

骨髓基质细胞移植对大鼠脊髓损伤后胶质纤维酸性蛋白和神经丝蛋白表达的影响*

李 雷¹ 吕 刚² 王 欢¹ 高 红³

摘要 目的: 研究骨髓基质细胞(BMSCs)移植对大鼠脊髓损伤(SCI)后胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和神经丝蛋白(NF)表达的影响, 探讨 BMSCs 促进 SCI 修复的机制。**方法:** Wistar 大鼠 60 只, 随机分为移植组 and 对照组, 伤后 1, 3, 7, 14, 28d, 每组每个时相点 6 只动物, 用免疫组织化学染色方法观察 GFAP 和 NF 的表达。免疫组化结果用计算机辅助的数字图像分析仪进行定量分析。**结果:** BMSCs 移植后可在损伤脊髓内生存、整合、迁移; BMSCs 移植后在不同时间点均可促进损伤区周围脊髓 GFAP 和 NF 的表达。**结论:** BMSCs 移植可通过促进损伤区周围脊髓 GFAP 和 NF 的表达等机制促进脊髓损伤修复。

关键词 脊髓损伤; 骨髓基质细胞; 移植; 胶质纤维酸性蛋白; 神经丝蛋白; 大鼠

中图分类号: R622⁴³ **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2007)-04-0299-04

The influence of BMSCs transplantation on expression of GFAP and NF in spinal cord injury of rat/LI Lei, Lu Gang, WANG Huan et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(4):299—302

Abstract Objective: To explore the influence of bone marrow stromal cell (BMSCs) transplantation on expression of GFAP and NF in spinal cord injury of rat. **Method:** Sixty rats were divided into transplantation group and control group. The expression of GFAP and NF were evaluated at 5 time points by means of immunohistological method after transplantation or operation. **Result:** BMSCs could survive, integrate and immigrate in spinal cord after transplantation. The expression levels of GFAP and NF in transplantation group were significantly higher than those in control group on the 1st, 3rd, 7th, 14th and 28th d. **Conclusion:** BMSCs can promote the expression of GFAP and NF, which can promote recovery of spinal cord injury.

Author's address Department of Orthopaedics, The Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004

Key words spinal cord injury; bone marrow stromal cells; transplantation; glial fibrillary acidic protein; neurofilament; rat

骨髓基质细胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs) 移植治疗脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 的实验研究近年国内外均有报道, 取得了较好的实验效果, 并证实 BMSCs 可在损伤区周围存活并分化^[1-4]。但其促进 SCI 修复的作用机制尚不够清楚。本实验应用免疫组织化学技术, 重点观察 BMSCs 移植对大鼠脊髓损伤后胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 和神经丝蛋白 (neurofilament, NF) 表达的影响, 拟从新的角度探讨 BMSCs 促进 SCI 修复的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胎牛血清 (Hyclone)、DMEM-LG (Invitrogen)、[DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)/F12 (1:1) 培养基]、胰蛋白酶 (购自美国 Gibco 公司); CD45 和 CD90 兔抗鼠多克隆抗体、小鼠抗大鼠 NF200 抗体、小鼠抗大鼠 GFAP 抗体、5-溴-2-脱氧

尿苷 (BrdU)、小鼠抗 BrdU 单抗、生物素化山羊抗兔、抗小鼠 IgG、SABC 试剂盒 (购自武汉博士德公司)。医用生物蛋白胶 (Fiberringlue, 广州倍特生物技术有限公司)。

1.2 BMSCs 的培养

取 2—4 个月 Wistar 大鼠 (中国医科大学动物部), 水合氯醛 (30mg/kg) 肌注麻醉, 无菌条件下取股骨和胫骨, 除去骨表面的附着组织。用止血钳除去股骨胫骨两端, 暴露骨髓腔。用含 10% 胎牛血清的 DMEM-LG 培养液, 从骨的一端注入培养液, 在另一端收集, 冲出骨髓。将收获的骨髓反复抽吸, 制成细胞悬液。收集细胞悬液, 1000rcf 离心 5min, 用培养液悬浮细胞。取少量细胞悬液与等量 4% 乙酸混合, 以

* 基金项目: 辽宁省教育厅高等学校科学研究项目 (2004F072)

1 中国医科大学附属第二医院骨科, 辽宁, 沈阳, 110004

2 通讯作者: 吕刚 (中国医科大学附属第一医院骨科)

3 中国医科大学附属第二医院小儿先天畸形实验室

作者简介: 李雷, 男, 医学博士, 副教授, 副主任医师

收稿日期: 2006-07-24

溶解红细胞, 计数。用培养液调节细胞密度 $8 \times 10^3/\text{cm}^2$, 接种, 置 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 培养箱培养, 3—4d 换液 1 次。当细胞达到 80%—90% 融合时, 传代扩增^[1]。(细胞传 3 代, 移植时 PBS 洗涤细胞 3 次, 调终浓度 $1 \times 10^5/\mu\text{l}$ 备用。)

1.3 免疫细胞化学方法检测 BMSCs CD45、CD90 的表达^[5]

选取 2—15 代 BMSCs, 胰酶消化后以 $8 \times 10^3/\text{cm}^2$ 浓度接种于盖玻片上。将生长在盖玻片上的细胞用 PBS 洗 3 次, 10% 福尔马林固定 20min, PBS 洗 5min 3 次。按照 SABC 试剂盒的说明用相应的二抗血清封闭 30min, 之后吸掉封闭液, 加入一抗, 4°C 孵育过夜。二抗室温孵育 1h, PBS 液洗 5min 3 次。SABC 液 1 滴滴片, DAB 避光显色 8min, 水终止反应, 洗 10min。苏木素复染, 盐酸/酒精分化, 二甲苯透明, 中性树脂封片并观察。

1.4 BrdU 标记

细胞传 3 代, 移植前 72h 按 $20\mu\text{mol/L}$ 终浓度加入 BrdU 标记, 移植时 PBS 洗涤细胞 3 次, 调终浓度 $1 \times 10^5/\mu\text{l}$ 备用^[1]。

1.5 动物分组

Wistar 大鼠 60 只, 体重 250—350g, 雌雄不拘。60 只随机分为移植组和对照组, 伤后第 1、3、7、14、28d, 用免疫组织化学染色方法观察 GFAP 和 NF 的表达。每组每个时相点 6 只动物。

1.6 手术方法

水合氯醛(30mg/kg)腹腔注射麻醉, 以 T8 棘突为中心取背部后正中切口长约 5cm, 显露 T7—T11 棘突及椎板。咬除 T9 棘突及全椎板, 11 号尖刀片在左侧造成脊髓半横断模型。BMSCs 移植组使用微量注射器约 45° 斜角(针头斜面向下)将 BMSCs 细胞悬液缓慢注入到脊髓半切头侧和尾侧损伤临近区域的灰白质交界处(距脊髓表面约 0.7mm), 每点 $3\mu\text{l}$, 总细胞数 6×10^5 细胞, 注射时间 10min, 留针 5min, 医用生物蛋白胶封闭注射孔。对照组依同样方法注射等量 PBS 缓冲液。

细胞移植或脊髓损伤后第 1、3、7、14、28d, 取大鼠过度麻醉, 先用 PBS 液, 再用 4% 多聚甲醛(PFA)心脏灌注。取出损伤和邻近 0.5cm 脊髓组织, PFA 固定。继续固定 24h, 石蜡包埋、切片, 片厚 $5\mu\text{m}$ 。

1.7 染色方法:

常规 HE 染色, 免疫组化染色采用 SP 法, 分别检测 BrdU、NF、GFAP 的表达。常规脱蜡到水, 热修复, 降至室温水洗, 一抗 4°C 过夜, 室温 PBS 洗三次 5min, 二抗 37°C , 35min, DAB 显色 5min, 水洗, 苏木

精复染 10min, 水洗返兰 30min, 脱水、透明、封片。光镜下观察, 细胞内有棕黄色颗粒者为阳性。

免疫组化结果用计算机辅助的数字图像分析仪 [Metaphor Image System(4.6)] 进行定量分析。随机计数 10 张切片, 切片经计算机图像分析系统处理, 测定上述 BrdU 的标记细胞数, 分别测出平均每张切片每平方毫米阳性细胞数。对同一批染色的切片, 根据染色的灰度定下同一标准, 根据染色的底色计算出 GFAP 和 NF 的平均灰度值(meangray)。灰度值可间接反映细胞蛋白的表达活性, 灰度值越大, 表达活性越低, 灰度值越小, 表达活性越高。

1.8 统计学分析

数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 用 SPSS 统计软件作 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 BMSCs 的分离培养及表面抗原鉴定

刚分离的 BMSCs 贴壁后呈圆形, 细胞体透亮, 折光性好, 与周围血细胞混杂。通过换液, BMSCs 以外的造血细胞被除去, BMSCs 自然纯化。BMSCs 形态不均一, 可呈现长梭形、大而扁平、小而多颗粒等多种形态。10—14d 后形成克隆, 约 3 周出现致密贴壁层。免疫细胞化学检测结果显示, 所分离细胞为 CD90 阳性、CD45 阴性(图 1—2, 见前置彩色插页 10), 阳性标志在 2—15 代间均无变化, 说明分离纯化的细胞符合 BMSCs 生物学特性^[5]。

2.2 BrdU 标记 BMSCs 在损伤脊髓内的存活和迁移

免疫组化发现, 对照组中未见 BrdU 阳性的细胞, 在 BMSCs 组动物脊髓内可见细胞核呈棕黄色的 BrdU 标记阳性的 BMSCs 存活, 脊髓灰质分布较白质密集, 第 7d 时可见向损伤区及周围的迁移, 少数标记阳性细胞在损伤对侧脊髓也可见到, 随着与注射点距离的增大, 阳性细胞逐渐减少, 迁移的细胞大部分集中在损伤的头尾间 4mm 处。移植后 14—28d, 脊髓中仍有 BMSCs 存活, 且与宿主整合良好, 但随时间推移, BrdU 阳性细胞数下降, 第 7、14、21、28d 时每平方毫米平均阳性细胞数分别为 137.20 ± 58.34 、 134.50 ± 53.58 、 102.15 ± 46.60 和 89.5 ± 32.76 。(见图 3, 见前置彩色插页 10)。

2.3 GFAP 的表达

移植组与对照组在伤后 1d 结果相似, 脊髓损伤区附近均可见不规则分布的 GFAP 阳性细胞。SCI 后损伤区附近 GFAP 表达随时间发展逐渐增强, 第 14d 时达到高峰, 星形胶质细胞则数量增多, 体积增大; 移植组各时间点染色深于对照组, GFAP 阳性细

胞高峰在伤后第 7d 持续至第 28d。伤后第 7、14、28d, 移植组与对照组的 GFAP 染色平均灰度值比较, 差异有显著性意义 ($P<0.05$)。见表 1。移植组在损伤脊髓交界区, 可观察到 GFAP 阳性表达弱于对照组 (图 4—7, 见前置彩色插页 10)。

2.4 NF 的表达

GFAP 和 NF 二者在伤后均持续增高, 相互之间呈明显的正相关, 但二者的变化也有不同之处, 在时间上 GFAP 的增高早于 NF 的增高, 在分布上 GFAP 在整个灰质的变化相似, 而 NF 在伤后早期只出现在前角运动神经元, 后角神经元的阳性出现较晚, 伤后 3d 仅偶有少量细胞和轴突阳性, 以后逐渐增多。在形态上, 神经元胞体及胞核均增大。BMSCs 移植

组大量 NF 阳性的细胞和轴突分布于损伤区周围, 伤后第 7、14、28d, 移植组与对照组的 NF 染色平均灰度值比较, 差异有显著性意义 ($P<0.05$)。见表 2 (见图 8—9, 见前置彩色插页 10)。

2.5 HE 染色

伤后 1d, 损伤区周围见灰质结构破坏, 可见出血, 白质也表现坏死, 伤后第 3d, 可见炎症细胞浸润, 细胞肿胀, 结构不清, 第 7d 以后伤处形成囊腔及胶质瘢痕。术后第 28d, 对照组见脊髓变性较重, 轴突数目较少, 微囊数目较多, 而移植组脊髓变性较对照组轻, 轴突数目较多, 微囊数目较少, 可见神经纤维和血管增生、修复更明显。

表 1 两组大鼠不同时间点损伤区周围脊髓 GFAP 染色阳性细胞灰度值

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

组别	鼠数	第 1d	第 3d	第 7d	第 14d	第 28d
移植组	6	119.51±18.50	79.53±14.35	51.48±12.34 ^①	40.33±11.65 ^①	59.08±10.54 ^①
对照组	6	131.22±21.34	98.66±14.50	78.55±14.56	73.65±12.64	99.43±12.45

①与对照组比较 $P<0.05$

表 2 两组大鼠不同时间点损伤脊髓周围 NF 染色阳性细胞灰度值

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

组别	鼠数	第 1d	第 3d	第 7d	第 14d	第 28d
移植组	6	110.51±19.60	84.65±15.65	64.67±12.53 ^①	52.43±11.80 ^①	43.09±10.69 ^①
对照组	6	125.24±20.65	103.86±16.80	90.65±15.87	80.85±12.74	75.46±12.85

①与对照组比较 $P<0.05$

3 讨论

BMSCs 具有自我更新和多向分化增殖潜能, 已有研究表明, BMSCs 是某些脑细胞如小神经胶质细胞和星形胶质细胞的前体细胞。BMSCs 可在成年大鼠脑内存活, 并沿已知的神经干细胞迁移路径进行整合、迁移。本研究采用大鼠脊髓半切模型进行 BMSCs 移植, 结果表明, 移植的 BMSCs 可在宿主脊髓中存活, 从第 7d 即可见到 BMSCs 自注射点向损伤部位及周围迁移。此外, BrdU 阳性细胞在脊髓灰质分布较白质密集, 可能是由于脊髓灰质血运丰富, 利于移植的 BMSCs 存活。移植的 BMSCs 在受损脊髓中存活、聚集和迁移的机制尚不清楚, 我们认为可能与损伤部位趋化因子的产生和释放有关。BMSCs 向神经分化以及神经修复作用的机制目前尚不明确, 可能与损伤局部的微环境变化有关。BMSCs 及其分化的神经胶质细胞含有可促进神经再生的营养因子及其受体, 有助于损伤神经组织的修复, 抑制不利于神经再生的瘢痕形成。另外也可能与移植细胞向神经环路的整合作用有关, 在脊髓半切部位存在移植 BMSCs 的充填和聚集, 弥合了脊髓之间的上下中断, BMSCs 来源的星形胶质细胞已形成明显的树突, 可能通过与神经细胞建立广泛的传入和传出联系甚至重建神经通路、髓鞘再生等机制诱导神经保护作用。总之, BMSCs 作为一种多潜能干细胞对中枢神经系统变性、缺血损伤等疾病具有显著的治

疗作用, 且具有其他细胞来源无法比拟的优势: ①获取方便, 可从患者本人骨髓取材; ②可在培养基中快速扩增; ③在宿主脑组织中可长期生存并进行整合; ④无免疫活性; ⑤可进行基因工程技术加工。因此, BMSCs 是一种理想的细胞来源, 为神经系统疾病的细胞和基因治疗展示了光明前景^[1-4]。

日本东京大学的研究者观察了 BMSCs 移植对脊髓神经细胞的作用及对脊髓损伤后再生的影响^[15], 推测实验治疗显效的机制可能为: BMSCs 移植提高了体内组织对损伤的修复能力, 维护了脊髓的完整性, 尽管移植细胞的数量在不断减少, 但受试动物确实显示了显著的肢体功能重建。

近年来, 国内外对 BMSCs 移植治疗脊髓损伤进行了的实验研究证明 BMSCs 可以在宿主脊髓中存活、发育、生长、分化, 并形成神经连接促进功能恢复。其可能的机制有: ①BMSCs 能作为一个细胞桥填充损伤区, 提供化学或机械的引导, 刺激脊髓神经生长, 引导损伤神经再生通过损伤区。②能够提供神经元, 补偿由于损伤破坏丢失的细胞结构。③能产生有益于宿主脊髓的各种因子, 这些营养因子能够挽救脊髓损伤后濒死的神经元, 促进神经再生^[1-3]。

GFAP 是构成神经胶质细胞的主要细胞骨架蛋白, 其表达的高低可以反映胶质细胞的功能状态。GFAP 主要用于标记损伤后胶质活动, 在正常情况下 GFAP 受星形胶质细胞的动力调节。损伤后增生

的 GFAP 阳性星形胶质细胞能促进星形胶质细胞有丝分裂,使原始祖细胞分化到成熟的星形胶质细胞。各种中枢神经系统损伤均可引起星形胶质细胞反应。实验证明,星形胶质细胞胞质裂解后能释放 NGF、bFGF、IL-1、IL-3、IL-6、TNF 等,脊髓损伤后,可能因为产生神经生长因子的需要,星形胶质细胞也增加它们细胞器的数量。然而星形胶质细胞在大鼠脊髓损伤的修复作用具有二重性,既可以抑制也可以促进损伤修复。成年大鼠脊髓损伤后,星形胶质细胞增生肥大,在囊肿和正常脊髓组织之间形成障碍,增生的瘢痕组织阻止轴突的生长^[6-8]。本实验结果表明,BMSCs 移植后第 7d,大鼠损伤脊髓 GFAP 免疫反应明显升高,持续在高水平达第 28d。而单纯脊髓损伤组 GFAP 免疫反应伤后第 14d 即明显下降,伤后第 28d 已基本恢复至伤后第 3d 的水平。因此,笔者的研究表明,脊髓损伤后应用 BMSCs 移植能使损伤区周围脊髓 GFAP 免疫反应增强,并能促进大鼠后肢功能的恢复。在本实验过程中也观察到 BMSCs 移植组在损伤交界区,GFAP 免疫反应表达明显降低,瘢痕组织较少;而在单纯脊髓损伤组,脊髓损伤交界区 GFAP 免疫反应表达明显增高,瘢痕组织较多。说明 BMSCs 移植后通过调节星形胶质细胞及其他胶质细胞反应,不仅可以减少瘢痕组织的形成,而且可以促进大鼠脊髓功能的恢复。

NF 是构成神经元胞体和神经轴突细胞骨架的主要成分,在维护神经元的功能和轴浆转运等一系列与脊髓损伤修复相关的病理生理变化中发挥着重要作用。成年哺乳动物脊髓损伤后的神经再生是指轴突的再生,轴突无合成蛋白的能力,所需功能和结构蛋白由细胞体合成经轴浆转运供给。NF 依相对分子质量的不同可分为 NF68、NF140 和 NF200 三种。其中 NF200 在正常情况下只存在于轴索中,而胞体不含或很少含有,故正常时 NF200 染色,胞体为阴性。当脊髓损伤后,损伤区内的神经细胞受创伤及继发因素的直接影响出现变性坏死、结构破坏及细胞崩解,失去对创伤的反应能力。而损伤区外的邻近神经元在创伤刺激及多种诱导因子的作用下,开始合成及积存 NF200,以适应神经再生的需要。NF200 积存于胞体内而使胞体着色。有研究表明脊髓不完全损伤后 NF200 阳性神经元的数量及神经元胞体着色的程度与后肢的功能恢复情况有密切的关系,说明 NF200 染色不仅能显示伤后神经元的形态,也能反映其功能状态^[11-14]。本实验选择损伤邻近段脊髓作为观察对象能较好地反映神经细胞在创伤后的修复反应。本实验中观察到脊髓损伤后 NF200 阳性神

经元地出现在时间上和分布上都有一定规律。在时间上存在一个潜伏期,伤后 3d 才出现变化,以后逐渐增强,在分布上,伤后早期主要为前角运动神经元着色,以后才出现侧角及后角神经元着色,至伤后 3 周时,后角神经元着色明显增强。不同部位神经元着色在时间上的这种差别反映了不同类型的神经元对创伤的反应是存在差别的,这可能与其功能及信号传导方向的不同有关。其内在机制还有待深入研究。本研究显示 BMSCs 移植后在不同时间点均可促进 NF 在损伤区周围脊髓内的表达。

本研究结果表明,BMSCs 移植后随时间的推移细胞数量逐渐减少,但促进了损伤区周围脊髓 GFAP 和 NF 的表达,并通过调节星形胶质细胞及其他胶质细胞反应抑制了损伤交界区胶质瘢痕的形成,从而促进了脊髓损伤后神经结构的修复和功能的恢复。

参考文献

- [1] Chopp M, Zhang XH, Li Y, et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation [J]. Neuro Report, 2000,11(11):3001—3005.
- [2] Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002,99(4):2199—2204.
- [3] Park KW, Eglitis MA, Mouradian MM, et al. Protection of nigral neurons by GDNF-engineered marrow cell transplantation[J]. Neuroscience Research, 2001, 40(4):315—323.
- [4] 赵宗茂,张庆俊,韩忠朝,等.骨髓间质干细胞移植对大鼠脊髓损伤神经功能恢复的影响[J].中华神经外科杂志,2003, 19(1):58—61.
- [5] Pittengex MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284(5411):143—147.
- [6] 吴立志,曾园山.促进损伤脊髓神经再生的研究进展[J].解剖学研究,2001,23(1):57—61.
- [7] Schwab ME. Repairing the injured spinal cord [J]. Science, 2002,295(5572):1029—1031.
- [8] Horner PJ, Gage FH. Regenerating the damaged central nervous system[J]. Nature, 2000,407(6807):963—970.
- [9] Baldwin S A, Brederick R, Blades D A, et al. Alterations in temporal/spatial distribution of GFAP and vimentin-positive astrocyte after spinal cord contusion with the new York University spinal cord injury device [J]. J Neurotrauma, 1998,15(12):1015—1026.
- [10] Hinkle D, Baldwin S, Scheff S, et al. GFAP and S100B gene expression in the hippocampus in response to mild cortical contusion[J]. J Neurotrauma, 1997, 40(4):729—738.
- [11] 胡俊勇,李佛保,廖威明,等.大鼠脊髓损伤后神经丝蛋白及胶质纤维酸性蛋白表达的变化及意义 [J]. 中山大学学报(医学科学),2003,24(2):129—131.
- [12] Zhang ZX, Casey DM, Julien J P, et al. Normal dendritic arborization in spinal motoneurons requires neurofilament subunit[J]. J Comp Neurol, 2002,450(2):144—149.
- [13] Uchida K, Baba H, Maezawa Y, et al. Progressive changes in neurofilament proteins and growth-associated protein-43 immunoreactivities at the site of cervical spinal cord compression in spinal hyperostotic mice[J]. Spine, 2002, 27(5):480—487.
- [14] Yabe JT, Wang FS, Chylinski T, et al. Selective accumulation of the high molecular weight neurofilament subunit within the distal region of growing axonal neurites [J]. Cell Motil Cytoskeleton, 2001,50(1):1—9.