·基础研究·

嗅鞘细胞移植结合步行训练对大鼠脊髓挫伤部位神经递质水平和神经营养因子表达的影响*

叶超群[1] 翟 蕾[2] 蔡艳华[1] 岳 峰[3] 孙天胜[1,5] 黄红云[4]

摘要

目的：初步研究嗅鞘细胞移植、步行训练、嗅鞘细胞移植结合步行训练后脊髓损伤部位神经递质含量和神经营养因子蛋白水平的变化，探索嗅鞘细胞移植结合步行训练促进大鼠神经功能恢复作用的可能机制。

方法：鼠龄（75±1）d的雌性SD大鼠32只，分为A、B、C、D四组，制作脊髓挫伤模型后，A组行嗅鞘细胞移植结合步行训练，B组行嗅鞘细胞移植，C组行步行训练结合改良Eagle培养基（DMEM）注射，D组行DMEM注射。细胞移植和DMEM注射在造模后2周进行，步行训练利用大鼠活动平板进行，自伤后1周开始，每周5d，每天1次，每次15—30min，共训练10周。伤后11周取材，反相高效液相色谱—荧光检测法测定脊髓损伤部位5羟色胺（5-HT）、多巴胺（DA）、去甲肾上腺素（NE）等几种神经递质含量，Western Blot检测脑源性神经营养因子（BDNF）、神经生长因子（NGF）、神经营养因子3（NT-3）蛋白表达。

结果：①各组损伤部位DA和DOPA均未测出，C组5-HT、NE含量较其他各组出现增高趋势，A组较B、D组出现增高趋势，却较C组出现降低趋势；②B组BDNF、NGF、NT-3蛋白水平较其他各组出现增高趋势，A组BDNF、NT-3水平较C、D组出现增高趋势，但却较B组出现降低趋势；但上述差异不具有显著性意义。

结论：伤后1周开始步行训练、2周进行嗅鞘细胞移植的结合型策略不能促进脊髓损伤部位神经营养因子表达和脊髓神经递质分泌。

关键词 脊髓损伤；嗅鞘细胞移植；步行训练；神经递质；神经营养因子

中图分类号：R744, R493 **文献标识码**：A **文章编号**：1001-1242（2014）-08-0702-05

The effect of olfactory ensheathing cells transplantation combining with step training on neurotransmitter level and neurotrophic factor protein expression in spinal cord injury site in rats with spinal cord contusion/YE Chaoqun, ZHAI Lei, CAI Yanhua, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29 (8): 702—706

Abstract

Objective: To explore the influence of olfactory ensheathing cell(OECs) transplantation combined with treadmill step training on neurotransmitter level and neurotrophic factor protein expression in spinal cord injury site in rats with spinal cord contusion.

Method: Thirty-two adult female Sprague Dawley rats aged (75±1)d were subjected to experimental spinal cord contusion at T10 level using a New York University impactor at the height of 25 mm. Rats were then randomly divided into 4 groups: group A, OECs transplantation combined with step training (OECs-step training) group; Group B, an OECs transplantation(OECs) group; Group C, step training combined with Dulbecco's modification of Eagle's medium(DMEM) injection (step training-DMEM) group; Group D, DMEM injection

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.08.002

*基金项目：国家自然科学基金资助项目（81171862）

1 北京军区总医院骨科，北京，100700；2 中国康复研究中心ICU；3 首都体育学院研究生部；4 北京市虹天济神经科学研究院；5 通讯作者

作者简介：叶超群，女，博士，主任医师；收稿日期：2013-11-16

(SCI-DMEM) group. The OECs transplantation and DMEM injection were performed at 2 weeks post-injury. Step training began at the 7th d post-injury and consisted of daily sessions (once daily, 5d a week, for 10 weeks) of quadrupedal treadmill training, starting from 15 min and gradually increasing to 30 min daily, at speeds starting from 3m/min and gradually increasing in accordance to the condition of rats. At the 11th week postinjury, all the rats were executed and the spinal cord encompassing the injury site were removed. The levels of 5-hydroxytryptamine(5-HT), dopamine(DA), 3,4-dihydroxyphenyl alanine(DOPA) and norepinephrine (NE) of spinal cord lesion site were assessed by reversed-phase high performance liquid chromatographic methodologies(RP-HPLC), and the protein expressions of nerve growth factor(NGF), brain derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3(NT-3) in spinal cord lesion site were analyzed by Western blotting.

Result: At the end of the 11th week post-injury, the DA and DOPA were not founded by RP-HPLC. An increased trend of 5-HT and DA levels in step training group, and expressions of BDNF, NGF and NT-3 protein in OECs group were observed. However, no synthetic effect on 5-HT, DA levels and BDNF, NGF, NT-3 protein expressions were demonstrated in OECs-step training group.

Conclusion: OECs transplantation combined with step training fail to promote the secretion of 5-HT, DA and expressions of BDNF, NGF, NT-3 protein in spinal cord injury site.

Author's address Orthopaedic Department, The Beijing Army General Hospital, Beijing, 100700

Key word spinal cord injury; olfactory ensheathing cells transplantation; step training; neurotransmitter; neurotrophic factor

以细胞移植为中心,将几种方法有机结合的结合型策略是近年脊髓损伤修复研究领域的热点,我们的前期研究[1]显示:规律步行训练及嗅鞘细胞移植结合步行训练可促进大鼠后肢运动功能恢复,但其机制并不清楚。有研究显示,嗅鞘细胞可分泌多种神经营养因子[2—4],步行训练则通过调节神经递质分泌和神经营养因子[5—6]表达来改善脊髓可塑性,促进神经功能恢复,二者结合能否进一步促进神经递质分泌和神经营养因子表达目前尚未见报道。本研究观察了嗅鞘细胞移植结合步行训练对脊髓损伤部位5羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺(dopamine, DA)、多巴(3,4-dihydroxyphenyl alanine, DOPA)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)等几种神经递质含量及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、神经营养因子3(neurotrophic factor, NT-3)蛋白表达的影响,以探索其在嗅鞘细胞移植结合步行训练促进大鼠神经功能恢复作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鼠龄(75±1)d的无特定病原体(specific pathogen free, SPF)二级雌性Sprague Dawley(SD)大鼠32只(微通利华实验动物中心),脊髓打击器(Impactor Ⅱ,美国新泽西大学神经科学合作中心提供),立体定位仪,微量显微注射器,环胞霉素注射液,来源于7d龄绿荧光SD大鼠的嗅鞘细胞(由北京西山医院神经外科研究室提供),大鼠活动平板(杭州段氏制造厂),高效液相色谱仪(LC-6A)(日本津岛制作所),荧光检测器(RF-530)(日本津岛制作所),C-R3A积分仪(日本津岛制作所),50μl Hamilton进样器(美国哈密通公司),GL-20B高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),GL-88B旋涡混合器(江苏海门麒麟医用仪器厂),KQ-100超声波清洗机(江苏昆山淀山检测仪器厂),标准品,盐酸多巴胺(L-DA)(中检所),重酒石酸去甲肾上腺素(瑞士Sigma公司),5-羟色胺硫酸肌酐(瑞士Sigma公司),3,4-二羟基苯乙酸(瑞士Sigma公司),兔源抗BDNF、NT-3、NGF抗体多克隆抗体(美国SANTA Cruz公司),羊抗兔的辣根过氧化物酶标记的二抗(北京中衫公司),硝酸纤维膜(美国Pierce公司),凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 模型制作:依据Gruner[7]并按既往研究方法[1]利用Impactor Ⅱ打击器制作脊髓损伤模型:0.4%戊

巴比妥钠(35±5)mg/kg腹腔注射麻醉,常规备皮、消毒、铺巾,以T10棘突为中点作长约1cm的纵行切口,逐层剪开皮肤、筋膜、钝性分离椎旁软组织,暴露T8—11棘突和椎板,游离T10椎板上下缘,咬去T10椎板和T9椎板的下半部分,暴露硬膜,固定T8和T11棘突并使大鼠悬空,接通电源,调节打击杆头部于T10段脊髓正上方距离硬脊膜25mm,释放打击杆,可见鼠尾出现一过性摆动及后肢痉挛,随后后肢出现弛缓性瘫痪,立即移去打击杆,逐层缝合肌肉、筋膜和皮肤;术后一周内每日给予青霉素20万单位肌注2次,一个月内每日排尿1次,常规饲养。

1.2.2 动物分组及干预:上述造模后的大鼠按数字表法随机分为嗅鞘细胞移植结合步行训练组(A组)、嗅鞘细胞移植组(B组)、步行训练结合改良Eagle培养基(Dulbecco's modification of Eagle's medium, DMEM组)(C组)、脊髓损伤结合DMEM注射组(D组),每组8只。A组在造模后1周开始步行训练,造模后2周进行嗅鞘细胞移植;B组在造模后2周进行嗅鞘细胞移植;C组在造模后1周开始步行训练,造模后2周注射DMEM;D组在造模后2周注射DMEM;C组和D组注射DMEM的部位和量与嗅鞘细胞相同。

细胞移植方法:移植前30分钟开始消化、洗涤细胞,用不含血清的DMEM将细胞稀释成浓度为1×10^5/μl的悬液;注射于距损伤中心0.5mm处的头侧、尾侧脊髓中线上,每个部位注射4个点,深度为1.75mm、1.25mm、1.00mm、0.50mm;每点0.5μl含嗅鞘细胞0.5×10^5个;注射速度为0.1μl/min,每点注射完毕后留针5min,然后缓慢退出;术毕逐层缝合筋膜、皮肤。移植后每日给予青霉素20万单位肌注两次,共5d;自移植前一天开始每天给予环胞霉素10mg/kg体重皮下注射,直至取材。

步行训练方案:利用大鼠活动平板进行步行训练,5d/周,1次/d,每次15—30min(刚开始的15min逐步过渡到30min),步速:开始速度为3m/min,以后根据大鼠步行情况逐渐增加;共训练10周。

1.2.3 观察指标及方法:在伤后11周,断头处死所有大鼠,迅速取出脊髓,取包括损伤和细胞移植部位在内的脊髓段约3mm,每组取4只大鼠脊髓置于-80℃冰箱冻存,用于Western blotting检测神经营养因子表达,另4例样本立即用于神经递质测定。

反相高效液相色谱—荧光检测法测定脊髓5-HT、DA、DOPA、NE:①迅速取上述取材的脊髓段,冰冷生理盐水冲洗除去血液,滤纸拭干称重、充分研磨、匀浆(6—8min);匀浆液转入离心管中,加适量0.4mol/L高氯酸溶液,涡流2min,冷冻离心机离心,10000r/min, 15min。②上清液置入离心管中,10000r/min,10min。③取上清液用高氯酸溶液定容至1ml,涡流混匀,得样品溶液。④线性关系考察:分别精密称取L-NE 3.0mg、L-DA 2.0mg、5-HTP 2.5mg、5-HIAA 2.1mg,用0.1mol/L HCL溶解分别定容至10ml;从中再分别取10μl混合后,用0.1mol/L HCL稀释1600倍摇匀,精密吸取5、10、15、20、25、30μl进样。以吸收峰峰高值对含量(ng)作线性回归,求得四种递质的回归方程及线性范围。⑤色谱条件:色谱柱:YWG-C18柱(250mm×46mm);流动相0.1mol/L的NaAc(内含0.1mmol/L EDTA-2Na),用HAc调pH5.1,取此缓冲液与甲醇按9∶1混合,用0.45μm的微孔滤膜过滤,超声脱气,流速为1.0ml/min,进样量20μl/次,发射波长330nm,激发波长290nm,灵敏度2。柱温:室温。⑥样品含量测定:取上述样品溶液20μl注入液相色谱仪,根据测得的峰高值按回归方程计算四种神经递质含量。

Western blotting分析脊髓神经营养因子蛋白表达:①蛋白提取:取-80℃冰箱中冷冻好的脊髓,称取约100mg组织放入研磨器,加入400μl裂解液,冰上反复研磨裂解30min。低温12000r/min离心5min,取上清,与loading buffer混合,95℃水浴5min后取出。恢复至室温。-20℃保存。按1∶20(组织∶缓冲液)比例加上样缓冲液在冰水浴中匀浆,沸水浴5min, 5000r/min离心7min,取上清液待用。②BDNF、NGF、NT-3蛋白检测:取上清经5%、12% SDS-polyacrylamide gel 6%、7%、9%和10%非连续梯度的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,在冰水浴中将蛋白转移至硝酸纤维膜;用丽春红染液染膜并照像记录判断转膜效率;将膜用转移液洗净后置于5%的Tris缓冲生理盐水吐温(Tris-buffered saline Tween, TBST)脱脂奶粉溶液室温下封闭1h,加入一抗(BDNF、NT-3、NGF,1∶200)4℃冰箱孵育过夜;TBST缓冲液洗涤(5min×3次),加羊抗兔的辣根过

氧化物酶标记的二抗室温下搅拌孵育1h,TBST洗涤(5min×3次)后化学发光显色,凝胶成像系统采集图像灰度值。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0软件,各组脊髓神经递质含量、神经营养因子表达比较采用多个独立样本的秩和检验。

2 结果

2.1 各组大鼠脊髓中DA、DOPA、5-HT,NE检测结果

2.1.1 线性范围及回归方程:见表1。

2.1.2 各组大鼠脊髓DA、DOPA、5-HT、NE含量:DA和DOPA在脊髓内均未测出。C组5-HT、NE含量较其他各组出现增高趋势,A组较B、D组出现增高趋势却较C组出现降低趋势,但上述差异无显著性意义。见表2。

2.2 各组大鼠脊髓损伤部位组织BDNF、NT-3、NGF表达

B组BDNF、NGF、NT-3蛋白水平较其他各组出现增高趋势,A组BDNF、NT-3水平较C、D组出现增高趋势,但却较B组出现降低趋势,差异无显著性意义,见图1,表3。

表1 线性范围及回归方法

	线性范围(μg/ml)	回归方程(峰面积对浓度) Y=A+B×X	检出限(μg/ml)
DA	0.052—1.04	A=-424.63 B=28148.16 *r*=0.9990	0.0473
DOPA	0.068—1.088	A=7.09 B=18101.97 *r*=0.9996	0.0591
5-HT	0.0034—0.42	A=467.3560 B=96219.6169 *r*=0.9960	0.0025
NE	0.0374—1.6	A=-374.1311 B=16808.1477 *r*=0.9999	0.0217

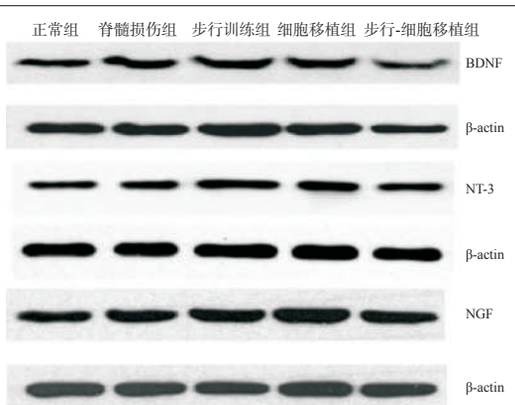
表2 损伤部位神经递质含量 ($\bar{x}\pm s$,μg/g)

	动物数	A组	B组	C组	D组	*P*
5-HT	4	0.218±0.072	0.15±0.058	0.324±0.095	0.308±0.068	0.504
NE	4	0.132±0.047	0.10±0.022	0.149±0.051	0.049±0.036	0.199

表3 损伤部位神经营养因子表达 ($\bar{x}\pm s$)

	动物数	BDNF	NT-3	NGF
A组	4	0.876±0.061	0.903±0.074	0.782±0.152
B组	4	0.923±0.075	0.919±0.049	0.847±0.147
C组	4	0.868±0.069	0.879±0.098	0.834±0.075
D组	4	0.819±0.029	0.781±0.124	0.731±0.139
P		0.322	0.173	0.459

图1 Western blotting分析各组脊髓损伤部位BDNF、NT-3、NGF蛋白表达



3 讨论

本文作者的既往研究显示:嗅鞘细胞移植仅使脊髓损伤大鼠BBB评分在伤后5—8周较对照组出现明显改善,步行训练组和嗅鞘细胞移植结合步行训练组BBB评分自伤后4周始较对照组明显改善,嗅鞘细胞移植结合步行训练组在伤后9周较B组和C组出现明显改善[1]。本研究在此基础上对上述策略对脊髓损伤大鼠损伤部位神经营养因子表达和神经递质含量进行了研究,结果显示:各组脊髓损伤部位神经递质含量和神经营养因子蛋白表达无明显差异;嗅鞘细胞移植结合步行训练组5-HT和NE含量仅较嗅鞘细胞移植和对照组呈现增高趋势,而较步行训练组呈现降低趋势;其BDNF、NT-3、NGF表达则较步行训练和对照组呈现增高趋势,较嗅鞘细胞移植组呈现降低趋势。提示:二者相结合未能充分结合二者优势进一步促进BDNF、NT-3、NGF表达和NE、5-HT分泌。

DA、DOPA、5-HT、NE属于调节性神经递质,在

调节运动神经原兴奋性中起重要作用，最近研究显示，脊髓损伤后腰骶段脊髓单胺类递质受体表达发生改变，编码去甲肾上腺素受体1基因、多巴胺受体1、4基因上调，5-HT受体基因下调[8]；去甲肾上腺素受体1[9—10]、多巴胺受体1、4[11—12]基因上调导致脊髓损伤运动神经元的激活，编码5-HT受体基因的下调提示对5-HT的敏感性降低[8]；Bose PK等[14]通过免疫组化方法发现活动平板和自行车运动训练可上调脊髓挫伤小鼠腰段GABA/GABA（b）受体、脊髓前角DBH阳性NE纤维出芽，前角运动神经元谷氨酸脱羧酶（glutamic acid decarboxylase, GAD67）、BDNF、NE和5-HT表达，导致脊髓挫伤小鼠步行功能改善；Engesser-Cesar C等[13]利用平面转轮对T9挫伤模型大鼠进行步行训练，发现15周，每周3次和7次的步行训练均可使动物后肢功能出现明显改善，虽然脊髓5-HT含量无明显改变，但免疫化学染色显示训练组动物损伤部位尾侧5-HT+纤维长度较对照组提高；上述结果提示：步行训练可能通过NE途径和5-HT途径促进脊髓损伤部位尾侧CPG的激活，与哺乳动物一致[15]。本研究进一步对转录后的蛋白水平进行了研究，结果显示：步行训练组5-HT、NE含量较其他各组出现增高趋势，但无显著性差异；我们分析一方面与样本数量少有关，另一方面主要与取材部位为损伤部位，残留正常组织少，其分泌的神经递质含量虽然发生变化但被总体样本含量稀释有关，各组DA和DOPA未能测出也证实了这一点。同时，神经递质分泌后立即代谢，仅呈一过性改变的特点也导致不易测出其真实变化。

神经营养因子在脊髓损伤大鼠神经功能恢复中的作用和机制得到了诸多研究，但结果并不一致。近期研究显示[16]：利用腺病毒载体损伤部位给予BDNF、NT-3能提高神经回路可塑性促进大鼠神经功能恢复，虽然NT-3组需要持续不断的外周刺激；本研究结果显示：3个治疗组的BDNF、NT-3、NGF表达均呈现较对照组增高的趋势，其中嗅鞘细胞移植组BDNF、NT-3表达最高，提示嗅鞘细胞移植可能通过促进BDNF、NT表达促进脊髓损伤大鼠神经功能恢复[17—18]；各组间无显著性差异，我们分析也与样本数量少、损伤部位残留正常组织少，神经营养因子蛋白表达变化被稀释有关。

有意思的是，虽然嗅鞘细胞移植组损伤部位BDNF和NT-3表达较其他组出现升高趋势，步行训练组5-HT、NE含量较其他各组出现增高趋势，但嗅鞘细胞移植结合步行训练组损伤部位BDNF、NT3表达较细胞移植组出现降低趋势，5-HT和NE含量均较步行训练组出现降低趋势，提示本研究中，步行训练与嗅鞘细胞可能存在一定程度的互相干扰。这与Maier IC等[19]的结果一致。而Guest JD等[20]利用纯化的嗅鞘细胞移植结合步行训练的方案干预T9全横断模型大鼠发现：嗅鞘细胞移植结合步行训练促进脊髓损伤大鼠步行功能改善的原因与嗅鞘细胞移植能促进组织赦免和轴突再生尤其是去甲肾上腺素能轴突再生，步行训练能进一步易化轴突再生有关。上述研究结果的差异可能与各研究所应用方案的干预时机、时间、方案不同有关，因此，如何进一步利用嗅鞘细胞和步行训练的优势促进脊髓损伤大鼠神经功能恢复有待进一步深入研究。

在此需特别说明的是，本研究存在样本量较少，没有对腰段脊髓神经递质及神经营养因子的变化进行研究等不足，进一步的研究将对此进行深入探索。

参考文献

[1] 叶超群,孙天胜,张立仁,等.嗅鞘细胞移植结合步行训练对脊髓挫伤大鼠神经功能的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2010,32(12):892—897.

[2] Lipson AC, Widenfalk J, Lindqvist E, et al. Neurotrophic properties of olfactory ensheathing glia[J]. Exp Neurol, 2003, 180(2):167—171.

[3] Ramón-Cueto A, Plant GW, Avila J, et al. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants[J]. J Neurosci, 1998, 18(10):3803—3815.

[4] Woodhall E, West AK, Chuah MI. Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor, brain- derived neurotrophic factor, glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2001, 88(1—2):203—213.

[5] de Leon RD, Tamaki H, Hodgson JA, et al. Hindlimb locomotor and postural training modulates glycinergic inhibition in the spinal cord of the adult spinal cat[J]. J Neurophysiol, 1999, 82(1):359—369.

[6] Tillakaratne NJ, Mouria M, Ziv NB, et al. Increased expression of glutamate decarboxylase (GAD(67)) in feline lumbar spinal cord after complete thoracic spinal cord transection [J]. J Neurosci Res, 2000, 60(2):219—230.

[7] Gruner JA. A monitored contusion model of spinal cord in-

（下转第756页）