

DOI: 10.13376/j.cblls/2016067

文章编号: 1004-0374(2016)04-0521-07

胶原支架在骨髓间充质干细胞治疗 中枢神经系统疾病中的应用

高 月[#], 储成艳[#], 李 深^{*}

(大连医科大学附属大连市中心医院神经内科, 大连 116033)

摘 要: 骨髓间充质干细胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs) 已被证明能够改善中枢神经系统疾病的预后, 但单独移植的 BMSCs 很难在损伤部位长期存活并分化为神经细胞。新近研究发现, 胶原支架能够促进 BMSCs 的增殖、存活与分化, 进而增强其修复缺损组织、重建神经功能的作用。现就 BMSCs 治疗中枢神经系统疾病的研究现状、胶原支架的应用和改性方式及其复合 BMSCs 治疗中枢神经系统疾病的研究进展进行综述。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 胶原支架; 胶原改性; 中枢神经系统疾病

中图分类号: R318; R338.3; R741.05 **文献标志码:** A

Role of collagen scaffold in facilitating the therapeutic effect of bone mesenchymal stem cells for central nervous system diseases

GAO Yue[#], CHU Cheng-Yan[#], LI Shen^{*}

(Department of Neurology, Dalian Municipal Central Hospital
Affiliated to Dalian Medical University, Dalian 116033, China)

Abstract: BMSCs (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs) have been proven to improve the prognosis of various central nervous system diseases. However, they could barely achieve long-term survival and neural differentiation in the lesion sites when they were transplanted alone. Recent studies have shown that collagen scaffold is capable of enhancing the proliferation, survival and differentiation of BMSCs, which in turn strengthens the effect of BMSCs in repairing damaged tissue and reconstructing nervous function. The purpose of this review is to summarize the current progress of BMSCs in treatment of central nervous system diseases, the application of collagen and its modification as biomaterial, as well as the combination of BMSCs and collagen scaffold on treatment of central nervous system diseases.

Key words: bone marrow-derived mesenchymal stem cells; collagen scaffold; collagen modification; central nervous system diseases

中枢神经系统疾病, 如脑血管病、神经退行性疾病等是困扰人类已久的难治性疾病, 且发病率呈逐年增长的趋势。由于中枢神经系统的高度复杂性和神经元有限的再生能力, 至今仍缺乏修复神经损伤的有效手段。新近, BMSCs 在再生医学领域中的研究成果使其成为医学界关注的热点, 已在多种中枢神经系统疾病的治疗当中取得了令人欣喜的成效^[1-2]。然而, 移植的 BMSCs 在损伤部位的存活

率很低, 分化的数量则更少, 难以达到长期、稳定的疗效, 也未能实现干细胞在损伤部位分化、替代丢失的神经细胞治疗神经系统疾病的初衷。

收稿日期: 2015-08-16; 修回日期: 2015-10-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(81300985); 辽宁省自然科学基金项目(201501821)

[#]并列第一作者

^{*}通信作者: E-mail: listenlishen@hotmail.com

近来, 医用生物材料逐渐展现出在干细胞治疗领域的应用价值, 在神经保护、修复与再生的过程中发挥重要作用。胶原蛋白是一种天然高分子生物材料, 可作为细胞移植的载体, 为移植细胞提供适宜的局部微环境。研究证实, 联合胶原支架可以提高 BMSCs 治疗中枢神经系统疾病的效果^[3-4]。本文就 BMSCs 治疗中枢神经系统疾病的研究现状、组织工程支架的特点、胶原支架的应用和改性及其复合 BMSCs 治疗中枢神经系统疾病的研究进展进行综述。

1 BMSCs治疗中枢神经系统疾病的研究现状

1.1 BMSCs治疗中枢神经系统疾病极具潜力

BMSCs 是一类自我复制能力强、具有多向分化潜能的成体干细胞, 可分化为成骨细胞、脂肪细胞、神经细胞等, 而且 BMSCs 相对易于收集及培养扩增, 规避了胚胎干细胞、脐带及外周血来源的

间充质干细胞、诱导多能干细胞各自所存在的伦理学、免疫排斥、潜在致瘤性等问题, 成为细胞治疗和组织工程中最具潜力的“种子细胞”之一^[5-6]。大量动物实验证明, BMSCs 植入体内后可以定位到损伤的神经组织, 主要通过分化为神经细胞、分泌神经营养因子、免疫调节、促进血管和神经突起新生等途径修复多种脑血管疾病、神经退行性疾病所导致的神经损伤, 促进感觉、运动及认知等缺失神经功能的恢复(图1)^[7-10]。值得注意的是, Jung 等^[11]在犬的 BMSCs 移植治疗中发现, 异种移植与自体移植均可作为治疗脊髓损伤的有效手段, 而相比较之下, 自体移植则更加有利于脊髓损伤后功能恢复。另外, Pedram 等^[12]通过观察移植体外已分化成神经样细胞的 BMSCs 和未分化的 BMSCs 对脊髓损伤大鼠的疗效, 结果发现, 就功能恢复而言, 移植已分化成神经样细胞的 BMSCs 作用更为突出。同样, Cho 等^[13]的实验结果也为此提供了有力证据。

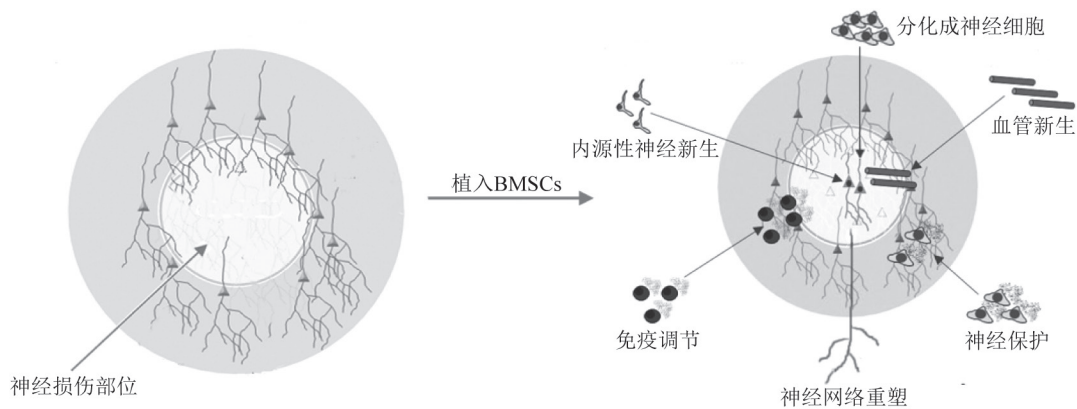


图1 神经损伤的模式图和BMSCs移植治疗的可能机制^[10]

临床数据显示, BMSCs 同样能够改善脑卒中和脊髓损伤患者的神经功能, 并未见明显安全性问题^[14-16]。基于 BMSCs 的神经修复作用, 科学家们探索将其应用于更多中枢神经系统疾病的治疗。近期, 有研究显示, BMSCs 移植治疗有助于匹罗卡品致痫大鼠的功能恢复与神经新生, 同时发状分裂相关增强子 1 (hairy and enhancer of split, Hes1) 沉默的 BMSCs 易于向 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyrate, GABA) 能神经元方向分化, 移植该种基因工程化的 BMSCs 对癫痫的治疗效果更加显著^[17]。另外, Semon 等^[18]尝试将 BMSCs 用于多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 的治疗, 他们利用髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 35-55 (myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG35-

55) 建立自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型, 通过 MS 的行为学评分证实 BMSCs 可减轻模型小鼠的 MS 症状, 利用甲苯胺蓝及苏木精-伊红染色等方法发现 BMSCs 治疗组小鼠髓鞘损伤的范围缩小且炎症细胞浸润程度降低。酶联免疫吸附结果显示, BMSCs 治疗 30 d 的小鼠血清中干扰素 γ (interferon γ , IFN γ)、白介素 -12 (interleukin-12, IL-12) 等炎症因子的水平明显下降。

1.2 BMSCs治疗存在的主要问题

BMSCs 用于治疗中枢神经系统疾病虽然前景广阔, 但仍须攻克 3 个关键性的理论和技术难题^[3,19]。(1) 损伤局部的恶劣微环境导致移植细胞存活率低。脑血管疾病、脊髓损伤、神经退行性疾病等造成不

同程度的神经组织变性或缺损,移植细胞的生长缺乏生理条件下的细胞外基质支撑和血管的营养供应。同时,病变微环境内的炎症反应和促凋亡因子致使移植的细胞很难存活。(2) BMSCs 分化率低、分化表型难以控制,与宿主整合困难。变性坏死环境内缺乏组织再生所需的信号分子,只有很少量的移植细胞能够分化为有功能的神经细胞,难以与宿主整合来替代损伤组织、重建神经纤维连接,从而无法达到治愈疾病的目的。(3) 移植细胞的迁移和扩散导致病变部位细胞密度降低。细胞植入靶组织后通常会在数小时或数天内快速扩散到其他部位,病变部位存留的干细胞数目急剧下降,无法实现其在损伤部位的长期修复。另外,移植细胞迁移到非靶组织也可能带来潜在的危害。因而,改善移植干细胞的微环境,促进其存活及向神经方向分化将有利于提高 BMSCs 修复神经组织损伤,促进功能恢复的作用。

2 组织工程支架的特点

生物技术的发展日新月异,生物材料已成为各国科学家竞相研发的热点。组织工程支架作为医用高分子材料的重要研究成果,为干细胞治疗走出困境带来希望。它能够为移植的细胞提供三维的空间结构,提高细胞存活率,甚至诱导其定向分化,进而增强移植细胞的治疗效应。理想的支架材料必须具备以下特征^[20-21]: (1) 对移植细胞和宿主组织没有细胞毒性,即使在降解后也需如此;(2) 有规律的生物降解速度,快速的降解会导致细胞失去黏附,也可能产生细胞毒性;(3) 具有组织相容性,不会

引起炎症反应;(4) 形态大小和内部空间结构必须适合细胞生长和损伤组织的恢复,如突起的生长、血管的形成等;(5) 弹性和硬度与宿主组织相似;(6) 合适的表面特性,如电荷、亲水性、疏水性,这些对细胞的黏附、炎症反应和组织相容性都有影响。另有报道显示,生物支架一方面可通过局部黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、Rho 激酶、酪氨酸激酶 A(tyrosine kinase A, Trk A) 等信号分子激活干细胞内信号网络,调控基因表达;另一方面还能够与细胞骨架相互连接,调节细胞的生物学行为^[22-23]。

3 胶原支架的优势

胶原蛋白是体内含量最大的蛋白质,属于细胞外基质的结构蛋白,作为一种天然高分子材料,其本身无细胞毒性且组织相容性好、细胞黏附性高、抗张强度适宜及可充分生物降解等优势而被广泛用作组织工程支架材料^[5,24-26](表 1)。胶原蛋白可于牛和猪皮肤、肌腱、鼠尾等组织中提取,主要分为 I、II、III 和 V 型。其中, I 型胶原是骨、皮肤、角膜等组织器官中最重要的成份,不仅具有较强的可塑性,本身还可作为多种工程支架的组成成份,因而在组织工程中的应用最为广泛^[27-29]。胶原蛋白可经冷冻干燥后形成海绵样结构或 37 °C 条件下自然凝胶两种途径形成支架结构。因此,可在体外将细胞接种于支架后植入病变部位,也可将细胞与胶原蛋白混合后注射至病变部位于体内形成支架。扫描电镜下观察胶原支架呈多孔结构,能够为细胞提供三维生存环境^[30]。体外研究证实,胶原支架多孔的内部结构适于 BMSCs 的黏附、生长及增殖。更重要

表1 胶原支架的主要应用

应用	胶原类型	支架复合物	实验结果	参考文献
创伤性脑损伤	I型	支架+BMSCs	缩小病变面积,促进病变及海马部位血管新生及功能恢复	[33-34]
	I型	支架+BMSCs	促进移植细胞存活、分化和神经突生长及功能恢复	[3]
脑缺血	I型	支架+NSCs	促进突触的形成及功能恢复	[35]
	I型	支架+ bFGF NPC-BMSCs	缩小病变面积,促进细胞存活、增殖和分化,促进功能恢复	[36]
脊髓损伤	I/III型	支架+BMSCs	促进轴突生长及功能恢复	[37]
	I型	支架+NPC	促进轴突再生、神经分化及功能恢复	[38]
皮肤创伤	I型	支架	促进皮肤的修复	[39]
骨、关节损伤	I型	支架+BMSCs	形成骨、软骨样结构组织	[40]
角膜再生	I型	支架+角膜基质细胞	角膜基质细胞大量克隆,可形成具有角膜细胞特征的上皮	[41]
肌肉再生	I型	支架+成肌细胞	成肌细胞高表达肌球蛋白重链,分泌肌细胞外基质	[42]

注: NPC, 即neural progenitor cells, 神经前体细胞

的是,与普通的二维培养相比,胶原支架还可以通过维持 BMSCs 高表达 Oct4、Sox2、Rex-1 和 Nanog 等转录因子提高其干细胞特性^[31]。另外,胶原支架还可以上调 BMSCs 表达与血管再生、神经新生及信号转导等相关的功能性基因的表达^[32]。

4 BMSCs复合胶原支架治疗中枢神经系统疾病

除了能够为细胞生长提供三维支撑结构与黏附界面外,胶原支架还可以为神经纤维投射指引方向,限制细胞迁移,隔离并降低免疫攻击,维持局部适宜的微环境,提高细胞存活率。同时,还有促进血管生成、神经再生、干细胞增殖及分化等有利作用^[20-21,26,43-44]。目前,BMSCs 复合胶原支架治疗中枢神经损伤的基础实验研究已取得了突破性进展。

4.1 BMSCs复合胶原支架治疗脑外伤

研究显示,BMSCs 复合胶原支架可通过减小病变区的体积、提高移植细胞存活、促进病变区血管的生成及神经突生长等途径进一步改善脑外伤引起的神经功能障碍^[34,45]。Qu 等^[32]研究发现,经复合胶原支架治疗后病灶区 BMSCs 的数量明显比单独移植 BMSCs 的多,血管内皮细胞生长因子的表达是单独移植 BMSCs 组的 6.8 倍。Mahmood 等^[46-47]的实验结果显示,与单独移植 BMSCs 治疗相比,复合胶原支架治疗能够更加有效地下调分别由反应性星形胶质细胞和少突胶质细胞表达的具有神经突起生长抑制作用的神经黏蛋白和 Nogo-A,上调生长相关蛋白-43 (growth associated protein43, GAP-43) 和突触素的表达,从而证实复合胶原支架可增强 BMSCs 对损伤部位神经轴突再生及突触形成的促进作用。然而,经开颅手术将细胞与支架直接植入病变部位,不仅手术复杂、风险高,同时对宿主的创伤大。Guan 等^[3]则选择在体外将胶原蛋白与¹⁸F-氟脱氧葡萄糖标记的 BMSCs 混合后经立体定位注射至病变部位,结果表明,胶原支架能够限制 BMSCs 迁移至其他部位,而且复合胶原支架有效促进了 BMSCs 的存活,向神经元方向分化及神经突起的生长。另外,正电子发射断层成像(PET)显示,复合胶原支架治疗组大鼠病变区的代谢最为活跃。毫无疑问,以胶原支架为载体复合 BMSCs 在治疗脑外伤方面已凸显出巨大的潜能,为脑外伤患者缺失神经功能的重建带来新的希望。

4.2 BMSCs复合胶原支架治疗脊髓损伤

在干细胞治疗脊髓损伤的研究过程中发现,无

论就移植细胞的存活、分化还是神经功能的恢复,复合胶原支架的作用都更加显著。Cholas 等^[37]在大鼠脊髓损伤的治疗研究中发现,单纯将胶原支架植入损伤部位也能改善神经功能。BMSCs 复合胶原支架还可以通过降低病变区巨噬细胞的浸润减轻局部的炎症反应,植入 4 周后的胶原支架经马尾松三色染色 (masson's trichrome) 依旧能够观察到植入的胶原支架呈多孔结构,并且可以观察到 GAP-43 染色阳性的神经轴突伸入胶原支架内部,但是病变区新生的血管细胞数量少于对照组。近期,苏州大学完成了我国首例自体 BMSCs 复合胶原支架移植治疗脊髓损伤,这标志着该治疗方法已进入临床试验阶段。

5 胶原支架的改性

胶原支架复合 BMSCs 治疗中枢神经系统疾病同样面临诸多挑战,胶原支架需要根据所植入部位的不同具备相适应的力学性能才能“因地制宜”地发挥预期效果。早在 2006 年,Engler 等^[48]就发现胶原支架的物理特性对细胞的生物学行为有重要影响,特别是细胞分化的方向。硬度在 0.1~1 kPa 时最有利于 BMSCs 向神经方向分化。因而,研究人员希望能够通过改变胶原支架的力学特性来定向调控其生物相容性、空间结构和降解速度,从而改善细胞的生长和分化的微环境。目前胶原改性的方式主要通过化学、物理和生物方法交联。

5.1 交联

5.1.1 化学交联

胶原的化学交联可经合成或天然的交联剂实现,合成的交联剂中戊二醛 (glutaraldehyde, GA) 和碳化二甲胺 / N-羟基丁二酰亚胺混合剂 (EDC/NHS) 的应用最为广泛。传统的 GA 价格低廉、交联效率高,不仅能够稳定胶原化学特性,还可以进一步降低其免疫原性。然而,GA 具有一定的生物毒性,容易导致组织的钙化,因此在一定程度上限制了其应用。EDC/NHS 是一种水溶性、毒性很低的混合交联剂,EDC 在其中起关键作用,NHS 主要负责稳定 EDC 的交联作用。与 GA 相比,EDC/NHS 生物相容性更强、不易被酶分解且更加有利于细胞分化。绝大部分化学交联剂只是充当分子内或分子间连接的桥梁,而 EDC/NHS 是通过催化分子内的羧基和氨基反应进行交联的,因此,又称为“零长度交联剂”^[49-50]。Salvatore 等^[51]以胶原支架作为神经引导管研究周围神经的新生,通过橡胶弹性理

论方法证实 EDC 交联的胶原支架降解时间延长,利用细胞活性分析表明,EDC 交联的胶原支架细胞相容性好,而 GA 交联后则具有细胞毒性。

与合成的交联剂相比,天然交联剂的优点在于其细胞毒性更低。京尼平是最为研究人员青睐的天然交联剂之一,提取于栀子果。京尼平能够高效地交联胶原支架,而且经京尼平交联的支架还可以自发荧光,从而有助于对培养细胞的分布、迁移及支架降解的动态观察^[52]。值得注意的是,经高浓度京尼平长时间交联的胶原支架具有很高细胞毒性,容易导致细胞死亡^[53]。Sundararaghavan 等^[54]研究显示,经京尼平交联的胶原支架有利于背根神经节神经元突起的生长,这种效应与胶原支架化学性质的变化有关,随着京尼平的作用时间和浓度而改变,但并不影响胶原纤维直径及内部多孔结构。

5.1.2 物理交联

相对于化学交联,物理交联是一种绿色无害的方式。适量的 γ 射线可以提高支架的化学特性和热稳定性。然而, γ 射线操作危险,射线量不均造成支架的交联程度不均一。紫外线照射、干热交联等处理虽然简易、安全,但费用昂贵,容易造成胶原的变性,不利于细胞的黏附、迁移及增殖^[49,55]。另外,物理交联还面临交联强度弱、消耗时间长等问题,因此,研究人员在不断改进化学交联剂性能、弱化其细胞毒性作用的同时,也在寻找更合适的交联方法。

5.1.3 生物交联

生物交联是近几年发展起来的安全、无毒性、无污染的手段,能够在生理条件下进行酶催化反应交联生物材料。谷氨酰胺转氨酶 (transglutaminase, TG) 广泛存在于动物、植物中,是目前研究最热的生物交联剂。它主要通过催化蛋白质中谷氨酸与赖氨酸残基形成酰胺键来改变支架的化学特性,还可加强细胞与纤维连接蛋白和整合素的联系促进细胞的黏附^[56]。Lee 等^[57]发现经 TG 处理的胶原硬度变大,可促进血管的新生,但并不影响支架孔隙率、孔径大小。TG 引人注目的地方还在于其特殊的酶活性位点使交联的针对性更强,利用 TG 可将不同种类的高分子或聚合物交联在一起,合成集多种特性于一身的生物材料^[58]。然而,生物交联的不足之处在于可能会导致胶原蛋白等生物材料产生异常的生化功能,可能在一些疾病的发生中产生预料不到的结果,如糖尿病、慢性肾功能不全等,未来还需要

依据更多的基础研究结果系统地评价其利弊^[59-60]。因此,研究人员在不断优化物理、化学交联方法,探索生物交联的实用性的同时,需要继续寻找更加合适的胶原支架改性方案。

6 小结与展望

BMSCs 治疗中枢神经系统疾病的积极作用已经得到证实,临床试验结果表明,其是一种安全、简便、有效的治疗手段。然而,这种治疗方法缺乏长效性,移植细胞的存活率和分化率低,单纯依靠移植细胞对神经的保护、营养及促神经突生长等作用无法达到根治疾病的目的。胶原蛋白作为神经组织工程学支架材料能够促进移植细胞的存活及分化,进而提高细胞治疗的疗效,具有广阔的应用前景,其联合 BMSCs 在治疗脑外伤和脊髓损伤中已表现出巨大的潜力。然而,研究人员仍需不断改进及探索胶原支架改性策略以匹配不同疾病要求,同时寻找类似硬度、孔径大小这些能够影响细胞行为的物理化学因素,并深入解析胶原支架调控细胞行为所涉及的具体信号转导通路,为人为精确控制干细胞的分化等提供靶点。

[参 考 文 献]

- [1] Teixeira FG, Carvalho MM, Sousa N, et al. Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70: 3871-82
- [2] Tam RY, Fuehrmann T, Mitrousis N, et al. Regenerative therapies for central nervous system diseases: a biomaterials approach. *Neuropsychopharmacology*, 2014, 39: 169-88
- [3] Guan J, Zhu Z, Zhao RC, et al. Transplantation of human mesenchymal stem cells loaded on collagen scaffolds for the treatment of traumatic brain injury in rats. *Biomaterials*, 2013, 34: 5937-46
- [4] Orive G, Anitua E, Pedraz JL, et al. Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10: 682-92
- [5] Ding L, Li X, Sun H, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on collagen scaffolds for the functional regeneration of injured rat uterus. *Biomaterials*, 2014, 35: 4888-900
- [6] Anitua E, Prado R, Orive G. Endogenous morphogens and fibrin bioscaffolds for stem cell therapeutics. *Trends Biotechnol*, 2013, 31: 364-74
- [7] Wang Y, Chen X, Cao W, et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol*, 2014, 15: 1009-16
- [8] Vu Q, Xie K, Eckert M, et al. Meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells for ischemic stroke.

- Neurology, 2014, 82: 1277-86
- [9] Wang F, Chang G, Geng X. NGF and TERT co-transfected BMSCs improve the restoration of cognitive impairment in vascular dementia rats. *PLoS One*, 2014, 9: e98774
- [10] Dihn  M, Hartung HP, Seitz RJ. Restoring neuronal function after stroke by cell replacement: anatomic and functional considerations. *Stroke*, 2011, 42: 2342-50
- [11] Jung DI, Ha J, Kang BT, et al. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *J Neuro Sci*, 2009, 285: 67-77
- [12] Pedram MS, Dehghan MM, Soleimani M, et al. Transplantation of a combination of autologous neural differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells into injured spinal cord of rats. *Spinal Cord*, 2010, 48: 457-63
- [13] Cho SR, Kim YR, Kang HS, et al. Functional recovery after the transplantation of neurally differentiated mesenchymal stem cells derived from bone marrow in a rat model of spinal cord injury. *Cell Transplant*, 2009, 18: 1359-68
- [14] Bang OY, Lee JS, Lee PH, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol*, 2005, 57: 874-82
- [15] Lee JS, Hong JM, Moon GJ, et al. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells*, 2010, 28: 1099-106
- [16] Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, et al. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain*, 2011, 134: 1790-807
- [17] Long Q, Qiu B, Wang K, et al. Genetically engineered bone marrow mesenchymal stem cells improve functional outcome in a rat model of epilepsy. *Brain Res*, 2013, 1532: 1-13
- [18] Semon JA, Maness C, Zhang X, et al. Comparison of human adult stem cells from adipose tissue and bone marrow in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5: 2
- [19] Dimmeler S, Ding S, Rando TA, et al. Translational strategies and challenges in regenerative medicine. *Nat Med*, 2014, 20: 814-21
- [20] Delcroix GJ, Schiller PC, Benoit JP, et al. Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering. *Biomaterials*, 2010, 31: 2105-20
- [21] Forraz N, Wright KE, Jurga M, et al. Experimental therapies for repair of the central nervous system: stem cells and tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*, 2013, 7: 523-36
- [22] Khatiwala CB, Kim PD, Peyton SR, et al. ECM compliance regulates osteogenesis by influencing MAPK signaling downstream of RhoA and ROCK. *J Bone Miner Res*, 2009, 24: 886-98
- [23] Inoue Y, Tsuda S, Nakagawa K, et al. Modeling myosin-dependent rearrangement and force generation in an actomyosin network. *J Theor Biol*, 2011, 281: 65-73
- [24] Taghiabadi E, Nasri S, Shafieyan S, et al. Fabrication and characterization of spongy denuded amniotic membrane based scaffold for tissue engineering. *Cell J*, 2015, 16: 476-87
- [25] Li X, Xiao Z, Han J, et al. Promotion of neuronal differentiation of neural progenitor cells by using EGFR antibody functionalized collagen scaffolds for spinal cord injury repair. *Biomaterials*, 2013, 34: 5107-16
- [26] Guan Z, Jia S, Zhu Z, et al. Facile and rapid generation of large-scale microcollagen gel array for long-term single-cell 3D culture and cell proliferation heterogeneity analysis. *Anal Chem*, 2014, 86: 2789-97
- [27] Cen L, Liu W, Cui L, et al. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatr Res*, 2008, 63: 492-6
- [28] Basha YR, Sampath KTS, Doble M. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015, 57: 452-63
- [29] Abou Neel EA, Bozec L, Knowles JC, et al. Collagen-emerging collagen based therapies hit the patient. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65: 429-56
- [30] Sancho A, Vazquez L, De-Juan-Pardo EM. Effect of cold storage on collagen-based hydrogels for the three-dimensional culture of adipose-derived stem cells. *Biofabrication*, 2014, 6: 035017
- [31] Han S, Zhao Y, Xiao Z, et al. The three-dimensional collagen scaffold improves the stemness of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *J Genet Genomics*, 2012, 39: 633-41
- [32] Qu C, Mahmood A, Liu XS, et al. The treatment of TBI with human marrow stromal cells impregnated into collagen scaffold: functional outcome and gene expression profile. *Brain Res*, 2011, 1371: 129-39
- [33] Lu D, Mahmood A, Qu C, et al. Collagen scaffolds populated with human marrow stromal cells reduce lesion volume and improve functional outcome after traumatic brain injury. *Neurosurgery*, 2007, 61: 596-602
- [34] Qu C, Xiong Y, Mahmood A, et al. Treatment of traumatic brain injury in mice with bone marrow stromal cell-impregnated collagen scaffolds. *J Neurosurg*, 2009, 111: 658-65
- [35] Yu H, Cao B, Feng M, et al. Combined transplantation of neural stem cells and collagen type I promote functional recovery after cerebral ischemia in rats. *Anat Rec: Hoboken*, 2010, 293: 911-7
- [36] Matsuse D, Kitada M, Ogura F, et al. Combined transplantation of bone marrow stromal cell-derived neural progenitor cells with a collagen sponge and basic fibroblast growth factor releasing microspheres enhances recovery after cerebral ischemia in rats. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17: 1993-2004
- [37] Cholas R, Hsu HP, Spector M. Collagen scaffolds incorporating select therapeutic agents to facilitate a reparative response in a standardized hemisection defect in the rat spinal cord. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18: 2158-72
- [38] Altinova H, Mollers S, Fuhrmann T, et al. Functional

- improvement following implantation of a microstructured, type-I collagen scaffold into experimental injuries of the adult rat spinal cord. *Brain Res*, 2014, 1585: 37-50
- [39] Ananta M, Brown RA, Mudera V. A rapid fabricated living dermal equivalent for skin tissue engineering: an in vivo evaluation in an acute wound model. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18: 353-61
- [40] Brady MA, Sivananthan S, Mudera V, et al. The primordium of a biological joint replacement: coupling of two stem cell pathways in biphasic ultrarapid compressed gel niches. *J Craniomaxillofac Surg*, 2011, 39: 380-6
- [41] Tidu A, Ghoubay-Benallaoua D, Lynch B, et al. Development of human corneal epithelium on organized fibrillated transparent collagen matrices synthesized at high concentration. *Acta Biomater*, 2015, 22: 50-8
- [42] Chen S, Nakamoto T, Kawazoe N, et al. Engineering multi-layered skeletal muscle tissue by using 3D microgrooved collagen scaffolds. *Biomaterials*, 2015, 73: 23-31
- [43] Ma F, Xiao Z, Chen B, et al. Accelerating proliferation of neural stem/progenitor cells in collagen sponges immobilized with engineered basic fibroblast growth factor for nervous system tissue engineering. *Biomacromolecules*, 2014, 15: 1062-8
- [44] Kriebel A, Rumman M, Scheld M, et al. Three-dimensional configuration of orientated fibers as guidance structures for cell migration and axonal growth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2014, 102: 356-65
- [45] Mahmood A, Wu H, Qu C, et al. Effects of treating traumatic brain injury with collagen scaffolds and human bone marrow stromal cells on sprouting of corticospinal tract axons into the denervated side of the spinal cord. *J Neurosurg*, 2013, 118: 381-9
- [46] Mahmood A, Wu H, Qu C, et al. Suppression of neurocan and enhancement of axonal density in rats after treatment of traumatic brain injury with scaffolds impregnated with bone marrow stromal cells. *J Neurosurg*, 2014, 120: 1147-55
- [47] Mahmood A, Wu H, Qu C, et al. Down-regulation of Nogo-A by collagen scaffolds impregnated with bone marrow stromal cell treatment after traumatic brain injury promotes axonal regeneration in rats. *Brain Res*, 2014, 1542: 41-8
- [48] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 2006, 126: 677-89
- [49] Yang H, Tan Q, Zhao H. Progress in various crosslinking modification for acellular matrix. *Chn Med J (Engl)*, 2014, 127: 3156-64
- [50] Krishnamoorthy G, Sehgal PK, Mandal AB, et al. Development of D-lysine-assisted 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide/N-hydroxysuccinimide-initiated cross linking of collagen matrix for design of scaffold. *J Biomed Mater Res A*, 2013, 101: 1173-83
- [51] Salvatore L, Madaghiele M, Parisi C, et al. Crosslinking of micropatterned collagen-based nerve guides to modulate the expected half-life. *J Biomed Mater Res A*, 2014, 102: 4406-14
- [52] Kwon YS, Lim ES, Kim HM, et al. Genipin, a cross-linking agent, promotes odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod*, 2015, 41: 501-7
- [53] Sundararaghavan HG, Monteiro GA, Lapin NA, et al. Genipin-induced changes in collagen gels: correlation of mechanical properties to fluorescence. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 87: 308-20
- [54] Sundararaghavan HG, Monteiro GA, Firestein BL, et al. Neurite growth in 3D collagen gels with gradients of mechanical properties. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 102: 632-43
- [55] Zhang X, Chen X, Yang T, et al. The effects of different crossing-linking conditions of genipin on type I collagen scaffolds: an in vitro evaluation. *Cell Tissue Bank*, 2014, 15: 531-41
- [56] Marturano JE, Xylas JF, Sridharan GV, et al. Lysyl oxidase-mediated collagen crosslinks may be assessed as markers of functional properties of tendon tissue formation. *Acta Biomater*, 2014, 10: 1370-9
- [57] Lee PF, Bai Y, Smith RL, et al. Angiogenic responses are enhanced in mechanically and microscopically characterized, microbial transglutaminase crosslinked collagen matrices with increased stiffness. *Acta Biomater*, 2013, 9: 7178-90
- [58] Taddei P, Chiono V, Anghileri A, et al. Silk fibroin/gelatin blend films crosslinked with enzymes for biomedical applications. *Macromol Biosci*, 2013, 13: 1492-510
- [59] Bullock PT, Reid DG, Chow WY, et al. A new glycation product 'norpronyl-lysine' and direct characterization of cross linking and other glycation adducts: NMR of model compounds and collagen. *Biosci Rep*, 2014, 34: e00096
- [60] Chen NX, O'Neill K, Chen X, et al. Transglutaminase 2 accelerates vascular calcification in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*, 2013, 37: 191-8

• 更正启事 •

本刊 2016 年第 3 期第 328 页, 第 4 节“基因 2 型 PRRSV 的变异与演化”第 1 段第 21 行,“其基因组特征是 Nsp2 存在 31 个氨基酸的不连续缺失, 缺失模式为 11+1+19”更正为“其基因组特征是 Nsp2 存在 131 个氨基酸的不连续缺失, 缺失模式为 111+1+19”。