

诱发电位在 GDNF 与 MSCs 联合移植法治疗猴脊髓损伤评价中的应用*

刘晓刚¹ 邓宇斌² 蔡 辉¹ 何杰民³ 沈慧勇³

摘要 目的:应用诱发电位技术评价控释胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)与骨髓间充质干细胞(MSCs)源性神经样细胞联合移植对猴脊髓损伤的治疗效果是否优于单纯细胞移植。**方法:**应用改良 Allen's 法制作猴脊髓损伤模型,实验组(4 只)给予控释 GDNF 与 MSCs 源性神经样细胞移植,对照组(4 只)给予单纯 MSCs 源性神经样细胞移植。进行运动诱发电位(MEP)和皮质体感诱发电位(CSEP)检测,比较两组间治疗 4—5 个月后诱发电位的差异。**结果:**联合移植组 MEP 潜伏期较单纯细胞移植组缩短($P<0.05$)、波幅较单纯细胞移植组高($P<0.01$);两组间 CSEP 的差异无显著性意义。**结论:**联合移植法对于损伤脊髓运动传导功能的恢复优于单纯细胞移植法;诱发电位对于评价脊髓功能的恢复程度具有重要的价值。

关键词 诱发电位;脊髓损伤;间充质干细胞;神经营养因子;猕猴

中图分类号:R394.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2009)-06-0509-03

Evoked potential in evaluating the effect of combined transplantation of GDNF and MSCs on spinal cord injury of mucaca multta/LIU Xiaogang, DENG Yubin, CAI Hui, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(6):509—511

Abstract Objective: To evaluate the effect of combined transplanation of controlled-release biomaterial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and mesenchymal stem cells (MSCs) induced prophase neuron-like cells on spinal cord injury repairing in mucaca multta with evoked potential technology. **Method:** Modified Allen's method was introduced to make spinal cord injury model. In one group mucaca multtas($n=4$) were transplanted with controlled-release biomaterial of GDNF and MSGs induced prophase neuron-like cells and in another group mucaca multta ($n=4$) were transplanted with only MSCs induced Prophase neuron like cells. Motor evoked potential (MEP) and cortical somatosensory evoked potential (CSEP) were detected at the time of pre-transplantation and 4—5 months after transplantation. **Result:** MEP and CSEP disappeared completely before transplantation and recovered partially 4—5 months after transplantation. Only the difference of MEP between two groups had statistical significance. **Conclusion:** Combined transplantation of GDNF and MSCs for spinal cord injury presents much more promising prospect than only cells transplantation. Evoked potential technology is a meaningful method to evaluate the effect for spinal cord injury.

Author's address Department of Pathology, Chui Yangliu Hospital of Beijing, 100022

Key words evoked potential; spinal cord injury; mesenchymal stem cells; neurotrophic factor; mucaca multta

来源于骨髓中的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)当前在治疗神经损伤系统疾病的研究中被广泛关注,被认为是具有治疗潜能的种子细胞之一,并在治疗脊髓损伤的研究中取得一定进展^[1-2]。本研究利用隐丹参酮将猴 MSCs 诱导为早期神经样细胞,同时联合控释胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)移植治疗猴脊髓损伤,应用诱发电位技术客观评价治疗的效果是否优于单纯细胞移植法。

1 材料与方

1.1 实验动物

健康雄性恒河猴 8 只(实验组、对照组各 4 只,

随机分配),年龄 2—3 岁,体重 3—4kg,购自华南灵长类动物研究中心。

1.2 动物模型的制作及干预

按照改良 Allen 法将所有实验动物造成急性重度脊髓损伤模型:盐酸氯胺酮注射液(10mg/kg)与安定注射液(0.5mg/kg)复合麻醉,肌肉注射,俯卧位,常

* 基金项目:国家自然科学基金(30271327)

1 北京市垂杨柳医院病理科,北京,100022

2 通讯作者:邓宇斌,教授,博士生导师,中山大学中山医学院病理生理学教研室,广东广州,510080

3 中山大学附属第二医院骨科

作者简介:刘晓刚,男,住院医师,硕士

收稿日期:2008-08-27

规消毒铺巾,手术切除第8腰椎棘突及椎板,修剪椎板,充分暴露脊髓硬膜,安装脊髓致伤器(中山大学仪器厂生产),玻璃套管下端呈圆弧形,与脊髓表面吻合良好,金属棒作自由落体运动时与套管间无摩擦,致伤能量 $6000\text{g}\cdot\text{cm}$ ($500\text{g}\times 12\text{cm}$),术后给予头孢拉定预防感染, 50mg/kg ,肌注,2次/d。脊髓休克期间(持续约1周)给予人工排尿、排便,2次/d。损伤后第10天,重新打开原有伤口,暴露损伤的脊髓,按照本室方法消化计数用隐丹参酮预诱导1.5h的猴MSCs,实验组将 3.0×10^6 个/kg与含 $2\mu\text{g}$ GDNF的单甲氧基聚乙二醇聚乳酸嵌共聚体(中山大学高分子研究所合成)用 $200\mu\text{l}$ 磷酸盐缓冲液制成悬液,局部注射到脊髓损伤部位。对照组给予仅含同等细胞量的磷酸盐缓冲液悬液。

1.3 诱发电位检测

应用美国 Viking IV 型电生理仪分别于移植术前、治疗后4—5个月间对实验动物进行运动诱发电位(motor evoked potential, MEP)及皮质体感诱发电位(cortical somatosensory evoked potential, CSEP)检测。

1.3.1 MEP 检测:刺激点:兴奋下肢胫前肌,记录电极置于靶肌肌腹表面,负极位于正极头侧,两电极间相距1.5cm,极间阻抗 $<5000\Omega$,地线置于股内侧肌,滤波频带2Hz—10kHz,线圈中心置于对侧头顶皮质运动区,刺激采用最大输出强度的60%,敏感度200mV,以靶肌出现收缩为准。

1.3.2 CSEP 检测:刺激部位:踝内后方,刺激胫后神经,频率2.3Hz,波宽0.3ms,刺激强度为两倍基强度,同时检测膈窝电位(PF)作为参考,接地电极置于胫外部皮肤。采用银-氯化银针状记录电极,置猕猴头顶 Cz' 点(负极),FPz 点(正极),刺激以脚趾轻微抽动为标志,平均叠加次数200次以上,带通10—1000Hz,敏感度 $10\mu\text{V}$,分析时间100ms,信号输入 Viking IV 系统的前置放大器进行放大、平均,记录潜伏期与波幅。

1.4 统计学分析

应用 SPSS11.0 统计软件,每侧肢体按一个样本计,每组样本量 $n=8$,组间诱发电位比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

移植术前所有实验动物 MEP 及 CSEP 均消失,治疗后4—5个月,两组动物的 MEP 与 CSEP 均有一定程度的恢复(图1,2),MEP 组间比较差异具有显著性意义,CSEP 组间比较无显著性意义(表1)。



图1 实验组 MEP 图像,呈多极性波



图2 实验组 CSEP 图像,呈正(P)、负(N)双向波型

表1 两组动物 MEP 和 CSEP 的潜伏期和波幅 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

	联合移植组($n=4$)	细胞移植组($n=4$)
MEP 潜伏期(ms)	28.63 ± 1.42^{①}	30.51 ± 1.28
MEP 波幅(mV)	0.50 ± 0.06^{②}	0.41 ± 0.04
CSEP 潜伏期 P(ms)	16.69 ± 0.36^{③}	16.78 ± 0.24
CSEP 潜伏期 N(ms)	20.53 ± 0.10^{③}	20.58 ± 0.08
CSEP 波幅(μV)	6.79 ± 0.37^{③}	6.50 ± 0.36

与细胞移植组相比:① $P<0.05$,② $P<0.01$,③ $P>0.05$

3 讨论

由于脊髓损伤后几无自身修复的可能,神经功能的损害常是不可逆的,而目前临床仍缺乏有效的治疗方法,给患者带来了无穷的痛苦,也给家庭和社会造成了沉重的负担。骨髓间充质干细胞(BMSCs)是骨髓中的与维持造血微环境相关的具有增殖与分化潜能的细胞群体,与胚胎干细胞、神经干细胞相比,其具有获取容易、体外易于培养、扩增速度快、便于进行自体移植等特点^[3],并且具有横向分化为神经干细胞的生物学特性^[4-5],因此,BMSCs 为脊髓患者的康复带来了曙光。研究发现,移植的大鼠 MSCs 可以在体内存活,迁移到脊髓部位并且分化为神经元^[6]。研究人员将成人 MSCs 通过静脉注射的方式输入非免疫抑制脊髓损伤大鼠体内^[7],大鼠的运动功能获得了显著提高,移植细胞渗入脊髓腹外侧白质区并且分化为少突胶质细胞而不是神经元, MSCs 可能通过促进损伤轴突生长和髓鞘再生的方式达到了治疗脊髓损伤的效果;同时证实了 MSCs 具有较低的免疫原性,可以显著降低移植排斥反应,这对异体移植来说是十分有利的。因此, MSCs 在治疗脊髓损伤方面具有很大的潜在价值。

近年来电生理技术发展迅速,尤其是 CSEP 和 MEP 在神经疾病领域的应用取得了很大进展,其灵

敏度高, 在客观评估脊髓功能及治疗效果等方面具有极大的价值。Lee KH 等^[8]研究发现, 将人 MSCs 于大鼠脊髓损伤后 1 周植入损伤部位, 2 个月后实验组大鼠与对照组大鼠相比, 其后肢功能获得了较高的 BBB 评分及痛觉程度。进一步的诱发电位检测显示, 实验组体感诱发电位潜伏期较对照组明显缩短, 表明诱发电位的变化是与脊髓功能变化相一致的。Lim JH 等^[9]应用诱发电位技术发现, 脐带血来源的间充质干细胞可以显著提高治疗后狗脊髓的神经传导速度, 从而证明了治疗的有效性。本研究中, 脊髓损伤后的 MEP 及 CSEP 均无法引出, 表明脊髓损伤模型的制作是成功的。治疗后, 联合移植组与单纯细胞移植组均对猕猴脊髓损伤产生了一定程度的修复作用, 这表现在治疗后二者的 MEP 与 CSEP 均有不同程度的恢复, 与正常值比较, 其潜伏期延长、峰值降低^[10-11]。与单纯细胞移植组相比, 联合移植组 MEP 及 CSEP 的潜伏期缩短, 波幅增高, 表明前者对脊髓神经传导功能的治疗效果要优于后者, 可能与对轴突、髓鞘及神经元的修复作用更佳有关。由于脊髓损伤后的波幅为零、潜伏期为无穷大, 因此, 此时的诱发电位恢复程度是与脊髓功能恢复程度呈正相关的。一般认为, MEP 的恢复更具有临床意义, 可以反映患肢的运动功能状况; 与 500mV 敏感度条件相比, 其图像更易识别, 更容易观察电位的变化^[10]。虽然联合移植组 CSEP 与单纯细胞移植组相比, 在潜伏期、波幅等方面的差异不具有显著性意义, 但这种差异在实际中可能仍具有重要的临床意义。

本实验结果说明, 控释 GDNF 与 MSCs 源性神经元样细胞联合移植能更有效的改善损伤脊髓的神经功能。这可能与 GDNF 的增效作用有关, 其作用机制可能是: 神经营养作用, 促进轴突与髓鞘的再生; 抑制瘢痕的形成; 对 MSCs 源性神经元样细胞的保护作用及二者之间的协同作用。

参考文献

- [1] 李雷, 吕刚, 王欢, 等. 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[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(4): 299—302.
- [2] Dasari VR, Spomar DG, Cady C, et al. Mesenchymal stem cells from rat bone marrow downregulate caspase-3-mediated apoptotic pathway after spinal cord injury in rats[J]. Neurochem Res, 2007, 32(12): 2080—2093.
- [3] 孙晓艳, 范洪学. 骨髓间充质干细胞的研究进展[J]. 吉林医学, 2007, 28(2): 156—159.
- [4] 姜焕荣, 孙旭芳. 大鼠骨髓间充质干细胞体外培养及分化为神经干细胞的实验研究[J]. 卒中与神经疾病, 2006, 13(6): 335—338.
- [5] Gordon D, Glover CP, Merrison AM, et al. Enhanced green fluorescent protein-expressing human mesenchymal stem cells retain neural marker expression[J]. J Neuroimmunol, 2008, 193(1-2): 59—67.
- [6] 余良宏, 康德智, 林建华, 等. 大鼠骨髓间质干细胞静脉移植在脊髓损伤中的定向迁移 [J]. 立体定向和功能神经外科杂志, 2006, 19(1): 17—20.
- [7] Cízková D, Rosocha J, Vanický I, et al. Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat [J]. Cell Mol Neurobiol, 2006, 26 (7-8): 1167—80.
- [8] Lee KH, Suh-Kim H, Choi JS, et al. Human mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery following acute spinal cord injury in rats[J]. Acta Neurobiol Exp (Wars), 2007, 67(1): 13—22.
- [9] Lim JH, Byeon YE, Ryu HH, et al. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs [J]. J Vet Sci, 2007, 8(3): 275—82.
- [10] 刘晓刚, 邓宇斌, 刘祖国, 等. 骨髓间质干细胞源性早期神经元与控释神经营养因子移植治疗猴脊髓损伤的研究[J]. 中华神经外科杂志, 2006, 22(10): 599—601.
- [11] 刘晓刚, 邓宇斌, 刘祖国, 等. 神经元样细胞与控释神经营养因子联合移植对脊髓损伤猴后索结构修复和功能恢复的作用[J]. 中国临床康复, 2005, 9(26): 96—99.