

基础研究

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

叶超群¹, 孙天胜¹, 高尔镜², 刘彦³

(1 北京军区总医院骨科 100700 北京市; 2 首都医科大学神经外科研究所 100 北京市;

3 北京市虹天济神经科学研究院 100045 北京市)

【摘要】目的:观察经不同方法共移植的嗅鞘细胞和雪旺氏细胞在脊髓内的迁移特点和对轴突再生的影响。**方法:**将 8 只 75±1d 雌性 SD 大鼠随机分为 2 组, 每组 4 只, 利用 NYU 打击器制作 T10 脊髓损伤模型, 打击高度 25mm, 打击杆重量 10g。造模后 2 周, 一组采用联合移植, 雪旺氏细胞移植于损伤部位中心, 嗅鞘细胞移植于距离损伤中心 0.5mm 处的头侧和尾侧的脊髓中线上; 另一组采用混合移植, 将嗅鞘细胞和雪旺氏细胞混合后移植于距离损伤中心 0.5mm 处的头侧和尾侧的脊髓中线上。每个部位注射 4 个点, 深度为 1.75mm、1.25mm、1mm、0.5mm, 注射速度为 0.1μl/min。联合移植组嗅鞘细胞量每点 0.5μl 含 5×10⁴ 个, 雪旺氏细胞量为每点 1μl 含 10⁵ 个雪旺氏细胞; 混合移植组为每点 1μl 含嗅鞘细胞和雪旺氏细胞各 5×10⁴ 个。细胞移植后 1 周和 8 周时各组分别取 2 只大鼠, 以损伤部位为中心取包含细胞移植部位的脊髓, 荧光和共聚焦显微镜下观察细胞迁移情况, 利用神经丝(neurofilament, NF)和生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)免疫荧光染色观察移植细胞对轴突再生的影响。**结果:**两组中均可见嗅鞘细胞迁移, 主要在灰质和白质内沿脊髓纵轴向损伤部位迁移, 还分别有一小部分沿中央管和蛛网膜下腔迁移; 但雪旺氏细胞仅在与嗅鞘细胞混合移植于距离损伤中心 0.5mm 处的头侧和尾侧脊髓时才可见有限距离的迁移。联合移植时, NF 阳性(NF+) 和 GAP-43 阳性(GAP-43+) 纤维伴随嗅鞘细胞迁移而沿脊髓纵轴延伸, 雪旺氏细胞移植处可见 NF+ 纤维从各个方向长入损伤部位(移植部位)并互相缠绕; 混合移植时, 大量 NF+ 纤维伴随移植细胞迁移而延伸, 损伤部位虽然 NF+ 纤维较少, 但没有互相缠绕现象。**结论:**雪旺氏细胞在损伤脊髓内迁移能力差; 嗅鞘细胞不仅具有良好的迁移能力, 而且可促进雪旺氏细胞迁移。无论是联合移植还是混合移植, 移植细胞均能促进轴突再生, 但联合移植时雪旺氏细胞移植处再生纤维互相缠绕、无法延伸。

【关键词】脊髓损伤; 嗅鞘细胞; 雪旺氏细胞; 共移植; 细胞迁移; 轴突再生

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.02.11

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2010)-02-0138-08

Migration and effect of cotransplantation of olfactory ensheathing cells(OECs) and Schwann cells(SCs) on axon regeneration in injured spinal cord/YE Chaoqun, SUN Tiansheng, GAO Erjing, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(2): 138~145

【Abstract】 Objective: To investigate varied migration and effect of cotransplantation of olfactory ensheathing cells(OECs) and Schwann cells(SCs) on axon regeneration in injured spinal cord of rats. **Method:** Spinal cord contusion at T10 segment was induced in adult female SD rats($n=8, 75\pm 1d$) by NYU impactor at the height of 25mm, and all animals were assigned as follows: (1) GFP+OECs cotransplantation 0.5mm cephalad and caudally to the injured site combined with injection of SCs labelled by hochest at injured site; (2) Mixed OECs and SCs(1:1)transplantation 0.5mm cephalad and caudally to injured site after 2 weeks(cell density: $1\times 10^5/\mu l$, depth: 1.75mm, 1.5mm, 1.0mm, 0.5mm, dosage: 0.5μl cell suspension/per depth). The rats were sacrificed at 1th and 8th week after transplantation respectively, and the T8 -11 cord containing lesion and

基金项目: 北京市委组织部优秀人才培养计划项目(20071D0502000266); 国家自然科学基金项目(30872604); 北京市虹天济神经科学研究院科研基金

第一作者简介: 女(1968-), 医学博士(后), 副教授, 研究方向: 脊髓损伤修复与康复(原单位为首都体育学院保健康复教研室)

电话: (010)66721209 E-mail: Yechoaun@sina.com.cn

通讯作者: 孙天胜

transplantation site were dissected, sectioned and stained immunochemically for fluorescent microscopy and then analyzed for cell migration and axon regeneration. **Result:** After cotransplantation of OECs and SCs, SCs remained largely at the transplanted site, while OECs were capable of migrating from injection site to injured site longitudinally and laterally. Most of the OECs migrated to the injured site in gray matter and white matter, and some migrated through central canal or pia from the entry site. In transplantation of OECs and SCs to same site, OECs could migrate to the injury site, and SCs could migrate in a limited distance. After combined transplantation of OECs and SCs, NF+ and GAP-43+ axons were observed migrated parallelly to the OECs processes, transplantation with SCs contained a greater concentration of NF+ axons, but no GAP-43+ axons was evidenced. NF+ axons penetrated into the SCs grafts from all directions and twisted irregularly in the injured site. After transplantation of OECs and SCs into same site, numerous NF+ and GAP-43+ axons parallel to mixed cells processes were observed with the density of NF+ axons being low in injured site. **Conclusion:** Both mixed and combined transplantation of OECs and SCs has the capacity for cell migration and axon regeneration in contused spinal cord of rats, while the former is better than latter due to the good growth protocol.

[Key words] Spinal cord injury; Olfactory ensheathing cells; Schwann cells; Cell transplantation; Migration; Axon regeneration

[Author's address] Orthopaedic Department, the Beijing Army General Hospital, 100700, Beijing, China

细胞移植是脊髓损伤修复领域的热点而颇具争议的问题之一。不同的研究发现,嗅鞘细胞、雪旺氏细胞、神经干细胞、骨髓基质细胞、胚胎干细胞、脐血干细胞等均具有不同程度的修复脊髓损伤作用;其中,嗅鞘细胞已进入临床试用阶段,其安全性已得到初步证实^[1]。然而,随之而出现的还有强烈的争议:移植细胞能否在脊髓内迁移、存活?移植细胞促进脊髓修复作用的研究结果为何不能被重复(即移植细胞是否具有促进脊髓损伤修复的作用)?动物功能改善与细胞移植的关系不能确定。本研究在既往研究的基础上,利用不同方法共移植嗅鞘细胞和雪旺氏细胞,观察其在脊髓内的迁移特点和促进轴突再生情况,为进一步研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

75±1d SPF 二级雌性 SD 大鼠 8 只(微通利华实验动物中心), NYU 打击器(美国新泽西大学 W.M. Keck 中心), 恒温冷冻切片机、立体定位仪、微量显微注射器、环孢霉素注射液、共聚焦显微镜、荧光显微镜、来源于 7 日龄绿荧光 SD 大鼠的嗅鞘细胞和普通 7 日龄 SD 大鼠的雪旺氏细胞(均由北京市虹天济神经科学研究院神经再生与修复研究室提供)。一抗包括:兔源抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)多抗(Z0334, Dako), 小鼠来源的抗神经丝(NF)单抗

(N0142, Sigma), 小鼠来源的抗生长相关蛋白-43(GAP-43)多抗(北京博菲康生物技术公司), 二抗为:Alexa 荧光 633 羊抗大鼠(Alexa Fluor 633 goat-anti-rat), Alexa 荧光 546 羊抗小鼠(Alexa Fluor 546 goat-anti-mouse)和 Alexa 荧光 546 羊抗大鼠(Alexa Fluor 546 goat-anti-rat), 二抗均为分子探针公司(Molecular)产品。

1.2 模型制作

依据 Wise Young 方法^[2]利用 NYU 打击器制作 T10 节段脊髓损伤模型。0.4%戊巴比妥钠(35±5mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠后,以 T10 棘突为中心常规备皮、消毒、铺巾,以 T10 棘突为中点作长约 1cm 的纵行切口,逐层剪开皮肤、筋膜、钝性分离椎旁软组织,暴露 T8~T11 棘突和椎板,游离 T10 椎板上下缘,咬去 T10 椎板和 T9 椎板的下半部分,暴露硬膜,固定 T8 和 T11 棘突并使大鼠悬空,接通打击器电路,调节打击高度为 25mm 后进行打击,大鼠出现一过性鼠尾摆动和后肢痉挛为打击成功标志;逐层缝合肌肉、筋膜和皮肤。造模后 1 周内每日给予青霉素 20 万单位肌注两次,1 个月内每日膀胱挤压排尿一次,常规饲养。

1.3 动物分组及细胞移植

造模后 2 周将大鼠随机分为 2 组,每组 4 只,分别进行嗅鞘细胞和雪旺氏细胞联合或混合移植。(1)联合移植组:雪旺氏细胞移植于损伤部位中心,嗅鞘细胞移植于距离损伤中心 0.5mm 处的头侧和尾侧的脊髓中线上;(2)混合移植组:将嗅

鞘细胞和雪旺氏细胞混合移植于距离损伤中心 0.5mm 处的头侧和尾侧的脊髓中线上。

移植前 30min 内开始消化细胞、洗涤,用不含血清的 DMEM 将细胞稀释成浓度为 1×10^5 个/ μl 的悬液(雪旺氏细胞先用 hoechst 33342 标记 10min,并用不含血清的 DMEM 洗涤 3 次)。每个部位注射 4 个点,深度为 1.75mm、1.25mm、1mm、0.5mm;联合移植组嗅鞘细胞量为:每点 0.5 μl 含 5×10^4 个,雪旺氏细胞量为每点 1 μl 含 10^5 个雪旺氏细胞,混合移植组为每点 1 μl 含嗅鞘细胞和雪旺氏细胞各 5×10^4 个;注射速度为 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$,每点注射完毕后留针 5min,然后缓慢退出;术毕逐层缝合筋膜、皮肤。移植后每日给予青霉素 20 万单位肌注两次,共 5d;自移植前一天开始每天给予环孢霉素 10mg/kg 皮下注射,直至取材。

1.4 取材和标本制作

移植后 1 周和 8 周时每组分别取 2 只大鼠取材,步骤:4%多聚甲醛心脏灌注固定,取以损伤部位为中心长 15mm 的脊髓段(包含细胞移植部位),脊髓取出后经 4%多聚甲醛后固定 4~6h、4℃ 30%蔗糖脱水 48h,待标本沉底后取出,恒冷箱冰冻切片机上行冠状切片,片厚 20 μm ,每隔 8 张取一张,直接贴在预先用 0.1%明胶处理过的载玻片上,每张载玻片贴 6 张切片,每只大鼠共制作 8 套切片,-80℃保存,1 个月内完成免疫荧光化学染色和荧光或共聚焦显微镜观察。每只大鼠的第 2、4、7 套切片用于观察细胞迁移情况,第 3 套切片用于细胞鉴定,第 5、6 套切片分别用于 NF/GFAP 和 NF/GAP-43 免疫荧光双染以观察移植细胞对轴突再生的影响。

1.5 免疫荧光化学染色

从-80℃冰箱内取出切片复温后 0.01MPBS 漂洗 10min $\times$ 3 次,含 10%山羊血清的 0.1%PBST(含 0.1%的 Triton-X100 的 PBS 溶液)常温封闭 2h,加入相应滴度的一抗(S-100/GFAP 免疫荧光双染滴度分别为:S-100 1:100,GFAP 1:400;NF 和 GFAP 免疫荧光双染滴度分别为:NF 1:800,GFAP 1:400;NF 和 GAP-43 免疫荧光双染滴度分别为:NF 1:800,GAP-43 1:200)4℃ 湿盒过夜,0.01M PBS 漂洗 10min $\times$ 3 次,加入相应荧光二抗(1:400)常温孵育 2h,漂洗、晾干后封片。普通荧光和共聚焦显微镜观察细胞迁移和促进轴突再生情况。共聚焦显微镜下用不同波长的光线激发,

GFAP/NF 免疫荧光双染中,NF+纤维呈红色,GFAP+组织呈蓝色;NF/GAP-43 免疫荧光双染中,NF+纤维呈红色,GAP-43+纤维呈蓝色。

2 结果

2.1 造模及细胞鉴定结果

所有大鼠造模成功、存活良好。普通荧光和共聚焦显微镜下,存活的嗅鞘细胞为绿色、具有较强折光性且轮廓清楚,主要呈双极、三极或多极,双极细胞突起较长;紫外光激发下可见 hoechst 标记的蓝色、折光性强、呈椭圆形的雪旺氏细胞核。死亡细胞轮廓不清、折光性消失。GFAP/S-100 免疫荧光双染显示:部分嗅鞘细胞 GFAP/S-100 双染阳性(图 1a),而雪旺氏细胞则为 S-100 阳性、GFAP 阴性(图 1b)。

2.2 不同方法共移植的嗅鞘细胞和雪旺氏细胞在脊髓内的迁移特点

(1)联合移植组:移植于损伤部位的雪旺氏细胞不能迁移,在损伤部位呈环行密集排列(图 2a、图 3a、b),移植于距损伤部位 0.5mm 的头侧和尾侧脊髓的嗅鞘细胞在移植后 1 周即可沿脊髓纵轴方向向损伤部位迁移,到达损伤部位边缘(图 2b);移植后 8 周时嗅鞘细胞和雪旺氏细胞均存活良好,嗅鞘细胞主要在灰质和白质内沿脊髓纵轴向损伤部位迁移,还分别有一小部分沿中央管和蛛网膜下腔迁移(图 3c~e)。

(2)混合移植组:混合移植 1 周时,嗅鞘细胞和雪旺氏细胞存活良好,嗅鞘细胞迁移至损伤部位,大部分雪旺氏细胞位于注射部位的周围(图 4a~f),少量可见伴随嗅鞘细胞发生有限距离的迁移。8 周时,无论在移植部位(图 5a、b)还是在损伤部位(图 5c、d)均可见存活的绿荧光细胞,但仅在移植部位可见大量 Hoechst 标记的雪旺氏细胞核,损伤部位仅见少量 Hoechst 标记的细胞碎片。

2.3 不同方法共移植的嗅鞘细胞和雪旺氏细胞对轴突再生的影响

(1)联合移植:联合移植 1 周时,即可见少量 NF+纤维伴随嗅鞘细胞迁移而沿脊髓纵轴方向延伸,在 GFAP+表达组织中穿行(图 6a);8 周时 NF+纤维数量明显增多,且伴随嗅鞘细胞而行的部分 NF+纤维表达 GAP-43(图 6b)。

雪旺氏细胞移植处可见大量 NF+纤维从各个方向长入损伤部位,在细胞聚集处互相缠绕成团,

周围由 GFAP 阳性组织包围, 仅有极少数绕过损伤部位周边到达损伤部位尾侧(图 6c), 没有 NF+ 纤维表达 GAP-43(图 6d)。

(2)混合移植:混合移植后 1 周时, 仅见少量 NF+ 纤维伴随移植细胞迁移(图 7a), 8 周时 NF+ 纤维明显增多, 且损伤部位未见 NF+ 纤维互相缠绕现象(图 7b), 无论在 1 周还是在 8 周, NF+ 纤维主要伴随绿色的嗅鞘细胞迁移; 移植细胞同时促进 GAP-43 表达(图 7c)。

3 讨论

3.1 移植细胞在脊髓内的迁移

移植细胞在脊髓内的迁移、存活是细胞移植修复策略成功的前提。我们在预实验中发现:嗅鞘细胞单独移植于损伤部位或距损伤部位 0.5mm 的头侧和尾侧脊髓时, 均可发生迁移; 雪旺氏细胞单独移植于上述部位时均不能迁移。以此为基础, 我们设计了嗅鞘细胞与雪旺氏细胞联合或混合两种不同的移植方法, 发现, 无论是在联合还是混合

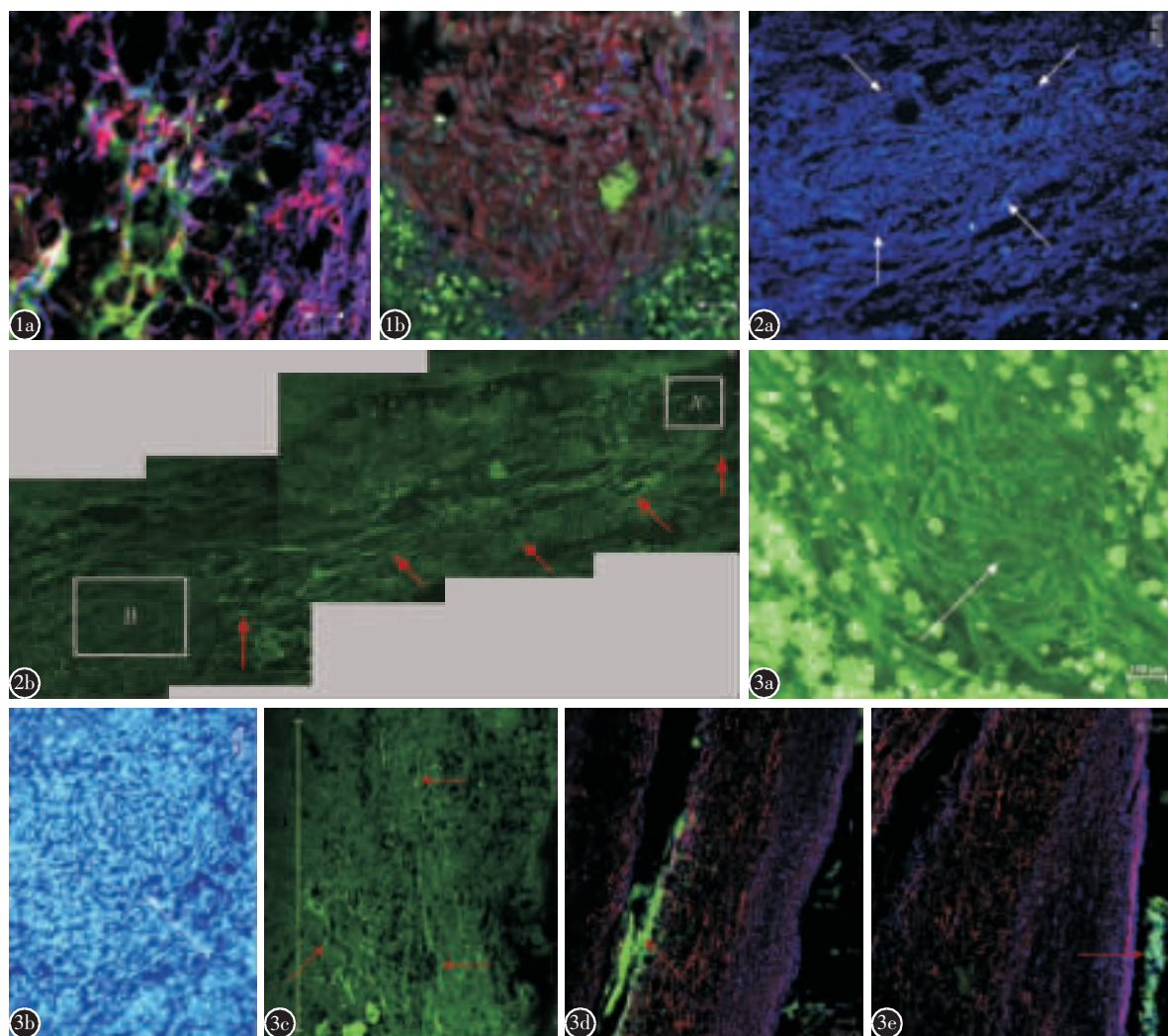


图 1 嗅鞘细胞及雪旺氏细胞的鉴定 **a** GFAP/S-100 免疫荧光双染色一部分嗅鞘细胞同时表达 GFAP (蓝色) 和 S-100 (红色), 另一部分仅表达 S-100 (红色) (共聚焦显微镜, bar=20 μ m) **b** GFAP/S-100 免疫荧光双染色雪旺氏细胞仅表达 S-100 (红色) (共聚焦显微镜, bar=20 μ m) **图 2** 联合移植 1 周的嗅鞘细胞和雪旺氏细胞的迁移 **a** hoechst 标记的雪旺氏细胞在紫外光激发下呈蓝色 (白色箭头所指), 位于损伤部位中心呈环状密集排列 (荧光显微镜, bar=100 μ m) **b** 绿色的嗅鞘细胞 (红色箭头所指) 在灰质和白质内沿脊髓纵轴向损伤部位迁移, 雪旺氏细胞位于损伤部位成密集排列、不能迁移; 图中 A 处为嗅鞘细胞移植部位, B 处为损伤部位和雪旺氏细胞移植部位 (荧光显微镜 $\times 100$) **图 3** 联合移植 8 周时嗅鞘细胞和雪旺氏细胞的迁移 **a、b** 为雪旺氏细胞, 位于损伤部位, 未能迁移 (白色箭头所指, 荧光显微照相, bar=100 μ m) **c** 嗅鞘细胞主要在白质和灰质内沿脊髓纵轴迁移 **d、e** 分别为嗅鞘细胞沿中央管和蛛网膜下腔迁移 (共聚焦显微照相, bar=100 μ m, 红色箭头所指的绿荧光细胞)

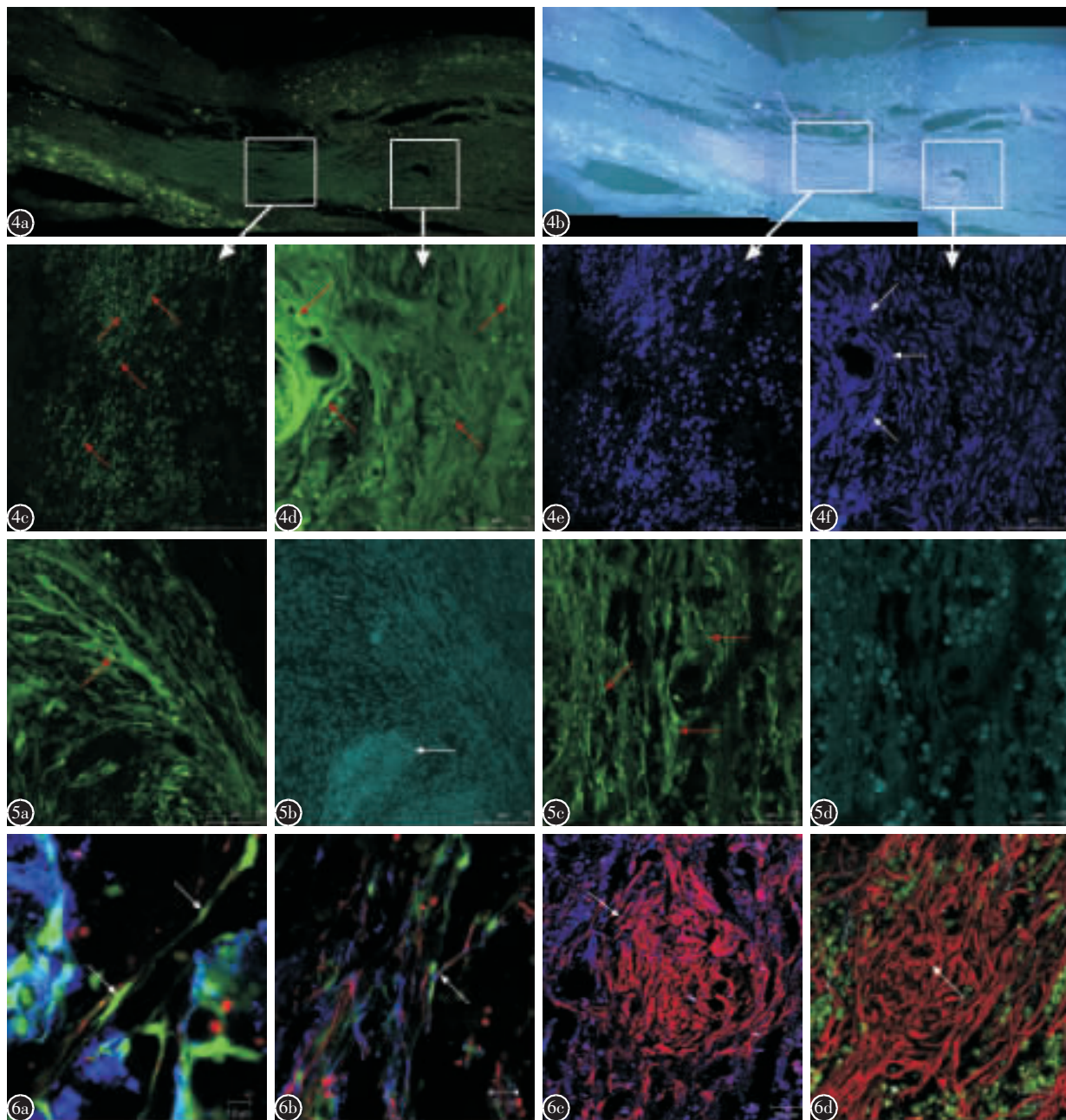


图 4 混合移植 1 周的嗅鞘细胞和雪旺氏细胞在脊髓内的迁移 **a、b** 为不同波长激发下混合移植嗅鞘细胞和雪旺氏细胞在脊髓内的迁移,雪旺氏细胞仅在注射部位周围作有限距离的迁移,嗅鞘细胞可沿脊髓纵轴在白质和灰质中迁移至损伤部位(荧光显微镜 $\times 100$) **c** 为迁移至损伤部位的绿荧光细胞(红色箭头所示) **d** 为混合移植的绿荧光细胞(红色箭头所示) **e** 为 hoechst 标记的细胞核,从形态上看为细胞死亡的碎片(共聚焦显微镜, $\text{bar}=75\mu\text{m}$) **f** 为 Hoechst 标记的雪旺氏细胞核(白色箭头所示,共聚焦显微镜, $\text{bar}=75\mu\text{m}$)(**c、e** 为不同波长激发下的损伤部位,**d、f** 为不同波长激发下注射部位) **图 5** 混合移植 8 周时的嗅鞘细胞和雪旺氏细胞在脊髓内的迁移(共聚焦照相, $\text{bar}=75\mu\text{m}$) **a、b** 为不同波长激发下的移植部位,可见大量的绿荧光细胞(**a**)和 hoechst 标记的雪旺氏细胞核(**b**) **c、d** 为损伤部位,可见大量绿荧光细胞(**c**)和少量 hoechst 标记的细胞碎片(**d**) **图 6** 联合移植嗅鞘细胞和雪旺氏细胞对轴突再生的影响 **a** 联合移植组 1 周时可见少量红色的 NF+纤维伴随绿荧光细胞的迁移而延伸($\text{bar}=10\mu\text{m}$),OEC:GFAP(蓝色)/NF(红色) **b** 移植 8 周时 NF+纤维明显增多,部分伴随绿荧光细胞延伸的红色的 NF+纤维同时表达 GAP-43(蓝色)($\text{bar}=20\mu\text{m}$),OEC:GAP-43(蓝色)/NF(红色) **c** 联合移植组 1 周时雪旺氏细胞聚集处可见大量排列成环形的红色 NF+纤维($\text{bar}=50\mu\text{m}$),SC:GFAP(蓝色)/NF(红色) **d** 移植 8 周时雪旺氏细胞聚集处排列成环形的红色 NF+纤维未能表达 GAP-43($\text{bar}=50\mu\text{m}$),SC:GAP-43(蓝色)/NF(红色)

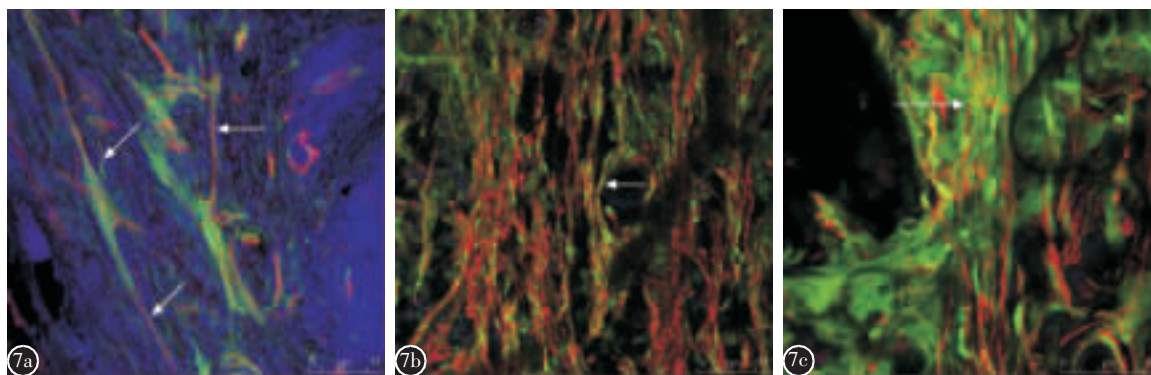


图 7 混合移植嗅鞘细胞和雪旺氏细胞对轴突再生的影响 a 混合移植 1 周时可见少量红色的 NF+纤维伴随绿荧光细胞的迁移而延伸(bar=75 μ m), OEC:GFAP(蓝色)/NF(红色) b 移植 8 周时伴随绿荧光细胞延伸的红色的 NF+纤维明显增多(bar=75 μ m), OEC/SWC/NF(红色) c 移植 8 周时红色的 GAP-43+纤维伴随绿荧光细胞延伸(bar=50 μ m), OEC/SWC/GAP-43(红色)

移植, 嗅鞘细胞移植入损伤部位的头侧和尾侧时均可发生迁移; 而联合移植时移植入损伤部位的雪旺氏细胞不能迁移, 仅在损伤部位成密集环形排列; 混合移植时, 雪旺氏细胞可随混合细胞流发生短距离迁移, 仅有极少数能到达损伤部位且存活能力差, 提示嗅鞘细胞不仅具有良好的迁移能力而且能促进雪旺氏细胞迁移。混合移植时, 嗅鞘细胞促进雪旺氏细胞迁移的机制可能与嗅鞘细胞分泌大量的神经生长因子有关^[3]。

无论是单独移植还是联合、混合移植于损伤部位邻近组织时, 嗅鞘细胞的迁移途径为: 主要在灰质和白质内沿脊髓纵轴向损伤部位迁移, 还分别有一小部分沿中央管和蛛网膜下腔迁移。由于我们的移植位置是在脊髓中线上, 有可能一部分细胞会注入中央管导致细胞在中央管中迁移, 在蛛网膜下腔迁移的细胞很少, 可能为在移植后拔针过程中漏出部分细胞进入蛛网膜下腔。此结果与 Ramon-Cueto 的报道一致^[4]。单独移植于损伤部位时, 雪旺氏细胞围绕注射微点成环形密集排列于损伤部位, 而嗅鞘细胞则主要沿脊髓纵轴分布于损伤部位及邻近组织, 还可见少量嗅鞘细胞在白质内向头侧和尾侧正常组织发生一定距离的迁移。

然而, 有研究显示嗅鞘细胞移植于损伤脊髓后不能迁移^[5,6]。Paul 等利用大鼠脊髓横断模型, 将嗅鞘细胞、骨髓基质细胞、成纤维细胞等移植于距损伤部位的头侧和尾侧脊髓发现, 所有细胞都能在移植后 1h 内发生“迁移”, 在移植后 24h 到达损伤部位, 且细胞间的“迁移”没有差别, 他们认为这种“迁移”是由于注射压力作用下的被动扩散,

并非细胞的主动迁移^[5]。Boyd 等的研究则显示, 来自孕 18d 的胚胎大鼠嗅鞘细胞在伤后 1 周时移植于 T10 水平脊髓压迫模型大鼠, 3 周后嗅鞘细胞仅位于损伤部位, 不能迁移^[6]。Pearse 最近的研究显示, 嗅鞘细胞和雪旺氏细胞在移植入损伤部位后各个时间点的迁移都受限, 在正常的白质或灰质内未见到嗅鞘细胞和雪旺氏细胞; 嗅鞘细胞移植入距损伤部位头侧和尾侧 4mm 处者, 也未见其迁移到邻近宿主组织, 但可在损伤中心见到嗅鞘细胞, 可能是沿因中线注射破坏的中央管或注射部位的软脊膜迁移至损伤部位的; 中央管内的嗅鞘细胞主要限于室管膜层直到进入损伤部位中心。对此差异, Pearse 认为与细胞移植的时间不同有关^[7]。伤后立即移植、在瘢痕未形成前, 细胞可能从注射部位迁移出去^[4,8,9]。而伤后 1 周的延期移植可能因损伤脊髓内胶质界面的形成^[10]或各种胞外基质如硫酸软骨素糖蛋白、tenascins 粘蛋白、可溶性 chemorepellant 分子^[11]的存在影响细胞迁移至宿主正常的脊髓组织。然而, 我们的细胞是在伤后 2 周移植的, 单独、联合移植和混合移植时嗅鞘细胞均可在脊髓组织内迁移, 尤其是 GFAP+嗅鞘细胞呈散在分布而 p75+细胞突起间互相连接、沿脊髓长轴延伸的特点(另文说明)说明细胞的迁移主要取决于其本身特性; 雪旺氏细胞则仅与嗅鞘细胞混合移植时才能发生有限迁移, 提示移植环境是影响细胞迁移的重要因素。

此外, 我们还发现混合移植 8 周时, 在移植部位可见大量折光性强、轮廓清楚的 Hoechst 标记的细胞核, 但损伤部位仅见少量的折光性差、轮廓不清的 Hoechst 标记的细胞核, 说明雪旺氏细胞

不仅迁移能力差而且极少数迁移至损伤部位的雪旺氏细胞存活能力差。我们推测其原因主要与雪旺氏细胞与脊髓融合能力差^[12,13]有关;另外,移植环境也影响其迁移和存活。在移植部位,移植的大量雪旺氏细胞可分泌神经营养因子为自身提供一个生存环境,相对于移植部位,损伤部位一方面因为炎性因子等的存在不利于雪旺氏细胞生存,另一方面,因迁移至损伤部位的雪旺氏细胞少,分泌的营养因子有限难以维持其生存。具体机制有待进一步研究。

3.2 移植细胞对轴突再生的作用

轴突芽生或再生是脊髓损伤动物神经功能修复的基础,也是脊髓损伤修复的目标之一。我们利用 NF 和 GAP-43 免疫荧光染色显示:联合移植 1 周时,即可见少量 NF+纤维伴随嗅鞘细胞延伸,其中部分 NF+纤维同时表达 GAP-43,且其周围组织内 GAP-43 表达增强,提示嗅鞘细胞不仅可为轴突生长提供支架,而且可促进轴突再生或芽生,引导轴突有序延伸,增强周围组织轴突的可塑性。雪旺氏细胞移植处有大量的 NF+/GAP-43-纤维从各个方向长入,互相缠绕成团,周围由 GFAP 阳性组织包围,仅极少数从损伤部位周围绕过损伤部位到达损伤部位尾侧,提示雪旺氏细胞可增加白质“赦免”,具有良好的促进轴突生长能力,但无法促进轴突有序延伸。此结果与 Ramon-Cueto 的研究结果稍有不同。Ramon-Cueto 利用包含雪旺氏细胞和基质的 PAN/PVC 管道“桥接”中胸段脊髓全横断模型大鼠损伤部位,将嗅鞘细胞移植于距离损伤部位 1mm 的头侧和尾侧脊髓中线,发现大量伴随嗅鞘细胞迁移而延伸的 NF+和 GAP-43+纤维进入包含雪旺氏细胞的管道,跨过宿主与移植细胞间的界面到达远端,距离达 1.5cm^[4]。我们推测其原因可能与 Ramon-Cueto 的研究中利用了包含基质的 PAN/PVC 管道,利于嗅鞘细胞、雪旺氏细胞迁移和 NF+、GAP-43+纤维延伸有关,而我们损伤部位处雪旺氏细胞密集排列,嗅鞘细胞虽然到达了损伤部位,但极少能渗入到雪旺氏细胞中,且雪旺氏细胞不能促进 GAP-43 的表达,进而导致 NF 阳性纤维缠绕成团、无法有序延伸。

在混合移植组,无论是在细胞注射位点还是在损伤部位,均有大量的 NF+纤维与移植细胞相伴沿脊髓纵轴方向延伸,并有大量的 GAP-43 表达,而没有 NF+阳性纤维缠绕现象,说明混合移植

能促进轴突生长或再生并防止其缠绕成团。这一方面可能与 GAP-43 表达有关,另一方面与嗅鞘细胞促进雪旺氏细胞有限迁移有关,尤其在损伤部位主要为嗅鞘细胞,可见少量 NF 阳性纤维伴随其迁移。这与 Pearse 等^[7]的结果明显不同。Pearse 等利用大鼠挫伤模型,在伤后 1 周将嗅鞘细胞、雪旺氏细胞分别移植入损伤部位、二者混合移植入损伤部位、雪旺氏细胞移植入损伤部位而嗅鞘细胞移植入损伤部位的头尾侧后发现:细胞混合移植入损伤部位有大量的 NF 阳性染色纤维,单独的嗅鞘细胞移植入损伤部位因存活细胞数量少、不能阻止大的空洞形成因而不能支持轴突生长,在雪旺氏细胞移植中,沿头侧-尾侧方向的 NF 阳性纤维与细胞突起方向一致。他们因此推测在挫伤模型轴突可生长到移植的雪旺氏细胞内。相反,嗅鞘细胞移植在损伤部位的头侧和尾侧也可促进轴突生长,但轴突生长方向与脊髓长轴方向垂直,并认为移植于损伤部位头侧和尾侧的嗅鞘细胞不能在脊髓组织内迁移。且 Ramon-Cueto^[4]结果中沿白质、灰质迁移的嗅鞘细胞可能为染料 Hoechst 污染了宿主内源性细胞所致。与 Ramon-Cueto 不同的是,我们利用绿荧光嗅鞘细胞和 hoechst 标记的绿荧光雪旺氏细胞则发现,嗅鞘细胞无论是单独移植入损伤部位的头侧和尾侧 0.5mm 处,还是和雪旺氏细胞混合移植入相同部位,均可见 NF+纤维伴随迁移的嗅鞘细胞沿头侧-尾侧的方向延伸,而雪旺氏细胞单独移植入损伤部位虽可促进大量 NF+纤维从各个方向长入移植细胞,但 NF+纤维进入移植细胞后围绕细胞呈环状排列,仅有极少数绕过损伤部位周围到达尾侧,而非 Pearse 研究所示为沿头侧-尾侧方向与脊髓纵轴方向一致排列。本研究中 NF+/GAP-43+纤维伴随嗅鞘细胞的迁移而延伸,而雪旺氏细胞不能促进 GAP-43 的表达也证实了嗅鞘细胞可促进轴突再生和有序延伸而雪旺氏细胞仅能促进轴突生长的特性。我们推测移植部位和时间不同可能是造成这种差异的原因之一,Pearse 在伤后 1 周将混合的细胞植入损伤部位中心,由于移植时脊髓损伤还处于亚急性期,炎性和免疫反应的存在不利于移植细胞的存活;移植于损伤中心则不利于嗅鞘细胞的广泛迁移,从而导致少量存活的嗅鞘细胞不能发挥功能。

总之,本研究结果显示,雪旺氏细胞在脊髓内

的迁移能力差,嗅鞘细胞不仅可在脊髓内发生长距离迁移而且可促进混合移植的雪旺氏细胞发生有限距离的迁移,说明移植细胞在脊髓内的迁移特点取决于细胞本身的特性和移植环境。联合移植时,嗅鞘细胞和雪旺氏细胞均可促进轴突再生,但雪旺氏细胞不能促进再生轴突长距离延伸,而在移植部位互相缠绕;混合移植时虽然损伤部位再生轴突数量较少,但沿脊髓纵轴延伸没有缠绕现象。

(致谢:本课题进行过程中,得到了北京市虹天济神经科学研究院神经再生研究室全体同志的大力帮助,在此表示衷心感谢!)

4 参考文献

1. Mackay-Sim A, Feron F, Cochrane J, et al. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial[J]. Brain, 2008, 131(9): 2376-2386.
2. Young W. Spinal cord contusion models[J]. Prog Brain Res, 2002, 137(1): 231-255.
3. Cao L, Zhu YL, Su Z, et al. Olfactory ensheathing cells promote migration of Schwann cells by secreted nerve growth factor[J]. Glia, 2007, 55(9): 897-904.
4. Ramon-Cueto A, Plant GW, Avila J, et al. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants [J]. J Neurosci, 1998, 18(10): 3803-3815.
5. Lu P, YANG H, Culbertson M, et al. Do olfactory ensheathing cells exhibit unique migratory or axonal growth-promoting properties after spinal cord injury in rats[J]? Neuroscience, 2006, 26(43): 11120-11130.
6. Boyd JG, Lee J, Skihar V, et al. LacZ-expressing olfactory ensheathing cells do not associate with myelinated axons after implantation into the compressed spinal cord[J]. PANS, 2004, 101(7): 2162-2166.
7. Pearse DD, Sanchez AR, Pereira FC, et al. Transplantation of Schwann cells and/or olfactory ensheathing glia into the contused spinal cord: survival, migration, axon association, and functional recovery[J]. Glia, 2007, 55(9): 976-1000.
8. Richter MW, Fletcher PA, Liu J, et al. Lamine propria and olfactory bulb ensheathing cells exhibit differential integration and migration and promote differential axon sprouting in the lesioned spinal cord[J]. J Neurosci, 2005, 25(46): 10700-10711.
9. Li X, Dancausse H, Grijalva I, et al. Labeling Schwann cells with CFSE—an in vitro and in vivo study[J]. J Neurosci Methods, 2003, 125(1-2): 83-91.
10. Pearse DD, Marcillo AE, Oudega M, et al. Transplantation of Schwann cells and olfactory ensheathing glia after spinal cord injury: Dose pretreatment with methylprednisone and interleukin-10 enhance recovery [J]. J Neurotrauma, 2004, 21(9): 1223-1239.
11. Barallobre MJ, Pascual M, Del Rio JA, et al. The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling[J]. Brain Res Rev, 2005, 49(1): 22-47.
12. Lakatos A, Franklin RJ, Barnett SC. Olfactory ensheathing cells and Schwann cells differ in their in vitro interactions with astrocytes[J]. Glia, 2000, 32(3): 214-225.
13. Lu J, Ashwell K. Olfactory ensheathing cells: their potential use for repairing the injured spinal cord [J]. Spine, 2002, 27(8): 887-892.

(收稿日期: 2009-05-12 修回日期: 2009-12-07)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)

消息

第五届全国骨科新理论、新技术、新材料研讨会通知

由中华医学会骨科分会基础学组主办,深圳市第二人民医院、香港中文大学承办的第五届全国骨科新理论、新技术、新材料研讨会定于 2010 年 5 月 28 日~31 日在深圳、香港两地召开。本次会议将以骨科微创技术、骨组织病理及影像学检查为专题。

投稿须知 尚未公开发表的论文结构式摘要(限 800 字)请注明作者通讯地址、邮政编码、电子邮件地址和手机号码。投稿地址:深圳市福田区笋岗西路 3002 号,深圳市第二人民医院创伤骨科,邮编:518030(请注明:会议投稿)。欢迎通过电子邮件投稿:szcsgk@163.com;截稿日期:2010 年 4 月 20 日。

会议注册 深、港两地:1400 元/人;仅深圳一地:1000 元/人。4 月 30 日前注册予以优惠,深、港两地:1000 元/人;仅深圳一地:600 元/人,研究生凭研究生证可按上述标准享受半价优惠。注册费寄往:深圳市中西医结合学会 中国银行黄木岗支行,帐号:824909623308091001(汇款附言栏注明注册人姓名及“会务”,并将汇款凭证复印件和注册表传真或邮寄至大会秘书处)。

会议住宿 深圳会场:深圳市金中环酒店公寓,标准房:468 元;单人房:398 元。香港会场:(1)香港沙田凯悦酒店地址:标准房和单人房:HK\$ 780(香港承办方负责超过 500 港币部分);(2)香港中文大学雅礼宾馆(中文大学校内),标准房和单人房:HK\$ 380。注:只对 4 月 30 日前缴纳注册费的代表预订房间,并按注册先后提供优惠房间。未预先注册的代表不能保证享受优惠价格。联系人:胡波(13602592525)。