

基础研究

辛伐他汀动员干细胞归巢对大鼠脊髓损伤的修复作用及其机制

韩晓光¹, 杨 宁¹, 崔岳毅¹, 党耕町¹, 徐迎胜², 宋纯理¹

(1 北京大学第三医院骨科; 2 神经内科 100191 北京市)

【摘要】目的:观察辛伐他汀动员骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)归巢至脊髓损伤部位对损伤脊髓的修复作用,并探讨其相关机制。**方法:**成年雌性 SD 大鼠 30 只,经尾静脉注射移植大鼠转绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)基因的 BMSCs, 24h 后随机分为 3 组:假手术组,仅切除椎板,不损伤脊髓;对照组,脊髓损伤后经蛛网膜下腔注射载体;实验组,脊髓损伤后经蛛网膜下腔注射辛伐他汀。每组 10 只。对照组和实验组采用改良 Allen 法(40g·cm)制作 T9~T10 节段脊髓损伤模型,从 L4 水平蛛网膜下腔注射辛伐他汀(5mg/kg)或载体。术前及术后 1d、3d、7d、14d、21d、28d 时盲法进行 BBB 评分和斜板试验;术后 28d 处死大鼠,取相应节段脊髓组织行形态计量学观察脊髓空腔体积大小;应用神经元核抗原(NeuN)/神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)与 GFP 免疫荧光双染法观察移植 GFP-BMSCs 的迁移及细胞分化情况;Western blot 检测血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)表达水平的变化。**结果:**术后各时间点假手术组动物 BBB 评分及斜板试验角度无明显变化,实验组及对照组 BBB 评分及斜板试验角度明显降低,术后 7d、14d、21d、28d 时实验组 BBB 评分高于对照组($P < 0.05$);术后 14d、21d、28d 时实验组大鼠的斜板试验角度高于对照组($P < 0.05$)。术后 28d 时假手术组脊髓内未见空腔,实验组和对照脊髓损伤部位均可见空洞形成,实验组空腔体积($0.29 \pm 0.08 \text{mm}^3$)小于对照组($0.57 \pm 0.10 \text{mm}^3$)($P < 0.05$);荧光显微镜下观察实验组在脊髓损伤周边可见大量表达绿色荧光的细胞,而对照组和假手术组很少。免疫荧光染色实验组 NeuN(+)/GFAP(+), GFP(+)/GFAP(+) 细胞明显多于对照组和假手术组($P < 0.05$)。Western blot 显示治疗组大鼠损伤处脊髓 BDNF 和 VEGF 表达高于对照组和假手术组($P < 0.05$)。**结论:**辛伐他汀可动员 BMSCs 归巢至脊髓损伤部位并参与损伤修复,其作用可能与其促进 BDNF 及 VEGF 高表达有关。

【关键词】脊髓损伤;辛伐他汀;骨髓间充质干细胞;归巢;大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2012.11.14

中图分类号:R683.2, R97 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2012)-11-1028-08

Study on the therapeutic effect of simvastatin by mobilizing the bone marrow-derived stem cells to the injury site in spinal cord injury rat/HAN Xiaoguang, YANG Ning, CUI Yueyi, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2012, 22(11): 1028-1035

【Abstract】Objectives: To study the effect of simvastatin-mediated mobilization of bone marrow-derived stem cells(BMSCs) on the injured spinal cord and the underlying mechanism. **Methods:** The transgenic rat GFP-BMSCs were transplanted into rat through the caudal vein. 24 hours after transplantation, animals were randomly divided into 3 groups: sham group(laminectomy only), vehicle treated group(SCI+vehicle) and simvastatin treated group(SCI+simvastatin). Spinal cord injury was introduced by modified Allen's method (10g·4cm) at T10 level. Simvastatin or vehicle was injected into the subarachnoid space after injury. Hind limb locomotor recovery(BBB scores and inclined plane test) was used for assessment. At 28 days after injury, animals were killed and HE was performed to evaluate the area of spinal cavity. Immunohistochemistry for GFP and cell lineage marker NeuN and GFAP was performed to evaluate simvastatin-mediated mobilization of bone

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171693, 81100895),教育部新世纪优秀人才支持计划(编号:NCET-10-0202)

第一作者简介:男(1984-),博士研究生,研究方向:脊柱外科(现在北京积水潭医院)

电话:(010)58516205 E-mail: hanxiaoguang@bjmu.edu.cn

通讯作者:宋纯理 E-mail: schl@bjmu.edu.cn; 徐迎胜 E-mail: xys@bjmu.edu.cn

marrow-derived cells into injured spinal cord. Western blot was performed to detect the expression of BDNF and VEGF. **Results:** The BBB scores and inclined-plated angles of the sham group did not significantly change during the research. While those in simvastatin treated rats showed significant recovery of hind limb function compared to control rats. HE revealed that simvastatin decreased the cavity of injured spinal cord. Immunohistochemistry revealed that simvastatin increased the number of GFP-positive cells in injured spinal cord, indicating that bone marrow-derived cells were mobilized and migrated into injured spinal cord. The numbers of double positive cells for GFP and NeuN marker or GFAP were more in the simvastatin treated rats than in the control rats, indicating that these GFP-BMSCs differentiated into the neuro or glial cells. The expression levels of BDNF and VEGF were higher in the simvastatin treated group. **Conclusions:** Simvastatin can mobilize the BMSCs home to the injured spinal cord, which can decrease the spinal cavity, increase the expression of BDNF and VEGF, and improve the functional recovery of spinal cord injury.

[Key words] Spinal cord injury; Simvastatin; Bone marrow-derived stem cells; Homing; Rat

[Author's address] Department of Orthopedics, Peking University Third Hospital, Beijing, 100191, China

对脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)目前临床尚缺乏有效的治疗方法。近年来,干细胞治疗脊髓损伤逐渐成为研究的热点,但外源性干细胞由于来源有限,免疫反应及伦理道德等问题限制了其进一步发展。成年动物及人体内存在大量丰富的内源性干细胞,为脊髓损伤的治疗提供了新的治疗靶点。如何动员、募集这些内源性干细胞至损伤部位是治疗的关键。他汀类药物作为降胆固醇药物已在临床广泛使用,最新研究证实他汀类药物还具有抗炎、抗氧化和神经保护等作用,我们在前期研究中发现在大鼠脊髓损伤后 24h 应用辛伐他汀可以显著促进脊髓损伤后神经功能恢复,但作用机理尚不明确^[1,2]。文献报道他汀类药物与干细胞具有协同作用^[3,4],可以促进骨髓间充质干细胞(BMSCs)迁移至损伤部位,参与损伤修复^[5]。我们在以往的研究中也发现辛伐他汀可以动员、募集干细胞归巢促进骨缺损的修复^[6]。本研究经大鼠蛛网膜下腔注射辛伐他汀观察其是否可以通过动员 BMSCs 的迁移、归巢,进而促进脊髓损伤的修复,并对其作用机理进行探讨。

1 材料和方法

1.1 实验材料与设备

成年健康雌性 SD 大鼠,体重 250~300g,购自北京大学医学部实验动物部。大鼠转绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)基因的 BMSCs(GFP-BMSCs)(购自广州赛业有限公司,已鉴定为 BMSCs,且稳定表达绿色荧光),辛伐他汀标准品(中国药品生物制品鉴定所),二甲基亚砜(Dimethyl Sulphoxide, DMSO, Sigma 公司,美国),L-DMEM 培养液(GIBCO 公司,美国);神经

元核抗原(neuronal nuclei, NeuN)抗体、神经胶质酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体及脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)抗体均购自 Abcam 公司;重物坠落脊髓损伤打击器(江苏瑞华器械厂),倒置荧光显微镜(Leica, 德国),红外荧光扫描仪(Bio-Rad, 美国)。

1.2 GFP-BMSCs 的培养传代及移植

将 GFP-BMSCs 制成细胞悬液,接种于培养瓶,置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中,培养液为 L-DMEM(含 10% FBS, 100U/ml 青霉素, 100mg/ml 链霉素),每 3~4d 更换培养液 1 次,当细胞融合达 80%~90%时按 1:3 比例传代,至第 3 代时用磷酸缓冲液(PBS)洗涤 3 次,0.25%胰蛋白酶消化细胞,以离心半径 10cm、1000r/min 离心 5min, PBS 重新悬浮细胞,调至细胞浓度为 1×10⁶/ml,经大鼠尾静脉缓慢注射细胞悬液 1ml。

1.3 动物分组及动物模型制作

细胞移植 24h 后将大鼠随机分为假手术组(A 组)、对照组(B 组)和辛伐他汀治疗组(C 组)和,每组 10 只。用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,俯卧位固定,常规备皮,消毒,铺巾。以 T10 棘突为中心作后正中切口,长约 2.0cm,充分暴露 T9-T10 棘突和椎板。A 组仅行椎板切除,不损伤脊髓;B、C 组采用改良 Allen 法制作脊髓损伤模型:直径为 2.5mm 垫板放于暴露脊髓处,以质量为 10g 的砝码从 4.0cm 高处自由落下,撞击硬膜囊,迅速移去砝码。认真止血后逐层关闭创口。随后 B、C 组在 L4 水平行椎板部分切除, C 组用微量注射器进行蛛网膜下腔缓慢注射辛伐他汀(溶

于含 2% DMSO、0.1% BSA 的 PBS 溶液, 终浓度为 $0.5\text{mg}/\mu\text{l}$, 剂量为 $5\text{mg}/\text{kg}$), B 组注射等体积单纯载体, 注射后留针 2~3min。待动物清醒后, 进行行为学检查, 选取 BBB(Basso-Beattie-Bresnahan) 评分 ≤ 1 分的大鼠纳入正式试验, 剔除造模失败大鼠, 随后的实验过程中无动物死亡。

1.4 行为学评分

根据文献报道及我们前期的方法, 分别于术前、术后 1d、3d、7d、14d、21d、28d 对大鼠进行 BBB 评分^[7]: 将动物置于宽阔活动场地自由活动 5min, 观察其后肢运动情况, 左右两侧肢体分别评分, 取平均值为每只大鼠的功能得分。在相同时间点, 进行斜板试验: 将大鼠置于一长方形木制斜板上, 大鼠身体纵线与斜板纵轴垂直放置, 逐渐升高斜板高度, 致大鼠在斜板上停留 5s 的最大角度为功能值, 每只动物测 5 次, 取其平均值为最终测定角度。由 2 位不参与动物分组与治疗但熟悉评分标准的观察者同时独立进行评分, 取平均值。

1.5 病理学观察

术后 28d, 每组取 6 只大鼠用过戊巴比妥钠腹腔注射深度麻醉, 经左心室灌注冰生理盐水至流出液澄清, 再用 4% 的多聚甲醛约 200ml 灌注固定后, 取损伤段(A 组取相应节段) 1cm 左右脊髓组织, 4% 多聚甲醛溶液固定 6~8h, 30% 蔗糖溶液脱水, 随后进行包埋。沿脊髓纵行切片, 厚度 $8\mu\text{m}$, 每 $50\mu\text{m}$ 取 1 张切片进行 HE 染色, 计算每张切片空腔面积乘以间隔厚度($50\mu\text{m}$)之和, 估算脊髓空腔体积, 求平均值。

1.6 免疫荧光检测

从病理学检查剩余切片中随机取损伤附近切片, 用 PBS 溶液洗涤, 加入 0.1% Triton-100 处理 15min, 5% 山羊血清封闭 1h, 一抗 4°C 过夜, 一抗分别为 NeuN(Abcam, 1:200) 和 GFAP(Abcam, 1:250), 用 PBS 充分洗涤, 加入山羊抗小鼠荧光二抗, 室温避光放置 1h, PBS 充分洗涤, 再用 DAPI 复染细胞核, 室温孵育 5min, 甘油封片后, 用荧光倒置显微镜观察摄像。阴性对照用 PBS 代替一抗来排除非特异染色。图像经 Image-Pro Plus 图像分析软件计算荧光细胞的分布及分化情况。每只动物随机取 6 张切片在相同条件下染色、摄像, 分别计算损伤中心 2mm^3 区域的 GFP 阳性细胞数, GFP/NeuN 阳性细胞数以及 GFP/GFAP 阳性细胞数, 并进行统计学分析。

1.7 Western blot 检测

术后 28d 时, 每组取 4 只大鼠过量麻醉腹腔注射处死, 取包括损伤中心在内的 2cm 左右的脊髓组织, 获取脊髓蛋白, 根据蛋白浓度进行等量上样, 电泳、转膜、洗膜、封闭, 4°C 下加一抗过夜, 一抗分别为抗 BDNF (Abcam, 1:250) 和抗 VEGF (Abcam, 1:250), 洗膜, 室温下加荧光二抗孵育 1h, 充分洗膜, Odyssey 红外成像系统观察、照相, 定量分析条带灰度。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 18.0 进行数据处理, 数据用均数 $\pm$ 标准差表示。多组数据间通过单因素方差分析 (ANOVA) 及 LSD 法进行统计学处理, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GFP-BMSCs 细胞培养及传代

获取的 GFP-BMSCs 细胞增殖迅速, 7~9d 细胞 90% 以上融合, 镜下观察见细胞贴壁生长, 呈形态规则、大小均一的成纤维样细胞, 并且稳定表达绿色荧光, 传代 6 代以上, 荧光无明显变弱 (图 1)。

2.2 行为学结果

入选正式实验的 30 只大鼠均纳入分析, 无死亡, 未发现药物毒性反应。3 组大鼠各时间点的 BBB 评分和斜板试验结果见表 1。术前 3 组大鼠双后肢评分均为 21 分, B、C 组脊髓损伤后双后肢均为全瘫, 术后 1d、3d 时两组 BBB 评分无显著性差异, 术后 7d、14d、21d、28d 时 C 组的 BBB 评分高于 B 组 ($P < 0.05$)。术前大鼠斜板试验的平均角度为 83° , 脊髓损伤后角度下降, 术后 14d、21d、28d, C 组大鼠的角度高于 B 组 ($P < 0.05$)。

2.3 组织形态学结果

A 组脊髓组织未见明显腔; B、C 组可见空腔 (图 2), B 组空腔体积为 $0.57 \pm 0.10\text{mm}^3$, C 组空腔体积为 $0.29 \pm 0.08\text{mm}^3$, 两组比较有统计学差异 ($P < 0.05$)。

2.4 免疫荧光检测结果

荧光显微镜下观察 A 组和 B 组中绿色荧光细胞很少; C 组在脊髓损伤周边可见大量表达绿色荧光的细胞。免疫荧光染色发现部分表达绿色荧光的细胞同时有神经元核抗原 (NeuN) 或神经胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 表达阳性, C 组双阳性

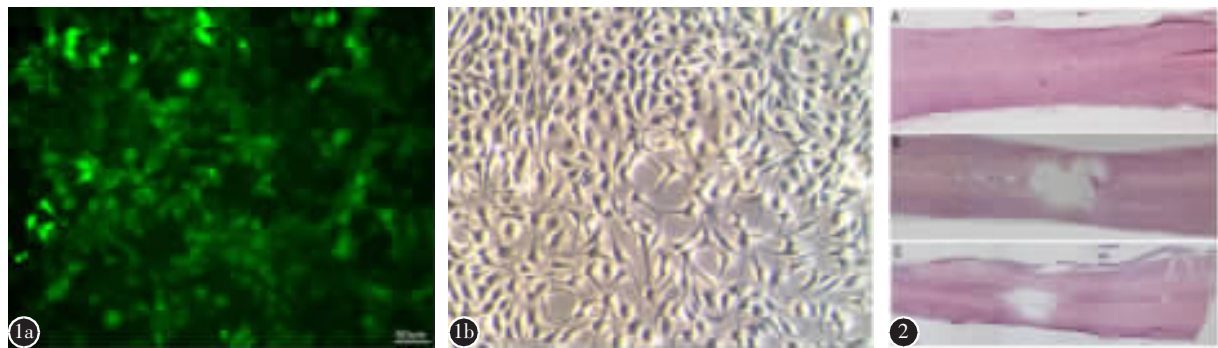


图 1 GFP-BMSCs 细胞形态观察 **a** 普通光镜下 GFP-BMSCs 贴壁生长, 呈长梭形或星形的成纤维样细胞形态 **b** 荧光显微镜下 GFP-BMSCs 表达稳定的绿色荧光 **图 2** HE 染色、普通光镜下观察脊髓损伤部位空腔情况 (A: 假手术组; B: 对照组; C: SIM 组)

Figure 1 The morphological observation of GFP-BMSCs **a** Under light microscope, the GFP-BMSCs adherently growth, having a fibroblast-like cell shape **b** under fluorescent microscope, the GFP-BMSCs express stable green fluorescence.

Figure 2 HE-stained samples of vehicle and simvastatin-treated spinal cord (A: spinal cord of sham group; B: vehicle-treated spinal cord; C: simvastatin-treated spinal cord)

表 1 3 组大鼠不同时间点的 BBB 评分和斜板试验结果

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

Table 1 The result of BBB score and inclined plane test in 3 groups

		BBB 评分 BBB score			斜板试验 inclined plane test		
		假手术组 (A 组) Vehicle group	对照组 (B 组) Sham group	SIM 治疗组 (C 组) Simvastatin group	假手术组 (A 组) Vehicle group	对照组 (B 组) Sham group	SIM 治疗组 (C 组) Simvastatin group
术前 Preoperation	21	21	21	21	81.0±2.3	81.6±2.8	81.2±4.2
术后 After operation							35.1±2.8 ^①
1d	21		0±0 ^①	0±0 ^①	81.9±3.1	32.1±2.4 ^①	
3d	21		1.5±0.8 ^①	3.8±0.6 ^①	80.8±2.8	34.1±2.3 ^①	41.2±2.1 ^①
7d	21		7.6±0.9 ^①	11.7±0.8 ^{①②}	81.7±3.5	40.5±2.8 ^①	49.7±2.6 ^{①②}
14d	21		9.8±0.9 ^①	13.2±1.3 ^{①②}	82.3±3.4	48.9±3.1 ^①	59.6±3.2 ^{①②}
21d	21		11.8±1.4 ^①	15.4±1.6 ^{①②}	81.4±3.6	52.1±2.9 ^①	63.9±2.7 ^{①②}
28d	21		12.2±1.5 ^①	15.7±1.2 ^{①②}	82.1±2.9	54.2±3.4 ^①	66.3±2.6 ^{①②}

注: ①与 A 组比较 $P<0.05$; ②与 B 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with the vehicle group, $P<0.05$, ②compared with the Sham group

细胞显著性多于 A、B 组 (图 3, 表 2, $P<0.05$)

2.5 Western blot 检测结果

A、B 组 BDNF 和 VEGF 表达量较低, 而 C 组 BDNF 和 VEGF 表达明显增多 (图 4)。半定量分析结果显示 C 组与 A、B 组比较有显著性差异 (图 4, 表 3, $P<0.05$)。

3 讨论

脊髓损伤致残率高, 严重危害人类健康和社会生产。目前临床尚缺乏有效的治疗方法。大剂量激素冲击治疗的治疗窗窄、效果存在争议, 且常伴有严重并发症。干细胞无限增殖及多功能分化的

理论和实践研究结果逐渐改变了人们对 SCI 的悲观认识^[8]。外源性干细胞移植替代受损的神经组织取得了一些进展, 但效果并不理想, 移植后细胞的存活比例、迁移能力及定向分化能力非常有限, 难以达到治疗目的, 加上取材不便、安全性及道德伦理等方面的因素, 目前尚不能普遍应用^[9]。

相对于局部损伤而言, 自身干细胞是无比丰富的“宝藏”。成年人和动物大脑、脊髓的室管膜及膜下区存在丰富的内源性干细胞/前体细胞, BMSCs 也具有神经分化潜能; 当受到某种刺激时, 这些“休眠”的干细胞被“唤醒”, 并归巢到损伤部位进行神经发生, 替代损伤的神经细胞^[10]。激

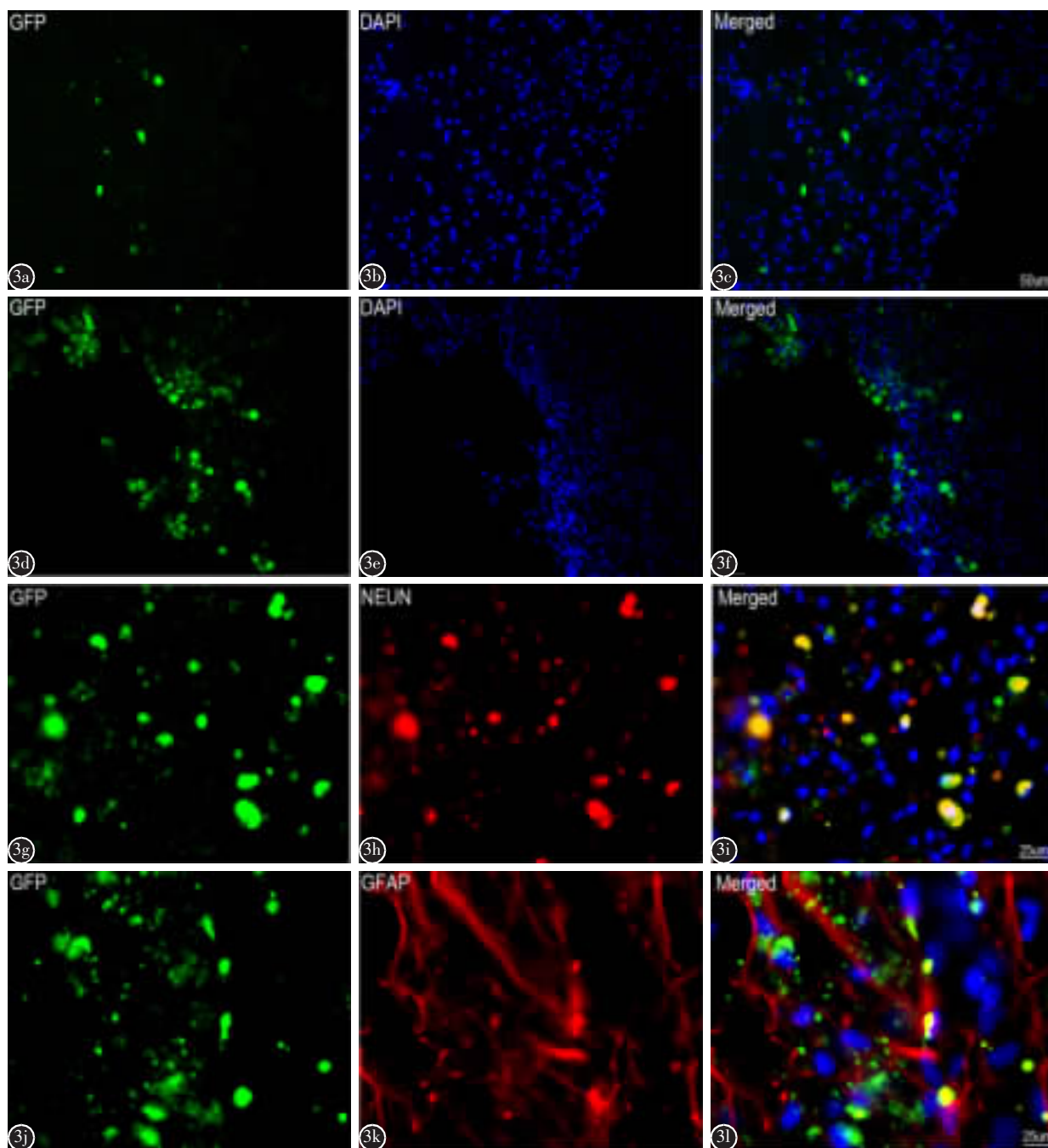


图3 GFP-BMSCs 免疫荧光双染结果 a、b、c 对照组大鼠脊髓损伤部位可见少量绿色荧光标记的 GFP-BMSCs 分布 d、e、f 实验组大鼠脊髓损伤部位可见较多绿色荧光标记的 GFP-BMSCs 分布,明显多于对照组(绿色为 GFP 染色,蓝色为细胞核 DAPI 染色) g、h、i 实验组脊髓损伤部位可见 GFP 和 NEUN 双染色双阳性细胞 j、k、l 实验组脊髓损伤部位 GFP 和 GFAP 双染色双阳性细胞

Figure 3 The immunohistochemistry result of GFP-BMSCs in the injured spinal cord a, b, c Immunohistochemistry for GFP in injured spinal cord of sham group d, e, f Immunohistochemistry for GFP in injured spinal cord of simvastatin-treated group, the numbers of GFP-positive cells in simvastatin group were much more than that in the sham group g, h, i Some GFP-positive cells were also positive for NeuN in simvastatin group, a marker for neurons j, k, l Some GFP-positive cells were also positive for GFAP in simvastatin group, a marker for astrocytes

表 2 三组大鼠脊髓组织中免疫荧光细胞计数($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 The statistical results of the immunofluorescence positive cells

	GFP细胞 GFP cells	GFP/NEU 细胞 GFP/NEU cells	GFP/GFAP 细胞 GFP/GFAP cells
A组 Group A	0±10	0±2	0±2
B组 Group B	51±30	5±3	5±2
C组 Group C	412±46 ^①	31±5 ^①	18±5 ^①

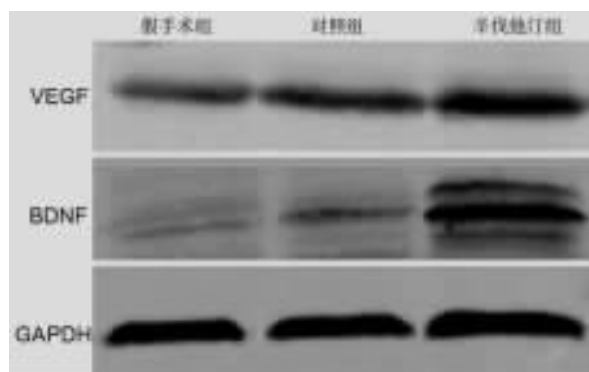
注:①与 B 组比较 $P<0.05$ Note: ①Compared with group B, $P<0.05$ 

图 4 3 组大鼠脊髓组织 Western blot 检测结果, 辛伐他汀组 VEGF 和 BDNF 表达的灰度值均高于假手术组和对照组

Figure 4 Effect of simvastatin on the expression of VEGF and BDNF in the injured spinal cord, the expressions of VEGF and BDNF in the Simvastatin treated group were higher than the vehicle group and sham group

表 3 三组大鼠脊髓组织 Western blot 检测灰度值

($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 3 The statistical results of Western blot

	BDNF/GAPDH	VEGF/GAPDH
A组 Group A	0.23±0.09	0.34±0.08
B组 Group B	0.28±0.07	0.49±0.09
C组 Group C	0.69±0.14 ^①	0.61±0.12 ^①

注:①与 A、B 组比较 $P<0.05$ Note: ①Compared with group A or B, $P<0.05$

活、诱导内源性干细胞,利用自身资源修复 SCI, 将更适合临床,具有广泛的研究和应用前景。

他汀类药物作为一类降胆固醇药物已在临床上广泛应用,最新研究发现他汀类药物还具有抗

炎、神经保护等功能。Punnu 等^[11,12]和 Derry 等^[13]分别在大鼠脊髓损伤前 7d 预防性应用和损伤后 2h 时内应用阿托伐他汀,可以减少神经细胞凋亡,促进运动功能恢复,并认为与其减轻免疫炎症反应有关。与 Punnu 等和 Derry 等的预防性给药不同,我们在以往的研究^[11,12]中证实大鼠脊髓损伤后 24h 应用辛伐他汀治疗可以促进损伤后神经功能恢复。有研究发现,很多炎症因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 均在 SCI 后 6h 内达到高峰^[14],临床上大剂量激素抗炎冲击疗法也要求在 SCI 后 8h 内应用;且免疫炎症反应在 SCI 修复中的利、害作用目前仍存在争议^[15],单纯用减轻免疫炎症反应很难解释辛伐他汀治疗大鼠 SCI 的作用机理。

国内外文献报道他汀类药物可以促进内源性内皮祖细胞的迁移、归巢,促进血管生成,还与 BMSCs 有协同作用^[3,4],促进 BMSCs 迁移至损伤部位,参与修复^[5]。在大鼠骨缺损实验中,我们也发现局部置入辛伐他汀可以促进内皮祖细胞的动员、迁移以及归巢,促进骨缺损的修复^[6]。既然辛伐他汀能够诱导干细胞归巢至骨缺损部位,辛伐他汀能否诱导内源性干细胞归巢到 SCI 部位参与修复重建?又是通过怎样的机制呢?目前已确定静脉移植的干细胞首先很快归巢到骨髓,在某种因素的刺激下又归巢到损伤部位,参与损伤修复^[16]。鉴于自身干细胞标记困难,BrdU 标记易于衰减,且增殖的其他细胞也易被标记,而文献报道 BMSCs 经静脉移植后数分钟内即开始迁移、归巢于骨髓腔中,在前 3h 内移植细胞的 2/3 即已归巢于骨髓腔中^[17,18]。因此,在本研究中,我们在脊髓损伤前 24h 静脉移植 GFP-BMSCs,以研究内源性干细胞的迁移情况。

他汀类药物作为肝脏 HMG-CoA 还原酶的抑制剂,口服后肝脏选择性高,经肝脏的首过效应后,只有低于 5% 的浓度进入血液循环^[19],作用于脊髓损伤部位的药物浓度会更低。相比较于系统给药,局部给药能更加快捷、直接作用于损伤部位,可能会有更明显的治疗效果,并且蛛网膜下腔注射给药是一种成熟、简洁的给药方式,在临床中常用^[20]。因此本实验我们采用蛛网膜下腔注射辛伐他汀的方法。

脊髓损伤的恢复最终取决于其功能的恢复,因此评价脊髓损伤后的恢复程度时,最重要的指标是运动功能的评分。本研究中,我们发现相比

较于对照组大鼠, 辛伐他汀治疗组大鼠运动恢复程度更明显。表明辛伐他汀治疗可以促进大鼠脊髓损伤后运动功能的恢复。BMSCs 是源于骨髓的干细胞, 参与基质微环境的组成和造血功能的调控, 可分化为神经元等多种细胞^[21]。文献报道 MSCs 促进损伤脊髓的修复作用包括以下方面^[22]: (1) 细胞替代作用。(2) 迁移至局部的 MSCs 及其分化的神经细胞可反应性分泌各种营养因子及生长因子, 促进局部微血管再生、神经再生和重构。在本研究中, 我们发现蛛网膜下腔注射辛伐他汀可以显著促进 GFP-BMSCs 迁移至损伤部位, 而对照组很少。此外, 通过免疫荧光试验, 我们发现这些迁移到损伤部位的 GFP-BMSCs 还表达神经元核抗原 (NeuN) 或神经胶质纤维酸性蛋白 (GFAP), NeuN 是神经元的特异性标记抗原, GFAP 是神经胶质细胞的特异性标记抗原, 说明这些归巢到脊髓损伤部位的细胞有一部分向神经元和神经胶质细胞分化的趋势。但这些细胞是否有神经元及神经胶质细胞的功能有待进一步研究验证。

近年来, 人们对干细胞归巢的调控因子进行了大量研究, 发现了一些调控干细胞归巢的调控因子^[23]。VEGF 是重要的血管生长因子, 能够促进血管生成, 进而促进脊髓损伤的功能恢复^[24]。BDNF 不仅能促进干细胞归巢, 还可改善神经发生微环境 (Neurogenesis Niche), 促进脊髓损伤后神经功能恢复^[25]。有研究发现 VEGF、BDNF 是神经祖细胞动员归巢的重要细胞因子^[26]。本研究中, 我们发现辛伐他汀治疗组脊髓损伤区域 BDNF 和 VEGF 呈高表达, 说明脊髓损伤后辛伐他汀动员干细胞归巢到损伤部位参与损伤修复可能与其促进 VEGF、BDNF 表达有关。

总之, 经蛛网膜下腔注射辛伐他汀可以有效促进大鼠脊髓损伤的修复, 其机制可能与辛伐他汀促进 BDNF、VEGF 的高表达, 继而促进干细胞迁移、归巢到损伤部位, 并参与损伤的修复有关。

4 参考文献

1. 韩晓光, 杨宁, 徐迎胜, 等. 辛伐他汀促进脊髓损伤后神经功能修复的实验研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2011, 21(3): 234-238.
2. Han X, Yang N, Xu Y, et al. Simvastatin treatment improves functional recovery after experimental spinal cord injury by upregulating the expression of BDNF and GDNF[J]. Neurosci Lett, 2011, 487(3): 255-259.
3. Cui X, Chopp M, Zacharek A, et al. Chemokine, vascular and therapeutic effects of combination Simvastatin and BMSC treatment of stroke [J]. Neurobiol Dis, 2009, 36(1): 35-41.
4. Mahmood A, Goussev A, Lu D, et al. Long-lasting benefits after treatment of traumatic brain injury (TBI) in rats with combination therapy of marrow stromal cells(MSCs) and simvastatin[J]. J Neurotrauma, 2008, 25(12): 1441-1447.
5. Li Y, Zhang D, Zhang Y, et al. Augmentation of neovascularization in murine hindlimb ischemia by combined therapy with simvastatin and bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplantation [J]. J Biomed Sci, 2010, 17(1): 75.
6. 宋泉生, 王晶莹, 朱静琳, 等. 辛伐他汀对骨髓源性内皮祖细胞动员及迁移的影响[J]. 中国微创外科杂志, 2009, 9(12): 1152-1155.
7. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1-21.
8. Hess DC, Borlongan CV. Stem cells and neurological diseases [J]. Cell Prolif, 2008, 41(Suppl 1): 94-114.
9. Okano H, Sakaguchi M, Ohki K, et al. Regeneration of the central nervous system using endogenous repair mechanisms [J]. Neurochem, 2007, 102(5): 1459-1465.
10. Okano H, Sakaguchi M, Ohki K, et al. Regeneration of the central nervous system using endogenous repair mechanisms [J]. J Neurochem, 2007, 102(5): 1459-1465.
11. Pannu R, Barbosa E, Singh AK, et al. Attenuation of acute inflammatory response by atorvastatin after spinal cord injury in rats [J]. J Neurosci Res, 2005, 79(3): 340-350.
12. Pannu R, Christie DK, Barbosa E, et al. Post-trauma Lipitor treatment prevents endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection, and promotes locomotor recovery following spinal cord injury [J]. J Neurochem, 2007, 101(1): 182-200.
13. Dery MA, Rousseau G, Benderdour M, et al. Atorvastatin prevents early apoptosis after thoracic spinal cord contusion injury and promotes locomotion recovery [J]. Neurosci Lett, 2009, 453(1): 73-76.
14. Donnelly DJ, Popovich PG. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury [J]. Exp Neurol, 2008, 209(2): 378-388.
15. Chan CC. Inflammation: beneficial or detrimental after spinal cord injury [J]. Recent Pat CNS Drug Discov, 2008, 3(3): 189-199.
16. Allers C, Sierralta WD, Neubauer S, et al. Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice [J]. Transplantation, 2004(78): 503-508.
17. Erices AA, Allers CI, Conget PA, et al. Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion [J].

无神经损伤的胸腰椎骨折的治疗进展

Treatment advancement in thoracolumbar fractures without neurological deficit

王许可, 王洪伟, 刘兰涛, 周 跃, 李长青
(第三军医大学新桥医院骨科 400037 重庆市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2012.11.15

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2012)-11-1035-05

目前,对于无神经损伤的胸腰椎骨折患者,在手术适应证的确定、手术方法的选择等方面,一直存在着争议^[1-3],一些学者倾向于保守治疗,但常因为后凸畸形的持续存在,到晚期引发代偿性劳损型疼痛,严重者可因椎管或椎间孔狭窄造成晚期脊髓或神经根受压,因此,手术治疗也是非常需要的。笔者就近年来无神经损伤的胸腰椎骨折的治疗新理念、观点以及治疗方法作一综述。

1 手术治疗与非手术治疗的选择

对于脊柱骨折后治疗方式的选择,普遍的观点是,稳定性骨折可考虑保守治疗,而不稳定性骨折应采取手术治疗^[1-3],但是如何判定脊柱骨折后的稳定性,目前没有明确

的、统一的标准。

脊柱骨折的分类系统被广泛接受和采用的有四种: Denis 分型^[3,4], Magerl 的 AO 分型^[5], McCormack 等提出的载荷分享分类 (load sharing classification)^[6], Vaccaro 等提出的胸腰段损伤分类和严重程度评分 (thoracolumbar injury classification and severity score, TLICS)^[7,8]。

Denis^[3,4]认为三柱结构中有两柱或两柱以上的结构受累判定为不稳定,并提出将脊椎骨折不稳定分为三度:① I 度,为力学不稳定;② II 度,为神经性不稳定;③ III 度,为兼有力学及神经性不稳定。McAfee 等^[9]认为即使爆裂骨折也有稳定性和不稳定性之分,当脊柱前柱和中柱受压缩遭到破坏,而后柱结构完整时,这种损伤是稳定的;只有当后柱也破坏时,损伤才不稳定,其将伴有后柱损伤、椎体前柱高度丢失>50%或伴有小关节半脱位的胸腰椎爆裂骨折分类为不稳定骨折。

目前,胸腰段骨折的 Denis^[3,4]和 AO^[5]分类系统已被广

第一作者简介:男(1983-),硕士研究生,研究方向:脊柱外科
电话:(023)68755608 E-mail:suikwong@163.com
通讯作者:李长青 E-mail:changqli@163.com

- Cell Transplant, 2003(12): 555-561.
18. Ceradini DJ, Gurtner GC. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue [J]. Trends Cardiovasc Med, 2005, 15(2): 57-63.
19. Obi C, Wysokinski W, Karnicki K, et al. Inhibition of platelet-rich arterial thrombus in vivo: acute antithrombotic effect of intravenous HMG-CoA reductase therapy[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(9): 1271-1276.
20. Farida H, Andres H, Jörg R, et al. Microtubule stabilization reduces scarring and causes axon regeneration after spinal cord injury[J]. Science, 2011, 331(6019): 928-931.
21. Kim BG, Hwang DH, Lee SI, et al. Stem cell-based cell therapy for spinal cord injury[J]. Cell Transplant, 2007, 16(4): 355-364.
22. Gu W, Zhang F, Xue Q, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells reduce lesion volume and induces axonal regrowth of injured spinal cord [J]. Neuropathology, 2010, 30(3): 205-217.
23. Cheng M, Qin G. Progenitor cell mobilization and recruitment: SDF-1, CXCR4, $\alpha 4$ -integrin, and c-kit[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012, 111: 243-264.
24. Patel CB, Cohen DM, Ahobila-Vajjula P, et al. Effect of VEGF treatment on the blood-spinal cord barrier permeability in experimental spinal cord injury: dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging[J]. J Neurotrauma, 2009, 26(7): 1005-1016.
25. Weishaup N, Blesch A, Fouad K. BDNF: the career of a multifaceted neurotrophin in spinal cord injury[J]. Exp Neurol, (10.1016/j.expneurol. 2012.09.001).
26. Wu H, Lu D, Jiang H, et al. Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/Akt pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2008, 25(2): 130-139.

(收稿日期:2012-02-14 修回日期:2012-04-27)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)