

HRP 神经逆行示踪评价 GDNF 修饰的神经移植复合体对大鼠脊髓运动神经元的保护作用

张文捷¹ 周 跃¹ 陈 菁² 王建忠¹ 陈建梅²

摘要 目的:采用大鼠坐骨神经缺损桥接动物模型,应用霍乱毒素 B-辣根过氧化物酶(CB-HRP)神经逆行示踪技术对构建的 GDNF 修饰的神经移植复合体的运动神经元保护作用进行评价。**方法:**20 只成年 Wistar 大鼠随机分为 4 组:A 组(n=5) 细胞外基质凝胶-PLGA 管桥接组;B 组(n=5)雪旺细胞-细胞外基质凝胶-PLGA 管桥接组;C 组(n=5) GDNF 基因修饰的雪旺细胞-细胞外基质凝胶-PLGA 管桥接组;D 组(n=5)自体神经桥接组。损伤各组 12 周时应用辣根过氧化物酶神经逆行示踪技术进行脊髓前角运动神经元的再生评价。**结果:**12 周时脊髓前角运动神经元再生评价结果提示:C 组优于 A、B 组,而与 D 组相比差异无显著性意义。**结论:**雪旺细胞的转基因处理可能弥补单纯细胞移植神经营养因子含量的不足,而可能达到与自体神经移植相似的效果。

关键词 胶质细胞源性神经营养因子;运动神经元;霍乱毒素 B-辣根过氧化物酶;脊髓损伤;神经移植

中图分类号:R49, R741 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2006)-04-0325-03

Protective effects of GDNF-modified nerve graft complexes on motoneuron of spinal cord in rats using HRP tracing technique/ZHANG Wenjie, ZHOU Yue, CHEN Jing, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(4): 325-327

Abstract Objective:To evaluate the protective effects of GDNF-modified nerve graft complexes on spinal cord motoneurons in rats using HRP tracing technique.**Method:**Twenty adult Wistar rats were divided into four groups randomly: nerve graft complexes, which fabricated by extracellular gel and PLGA conduits (group A N=5), Schwann cells and extracellular gel and PLGA conduits(group B N=5) or GDNF-modified Schwann cells and extracellular gel and PLGA conduits (group C N=5) respectively, were used to repair sciatic nerve defects in rats; autograft serve as group D (N=5). Regeneration rates of motoneurons in spinal cord were evaluated by using HRP tracing technique at 12 week postoperatively.**Result:**Higher number of labeled motoneurons in spinal cord were observed using PLGA conduits seeded with GDNF enhanced expressing Schwann cells(group C) than with PLGA conduits (group A) alone or PLGA conduits seeded with control Schwann cells(group B), but there is no significant difference when compared with the group of autograft (group D).**Conclusion:**These results suggest that using gene transfer techniques to increase neurotrophic factor expression in Schwann cells added to nerve grafts may be a promising methods for improving nerve regeneration.

Author's address Dept. of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, ChongQing, 400037

Key words glial cell line-derived neurotrophic factor; motoneuron; cholera toxin B subunit-peroxidase; spinal cord injury; nerve graft

二十多年来, 尽管神经科学领域取得了大量的研究成果及进展, 但周围神经损伤的外科重建仍然富有挑战性^[1], 自体神经移植术仍然是周围神经修复的“黄金”方法。

近年来大量的采用雪旺细胞作为移植细胞而应用于周围神经损伤的研究显示出许多令人鼓舞的成绩, 但目前取得的效果与自体神经移植相比尚有较大差距^[2-3]。

由于应用基因转染技术可改变或增强种植细胞的神经营养因子水平, 可能为神经再生提供相对持久而有效的营养支持^[4-5]。因此本实验将应用携带胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 基因的逆转录病毒载体

质粒(pLXSN-GDNF)对体外培养的雪旺细胞进行基因修饰, 而后应用所获取的 GDNF 基因修饰的雪旺细胞结合细胞外基质凝胶及生物可降解聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物[poly(DL-lactide-co-glycolide), PLGA (85:15)]管构建新型的神经移植复合体, 用于大鼠坐骨神经缺损的修复。本实验基于上述动物模型, 应用霍乱毒素 B-辣根过氧化物酶 (cholera toxin B subunit-peroxidase conjugate lyophilized powder, CB-HRP) 神经逆行标记技术对构建的 GDNF 修饰

1 第三军医大学新桥医院骨科, 重庆, 400037

2 第三军医大学野战外科研究所 6 室

作者简介: 张文捷, 男, 博士, 主治医师

收稿日期: 2005-08-17

的神经移植复合体的脊髓运动神经元保护作用进行观察评价。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选用清洁级 Wistar 品系健康成年大鼠 20 只(购自第三军医大学创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室野战外科研究所动物实验中心), 雌雄不拘, 体重 180—200kg, 实验前后均分笼喂养, 饮自来水, 自由摄食(饲料为大鼠用高蛋白饲料), 鼠舍湿度 50%—60%, 温度 22—25℃, 通风良好, 每天明暗时间各半。

实验动物应用随机数字法分为以下 4 组: A 组, 细胞外基质凝胶-PLGA 管复合体桥接组 (n=5); B 组, 雪旺细胞-PLGA-细胞外基质凝胶复合体桥接组 (n=5); C 组, GDNF 基因修饰雪旺细胞-PLGA-细胞外基质凝胶复合体桥接组 (n=5); D 组, 自体神经桥接组 (n=5)。

1.2 PLGA 管-细胞外基质凝胶-雪旺细胞神经移植复合体的体外构建

1.2.1 PLGA 管的制备: 应用组织工程方法将聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物[poly(DL-lactide-co-glycolide), PLGA(85:15)](Sigma-aldrich)制备成长 15mm、内径 1.5mm、壁厚 0.3mm 的导管, 干燥机内真空 (20L/h; -0.1MPa) 抽提溶剂 24h, 于真空干燥机内保存备用^[6-7]。

1.2.2 雪旺细胞的培养及 GDNF 基因修饰的雪旺细胞的获取和神经移植复合体的构建: 无菌条件下切取 1—2 天龄的新生大鼠坐骨神经置于 D-Hanks 液中, 解剖显微镜下仔细剥离神经外膜组织, 眼科剪将神经组织剪切成约 1.0mm³ 的组织块, 0.25% 胰酶 + 0.03% 胶原酶 IV 消化 30min, 常规细胞培养液 (90% DMEM + 10% 胎牛血清 + 青霉素 100U/ml + 链霉素 100U/ml) 清洗 3 次后, 接种于六孔培养板中。24h 待细胞贴壁后, 以含 1×10^{-5} mol/L 阿糖胞苷的去除成纤维细胞培养液 (1×10^{-5} mol/L 的阿糖胞苷 + 常规细胞培养液) 培养 48h, 而后更换雪旺细胞增生刺激培养液 (10μg/ml Bovine pituitary extracts + 2μmol/L forskolin + 常规细胞培养液) 继续培养。待细胞达 80% 汇合后, 0.25% 的胰酶消化制成细胞悬液, 调整细胞浓度为 3×10^7 /ml, 与等体积的细胞外基质凝胶 (ECM GEL sigma) 混合均匀后, 微量注射器抽取 20μl 注入已完成动物坐骨神经缺损桥接的 PLGA 管 (参 1.3) 内。由于细胞外基质凝胶在体内环境下快速凝胶化, 因此细胞外基质凝胶泄漏很少。

GDNF 基因修饰的雪旺细胞的获取, 是将以上方法培养的雪旺细胞经重组逆转录病毒 [携带 GDNF 的重组逆转录病毒载体质粒 pLXSN-GDNF (第三军医大学神经生物教研室阮怀珍教授惠赠) 经 PA317 细胞包装、病毒提取、滴度测定而获取的高生物活性的重组逆转录病毒] 转染、RT-PCR 及 Western blotting 鉴定、细胞扩增后, 按上述方法 1.2 构建神经移植复合体。

1.3 动物模型制作

实验大鼠 3% 戊巴比妥钠 (40mg/kg) 腹腔注射麻醉, 右侧大腿后外侧入路, 无菌条件下显露坐骨神经, 追踪至梨状肌下缘 5.0mm 处, 切断并切除远断端 10mm 神经干。A 组, 将细胞外基质凝胶直接注入 PLGA 管内组成的复合体用以桥接坐骨神经缺损; B 组, 如 1.2 方法构建以雪旺细胞、细胞外基质凝胶和 PLGA 管组成的复合体用以桥接坐骨神经缺损; C 组, 如 1.2 方法构建以 GDNF 基因修饰的雪旺细胞、细胞外基质凝胶和 PLGA 管组成的复合体用以桥接坐骨神经缺损; D 组, 自体坐骨神经切下 10mm 后反转 180° 与两断端对接, 各损伤组均保持 10mm 的坐骨神经缺损区。

1.4 示踪显色方法

1.4.1 示踪剂注射: 取 12 周时相点实验大鼠, 麻醉后显露正常侧和实验侧坐骨神经, 用 25μl 微量注射器斜形刺入神经干远端 (注射前将拟注射区域以止血钳压榨一下), 双侧坐骨神经各注入 8μl CB-HRP (Sigma, USA, 含辣根过氧化物酶 1μg/μl, 霍乱毒素 B 0.42μg/μl) 后, 分层封闭切口。

1.4.2 固定取材: 动物存活 60h 后, 在麻醉下进行生理盐水 200ml 而后 3% 多聚甲醛 / 2% 戊二醛 / 0.1MPB (pH7.4) 溶液 300ml 心脏灌注固定 (方法同前), 切取 L4 脊髓节段标本, 继续后固定 6h 后, 30% 蔗糖 / 0.1MPB 液中浸泡至组织块沉底, 冰冻切片, 片厚 30μm, 间隔 5 张抽取 1 张, 收集于 5% 蔗糖 / 0.1MPB 液中备用。

1.4.3 显色: 液体配制: ① TMB 显色 A 液: 硝普钠 (北京双鹤现代医药技术有限公司) 100mg, 蒸馏水 92.5ml, 0.2mol/L 醋酸盐缓冲液 5ml; ② TMB 显色 B 液: TMB (四甲基联苯胺 Tetramethyl-benzidine Sigma, USA) 5mg, 无水酒精 2.5ml, 略加热溶解。

A、B 液 10min 内新鲜配制, 临用前混合备用。

显色步骤: ① 室温下蒸馏水快速漂洗切片 3 次, 总共不超过 5min; ② 切片洗后放入 TMB 溶液中 (A、B 混合液) 中, 室温 2min; ③ 滴加 3% H₂O₂ 1—2 滴, 室温孵育 20min; ④ 5% 醋酸缓冲液 (pH3.3) 漂洗 3—

4 次;⑤贴片、脱水、封片。

1.5 光镜观察及图像分析

随机选取 5 张染色切片,光镜(10×20)下观察计数具有胞核或胞体轮廓完整、突起明显的 CB-HRP 标记的脊髓前角运动神经元,求出实验侧标记神经元数占正常侧标记神经元数的百分率(轴突再生神经元的百分率)。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计分析软件,单因素方差分析中的 Turkey 法进行多样本均数的两两比较。

2 结果与讨论

光镜下观察,CB-HRP 阳性标记的运动神经元集中于前角外侧运动核区域,胞体呈深蓝色,核中空,具树枝状突起。12 周时 C、D 两组,CB-HRP 标记神经元数目百分比最高,分别为 $84.2\% \pm 2.1\%$ 和 $83.9\% \pm 2.5\%$,两组相比无显著差异;A 组 $59.5\% \pm 4.1\%$ CB-HRP 标记神经元数目百分比最低,与 B、C 及 D 组相比,差异有显著性意义($P < 0.01$);而 B 组 $70.5\% \pm 3.9\%$ 与 C 和 D 组相比的统计学分析结果显示, $P < 0.01$ (图 1)。

HRP 逆行示踪技术可以准确而特异性追踪显示神经纤维与脊髓神经元胞体的相互联系,因此,自

上世纪 70 年代起成为神经生物学的重要研究手段之一。神经营养因子对神经元的保护及轴突再生的作用已被大量研究所证实,应用外源性神经营养因子成为治疗外周神经损伤最重要的手段之一^[8]。GDNF 广泛存在于中枢及外周神经系统,是一种对中枢及外周神经元(尤其是运动神经元)具有显著作用的营养因子之一^[9-11]。本实验采用转基因的方法对培养的雪旺细胞进行 GDNF 的基因修饰,而后用于构建 GDNF 基因修饰的人工神经复合体,以期增强神经损伤修复的效果,在正常侧和实验侧坐骨神经远端注入 CB-HRP 后,清晰地显示 HRP 标记的脊髓前角运动神经元计数的结果显示 C 或 D 组的神经元再生百分率显著高于 A 或 B 组($P < 0.01$),而 C、D 两组的神经元再生百分率无显著差异,提示构建的 GDNF 基因修饰的神经移植复合体对坐骨神经缺损的修复作用可达到与自体神经移植相似的效果。

3 结论

应用基因转染方法对雪旺细胞进行外源性神经营养因子的基因修饰,可增强单纯雪旺细胞移植神经营养因子的表达水平,而可达到显著增强神经元保护的支持作用。

参考文献

- [1] Lundborg G.A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance [J]. Hand Surg Am, 2000, 25(3): 391—414.
- [2] Rodriguez FJ,Verdu E,Ceballos D,et al. Nerve guides seeded with autologous Schwann cells improve nerve regeneration [J]. Exp Neurol, 2000,161(2): 571—584.
- [3] Mosahebi A, Fuller P, Wiberg M, et al. Effect of allogeneic Schwann cell transplantation on peripheral nerve regeneration [J].Exp Neurol, 2002,173(1): 213—223.
- [4] Sorensen J,Haase G,Krarup C,et al. Gene transfer to Schwann cells after peripheral nerve injury: a delivery system for therapeutic agents[J].Ann Neurol, 1998,43(1): 205—211.
- [5] Loh NK,Woerly S,Bunt SM,et al.The regeneration of axons within tissue defects in the CNS is promoted by implanted hydrogel matrices that contain BDNF and CNTF producing fibroblasts[J]. Exp Neurol, 2001; 170(1): 72—84.
- [6] 张文捷,李兵仓,王建民,等.组织工程人工神经诱导管的制备及其在体外与大鼠体内降解性能研究 [J]. 第三军医大学学报, 2004,26(13):1165—1168.
- [7] 张文捷,周跃,王建民,等.组织工程人工神经诱导管的制作及其生物相容性观测[J].中国临床康复,2004,8(23):4705—4707.
- [8] Terenghi G.Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors[J].J Anat,1999,194:1—14.
- [9] Chen ZY,Cao L,Lu LC,et al.Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances axonal regeneration following sciatic nerve transection in adult rats[J]. Brain Res,2001,902: 272—276.
- [10] Golgen JP, Demaro J, Osborne PA. et al. Expression of neurotrophin, GDNF and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse[J].Exp Neurol,1999,158:504—505.
- [11] Watabe K,Sakamoto T,Ohashi T,et al. Adenoviral gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor to injured adult motoneurons[J]. Hum Cell,2001,14(1):7—15.

A 组实验侧 A 组正常侧

B 组实验侧 B 组正常侧

C 组实验侧 C 组正常侧

D 组实验侧 D 组正常侧

图 1 各实验组 12 周时脊髓前角运动神经元再生 CB-HRP 逆行示踪观察 (×200)