论著

文章编号:1000-5404(2011)10-0998-05

树突细胞及神经干细胞/前体细胞联合移植促进脊髓损伤大鼠运动功能恢复

晁 瑞[1],赵建华[1],刘明永[1],王永飞[1],郭乔楠[2] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所脊柱外科[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院病理学研究所[2])

【摘要】 **目的** 观察树突细胞(dendritic cells,DCs)及神经干细胞/前体细胞(neural stem/progenitor cells,NSPCs)联合移植对大鼠脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)修复的作用,并初步探讨其机制。**方法** SD成年大鼠80只制作脊髓损伤模型,随机数字表法分为4组,SCI 9 d后分别移植Hanks平衡盐溶液(Hanks balanced salt solution,HBSS)、DCs、NSPCs、DCs+NSPCs。通过BBB评分法评估SCI大鼠运动功能,组织病理学方法观察损伤局部病理学改变。采用增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescence protein,EGFP)转基因SD大鼠脑来源的NSPCs,损伤局部移植2周后观察存活情况。免疫组织荧光法观察损伤局部神经生长因子-3(neurotrophin-3,NT-3)的表达变化。**结果** 移植84 d后DCs+NSPCs组运动功能明显改善($P<0.05$),DCs+NSPCs组、NSPCs组、DCs组、HBSS组BBB评分分别为(11.70±0.99)、(9.75±0.50)、(7.40±0.93)、(5.93±0.78),相邻两组有统计学差异($P<0.05$)。DCs+NSPCs组损伤区范围及空洞均明显减少($P<0.05$),NSPCs存活数量明显增加($P<0.01$),显著上调损伤区NT-3的表达。**结论** DCs联合NSPCs移植能够促进神经干细胞存活,减少损伤区范围及空洞形成,改善SCI大鼠运动功能。损伤区NT-3的表达增加可能是促进修复的机制之一。

【关键词】 脊髓损伤;树突细胞;神经干细胞;移植

【中图法分类号】 R651.2;R329.2;R338.2 【文献标志码】 A

Co-transplantation of neural stem/progenitor cells with dendritic cells promotes functional recovery in a rat model of spinal cord injury

Chao Rui[1], Zhao Jianhua[1], Liu Mingyong[1], Wang Yongfei[1], Guo Qiaonan[2] ([1]Department of Spinal Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the effect and mechanism of co-transplantation of neural stem/progenitor cells (NSPCs) with dendritic cells (DCs) on spinal cord injury (SCI) in adult rats. **Methods** Eighty adult SD rats were subjected to moderate SCI. Nine days after SCI, SD rats were randomly divided into 4 groups and locally injected with Hanks' balanced salt solution (HBSS), DCs, NSPCs, and DCs + NSPCs. The motor functions of rats after SCI were evaluated with BBB scores. The local pathological changes of injured sites were observed by histopathological means. NSPCs from brain of enhanced green fluorescence protein (EGFP) transgenic rat or common newborn rat were transplanted, and NSPCs survival was studied two weeks later. Neurotrophin-3 (NT-3) expression in injured sites was detected by immunofluorescence to illustrate the underlying mechanism. **Results** Eighty-four days after treatment, the DCs + NSPCs group exhibited significantly better motor function than other groups ($P<0.05$), with BBB scores: DCs + NSPCs group 11.70 ± 0.99, NSPCs group 9.75 ± 0.50, DCs group 7.40 ± 0.93 and HBSS group 5.93 ± 0.78. The cavities and scars in the DCs + NSPCs group were smaller than those in other groups ($P<0.05$). In the DCs + NSPCs group, increased neurotrophin-3 (NT-3) expression (compared with other groups, $P<0.05$) and improved NSPCs survival (compared with NSPCs group, $P<0.01$) were observed in the injured sites. **Conclusion** Co-transplantation of NSPCs with DCs promotes NSPCs survival and functional recovery in adult rats after SCI, possibly involving NT-3

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81070981)

【通信作者】 赵建华,电话:(023)68757931,E-mail:zhaojianhua1964@yahoo.com

up-regulation in injured sites.

[Key words] spinal cord injuries; dendritic cells; neural stem cells; transplantation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81070981). Corresponding author: Zhao Jianhua, Tel: 86-23-68757931, E-mail: zhaojianhua1964@yahoo.com

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)造成大量神经细胞死亡和感觉运动功能丧失[1]。局部移植不同种属或相同种属不同部位来源的神经干细胞/前体细胞(neural stem/progenitor cells, NSPCs)均不同程度促进SCI的修复[2]。外源性NSPCs往往因为损伤局部缺血、缺氧而大量死亡[3]。骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stromal cells, BMSCs)和人脂肪来源的间质干细胞(adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, AT-MSCs)分别联合NSPCs移植修复损伤脊髓,促进了神经干细胞存活,但是联合移植没有明显改善运动功能[4-5]。树突细胞(dendritic cells, DCs)是具有抗原提呈作用的免疫细胞[6]。脊髓损伤研究表明DCs有神经保护作用[1,7-10]。移植DCs能够活化内源性神经干细胞[7,9-10]。DCs能否通过改善局部微环境,促进外源性NSPCs存活,进一步改善损伤脊髓的神经功能尚少见报道。本实验采用骨髓源性DCs联合NSPCs进行局部移植,观察对大鼠SCI的修复作用,并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 DCs培养

DCs来源于4~6周龄SD大鼠胫腓骨骨髓,参照Hauben等[1]的方法诱导分化培养7 d后用细胞刮收集细胞备用。

1.2 NSPCs原代培养

NSPCs来源于增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescence protein, EGFP)转基因或普通新生SD大鼠(1~3 d)全脑,参照Gao等[11]的方法增殖培养7 d后收集神经球,制备单细胞悬液备用。

1.3 SCI动物模型的制作

雌性SD大鼠,10~12周龄,体质量200~250 g,第三军医大学实验动物中心提供,参照Basso等[12]的方法制作打击损伤模型(10 g, 20 mm, NYU, USA),造成T9节段中度挫伤。

1.4 细胞移植

制模成功9 d[1,3,13]后进行BBB评分,评分≤5入选。根据移植细胞不同分为4组:假移植组(HBSS组)、DCs组、NSPCs组、DCs+NSPCs组,每组20只。将移植细胞制备成单细胞悬液,置于冰上备用。立体定位仪下汉密尔顿注射器吸取5 μl细胞悬液或HBSS,由背侧正中向损伤中心穿刺入1.5 mm,缓慢注射5 min,细胞移植量分别为DCs 1×10^6/(5 μl),NSPCs 2×10^4/(5 μl)。

1.5 后肢运动功能评定

根据BBB评分法[12],采用双人双盲法评定大鼠后肢运动功能。移植后1个月内每2天评分1次,1个月后每周评分1次。

1.6 组织病理学制样及观察

细胞移植84 d后灌注取材。组织病理学切片制备参照课题组前期研究[8,10]。Image Pro Plus 6.0图像处理软件计算损伤区和空洞面积。

1.7 NSPCs存活情况观察

EGFP阳性NSPCs移植后2周分别取脊髓制备冰冻纵行切片(片厚20 μm),由正中向两侧分别连续纵切12张,按顺序排列编号,第6、12、18张冰冻切片立即在激光共聚焦显微镜下观察(Leica,德国)检测,每张切片采用9格法拍摄等倍视野图片,Image Pro Plus 6.0图像处理软件下手动计数NSPCs存活数量。

1.8 免疫组织化学及图像分析

冰冻及石蜡切片免疫荧光染色方法参照课题组前期研究[10]。一抗:兔抗大鼠NT-3多克隆抗体(1∶300, Abcam Cambridge, UK),二抗:羊抗兔CY3(1∶200,碧云天,江苏),DAPI(碧云天,江苏)染核。Image Pro Plus 6.0图像处理软件分析在一定值范围内的荧光表达面积(荧光值70~250)。

1.9 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件。BBB评分采用两因素重复测量的方差分析。免疫荧光表达量、SCI瘢痕和空洞面积采用单因素方差分析,NSPCs存活比较采用独立两样本均数 t 检验(双侧)。

2 结果

2.1 一般情况

细胞移植12周后,HBSS组、DCs组、NSPCs组、DCs+NSPCs组分别存活8、9、8、10只。死亡原因主要为手术创伤、泌尿系统感染、自噬等。存活大鼠双下肢呈不同程度瘫痪,前肢活动自如,背部皮肤愈合良好。

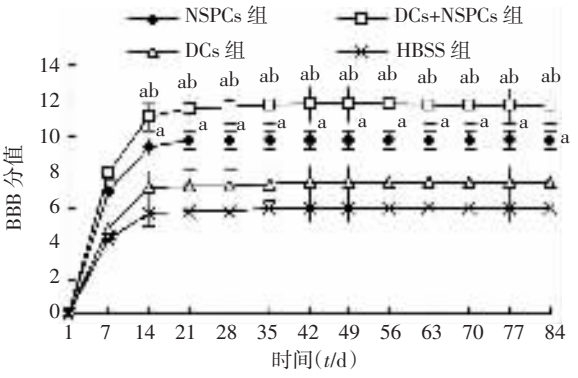
2.2 SD大鼠后肢运动功能BBB评定

细胞移植后各组大鼠均出现脊髓休克表现。7 d后DCs+NSPCs组和NSPCs组运动评分较其他两组明显增加($P<0.05$)。11 d后DCs+NSPCs组较NSPCs组增加($P<0.05$)。NSPCs组、DCs组、HBSS组在28 d后进入平台期,DCs+NSPCs组评分继续缓慢增加,42 d后进入平台期(图1)。移植84 d时DCs+NSPCs组、NSPCs组、DCs组、HBSS组评分分别为(11.70±0.99)、(9.75±0.50)、(7.40±0.93)、(5.93±0.78)。DCs组和HBSS组评分无统计学差异。

2.3 组织病理学观察

HBSS组损伤区可见大量神经纤维断裂,无序排列,空洞形

成，空洞内间质填充（图2A）。DCs组损伤区细胞和神经纤维数量明显增加，部分区域形成瘢痕，损伤范围及空洞面积较HBSS组小（图2B，表1）。NSPCs组细胞数量增加，神经纤维排列较为有序，瘢痕较小，损伤范围较DCs组进一步减小，但空洞面积形成与HBSS组、DCs组无差异（图2C，表1）。DCs+NSPCs组损伤范围与NSPCs组无差异，但空洞面积均较其他组明显减少（图2D，表1）。



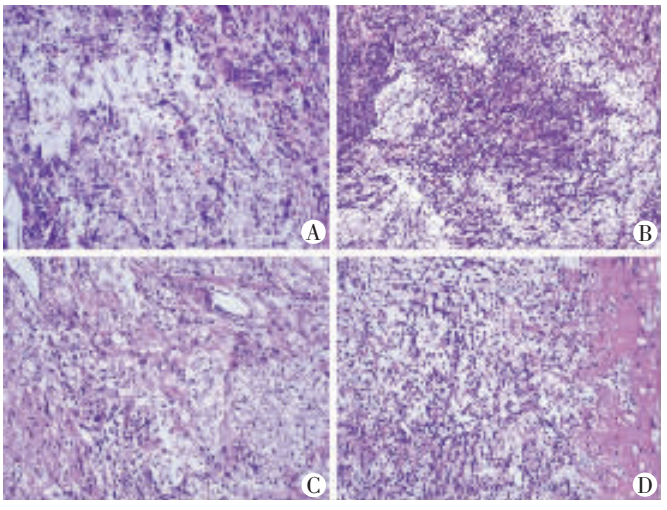
a：$P<0.05$，与HBSS组及DCs组比较；b：$P<0.05$，与NSPCs组比较

图1　各组大鼠SCI后不同时相点运动功能BBB评分分析

表1　移植84 d后各组损伤区范围及空洞测量结果（$n=5$，mm^2，$\bar{x}\pm s$）

组别	损伤区范围	空洞面积
HBSS组	8.23±0.26	2.33±0.39
DCs组	7.55±0.14[a]	1.62±0.12[a]
NSPCs组	6.91±0.30[ab]	1.82±0.19
DCs+NSPCs组	6.84±0.32[ab]	0.96±0.07[abc]

a：$P<0.05$，与HBSS组比较；b：$P<0.05$，与DCs组比较；c：$P<0.05$，与NSPCs组比较



A：HBSS组；B：DCs组；C：NSPCs组；D：DCs+NSPCs组

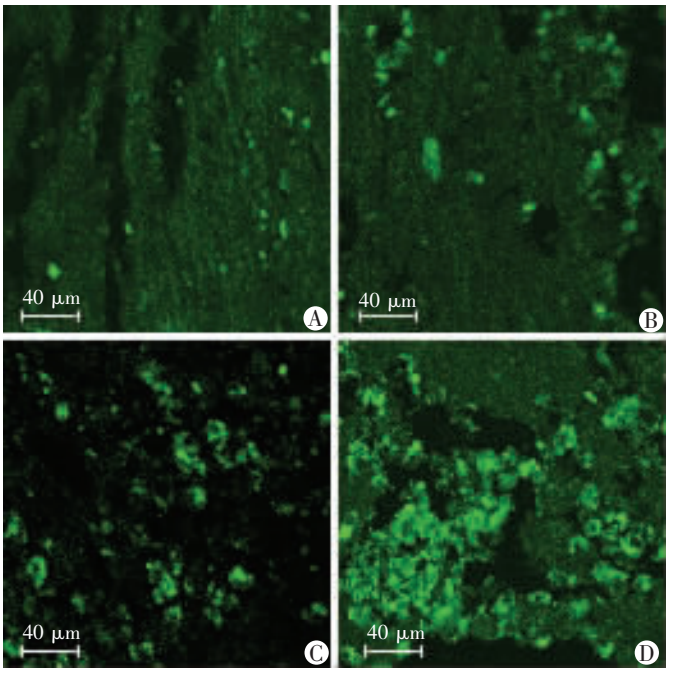
图2　移植84 d后各组损伤区病理变化　（HE ×200）

2.4　移植2周后NSPCs存活情况

HBSS组和DCs组仅见点状自发绿色荧光物质散在分布，无明显核浆结构（图3A、B）。NSPCs组移植的EGFP阳性细胞散在分布于损伤区（图3C），DCs+NSPCs组可见大量EGFP阳性细胞成团，聚集分布于组织腔隙内（图3D）。DCs+NSPCs组（57.33±5.13，$n=3$）的NSPCs存活数量较NSPCs组（33.33±6.11，$n=3$）明显增加（$P<0.01$）。

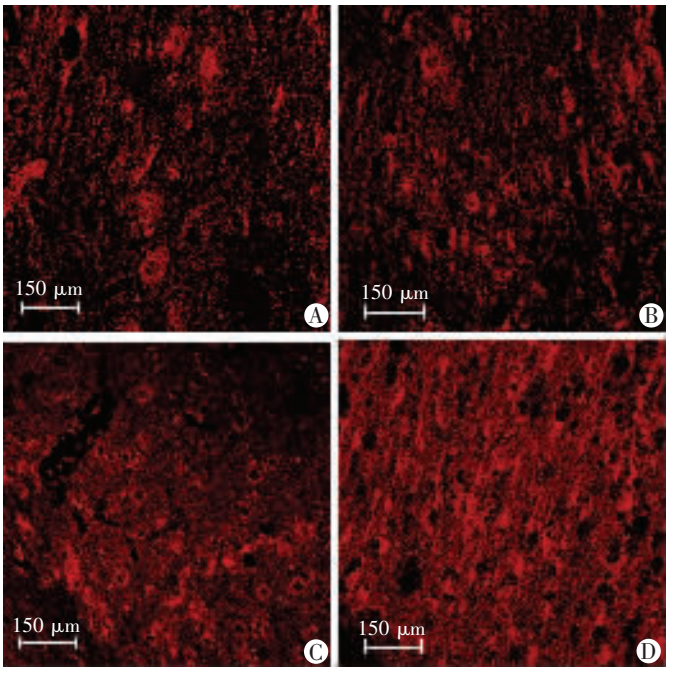
2.5　损伤区NT-3的表达情况

HBSS组仅少量残存细胞表达NT-3（图4A）。DCs组、NSPCs组的NT-3表达依次增加，呈局灶性分布（图4B、C）。DCs+NSPCs组损伤区NT-3的表达较其他组明显增加（图4D，表2，$P<0.05$）。



A：HBSS组；B：DCs组；C：NSPCs组；D：DCs+NSPCs组

图3　移植2周后激光共聚焦显微镜观察移植NSPCs存活情况



A：HBSS组；B：DCs组；C：NSPCs组；D：DCs+NSPCs组

图4　移植2周后激光共聚焦显微镜观察损伤中心区各组NT-3表达情况

表 2 移植 2 周后各组 NT-3 表达面积（$n=5$，μm^2，$\bar{x}\pm s$）

组别	NT-3 表达面积
HBSS 组	119 042.21 ± 10 130.23
DCs 组	128 985.04 ± 8 342.58[a]
NSPCs 组	169 729.32 ± 12 091.18[ab]
DCs + NSPCs 组	233734.24 ± 19 373.58[abc]

a：$P<0.05$，与 HBSS 组比较；b：$P<0.05$，与 DCs 组比较；c：$P<0.05$，与 NSPCs 组比较

3 讨论

SCI 往往造成严重的神经功能丧失。NSPCs 具有自我增殖和定向分化的潜能，因此被广泛应用于 SCI 的研究[2]。本课题组及国外实验表明 DCs 移植也能够促进损伤脊髓的神经功能恢复，活化内源性 NSPCs。据此我们推测，DCs 联合 NSPCs 移植或许能够促进 NSPCs 在损伤区的存活，进一步改善 SCI 大鼠神经功能。大鼠 SCI 后 DCs 移植治疗的时间窗是 28 d[1]，而损伤后 1 周内移植的 DCs 存活较低[13]。NSPCs 在伤后 9 d 移植存活率较高[3]。因此，在两种细胞治疗时间窗内，本实验选择建模后 9 d 进行细胞移植，降低损伤急性期对移植细胞造成的非实验影响。

本实验结果表明，DCs 组运动功能无明显改善，而 NSPCs 组改善明显，提示改善运动功能的主要是 NSPCs，而不是 DCs。DCs 在 SCI 修复方面仍存在争议。Mikami 等[9]在小鼠实验中观察未负载抗原的脾细胞来源的 DCs 能够促进运动功能恢复。而 Liu 等[7-8,10]研究发现对 SCI 小鼠发挥保护作用的是负载脊髓匀浆蛋白的骨髓源性 DCs，这与 Hauben 等[1]的负载髓磷脂碱性蛋白的骨髓源性 DCs 大鼠模型实验相吻合。细胞来源或局部移植的细胞量可能是产生上述差异的原因。为平衡上述实验间细胞移植量的差异，本实验采用大鼠模型，骨髓源性 DCs 移植量[1×10^6/(5 μl)]同 Mikami 等[9]的实验，是课题组前期工作及 Hauben 等[1]实验中 DCs 移植量的两倍，但也未观察到明显运动功能改善。从本实验组内分析看，DCs 的数量远远大于 NSPCs。因此，DCs 的数量本身对联合移植组运动功能可能无显著影响。病理分析提示 DCs 组瘢痕较多。瘢痕的物理屏障可能是阻止 DCs 改善运动功能的因素之一[8,10]。

DCs 组损伤范围及空洞形成较 HBSS 组明显减小，同样 DCs + NSPCs 组较 NSPCs 组减小。分析其原因可能是：局部移植 DCs 改善了微环境，宿主细胞存活增加；外源性 DCs 及 NSPCs 在局部存活，增加了局部细胞密度，减少了空洞面积。这一病理结果提示尽管局部移植 DCs 不能有效改善运动功能，但是在一定程度上降低 SCI 程度，为 SCI 修复提供了物质基础。DCs + NSPCs 组运动功能较 NSPCs 组进一步改善，提示 DCs 能够与 NSPCs 发挥协同作用。实验观察到，DCs + NSPCs 组 NSPCs 数量明显增加（$P<0.01$）。因此，联合移植组运动功能的进一步改善直接因素可能是参与修复的 NSPCs 数量增加，而 DCs 为 NSPCs 的存活提供了良好条件。NSPCs 自身分泌多种神经营养因子，如 NGF、BDNF、NT-3 等[14]。增加的 NSPCs 直接通过旁分泌作用为局部提供更多的营养支持。将 NSPCs 移植到损伤局部，持续表达神经营养因子，能够促进神经元的存活[15]及轴突的再髓鞘化、再生[14]。NSPCs 可以向损伤部位迁移分化为不同类型神经细胞，直接参与脊髓组织重建修复[16]。

本实验观察到 DCs 组损伤区 NT-3 表达较 HBSS 组高，DCs + NSPCs 组较 NSPCs 组高。以往实验表明脊髓创伤形成后分别在 4、12 h 测损伤区域的 NT-3 水平降低，而邻近区域 NT-3 水平升高[17]。在正常的脊髓组织中 NT-3 主要在神经细胞的胞体中表达，包括胶质细胞、神经元[18-19]；而损伤脊髓中神经元大量死亡，胶质细胞反应性增生，NT-3 主要在胶质细胞表达。NSPCs 和 DCs 也分别表达 NT-3[14,20]。本实验中 NT-3 表达增加可能因为残存宿主细胞增加和外源性 NSPCs、DCs 的植入。联合移植能够改善脊髓局部微环境和促进包括 NT-3 在内的神经营养因子的表达可能是 NSPCs 存活增加的直接原因之一。未成熟 DCs 自身分泌多种神经营养因子，如 NGF、BDNF、NT-3 等，同时 DCs 是抗原提呈细胞，在吞噬抗原活化成熟的过程中，进一步释放神经营养因子[20-21]。局部移植 DCs 是联合移植组 NT-3 增加的主要干预措施。课题组前期研究结果提示负载脊髓匀浆蛋白 DCs 组 NT-3 蛋白水平高于对照组[8]，且神经干细胞标志物 nestin 表达时间延长[7,10]。因此，DCs 可能通过旁分泌 NT-3 参与了 NSPCs 的调控。包括 NT-3 在内的神经营养因子为局部提供了良好的营养支持，一定程度地减轻了继发性损伤。NT-3 是轴突再生修复中非常关键的神经营养因子之一[22]。NT-3 通过使 TrkC 受体的二聚化及与 P75 受体结合下调 RhoA，使肌动蛋白重组从而促进轴突再生，改善感觉及运动功能[23]。

总之，NSPCs、DCs联合移植促进脊髓损伤局部NSPCs存活，进一步改善SCI大鼠后肢运动功能。损伤区NT-3表达上调可能是联合移植促进SCI修复的机制之一。NT-3在细胞联合移植修复中的来源及作用机制有待进一步研究。

志谢 感谢第三军医大学大坪医院野战外科研究所脊柱外科刘鹏副教授在论文撰写上给予的宝贵建议

参考文献：

[1] Hauben E, Gothilf A, Cohen A, *et al*. Vaccination with dendritic cells pulsed with peptides of myelin basic protein promotes functional recovery from spinal cord injury [J]. J Neurosci, 2003, 23 (25): 8808 - 8819.

[2] Nandoe-Tewarie R S, Hurtado A, Bartels R H, *et al*. Stem cell-based therapies for spinal cord injury[J]. J Spinal Cord Med, 2009, 32(2): 105 - 114.

[3] Parr A M, Kulbatski I, Tator C H. Transplantation of adult rat spinal cord stem/progenitor cells for spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 2007, 24(5): 835 - 845.

[4] Parr A M, Kulbatski I, Zahir T, *et al*. Transplanted adult spinal cord-derived neural stem/progenitor cells promote early functional recovery after rat spinal cord injury [J]. Neuroscience, 2008, 155 (3): 760 - 770.

[5] Oh J S, Kim K N, An S S, *et al*. Co-transplantation of Mouse Neural Stem Sells (mNSCs) with Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Sells Improves mNSC Survival in a Rat Spinal Cord Injury Model[J]. Cell Transplant, 2010. Nov 5. [Epub ahead of print]

[6] Mellman I, Steinman R M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines[J]. Cell, 2001, 106(3): 255 - 258.

[7] Liu M, Zhao J, Liang H, *et al*. Vaccination with dendritic cells pulsed with homogenate protein of spinal cord promotes functional recovery from spinal cord injury in mice [J]. Spinal Cord, 2009, 47 (5): 360 - 366.

[8] 王科，赵建华，梁华平. 吴茱萸碱刺激的负载脊髓匀浆蛋白DCs促进小鼠脊髓损伤的修复[J]. 第三军医大学学报，2010，32(3)：269 - 273.

[9] Mikami Y, Okano H, Sakaguchi M, *et al*. Implantation of dendritic cells in injured adult spinal cord results in activation of endogenous neural stem/progenitor cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery[J]. J Neurosci Res, 2004, 76(4): 453 - 465.

[10] 刘明永，赵建华，梁华平，等. 负载脊髓匀浆蛋白的树突状细胞促进小鼠脊髓损伤功能恢复的作用研究[J]. 中华神经外科杂志，2008，24(5)：393 - 397.

[11] Gao F, Zhang Q, Zheng M H, *et al*. Transcription factor RBP-J-mediated signaling represses the differentiation of neural stem cells into intermediate neural progenitors [J]. Mol Cell Neurosci, 2009, 40 (4): 442 - 450.

[12] Basso D M, Beattie M S, Bresnahan J C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection [J]. Exp Neurol, 1996, 139 (2): 244 - 256.

[13] Hauben E, Butovsky O, Nevo U, *et al*. Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion[J]. J Neurosci, 2000, 20(17): 6421 - 6430.

[14] Lu P, Jones L L, Snyder E Y, *et al*. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2003, 181(2): 115 - 129.

[15] Llado J, Haenggeli C, Maragakis N J, *et al*. Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors[J]. Mol Cell Neurosci, 2004, 27(3): 322 - 331.

[16] McMahon S S, Albermann S, Rooney G E, *et al*. Engraftment, migration and differentiation of neural stem cells in the rat spinal cord following contusion injury [J]. Cytotherapy, 2010, 12 (3): 313 - 325.

[17] Kazanis I, Giannakopoulou M, Philippidis H, *et al*. Alterations in IGF-I, BDNF and NT-3 levels following experimental brain trauma and the effect of IGF-I administration[J]. Exp Neurol, 2004, 186 (2): 221 - 234.

[18] Juric D M, Mele T, Carman-Krzan M. Involvement of histaminergic receptor mechanisms in the stimulation of NT-3 synthesis in astrocytes [J]. Neuropharmacology, 2011. Jan 27. [Epub ahead of print]

[19] Tzeng S F, Huang H Y. Downregulation of inducible nitric oxide synthetase by neurotrophin-3 in microglia[J]. J Cell Biochem, 2003, 90 (2): 227 - 233.

[20] Ohta S, Ueda Y, Yaguchi M, *et al*. Isolation and characterization of dendritic cells from common marmosets for preclinical cell therapy studies[J]. Immunology, 2008, 123(4): 566 - 574.

[21] Noga O, Peiser M, Altenahr M, *et al*. Selective induction of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor by LPS and allergen in dendritic cells [J]. Clin Exp Allergy, 2008, 38 (3): 473 - 479.

[22] Kusano K, Enomoto M, Hirai T, *et al*. Transplanted neural progenitor cells expressing mutant NT3 promote myelination and partial hindlimb recovery in the chronic phase after spinal cord injury[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 393(4): 812 - 817.

[23] Lykissas M G, Batistatou A K, Charalabopoulos K A, *et al*. The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration [J]. Curr Neurovasc Res, 2007, 4(2): 143 - 151.

（收稿 2011-01-16 修回 2011-02-09）

（编辑 邓强庭）