

移植胚胎干细胞的衍生细胞修复小鼠脊髓损伤的行为学观察

武明鑫¹ 杨建华² 王 裕³ 李战春¹ 王立强¹ 张 新¹

摘要 目的:观察胚胎干细胞的衍生细胞移植对小鼠脊髓损伤神经功能恢复的影响。方法:将小鼠胚胎干细胞体外诱导分化为胚胎干细胞的衍生细胞后,制作小鼠脊髓半切损伤模型,在实验组注射胚胎干细胞的衍生细胞到脊髓半切小鼠的损伤脊髓周围。实验对照组按照同样方法注入等量磷酸盐缓冲液。移植后 2、4、8 周观察小鼠脊髓神经功能恢复情况(BBB 评分)。结果:实验组较实验对照组死亡数下降(实验组 2 只,实验对照组 7 只),并有明显的神经功能恢复(各时相点 BBB 评分及斜板试验临界角度两组间比较 $P < 0.01$)。结论:在脊髓损伤小鼠体内移植胚胎干细胞的衍生细胞可改善受损的脊髓神经功能和提高生存率。

关键词 脊髓损伤; 胚胎干细胞; 动物行为学; 移植; 小鼠

中图分类号:R651.2 R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-03-0207-03

An observation on improving functional outcome following embryonic stem cells transplantation to injured spinal cord in mouse through utilizing ethology/WU Minxin, YANG Jianhua, WANG Yu et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(3):207-209

Abstract Objective: To observe the affection on neurological functional recovery of transplantation of embryonic stem cells (ES cell) to injured spinal cord in adult mouse. **Method:** Labeled XY with Lac-Z marked gene of mouse ES cell was cultured and induced to differentiate by specialized factors in vitro. ES cell-derived cells were planted into vertebral canal around injured spinal cord model. The functional outcome measurements were performed using the modified BBB score at 2, 4, and 8 weeks after transplantation. **Result:** An obvious decrease of mortality and a statistically significant improvement in neurological function outcome was noted in mouse of ES cell transplantation group. **Conclusion:** ES cell transplantation group was superior to control group in neural function recovery and mortality.

Author's address Orthopedics Department, The First Hospital of Jilin University, Changchun, 130021

Key words spinal cord injury; embryonic stem cells; ethology; transplantation; mouse

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES)是一种高度未分化的全能细胞,具有发育成各种类型细胞的潜能,近几年已成为生命医学领域的研究热点之一。在一定条件下,ES 细胞可诱导分化成为神经前体细胞和有生理功能的神经细胞,当移植到健全或损伤的中枢神经系统后,可以与宿主细胞有效整合,修复重建损伤的神经组织^[1]。这将为损伤脊髓的修复治疗带来新的途径及希望。为此,本实验研究设计采用胚胎干细胞移植的方法,探索其对脊髓损伤修复的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

C57/BL6J 小鼠共 36 只,6—8 周龄,雌雄不限,平均体重 20—25g(中科院上海实验动物中心提供),小鼠胚胎干细胞株 S8(上海市发育生物学研究中心提供)。

主要细胞培养试剂:高糖 DMEM、2-巯基乙醇(BME)、小鼠白血病抑制因子(LIF)、丝裂霉素 C、胎牛血清(FBS)、贴壁诱导培养液(上海市发育生物学研究中心)、EFM:高糖 DMEM+10% FBS+1% P/S、ESM:高糖 DMEM+15% FBS+0.5% P/S+1% 非必需氨基酸+1000U/ml LIF+BME、全反式维甲酸 RA (Sigma)。二甲基甲酰胺(DMF)(北京鼎国生物技术的发展中心)。

主要实验仪器:细胞培养箱(HERA cell)、洁净工作台(AIR TECH)苏净集团安泰公司制造、倒置显微镜(CK40 Olympus)、高速离心机(Centrifuge 5810R)Eppendorf、自制毛细玻璃针。

1 吉林大学第一医院骨科,长春市,130021

2 佳木斯医学院附属医院骨科

3 上海发育工程实验室

作者简介:武明鑫,男,主治医师,博士

收稿日期:2005-09-13

1.2 胚胎干细胞的培养和诱导

ES 细胞复苏后, 将 ES 细胞悬液加到铺有饲养层的培养皿中, 再加入约 5ml ESM 培养液, 在 37℃ 含 5% 的 CO₂ 培养箱中培养、经几次传代后, 0.25% 胰酶消化成单细胞, FBS 终止, 1000rpm 离心 10min, 细胞用诱导培养液 A (EFM+RA 0.5μm) 重悬细胞并种于培养皿, 避光 37℃ 在 5%CO₂ 培养箱中培养 5 天, 以此诱导得到类胚体 (EBs), 然后将其收集并种于明胶包被的培养皿中, 采用贴壁诱导培养液继续诱导培养, 此后每 2 天换一次液, 共培养 9 天; 最后以 0.05% 胰酶消化细胞, PBS 终止, 并用 350 目的滤网过滤细胞, 1000r/min 离心 10min; 用含有 0.5% 胎牛血清的 PBS 洗涤 2 次, 计数细胞活性大于 95%。最终细胞浓度控制在 3×10⁷/ml 以上, 收集细胞备用注射。

1.3 实验动物分组及模型制作、细胞移植方法

C57/BL6J 小鼠, 6—8 周龄, 雌雄不限, 共 36 只, 随机分为 3 组: ①假手术组 (A 组): 12 只, 仅剪除 T12、L1 位棘突和椎板暴露硬膜囊然后逐层缝合。②实验组 (B 组): 12 只, 脊髓右侧半切 (T12、L1 位) 后行距损伤区约 1cm 的椎管内注射胚胎干细胞的衍生细胞悬液; ③实验对照组 (C 组): 12 只, 脊髓右侧半切 (T12、L1 位) 后在损伤邻近区注射磷酸盐缓冲液。实验组及实验对照组小鼠脊髓右侧半切损伤模型制作方法^[2]: 戊巴比妥钠 (30mg/kg) 腹腔注射麻醉。常规备皮消毒, 按肋骨确定椎体序列, 以 T12 肋为标志, 取后正中切口长约 1cm, 咬除 T12 及 L1 棘突及相应椎板, 在 T12—L1 椎骨平面打开椎管, 充分暴露脊髓背面及两侧, 用弯头纤维镊将脊髓轻轻挑起, 用纤维剪刀将右侧脊髓剪断, 保留对侧, 有利于术后小鼠存活及可以进行对照便于评测。将分离的肌肉缝合封闭椎管缺损, 缝合皮肤, 制成脊髓损伤模型。细胞移植方法: 实验组将胚胎干细胞的衍生细胞悬液用毛细玻璃针吸入 3μl 的 ES 细胞, 与脊髓水平呈 20° 植入到受损小鼠模型周围的椎管内, 离损伤区域约 1cm 处, 注入约 2—3μl, 总细胞数为 9×10⁴ 个细胞。约 3—5min 内注完, 逐层缝合切口各层; 实验对照组则用同样方法注射等量磷酸盐缓冲液。

1.4 术后动物行为学观察

实验小鼠在处理 2 周、4 周、8 周时对受试鼠进行分级为 21 级的 BBB 运动评分 (the Basso Beattie Bresnahan locomotor rating scale)^[3] 与斜板试验, 同时观察小鼠的饮食、活动、存活、排便、排尿、切口愈合情况。BBB 运动评分: 将实验小鼠放入一固定场地, 观察动物的臀、膝、踝关节、行走步态、躯干运

动及其协调情况, 根据 BBB 运动评分法标准^[2] 进行盲法评分。斜板试验设计: 按大鼠身体轴线与斜板纵轴垂直方向放置小鼠, 斜板每次升高或降低的度数为 5°, 以大白鼠停留在斜坡上 5s 的最大角度为其功能值, 记下斜板度数。

1.5 统计学分析

神经功能评分以均数±标准差表示, 用 SPSS (广义线性模型) 统计分析软件对实验数据进行统计分析, 以 P<0.05 为差异显著性标准。

2 结果

2.1 胚胎干细胞观察

经 X-Gal 染色可见在含有 LIF 的 ESM 培养液和胎鼠成纤维细胞条件下, 胚胎干细胞保持未分化状态克隆生长良好, 形态上呈圆形或椭圆形小集落生长, 集落边缘光滑、明亮, 胞体体积小, 细胞核大, 有一个或多个核仁 (图 1)。

2.2 胚胎干细胞经体外诱导后生长状态观察

胚胎干细胞经体外二步诱导培养, 经 X-Gal 染色可见类胚体周边生长出纤维状细胞, 排列紧密, 核质比大 (图 2)。

图 1 胚胎干细胞克隆 图 2 经诱导的胚胎干细胞的衍生细胞 (X-gal 染色×200)

2.3 术后一般情况观察

实验小鼠均在术后 12h 完全清醒, 所有实验组及实验对照组受试鼠均出现了极为典型的截瘫综合征: 常伴有腹部胀气、尿潴留、大便困难伴硬结, 小便口处肿胀等。整个实验过程中因各种原因而死亡的小鼠共 11 只 (其中假手术组 2 只, 实验组 2 只, 实验对照组 7 只), 死亡率为 30.8%。注射磷酸盐缓冲液的 C 组死亡率最高。

2.4 术后行为学检测

术后 2 周、4 周、8 周时间点, 3 组受试鼠进行斜板试验临界角度, 假手术组在术后 2 周、4 周、8 周斜板试验无明显差异, 临界角度在 45°—50° 左右。而实验组是处于逐渐恢复的过程, 临界角度从 40° 恢复到 50° 左右, 术后 2 周、4 周、8 周间有明显差异, 实验对照组也有不同程度的恢复。但假手术组与实验组之间无明显差异, 假手术组和实验组分别与实验对照组比较差异有非常显著性意义 (表 1)。

表 1 三组受试鼠斜板试验临界角度和运动能力 BBB 评分的比较

($\bar{x} \pm s$)

术后时间	假手术组(A)			实验组(B)			实验对照组(C)		
	动物数	临界角度(°)	BBB 评分	动物数	临界角度(°)	BBB 评分	动物数	临界角度(°)	BBB 评分
术后 2 周	12	44.31±3.08	18.90±1.18	11	40.31±1.93	4.58±1.32	8	32.30±2.01	1.25±0.88
术后 4 周	11	50.91±2.66	19.14±1.34	11	45.80±1.97	9.38±1.59	5	30.50±1.63	2.80±1.30
术后 8 周	10	51.50±1.36	18.33±1.21	10	50.43±1.51	12.88±1.45	5	41.33±0.75	3.33±0.57

A 与 C 组相同术后时间临界角度和 BBB 评分相比 $P < 0.01$; B 与 C 组相同术后时间临界角度和 BBB 评分相比 $P < 0.01$; B 组组内不同术后时间临界角度和 BBB 评分相比 $P < 0.01$

在术后 2 周、4 周、8 周时间点, 3 组受试鼠进行运动能力 BBB 评分, 假手术组在术后评分无明显差异, 评分较高, 在 20 分左右。而实验组是处于逐渐恢复的过程, 术后 2 周、4 周、8 周间有明显差异, 对照组恢复不明显在 4 分左右。但 A 组与 B 组之间有明显差异, A 组和 B 组分别与 C 组比较差异有非常显著性意义。

3 讨论

胚胎干细胞是一种高度未分化的全能细胞, 具有发育成各种类型细胞的潜能, 在体外培养系统中可扩增并可维持其全能性。能广泛参与宿主胚胎各组织, 器官生长发育, 形成嵌合体。本实验采用国内自行建系的胚胎干细胞株 S8, 在体外培养过程中应用两种自行设计的培养液, 即 ESM 和 EFM, 这与其他同类实验研究在体外培养诱导方法不同, 从实验结果看到, 注入经该方法诱导培养的胚胎干细胞的衍生细胞的脊髓损伤小鼠, 术后神经功能较实验对照组明显恢复, X-gal 染色观察经体外诱导分化的胚胎干细胞衍生细胞见类胚体周边生长出纤维状细胞, 排列紧密。这些结果从一方面证实胚胎干细胞株 S8 建系是成功的, 应用本实验的诱导方法可在体外将胚胎干细胞向神经前体细胞诱导分化。

本研究中发现实验组模型小鼠比对照组后肢的负重有较好的恢复, 可以说明脊髓神经组织连续性得到一定的恢复, 传导通路得到部分或全部恢复, 这对临床上多见的不可逆脊髓中枢神经系统损伤的修复具有重要意义。在本实验研究中发现实验组小鼠神经功能明显恢复, 并和对照组有明显差异, 因植入的衍生细胞距离损伤部位 1cm, 表明植入外源性 ES 细胞的衍生细胞能在损伤区环境中存活, 至少迁移 1cm 到损伤脊髓区域, 这从结构上来讲, 重建了神经元及胶质细胞, 并具有神经功能, 恢复了神经组织连续性。同时也说明 ES 细胞完全适应损伤后的脊髓环境, 在该环境中的炎性因子并未造成 ES 细胞的损伤, 这与 McDonald 的实验结果相似^[4]。

胚胎干细胞的衍生细胞迁移机制目前还不十分清楚, 但可以推断胚胎干细胞的衍生细胞迁移机制

与微环境有关, 包括神经细胞黏附分子(NCAM)、细胞外基质等^[5], 在我们实验中, 由神经功能的恢复表现可以推断出: 植入经诱导的胚胎干细胞, 在脊髓损伤的环境对其未造成较大影响, 反而这种损伤的微环境可能除产生某种细胞因子刺激 ES 细胞的迁移外, 同时也能帮助其存活, 并按微环境的诱导, 分化成为终末细胞。这也可能与脊髓损伤后立即中和髓磷脂类抑制分子的作用, 则轴突的再生便会先于胶质瘢痕出现有关^[6-7]。同时国外也有报道, Liu 等^[8]在应用胚胎干细胞体外培养神经细胞的方法的同时, 将分化的细胞转移到特殊的培养基中可大量得到少突胶质细胞, 移植入先天性髓鞘缺失的成鼠中, 发现少突胶质细胞不但可迁移且与宿主整合, 而且产生新的髓鞘并使宿主的轴索髓鞘再生, 提示胚胎干细胞在这种特殊的微环境下, 能克服一些抑制轴突的生长因子, 促进髓鞘形成。

参考文献

- [1] Clarke DL, Johansson CB, Wibertz J, et al. Generalized potential of adult neural stem cells [J]. Science, 2000, 288: 1660—1663.
- [2] 杨迎暴, 朴英杰. 脊髓损伤模型的建立及其评价标准[J]. 中华创伤杂志, 2002, 18: 188.
- [3] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight drop device versus transection [J]. Exp Neurol, 1996, 139: 244—256.
- [4] McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, et al. Mickey SK transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord[J]. Nat Med, 1999, 5(12): 1410—1412.
- [5] Wu W, Wong K, Chen JH, et al. Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the concentration of the secreted protein slit[J]. Nature, 1999, 400: 331—336.
- [6] Behar O, Mizuno K, Neumann S. Putting the spinal cord together again[J]. Neuron, 2000, 26 (2): 291—293.
- [7] Huang DW, Mc Kerracher L, Braun PE, et al. A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord[J]. Neuron, 1999, 24(3): 639—647.
- [8] Liu S, Qu Y, Stewart TJ, et al. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(11): 6126—6131.