文章编号:1000-5404(2012)03-0231-04

论著

# UW液对大鼠坐骨神经低温保存时组织结构、细胞活性及免疫原性的影响

阳明明,蒋电明,钟 健 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院骨科)

[摘要] **目的** 研究UW液低温保存方法对大鼠坐骨神经组织结构、细胞活性及免疫原性的影响。**方法** SD大鼠坐骨神经4 ℃条件下用UW液保存(UW组),分别保存1、4、6周,以新鲜坐骨神经作对照(对照组)。HE染色和透射电镜扫描观察组织结构改变;LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity试剂盒和TUNEL法分别评估细胞活性和凋亡程度;Western blot法检测细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和主要组织相容性复合体Ⅱ(MHCⅡ)的表达以了解免疫原性改变。**结果** 各保存时相点UW组神经外膜和雪旺细胞基底膜结构均较完整,与对照组无明显差别。各UW组细胞活性程度降低,TUNEL阳性细胞数增多,ICAM-1和MHCⅡ表达降低,与对照组相比均有明显统计学差异($P<0.05$);且4、6周组TUNEL阳性细胞数均高于1周组($P<0.05$),ICAM-1和MHCⅡ表达均低于1周组($P<0.05$),但4、6周组间均未见明显差异。**结论** UW液低温保存方法能有效维持周围神经组织神经外膜和雪旺细胞基底膜结构完整性,并降低保存神经的免疫原性,但有效维持神经组织细胞活性的时限不超过1周。

[关键词] UW液;低温保存;周围神经;大鼠
[中图法分类号] R322.85; R329-33; R329.24 [文献标志码] A

# Effect of University of Wisconsin solution on morphology, cell viability and immunogenicity of rat sciatic nerve during cold storage

Yang Mingming, Jiang Dianming, Zhong Jian (Department of Orthopaedics, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of University of Wisconsin (UW) solution on morphology, cell viability and immunogenicity of rat sciatic nerve during cold storage. **Methods** Rat sciatic nerve segments were preserved in UW solution at 4℃ for 1, 4 and 6 weeks, respectively, and fresh rat sciatic nerve segments were set as controls. Morphological changes of sciatic nerve segments were stained by HE and were observed under transmission electron microscope. Cell viability was detected by using LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity kits and confocal microscopy, cell apoptosis was detected by TUNEL staining, and Levels of ICAM-1 and MHCⅡ were detected by Western blotting. **Results** Epineurium and Schwann cell basal lamina in the UW group at each time point remained intact and were similar to those in the control group. Cell viability was decreased, quantity of TUNEL positive cells was increased and levels of ICAM-1 and MHCⅡ was decreased in the UW group at each time point, as compared with those of the control group ($P<0.05$). In the UW group, quantity of TUNEL positive cells at both 4 and 6 weeks were larger than that at 1 week ($P<0.05$), and levels of ICAM-1 and MHCⅡ at both 4 and 6 weeks were lower than those at 1 week ($P<0.05$), but there was no significantly difference in cell viability, quantity of TUNEL positive cells and levels of ICAM-1 and MHCⅡ between 4 weeks and 6 weeks ($P>0.05$). **Conclusion** Cold storage of peripheral nerve with UW solution can effectively maintain structural integrity of epineurium and Schwann cell basal lamina and reduce nerve immunogenicity within one week.

[**Key words**] University of Wisconsin Solution; cold storage; peripheral nerve; rats

Supported by the Traditional Chinese Medicine Science and Technology Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2009-1-10). Corresponding author: Jiang Dianming, E-mail: jdm571026@vip.163.com

[基金项目] 重庆市卫生局中医药科技项目(2009-1-10)
[通信作者] 蒋电明,E-mail: jdm571026@vip.163.com

有效地体外保存周围神经不但有助于改善移植神经修复周围神经缺损的效果,还将推动同种异体周围神经移植库的构建,创造出巨大的实际价值和经济效益。但目前仍缺乏较公认的、理想的周围神经体外保存方法。本研究拟采用目前较为公认的器官保存液-UW液(University of Wisconsin solution),在4 ℃条件下低温保存大鼠坐骨神经,旨在较为全面地了解UW液低温保存方法对周围神经组织结构、细胞活性及免疫原性的影响,探讨UW液低温保存周围神经的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料及仪器

成年健康SD雄性大鼠60只(由重庆医科大学动物中心提供),体质量200~250 g。UW液(Bristol-Myers squibb,美国),LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity试剂盒(Molecular Probes,美国),TUNEL凋亡检测试剂盒(Roche,美国),小鼠抗大鼠ICAM-1(Abcam,英国)和MHC Ⅱ单克隆抗体(Santa Cruz,美国),蛋白抽提试剂盒、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒等(碧云天生物技术研究所)。激光扫描共聚焦显微镜(Leica TCS SP2,德国);透射电子显微镜(Hitachi 7 500,日本)。

### 1.2 方法

1.2.1 大鼠坐骨神经取材及分组 3%水合氯醛(15 mg/kg)腹腔注射麻醉SD大鼠、常规消毒双下肢,俯卧位固定、铺巾,无菌条件下取双侧全段坐骨神经,长2.5~3.0 cm/条。预冷生理盐水漂洗去表面血块后,将神经标本置入UW液中,每20毫升UW液浸泡10条神经标本,4 ℃条件下分别保存1、4、6周(1、4、6组,$n=30$),以新鲜坐骨神经作对照(对照组,$n=30$)。

1.2.2 神经组织形态学观察 取对照组和各保存时相点UW组坐骨神经标本,一部分用4%多聚甲醛固定24 h,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,作厚5 μm的横切片,常规HE染色后光镜下着重观察神经外膜连续性、完整性;一部分以3%戊二醛和1%锇酸溶液双重固定,由重庆医科大学基础医学院电镜教研室制作标本,Hitachi 7500透射电镜主要观察神经组织内雪旺细胞基底膜的完整性等。

1.2.3 神经组织细胞活性观察 采用LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity试剂盒观察神经组织内的细胞活性情况。该试剂盒有2个荧光探针:Calcein-AM和EthD-I。Calcein-AM可以穿透活细胞,并在其内酯酶的作用下发出绿色荧光,而EthD-I不能穿透活细胞但可穿过死细胞膜并嵌入细胞的DNA双螺旋从而产生红色荧光。将各组神经标本剪成长约2 mm的小段,小心剥离神经外膜,并分离出神经束;将神经束置于0.1%胰蛋白酶中37 ℃,消化20 min,以含10%胎牛血清的DMEM培养液终止消化;D-PBS冲洗2次后,将神经纤维分散展开于载玻片上;以含终浓度为4 μmol/L Calcein-AM和6 μmol/L EthD-I的D-PBS室温避光孵育15 min;D-PBS冲洗2次后,用抗荧光淬灭剂封片,并立即在激光扫描共聚焦显微镜下观察神经纤维中绿色和红色荧光分布情况。

1.2.4 神经组织凋亡细胞检测 凋亡细胞检测采用TUNEL法,按照Roche试剂盒说明操作。凋亡结果判定:光镜下TUNEL阳性细胞核呈棕黄色,并应用Image-Pro Plus 6.0软件计数每3个随机400倍视野中TUNEL阳性细胞数,取平均值。

1.2.5 Western blot检测ICAM-1和MHC Ⅱ蛋白的表达 神经标本用冷TBS洗涤3次,剪成小块置于匀浆器内。按蛋白抽提试剂盒说明书提取各组神经组织蛋白,BCA法测定蛋白浓度。经10% SDS-PAGE电泳分离后,用Bio-Rad Western印记分析仪将蛋白转移至PVDF膜上,以含5%脱脂牛奶的TBST室温封闭1 h后,分别加入小鼠抗大鼠ICAM-1单克隆抗体(1∶1 000)、MHC Ⅱ单克隆抗体(1∶200)和β-actin抗体(1∶2 000,北京四正柏),4 ℃过夜,洗膜,分别加入辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠IgG(1∶1 500,北京中杉),室温孵育1 h,洗膜,加入化学发光试剂,放入X线片夹中曝光,扫描胶片并存档,Alpha软件处理系统分析PVDF膜条带的光密度值,以目的条带与内参条带光密度比值作为目的蛋白的相对表达量。

### 1.3 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 16.0统计软件进行单因素方差分析及LSD-$t$检验。

## 2 结果

### 2.1 神经组织形态学观察

大鼠坐骨神经经UW液低温保存不同时限,各组神经组织的神经外膜均保持较好的完整性和连续性。透射电镜观察显示各UW液低温保存组坐骨神经组织的雪旺细胞基底膜和雪旺细胞细胞膜结构清晰、完整,未见明显中断、崩解,但UW液低温保存4、6周组神经组织出现髓鞘同心圆板层结构分离、空泡形成,雪旺细胞细胞质内有较多髓样小体等病理形态学改变(图1)。

### 2.2 神经组织细胞活性观察

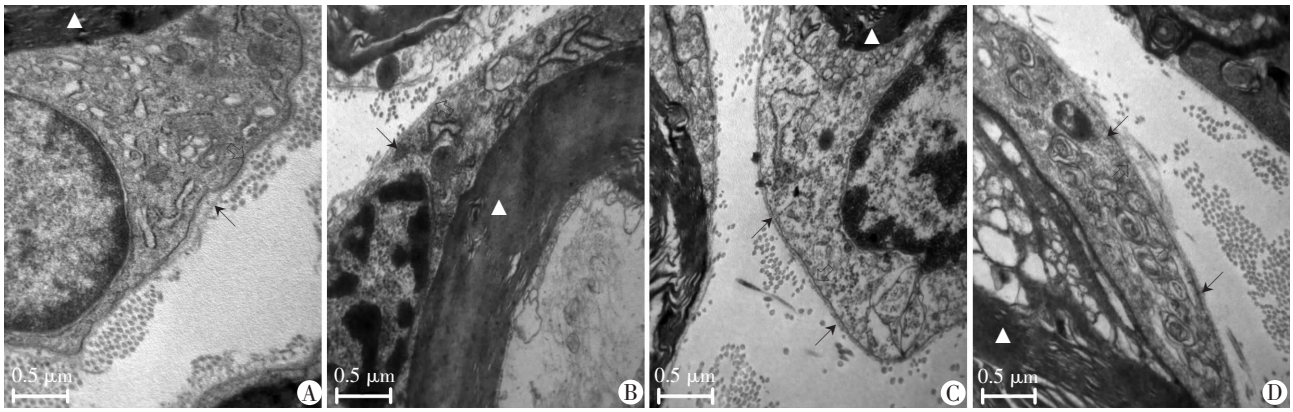
对照组神经组织中以绿色荧光为主,只有零星红色荧光点状分布,表明细胞活性程度高,只有极少量死亡细胞存在(图2A)。UW液保存1周组神经组织较对照组红色荧光分布增多,绿色荧光减弱,提示细胞活性降低、死亡细胞增多(图2B)。UW液保存4、6周组神经组织中均以红色荧光为主,绿色荧光极其微弱,二者间未见明显差别,说明UW液低温保存神经组织4周及以后,神经组织内以死亡细胞为主,活细胞几乎丧失殆尽(图2C、D)。

### 2.3 神经组织凋亡细胞检测

UW液低温保存1、4、6周神经组织中TUNEL阳性细胞数分别为(6.6±1.35)、(14.5±1.25)和(15.2±1.37),较对照组(1.6±0.63)均有明显增加($P<0.01$);UW液保存4、6周组与保存1周组相比也有明显统计学差异($P<0.01$),但保存4周组神经组织中TUNEL阳性细胞数与保存6周组无明显统计学差异(图3)。

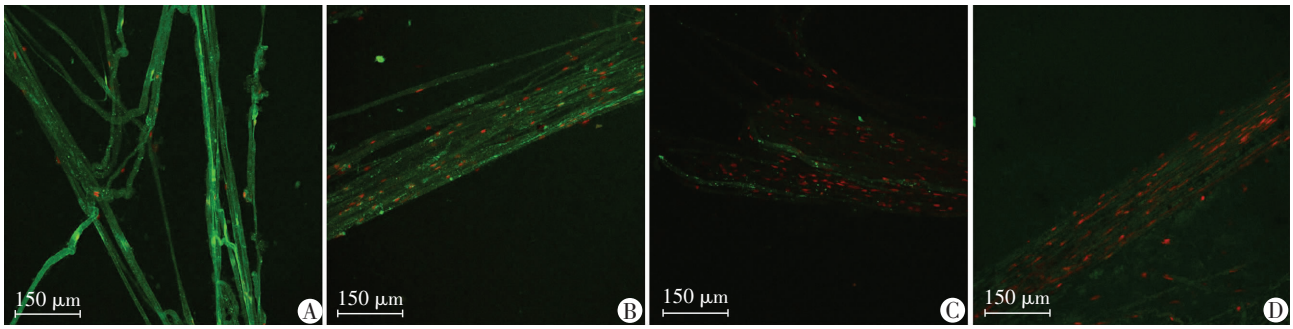
### 2.4 神经组织ICAM-1和MHC Ⅱ蛋白检测

UW液低温保存1、4、6周组,与对照组相比,神经组织中ICAM-1和MHC Ⅱ蛋白的表达均下调($P<0.05$);UW液保存4、6周组与保存1周组比较差异亦具有显著性($P<0.05$),但保存4周组与保存6周组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。



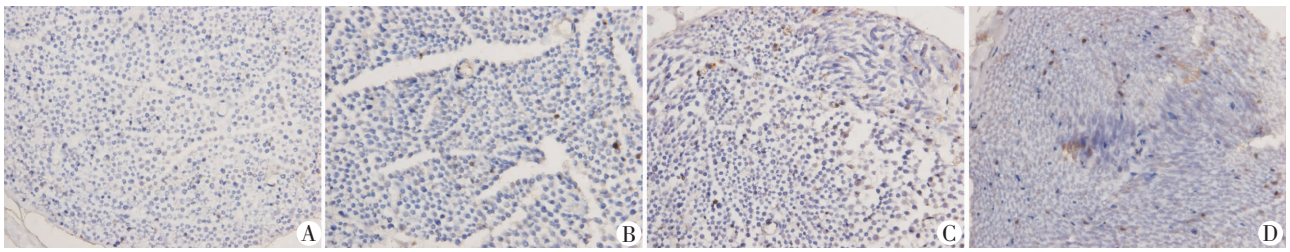

↑:雪旺细胞基底膜;⇳:雪旺细胞胞膜;△:髓鞘;A:对照组;B:UW 液保存 1 周组;C:UW 液保存 4 周组;D:UW 液保存 6 周组

**图 1　各组坐骨神经组织透射电镜观察**




活细胞标记物 Calcein-AM 荧光标记呈绿色,死细胞标记物 EthD-I 荧光标记呈红色;A:对照组;B:UW 液保存 1 周组;C:UW 液保存 4 周组;D:UW 液保存 6 周组

**图 2　激光扫描共聚焦显微镜观察各组坐骨神经组织的细胞活性情况**




A:对照组;B:UW 液保存 1 周组;C:UW 液保存 4 周组;D:UW 液保存 6 周组

**图 3　TUNEL 检测各组坐骨神经组织细胞凋亡情况**　(×400)

**表 1　各组神经组织 ICAM-1 和 MHCⅡ蛋白相对表达量**($n=30$, $\bar{x}\pm s$)

| 组别 | ICAM-1 蛋白 | MHC Ⅱ 蛋白 |
|---|---|---|
| 对照组 | 0.844 ± 0.071 | 0.718 ± 0.113 |
| UW 液低温保存组 | | |
| 1 周 | 0.612 ± 0.125[a] | 0.527 ± 0.101[a] |
| 4 周 | 0.376 ± 0.116[ab] | 0.304 ± 0.100[ab] |
| 6 周 | 0.370 ± 0.154[ab] | 0.300 ± 0.029[ab] |

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 UW 液保存 1 周组比较

## 3　讨论

自体神经移植是周围神经损伤修复的“金标准”,但因来源受限、供区并发症等缺点,极大地限制了其临床应用,而同种异体神经移植则被认为是目前治疗长段周围神经缺损的有效替代方法[1]。与器官移植一样,神经移植技术的发展也受限于其体外保存方法和质量的改进,但目前国内外尚无公认的周围神经体外保存方法。UW 液具有减轻细胞水肿、拮抗钙超载、抗氧自由基和缺血/再灌注损伤等优点[2],其体外保存肝、肾等器官已取得良好效果[3-4],而目前有关 UW 液低温保存周围神经的研究报道尚不多。

理想的体外保存方法应当使保存后的神经如同新鲜神经一样,为神经再生提供所需的条件:①完整的轴突再生管道。雪旺细胞基底膜是沉积在雪旺细胞外围的一层有序紧密排列的细胞外基质,是轴突再生的理想三维支架导管,对轴突成功再生极为重要[5-6]。②活性雪旺细胞(Schwann cells, SCs)。SCs 是周围神经的主要结构和功能细胞,能合成和分泌多种神经营养

因子如神经生长因子(NGF),脑源性神经营养因子(BDNF),促进神经轴突再生[7]。研究表明,神经桥接导管复合SCs后,其促神经再生作用明显增强[8]。本实验采用UW液低温保存大鼠坐骨神经后,HE染色及透射电镜扫描结果显示,各保存时相点UW组神经组织的神经外膜和雪旺细胞基底膜管道结构均能保持较好的完整性,未见明显变形、塌陷或崩解,与对照组相比无明显差异。但激光共聚焦显微镜观察和TUNEL染色发现,各保存时相点UW组神经组织细胞活性降低、细胞凋亡增多,且4、6周组与1周组相比,细胞活性降低和细胞凋亡增多尤其明显,但4、6周组间差别不大,上述结果表明UW液低温保存方法较有效地维持保存神经组织中细胞活性的时限不超过1周,而一旦保存时限达到或超过4周,神经组织中细胞活性则几乎丧失殆尽。这也与Levi等[9]的观点基本一致。

此外,理想的体外保存方法还应有效降低保存神经的免疫原性,以减轻移植排斥反应。MHC Ⅱ和ICAM-1分子在移植排斥反应中起着重要作用,MHC Ⅱ分子与$CD4^+$T细胞活化、增殖密切相关[10],而$CD4^+$T细胞是介导同种异体排斥反应的关键细胞;ICAM-1则在T细胞黏附、激活及侵入等环节发挥了作用[11]。本实验Western blot检测发现各保存时相点UW组神经组织MHC-Ⅱ和ICAM-1分子的表达均降低,且4、6周组均低于1周组,但4、6周组间未见明显差异。上述结果提示UW液低温保存方法可以降低保存神经的免疫原性,且免疫原性的下降程度在一定时限内呈时间依赖性。研究表明神经组织的抗原性主要存在于SCs,而来源于SCs的MHC Ⅱ和ICAM-1分子更被认为是异体神经桥接物的主要抗原物质[12],并且已发现采用冷冻、化学萃取等脱细胞处理技术能有效地降低神经组织免疫原性[13-14]。因此本课题组分析认为,UW液低温保存后SCs活性下降、凋亡增加可能是神经组织免疫原性降低的原因之一。但活性SCs对轴突再生有重要的促进作用,其缺失势必将严重影响周围神经缺损特别是长段缺损的修复效果。已有报道称无细胞神经桥接导管有效修复神经缺损的长度不超过3 cm[15]。

综上所述,UW液低温保存方法能有效维持周围神经组织神经外膜和雪旺细胞基底膜结构完整性,并降低保存神经的免疫原性,但维持神经组织细胞活性的时限较短。本课题组认为单纯采用UW液低温保存周围神经,为了有效地保留神经组织细胞活力,保存时限不应超过1周。在进一步的实验研究中,可以尝试改良UW液成分如增加具有抗细胞缺血缺氧损伤、抗细胞凋亡等作用的组分,以寻求在降低神经免疫原性的同时,尽量保留其活性细胞组分,有效地延长其体外保存时限,从而改善体外保存后的神经修复周围神经缺损尤其是长段缺损的效果,并推动周围神经移植库的构建。

## 参考文献:


[1] Siemionow M, Brzezicki G. Chapter 8: Current techniques and concepts in peripheral nerve repair [J]. Int Rev Neurobiol, 2009, 87: 141-172.

[2] Belzer F O, Southard J H. Principles of solid-organ preservation by cold storage [J]. Transplantation, 1988, 45(4): 673-676.

[3] Lopez-Andujar R, Deusa S, Montalva E, *et al*. Comparative prospective study of two liver graft preservation solutions: University of Wisconsin and Celsior [J]. Liver Transpl, 2009, 15(12): 1709-1717.

[4] Opelz G, Dohler B. Multicenter analysis of kidney preservation [J]. Transplantation, 2007, 83(3): 247-253.

[5] Bozkurt A, Brook G A, Moellers S, *et al*. In vitro assessment of axonal growth using dorsal root ganglia explants in a novel three-dimensional collagen matrix [J]. Tissue Eng, 2007, 13(12): 2971-2979.

[6] Ide C, Tohyama K, Yokota R, *et al*. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration [J]. Brain Res, 1983, 288(1/2): 61-75.

[7] Madduri S, Gander B. Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration [J]. J Peripher Nerv Syst, 2010, 15(2): 93-103.

[8] Sun X H, Che Y Q, Tong X J, *et al*. Improving nerve regeneration of acellular nerve allografts seeded with SCs bridging the sciatic nerve defects of rat [J]. Cell Mol Neurobiol, 2009, 29(3): 347-353.

[9] Levi A D, Evans P J, Mackinnon S E, *et al*. Cold storage of peripheral nerves: an in vitro assay of cell viability and function [J]. Glia, 1994, 10(2): 121-131.

[10] 柏秀娟, 张绪清. MHC Ⅱ类反式激活因子在上调HepG2细胞HLA Ⅱ类分子表达中的作用 [J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(21): 2019-2022.

[11] 柳祎, 孙宗全. 细胞间黏附分子-1的反义寡核苷酸在小鼠心脏移植中的作用 [J]. 中华器官移植杂志, 2007, 28(12): 741-745.

[12] Atchabahian A, Mackinnon S E, Hunter D A. Cold preservation of nerve grafts decreases expression of ICAM-1 and class II MHC antigens [J]. J Reconstr Microsurg, 1999, 15(4): 307-311.

[13] 孟庆刚, 岳琦, 马勇胜. 冷冻法与免疫抑制剂法对鼠异体神经移植影响的比较研究 [J]. 中华现代临床医学杂志, 2003, 1(8): 673-675.

[14] 孙明学, 唐金树, 王鑫, 等. 去细胞处理对化学去细胞异体神经免疫原性的影响 [J]. 中华外科杂志, 2006, 44(4): 275-278.

[15] Hess J R, Brenner M J, Fox I K, *et al*. Use of cold-preserved allografts seeded with autologous Schwann cells in the treatment of a long-gap peripheral nerve injury [J]. Plast Reconstr Surg, 2007, 119(1): 246-259.


(**收稿**:2011-10-18;**修回**:2011-11-10)

(编辑 龙 亮)