

# 纳米凝胶搭载的 siRNA 通过靶向抑制施万细胞铁死亡促进周围神经损伤修复

杨俊<sup>1,2</sup>, 黄欣林<sup>3</sup>, 覃汉俊<sup>4</sup>, 谢思远<sup>5</sup>, 朱煜华<sup>6</sup>, 吴珺<sup>7</sup>

1. 中国人民解放军陆军第七十四集团军医院(原解放军第四二一医院)骨科, 广东 广州 510318; 2. 南方医科大学南方医院创伤骨科, 广东 广州 510515; 3. 南方医科大学南方医院关节与骨病外科, 广东 广州 510515; 4. 深圳市人民医院(南方科技大学第一附属医院)创伤骨科, 广东 深圳 518020; 5. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515; 6. 南方医科大学南方医院脊柱骨科, 广东 广州 510515; 7. 中国人民解放军陆军第七十四集团军医院(原解放军第四二一医院)门诊部体检中心, 广东 广州 510318

**【摘要】目的:**探究周围神经损伤(PNI)后施万细胞的死亡机制,使用纳米凝胶搭载的 siRNA 靶向抑制施万细胞死亡。**方法:**下载 GEO 数据库中 PNI 的转录组数据,依次进行数据处理、差异分析、GO 功能富集分析、铁死亡通路鉴定以及靶基因的筛选。通过蛋白印记和 qPCR 实验验证靶基因的差异性。自组装单宁酸(TA)-siRNA 纳米凝胶,通过丁达尔效应实验、粒径和电位测量、细胞吞噬实验、细胞骨架染色和 CCK-8 细胞活力实验鉴定纳米凝胶的物理学和生物学特性。通过划痕实验、免疫荧光染色实验、蛋白印记和 qPCR 实验验证 TA-siRNA 纳米凝胶抑制施万细胞铁死亡的有效性。**结果:**PNI 后施万细胞出现明显的铁死亡现象,Bex1 是调控施万细胞铁死亡的关键基因。TA-siRNA 纳米凝胶具有优良的物理学和生物学特性,能够将 siRNA 成功地携带到损伤的施万细胞中并沉默靶基因,从而有效地抑制施万细胞损伤后的铁死亡。**结论:**纳米凝胶搭载的 siRNA 可以靶向抑制施万细胞铁死亡,为临床治疗 PNI 提供新的方向。

**【关键词】**周围神经损伤;施万细胞;铁死亡;纳米凝胶;siRNA;靶向治疗

**【中图分类号】**R745;R363

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**1005-202X(2024)04-0495-09

## siRNA delivered by nanogels facilitates peripheral nerve repair through inhibiting ferroptosis in Schwann cells

YANG Jun<sup>1,2</sup>, HUANG Xinlin<sup>3</sup>, QIN Hanjun<sup>4</sup>, XIE Siyuan<sup>5</sup>, ZHU Yuhua<sup>6</sup>, WU Jun<sup>7</sup>

1. Department of Orthopedics, the 74th Group Army Hospital of PLA (formerly, the 421st Hospital of PLA), Guangzhou 510318, China; 2. Department of Orthopedic Trauma, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 3. Department of Joint and Bone Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 4. Department of Orthopedic Trauma, Shenzhen People's Hospital (the First Affiliated Hospital of Southern University of Science and Technology), Shenzhen 518020, China; 5. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 6. Department of Spinal Orthopedics, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 7. Physical Examination Center of the Outpatient Department, the 74th Group Army Hospital of PLA (formerly, the 421st Hospital of PLA), Guangzhou 510318, China

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of Schwann cell death after peripheral nerve injury (PNI), and to inhibit Schwann cell death by nanogel-delivered siRNA. **Methods** The transcriptome data of PNI in GEO database were downloaded for data processing, followed by difference analysis, GO functional enrichment analysis, ferroptosis pathway identification, and target gene screening. The differences of target genes were verified through protein imprinting and qPCR experiment. The physical and biological properties of self-assembled tannic acid (TA)-siRNA nanogels were identified by Tyndall effect, particle size and potential measurements, phagocytosis assay, cytoskeleton staining, and CCK-8 cell viability assay. The effectiveness of TA-siRNA nanogel in inhibiting ferroptosis in Schwann cells was verified by scratch experiment,

**【收稿日期】**2024-02-11

**【基金项目】**军队医学科技青年培育计划(19QNP005);南方医科大学南方医院临床研究专项(2022CR006);南方医科大学南方医院院长基金(2020B028)

**【作者简介】**杨俊,副主任医师,研究方向:外周神经损伤、骨材料、骨感染与组织工程重建,E-mail:859487053@qq.com

immunofluorescence staining, protein imprinting, and qPCR experiment. **Results** After PNI, obvious ferroptosis was observed in Schwann cells, and Bcl2 was identified as the key gene regulating ferroptosis in Schwann cells. With excellent physical and biological properties, TA-siRNA nanogel could successfully carry siRNA into damaged Schwann cells, and silence their ferroptosis genes, thus effectively inhibiting ferroptosis after Schwann cell damage. **Conclusion** Nanogel-delivered siRNA can inhibit ferroptosis in Schwann cells, providing a new direction for PNI treatment.

**Keywords:** peripheral nerve injury; Schwann cell; ferroptosis; nanogel; siRNA; targeted therapy

## 前言

周围神经损伤(PNI)是一个重大的临床和公共卫生问题,PNI的发生会导致身体相关部分的运动、感觉和自主神经功能部分或全部丧失<sup>[1-2]</sup>。与中枢神经系统相比,周围神经系统在损伤后具有显著的再生能力,而施万细胞的可塑性对这种能力有重要贡献<sup>[3]</sup>。施万细胞是周围神经的髓磷脂形成细胞,在神经损伤的修复过程中起重要作用。目前普遍认为施万细胞能够通过重编程产生促进神经再生修复的细胞表型,清除多余的髓鞘,同时分泌各种细胞因子引导轴突生长<sup>[4]</sup>。然而,这些功能的正常发挥需要足够的施万细胞,特别是当周围神经严重受损时。Siironen等<sup>[5-6]</sup>发现PNI后,施万细胞的数量经历了一个由上升到急剧下降的过程,确定了施万细胞数量不足是PNI修复结果不理想的重要原因。因此,抑制施万细胞的死亡是一种治疗PNI有前景的策略。

常见的细胞死亡机制包括细胞凋亡、细胞坏死、细胞焦亡、铁死亡等<sup>[7]</sup>。其中铁死亡是最近发现的一种程序性细胞死亡形式,其特征是细胞内铁积累、脂质过氧化和谷胱甘肽过氧化物酶耗竭,并伴有线粒体广泛的超微结构改变。最近,Abdalkader等<sup>[8]</sup>在许多神经系统疾病中发现了铁水平升高和神经元氧化损伤。同时,有证据表明通过抑制铁死亡可以有效改善神经性疼痛,促进神经损伤的修复<sup>[9]</sup>。因此,鉴于施万细胞在周围神经系统中的重要作用,使用药物靶向抑制施万细胞的铁死亡以促进周围神经的修复,可能是治疗PNI的一个有效的方法。

RNA干扰(RNAi)是一种广泛存在于生物体内的基因表达调控机制。通过双链RNA的介导,小的双链RNA分子可以有效地触发特定基因的RNAi沉默<sup>[10]</sup>。在RNAi作用中,siRNA起着重要作用,并且由于其具有成本低、特异性强、应用范围广等特点,正有望成为下一代靶向药物<sup>[11]</sup>。然而,当系统给药时,siRNA在到达其作用位点时面临诸多额外的生理障碍,包括血清蛋白的非特异性结合、肾脏和免疫系统的清除、核酸酶的降解等。另外,siRNA分子过大且亲水性过强,无法单独通过细胞膜扩散等特点也会限制siRNA发挥疗效<sup>[12-13]</sup>。因此,设计能够促进

siRNA被动递送到靶组织并被靶细胞内化的载体是siRNA递送研究的一个重要方向。目前,纳米凝胶已成为siRNA转染细胞的载体。通过使用纳米凝胶,研究人员已经将siRNA有效传递给肾脏、卵巢和皮肤中的靶基因<sup>[14-15]</sup>。

本研究使用单宁酸(TA)和siRNA制备TA-siRNA纳米凝胶<sup>[16]</sup>。TA是一种天然多酚,是没食子酸的可水解两亲性单宁衍生物,其结构中含有多个没食子酸基团,可以通过氢键、静电、配位键和疏水相互作用与蛋白质和多糖等各种有机、无机、亲水和疏水材料相互作用。TA作为一种具有抗炎、抗菌和抗癌活性的天然交联剂,已被应用于各种生物医学研究<sup>[17]</sup>。另外,转录组测序技术和相关数据分析方法的发展为揭示PNI中施万细胞的分子特征提供了机会<sup>[18]</sup>。在本研究中,首先通过RNA-seq分析确认在PNI中铁死亡与施万细胞死亡的关联,结合体外实验确定调控施万细胞铁死亡的关键基因。随后,针对关键基因设计相应的siRNA,并与TA结合成纳米凝胶递送,靶向沉默施万细胞的铁死亡调控基因,从而抑制施万细胞死亡和促进周围神经修复。本研究对PNI中施万细胞死亡的机制提出新的见解,为靶向治疗PNI提供方向。

## 1 资料与方法

### 1.1 RNA-seq生物信息学定量分析

**1.1.1 数据处理** PNI的转录组测序样本来自GEO数据库,数据集编号为GSE244328。其中5个样本为正常组(GSM7813623、GSM7813624、GSM7813621、GSM7813622、GSM7813618),4个样本为损伤组(GSM7813620、GSM7813619、GSM7813616、GSM7813617)。为了去除各样本间的批次效应,使用“limma”包中的“normalizeBetweenArrays”函数对各样本进行标准化处理,使得各样本间的比较更加准确可靠<sup>[19-20]</sup>。随后,使用“factoextra”包对样本进行主成分分析(PCA),查看各样本的聚类情况。

**1.1.2 差异表达基因的鉴定** 为了寻找损伤组和正常组样品之间的差异表达基因,利用R包“DESeq2”对两组样本进行差异表达分析,以 $|\log_2(FC)| > 1, P < 0.05$

为界<sup>[20]</sup>。对于差异基因,利用“ggplot2”包分别生成热图和火山图进行可视化<sup>[21]</sup>。

**1.1.3 富集分析** 为了确定差异基因的功能和生物学意义,使用基因本体论(GO)数据库对上调基因进行富集分析。富集分析使用“clusterProfiler”包<sup>[21]</sup>,并以  $P<0.05$  为统计学标准。

**1.1.4 铁死亡通路的鉴定与相关基因的筛选** 使用非参数检验鉴定铁死亡通路在两组间是否存在差异。除此之外,使用箱线图分析 GO 数据库中 5 个铁死亡通路关键基因在两组间的表达差异情况。运用皮尔森相关性分析进一步筛选与铁死亡通路最相关的上调基因,使用散点图可视化,并以  $P<0.05$  为统计学标准。筛选得到的上调基因作为目标基因进行后续实验验证。

1.2 施万细胞的来源与处理

使用来自于美国 ATCC 生物标准品资源中心的小鼠施万细胞。施万细胞在 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基,加 10% 胎牛血清,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中生长。为了建立损伤组的细胞模型,使用 1 000 ng/mL 脂多糖(LPS)模拟炎症刺激来处理正常的施万细胞。处理后的施万细胞继续在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养 24 h。

1.3 蛋白质印记分析

施万细胞以  $5\times10^5$  个/孔接种于 6 孔板。培养 24 h 后,消化细胞,预冷 PBS 洗涤细胞 3 遍,于冰上加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂,用枪头轻轻吹打细胞,将抽提液转移至 EP 管中,冰上裂解 30 min,4 °C 14 000 g 离心 10 min,小心转移上清液,并记录转移体积,得到细胞总蛋白。随后,使用 BCA 法检测总蛋白浓度。配制 SDS-PAGE 凝胶后对上述样本进行电泳分离,转移至 PVDF 膜上,5% BSA 室温封闭 2 h。TBST 清洗后,加入  $\beta$ -actin、Bex1、Cd5l、Kng2 等一抗 4 °C 摇床孵育过夜,TBST 清洗 3 遍,添加 HRP-IgG 二抗,室温孵育 2 h。弃二抗,TBST 清洗 3 遍后,使用发光液进行曝光。用 ImageJ 软件分析目的蛋白的相对灰度值的差异。

1.4 实时荧光定量 PCR(qPCR)

细胞处理完毕,用预冷的 PBS 冲洗 3 遍,按照试剂盒说明书加入试剂并提取总 RNA,检测浓度后按照试剂盒说明书逆转录构建 cDNA,反应条件为:37 °C 孵育 15 min,85 °C 反应 5 s,4 °C 保存。qPCR 实验条件为:95 °C 预变性 15 s,95 °C 变性 5 s,62 °C 退火 30 s,40 个循环。实验结果以  $\beta$ -actin 为内参计算目的基因相对表达量。引物序列如表 1 所示。

表 1 qPCR 引物序列  
Table 1 qPCR primer sequences

基因	上游引物 F	下游引物 R	产物长度
Cd5l	CCCGGAAAATCTATGGGCCT	ATGAGGGCCCACTGAACAAG	196bp
Bex1	GACCCCTGCCTTGTGATGTA	AGGTAATACGGATCTTCCCATGC	156bp
Kng2	CAGCCACCTCTTTGCTCTCA	GAAGTGCCACACAGTCTCCA	146bp

1.5 自组装 TA-siRNA 纳米凝胶的制备

在 PBS 中制备 siRNA 溶液[0.2 光密度(OD) mL<sup>-1</sup>]和 TA 溶液(0.2wt%)。将 1 mL 的 siRNA 溶液放入冰水浴中,在磁力搅拌器上以 100 转/min 的速度搅拌。在 3 min 内,将 1 mL TA 溶液滴加到 siRNA 溶液中,反应 10~30 min。得到的 TA-siRNA 纳米凝胶经过离心和过滤装置,其分子量截止值为 100 kDa,去除未反应的 TA 和 siRNA。然后在纳米凝胶中加入 200  $\mu$ L 无 RNase 的 PBS,TA-siRNA 纳米凝胶原液 4 °C 保存。使用的 siRNA 根据基因 Bex1 设计,购买自广州艾基生物技术有限公司。

1.6 自组装 TA-siRNA 纳米凝胶特性的测定

使用激光同时检测 TA 溶液、siRNA 溶液、TA-siRNA 溶液是否产生丁达尔效应。使用透射电

镜(TEM)获得 TA-siRNA 纳米凝胶的微观图像。采用动态光散射分析仪(Zetasizer Nano ZS, Malvern)测量纳米凝胶的尺寸分布和 Zeta 电位。使用 5-羧基荧光素(5-FAM)标记 siRNA,在荧光倒置显微镜下分别观察巨噬细胞对 siRNA 和 TA-siRNA 的吞噬效果。

1.7 细胞骨架染色

将  $4\times10^5$  的施万细胞接种到 35 mm 培养皿。实验时,移去培养基,用 PBS 清洗一遍,加入透化液。室温处理 20 min 后,移去透化液,用 PBS 液清洗 3 次,每次 10 min。随后使用 4% 多聚甲醛固定 30 min,完成后用含 0.1% TritonX-100 的 PBS 清洗 3 次,每次 10 min。使用 1% Actin-TrackerGreen 染色,室温避光孵育 40 min。孵育后用含 0.1% TritonX-100 的 PBS 清洗 3 次,每次 10 min。清洗完毕后在倒置荧光显微



镜下观察染色结果。

### 1.8 CCK-8检测细胞活力和增殖

取对数生长期的施万细胞配成细胞悬液,并用计数板对细胞进行计数。将细胞接种于96孔板,每孔接种5000个细胞,设置3组,每组设置5个复孔。3组分别加入对照培养液、纳米凝胶液、纳米凝胶和siRNA混合液各100  $\mu$ L,置于37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中孵育。在避光条件下,每孔加入10  $\mu$ L CCK-8,轻摇混匀,在37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中继续孵育2 h,在免疫酶标仪450 nm波长处检测OD值。分别检测处理后1、3和7 d的细胞活力。

### 1.9 划痕实验

将不同分组的施万细胞置于6孔板中过夜。当细胞达到60%~80%汇合时,用200  $\mu$ L移液器吸头划出一条直线。处理后的施万细胞继续在37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$ 的恒温培养箱中培养。然后,在0和12 h时,在显微镜下拍摄细胞伤口宽度的照片。

### 1.10 免疫荧光染色实验

损伤组的施万细胞随机分成4组,分别加入对照培养液(Control)、TA溶液、siRNA、TA-siRNA纳米凝胶液各100  $\mu$ L。培养24 h后,以甲醛溶液固定细胞,TBST缓冲,室温下封闭30 min,分别以一抗(鼠抗MBP单克隆抗体)及二抗室温下孵育1 h,TBST缓冲液清洗后,以DAPI染色,滴加抗淬灭剂并封片,使用荧光倒置显微镜进行观察。

### 1.11 统计学方法

使用GraphPad Prism 8、image J以及R4.2.1进行统计学分析。符合正态分布的计量资料用均数 $\pm$ 标准差表示,所有实验至少重复3次,使用 $t$ 检验和ANOVA分析进行统计比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 生物信息学分析结果

各样本基因整体表达情况的柱状图显示各样本间存在批次差异,使用normalizeBetweenArrays函数对各样本进行归一化处理后,各样本整体表达情况得到统一(图1a和图1b)。PCA散点图反映维度1(PCA1)和维度2(PCA2)的主成分得分分别为48.52%和11.20%,累计解释基因表达变化的59.72%。两个维度呈现明显的分离,说明两组样本存在明显差异(图1c)。利用DESeq2包共筛选出6098个差异基因,其中2982个基因表现为上调,3116个基因表现为下调(图1d)。热图显示损伤组和正常组之间具有显著的表达差异(图1e)。对上调基因进行功能富集分析发现,上调基因和细胞程序性

死亡明显相关。条形图展示了上调基因相关的细胞程序性死亡通路(图1f)。铁死亡也是细胞程序性死亡的一种,两组间非参数检验的结果表明,铁死亡通路在损伤组高度富集( $P<0.05$ )(图1g)。在GO数据库中,3个铁死亡通路的关键基因(Slc7a11、Gpx4、Tmem154)在损伤组高表达( $P<0.05$ )(图1h)。皮尔森相关性分析显示,Cd5l、Bex1和Kng2是与铁死亡通路相关性最高的前3个上调基因( $P<0.05$ )(图1i)。

### 2.2 差异基因的实验验证

分别使用蛋白印记和qPCR实验检测目标基因Cd5l、Bex1和Kng2在损伤组与正常组施万细胞中的表达(图2)。结果显示Bex1在两组间具有显著的表达差异( $P<0.05$ ),而Cd5l和Kng2在两组之间的表达差异不明显( $P>0.05$ )。

### 2.3 TA-siRNA纳米凝胶的物理表征

相较于TA溶液和siRNA溶液,TA-siRNA纳米凝胶溶液在激光照射下可以产生明显的丁达尔效应(图3a)。TEM微观图像显示单个TA-siRNA纳米凝胶的粒径大小(图3b)。动态光散射分析仪测量得到纳米凝胶的粒径大小分布为(72.35 $\pm$ 5.32) nm,平均Zeta电位为-36.48 mV(图3c和图3d)。

### 2.4 TA-siRNA纳米凝胶的细胞吞噬效果

细胞吞噬实验图显示在2 h时,TA-siRNA(绿色)大量分布于施万细胞的细胞核(蓝色)周围,而siRNA组细胞核周围几乎没有绿色荧光分布(图4a)。

### 2.5 TA-siRNA纳米凝胶的生物相容性

细胞骨架染色实验结果显示在对照组、TA组、TA-siRNA纳米凝胶组中,绿色荧光的强度和分布没有明显的差异(图4b)。CCK-8分析结果显示,3组施万细胞的细胞活力基本相同,并且随着处理时间的延长,处理组的细胞活力也没有明显的下降(图4c)。

### 2.6 TA-siRNA纳米凝胶的基因沉默效率

蛋白质印记显示,相对于对照组、TA组和siRNA组,TA-siRNA纳米凝胶处理组的施万细胞髓鞘碱性蛋白(MBP)的表达量有一定的升高( $P<0.01$ ),而Bex1的表达量明显降低( $P<0.001$ )(图5a)。

### 2.7 TA-siRNA纳米凝胶对施万细胞迁移的作用

划痕实验显示,在12 h时,相对于对照组、TA组和siRNA组,TA-siRNA纳米凝胶组的细胞迁移率显著升高( $P<0.0001$ ),12 h的迁移面积占损伤面积的比例超过60%(图5b)。

### 2.8 TA-siRNA纳米凝胶对髓鞘修复的作用

免疫荧光染色结果显示,与其他组相比,TA-siRNA组具有更大的荧光面积和更高的荧光强度,说明MBP在TA-siRNA组中拥有更高的表达量(图5c)。

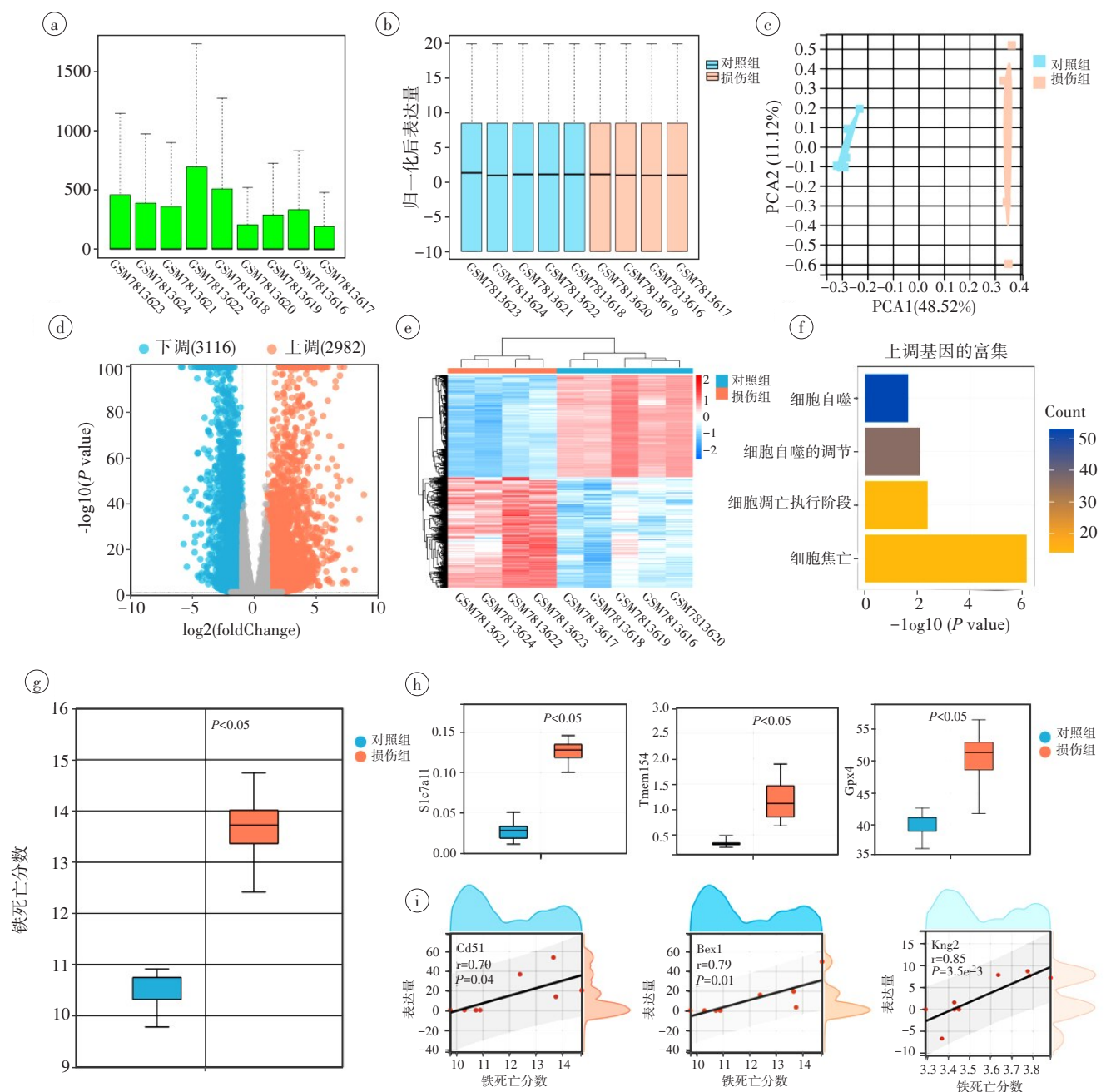


图1 施万细胞正常组和损伤组的转录组分析

Figure 1 Transcriptome analysis of normal and damaged Schwann cells

图1a是各样本的基因整体表达情况;图1b使用normalizeBetweenArrays函数对各样本进行归一化处理;图1c是PCA显示各样本的聚类情况;图1d是正常组与损伤组差异基因火山图;图1e是正常组与损伤组所有差异基因表达热图;图1f是组间上调基因的功能富集分析;图1g是两组间铁死亡通路的非参数检验结果;图1h展示GO数据库中3个铁死亡通路关键基因在损伤组高表达(Slc7a11、Gpx4、Tmem154)( $P<0.05$ );图1i使用皮尔森相关性分析筛选与铁死亡通路最相关的上调基因,其中Cd51、Bex1和Kng2被鉴定为相关性最高的前3个基因( $P<0.05$ )

### 3 讨论

通过生物信息学分析,初步认识了PNI中施万细胞的变化与发展。通过对上调基因的GO富集分析,找到了PNI后施万细胞出现程序性死亡的证据(图1f)。与先前的研究一致,施万细胞在神经损伤后表现出显著的自噬、凋亡和坏死等细胞现象<sup>[22-23]</sup>。施万细胞的死亡将导致损伤后神经营养因子分泌不足,

髓鞘碎片无法及时清理,进而导致神经修复进程受阻。以往的研究表明,在神经损伤病变中,施万细胞的铁死亡通路被显著激活,抑制施万细胞铁死亡是治疗神经损伤和病变的一个有效方法<sup>[24-26]</sup>。本研究也得到了类似的结果,在损伤组的施万细胞中,3个铁死亡通路的关键基因(Cd51、Bex1和Kng2)显著高表达(图1h),说明铁死亡机制在施万细胞死

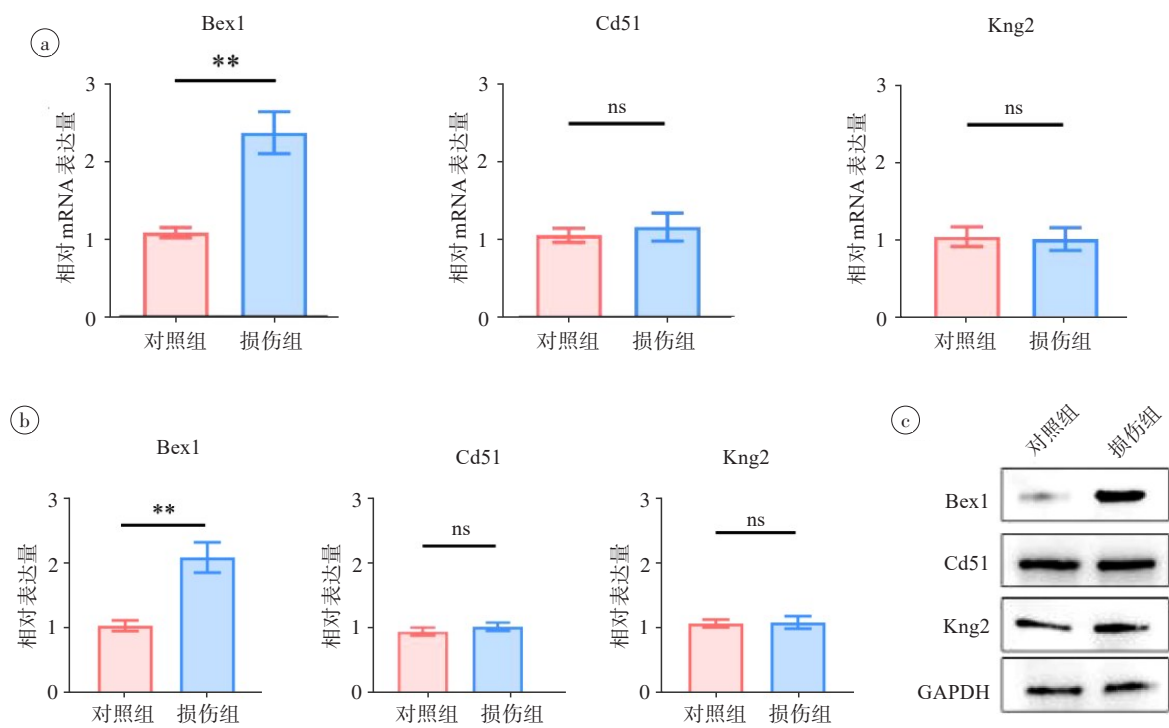


图 2 转录组分析结果的实验验证(\*\* $P<0.01$ )

Figure 2 Experimental verification of transcriptome analysis results (\*\* $P<0.01$ )

图 2a 是 PCR 结果,显示在对照组和损伤组中,目标基因(Bex1、Cd51 和 Kng2)的表达差异;图 2b 是蛋白印记结果,显示在对照组和损伤组中目标基因的表达式差异;图 2c 是 Bex1、Cd51 和 Kng2 的蛋白印记条带

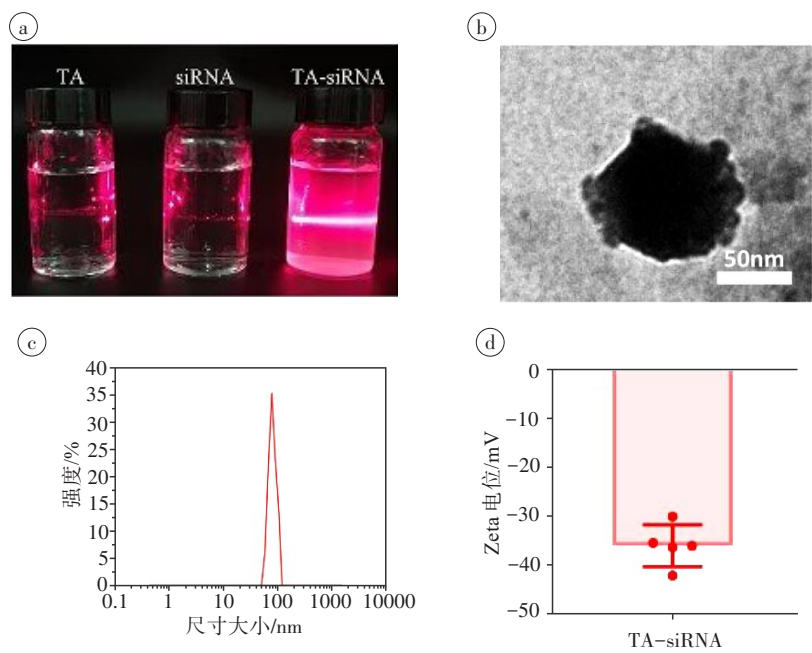


图 3 TA-siRNA 纳米凝胶的物理学特性

Figure 3 Physical properties of TA-siRNA nanogels

图 3a 是丁达尔效应实验;图 3b 是 TA-siRNA 纳米凝胶的 TEM 图像;图 3c 是纳米凝胶的尺寸分布;图 3d 是纳米凝胶的 Zeta 电位

亡进程中的重要作用。结合实验验证发现 Bex1 是抑制施万细胞铁死亡的潜在靶点(图 2)。以往的研究表明,Bex1 是 p75 神经营养因子受体的相互作用物,

与神经营养信号的传导和神经元的修复密切相关。Bex1 作为上游 p75NTR 功能的细胞内调节因子,在神经细胞的细胞周期、生长停滞和细胞分化过程中都



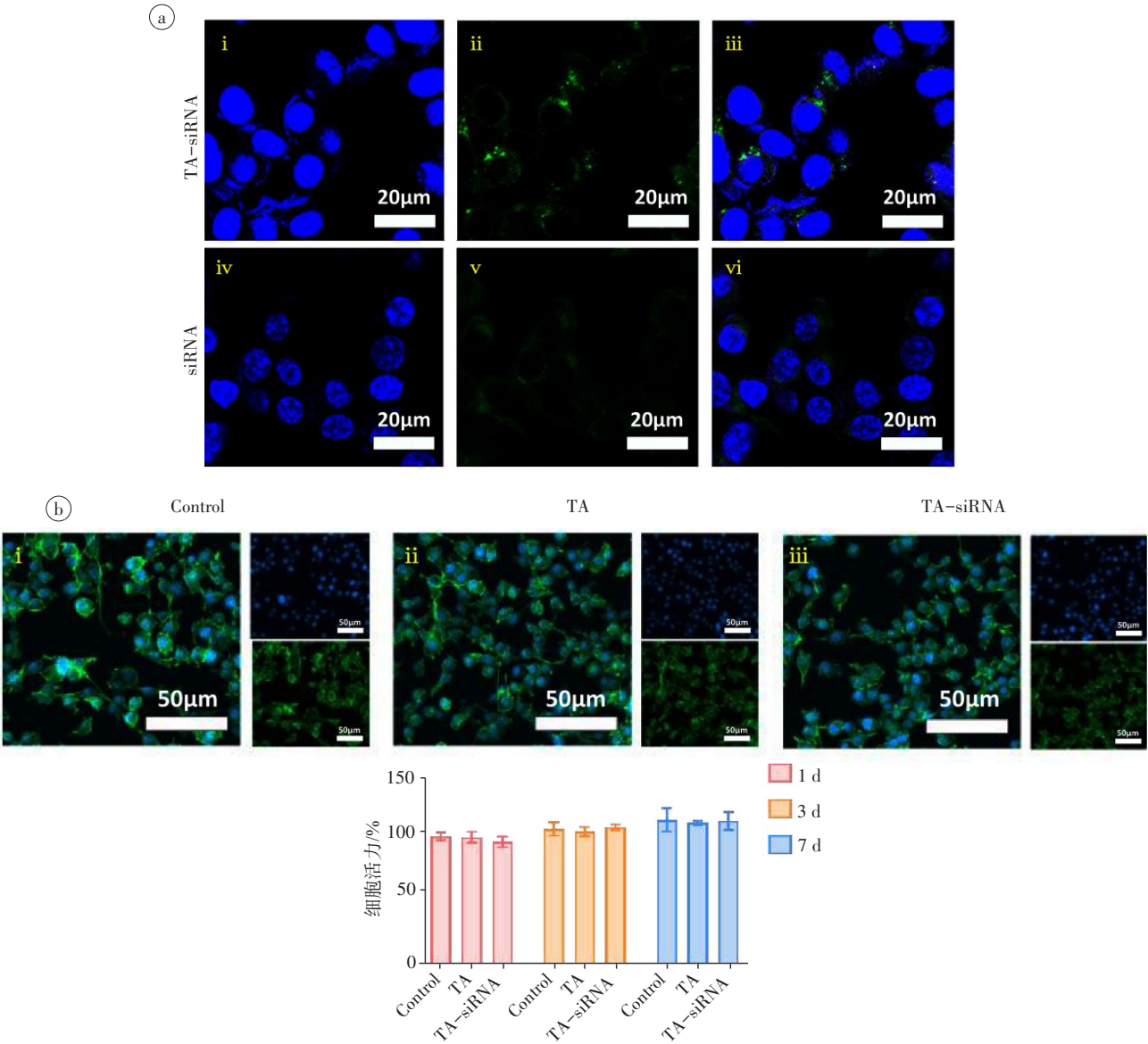


图 4 TA-siRNA 纳米凝胶的生物特性  
Figure 4 Biological properties of TA-siRNA nanogels

图 4a 是巨噬细胞分别摄取 TA-siRNA 纳米凝胶和 siRNA 的共聚焦显微镜图像;图 4b 是对照组 (Control)、TA 组和 TA-siRNA 组的细胞骨架染色;图 4c 是 CCK-8 细胞活力检测结果图

有动态调控<sup>[27]</sup>。除此之外,Bex1 在神经损伤中与某些髓鞘相关糖蛋白(MAG)相互拮抗,可以有效抵消 MAG 对轴突生长的抑制作用<sup>[28]</sup>。siRNA 可以通过 RNA 干扰有效抑制基因表达,起到治疗疾病和修复损伤的作用<sup>[29]</sup>。然而,由于 siRNA 的自身特性以及人体环境的复杂性,siRNA 到达作用位点发挥疗效往往面临着较多障碍<sup>[13]</sup>。因此,本研究试图通过设计 TA-siRNA 纳米凝胶,有效提高 siRNA 的作用效果。通过实验发现 TA-siRNA 纳米凝胶拥有优良的物理学性能。丁达尔现象和动态光散射分析仪测量显示,TA-siRNA 凝胶颗粒具有胶体的尺寸。纳米凝胶的 Zeta 电位为  $(-36.48 \pm 7.20)$  mV,说明纳米凝胶颗粒

具有一定的稳定性(图 3)。TA 的化学结构特点是存在酯键和大量的儿茶酚基团,这样的化学结构使得 TA 容易通过氢键与 siRNA 的磷酸主链相互作用,从而形成较为稳定的纳米凝胶<sup>[16]</sup>。此外,表面带负电荷的纳米凝胶颗粒在血液运输的过程中不易与带负电荷的血清白蛋白结合,因此可以在循环系统中保持较长时间的活性,为输送至损伤部位提供保障。

以往的研究充分证明了稳定的胶体在药物递送过程中具有更好的安全性、保护性、靶向性以及生物相容性<sup>[30-32]</sup>,本研究结果与此相符。细胞吞噬实验显示,相对于 siRNA,TA-siRNA 纳米凝胶更容易被施万细胞吞噬,表现出更高的细胞吞噬率和 siRNA 转染

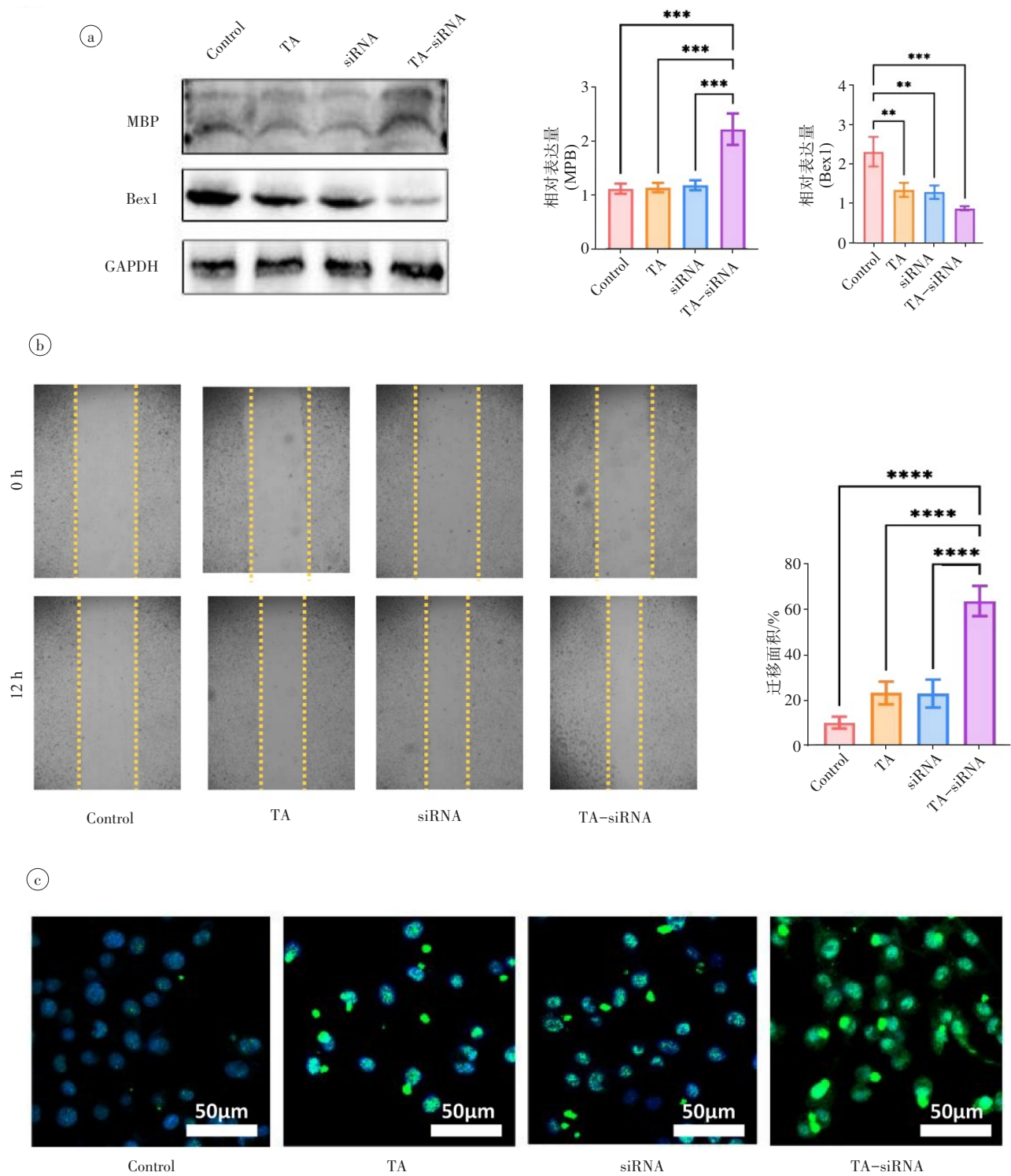


图 5 TA-siRNA 纳米凝胶的作用效果(\*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ )  
Figure 5 Effects of TA-siRNA nanogels (\*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ )

图 5a 是 MBP 和 Bex1 的蛋白印记结果(GAPDH 作为内参);图 5b 是施万细胞划痕实验结果图;图 5c 是髓鞘碱性蛋白(MBP)免疫荧光结果图

率(图 4a)。CCK-8 分析结果显示,3 组施万细胞的细胞活力基本相同(图 4c)。此外,有研究表明,施万细胞的细胞骨架与髓鞘生长、轴突运输以及施万细胞的生长分裂密切相关,因此完整的骨架是施万细胞行使功能的必要结构<sup>[33-34]</sup>。通过骨架染色实验发现对照组、TA 组、TA-siRNA 组的细胞骨架在数目和分

布上没有明显的差异(图 4b),说明 TA-siRNA 纳米凝胶具有良好的生物相容性。基于上述结果,使用 TA-siRNA 纳米凝胶靶向抑制施万细胞的铁死亡,其中 siRNA 根据靶基因 Bex1 设计。蛋白质印记显示,相比其他组,损伤组的施万细胞在接受 TA-siRNA 处理后,Bex1 表达水平显著下降,而 MBP 表达量有所



提高(图5a),证明TA-siRNA纳米凝胶对损伤施万细胞进行转导的有效性,说明TA-siRNA纳米凝胶能更好地抑制施万细胞铁死亡并诱导MBP的表达,从而加速神经损伤修复的过程。划痕实验表明,TA-siRNA纳米凝胶处理的施万细胞具有更高的细胞迁移率(图5b),说明在TA-siRNA纳米凝胶的作用下,损伤的施万细胞具有更快的增殖和迁移速度,表现出更好的愈合效果。不仅如此,免疫荧光染色结果显示TA-siRNA组相比其他组高表达MBP蛋白(图5c)。MBP是一种在神经系统的神经髓鞘化过程中非常重要的蛋白质。有研究表明,MBP含量的下降将导致神经退行性病变和神经元死亡<sup>[34]</sup>。在TA-siRNA纳米凝胶的作用下,损伤的施万细胞能更多地合成MBP,因此能够更好地减少神经元的死亡,促进神经损伤的修复。

## 4 结论

本研究发现在PNI后,施万细胞会出现铁死亡的现象。为了有效抑制铁死亡,利用TA-siRNA纳米凝胶的优良特性和生物相容性,将siRNA成功地携带到损伤的施万细胞中并沉默其关键铁死亡调控基因Bex1,从而有效地抑制施万细胞损伤后的铁死亡。这种纳米凝胶技术为PNI的治疗提供一种新的、有前景的策略。

## 【参考文献】

- [1] Asplund M, Nilsson M, Jacobsson A, et al. Incidence of traumatic peripheral nerve injuries and amputations in Sweden between 1998 and 2006[J]. *Neuroepidemiology*, 2009, 32(3): 217-228.
- [2] Li RJ, Liu ZG, Pan YM, et al. Peripheral nerve injuries treatment: a systematic review[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 68(3): 449-454.
- [3] Yi S, Zhang Y, Gu XK, et al. Application of stem cells in peripheral nerve regeneration[J]. *Burns Trauma*, 2020, 8: tkaa002.
- [4] Min Q, Parkinson DB, Dun XP. Migrating Schwann cells direct axon regeneration within the peripheral nerve bridge[J]. *Glia*, 2021, 69(2): 235-254.
- [5] Siironen J, Collan Y, Røytty M. Axonal reinnervation does not influence Schwann cell proliferation after rat sciatic nerve transection[J]. *Brain Res*, 1994, 654(2): 303-311.
- [6] Condie D, Tolkachjov SN. Facial nerve injury and repair: a practical review for cutaneous surgery[J]. *Dermatol Surg*, 2019, 45(3): 340-357.
- [7] Yuan JY, Ofengeim D. A guide to cell death pathways[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023. DOI: 10.1038/s41580-023-00689-6.
- [8] Abdalkader M, Lampinen R, Kanninen KM, et al. Targeting Nrf2 to suppress ferroptosis and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 466.
- [9] Wang HX, Huo XD, Han CY, et al. Ferroptosis is involved in the development of neuropathic pain and allodynia[J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(8): 3149-3161.
- [10] Setten RL, Rossi JJ, Han SP. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(6): 421-446.
- [11] Dykxhoorn DM, Palliser D, Lieberman J. The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs[J]. *Gene Ther*, 2006, 13(6): 541-552.
- [12] Kanasty R, Dorkin JR, Vegas A, et al. Delivery materials for siRNA

- therapeutics[J]. *Nat Mater*, 2013, 12(11): 967-977.
- [13] Friedrich M, Aigner A. Therapeutic siRNA: state-of-the-art and future perspectives[J]. *BioDrugs*, 2022, 36(5): 549-571.
- [14] Kim B, Park JH, Sailor MJ. Rekindling RNAi therapy: materials design requirements for *in vivo* siRNA delivery[J]. *Adv Mater*, 2019, 31(49): e1903637.
- [15] 范磊. 电活性水凝胶的构建及其在神经损伤修复中的应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
- [15] Fan L. Construction of electroactive hydrogels and its application in nerve injury repair[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021.
- [16] Lei H, Fan DD. A combination therapy using electrical stimulation and adaptive, conductive hydrogels loaded with self-assembled nanogels incorporating short interfering RNA promotes the repair of diabetic chronic wounds[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(30): e2201425.
- [17] Jafari H, Ghaffari-Bohlouli P, Niknezhad SV, et al. Tannic acid: a versatile polyphenol for design of biomedical hydrogels[J]. *J Mater Chem B*, 2022, 10(31): 5873-5912.
- [18] Sundaram VK, Schütza V, Schröter NH, et al. Adipo-glia signaling mediates metabolic adaptation in peripheral nerve regeneration[J]. *Cell Metab*, 2023, 35(12): 2136-2152.e9.
- [19] Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7): e47.
- [20] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biol*, 2014, 15(12): 550.
- [21] Wu TZ, Hu EQ, Xu SB, et al. clusterProfiler 4.0: a universal enrichment tool for interpreting omics data[J]. *Innovation (Camb)*, 2021, 2(3): 100141.
- [22] Jia B, Huang W, Wang Y, et al. Nogo-C inhibits peripheral nerve regeneration by regulating Schwann cell apoptosis and dedifferentiation[J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 616258.
- [23] 肖海丽, 袁真, 魏超, 等. 施万细胞可塑性和自噬对PNI修复的作用[J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2023, 63(5): 87-91.
- [23] Xiao HL, Yuan Z, Wei C, et al. Role of Schwann cell plasticity and autophagy in peripheral nerve injury repair[J]. *Journal of Nanchang University (Medical Sciences)*, 2023, 63(5): 87-91.
- [24] Gao DK, Huang YY, Sun XY, et al. Overexpression of c-Jun inhibits erastin-induced ferroptosis in Schwann cells and promotes repair of facial nerve function[J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(8): 2191-2204.
- [25] Hu M, Jiang W, Ye C, et al. Honokiol attenuates high glucose-induced peripheral neuropathy via inhibiting ferroptosis and activating AMPK/SIRT1/PGC-1 $\alpha$  pathway in Schwann cells[J]. *Phytother Res*, 2023, 37(12): 5787-5802.
- [26] Wu KY, Deng F, Mao XY, et al. Ferroptosis involves in Schwann cell death in diabetic peripheral neuropathy[J]. *Open Med (Wars)*, 2023, 18(1): 20230809.
- [27] Vilar M, Murillo-Carretero M, Mira H, et al. Bex1, a novel interactor of the p75 neurotrophin receptor, links neurotrophin signaling to the cell cycle[J]. *EMBO J*, 2006, 25(6): 1219-1230.
- [28] Khazaei MR, Halfter H, Karimzadeh F, et al. Bex1 is involved in the regeneration of axons after injury[J]. *J Neurochem*, 2010, 115(4): 910-920.
- [29] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs[J]. *Cell*, 2009, 136(4): 642-655.
- [30] 高至亮, 李梦琦, 郝京诚, 等. 胶体粒子的机械性能调控及其在药物递送中的应用[J]. *化学学报*, 2022, 80(7): 1010-1020.
- [30] Gao ZL, Li MQ, Hao JC, et al. Tuning the mechanical properties of colloid particles for drug delivery[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2022, 80(7): 1010-1020.
- [31] Zheng BJ, McClements DJ. Formulation of more efficacious curcumin delivery systems using colloid science: enhanced solubility, stability, and bioavailability[J]. *Molecules*, 2020, 25(12): 2791.
- [32] Kostarelos K. Rational design and engineering of delivery systems for therapeutics: biomedical exercises in colloid and surface science[J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2003, 106: 147-168.
- [33] Salzer JL. Schwann cell myelination[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7(8): a020529.
- [34] Frid K, Einstein O, Friedman-Levi Y, et al. Aggregation of MBP in chronic demyelination[J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2015, 2(7): 711-721.

(编辑:陈丽霞)