

基础研究

不同剂量嗅鞘细胞蛛网膜下腔移植
修复脊髓损伤的实验研究李 军¹, 魏开斌¹, 刘 红², 刘雨亮¹, 王永红¹, 张文正¹, 卓 锋¹, 王 强¹

(1 泰安市中心医院骨一科; 2 护理部 271000 泰安市)

【摘要】目的:探讨嗅鞘细胞蛛网膜下腔移植治疗脊髓损伤的可行性、安全性及细胞移植数量与疗效的关系。**方法:**应用改良 Allen's 法制备大鼠 T10 脊髓损伤模型, 随机分四组: 大剂量嗅鞘细胞蛛网膜下腔移植组(A 组, 2×10^6 个)、中剂量嗅鞘细胞蛛网膜下腔移植组(B 组, 2×10^5 个)、小剂量嗅鞘细胞蛛网膜下腔移植组(C 组, 2×10^4 个)、DMEM/F12 培养液蛛网膜下腔移植组(D 组)。术后即刻进行细胞移植, 术后第 4、10 周行 CBS 功能评分及组织学检查, 观察脊髓神经功能修复情况及损伤区神经纤维数量。**结果:**CBS 功能评分示 A、B 组明显好于 C、D 两组($P < 0.05$); A、B 两组间比较无差异, C、D 两组间比较无差异($P > 0.05$)。组织学观察发现 A、B 组神经纤维数量多于 C、D 组。**结论:**急性期嗅鞘细胞经蛛网膜下腔移植治疗脊髓损伤安全有效, 急性期移植细胞数量较大则脊髓神经功能恢复较好。

【关键词】嗅鞘细胞; 脊髓损伤; 蛛网膜下腔移植; 移植剂量

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.11.11

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2011)-11-929-05

Different doses of olfactory ensheathing cells transplantation in subarachnoid for repairment of spinal cord injury, an experimental study/LI Jun, WEI Kaibin, LIU Hong, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2011, 21(11): 929-933

【Abstract】Objective: To investigate the feasibility, safety and dose-effect relationship of olfactory ensheathing cell transplantation for spinal cord injury. **Method:** Rats with T10 spinal cord injury induced by modified Allen method were randomly divided into four groups and received immediate cell transplantation as followings: high-dose olfactory ensheathing cells (OECs) transplantation in subarachnoid (group A), medium-dose transplantation (group B), low-dose transplantation (group C), control group with DMEM/F12 transplantation (group D). The neurofunctional recovery was noted by combined behavioral scores (CBS); the axons regeneration and the survival of olfactory ensheathing cells at the different time-point recorded either. **Results:** The neurofunction of group A and B improved significantly compared with group C or D according to combined behavioral scores (CBS), whereas no difference was noted between group A and B, as well as same as between group C and D. It was found by histological observation that the number of nerve fibers of group A and group B was more than group C and D. **Conclusion:** The OEC transplantation in subarachnoid for acute spinal cord injury is reliable, and high dose shows good prognosis.

【Key words】 Olfactory ensheathing cells; Spinal cord injury; Subarachnoid transplantation; Dose

【Author's address】 Department of Orthopedics, The Central Hospital of Taian, Shandong, 271000, China.

近年来, 嗅鞘细胞 (olfactory ensheathing cells, OECs) 移植治疗脊髓损伤 (SCI) 的基础及临床研究较多^[1-5], 为脊髓损伤患者带来了一线希

望。但是由于目前髓内局部移植方式存在操作复杂、需要暴露脊髓易造成脊髓二次损伤、感染、且重复移植困难等缺点, 限制了该技术的临床应用。笔者拟探讨不同移植数量 OECs 通过蛛网膜下腔移植治疗 SCI 的可行性及安全性, 报道如下。

第一作者简介: 男 (1978-), 主治医师, 硕士, 研究方向: 脊髓损伤与修复

电话: (0538) 6298559 E-mail: lijun201107@163.com

通讯作者: 魏开斌 E-mail: wkb1966@163.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年 Wistar 大鼠, 64 只, 清洁级, 雌雄各半, 体重 200~250g, 购自山东鲁抗医药公司实验动物中心。

1.2 OECs 培养和标记

取体重 200~250g 的 Wistar 大鼠的嗅球, 应用改良 Nash 差速贴壁和环孢霉素 A (Ara-C) 结合法进行 OECs 的纯化培养鉴定^[6]。10% 水合氯醛 (0.3ml/100g) 行腹腔注射麻醉, 碘伏消毒皮肤, 暴露两侧嗅球并完整取出, 置于含青、链霉素 (青霉素、链霉素各 100 IU/L) 冰的 DMEM/F12 培养液中, 显微镜下去除嗅球表面的软脑膜及血管膜, 眼科剪将嗅球剪碎, 0.125% 胰酶在 37℃、5% CO₂ 孵育箱中消化 20min, 胎牛血清终止消化。200 目筛网过滤, 800r/min, 离心 5min, 弃上清后用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液重新混悬成单细胞悬液, 以 1×10^6 个/ml 密度接种于六孔培养板内, 置培养箱内培养。24h 后将细胞悬液吸出, 重新种植于经多聚右旋赖氨酸包被六孔培养板内, 2d 后半量换液一次, 第 5 天在培养板内加入浓度为 5μmol/L 的 Ara-C, 作用 24h, 后全量更换培养液, 以后每隔 2d 半量换液一次, 每日在倒置显微镜下观察细胞的形态及生长情况, 间断摄片。取纯化培养 10~14d 的 OECs, 行 NGFR P75 (1:100, Boster Bio.co.) 免疫组化染色鉴定并计算纯度。移植前, 首先用终浓度为 10μg/ml 的双苯亚甲胺 (Hoechst 33342, Sigma) 进行 OECs 细胞核染色标记 (图 5a), 37℃ 孵育 20min, 然后用无血清的 DMEM/F12 培养液洗 2 次, 最后消化收集计数, 移植细胞数分别为 2×10^4 个、 2×10^5 个、 2×10^6 个^[1,7]。

1.3 动物模型制备

用改良的 Allen's 法^[8]制备大鼠 T10 脊髓急性挫伤动物模型。用 10% 水合氯醛 (0.3ml/100g) 腹腔注射麻醉, 术区常规备皮消毒, 以 T10 棘突为中心取 2cm 的纵行切口, 逐层切开皮肤、筋膜、钝性分离两侧椎旁肌, 暴露 T9~T11 棘突椎板, 咬除 T10 棘突椎板暴露 3×4mm 硬脊膜打击区, 用血管钳将 T9 和 T11 棘突向两侧牵拉以固定脊髓, 在硬脊膜打击区表面垫一曲度与脊髓表面一致的塑料垫片, 用直径 2.0mm、重 10g 的圆柱状金属棒在细玻璃管的引导下从 5cm 高处垂直落下, 打击动能为 (10g×5cm), 制备成 T10 脊髓急性挫伤模型, 以大鼠出现尾巴摆动和后肢痉挛为打击成功标

志, 冲洗创口, 逐层缝合肌肉、皮肤。

1.4 动物分组及细胞移植

动物模型制备后, 随机分 4 组, 每组 16 只, 术后即刻进行细胞移植, 具体如下:

动物模型制备后, 以 L5 棘突为中心, 取 1cm 纵形切口依次切开皮肤、筋膜, 分离两侧椎旁肌, 暴露 L3 棘突椎板, 咬除 L3 棘突椎板显露 L3/4 硬脊膜, 用微量注射器轻轻刺入硬脊膜内, 调整针头使之尽量与椎管平行, 向头端缓慢进针少许, 回抽见脑脊液后, 注入 20μl OECs 悬液, A 组为大剂量蛛网膜下腔移植组: 注入细胞数量为 2×10^6 个。严密缝合肌肉、皮肤。B 组为中剂量蛛网膜下腔移植组: 移植方法同 A 组, 注入细胞数量为 2×10^5 个。C 组为小剂量蛛网膜下腔移植组: 移植方法同 A 组, 注入细胞数量为 2×10^4 个。D 组为 DMEM/F12 培养液蛛网膜下腔移植组: 移植方法同 A 组, 将 20μl DMEM/F12 培养液注入蛛网膜下腔。

1.5 术后管理

各组大鼠分笼饲养, 按时更换垫料, 饲养室的温度控制在 25℃ 左右, 相对湿度 50% 左右, 房间定期消毒。术后肌肉注射青霉素, 20 万 U/d, 连续 3d。及时翻身, 以防出现压疮; 人工挤压膀胱帮助排尿, 2 次/d, 至自主排尿。开塞露帮助排便。

1.6 观察指标

应用改良 CBS 评分法^[9]分别在术后第 1 天、1 周、2 周、3 周、4 周、8 周、10 周进行评分 (包括开放空间中后肢运动、伸趾、立足反应、回缩反射、端正体位反射、斜板试验与热板实验等七个方面) 对每组大鼠随机取 10 只分别进行肢体运动功能评分, 评估脊髓功能恢复情况。100 分表示下肢功能完全丧失, 0 分表示正常。

移植后第 4、10 周每组随机取 2 只大鼠进行取材、切片, 步骤: 4% 多聚甲醛心脏灌注固定, 以损伤部位为中心切取长 20mm 的脊髓段行快速冰冻, 部分冰冻组织行 6μm 厚纵行切片, 荧光显微镜下观察 OECs 在 SCI 区域的存活、分布情况。剩余组织经 4% 多聚甲醛固定后常规脱水、石蜡包埋、6μm 厚纵行切片, 采用 HE 染色、嗜银染色, 对 SCI 区域神经纤维再生情况进行组织学观察, 比较各组再生轴突数量、形态以及跨越损伤部位的情况, 并行 NGFR P75 免疫组化染色检测 OECs 在 SCI 区域的存活、分布等情况。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (两两比较采用 LSD 法)。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织学观察

培养的 OECs 经 NGFR P75 染色, 阳性细胞呈棕黄色 (图 1a、b), 培养 10d 的 OECs 纯度达 70% 以上。SCI 术后 4 周 HE 染色显示 A、B 组脊髓损伤区结构紊乱, 细胞走行方向不一致 (图 2a、b), 但空洞不明显; C、D 组大鼠脊髓损伤段常有明显空洞存在 (图 2c、d)。嗜银染色见 SCI 部位 A、B 组神经纤维数量多于 C、D 组 (图 3a~d)。

术后 4 周 NGFR P75 免疫组化染色 B 组 SCI 局部可见阳性植入细胞 (图 4); A、B 及 C 组可见荧光标记的 OECs (图 5a~d), 分布于整个损伤区域, 细胞数量 A、B 组多于 C 组。术后 10 周各组均未见有荧光标记的 OECs, NGFR P75 免疫组化染色亦未见阳性细胞存在于损伤区。

2.2 术后各时段神经功能改变

术后各时段的 CBS 评分结果显示: 术后 1d、1

周时各组间无差异 ($P > 0.05$); 术后 2 周开始各时间点 A、B 组评分显著低于 C、D 组 ($P < 0.05$), 但 A 组与 B 组间无差异 ($P > 0.05$); C 组于第 4 周开始 CBS 评分低于 D 组 ($P < 0.05$, 表 1)。

3 讨论

目前, 基础研究及临床实验已证实^[10-12]: OECs 髓内局部移植治疗 SCI 有较好的疗效, 但该移植方式需要暴露脊髓, 手术创伤大, 容易造成脊髓的再次损伤, 易导致感染等并发症, 患者花费较高, 不易重复移植治疗等诸多缺点。本实验应用 OECs 蛛网膜下腔移植治疗 SCI 则简化了手术操作, A 组和 B 组与 D 相比, 其行为学评估均明显改善, 组织学改变相似, OECs 蛛网膜下腔移植有效, 亦可达到修复 SCI 的目的。腰穿操作简单, 创伤小, 花费低, 易于重复移植治疗, 患者容易接受, 为临床治疗 SCI 提供了一种移植方式。

本研究发现移植 OECs 的数量与疗效有一定的关系: OECs 移植数量需达到 2×10^5 个, 治疗脊髓损伤才能取得较好的疗效, A 组细胞数量为 B 组的十倍, 其疗效差别与之却无统计学意义。目前临床移植应用的 OECs 来源少, 扩增数量有限, 因

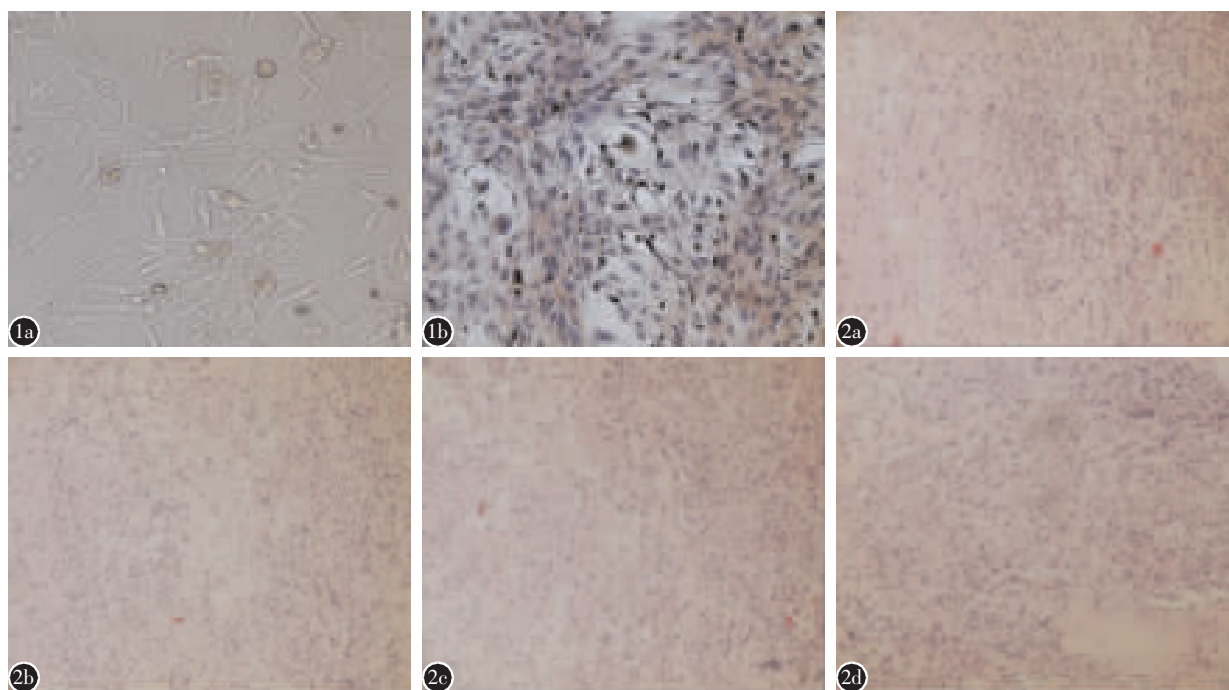


图 1 a 为培养 10d 的 OECs $\times 200$, 细胞多呈双极、三极形态 b 为 NGFR P75 鉴定及苏木精复染 $\times 100$, OECs 呈棕黄染色, 苏木精复染核呈蓝色 图 2 为移植术后 4 周损伤区灰质纵行切片 HE ($\times 40$) a、b 为 A、B 组可见损伤区结构紊乱, 细胞走行方向不一致 c、d 为 C、D 组可见损伤区有较多空洞存在

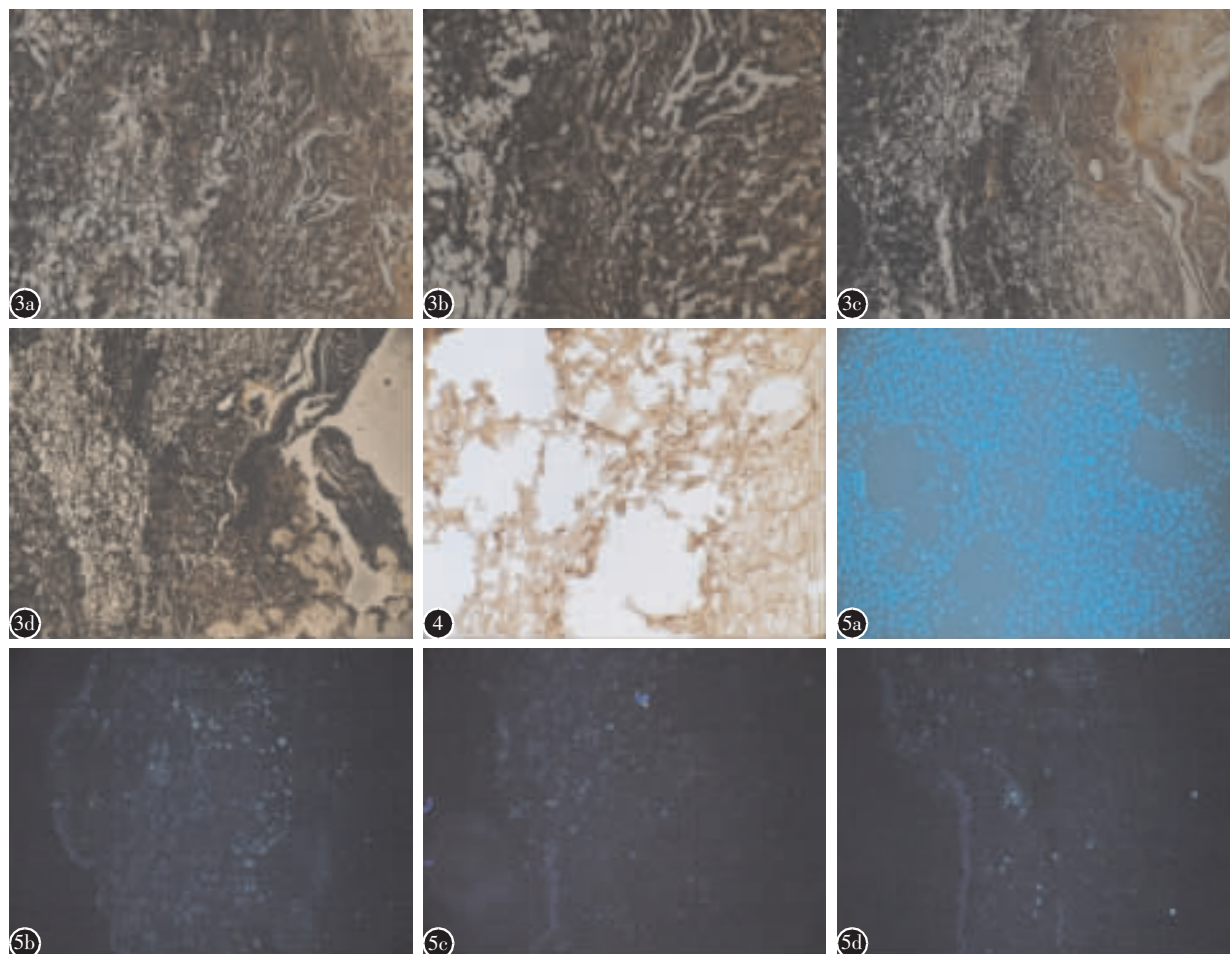


图 3 为移植术后 10 周损伤区白质纵行切片嗜银染色 $\times 100$ a、b 为 A、B 组神经纤维数量较多 c、d 为 C、D 组神经纤维数量较少 图 4 为中剂量移植组 4 周损伤区白质阳性染色(P75 $\times 100$) 图 5 a 为移植前 Hoechst 标记的 OECs b、c、d 分别为 A、B、C 组细胞移植术后 4 周损伤区纵切面,可见标记的 OECs

表 1 各组大鼠术后 CBS 评分分析结果

($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	1d	1周	2周	3周	4周	8周	10周
A组	85.80 $\pm$ 1.23	78.00 $\pm$ 3.21	63.12 $\pm$ 3.47 ^{①②}	34.31 $\pm$ 5.35 ^{①②}	20.12 $\pm$ 5.13 ^{①②}	14.44 $\pm$ 6.31 ^{①②}	13.03 $\pm$ 4.94 ^{①②}
B组	86.30 $\pm$ 1.16	79.47 $\pm$ 3.28	64.54 $\pm$ 3.34 ^{①②}	35.67 $\pm$ 3.98 ^{①②}	20.57 $\pm$ 4.26 ^{①②}	14.94 $\pm$ 5.56 ^{①②}	14.77 $\pm$ 6.31 ^{①②}
C组	86.50 $\pm$ 1.08	80.34 $\pm$ 4.39	73.27 $\pm$ 2.42	48.17 $\pm$ 4.64	34.86 $\pm$ 3.42 ^①	31.68 $\pm$ 6.57 ^①	31.06 $\pm$ 5.31 ^①
D组	86.30 $\pm$ 0.95	80.96 $\pm$ 2.74	72.57 $\pm$ 3.49	51.83 $\pm$ 4.46	40.07 $\pm$ 6.07	37.93 $\pm$ 7.32	36.94 $\pm$ 6.85

注:①与 D 组比较 $P < 0.05$; ②与 C 组比较 $P < 0.05$;

此嗅鞘细胞蛛网膜下腔移植的细胞数量控制在合适范围为宜。

NGFR P75 免疫组化染色及荧光显微镜检查均证实 SCI 区域有 OECs 的存在,说明急性期 OECs 蛛网膜下腔移植后可进入 SCI 部位而发挥其修复受损脊髓功能的作用,其迁移到损伤部位或发挥脊髓损伤修复作用的可能机制:(1)移植入蛛网膜下腔的 OECs 随脑脊液循环或局部漂移扩散迁移到 SCI 部位,由于急性期血脑屏障遭到破

坏,OECs 可向损伤区脊髓实质内迁移。(2)损伤后全身及局部细胞趋化因子分泌增加,对移植的 OECs 有趋化迁移作用,使 OECs 向损伤区及其邻近组织迁移。(3)软脊膜和脊髓受损后发生的原发性和一系列继发性免疫炎症^[13]反应,导致损伤局部的通透性大大增加,其分泌 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子,与 OECs 表达的粘附分子等相互作用,可使 OECs 通过软脑膜屏障而直接到达损伤部位。(4)神经胶质细胞的归巢作用,促使 OECs 发生特

异性迁移。(5)部分未迁移到损伤部位的 OECs 可分泌多种神经营养因子和神经生长因子如 BDNF、NT-3、NT-4、GDNF 等^[14]经脑脊液循环到达 SCI 部位,促进神经轴突的再生,同时改变局部微环境,减轻脊髓的继发性损伤,发挥修复作用。迁移到损伤部位 OECs 能诱导周围的星形胶质细胞和小胶质细胞分泌大量胶质源性神经生长因子并抑制其反应性增生,抑制胶质瘢痕的形成^[15];并在局部形成支架桥梁—神经胶质桥,包绕轴突使轴突再髓鞘化,可帮助再生神经轴突穿越胶质瘢痕,到达相应的靶点,恢复损伤的神经功能^[16,17]。

行为学观察自移植 2 周以后脊髓神经功能开始恢复,故早期治疗效果较好。OECs 移植后的存活时间研究^[18,19]不一致,本实验 4 周后取材,SCI 局部可见荧光标记的 OECs,NGFR P75 免疫组化呈棕黄染色,证实移植的 OECs 仍存活,NGFR P75 免疫组化染色与 Hoechst 染色未观察到共染,至于软脊膜上是否有移植细胞附着,本实验未涉及,有待进一步实验去证实。

综上,OECs 蛛网膜下腔移植治疗 SCI 有较好的疗效;其疗效与移植细胞数量呈正相关,移植细胞数量以达到 2×10^5 个为宜,此移植方式简便易行,但急性期进行 OECs 移植治疗 SCI 应用于临床患者尚需慎重对待。

4 参考文献

- 叶超群,孙天胜,高尔镜,等.不同方法共移植的嗅鞘细胞和雪旺氏细胞在损伤脊髓内的迁移和对轴突再生的影响[J].中国脊柱脊髓杂志,2010,20(2):138-145.
- Radtke C,Sasaki M, Lankford KL. Potential of olfactory ensheathing cells for cell-based therapy in spinal cord injury[J]. J Rehabil Res Dev,2008,45(1):141-151.
- Bretzner F,Liu J,Currie E.Undesired effects of a combinatorial treatment for spinal cord injury transplantation of olfactory ensheathing cells and BDNF infusion to the red nucleus[J]. Eur J Neurosci,2008,28(9):1795-1807.
- Su Z,Cao L,Zhu Y. Nogo enhances the adhesion of olfactory ensheathing cells and inhibits their migration [J].J Cell Sci, 2007,120(11):1877-1887.
- 钟环,蔡小娴,陈继铭.NTFs 基因修饰的人胚 OECs 植入促进大鼠 SCI 神经再生及功能恢复的研究[J].中国医疗前沿,2009,4(6):13-14.
- 魏开斌,刘爱华,孙卫山,等.成年大鼠嗅球成鞘细胞的原代培养及形态学研究[J].中国矫形外科杂志,2004,12(20):1561-1564.
- 陈东,杨晓华,边立功.骨髓间充质干细胞不同移植方法治疗脊髓损伤的实验研究[J].神经解剖学杂志,2007,23(6):635-638.
- Kaptanoglu E,Tuncel M,Palaoglu S,et al. Comparison of the effects of melatonin and methylprednisolone in experimental spinal cord injury[J].J Neurosurg,2000,93(1 Suppl):S77-S84.
- Masahito H,Masakazu T,Kazuhiko W,et al.Protein kinase inhibition by fasudil hydrochloride promotes neurological recovery after spinal cord injury in rats[J].J Neurosurg (Spine 1), 2000,9(3):94-101.
- 胡志俊,马迎辉.嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤的研究进展[J].中国骨伤杂志,2009,22(1):69-70.
- Zheng ZC,Wei KB,Liu F,et al.Clinical verification of olfactory ensheathing cell transplantation in treatment of spinal cord injury[J].Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research,2010,14(27):5119-5122.
- 袁梦郎,吕金海,杨拯,等.基因修饰嗅鞘细胞治疗脊髓损伤研究:可能成为首要的选择[J].中国组织工程研究与临床康复, 2010,14(44):8308-8309.
- Niu S,Fei M,Cheng C, et al. Altered beta-1,4-galactosyltransferase I expression during early inflammation after spinal cord contusion injury [J].J Chem Neuroanat,2008,35(3):245-256.
- Pastrana E,Moreno-Flores MT,Avila J,et al. BDNF production by olfactory ensheathing cells contributes to axonal regeneration of cultured adult CNS neurons [J].Neurochem Int, 2007,50(3):491-498.
- Tsuchida H,Hashimoto J,Crawford E,et al. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats[J].J Orthop Res,2003,21(1):44-53.
- Dombrowski MA,Sasaki M,Lankford KL, et al. Myelination and nodal formation of regenerated peripheral nerve fibers following transplantation of acutely prepared olfactory ensheathing cells[J].Brain Res,2006,1125(1):1.
- Toft A,Scott DT,Bamett SC,et al.Electrophysiological evidence that olfactory cell transplants improve function after spinal cord injury[J].Brain,2007,130(4):970-984.
- Ramon-Cueto A,Cordero MI, Santos-Benito FF. Functional rerecovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia [J].Neuron, 2000,25(2):425-435.
- 陈莉发,段朝霞,张洁元,等.嗅鞘细胞移植到损伤脊髓存活时间的研究[J].成都医学院学报,2010,5(3):190-192.
- 魏开斌,刘爱华,杨宪勇,等.嗅球组织块和细胞悬液移植对脊髓损伤的修复[J].中华实外科杂志,2005,3(22):359-360.

(收稿日期:2011-06-19 修回日期:2011-08-18)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 刘彦)