度下, GCPS 5、GCPS 10 和 GCPS 20 组的 *NF-M* 表达均高于 GCPS 0 组, 且在 10 mV/cm 和 20 mV/cm ES 作用下, GCPS 10 组的 *NF-M* 表达量高于 GCPS 5 和 GCPS 20 组。与 *NF-M* 不同, GCPS 5、GCPS 10 和 GCPS 20 组 *GFAP* 在低

强度 (10 mV/cm) 和中强度 (20 mV/cm) ES 下的表达量均高于高强度 (50 mV/cm) ES, 且 GCPS 20 组的 *GFAP* 表达量在各 ES 强度下均低于同强度的 GCPS 5 和 GCPS 10 组。阳性细胞率定量结果 (图 S6) 也表明, GCPS 0、GCPS 10、GCPS 20 组在 20 和 50 mV/cm ES 条件下相比 PS 0 组, *NF-M* 的阳性细胞率显著升高, 同时 GCPS 0、GCPS 10、GCPS 20 组在 50 mV/cm ES 条件下相比 GCPS 5 组具有显著差异, 说明 GCPS 微沟结构和 ES 在持续作用 7 d 后均能够提高 MSCs 中 *NF-M* 阳性细胞比例, 促进 MSCs 的向神经分化。且在相同的 10 和 20 mV/cm ES 条件下, GCPS 5、GCPS 10、GCPS 20 组 MSCs 的 *GFAP* 阳性细胞率显著高于 PS 0 组, 说明电刺激能显著提升 MSCs 的向神经分化, 其次, 在 0 mV/cm 的条件下, GCPS 20 的阳性细胞率显著

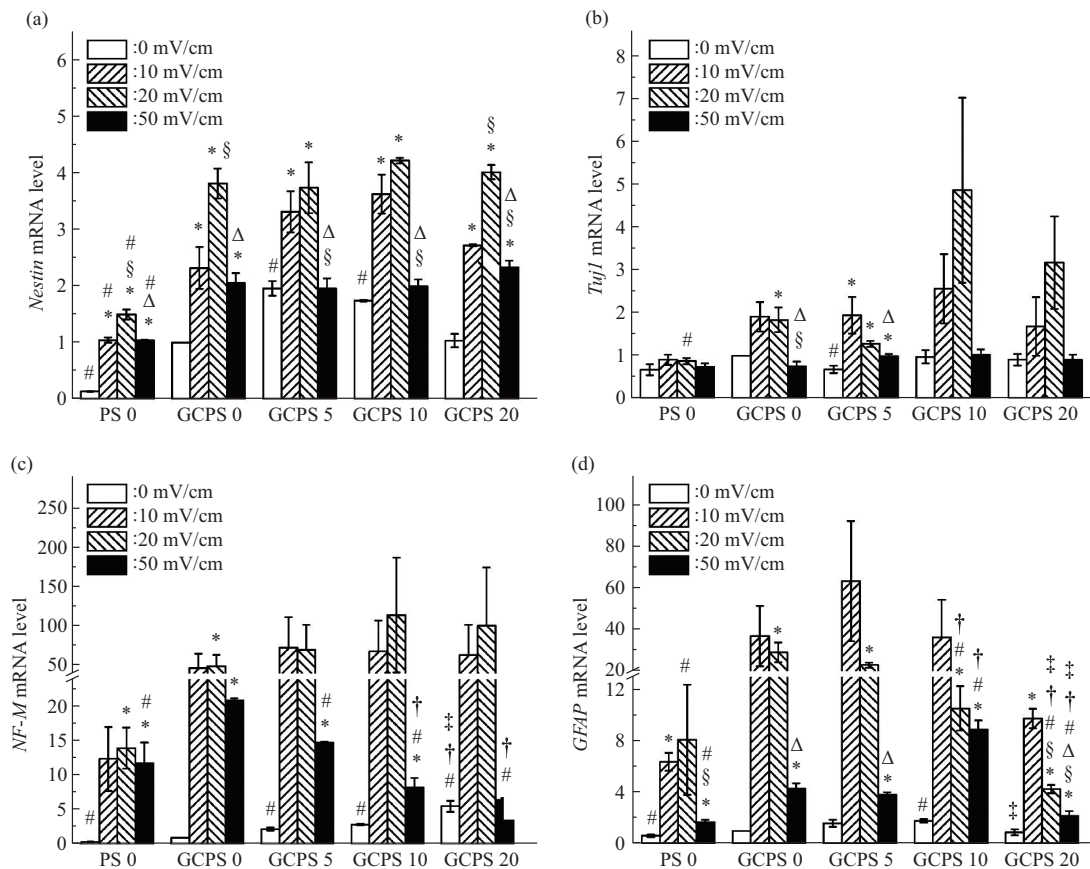


Fig. 7 Gene expression levels of neural markers *Nestin*, *Tuj1*, *NF-M* and *GFAP* in MSCs on GCPs after ES for 7 d

(a) *Nestin* mRNA expression level in MSCs on GCPs after ES for 7 d. (b) *Tuj1* mRNA expression level in MSCs on GCPs after ES for 7 d. (c) *NF-M* mRNA expression level in MSCs on GCPs after ES for 7 d. (d) *GFAP* mRNA expression level in MSCs on GCPs after ES for 7 d. * $P < 0.05$ indicated significant difference compared with the 0 mV/cm group on the same substrate. § $P < 0.05$ indicated significant difference compared with the 10 mV/cm group on the same substrate. Δ $P < 0.05$ indicated significant difference compared with the 20 mV/cm group on the same substrate. # $P < 0.05$ indicated significant difference compared with the GCPs 0 group under the same ES intensity. † $P < 0.05$ indicated significant difference compared with the GCPs 5 group under the same ES intensity. ‡ $P < 0.05$ indicated significant difference compared with the GCPs 10 group under the same ES intensity.

大于 GCPs 0、GCPs 5 组，表明微沟槽结构能增强 MSCs 的向神经分化。

上述结果表明，微沟槽宽度与 ES 强度的组合可影响 MSCs 的神经分化谱系选择。10 mV/cm 和 20 mV/cm 的 ES 有利于各宽度 (5、10、20 μm) 微沟槽基底上 MSCs 向神经元方向分化；而相同 ES 强度下，5 μm 和 10 μm 宽度的微沟槽更有利于 MSCs 向神经胶质细胞/SCs 分化。综合各组合条件下神经标记物的表达水平，10 mV/cm 或 20 mV/cm ES 联合 GCPs 10 对 MSCs 成神经分化具有较优的

促进作用。

2.6 ES 联合 GCPs 对 MSCs 分泌神经营养因子的影响

检测 ES 作用 3 d 时各 GCPs 基底上 MSCs 分泌神经营养因子水平。GCPs 5、GCPs 10 和 GCPs 20 基底组 NGF-β 和 BDNF 浓度无显著差异，且不受 ES 强度变化的影响 (图 9)。在 10 mV/cm ES 作用下，GCPs 各基底组 GDNF 浓度均高于同基底未加 ES 组，而 ES 强度增大时，GDNF 的浓度又呈现不同程度的降低。

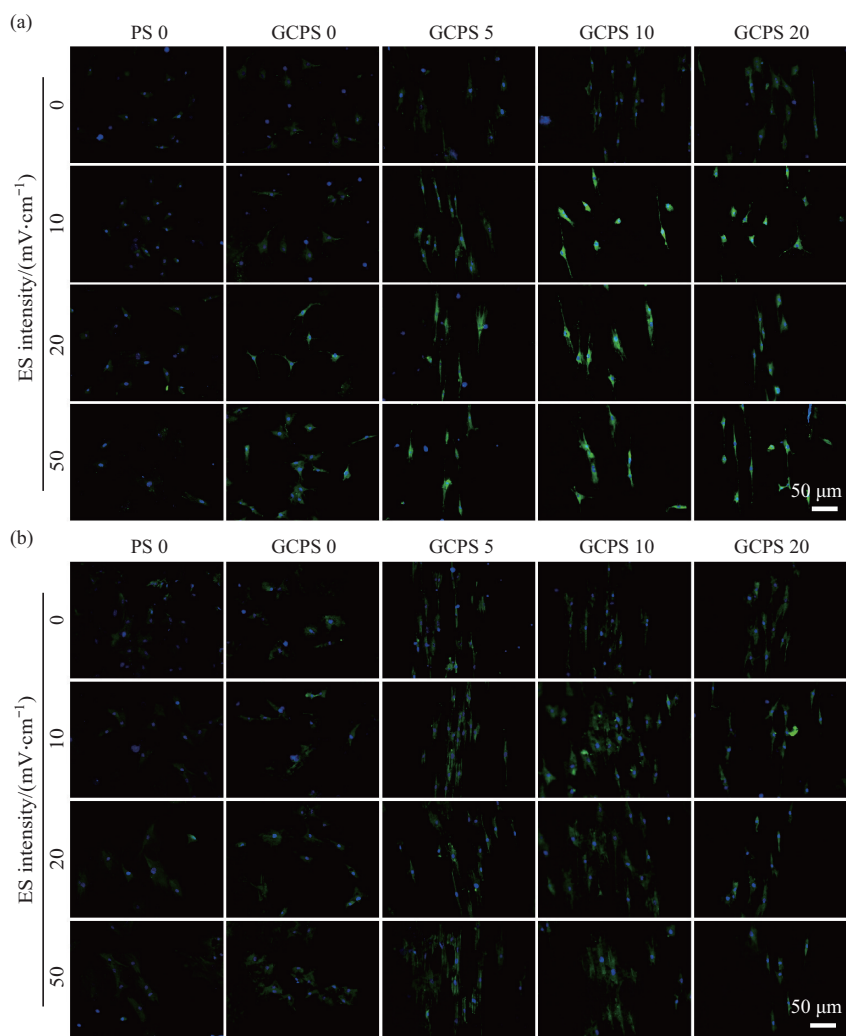


Fig. 8 The neural differentiation of MSCs on GCPSs after ES for 7 d
(a) NF-M (green). (b) GFAP (green). Cell nuclei were stained with DAPI (blue).

3 讨 论

各向异性拓扑结构对神经再生与轴突定向延伸具有重要意义。目前,可用于制备该类神经支架的加工技术包括光刻、软刻蚀、自组装、非接触印刷、静电纺丝及3D打印等多种方法^[27-29]。其中,软刻蚀中的微模塑法是一种简便高效的表面图案化手段,适用于构建平行排列的微沟槽结构。微沟槽促进神经发生的机制在于其将单个神经细胞限制于单一通道内,从而引导神经突定向生长,避免因神经突外伸导致的轴突错配。Miller等^[30]发现,当沟槽宽度与脊宽均为10 μm、深度为3 μm时,(77±1)%的DRG神经突沿沟槽方向延伸,而当深度增至4 μm时,该比例提升至(92±1)%,表明沟槽深度对神经突的生长取向具有显著影响。沟槽宽

度亦影响干细胞分化率及神经突取向性, Beduer等^[31]指出,宽度小于20 μm的沟槽可实现神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的优异定向排列,且适宜尺寸可在提高分化率的同时获得高度取向的神经突。Kurpinski等^[32]验证了宽度10 μm、脊宽10 μm、深度3 μm的PDMS微沟槽可有效引导MSCs沿沟槽排列; Weigel等^[33]亦认为该尺寸组合是支持神经突延伸的最佳参数。此外,沟槽截面形状同样调控细胞形貌与排列, Mobasseri等^[34]制备了方形、V形和倾斜形微沟槽,发现V形与倾斜形内壁可增强神经细胞的定向延伸,其中沟槽间距与倾斜角度是关键调控因素。

关于微沟槽基底对细胞增殖的影响,目前仍存在不同观点,这可能与基底材料、沟槽尺寸及细胞来源的差异有关。Wood等^[35]发现,犬脂肪组织

来源的MSCs在微沟槽结构上的铺展面积虽显著小于平面基底,但细胞增殖水平无明显差异,且沟槽宽度(800、1 600和2 000 nm)不影响其增殖能力。然而, Watari等^[36]研究表明,与人源MSCs在平面基底及宽度为1 400 nm和4 000 nm的微沟槽基底相比,宽度为400 nm的基底上细胞增殖速率最低,且在第7、14和21天时各宽度沟槽基底上的细胞总数均低于平面基底,这可能与初始黏附量的差异有关。本文制备的微沟槽深度为3 μm ,

宽度/脊宽分别为5 μm /5 μm 、10 μm /10 μm 和20 μm /20 μm 。结果表明,各宽度微沟槽均可引导MSCs沿沟槽方向定向排列,且对细胞增殖无显著影响。在持续培养过程中,微沟槽基底可诱导MSCs形态向神经元样细胞转变,其中10 μm 和20 μm 宽度沟槽基底上的形态变化更为明显。进一步通过检测神经标记物NF-M和GFAP发现,微沟槽基底可通过物理引导作用促进MSCs向神经谱系分化。

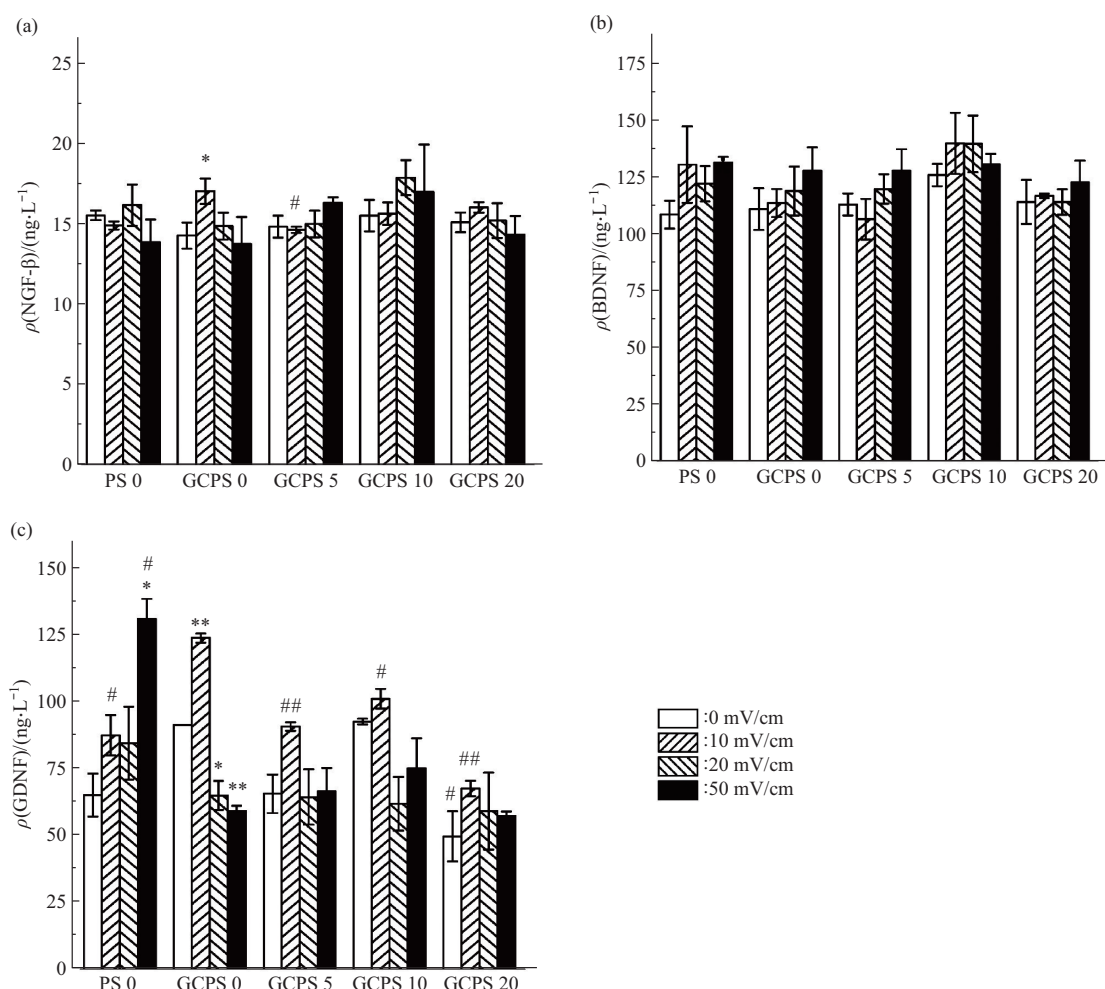


Fig. 9 Effects of ES on secretion of neurotrophic factors by MSCs on GCPSs

(a) NGF- β secretion level by MSCs on GCPSs after ES for 3 d. (b) BDNF secretion level by MSCs on GCPSs after ES for 3 d. (c) GDNF secretion level by MSCs on GCPSs after ES for 3 d. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ indicated significant difference compared with the 0 mV/cm group on the same substrate, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ indicated significant difference compared with the GCPS 0 group under the same ES intensity.

单纯依赖微沟槽结构的物理引导促进MSCs成神经分化效果有限,且耗时长、缺乏神经谱系特异性。为此,本文进一步构建了导电功能化的微沟槽基底GCPSs,选用免疫原性低、生物相容性及力学性能优异的胶原蛋白和PCL为基质,并掺杂导电

组分石墨烯。相较于导电聚合物支架,碳基材料掺杂支架通常具有更高的导电性。例如,含10% (质量百分比) Py的PPy/PCL基底电导率为0.164 S/m ^[37], PANI/PCL纤维支架为0.671 S/m ^[38],而含7%碳纳米纤维的PCL基底可达3.9 S/m ^[39],含24.3%石墨

烯的PLGA支架电导率甚至可高达150 S/m^[40]。本文制备的GCPS 0、GCPS 5、GCPS 10及GCPS 20电导率分别为(3.08±0.44)、(2.70±0.17)、(2.58±0.14)和(2.33±0.13)S/m, 沟槽宽度对导电性无显著影响。GCPSs联合外源ES可调控MSCs向神经细胞分化, 且微沟槽宽度与ES强度共同影响分化谱系。ES作用7 d后, 在10 mV/cm和20 mV/cm强度下, 神经元标记物在各宽度沟槽基底上的表达均较高, 且不受沟槽宽度影响, 而在此ES强度范围内, 5 μm和10 μm宽度的沟槽更有利于MSCs表达神经胶质细胞/施万细胞标记物, 提示可通过优化沟槽宽度与ES强度组合实现特定神经谱系的分化导向。Lu等^[41]采用微沟槽结构PLCL/石墨烯基底获得相似结论, 该基底电导率可稳定保持至少28 d, 联合ES可促进SCs定向迁移与分化, 且聚多巴胺修饰可增强细胞黏附, 进一步改善细胞在微沟槽上的排列与生长。

除电刺激外, 力学刺激、磁刺激和光刺激等物理刺激策略亦被广泛用于调控干细胞行为及促进组织再生。其中, 力学刺激主要通过力学转导途径影响细胞骨架重构、Yes相关蛋白/含PDZ结合基序的转录共激活因子(yes-associated protein/transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, YAP/TAZ)信号通路信号活化及相关基因表达, 其生物学效应高度依赖于加载模式、应变幅度和材料力学性质, 但难以直接模拟神经组织特有的电生理微环境^[42]。相较之下, 电刺激能够直接模拟天然神经系统中的生物电信号, 通过调节细胞膜电位、离子通道活性及细胞内信号通路, 有效促进神经相关基因表达、神经营养因子分泌以及神经突延伸。Cheng等^[43]系统综述了电刺激在神经组织工程中的应用, 指出合理设计刺激参数与导电材料体系, 可显著调控干细胞的迁移、增殖及神经谱系分化进程。此外, ES兼具参数(如场强、频率和作用时长)灵活可调、易于与导电生物材料耦合等优势, 为构建兼具结构仿生与电功能仿生的微环境提供了可行路径。本研究将ES与取向导电微沟槽基底相结合, 实现了拓扑结构引导与电信号调控的共同作用, 为促进MSCs神经谱系分化提供了一种有效策略。当然, 未来仍需进一步优化ES参数, 并系统评估长期使用中的电化学稳定性与生物安全性, 以推动电活性材料在神经再生中的临床转化。

4 结 论

本文制备了取向微沟槽PDMS基底, 系统考察其对MSCs细胞行为的影响, 并在此基础上进行电功能修饰, 构建取向导电微沟槽基底GCPSs, 进一步探讨ES联合GCPSs对MSCs成神经分化的调控作用。结果表明, 取向微沟槽PDMS基底能够支持MSCs长期生长, 引导细胞沿沟槽方向排列, 并促使细胞形态向神经样细胞转变, 具备诱导MSCs向神经方向分化的能力。所构建的GCPSs导电性优良, 且其导电性能不受微沟槽宽度影响。GCPSs细胞具有良好的相容性, MSCs在不同宽度沟槽基底上均呈时间依赖性增殖。ES联合GCPSs可共同促进MSCs向神经细胞分化, 且微沟槽宽度与ES强度共同影响神经谱系特异性, 其中, 低强度(10 mV/cm)或中强度(20 mV/cm)ES联合GCPS 10可有效促进MSCs成神经分化。

数据可用性声明 本论文的关联数据(DOI: 10.57760/sciencedb.010e7/CSTR: 31253.11.sciencedb.010e7)可在Science Data Bank数据库(<https://www.scidb.cn/s/zqIvim>)中访问获取。

附件 见本文网络版(<http://www.pibb.ac.cn>, <http://www.cnki.net>):

PIBB_20260372_Table_S1.pdf
PIBB_20260372_Figure_S1.pdf
PIBB_20260372_Figure_S2.pdf
PIBB_20260372_Figure_S3.pdf
PIBB_20260372_Figure_S4.pdf
PIBB_20260372_Figure_S5.pdf
PIBB_20260372_Figure_S6.pdf

参 考 文 献

- [1] Ghosh N, Bregere C, Bustos P, *et al.* L-ala-L-gln suppresses hypoxic phenotype and fibrogenic activity of rat perineurial fibroblasts. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2023, **22**(5): 761-773
- [2] Aldali F, Tang L, Yang Y, *et al.* Peripheral nerve repair: innovations and future directions. *J Transl Med*, 2026, **24**(1): 330
- [3] Ogawa S, Miyawaki S, Teranishi Y, *et al.* Peripheral nerve regeneration: from molecular mechanisms to biomaterial design strategies. *Mater Des*, 2026, **264**: 115779

- [4] Kulangara K, Yang Y, Yang J, *et al.* Nanotopography as modulator of human mesenchymal stem cell function. *Biomaterials*, 2012, **33**(20): 4998-5003
- [5] Xiao L, Li M, Zhang N, *et al.* Synergistic effects of aligned PCL/rGO scaffolds and electrical stimulation on BMSC neuronal differentiation. *J Biomater Appl*, 2026, **41**(3): 460-469
- [6] Chen G, Lv Y, Dong C, *et al.* Effect of internal structure of collagen/hydroxyapatite scaffold on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2015, **10**(2): 99-108
- [7] Simsar E G, Cheng P, Dogruel T, *et al.* Few-layered conductive graphene foams for electrical transdifferentiation of mesenchymal stem cells into schwann cell-like phenotypes. *Adv Healthc Mater*, 2026, **15**(9): e02204
- [8] Venkatesh H S, Morishita W, Geraghty A C, *et al.* Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature*, 2019, **573**(7775): 539-545
- [9] Levin M. Bioelectric signaling: reprogrammable circuits underlying embryogenesis, regeneration, and cancer. *Cell*, 2021, **184**(8): 1971-1989
- [10] Al-Majed A A, Neumann C M, Brushart T M, *et al.* Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *J Neurosci*, 2000, **20**(7): 2602-2608
- [11] Koppes A N, Nordberg A L, Paolillo G M, *et al.* Electrical stimulation of schwann cells promotes sustained increases in neurite outgrowth. *Tissue Eng Part A*, 2014, **20**(3/4): 494-506
- [12] Banks T A, Luckman P S B, Frith J E, *et al.* Effects of electric fields on human mesenchymal stem cell behaviour and morphology using a novel multichannel device. *Integr Biol*, 2015, **7**(6): 693-712
- [13] Zhou D, Bian M, Wei L, *et al.* Stepwise regulation of cellular oxidative stress via conductive-piezoelectric integrated microstructured conduits for enhanced nerve regeneration. *Adv Sci*, 2026, **13**(13): e16124
- [14] Yi H, Patel R, Patel K D, *et al.* Conducting polymer-based scaffolds for neuronal tissue engineering. *J Mater Chem B*, 2023, **11**(46): 11006-11023
- [15] Serafin A, Rubio M C, Carsi M, *et al.* Electroconductive PEDOT nanoparticle integrated scaffolds for spinal cord tissue repair. *Biomater Res*, 2022, **26**(1): 63
- [16] Trueman R P, Guillemot-Legrís O, Lancashire H T, *et al.* Aligned bioelectronic polypyrrole/collagen constructs for peripheral nerve interfacing. *Adv Eng Mater*, 2024, **26**(6): 2301488
- [17] Novoselov K S, Geim A K, Morozov S V, *et al.* Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, 2004, **306**(5696): 666-669
- [18] Raghavan A, Ghosh S. Influence of graphene-based nanocomposites in neurogenesis and neuritogenesis: a brief summary. *ACS Appl Bio Mater*, 2024, **7**(2): 711-726
- [19] Hajipour Keyvani A, Mohammadnejad P, Pazoki-Toroudi H, *et al.* Advancements in cancer treatment: harnessing the synergistic potential of graphene-based nanomaterials in combination therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2025, **17**(2): 2756-2790
- [20] Liang J, Wu Y, Zhang C, *et al.* Graphene-based nanomaterials in photodynamic therapy: synthesis strategies, functional roles, and clinical translation for tumor treatment. *Int J Nanomed*, 2025, **20**: 8359-8392
- [21] Kim J, Park S, Kim Y J, *et al.* Monolayer graphene-directed growth and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Nanotechnol*, 2015, **11**(11): 2024-2033
- [22] Hu Y, Chen Z, Wang H, *et al.* Conductive nerve guidance conduits based on morpho butterfly wings for peripheral nerve repair. *ACS Nano*, 2022, **16**(2): 1868-1879
- [23] Thakkar V, Mehdipour M, Chang S. Unlocking nerve regeneration: electrical stimulation and bioscaffolds to enhance peripheral nerve regeneration. *Front Neurosci*, 2025, **19**: 1594435
- [24] Dong C, Qiao F, Hou W, *et al.* Graphene-based conductive fibrous scaffold boosts sciatic nerve regeneration and functional recovery upon electrical stimulation. *Appl Mater Today*, 2020, **21**: 100870
- [25] Kim J, Kim Y R, Kim Y, *et al.* Graphene-incorporated chitosan substrata for adhesion and differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Mater Chem B*, 2013, **1**(7): 933-938
- [26] Zhao Y, Liu Y, Kang S, *et al.* Peripheral nerve injury repair by electrical stimulation combined with graphene-based scaffolds. *Front Bioeng Biotechnol*, 2024, **12**: 1345163
- [27] Xue Y, Li J, Jiang T, *et al.* Biomimetic conductive hydrogel scaffolds with anisotropy and electrical stimulation for *in vivo* skeletal muscle reconstruction. *Adv Healthc Mater*, 2024, **13**(4): e2302180
- [28] Rodriguez-Sanchez D N, de Carvalho L A M, Mancilla-Corzo I, *et al.* Long-gap sciatic nerve regeneration using 3D-printed nerve conduits with controlled FGF-2 release. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2025, **17**(28): 40237-40257
- [29] Zhang H, Jiang J, Zhang C, *et al.* Graphdiyne-Ivy fiber neural scaffold promotes stem cell directed differentiation and neuronal maturation. *Mater Today Bio*, 2026, **38**: 103022
- [30] Miller C, Jeftinija S, Mallapragada S. Synergistic effects of physical and chemical guidance cues on neurite alignment and outgrowth on biodegradable polymer substrates. *Tissue Eng*, 2002, **8**(3): 367-378
- [31] Bédier A, Vieu C, Arnauduc F, *et al.* Engineering of adult human neural stem cells differentiation through surface micropatterning. *Biomaterials*, 2012, **33**(2): 504-514
- [32] Kurpinski K, Chu J, Hashi C, *et al.* Anisotropic mechanosensing by mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(44): 16095-16100
- [33] Weigel S, Osterwalder T, Tobler U, *et al.* Surface microstructures on planar substrates and textile fibers guide neurite outgrowth: a scaffold solution to push limits of critical nerve defect regeneration? *PLoS One*, 2012, **7**(12): e50714
- [34] Mobasseri S A, Terenghi G, Downes S. Micro-structural geometry of thin films intended for the inner lumen of nerve conduits affects nerve repair. *J Mater Sci Mater Med*, 2013, **24**(7): 1639-1647
- [35] Wood J A, Ly I, Borjesson D L, *et al.* The modulation of canine mesenchymal stem cells by nano-topographic cues. *Exp Cell Res*,

- 2012, **318**(19): 2438-2445
- [36] Watari S, Hayashi K, Wood J A, *et al.* Modulation of osteogenic differentiation in hMSCs cells by submicron topographically-patterned ridges and grooves. *Biomaterials*, 2012, **33**(1): 128-136
- [37] Zarei M, Samimi A, Khorram M, *et al.* Fabrication and characterization of conductive polypyrrole/chitosan/collagen electrospun nanofiber scaffold for tissue engineering application. *Int J Biol Macromol*, 2021, **168**: 175-186
- [38] Li Y, Li X, Zhao R, *et al.* Enhanced adhesion and proliferation of human umbilical vein endothelial cells on conductive PANI-PCL fiber scaffold by electrical stimulation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, **72**: 106-112
- [39] Gopinathan J, Pillai M M, Elakkiya V, *et al.* Carbon nanofillers incorporated electrically conducting poly ϵ -caprolactone nanocomposite films and their biocompatibility studies using MG-63 cell line. *Polym Bull*, 2016, **73**(4): 1037-1053
- [40] Esrafilzadeh D, Jalili R, Stewart E M, *et al.* High-performance multifunctional graphene-PLGA fibers: toward biomimetic and conducting 3D scaffolds. *Adv Funct Mater*, 2016, **26**(18): 3105-3117
- [41] Lu S, Chen W, Wang J, *et al.* Polydopamine-decorated PLCL conduit to induce synergetic effect of electrical stimulation and topological morphology for peripheral nerve regeneration. *Small Methods*, 2023, **7**(2): e2200883
- [42] Cheng H, Huang Y, Yue H, *et al.* Electrical stimulation promotes stem cell neural differentiation in tissue engineering. *Stem Cells Int*, 2021, **2021**: 6697574
- [43] Ferrai C, Schulte C. Mechanotransduction in stem cells. *Eur J Cell Biol*, 2024, **103**(2): 151417

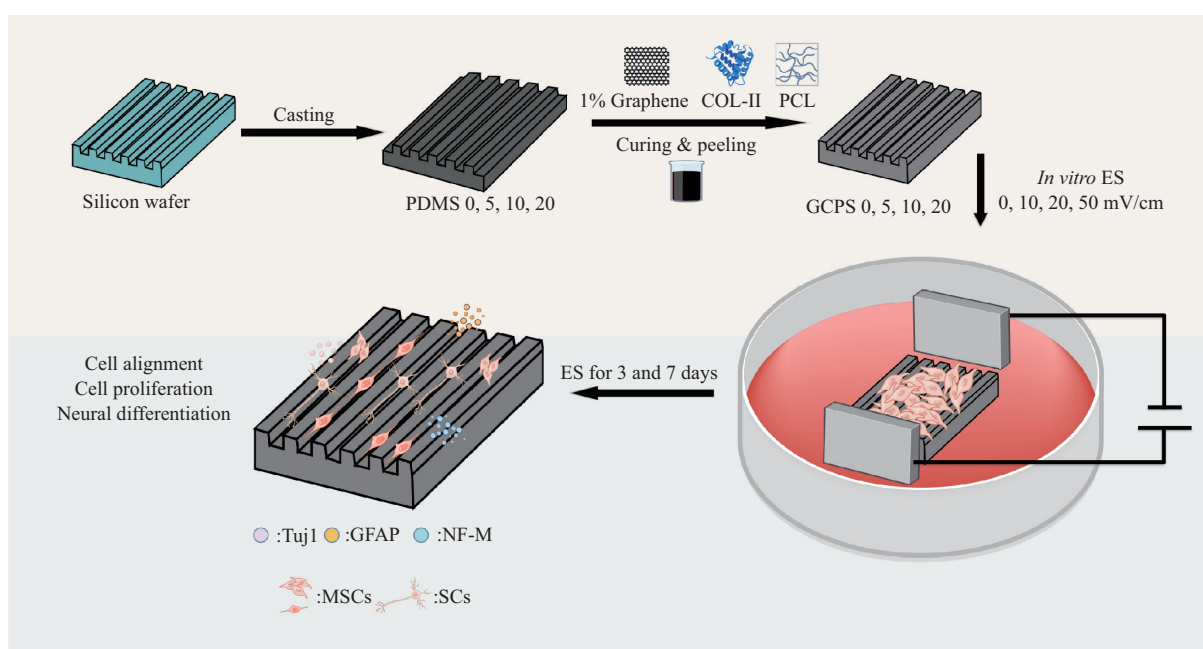
Electrical Stimulation Combined With Conductive Microgrooves Promotes Neural Differentiation of Stem Cells*

DAN Xiao-Qiang^{1)**}, DONG Chan-Juan^{1,2)**}, LÜ Yong-Gang^{1)***}

⁽¹⁾State Key Laboratory of New Textile Materials and Advanced Processing, Wuhan Textile University, Wuhan 430200, China;

⁽²⁾Mechanobiology and Regenerative Medicine Laboratory, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Peripheral nerve injury is a common clinical condition that can impair the regulatory function of target organs, leading to functional disability; severe injuries may even result in lifelong disability. Therefore, how to effectively promote the morphological and functional reconstruction of injured peripheral nerves has become a critical scientific issue that urgently needs to be addressed. This study biomimicked the highly oriented structure and electrophysiological properties of peripheral nerves and investigated the feasibility and effectiveness of combining electrical stimulation (ES) with oriented conductive substrates for the repair of injured peripheral nerves at the cellular level. **Methods** Polydimethylsiloxane (PDMS) substrates with oriented microgroove structures of varying widths (0, 5, 10, and 20 μm) were fabricated using silicon wafers with

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (U23A2070).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-27-59367809, E-mail: yglvme@163.com; yglv@wtu.edu.cn

Received: July 09, 2026 Accepted: September 08, 2026

micropatterned grooves as templates. Graphene-based conductive patterned substrates (GCPSs) with oriented microgrooves were then constructed *via* soft lithography and designated as GCPS 0, GCPS 5, GCPS 10, and GCPS 20 according to the groove width. The GCPSs were prepared from collagen/polycaprolactone (PCL) matrices containing 1.0 wt% graphene, and their morphology, wettability, and conductivity were characterized. Mesenchymal stem cells (MSCs) viability, proliferation, adhesion, and orientation on the substrates were evaluated before ES treatment. Then, ES at a frequency of 2 Hz and field strengths of 10, 20, or 50 mV/cm were applied to the cells for 10 min daily, over 3 or 7 consecutive days. Neural differentiation was assessed by morphological observation, immunofluorescence staining, and analysis of neural lineage-related markers.

Results The oriented microgroove PDMS substrates supported long-term MSCs growth, guided cells to align along the groove direction, and promoted a morphological transition toward neural-like cells, exhibiting the capacity to induce MSCs differentiation toward the neural lineage. Microgroove structures effectively guided the alignment of MSCs and promoted the development of a more elongated, neural-like morphology, with the most pronounced morphological changes observed on grooves of 10 and 20 μm in width. Meanwhile, the incorporation of graphene endowed the GCPSs with favorable electrical conductivity, though the groove width did not significantly affect the conductive performance. The GCPSs showed good cytocompatibility with MSCs, and cell proliferation on these substrates exhibited a time-dependent pattern, with no significant effect observed from groove width. The inductive effect of ES combined with GCPSs on MSCs differentiation toward specific neural lineages was co-regulated by ES intensity (0, 10, 20, and 50 mV/cm) and microgroove width. ES at 10 mV/cm and 20 mV/cm promotes MSCs differentiation toward neurons on microgrooved substrates of various widths (5, 10, and 20 μm); under the same ES intensities, microgrooves with widths of 5 μm and 10 μm are more favorable for MSCs differentiation toward glial cells/SCs. Notably, low-intensity ES (10 or 20 mV/cm) combined with GCPS 10 significantly enhanced the neural differentiation of MSCs. Neurotrophic factor secretion levels by MSCs cultured on various GCPS substrates after 3 d of ES application was further detected. There were no significant differences in nerve growth factor- β (NGF- β) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) concentrations among the GCPS 5, GCPS 10, and GCPS 20 substrates, and these levels were not affected by variations in ES intensity. Under ES at 10 mV/cm, the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) concentration in each GCPS substrate was higher than that in the corresponding non-ES group on the same substrate. However, as ES intensity increased, the GDNF concentration decreased to varying degrees.

Conclusion This study demonstrates that the combined strategy of “oriented topographical structure+ES” can effectively promote the neural differentiation of MSCs and holds promise for accelerating the repair process of peripheral nerve injuries.

Key words electrical stimulation, oriented structure, graphene, conductive matrices, neuronal differentiation

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0372

CSTR: 32369.14.pibb.20260372