

神经前体细胞巢蛋白在大鼠脊髓损伤后的表达*

李俊岑¹ 丁培培¹ 刘姿辰¹ 张 剑¹ 梁 楠² 张 晓^{2,3}

摘要

目的:探讨成年大鼠脊髓损伤后损伤(SCI)区局部巢蛋白(nestin)的表达及意义。

方法:应用 Allen 法建立大鼠 SCI 模型,行为学评分采用 BBB 评分,用病理学和免疫组织化学方法检测脊髓在不同时段的病理改变和 nestin 的表达变化。

结果:伤后第 1 天,脊髓实质灶状出血,小血管栓塞,部分神经细胞细胞核碎裂,见损伤区附近、软脊髓膜下的白质和脊髓中央管区有 nestin 表达,BBB 评分低,随后增加,1—2 周恢复幅度加大。第 3 天后损伤灶出现大量胶质细胞,损伤组织液化。第 5 天后液化灶逐渐扩大,出血减少,阳性神经元和阳性反应的平均积分光密度值达到高峰($P<0.05$)。第 7 天后神经细胞退行性变更为严重,部分神经细胞崩解仅留其轮廓,胶质细胞增生明显。2 周后出血已基本吸收,以损伤处为中心,囊腔开始形成, nestin 表达明显下调($P<0.05$)。

结论:脊髓损伤可诱导损伤区周围短暂的 nestin 阳性表达, nestin 可能在脊髓损伤后的再生与修复中起重要作用。

关键词 脊髓损伤;巢蛋白;Allen 撞击器;Basso, Beattie, Bresnahan 运动功能评分

中图分类号:R651.2,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-09-0833-05

Expression of nestin of neural precursor cell after spinal cord injury in rats/LI Juncen,DING Peipei, LIU Zichen,et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(9): 833—837

Abstract

Objective:To study the expression and significance of nestin in the areas adjacent to the injured site after spinal cord injury(SCI) in rats.

Method:Each rat received contusion on its spinal cord at T9 with modified Allen's impactor to establish SCI model. The behavioral evaluation was performed with Basso, Beattie & Bresnahan locomotor rating scale (BBB scale).The pathological study included hematoxylin and eosin (HE) staining, and immunohistology staining for nestin.

Result: The spinal cord lesion as bleeding, small vessel thrombosis, some nerve cell karyorrhexis in myeloid tissue could be seen at the 1st d after injury. The expression of nestin could be seen near the damage zone, spinal cord white matter under spinal pia-mater and the central canal of spinal cord.BBB score lowered at the 1st d after injury, and the recovery range increased gradually in 1—2 weeks.There were a lot of glial cells proliferation, tissue liquefaction in damaged zone at the 3rd d after injury. Liquefaction area of damage areas expanded gradually, bleeding reduction, and the average integral optical density of nestin-immunoreactive neurons reached the peak ($P<0.05$) at the 5th d after injury. Nerve cells occurred serious degeneration, some nerve cells appeared necrosis, with marked hyperplasia of glial cells at the 7th d after injury. Two weeks later the bleeding absorbed basically, cysts began to form around the damage center and the nestin expression reduced significantly($P<0.05$).

Conclusion:SCI can induce the transient expression of nestin in the areas adjacent to injured site, which may play an important role in the repair and restoration of spinal cord.

DOI10.3969/j.issn.1001-1242.2010.09.004

* 基金项目:四川省科技厅课题(06J13-023);成都医学院创新实验项目(2009154)

1 成都医学院,610081;2 成都医学院实验技术教研室;3 通讯作者

作者简介:李俊岑,男,本科在读学生;收稿日期:2009-09-12

Author's address Chengdu Medical College Experimental Technology Center, Chengdu Sichuan Province, PRC, 610081

Key words spinal cord injury; nestin; Allen's impactor; Basso, Beattie & Bresnahan locomotor rating scale

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种严重的中枢神经系统损伤,常造成不同程度的伤残,甚至死亡。脊髓损伤后,神经元的丧失不可避免,应用外源性的神经干细胞/前体细胞移植来替代受损的神经组织,其效果均不理想,主要是移植后的细胞存活比例、迁移能力及定向分化能力都非常有限,很难达到治疗目的。自从 Reynolds(1992)等^[1]在成年小鼠脑纹状体中分离出能在体外不断分裂增殖、具有多向分化潜能的神经干细胞之后,人们又在胚胎和其他成体哺乳动物神经系统发现、分离和纯化了神经干细胞和神经前体细胞,给利用内源性神经干细胞作为治疗工具治疗以神经元死亡为特征的疾病带来了希望^[2-4],利用自身的资源来重建脊髓功能,更适合于临床运用,具有广阔的研究和应用前景。但是,SCI后,这些内源性神经干细胞在活体内的解剖定位及组织形态尚未完全明确,脊髓的微环境怎样引导神经干细胞增殖还不清楚,神经干细胞增殖的部位和时间的差异也不清楚。因此,本实验应用组织病理学及免疫组化标记方法检测大鼠脊髓损伤后不同时段损伤区附近神经干细胞标志物巢蛋白(nestin)的表达,并探讨其在SCI修复过程中的意义。

1 材料与方法

1.1 动物模型制作

采用3月龄SD大鼠36只,雌雄不限,体重200—220g,随机分为正常对照组和SCI后第1、3、5、7、14天组。用1.5%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(用量45mg/kg体重),背部剃毛,常规消毒。以T10为中心,纵行切开皮肤及皮下组织,剥离椎旁肌肉并暴露棘突与椎板,咬除T10椎板,模仿Allen's法用自行加工设计的打击装置制备动物模型,即10g冲击棒自12.5mm高处自由坠落致伤脊髓。缝合伤口,术后协助大鼠排尿,每日早晚各1次,持续1—2周,至大鼠恢复反射性排尿。在此期间注意观察皮肤有无压疮或感染、下肢有无溃烂。对照组大鼠仅切除相应椎板后即缝合伤口。动物饲养室温维持在25—30℃。

1.2 方法

1.2.1 HE染色和免疫组织化学染色(immunohistochemistry staining, IHC):标本用4%多聚甲醛固定后制作5μm厚的石蜡切片。每例标本间隔取石蜡切片20张,入60℃烤箱30min,梯度酒精脱水,一部分常规HE染色。另一部分高压热抗原修复,非生物素二步法进行nestin免疫组化染色(二步法免疫组化检测试剂,北京中杉金桥生物技术有限公司, PV-6002):用3% H₂O₂预处理10min,封闭内源性过氧化酶,用0.01mol/L PBS漂洗3次,每次2min。用正常山羊血清在37℃温箱中封闭非特异性抗原10min。用0.01 mol/L PBS漂洗3次,每次2min。用nestin抗体(效价1:100, upstate)孵育切片,37℃ 1h,或入冰箱(4℃)过夜,用0.01 mol/L PBS漂洗3次,每次2min。用羊抗鼠二抗(中杉金桥公司产品)37℃恒温孵育30min,用PBS洗3次,每次2min;把切片入DAB-H₂O₂显色液,室温下反应,待显色充分,及时用0.01mol/L PBS漂洗2次,每次2min;苏木素复染,梯度酒精逐级脱水,二甲苯透明,树胶封片。

1.2.2 阴性对照实验:用PBS代nestin抗体,其余步骤不变。

1.2.3 大鼠后肢运动功能观察:采用BBB (Basso, Beattie & Bresnahan locomotor rating scale)运动功能评分方法^[10]。

1.2.4 结果观察:采用OLYMPUS数码照相机采集图像进行观察分析。观察nestin阳性产物在脊髓的分布,分别计数正常组,术后第1天组、第5天组及第14天组脊髓内、中、外三个视野1028μm²面积内nestin的阳性细胞数,测量阳性产物的光密度值。

1.3 统计学分析

各组阳性细胞数和平均积分光密度值数据以均数±标准差表示,用SPSS 13.0软件包,采用方差分析LSD法进行组间比较。

2 结果

2.1 BBB评分结果

对照组大鼠及SCI组损伤前大鼠BBB评分均

为 21.00 分,SCI 后第 5 天组(5.67 ± 4.755)和第 7 天组(7.40 ± 3.893) 均明显大于第 1 天组(0.93 ± 1.386)和第 3 天组(2.14 ± 3.317)($P < 0.05$)。第 14 天组(12.60 ± 1.265)明显大于 5 天组与第 7 天组($P < 0.05$),SCI 各组 BBB 评分均明显小于对照组($P < 0.05$)。

2.2 HE 染色结果

SCI 后第 1 天见脊髓实质灶状出血,小血管栓塞,部分神经细胞细胞核碎裂(图 1)。第 3 天损伤灶出现大量胶质细胞,损伤组织液化(图 2)。SCI 后第 5 天,液化灶逐渐扩大,出血减少(图 3)。损伤后第 7 天,神经细胞退行性变更为严重,部分神经细胞崩解仅留其轮廓,胶质细胞增生明显(图 4)。SCI 后 2 周,以损伤处为中心,灰质大部崩解,残存部分周围白质,囊腔开始形成,但与周围分界尚不完全清楚,出血已基本吸收,周围残存白质进一步减少(图 5)。

2.3 免疫组化染色结果

2.3.1 脊髓内 nestin 免疫阳性反应物的分布概况: 在本实验中观察到 nestin 阳性神经元主要分布在软脊膜下的脊髓白质和中央管周围的脊髓灰质内。nestin 在各组的神经元和神经胶质细胞中有表达,但以神经胶质细胞的表达为主,阳性反应物主要定位在胞核、胞浆和基质中。部分纤维的突起也呈阳性反应。

2.3.2 SCI 后 nestin 的变化: 在正常 SD 大鼠脊髓中央管的背侧或腹侧, nestin 免疫染色呈阴性反应。

SCI 后第 1 天,脊髓实质中可见少量的胶质细胞 nestin 免疫反应阳性,在脊髓中央管的上皮细胞可见少量的免疫反应阳性物,呈 nestin 弱染色的突起(图 6)。SCI 后第 5 天,正常组及手术组者比较,脊髓灰质中可见神经胶质细胞 nestin 免疫阳性反应明显增强,在软脊髓膜下观察到大量的 nestin 免疫染色阳性细胞,胞体为多角形或卵圆形,有较多突起,部分细胞突起的伸展方向和细胞的长轴一致,且阳性神经元数明显增多($P < 0.05$)。在脊髓中央管的上皮细胞周围可见大量的免疫反应阳性物,神经突起的免疫反应呈 nestin 强阳性,与第 1 天组比较平均积分光密度值明显增加($P < 0.05$)(图 7)。SCI 后第 14 天,在脊髓中央管的上皮细胞和神经突起 nestin 免疫反应阳性物减弱,在脊髓的软脊髓膜下神经胶质细胞和突起 nestin 免疫阳性表达明显下调($P < 0.05$)(图 8)。免疫组织化学方法对照实验结果均为阴性。

3 讨论

应用神经干细胞治疗中枢神经系统的损伤已经日益成为神经生物学领域的热点,同时也为中枢神经系统退变性疾病提供了潜在的治疗价值。体外细胞培养研究结果表明,在成年哺乳类动物的中枢神经系统中存在着具有多向分化潜能的干细胞^[9],分布于大脑皮质、海马齿状回、室管膜下层、纹状体、脊髓中央管室管膜区等部位^[11]。nestin 属于第Ⅳ类中间丝

表 1 各组脊髓 nestin 阳性细胞数及平均积分光密度值 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

	正常组	手术后第 1 天组	手术后第 5 天组	手术后第 14 天组
平均积分光密度值	0.63 ± 0.709	1.66 ± 0.371^{①}	3.35 ± 0.370^{①③}	1.23 ± 0.330^{②④⑤}
阳性细胞数	4.00 ± 6.083	112.80 ± 11.819^{①}	460.50 ± 22.331^{①③}	76.67 ± 49.541^{①④⑤}

与正常组比较:① $P < 0.05$,② $P > 0.05$;与术后 1 天组比较:③ $P < 0.05$,④ $P > 0.05$;与术后 5 天组比较:⑤ $P < 0.05$

图 1 SCI 后第 1 天, 脊髓 T9 节段 HE 染色结果



脊髓实质灶状出血,部分神经细胞坏死 (HE $\times 400$)

图 2 SCI 后第 3 天, 脊髓 T9 节段 HE 染色结果



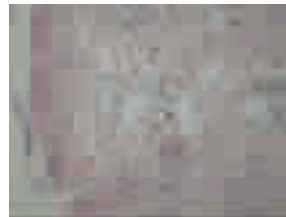
损伤灶区出现大量胶质细胞,部分区域液化 (HE $\times 200$)

图 3 SCI 后第 5 天, 脊髓 T9 节段 HE 染色结果



液化灶逐渐扩大,出血区域减少 (HE $\times 200$)

图 4 SCI 后第 7 天, 脊髓 T9 节段 HE 染色结果



部分神经细胞崩解仅留其轮廓,胶质细胞增生明显 (HE $\times 400$)

图 5 SCI 后第 14 天, 脊髓 T9 节段 HE 染色结果



出血已基本吸收,囊腔开始形成 (HE ×400)

图 6 SCI 后第 1 天, 脊髓 T9 节段 nestin 表达情况



脊髓中央管上皮细胞周围和部分上皮细胞胞质中可见少量的 nestin 免疫反应阳性物,细胞突起呈 nestin 弱染色 (免疫组化染色 ×400)

图 7 SCI 后第 5 天,脊髓 T9 节段 nestin 表达情况



脊髓中央管上皮细胞大量增殖,由单层变为复层,周围可见大量 nestin 阳性细胞,其突起呈 nestin 强染色 (免疫组化染色 ×400)



脊髓软脊髓膜下神经胶质细胞和突起呈 nestin 免疫反应强阳性,向脊髓中心迁移 (免疫组化染色 ×400)

图 8 SCI 后第 14 天,脊髓 T9 节段 nestin 表达情况



脊髓损伤区 nestin 免疫反应阳性细胞参与组织的修复 (免疫组化染色 ×40)



脊髓损伤区神经胶质细胞和突起呈 nestin 免疫反应阳性,参与损伤后组织的修复 (免疫组化染色 ×400)



脊髓软脊髓膜下神经胶质细胞和突起的 nestin 免疫反应阳性物减弱 (免疫组化染色 ×400)

蛋白,分布在细胞浆内,参与细胞骨架的构成。在中枢神经系统发育过程中,主要表达于未分化、具有分裂能力的细胞中,当神经细胞迁移基本完成后,其表达开始下降,并随细胞成熟而停止表达。在离体培养的成年中枢神经系统的多潜能前体细胞中也有 nestin 表达。在组织中 nestin 的表达有时间顺序性,作为必需的先导蛋白最先表达,其他中间丝成员的表达相继,这对于前体细胞的分化有重要意义。在哺乳动物中枢神经系统内, nestin 被认为是中枢神经系统发育过程中神经干细胞或神经前体细胞的标志之一^[12-13],因而 nestin 阳性表达细胞可被看做神经前体细胞。目前使用神经干细胞移植治疗 SCI 存在的问题是:尽管已证实干细胞移植有一定的效果^[5-9],但远未达到治愈 SCI 的目的,这是因为调控移植的神经干细胞在受体内存活、分化及增殖的机制仍不清楚。

本研究结果显示在脊髓的不同区域有 nestin 阳性细胞表达。在 SCI 区域, nestin 阳性细胞散在分布

于损伤的白质和灰质中,神经细胞的胞质和轴突中可见大量免疫反应阳性物颗粒。在脊髓室管膜区域,脊髓中央管上皮细胞大量增殖,由单层变为复层,周围可见大量 nestin 阳性细胞,其突起呈 nestin 强染色,并向损伤区域伸展。在软脊髓膜下区域,神经胶质细胞和突起呈 nestin 免疫反应强阳性,向脊髓中心迁移。这些实验结果提示,SCI 可能诱发脊髓神经细胞中某一种或某些基因的表达,使其神经细胞表现出神经干细胞或前体细胞的性质,或者是 SCI 后神经细胞所生存的内环境发生改变,使神经细胞回到原始增殖分化的状态。

本研究结果还显示在 SCI 后 nestin 阳性细胞在不同的时间中表达有差异。在伤后第 24 小时, nestin 阳性表达开始出现,伤后第 5 天达高峰,伤后 2 周下调,提示神经前体细胞的增殖活性不仅与 SCI 的类型有关,而且与 SCI 的程度和损伤的时间相关,损伤的程度越重和损伤的时间越长,导致的脊髓缺血、细胞凋亡、坏死、丢失的程度越严重,则神经前体细胞

的增殖活性越强。因此,SCI后2周可能是移植神经干细胞治疗SCI的“窗口期”,此时移植治疗可能会有利于损伤的修复与功能重建。

Lin R等^[14]的实验结果提示 nestin 阳性细胞可能来源于SCI后室管膜管内细胞向胚胎期多潜能细胞转化、迁移而来,或者是脊髓内或室管膜管内存在着“静止”或“休眠”的干细胞亚群,在致伤因子作用下其分裂、分化的潜力被激活,从而出现增殖现象。脑挫伤动物模型的研究结果^[15]与本实验SCI动物模型的研究结果相类似,即也在伤后1周左右,损伤灶附近 nestin 阳性表达细胞明显增加。Shibuya S等^[16]研究也发现,急性脊髓打击伤后,来源于中央管室管膜细胞的星形胶质细胞主要集聚于脊髓中央管周围和灰质内的血管周围,而来源于软脊膜下星形胶质细胞的星形胶质细胞主要集聚于脊髓白质内的血管周围,而且,增殖的室管膜细胞大多(77%)分化成星形胶质细胞。

尽管神经干细胞治疗SCI是目前研究热点,但是神经干细胞在体内存活、分化及增殖的机制仍需进一步研究。急性脊髓打击伤后,大量 nestin 阳性细胞表达,提示SCI后,脊髓的微环境可能诱导神经干细胞产生,问题的关键是这些神经干细胞怎样转化为具有功能的神经元。因此,SCI治疗的关键是促进神经元的生长。

参考文献

- [1] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. *Science*, 1992, 255: 1707—1710.
- [2] Thored P, Arvidsson A, Cacci E. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3): 739—747.
- [3] Goldman S. Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(7): 862—871.
- [4] 黄艳君. 成体内源性神经干细胞的激活及活化策略[J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22(4): 380—382.
- [5] Blesch A, Lu P, Tuszynski MH. Neurotrophic factors, gene therapy, and neural stem cells for spinal cord repair [J]. *Brain Res Bull*, 2002, 57(6): 833—838.
- [6] Akiyama Y, Honmou O, Kato T, et al. Transplantation of clonal neural precursor cells derived from adult human brain establishes functional peripheral myelin in the rat spinal cord [J]. *Exp Neurol*, 2001, 167(1): 27—39.
- [7] 闫铭, 罗卓荆. 细胞移植在脊髓损伤再生修复中的作用 [J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2004, 3(2): 186—187.
- [8] 张建军, 陈先, 刘兰泽, 等. 组织工程化干细胞移植治疗大鼠急性脊髓损伤的研究[J]. *中国康复医学杂志*, 2009, 24(4): 335—337.
- [9] 张燕青, 曾园山, 曾湘, 等. 神经营养素-3 基因修饰雪旺细胞和神经营养素-3 受体基因修饰脊髓间充质干细胞联合移植促进脊髓损伤大鼠神经元存活的研究[J]. *中国康复医学杂志*, 2009, 24(7): 577—581.
- [10] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight 2 drop device versus transaction [J]. *Exp Neurol*, 1996, 139(2): 244—256.
- [11] 魏丽春, 曾丽华, 田芙蓉, 等. 正常成年大鼠中枢神经系统内 nestin 蛋白免疫阳性结构的分布 [J]. *第四军医大学学报*, 2003, 24(22): 2072—2075.
- [12] Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein [J]. *Cell*, 1990, 60(4): 585—595.
- [13] Almazan G, Vela M, Molina-Holgado E, et al. Re-evaluation of nestin as a marker of oligodendrocyte lineage cells [J]. *Micirc Res Tech*, 2001, 52(6): 753—756.
- [14] Lin R, Matesic DF, Marvin M, et al. Re-expression of the intermediate filament nestin in reactive astrocytes [J]. *Neurobiol Dis*, 1995, 2(2): 79—85.
- [15] Holmin S, Almqvist P, Lendahl U, et al. Adult nestin-expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury [J]. *Eur J Neurosci*, 1997, 9(1): 65—75.
- [16] Shibuya S, Miyamoto O, Itan O, et al. Temporal progressive antigen expression in radial glia after compressive spinal cord injury in adult rats [J]. *Glia*, 2003, 42(21): 172—183.