

·基础研究·

人胚胎嗅鞘细胞与神经干细胞联合移植修复
大鼠脊髓全横断损伤的研究*尹国栋¹ 汤 逊¹ 林月秋¹ 徐永清¹ 周田华¹

摘要 目的:探索人胚胎嗅鞘细胞(hOECs)与神经干细胞(hNSCs)联合移植修复大鼠脊髓全横断损伤的可行性。方法:制作 Wistar 大鼠脊髓全横断模型,9—10d 后,分别将取材自人胎脑的 hOECs 和 hNSCs 移植到脊髓损伤处(联合移植组),并设 hOECs 移植组、hNSCs 移植组和对照组,移植术后第 1、2、4、6、8、10 周进行 BBB 运动功能评分,取材行荧光化学(Hoechst33342)和免疫组织化学染色(P75、NF-200、GFAP、Synaptophysin)观察。结果:术后 4—10 周, hNSCs 组、hOECs 组和联合移植组的 BBB 评分较对照组明显提高($P<0.05$),其中,联合移植组的运动功能改善更显著。免疫组化染色显示, hNSCs 可以在损伤脊髓内存活 10 周以上,并分化为神经元或星形胶质细胞,联合移植组和 hOECs 组 P75 染色呈阳性反应, hOECs 与 hNSCs 联合移植可促进神经突触的形成,恢复神经元之间的联系。结论: hOECs 和 hNSCs 联合移植可促进脊髓全横断损伤大鼠神经突触的再生,改善其肢体运动功能。

关键词 脊髓损伤;人胚胎嗅鞘细胞;人胚胎神经干细胞;BBB 评分

中图分类号:R683.2,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-08-0680-03

Recovery of adult rat spinal cord injury by co-transplantation of human embryonic olfactory ensheathing cells and neuro stem cells/YIN Guodong,TANG Xun,LIN Yueqiu,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2006,21(8):680—682

Abstract **Objective:**To investigate the therapy effect of hOECs and hNSCs co-transplantation on adult rats' transected spinal cord.**Method:**Nine to ten days after models of rat spinal cord injury were established,OECs and NSCs from human embryos were transplanted to the wounds. At the same time, other 3 groups of rat were injected with OECs,NSCs and DF-12 solution separately, after 1,2,4,6,8 and 10 weeks, all rats were estimated with system of the BBB locomotion score respectively. The tissue section of spinal cords were harvested and inspected under fluorescent microscope or the methods of immunohistochemistry staining.**Result:**From 4 weeks to 10 weeks,the BBB locomotion scores of all transplantation groups,especially the co-transplantation group,were improved significantly contrasting to that of control group ($P<0.05$).Transplanted hNSCs can survive for at least ten weeks and differentiated into neurons and astrocytes.Immunohistochemistry staining of P75 showed the hOECs and co-transplantation group had a positive reaction.Co-transplantation of hOECs and hNSC can promote the formation of nerve synapse and resume the relationship between neurons.**Conclusion:**Co-transplantation of hOECs and hNSCs can enhance the recovery of locomotion function in adult rats with spinal cord injury and improve the locomotion function.

Author's address The Orthopaedic Center of PLA,Kunming General Hospital of Chengdu Command,Kunming, 650032

Key words spinal cord injury;human embryonic olfactory ensheathing cells;human embryonic neural stem cells; BBB locomotion score

神经轴突再生困难是造成脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)后难以康复的主要原因之一。嗅鞘细胞兼具中枢和周围两个神经系统细胞特性,可表达和分泌多种细胞表面黏附分子及神经营养因子,对中枢神经元轴突再生有着其他类型细胞难以取代的作用^[1-3]。神经干细胞具有自我更新、多方向分化、分泌多种神经营养因子及易于被多基因修饰等多种神经生物学特性^[4],是 SCI 细胞替代疗法中较理想的细胞来源之一^[5]。实验证实,OECs 与 NSCs 分别移植可以促进 SCI 大鼠部分脊髓功能的恢复,但效果有

限。本实验首次尝试利用 hOECs 与 hNSCs (Hoechst33342 标记)联合移植修复大鼠 SCI,旨在为 SCI 移植治疗实验研究和临床研究探索新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

* 基金项目:云南省自然科学基金资助项目(2002C0070M)

1 成都军区昆明总医院全军骨科中心,云南昆明,650032

作者简介:尹国栋,男,硕士

收稿日期:2006-06-23

DMEM-F12(DF12)培养基购自 Hyclone 公司,碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮细胞生长因子(EGF)购自 USB 公司, B27、N2、小牛血清(NCS)、胰蛋白酶购自 Gibco 公司, Hoechst33342、多聚赖氨酸(PLL)购自 Sigma 公司, P75 抗体、NF-200、GFAP 抗体、EnVision 试剂盒购自 Dako 公司(单克隆抗人抗体)、Synaptophysin(多克隆抗体)抗体及 DAB 显色试剂盒均购自博士德公司。成年雄性 Wistar 大鼠 48 只, 重 250—300g, 由本院实验动物中心提供。

1.2 移植细胞的制备

①取 3—5 个月胎龄流产新鲜人胚胎(经昆明总医院伦理委员会批准, 患者及家属知情同意), 无菌条件下分离两侧嗅球, 剪取嗅球最外两层, 剪碎后消化, 反复吹打置悬后静置, 收集上清, 重复上述步骤。差速贴壁法收集 hOECs^[6], 用 10%NSCs-DF12 将细胞密度调整为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 接种于含有 PLL 预处理盖玻片的 6 孔培养板中或 PLL 预处理的培养瓶中, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养, 3d 左右半量换液 1 次。②分离胎脑皮质, 胰蛋白酶消化, 终止消化后反复吹打、过滤, 所得细胞培养、传代。移植前 1d, 向处于增殖活跃期的 hNSCs 培养液中分别加入 hoechst33342, 使其终浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, 培养过夜, 次日更换新鲜培养基, 操作过程均小心避光。hNSCs 与 hOECs 细胞在移植前用 DF-12 培养液调整细胞浓度为 5×10^{10} 个/L。

1.3 大鼠脊髓全横断模型的制作

3%的戊巴比妥钠 ($30 \text{mg}/\text{kg}$ BW) 腹腔注射麻醉, 暴露 T10 脊髓。用尖刀横切 T10 脊髓, 重复横切 3 次以上, 确认脊髓已全横断并在局部制造约 2mm 缺损, 明胶海绵止血。术后协助大鼠排尿、排便并予保温及抗感染等处理。

1.4 实验分组

将制成的 48 只脊髓全横断模型大鼠随机分为 4 组, 每组 12 只。A 组为 hOECs 和 hNSCs 联合移植组, 注射 hOECs 悬液和 hNSCs 悬液分别为 $3 \mu\text{l}$ 和 $2 \mu\text{l}$; B 组为 hOECs 移植组, 注射 hOECs 悬液 $5 \mu\text{l}$; C 组为 hNSCs 移植组, 注射 hNSCs 悬液 $5 \mu\text{l}$; D 组为对照组, 注射 DF-12 培养液 $5 \mu\text{l}$ 。

1.5 细胞移植

术后 9—10 天沿原切口暴露脊髓, 移植实验组在脊髓横断处用微量注射器缓慢注入 $5 \mu\text{l}$ 细胞悬液; 对照组则在脊髓横断处注射 $5 \mu\text{l}$ 不含细胞的 DMEM/F12 培养液, 术后常规护理。术前 1d 开始, 各组均服用含环孢霉素 A ($50 \text{mg}/\text{L}$) 的饮水, 直至大鼠被处死。术后联合移植组、hNSC 组、hOECs 和对照组

分别有 4、2、3、2 只大鼠死亡, 分别予以补充。

1.6 BBB(Basso-Beattie-Bresnahan)运动功能评分

采取双人盲法对 4 组进行评分, 于术后 1 周、2 周、4 周、6 周、8 周、10 周进行, 共 6 次。

1.7 脊髓取材固定

分别于术后第 4、10 周每组各取 4 只大鼠, 2 只大鼠采用多聚甲醛心脏灌注法固定, 于损伤中心向头尾各 1cm 处切断脊髓, 做连续石蜡切片, 行免疫组织化学染色; 剩余大鼠取新鲜标本行连续冰冻切片。

1.8 免疫组织化学染色

用 NF-200、GFAP、P75、Synaptophysin 抗体分别对四组大鼠标本(石蜡切片)行二氨基联苯胺(DAB)染色, 所有操作均按试剂盒要求进行。冰冻切片行荧光显微镜观察(激发波长 350nm)。每组挑选 6 张 10 周 Synaptophysin 抗体染色切片, 每张切片随机选定 5 个损伤区域非重叠视野进行灰度测定, 最后统计各组灰度值。

1.9 统计学分析

用 SPSS10.0 版统计软件包, 对数据进行两两配对 t 检验或单因素方差分析。

2 结果

2.1 BBB 运动功能评分

脊髓全横断术后第 1 周、2 周, 所有大鼠的 BBB 运动功能评分均为 0 分; 伤后 3 周各移植组和对照组后肢运动功能均有轻微恢复; 细胞移植 4 周后, 各移植组 BBB 运动功能评分明显高于对照组, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 其中联合移植组 BBB 评分亦高于 hNSCs 和 hOECs 单独移植组 ($P < 0.05$), hNSCs 与 hOECs 单独移植组之间 BBB 评分则差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。6 周后, 各移植组 BBB 评分提高更为显著 ($P < 0.05$), 联合移植组与各单独移植组之间 BBB 评分差值有增高趋势, 提示联合移植可促进 SCI 大鼠后肢运动功能恢复(见表 1)。

表 1 大鼠各阶段 BBB 运动功能评分结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	伤后时间(周)					
	1	2	4	6	8	10
A 组	0	0	1.667 ± 1.030	3.000 ± 0.667	7.100 ± 1.101	9.500 ± 0.926
B 组	0	0	1.000 ± 0.853	2.600 ± 0.966	4.400 ± 0.966	7.625 ± 0.744
C 组	0	0	1.000 ± 0.603	2.400 ± 0.843	4.700 ± 0.949	8.125 ± 1.126
D 组	0	0	0.250 ± 0.452	0.800 ± 0.789	1.400 ± 1.075	2.750 ± 0.886

2.2 脊髓组织切片的荧光观察和免疫组织化学染色结果

2.2.1 冰冻切片荧光显微镜下表现: hNSCs 移植和联合移植组, 4 周标本, hoechst33342 标记的 hNSCs 多集中于注射部位, 荧光比较强; 10 周后荧光强度

渐弱和密度降低(对比 4 周), 标记细胞有分散的趋势, 细胞可迁徙至原注射部位 2—4mm 远处, 提示细胞移植后可向周围迁移, 但在损伤区域为中心的小范围内荧光标记仍相对密集, 提示损伤因素对 hNSCs 的趋化影响。对照组为阴性。

2.2.2 单克隆抗人 P75 染色在 hOECs(图 1, 见前置彩色插页 7) 组及联合移植组术后 4 周及 10 周均呈阳性结果(图 2, 见前置彩色插页 7), 提示 hOECs 移植到损伤脊髓后可以持续存活 10 周以上, 部分细胞甚至迁移并越过损伤脊髓头尾两端 2—4mm 处, 与脊髓局部细胞发生联系, 对照组染色结果为阴性。

2.2.3 抗人单抗 NF-200 及 GFAP 染色在 hNSCs 移植后 4 周及 10 周(图 3—4, 见前置彩色插页 7)均呈阳性结果, 提示 hNSCs 移植到损伤脊髓后可以持续存活, 可以分化为 NF-200 阳性的神经元或 GFAP 阳性的星形胶质细胞, 对照组染色结果为阴性。

2.2.4 各组术后 10 周石蜡切片 Synaptophysin 抗体染色(图 5, 见前置彩色插页 7)灰度检测结果: A 组: 79.90 ± 7.04 , B 组: 53.93 ± 9.07 , C 组: 53.23 ± 7.03 , D 组: 40.27 ± 7.47 。各移植组与对照组灰度值有显著差异($P < 0.05$), 其中联合移植组与 hOECs 和 hNSCs 移植组之间差异有显著性意义($P < 0.05$), 而两个单独移植组之间差异无显著性意义($P > 0.05$), 提示移植组的神经突触的生长数目明显高于对照组, 而联合移植更有利于损伤脊髓神经轴突的再生。

3 讨论

目前认为脊髓损伤后难以恢复的主要原因包括: ①对脊髓的直接打击及继发损伤使脊髓内功能神经元大量坏死或凋亡, 而神经元再生困难^[3]; ②脊髓损伤后暴露的髓鞘相关抑制分子及继发的胶质瘢痕阻碍了轴突的生长和正确连接^[7]; ③损伤造成局部细胞凋亡, 致使细胞分泌的神经营养因子减少, 破坏了支持轴突再生的有利微环境^[8]。

本实验中观察到: 损伤 4 周后, 联合移植组和 hNSCs 移植组都能检测到 NF-200、GFAP 抗原的表达, 提示移植的神经干细胞不仅可以在损伤局部存活, 同时还可以向神经元、星形胶质细胞方向分化, 荧光显微镜下亦可观察到, 移植的 hNSCs 有向周围迁徙的能力, 也有向脊髓损伤局部相对集中的趋势, 可能神经细胞死亡后可释放某些细胞因子或继发炎症因子对外来细胞有一定的定向趋化作用, 诱导细胞迁移。损伤后 4 周和 10 周, 联合移植组和 hOECs 组都可以检测到 P75 的表达, 而联合移植组 Synaptophysin 染色平均灰度值明显高于 hNSCs 移

植组和对照组($P < 0.05$), 说明联合移植组具有更多成熟突触数目, 可能在脊髓微环境中, hOECs 对 hNSCs 的增殖、分化具有促进作用, 能诱导更多神经元生成, 有效支持脊髓神经元的再生和神经元间突触结构的生成, 改善由于损伤造成的上下行神经元之间的联系, 这与实验中 BBB 运动功能评分所得到结果是一致的。

hOECs 与 hNSCs 联合移植在脊髓损伤修复中的可能作用机制有: 从神经元替代和调节脊髓再生微环境两方面切入, hOECs 支持宿主神经元和神经干细胞来源的神经元之间突触连接的形成, 从结构上保证上下行神经传导束的连通; hOECs 可表达多种细胞黏附分子和细胞外基质^[9], 如层粘连蛋白、连接素和纤维粘连蛋白等, 为神经轴突生长提供适宜的底物或支架; hOECs 可使脱髓鞘或新生的轴突重新髓鞘化^[10], 正是这种成鞘作用使损伤神经纤维与周围胶质微环境隔绝, 降低髓鞘抑制因子对轴突再生的不利影响; hOECs 可分泌多种神经营养因子^[9], 可能在诱导神经干细胞向神经元方向分化或神经元保护方面发挥作用; 神经干细胞来源的少突胶质或少突胶质祖细胞可能为脱髓鞘及再生的突触提供重新髓鞘化, hOECs 的移植使这一过程得到强化。总之 hOECs 与 hNSCs 可能在诱导分化、“桥接神经元”、促进神经突触再生方面发挥协同作用, 从而改善脊髓功能。

Cao^[11-12]等证实: 神经干细胞移植到正常脊髓, 可分化为各种类型的成熟神经元; 而移植到损伤脊髓后, 多数分化为星形胶质细胞, 这在某种程度上限制了神经干细胞的 SCI 治疗作用。神经干细胞在中枢神经系统的分化受到以下因素影响: 损伤局部血清比例越高, 分化的胶质细胞越多^[13]; 移植临近区域的细胞类型亦可影响其分化结果^[14]。hOECs 和 hNSCs 联合移植有助于神经突触再生可能亦通过促进 hNSCs 的分化发挥作用, 因为 OECs 和 NSCs 都能在移植局部分泌多种神经营养因子和细胞外基质, 同时通过细胞增殖、分化和迁移等方式, 桥接神经轴突连接, 抑制胶质瘢痕生长, 支持脱髓鞘轴突再髓鞘, 从而改善损伤局部不利于神经再生的微环境^[15-16]。

参考文献

- [1] Richter MW, Fletcher PA, Liu J, et al. Lamina 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.
- [2] Sasaki M, Karen L, Zemedkun LM, et al. Identified olfactory en-

(下接 719 页)