纯化的大鼠嗅鞘细胞在大鼠脊髓损伤中的修复作用

姜复龄[1],何 佳[2] (1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所脊柱外科,重庆 400042;2. 华中科技大学附属同济医院神经内科,湖北 武汉 400030)

[摘 要] **目的** 探讨纯化的大鼠嗅鞘细胞对损伤的脊髓的修复作用,评价其作为脊髓损伤治疗的可行性。**方法** 用新生 Wistar 大鼠嗅球做嗅鞘细胞的培养,大量繁殖并利用免疫吸附进行纯化;制造大鼠脊髓横断伤模型;将纯化的细胞以不同的浓度进行细胞移植,连续观察损伤脊髓的变化、神经功能评定(BBB 评分)及其组织化学变化。**结果** 免疫吸附是纯化嗅鞘细胞的可靠方法,在细胞浓度为 3×10^5 mol/L 时细胞移植效果较好,术后连续观察,试验组较对照组有明显的运动功能的恢复,组织化学观察,移植区神经纤维数量增多。**结论** 嗅鞘细胞移植可在一定程度上促进脊髓损伤神经纤维再生和功能恢复。

[关键词] 脊髓损伤;抗体纯化;嗅鞘细胞移植;神经再生

[中图分类号] R651.2 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)04-0359-03

Effect of purified olfactory ensheathing cells in repairation of acute spinal cord injury

JIANG Fu-ling, HE Jia(Department of Spine Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of purified olfactory ensheathing cells in repairation of acute spinal cord injury and discuss its feasibility for therapy. **Methods** The olfactory ensheathing cells were cultured and purified with the olfactory bulb of Wistar neonate rats. Manufacturing transection injury model in the rat spinal cord and transplanting the puried cells with different concentration, and then changes of the spinal cord, neurologic evaluation (BBB scores) and histochemistry changes were observed. **Results** Immunoadsorption is a reliable way to purify olfactory ensheathing cells. When the concentration was 3×10^5 mol/L, the effect of transplantion is the best. After a continuous postoperative observation, it was proved that there was an obvious improvement in terms of motor function, and the number of nerve fiber of the transplant area has increased. **Conclusion** Olfactory ensheathing cells transplantation can promote the nerve regeneration and the recovery of motor function in spinal cord injuries.

Keywords: spinal cord injury; antibody purification; olfactory ensheathing cells transplantation; nerve regeneration

近年来,嗅鞘细胞(OECs)移植治疗脊髓损伤有新的进展。Stamegna 等[1]在比较 OECs、SCs 及新生大脑细胞移植治疗脊髓脱髓鞘模型时发现,电生理测得 OECs 和 SCs 组轴突的传导速度和反应频率提高,说明轴突重新髓鞘化。将人胚胎嗅球嗅鞘细胞移植对 117 例不同脊髓节段损伤的晚期患者进行治疗,都有不同程度的脊髓功能的恢复[2]。除单纯 OECs 移植外,基因修饰后的 OECs 移植亦具有促进神经再生的功能,而且作用可能更大。除此之外,嗅鞘细胞与传统的神经营养素家族细胞基因的修饰[3],与端粒酶逆转录酶基因导致的永生化[4],进一步的提升了嗅鞘细胞在脊髓损伤治疗方面的功能。本实验探讨纯化的大鼠嗅鞘细胞对损伤的脊髓的修复作用,评价其作为脊髓损伤治疗的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM/F12 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(Hyclone 公司),小鼠抗大鼠 Thy1.1 单克隆抗体、羊抗小鼠 IgG(Sigma 公司),胰蛋白酶(Sigma 公司),多聚氨酸(poly-L-Lysine:Sigma 公司),阿糖胞苷(arabinoside cytosi Ara-c:Sigma 公司),牛垂体提取物(bovine pituitary extract BPE:Sigma 公司),Forskolin(Sigma 公司),DAB 免疫组化试剂盒(北京中山公司),GENMED 冰冻切片神经纤维银染试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司),实验动物新生 Wistar 大鼠由华中科技大学同济医学院动物中心提供(许可号:20051006)。

1.2 嗅鞘细胞的分离和纯化

无菌环境下完整分离大鼠嗅球,剥除软脑膜和血管膜(解剖显微镜下),机械分离嗅球成 3 组 1 ~ 2 mm 织小块。用 0.2% 胰酶 37 ℃孵箱中消化 30 min,滤网滤过组织残渣,收取细胞悬液,1 000r/min 离心 15 min,弃上清加入无血清 DMEM/F12 培养基清洗,最后用 10% FBS 完全培养基重悬细胞成单细胞悬液,接种于 25 cm^2 塑料培养瓶中,放入细胞培养箱。

采用改良 Nash 差速贴壁法和 Ara-c 化学抑制纯化培养 OECs。Ara-c 终浓度为 1×10^5 mol/L,作用 48 h,加入条件培养

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201304006

[通讯作者]何 佳,女,博士,主要从事神经损伤与修复的基础研究,E-mail:hj030887@163.com

[收稿日期] 2013-06-14 [修回日期] 2013-06-25

基(10% FBS + 20 μmol/L forskolin + 20 μg/L BPE + DMEM/F12)纯化培养。细胞与小鼠抗大鼠 Thy1.1 单克隆抗体共同孵育 30 min,冲洗后去除多余的抗体;细胞置于羊抗小鼠 IgG 包被的培养瓶中 4 ℃下孵育 1 h 后细胞重新置于培养瓶中培养。

1.3 免疫组织化学方法检测及纯度测定

将原代及纯化的嗅鞘细胞爬片,用免疫组织化学方法(ABC 法)进行鉴定。细胞爬片后将爬片取出,置于另一 24 孔板内,PBS 洗两遍;40% 多聚甲醛固定,PBS 洗片;滴加一抗 A(1∶100),37 ℃孵育;再次 PBS 冲洗;滴加试剂 B(IgG/Bio),孵育后 PBS 冲洗;滴加试剂 C(S-A/HRP),孵育后 PBS 冲洗后 THB 漂洗一次;室温下暗处放置;细胞核衬染,浸入苏木精染液 2 min;甘油封片。

1.4 脊髓横断伤模型的建立及其嗅鞘细胞移植

1.4.1 脊髓横断伤模型的建立[5] 60 只大鼠,随机分为 A 组(细胞移植组)、B 组(阴性对照组)、C 组(空白对照组),每组 20 只;0.4% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉动物,成功后,A、B、C 组无菌条件下逐层切开分离组织至 T_{13} ~ L_1 椎体,咬除椎板,显示腰膨大;A、B、C 组于手术显微镜下纵向切开硬脊膜约 0.5 cm,借助脑膜镊用虹膜刀沿脊髓后动脉左侧切入,并适度旋转以搅毁局部脊髓,然后用负压吸引器吸收损毁的脊髓组织,从而在半切脊髓的基础上又造成直径约 2 mm,深达脊髓腹侧硬脊膜的盲洞损伤,以用于移植供体组织。

1.4.2 嗅鞘细胞移植 A 组脊髓损伤部位注入 OECs 细胞悬液,其细胞浓度为 2×10^5/mL。B 组脊髓损伤部位注入 0.5 μl 的无血清的 DMEM/F12 培养液。C 组只损伤脊髓,不做处理。

1.5 移植后脊髓功能的恢复数据监测

1.5.1 下肢运动功能检查评价 爬坡试验:倾斜 45° ~ 50° 的钢丝网长 40 cm,宽 50 cm,动物由下向上爬行。Tarlov 评分:0 级:下肢无收缩;Ⅰ级:下肢肌肉有收缩,髋、膝关节无活动;Ⅱ级:髋、膝关节无活动但不能承重;Ⅲ级:能承重,但不能主动攀登;Ⅳ级:能主动攀登。BBB 评分:根据后肢体位、活动方式、活动范围来定义,其总得分为 21 分。

1.5.2 电生理检查[6] 移植后 6、12 周行诱发电位检查,采用经颅磁刺激法,刺激强度为 80%,将电极置于小腿三头肌记录运动诱发电位,参考电极及地线分别置于同侧跟腱及膝部。

1.5.3 组织学检查 - 银染 术后 12 周,所有存活大鼠经腹腔内注射麻醉后,用等渗盐水及 4% 多聚甲醛做心脏灌注固定,取脊髓损伤区远、近端常规石蜡包埋、连续切片,包括纵向和横向,其厚度为 10 μm。用 N F 单克隆抗体,采用 ABC 法(方法同上)做免疫组化染色。

1.6 统计学方法

所有数据资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计分析采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析。

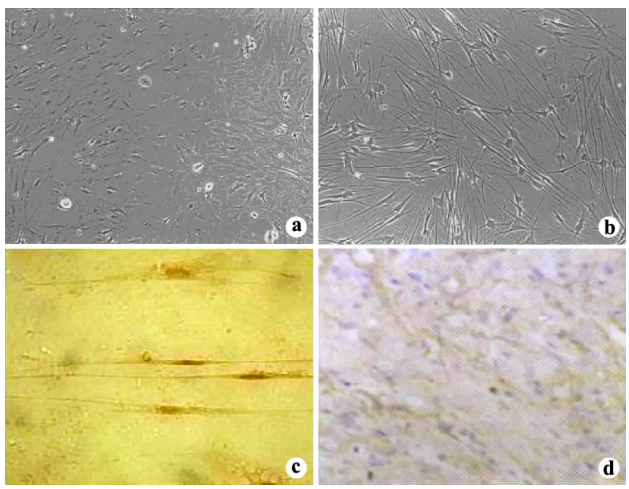
2 结果

2.1 大鼠嗅鞘细胞培养与纯化

倒置相差显微镜下,培养 36 h 以后,细胞完成贴壁,多级的、平角的细胞成分较多;纯化后 4 d(图 1a),双极或多极的细胞类型增加,平角细胞类型减少,免疫荧光证明平角细胞为成纤维细胞类型;纯化后 14 d(图 1b),细胞生长密集,部分细胞已接触,细胞形态为双极为多。分离培养的嗅鞘细胞进行 P75 免疫组化染色,在倒置相差显微镜下可见双极或三极的嗅鞘细胞胞体(图 1c)。显微镜下细胞计数(一个视野下,阳性细胞数/细胞总数)得出该法分离培养的嗅鞘细胞在 95% 以上。

2.2 术后脊髓组织学观察

A 组:脊髓损伤区结构紊乱,纤维走向杂乱,没有一致的方向,细胞数目较 B 组多,其远端的神经纤维的数目明显少于近端。B 组:脊髓损伤后 3 h 脊髓灰质中多灶性出血,白质尚正常;6 h 后灰质中出血增多,遍布全灰质,白质水肿;12 h 后白质出现出血灶,灰质中神经细胞退变坏死,白质中神经轴突开始退变;24 h 灰质中心出现坏死,白质中多处轴突退变;48 h 中心软化,白质退变;晚期为胶质组织替代,正常的脊髓组织结构中断,代以增生的纤维状瘢痕组织,仅少量的神经纤维可以通过横断区界面,脊髓损伤段常有空洞存在,近端可有少许的神经纤维存在。C 组:早期的与 B 组相同,后期没有神经纤维的生长。术后 12 周,组织学检查 - 银染结果(图 1d)可见深棕色的神经纤维。



a:纯化培养 4 d,嗅鞘细胞细胞立体感强,折光性好,成纤维细胞较少(×100);b:纯化培养 14 d,嗅鞘细胞生长更加密集,局部细胞胞体突起平行排列(×150);c:未纯化细胞 6 d,OECs 细胞胞体深染(×100);d:脊髓损伤区纵切片,深棕色的为神经纤维(×200)

图 1 大鼠嗅鞘细胞培养和术后脊髓组织学观察

2.3 移植术后脊髓运动功能、电生理改变

术后脊髓运动功能的改变:A 组死亡 4 只,B 组死亡 2 只,C 组没有死亡。术后 2 周:A 组大鼠后肢有少许功能恢复,B 组、C 组后肢没有任何运动功能恢复。术后 4 周:A 组大鼠的 BBB 得分稳定增加,达到 4 分;B 组、C 组有少许的运动功能的恢复,但其 BBB 得分小于一分。术后 6 ~ 12 周:A 组大鼠后肢得分达到 12 分,B 组、C 组维持在 3 分左右。A 组在各个时间段得分及其增长幅度均高于 B 组、C 组得分,但其平均得分与正常值差别较大;B 组、C 组得分的均值差别无统计学意义,见表 1。

术后电生理的变化:刺激左侧胫神经,在对侧皮层可以记录到一稳定的"W 型"波,波峰向下定义为正波波峰向上为负波(N 波)。从波形上可以看出,由于 P1N1 比较稳定,所以我们选用 N1 波作为测量指标。正常大鼠的 N1 潜伏时和波幅分别为(19.09 ±1.01)ms,(1.92 ±0.84)μV 。术后不同时间点各组动物的 CSEP 潜伏时和波幅数据见表 2。

表 1 脊髓损伤后不同时间各组动物 BBB 得分

组 别	*n*	2 周	4 周	6 周	8 周	10 周
A 组	16	2.12 ±0.014	4.74 ±0.023	6.99 ±0.081	8.03 ±0.011	12.03 ±0.011
B 组	18	0	0.26 ±0.020	1.03 ±0.061	3.03 ±0.011	3.59 ±0.011
C 组	20	0	0.40 ±0.011	1.01 ±0.080	3.47 ±0.011	3.87 ±0.011

表 2 术后各组 6、12 周 N1 波的潜伏时和波幅

组 别	*n*	术后 6 周		术后 12 周	
		潜伏时(ms)	波幅(%)	潜伏时(ms)	波幅(%)
A 组	16	23.4 ±0.8	21 ±6	21.6 ±0.8	80 ±6
B 组	18	26.0 ±0.8	20 ±5	27.0 ±0.3	24 ±4
C 组	20	25.0 ±0.7	22 ±4	24.0 ±0.9	22 ±6

3 讨论

本试验在嗅鞘细胞的分离、纯化,采用了不同的纯化方法,取得了满意了效果。在纯化阶段,我们采用过差速贴壁法[7]、Ara C 纯化、免疫吸附 3 种方法;Ara C 是一种使用较多的纯化方法,作为一种抑制细胞有丝分裂的抑制剂,在抑制成纤维细胞的同时也抑制了嗅鞘细胞;我们应用 p75 抗体包被培养皿进行免疫吸附,并使用 Thy1.1 抗体结合补体对成纤维样细胞产生细胞毒作用杀灭污染细胞达到纯化目的,细胞的纯度一般都在 95% 以上,在接种细胞密度时,我们通过比较认为以 10^6/mL 接种时对细胞的纯化最有利,其缺点是价格较贵,步骤较繁琐。

由于神经细胞属于不可再生细胞类型,其再生能力较差,特别是神经坏死后其微环境的破坏,加剧了其再生的难度。人们从哺乳动物的嗅神经的毁损后的嗅功能的丧失和恢复的过程中得到启发并做了大量的研究。1897 年有文献最早阐明了哺乳动物嗅球中存在两种大胶质细胞:星形细胞和梭形细胞,前者是星形胶质细胞,后者现已被证明是 OECs[8]。随着人们对 OECs 的不断深入研究,OECs 的生物学特性逐渐被揭晓,其移植治疗脊髓损伤的效果也得到认可,本试验就是在这样的背景下探讨嗅鞘细胞对脊髓损伤的潜在治疗的效果。

脊髓损伤后,由于轴突的再生能力较差,及其局部微环境的破坏和胶质瘢痕的限制,导致了神经功能恢复的难度较大。嗅鞘细胞能有效的促进轴突的再生和微环境的复原。本试验采用细胞移植的方法,并使用 BBB 功能评分和免疫组织化学的评定方式,从功能和形态学两方面对脊髓损伤的恢复情况做了较为客观的评价。试验结果证明,嗅鞘细胞能有效的促进神经功能的恢复。试验组与对照组的结果比较,其有效性显而易见。术后的神经电生理的变化,也间接的支持毁损神经的再生。

作为一种新的研究方法,嗅鞘细胞其特有的生物学性状使其成为目前细胞移植治疗脊髓损伤最有应用前景的候选细胞之一。但是,随着研究的进一步深入存在诸多方面的不足。由本试验可以看出:虽然细胞移植组较对照组有较大的神经功能的改善,但其 BBB 评分在 12 分左右就停滞不前,与其功能的完全恢复差距较远;作为种子细胞,嗅鞘细胞的生物学特性没有完全得到阐明。

[参考文献]

[1] Stamegna JC, Felix MS, Roux-Peyronnet J, et al. Nasal OEC transplantation promotes respiratory recovery in a subchronic rat model of cervical spinal cord contusion[J]. Exp Neurol, 2011; 229(1): 120 - 131.

[2] Gomes ME, Reis RL, Cunha AM, et al. Cytocompatibility and response of osteoblastic-like cells to starch-based polymers: effect of several additives and processing conditions[J]. Biomaterials, 2001, 22(13): 1911 - 1917.

[3] Cancalon PF. Survival and subsequent regeneration of olfactory neurons after a distal axonal lesion[J]. J Neurocytol, 1987; 16(6): 829 - 841.

[4] Heredia M, Gascuel J, Ramón-Cueto A, et al. Two novel monoclonal antibodies (1.9.E and 4.11.C) against olfactory bulb ensheathing glia [J]. Glia 1998, 24(3): 352 - 364.

[5] 黄红云,陈 琳,王洪美,等. 年龄对嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤疗效的影响[J]. 首都医科大学学报, 2003, 24(1): 56 - 59.

[6] 任继鑫,孙天胜. 嗅鞘胶质细胞的培养、鉴定及在脊髓损伤中的应用[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2002, 129(5): 385 - 387.

[7] Nash HH, Borke RC, Anders J. New method of purification for establishing primary cultures of ensheathing cells from the adult olfactory bulb [J]. Glia, 2001, 34(2): 81 - 87.

[8] Pressler RT, Strowbridge BW. Blanes cells mediate persistent feedforward inhibition onto granule cells in the olfactory bulb[J]. Neuron, 2006, 49 (6): 889 - 904.

(编辑:魏 源)