

基础研究

神经干细胞与原浆型星形胶质细胞联合移植对大鼠
损伤脊髓轴浆运输功能的修复作用

曾 琳, 李 民, 刘 媛, 龙在云, 李应玉, 伍亚民, 廖维宏

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所三室, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室 400042 重庆市)

【摘要】目的:观察神经干细胞(NSC)与原浆型星形胶质细胞(PAS)联合移植对大鼠损伤脊髓轴浆运输功能的修复作用。**方法:**40只Wistar大鼠,制成L1~L2左侧脊髓半切空洞损伤模型,随机分为损伤组(A组),损伤后移植PAS组(B组)、移植NSC组(C组)、NSC和PAS按2:1比例联合移植组(D组),每组10只。4周及8周后行损伤部位神经丝-200(NF-200)染色观察NSC在体内的分化情况,腓肠肌胆碱酯酶染色观察运动终板的反应和核黄逆行示踪观察轴浆运输的恢复情况。**结果:**(1)4周时D组和C组移植部位可见少量NF-200阳性标记的神经元,8周时数量明显增多,D组多于C组;4周及8周时A、B组均未见到明显阳性标记的神经元。(2)4周时,A、B组胆碱酯酶染色示运动终板均出现退变,终板染色变浅;8周时A组终板明显退变,出现大片染色空白区,甚至终板消失,只剩下模糊的轮廓;B组终板退变程度轻于A组,着色淡,轮廓欠清晰,周边呈浅棕红色淡染,但未出现大片染色空白区;C、D组4周时终板边缘发生皱缩,呈颗粒样改变,无明显染色缺失;8周时C组较4周时变化不明显,D组受损终板皱缩明显好转,颗粒样改变消失。(3)4周时,B、C、D组核黄染色的神经元散在位于脊髓的前、后、侧角,其中D组阳性标记的神经元的数量及荧光强度大于B、C组,C组又稍强于B;8周时B、C、D组阳性神经元数量均增多,神经元的数量及荧光强度仍是D组>C组>B组;A组4周及8周时均未见到明显阳性染色的神经元。**结论:**联合移植NSC和PAS(2:1)能更好地修复损伤脊髓的轴浆运输功能并能较好地防治其后肢肌肉运动终板的溃变。

【关键词】神经干细胞;原浆型星形胶质细胞;脊髓损伤;轴浆运输;运动终板

中图分类号:Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-04-0298-04

Repair effects of neural stem cell and protoplasmic astrocyte transplantation on recovery of axon-plasma transporting of injured spinal cord in adult rats/ZENG Lin, LI Min, LIU Yuan, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(4): 298~301

【Abstract】Objective:To observe the effects of neural stem cells(NSC) and protoplasmic astrocyte(PAS) on the repair of axon-plasma transporting of injured spinal cord in adult rats.**Method:**Forty Wistar rats were respectively divided into four groups:hemisection-cavity injured group (group A),PAS-transplant group(group B),NSC-transplant group(group C),NSC and PAS in the ratio of 2:1 transplant group(group D).NF-200 immunohistochemical staining was carried out at the 4th and 8th week after operation to observe the differentiation of NSC in vivo,at the same time AchE staining and NY tracing were carried out to observe the recovery of axon-plasma transporting and the protective effects of motor end-plate.**Result:**(1)With NF-200 staining,at 4 weeks there were a few neurons in the group D and C,at 8 weeks the number of neurons increased obviously in both two groups,but the number in the group D was more than that in group C.At 4 and 8 weeks there was not any positive neuron found in group A and B.(2)With AchE staining,at 4 weeks the morphology of motor end-plate degenerated in group A and B,at 8 weeks the morphology of motor end-plate degenerated markedly or even disappeared in group A,but the degenerative reaction in group B was mild compared with group A.At 4 weeks,particles and crimple of edge were observed on motor end-plate in group C and D. At 8 weeks,there was no remarkable change in group C compared with that at 4 weeks,the morphology of motor end-plate was nearly normal in group D.(3)With NY tracing,at 4 weeks neurons were interspered in

基金项目:本课题受国家自然科学基金(编号:30171068)和重庆市院士基金(合同号:7671)资助

第一作者简介:女(1970-),实验师,研究方向:脊髓损伤的修复治疗

电话:(023)68757430 E-mail:Lzeng118@163.com

通讯作者:伍亚民

anterior and posterior horns in group B,C,D.The positive neurons in group D was much more than that in group B and C,and group C was more than group B.At 8 weeks the number of positive neurons increased obviously among the three groups,and the change of the number and fluorescence intensity of positive neurons was $D>C>B$ in the three groups,in group A,there was no obviously positive neuron at 4 and 8 weeks.

Conclusion: NSC combined with PAS in the ratio of 2:1 transplant can resume the function of axon-plasma transporting and has protective effects on motor end-plate after spinal cord injury in adult rats.

[Key words] Neural stem cell; Protoplasmic astrocyte; Spinal cord injury; Axon-plasma transporting; Motor end-plate

[Author's address] State Key Laboratory of Trauma,Burn and Combined Wound,the 3rd Department of Research Institute of Surgery,the Affiliated Daping Hospital,the 3rd Military Medical University,Chongqing, 400042,China

离体实验已证实^[1],原浆型星形胶质细胞(protofasmic astrocyte,PAS)较纤维型星形胶质细胞(fibrous astrocyte,FAS)能更好地促进神经干细胞(neural stem cell,NSC)向神经元分化,且 NSC 与 PAS 以 2:1 共培养条件下,NSC 分化为神经元的比例最高。那么,在体条件下 PAS 对 NSC 分化的调控作用又如何呢?这种作用对损伤脊髓的功能修复有何影响?这些问题均有待深入研究。为此本实验采用脊髓半切空洞损伤模型,观察 NSC 与 PAS 以 2:1 的比例联合移植对大鼠脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)后轴浆运输功能的修复作用,从一个侧面来评估上述 PAS 对 NSC 分化的调控作用及意义。

1 材料与方法

1.1 动物分组

Wistar 成年大鼠 40 只(第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供),体重 220~250g,雌雄不拘,采用我科建立的大鼠脊髓半切空洞损伤模型^[2]建模成功后,随机将动物分为 4 组:A 组,脊髓 L1~L2 左侧半切空洞损伤组;B 组,在损伤后移植 PAS 组,细胞计数板计算调整细胞密度为 3×10^7 个/ml,然后用无菌加样枪将 10 μ l 细胞悬液(3×10^5 个细胞)沿脊髓空洞壁缓慢注入;C 组,在损伤后移植 NSC 组(3×10^5 个);D 组,在损伤后按 2:1 移植 2×10^5 个 NSC 和 1×10^5 个 PAS 细胞的联合移植组。每组 10 只大鼠,每组又分术后 4 周、8 周两个时相点观察,每时相点 5 只大鼠(其中 3 只用来做 NF-200 染色及胆碱酯酶染色,2 只用来观察核黄逆行示踪结果)。

1.2 手术方法

用 1%戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔注射麻醉。腰背部脱毛,动物俯卧固定在手术板上。常规消

毒,无菌条件下切开 T12~L3 处皮肤和肌肉,分离并切除 T12、T13、L1 椎板,暴露腰膨大,刀片横断并用玻璃针捣毁吸出腰膨大左半侧脊髓,形成一约 2 $\times$ 2 $\times$ 2mm 大小的空洞^[2]。细胞移植时用无菌加样枪将 10 μ l 细胞悬液沿脊髓空洞壁缓慢注入,用 9-0 线缝合硬脊膜,逐层缝合肌肉、皮肤并肌肉注射青霉素 1 万单位(3 次/日 $\times$ 3d),防止感染。必要时挤压膀胱帮助大鼠排尿(本组模型制作过程中有大鼠死亡,2 周时死亡 2 只,4 周时死亡 1 只,8 周时死亡 1 只,均进行了补充)。

1.3 标本制备及染色方法

1.3.1 NF-200 荧光组织化学染色 术后 4 周、8 周,经 0.01M PBS、4%多聚甲醛常规灌注固定,取损伤部位及上、下端共 3 个节段的脊髓,冰冻切片机(Leica CM1900)连续横切片,每切 5 片取 1 片(共取 5 片),片厚 10 μ m,将切片用 NF-200 免疫组化标记,激光共聚焦显微镜(Leica SP2)下观察移植细胞向神经元的分化情况。NF-200 阳性染色者为由移植 NSC 分化的神经元。

1.3.2 胆碱酯酶染色

1.3.2.1 标本制备 损伤后 4 周、8 周,常规灌注固定,取损伤侧小腿腓肠肌,放入 30%蔗糖溶液中过夜,待组织沉底后,进行冰冻切片,厚度约 30~40 μ m,贴片备用。

1.3.2.2 染色方法 分别取以下液体,组成混合液:0.06N(0.82%)乙酸钠 6.32ml;0.1N(0.6%)乙酸 0.20ml;0.1M (2.94%)柠檬酸钠 0.48ml;30mM (0.75%)硫酸铜 1ml;5mM (0.165%)铁氰化钾 1ml;H₂O 0.8ml。

将碘化乙酰胆碱 5mg 溶于上述混合液中,调节 pH 值至 5.5~5.6,将冰冻切片浸于上述液体中,37 $^{\circ}$ C,30~120min 即可。光镜下观察胆碱酯酶在运动终板中的着色及分布情况,染成棕红色的为运

动终板。

1.3.3 核黄逆行示踪 术后 4 周、8 周用 1%戊巴比妥钠(40mg/kg)进行麻醉,左腿部剪毛、消毒皮肤后,切开臀大肌,分离坐骨神经上段。将荧光示踪剂核黄(nuclear yellow, NY)(Sigma 公司,美国)用 0.01M PBS 稀释成 0.5%的浓度,用微量注射器将 6 μ l 上述稀释液缓慢(15min)注入坐骨神经干内,注射完毕后滞针约 10min,以防溶液外溢。原位缝合肌肉、皮下组织及皮肤切口,切口处涂以青霉素粉末防止感染。于术后 16~18h 用 1%戊巴比妥钠将动物麻醉后,用 1%多聚甲醛-0.125%戊二醛灌注动物并取出损伤节段上端 2~3 节脊髓组织,用 30%蔗糖溶液固定,待组织完全下沉后,冰冻切片连续切片,厚约 10 μ m,每切 5 片取 1 片(共取 5 片),迅速贴片,激光共聚焦显微镜下扫描成像。观察逆行示踪剂 NY 在脊髓中的分布情况。NY 自大鼠坐骨神经逆行运输至脊髓神经细胞核内,在波长为 405nm 激发光的作用下,呈黄色荧光。

2 结果

2.1 NF-200 染色结果

术后 4 周,D 组和 C 组在移植部位可见少量 NF-200 阳性标记的神经元,A 组和 B 组未见明显的阳性标记神经元。术后 8 周,D 组和 C 组移植部位 NF-200 阳性标记的神经元数量明显增多,D 组多于 C 组,A 组损伤部位未见阳性标记神经元,B 组移植部位胶质纤维明显增生,未见明显阳性标记神经元(图 1,后插页 II)。

2.2 胆碱酯酶染色结果

术后 4 周,A、B 组运动终板均出现退变,边缘出现空泡样淡染区,终板染色变浅;C、D 组部分终板边缘发生皱缩,呈颗粒样改变,无明显染色缺失。术后 8 周,A 组终板明显退变,出现大片染色空白区,甚至终板消失,只剩下模糊的轮廓。B 组终板退变程度轻于 A 组,着色淡,轮廓欠清晰,周边呈浅棕红色淡染,但未出现大片染色空白区。C 组较 4 周时变化不明显,仍有皱缩及边缘的颗粒样改变。D 组受损终板皱缩明显好转,颗粒样改变消失,运动终板形态结构完整(图 2,后插页 II)。

2.3 核黄逆行示踪结果

术后 4 周,A 组未见到明显的阳性染色的神

经元,B、C、D 组呈阳性染色的神经元散在位于脊髓的前、后、侧角,其中 D 组阳性标记的神经元的数量及荧光强度高于 B、C 组,C 组又稍强于 B 组。至术后 8 周 B、C、D 组阳性神经元数量与 4 周比均增多,其中 D 组增加更为明显,其分布均匀而稠密,大小不等的神经元均可被标记;B、C 组阳性标记神经元增加幅度相对于 D 组要低,荧光着色神经元个数仍较少,荧光强度低,两组比较仍是 C 组要强于 B 组,A 组未见到明显的阳性染色的神经元(图 3,后插页 III)。

3 讨论

在体条件下的 NSC 分化比离体条件复杂,参与调控的因素也更多。目前许多研究表明在成年动物的脊髓中虽然没有新的神经元生成,但成年动物脊髓中 NSC 的存在已被实验证实,而且成年动物脊髓 NSC 在体外或移植到神经元产生区也可分化成神经元,而在脊髓却主要分化成胶质细胞,这可能是局部微环境作用导致的结果^[3-5]。SCI 后,局部微环境发生明显改变,缺血缺氧、损伤后的组织坏死以及早期炎症反应,导致大量炎症因子的释放,如白细胞介素-1(IL-1),白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等都有神经毒性和促胶质细胞分化的特性。因此这样的微环境不利于移植的 NSC 向神经元分化^[6]。PAS 在离体条件下通过分泌多种细胞因子对 NSC 向神经元分化进行调控,本实验通过在体实验进一步验证了 PAS 对 NSC 分化的调控作用。经免疫组化染色证实以 2:1 联合 PAS 移植的 NSC 在损伤脊髓微环境中分化神经元数量明显多于单纯 NSC 体内移植。说明 PAS 在体条件下也能有效地促进 NSC 向神经元分化。其可能的机制包括:(1)体内成活的 PAS 通过不断分泌各种活性神经营养因子促进 NSC 存活,调控其向神经元分化;(2)细胞联合移植可以减轻宿主周围组织的继发性损害,改善损伤微环境;(3)细胞联合移植在体内条件下可以通过细胞间相互作用能够在一定程度上削弱微环境中不利因素的影响。

在神经细胞中轴浆运输是神经细胞的特性之一。神经元需要从胞体不断地将各种成分运输至轴突及其分支,也需要从其支配的靶组织摄取营养以维持其正常代谢,有效的轴浆运输必须依赖于完整的神经通路^[7]。本实验通过 NY 逆行示踪发

现,术后 4 周时损伤组未见到阳性着色的神经元,说明空洞损伤所导致的神经纤维通路的中断,也影响了在体脊髓神经元轴浆运输的功能;在术后 8 周联合移植治疗组 NY 着色阳性神经元的数量明显多于其他组。提示联合移植治疗组的轴浆运输功能恢复得更好,可能是由于移植的细胞部分地恢复了损伤脊髓头尾两断端处的纤维联系,从而部分修复了脊髓神经元的轴浆运输功能^[8],同时轴浆运输的增强也为中枢运输各种营养物质,对促进移植和分化的神经细胞的存活,加强其功能也可能具有积极的作用。运动终板正常结构与功能的维护有赖于中枢神经元的完整联系,并与轴浆运输所供应的各种营养因子、递质以及糖蛋白有密切的关系^[9]。从本实验观察到术后 4 周损伤组和单纯 PAS 组的运动终板出现退变,边缘出现空泡样淡染区,终板染色变浅,数量无明显减少;术后 8 周,损伤组终板明显退变,出现大片染色空白区,甚至终板消失,只剩下模糊的轮廓,而联合移植组受损终板染色逐渐恢复,皱缩明显好转,颗粒样改变消失。说明失去神经支配的骨骼肌可能重新受到了神经支配^[10]。

本实验结果表明,细胞联合损伤脊髓内移植后,NSC 能在 PAS 的调节作用下大量分化为神经元参与损伤脊髓的修复,对脊髓神经元轴浆运输功能的恢复有较明显的促进作用,从而减缓了脊髓损伤引起的运动终板的溃变,对运动终板起到一定的保护作用。

4 参考文献

1. 曾琳,李民,刘媛,等.原浆型和纤维型星型胶质细胞调控神经

干细胞定向分化的比较研究[J].创伤外科杂志,2007,9(2):160-162.

2. 刘媛,李庭梅,龙在云,等.神经干细胞移植对大鼠脊髓半切空洞损伤的修复作用[J].中国矫形外科杂志,2005,13(20):1573-1576.

3. Nakayama T, Momoki S.T, Inoue N, et al. Astrocyte-derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons[J]. Neurosci Res, 2003, 46(2):241-249.

4. Sun Y, Shi J, Lu PH. Neurotrophic factors and neural stem cells[J]. Prog Physiol Sci, 2002, 33(4):313-316.

5. Espinosa-Jeffrey A, Becker-Catania SG, Zhao PM, et al. Selective specification of CNS stem cells into oligodendroglial or neuronal cell lineage; cell culture and transplant studies[J]. J Neurosci Res, 2002, 69(6):810-825.

6. Benoit BO, Savarese T, Joly M, et al. Neurotrophin channeling of neural progenitor cell differentiation[J]. J Neurobiol, 2001, 46(4):265-280.

7. Suzuki Y, Kitaura M, Wu S, et al. Electrophysiological and horseradish peroxidase-tracing studies of nerve regeneration through alginate-filled gap in adult rat spinal cord[J]. Neurosci Lett, 2002, 318(3):121-124.

8. Dan HP, Liu S, Choudhri T, et al. Regeneration of primary sensory axons into the adult spinal cord via a peripheral nerve graft bridging the lumbar dorsal roots to the dorsal column[J]. J Neurosci Res, 2002, 68(3):293-304.

9. Tadjihata M, Satoh A, Yoshimura T, et al. Effects of myastheric immunoglobulin G on motor end plate porphology[J]. J Neurol, 2003, 250(1):75-82.

10. Santafe MM, Salon I, Garcia N, et al. Medulation of Ach release by presynaptic muscarinic auto receptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat [J]. Eur J Neurosci, 2003, 17(1):119-127.

(收稿日期:2007-07-16 修回日期:2008-03-03)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 彭向峰)

消息

第八届国家级《脊柱畸形》医学继续教育学习班通知

由南京鼓楼医院脊柱外科举办的第八届国家级“脊柱畸形”医学教育学习班将于 2008 年 6 月 12~16 日在南京举办。届时将邀请国内外著名脊柱外科专家作专题报告。学习班授课内容包括:(1)理论授课。脊柱畸形的临床评价和支具治疗原则;脊柱畸形矫形的美学与平衡理念;脊柱畸形微创矫形术;脊柱畸形全脊椎截骨和翻修手术策略;早期半椎体切除治疗先天性脊柱侧凸的适应证及疗效分析;强直性脊柱炎后凸畸形及外伤性迟发性后凸畸形的截骨矫形;各种新型脊柱内固定技术的生物力学研究和临床应用;特发性脊柱侧凸发病机理研究进展;(2)模型操作。学员有机会在脊柱侧凸模型上进行三维去旋转矫形器械操作。(3)手术观摩。学员将分组参观脊柱侧凸的后路和前路矫形手术。(4)病例讨论。学习班将提供大量复杂脊柱畸形的临床病例,学员可利用现代矫形理论进行讨论。

学习班结业合格授予继续教育 I 类学分。有关此继续教育的详细内容请访问南京鼓楼医院脊柱外科网站 www.soscoliosis.com 或 www.scoliosis-china.com。报名截止日期:2008 年 6 月 1 日;报到时间:2008 年 6 月 12 日 12:00~22:00。来信请寄:南京市中山路 321 号 南京鼓楼医院脊柱外科 张林林 收,邮编:210008。联系电话:(025)83105121。