

脑源性神经生长因子转基因细胞移植和大剂量甲基强的松龙对脊髓损伤后细胞凋亡的影响

张 强, 邹德威, 海 涌, 白克文

(解放军 306 医院骨科 全军脊柱外科中心 100101 北京市)

【摘要】目的:探讨大鼠脊髓损伤后腺病毒介导的脑源性神经生长因子(AxCA-BDNF)体外转基因成肌细胞移植和静脉内注射大剂量甲基强的松龙(MP)对大鼠脊髓损伤后细胞凋亡的影响。**方法:**120 只 Wistar 大鼠分为:脊髓挫伤组(A 组),脊髓挫伤后 AxCA-BDNF 基因转染的成肌细胞移植组(B 组),脊髓挫伤后静脉内注射大剂量 MP 治疗组(C 组),脊髓挫伤后同时应用 AxCA-BDNF 和 MP 组(D 组)。手术后 1、3、7、14、28d 用行为学和电生理检查观察大鼠功能恢复情况,并用计算机图像分析技术对脊髓损伤区细胞凋亡(TUNEL 法)和 Bcl-2 蛋白表达(免疫组化法)进行定量分析。**结果:**四组中均发现凋亡细胞及 Bcl-2 蛋白阳性表达细胞,图像分析发现四组凋亡细胞核数为 A 组>B 组>C 组>D 组;Bcl-2 免疫反应阳性细胞表达顺序为 D 组>C 组>B 组>A 组,大鼠后肢功能恢复和电生理检查也有类似的变化趋势。**结论:**体外转基因成肌细胞移植和大剂量 MP 都能抑制大鼠脊髓损伤后的细胞凋亡,促进大鼠后肢功能恢复,两者联合应用具有协同作用。

【关键词】脊髓损伤;转基因;脑源性神经生长因子;甲基强的松龙;细胞凋亡

中图分类号:R322.81, R977.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2005)-07-0425-04

Effect of adenovirus-mediated brain derived neurotrophic factor ex vivo transgene myoblasts cells and methylprednisolone on apoptosis after spinal cord injury/ZHANG Qiang, ZOU Dewei, HAI Yong, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15(7):425-428

【Abstract】Objective:To investigate the effect of brain derived neurotrophic factor(BDNF) ex vivo transgene myoblasts cells and methylprednisolone(MP) on apoptosis after spinal cord injury(SCI).**Method:**One hundred and twenty rats were divided into four groups,spinal cord contusion injury(group A),spinal cord contusion injury with transplantation of ex vivo transgene myoblasts cells into injured site (group B),spinal cord contusion injury with large dose of MP intravenous injection (group C),spinal cord contusion injury with transplantation of transgene myoblasts cells to injured site combined with large dose of MP intravenous injection (group D), after operation.Tarlv score,somatosensory evoked potentials(SEP),motor evoked potentials(MEP) were examined at 1,3,7,14 and 28 day post operation.The apoptosis of spinal slice from the injured spinal cord were examined by the methods of the terminal deoxynucleotid transferase-mediated DUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) reaction and the expression of Bcl-2 was tested by immunohistochemistry.The positive cells were quantitatively analyzed by a computer image analysis system.**Result:**The number of apoptosis cells and the strong expression of Bcl-2 protein expression were found in four groups,the group ranking was A>B>C>D ($P<0.05$) as for the number of apoptosis cells and D>C>B>A ($P<0.05$) as for the expression of Bcl-2.These increases in Bcl-2 positive cells were paralleled by a significant improvement in neurological function and the peak latencies of early waves in SEPs and MEPs recovery.**Conclusion:**Intraspinal grafting of transgene myoblasts cells and MP intravenous injection respectively can inhibit the cell apoptosis of injured spinal cord as well as promote the recovery of neural function of adult rat injured spinal cord.Combined intraspinal grafting of transgene myoblasts cells with MP intravenous injection have a coordination effect.

【Key words】Spinal cord injury;Transgene;Brain derived neurotrophic factor;Methylprednisolone;Apoptosis

【Author's address】Orthopaedic Department,306 Hospital of PLA,Beijing,100101,China

第一作者简介:男(1963-),副主任医师,医学博士,研究方向:脊柱外科基础与临床
电话:(010)66356729-2261 E-mail:zhangqwte@sina.com.cn

细胞凋亡是一种自然的生理过程,在维持组织和器官发育以及排除不必要的细胞过程中起关

键作用。近年的研究表明,这种凋亡也可发生在脑、脊髓损伤后^[1-3]。本研究应用原位末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导 dUDP 标记法 (TUNEL 法) 和对 Bcl-2 蛋白表达的测定 (免疫组化法), 观察成年大鼠脊髓损伤后应用腺病毒介导的脑源性神经生长因子 (AxCa-BDNF) 体外转基因成肌细胞移植和大剂量甲基强的松龙 (MP) 对损伤脊髓细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

Wistar 大鼠 120 只, 体重 180~250g, 雌雄不拘。1%戊巴比妥钠 30mg/kg 腹腔内注射麻醉, 腰背部脱毛。将大鼠固定在立体定位仪上, 无菌条件下暴露脊髓腰膨大。应用改良的 Allen's 打击法致伤脊髓 (10g×2.5cm)。随机将动物分为: 脊髓挫伤组 (A 组); 脊髓挫伤后应用 AxCa-BDNF 基因转染的成肌细胞移植组 (B 组); 脊髓挫伤后即刻静脉内注射大剂量 MP 组 (首先以 30mg/kg、15min 静脉内快速冲击, 继之以 5.4mg/kg/h 维持 23h) 治疗组 (C 组); 脊髓挫伤后即刻应用 AxCa-BDNF 基因转染的成肌细胞移植和静脉内注射大剂量 MP 治疗组 (D 组)。手术后 1、3、7、14、28d 应用行为学和电生理检查观察大鼠神经功能恢复情况, 免疫组化观察大鼠损伤脊髓 TUNEL 反应和 Bcl-2 蛋白表达的变化。每个时相点每组 6 只动物。细胞移植组用微量注射器固定于微电极推进器上, 抽取 AxCa-BDNF 基因转染的成肌细胞悬液 5 μ l (5×10⁴ 个细胞/ μ l), 与脊髓成 30°角在受伤区及周围注射 3~5 点。

1.2 检测方法

1.2.1 行为学检查^[4] 采用改良的 Tarlov 评分, 0 分: 无自主性运动; 1 分: 仅限于髌膝关节的非反射性运动; 2 分: 肢体髌膝踝三个主要关节的运动; 3 分: 能主动支持体重和不协调步态, 或偶尔出现协调步态; 4 分: 前肢和后肢协调的步态, 行走时有趾间关节的运动; 5 分: 正常步态。

1.2.2 诱发电位检查 动物麻醉后, 选择左侧坐骨神经和对侧大脑皮层运动区分别进行电刺激, 记录 SEP 和 MEP 波形曲线, 计算波峰和潜峰时。刺激频率 4Hz, 波宽 0.2ms, 强度 40~60mV。

1.2.3 凋亡细胞的检测 术后 1、3、7、14、28d 实验动物经麻醉后, 用生理盐水、4%多聚甲醛做心

脏灌注固定。取脊髓全长, 对 SCI 区以及上、下端 1cm 的脊髓组织切片进行细胞凋亡的检测。TUNEL 荧光原位末端标记法参照 Boehringer Mannheim 公司 In situ cell death detection kit fluorescence 说明书操作, 荧光显微镜下观察凋亡细胞数。Bcl-2 单克隆抗体 (SANTA CRUZ 公司产品) 参照 SP 试剂盒说明书进行操作, 镜下观察阳性细胞并计数。随机计数 9 张切片 (损伤段、损伤上段、损伤下段各 3 张), 切片经计算机图像分析系统处理, 分别测出平均每张切片每平方毫米阳性细胞数, 并行 *t* 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 大鼠行为学检查结果

手术后 1d, A、B、C、D 四组大鼠都表现为双后肢瘫痪, 行为学观察无明显差别。1 周时 B、C、D 组大鼠神经功能明显好于 A 组, 4 周时 B、C、D 组大鼠已能行走, A 组大鼠则行走困难。Tarlov 评分见表 1。

2.2 电生理检查结果

见表 2。手术后 1d, A、B、C、D 组大鼠都表现为双后肢瘫痪, B、C、D 组运动诱发电位 (MEP) 和感觉诱发电位 (SEP) 潜峰时与 A 组比较无显著性差异 ($P>0.05$), 手术后 4 周 B、C、D 组潜峰时明显缩短, 与 A 组比较有显著差异 ($P<0.05$)。

2.3 大鼠损伤脊髓凋亡细胞数的变化结果

见图 1 (后插页 III) 和表 3。AxCa-BDNF 基因转染的成肌细胞移植和 MP 治疗可以明显减少损伤脊髓凋亡细胞数, 伤后 3、7、14d, B、C、D 组与 A 组比较有显著性差异。

2.4 大鼠损伤脊髓 Bcl-2 免疫反应阳性细胞数的变化

见图 2 (后插页 III) 和表 4。B、C、D 组伤后 7d

表 1 4 组大鼠脊髓损伤后各时相点的 Tarlov 评分
($\bar{x}\pm s$, $n=6$, 分)

损伤后 时间 (d)	Tarlov 评分			
	A 组	B 组	C 组	D 组
1	2.56±0.72	2.64±0.68	2.52±0.63	2.34±0.52
3	3.11±0.42	3.12±0.47	3.31±0.41	3.61±0.45
7	3.05±0.37	3.84±0.54 ^①	4.07±0.42 ^①	4.17±0.55 ^{①③}
14	3.21±0.85	4.39±0.58 ^①	4.31±0.43 ^①	4.53±0.29 ^{②③}
28	3.76±0.41	4.33±0.17 ^②	4.31±0.23 ^②	4.54±0.20 ^{②③}

注: 与 A 组比较 *t* 检验 ① $P<0.05$, ② $P<0.01$; ③与同时点 A、B、C 组比较单因素方差分析 $P<0.05$

表 2 4 组大鼠脊髓损伤后不同时间点 MEP 和 SEP 潜峰时

($\bar{x} \pm s$, ms, $n=6$)

组别	伤后 1d		伤后 3d		伤后 7d		伤后 14d		伤后 28d	
	MEP	SEP	MEP	SEP	MEP	SEP	MEP	SEP	MEP	SEP
正常组	1.48±0.46	1.96±0.26	1.48±0.46	1.96±0.26	1.48±0.46	1.96±0.26	1.48±0.46	1.96±0.26	1.48±0.46	1.96±0.26
A 组	3.92±0.82	4.90±1.54	3.82±0.63	4.43±0.38	3.75±0.63	4.25±0.65	3.64±0.48	3.43±0.49	3.48±0.95	3.21±0.55
B 组	3.64±0.45	3.45±0.62	3.26±0.46	3.55±0.49	2.75±0.46 ^①	2.89±0.47 ^①	2.50±0.33 ^①	2.09±0.36 ^①	2.03±0.33 ^②	2.10±0.32 ^①
C 组	3.16±0.64	3.28±0.44	3.10±0.42	3.73±0.47	2.46±0.42 ^①	2.94±0.52 ^①	2.50±0.54 ^①	2.30±0.35 ^①	2.15±0.28 ^②	2.13±0.46 ^①
D 组	3.25±0.56	3.16±0.42	2.17±0.57	3.17±0.63	2.17±0.57 ^①	2.82±0.45 ^①	1.98±0.22 ^{②③}	2.54±0.52 ^{②③}	1.64±0.30 ^{②③}	1.91±0.42 ^{①③}

注:与 A 组同时时间点比较 t 检验① $P<0.05$,② $P<0.01$;③与同时时间点 A、B、C 组比较单因素方差分析 $P<0.05$

表 3 4 组大鼠脊髓损伤后各时相点凋亡细胞数

($\bar{x} \pm s$, 个/ mm^2 , $n=6$)

组别	移植后时间(d)				
	1	3	7	14	28
A 组	10.12±2.78	36.23±6.47	23.38±7.46	15.67±4.58	8.18±2.88
B 组	8.73±2.33	24.16±4.82 ^①	18.24±4.08 ^①	8.05±2.84 ^②	7.65±1.74
C 组	9.31±9.84	25.78±6.91 ^①	22.28±5.46 ^①	9.94±1.58 ^①	7.59±2.15
D 组	8.3±2.52	22.59±6.15 ^{①③}	16.22±5.65 ^{①③}	7.18±1.54 ^{②③}	7.45±2.91

注:与 A 组同时时间点比较 t 检验 ① $P<0.05$,② $P<0.01$;③与其他组比较单因素方差分析 $P<0.05$

表 4 4 组大鼠脊髓损伤后各时相点 Bcl-2 免疫反应阳性细胞数

($\bar{x} \pm s$, 个/ mm^2 , $n=6$)

组别	移植后时间(d)				
	1	3	7	14	28
A 组	188.81±36.04	211.64±31.67	116.03±21.57	92.52±17.28	75.88±15.10
B 组	195.55±33.60	289.17±16.06 ^②	304.98±25.77 ^②	192.11±29.38	110.86±17.75 ^①
C 组	200.69±23.92	316.62±27.99 ^②	388.46±36.08 ^②	253.10±24.88 ^②	159.76±24.52 ^①
D 组	213.37±21.19	325.87±25.31 ^{②③}	401.70±31.39 ^{②③}	273.77±24.93 ^{②③}	161.81±20.60 ^{②③}

注:与 A 组同时时间点比较 t 检验① $P<0.05$,② $P<0.01$;③与同时时间点 A、B、C 组比较单因素方差分析 $P<0.05$

时 Bcl-2 免疫反应阳性细胞达到高峰,28d 时仍然处于较高水平。伤后 3、7、14、28d, B、C、D 组与 A 组比较有显著性差异。

3 讨论

随着分子生物学研究的发展,人们认识到细胞凋亡受细胞内外因素的调节。在神经系统的发育过程中,凋亡起重要作用。目前大量研究表明,在神经系统损伤及神经系统退行性疾病的过程中也可见凋亡的发生^[1,3]。近年来细胞凋亡的概念也引入脊髓损伤。

实验证明 Bcl-2 能有效地抑制氧自由基的产生及脂质过氧化过程。通过转基因等手段使实验动物过度表达 Bcl-2 可以减轻神经损伤,并能有效地阻止细胞凋亡。因此,它在神经损伤中的保护作用正越来越受到重视。Bcl-2 是可诱导基因,神经组织损伤后,通过一定形式的诱导作用可以增加它在损伤神经组织中的表达,从而提高组织对抗损伤的能力^[5,6]。

MP 是早期应用于治疗实验性和人类脊髓损伤的药物,尽管其保护机制还不完全清楚,但其理论上的有益作用包括通过恢复血-中枢神经系统屏障,抑制脉管源性水肿,增强中枢神经系统血流量,稳定溶酶体膜,抑制垂体内啡肽释放,改变损伤组织中电解质浓度和减轻炎症反应。MP 治疗脊髓损伤有益的作用包括^[7]: (1)防止损伤脊髓组织丢失钾离子和促进细胞外钙离子的恢复;(2)改善创伤后脊髓缺血;(3)增强创伤后脊髓组织 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶的活性;(4)增强脊髓神经元兴奋能力;(5)抑制脂质过氧化物。

神经营养因子对脊髓损伤修复具有重要的作用,BDNF 具有运动神经元营养活性,对多种感觉神经元、胆碱能神经元、多巴胺能神经元以及 γ -氨基丁酸能神经元的发育分化与生长再生也具有维持和促进作用,在阻止损伤后运动神经元死亡的作用上,BDNF 与神经营养因子-3(NT-3)有相同效应。BDNF、神经生长因子、NT-3 可以挽救轴突切除的前脑神经元并能促进神经元的再生。由

于神经营养因子不能通过血脑屏障,给药困难,人们将神经营养因子基因修饰的细胞植入脊髓损伤部位。已证实经基因工程技术修饰的细胞可分泌 BDNF 促进脊髓损伤后的皮质脊髓束轴突生长及部分神经功能恢复,防止和减慢横切损伤神经后神经元的死亡速度^[8,9]。

我们的研究中发现大鼠脊髓损伤后 1d, A、B、C、D 四组脊髓灰质和白质中的星形胶质细胞、少突胶质细胞、小神经胶质细胞和神经元在脊髓损伤后都参与了程序性细胞死亡(PCD),即这些细胞都发生了凋亡。凋亡高峰发生在损伤后 3d,凋亡细胞核数比较 A 组>B 组>C 组>D 组。大鼠脊髓损伤后 1d 即开始较高表达 Bcl-2 免疫反应,A 组 Bcl-2 高峰发生在损伤后 3d,应用 AxCa-BDNF 基因转染的成肌细胞移植和 MP 治疗后 7d 达到高峰,此时 Bcl-2 免疫反应不仅在神经元中有表达,更多的是在胶质细胞中大量表达,Bcl-2 免疫反应在此状态下一直维持到伤后 14d 之后开始下降,伤后 28d 仍有少量神经元表达。四组 Bcl-2 免疫反应阳性细胞比较 D 组>C 组>B 组>A 组。大鼠行为学和电生理检查也出现了类似的变化趋势。因此,我们认为大鼠脊髓损伤应用 AxCa-BDNF 基因转染的成肌细胞移植可以产生脑源性神经营养因子,具有加强脊髓修复和促进轴突再生的作用,MP 治疗能够阻止或减轻脊髓细胞凋亡,两者合用具有协同作用,共同促进脊髓损伤大鼠运动功能的恢复。

4 参考文献

1. Yune TY, Kim SJ, Lee SM, et al. Systemic administration of 17beta-estradiol reduces apoptotic cell death and improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats[J]. J Neurotrauma, 2004, 21(3): 293-306.
2. Nesic-Taylor O, Cittel D, Ye Z, et al. Exogenous Bcl-x(1) fusion protein spares neurons after spinal cord injury [J]. J Neurosci Res, 2005, 79(5): 628-637.
3. Yong C, Arnold PM, Zoubine MN, et al. Apoptosis in cellular compartments of rat spinal cord after severe contusion injury[J]. J Neurotrauma, 1998, 15(7): 459-472.
4. Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurological impairment[J]. Exp Neurol, 1985, 88(1): 123-134.
5. Wingrave JM, Sribnick EA, Wilford GG, et al. Higher calpastatin levels correlate with resistance to calpain-mediated proteolysis and neuronal apoptosis in juvenile rats after spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 2004, 21(9): 1240-1254.
6. Yukawa Y, Lou J, Fukui N, et al. Optimal treatment timing to attenuate neuronal apoptosis via Bcl-2 gene transfer in vitro and in vivo[J]. J Neurotrauma, 2002, 19(9): 1091-1103.
7. Bracken MB. Methylprednisolone and acute spinal cord injury: an update of the randomized evidence [J]. Spine, 2001, 26(24 S): S47-S54.
8. Novikova LN, Novikov LN, Kellerth JO. Differential effects of neurotrophins on neuronal survival and axonal regeneration after spinal cord injury in adult rats [J]. J Comp Neurol, 2002, 452(3): 255-263.
9. Hidaka C, Khan SN, Farmer JC, et al. Gene therapy for spinal applications[J]. Orthop Clin North Am, 2002, 33(2): 439-446.

(收稿日期: 2005-03-16 修回日期: 2005-05-23)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

第八届骨科新进展、新技术学习班暨《中华骨科杂志》中青年优秀论文评选活动通知

由中华医学会杂志社、中华医学会骨科分会、《中华骨科杂志》编辑部主办,浙江省医学会、浙江大学医学院附属二院承办的第八届骨科新进展、新技术学习班将于 2005 年 8 月 11 至 15 日在美丽的西子湖畔杭州召开。届时将有十几位国内知名骨科专家、教授就关节、脊柱、创伤、肿瘤、运动医学和生物力学等专题展开演讲和教学。届时还将举办第七届《中华骨科杂志》编委会及 2000~2004 年《中华骨科杂志》中青年优秀论文评选活动。

本学习班为国家级继续医学教育项目,学习班结业后将授予国家级继续教育学分 8 分。欢迎报名,并携带疑难病例资料进行交流。报名截止日期:2005 年 7 月 31 日。会务及资料费:800 元,食宿统一安排,费用自理。

联系人:(1)杭州解放路 88 号 233 信箱,浙江大学医学院附属二院骨科陶惠民、陈维善,邮编:310009。电话:13805734458, (0571) 87783578、87783545。E-mail: huimintao@hotmail.com。(2)天津市解放南路 406 号天津医院内《中华骨科杂志》编辑部胡永成、马英。邮编:300211。电话:13920006965, (022) 28334734。E-mail: yongchenghu@yahoo.com.cn。