微囊化兔坐骨神经组织细胞移植对脊髓损伤后大鼠 GDNF 表达的影响

陈 惠[1],向唯聂[2],杨耀防[2],李卫东[3] (九江学院:1. 基础医学院实验中心;2. 医学部;3. 基础医学院科研中心,江西 九江 332000)

[摘 要] **目的** 探讨微囊化兔坐骨神经组织细胞移植对脊髓半横断损伤后大鼠胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)的表达影响。**方法** 成年 SD 大鼠 80 只随机分为 4 组,微囊组($n=25$)、细胞组($n=25$)、单损组($n=25$)、正常组($n=5$)。术前制备兔坐骨神经细胞混悬液以及将其微囊化,微囊组、细胞组和单损组大鼠在脊髓半横断伤后,立即在损伤处分别植入 10 μl 微囊化坐骨神经组织细胞、10 μl 坐骨神经组织细胞以及 10 μl 生理盐水。于术后 2 d、7 d、14 d、21 d、28 d(每个时相取 5 只大鼠)取出损伤部位脊髓组织,正常组(每个时相取 1 只大鼠)则取相应节段脊髓。组织石蜡包埋后切片,行免疫组织化学染色观察 GDNF 的表达变化。**结果** GDNF 阳性染色主要见于神经元细胞及胶质细胞的胞浆内。大鼠脊髓损伤后上述细胞 2 d 后表达开始上升,21 d 达到最高。微囊组与单损组、细胞组比较差异有显著性($P<0.05$)。**结论** 微囊化兔坐骨神经组织细胞移植于大鼠损伤脊髓后,可以抑制炎症反应,促进 GDNF 的表达,有利于大鼠运动功能恢复。

[关键词] 脊髓损伤;微囊;移植;胶质细胞源性神经营养因子;大鼠

[中图分类号] R651.2;R392.4;R332 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)06-0602-04

Effects of transplantation of microencapsulated rabbit sciatic nerve on expressions of GDNF after spinal cord injury in rats

CHEN Hui, XIANG Wei-nie, YANG Yao-fang, LI Wei-dong (College of Basic Medical Science, Jiujiang University, Jiujiang Jiangxi 332000, China)

Abstract: Objective To explore the effects of transplantation of microencapsulated rabbit sciatic nerve cells on glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expressions after spinal cord injury (SCI) in rats. **Methods** Eighty Sprague Dawley rats were randomly divided into four groups: microcapsule group ($n=25$), cell group ($n=25$), injury control group ($n=25$) and normal group ($n=5$). The rabbit sciatic nerve cells suspension was prepared from rabbits. SCI was conducted by hemisection injury of spinal cord. Different groups were respectively implanted with 10 μl microencapsulated cells suspension (microcapsule group), 10 μl sciatic nerve cells suspension (cell group) and 10 μl physiological saline (injury control group). Spinal cord tissues were taken out (five rats per hour) 2 days, 7 days, 14 days, 21 days and 28 days after operation respectively, while corresponding tissues were collected (one rat per hour) in normal group. All tissues were embedded in paraffin and sectioned. Meanwhile, immunohistochemical stain was applied for the detection of GDNF. **Results** The GDNF positive staining was mainly seen in the cytoplasm of neurons and gliocytes. The expressions of GDNF were increased two days after SCI and were reached the highest leve1 21 days after SCI. The expression levels of GDNF in microcapsulated group were remarkably different from those in injury control group and cell group ($P<0.05$). **Conclusion** It suggests that the transplantation of microencapsulated rabbit sciatic nerve cells could suppress inflammatory reaction and improve the expressions of GDNF, thus accordingly promote the recovery of motor function in rats.

Keywords: spinal cord injury; microcapsule; transplantation; glial cell line-derived neurotrophic factor; rat

微囊化异种坐骨神经移植对脊髓损伤修复效果要好于单纯坐骨神经组织细胞移植[1],然而其机制不完全清楚。胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)是神经营养因子家族成员之一,其对多巴胺能神经元[2]和胆碱能神经元有强大的营养活性,对感觉神经元也有营养活性。本研究通过观察不同分组的动物在相同时段的 GDNF 表达差异,以探讨微囊化异种坐骨神经移植对脊髓损伤修复的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料和动物

Ⅳ型胶原酶(Gibco 公司),海藻酸钠(Sigma 公司),胰蛋白酶-EDTA(北京索莱宝生物有限公司),改良 Eagle's 培养液(Hyclone 公司),GDNF 多克隆抗体、sABC 试剂盒、DAB 显色剂

[基金项目] 江西省卫生厅立项项目(20061128)

[作者简介] 陈 惠(1971 -),女,江西省九江市人,实验师,硕士,主要从事神经损伤方面的研究。E-mail:chen8200233@qq.com

[通讯作者] 向唯聂(1966 -),男,江西省九江市人,教授,硕士,主要从事神经生物学方面的研究。

[收稿日期] 2011-06-10 [修回日期] 2011-07-15

(武汉博士德生物有限公司),水平流超净台(ESCO 有限公司)。健康幼年家兔 6 只,体重 2 500 ~ 3 300 g;健康成年 SD 大鼠 80 只,体重 220 ~ 260 g,雌雄不限,均由南昌大学医学院实验动物科学部提供。实验于 2009 年 6 月至 2010 年 6 月在九江学院医学院科研中心完成。

1.2 实验动物分组

80 只 SD 大鼠按随机数字表法分为 4 组;正常对照组 5 只,微囊组、细胞组和单纯损伤组各 25 只,各组根据脊髓损伤后移植物的不同而命名,即微囊组植入微囊化坐骨神经组织细胞、细胞组植入坐骨神经组织细胞、单损组植入生理盐水。

1.3 兔坐骨神经细胞悬液制备及微囊化

6 只幼年家兔在无菌条件下取双侧坐骨神经,置于 4 ℃改良 Eagle's 培养液,在水平流超净台下去神经外膜和束膜,剪碎成小块,然后加入 0.25% 胰蛋白酶和Ⅳ型胶原酶 37 ℃水浴消化 30 min,离心,铜网过滤,加入生理盐水用吸管轻轻吹打成细胞团。将坐骨神经细胞悬液分为两份,一份保存于 4 ℃中待移植,另一份将其微囊化。制备好的坐骨神经细胞悬液与 30% 氯化钡溶液[3](过滤除菌)1∶1 充分混合,吸入自制的微囊注射器中,然后逐滴注射入 1.5% 海藻酸钠生理盐水溶液(过滤除菌)中,微囊立即形成,生理盐水洗涤后,将所得的微囊化神经细胞置于生理盐水中 4 ℃保存待移植。

1.4 大鼠脊髓半横断损伤模型建立和移植

SD 大鼠经腹腔麻醉后,以 T_{10} 为中心,切开皮肤,分离肌肉,打开椎管,暴露脊髓后,以脊髓前正中裂为界,用虹膜刀向右半侧水平横向切开,并去除横断侧约 2 mm 脊髓组织,使其形成间隙,于伤处根据不同的分组立即植入不同的移植物。微囊组植入明胶海绵吸附的 10 μl 微囊化坐骨神经组织细胞,细胞组植入明胶海绵吸附的 10 μl 坐骨神经组织细胞、单损组植入明胶海绵吸附的 10 μl 生理盐水。移植前后均不使用免疫抑制剂。术后腹腔注射青霉素 3 d。正常对照组只打开椎管,不切断脊髓。

1.5 病理学检查

细胞组、单损组和微囊组动物分别于术后 2、7、14、21、28 d(每个时间点 5 只大鼠),麻醉后开胸,经心-升主动脉以 4% 多聚甲醛灌注,以损伤平面为中心,取出包括损伤头、尾侧各约 4 mm长的脊髓段,正常组大鼠则灌注后即刻取相应部位脊髓。制成常规石蜡切片,分为 3 套,分别进行 HE 染色、尼氏染色和 GDNF 免疫组化染色(SABC)。

1.6 免疫组化染色检测和图像分析

GDNF 免疫组化染色按试剂盒的说明步骤进行。首先将切片脱蜡至水,然后灭活内源性过氧化物酶,热修复抗原,血清封闭,滴加即用型 GDNF 兔抗,4 ℃过夜,再加生物素标记的二抗和 SABC 试剂,在室温下作用 30 min 后,滴加 DAB 显色,苏木素复染后封片。PBS 代替一抗作阴性对照。脊髓 GDNF 免疫组化染色切片,在普通显微镜下观察其阳性表达,并应用图像分析,计算各组 GDNF 染色切片阳性细胞数密度(每立方毫米细胞个数)。

1.7 行为学观察

细胞组、单损组和微囊组动物分别于术前和术后 2、7、14、21、28 d(每个时间点 5 只大鼠)将大鼠放置观察台上,对右后肢肌肉关节活动情况依据 BBB 评分标准进行评分,判断后肢运动功能恢复情况,评分的分值越高说明大鼠的后肢功能越好,术前各组的分值均为 21 分,术后第 1 天分值为 0 分[4]。每次均在同一时刻观察。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计分析软件对 GDNF 染色结果进行 t 检验,行为学观察结果行非参数 Kruskal-Wallis 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经组织细胞悬液制备情况

将组织细胞悬液滴入细胞计数板,光镜进行细胞计数,细胞浓度为(2.0 ~ 2.4) × 10^6/mL,并用台盼蓝染色鉴别细胞成活率大于 95%。

2.2 脊髓损伤后运动功能恢复

术前各组大鼠运动功能均正常,评分均为 21 分,损伤后细胞组、单损组和微囊组大鼠右后肢出现瘫痪,评分为 0 分。第 2 天各组行为学观察无差异;从第 7 天起微囊组运动功能好于其他组,第 14 天差异最突出,直到第 28 天功能恢复都好于其他组。

表 1 脊髓损伤后动物后肢运动功能 BBB 评分($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	2 d	7 d	14 d	21 d	28 d
微囊组	1.00 ± 0.70	10.27 ± 1.15	16.32 ± 1.02	18.66 ± 1.27	20.66 ± 1.26
细胞组	1.00 ± 0.72	7.26 ± 1.13#	15.58 ± 1.21#	17.01 ± 1.24*	19.26 ± 1.28*
单损组	1.00 ± 0.68	6.98 ± 1.20#	15.34 ± 1.32#	16.85 ± 1.15*	19.20 ± 1.30*

*:与微囊组比较,$P < 0.05$;#:与微囊组比较,$P < 0.01$

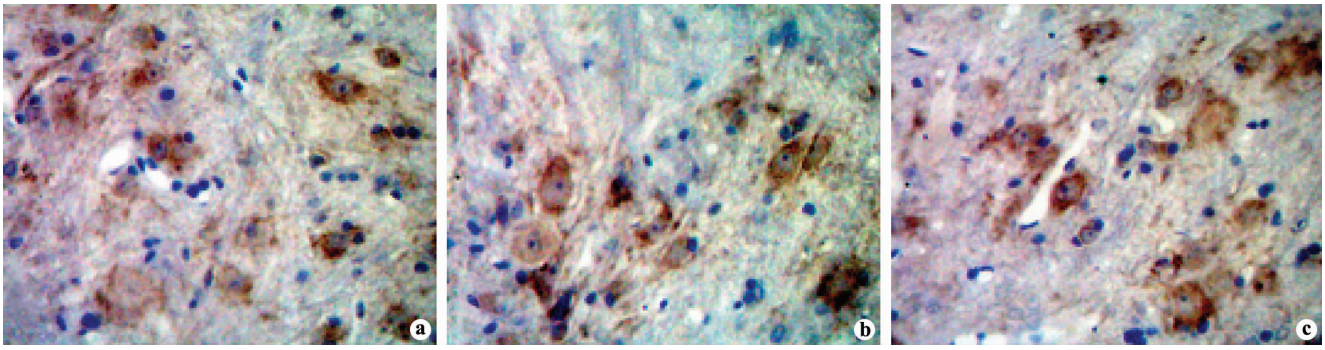
2.3 脊髓损伤后病理改变

脊髓损伤后第 2 天损伤段脊髓结构破坏严重,灰质中神经元胞体皱缩,核周尼氏体脱失、溶解,细胞边界模糊不清,损伤区出现大量的红细胞,出血严重,大量巨噬细胞和白细胞浸润,同时胶质细胞增生。微囊组巨噬细胞和白细胞浸润表现要轻于其他组。损伤后第 7 天,各组大量胶质细胞增生,微囊组只很少的白细胞和巨噬细胞浸润;而细胞组和单损组,仍有小量的白细胞和巨噬细胞浸润。损伤后第 14 天和第 21 天,主要表现神经元增生活跃,微囊组的尼氏小体着色深,并且数量多。损伤后第 28 天,神经元的尼氏小体颜色变浅,数量减少,各组无明显区别。正常组脊髓组织未见出血、坏死、组织水肿及变性等损伤表现。

2.4 损伤后 GDNF 的表达

脊髓半横断伤后第 2 天即出现 GDNF 染色阳性,呈棕黄色细小斑点状,第 7 天至第 14 天以后阳性细胞逐渐增多,散在或片状分布,数密度增大、染色较深,神经胶质细胞胞浆,神经元胞体胞膜和胞浆均表达;第 21 天 GDNF 表达至高峰,阳性细胞

数量继续增多,数密度达到最大值,染色继续加深,以微囊组最为明显(图 1),微囊组明显高于细胞组和单损组($P<0.01$);至第 28 天时斑点则减少,但阳性细胞数密度仍处于一个平台期,微囊组与细胞组、单损组比较差异仍有显著性意义($P<0.05$)。各组 GDNF 染色阳性细胞数密度见表 2。正常对照组阳性细胞数密度为(1.0 ±0.20)。



a:微囊组;b:细胞组;c:单损组

图 1 大鼠脊髓损伤后 21 d 脊髓切片 GDNF 免疫组织化学染色(SABC 法 ×400)

表 2 脊髓损伤后各组 GDNF 阳性细胞数密度($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	2 d	7 d	14 d	21 d	28 d
微囊组	2.68 ±0.18	10.29 ±1.14	14.97 ±1.14	22.26 ±0.21	12.87 ±1.04
细胞组	2.27 ±0.21	7.28 ±1.12#	10.19 ±1.15#	20.63 ±0.25*	11.16 ±1.09#
单损组	2.19 ±0.16	6.99 ±1.18#	10.03 ±1.21#	20.61 ±0.27*	11.13 ±1.01#

*:与微囊组比较,$P<0.05$;#:与微囊组比较,$P<0.01$

3 讨论

坐骨神经组织细胞其主要成分是许旺细胞,它是周围神经系统的神经胶质细胞,包绕轴突形成髓鞘和神经膜,在神经纤维的再生修复中起诱导、营养及促进轴突生长和成熟的作用。研究表明脊髓损伤后伤处移植许旺细胞,它们能继续存活、增殖、迁移和分化,能保护神经元、促进轴突的生长与再生,使神经元部分功能恢复[5],并能分泌多种神经营养因子,为损伤神经元的再生提供良好的微环境,同时支持和引导轴突再生,抑制胶质瘢痕形成。

异种细胞移植不可避免的问题就是免疫排斥反应,免疫排斥反应使移植效果下降。因此,本实验采用微囊化技术,将异种许旺细胞微囊化后再进行移植,即把许旺细胞包裹在海藻酸钡微囊里。此微囊是一种高分子多聚复合体,具有半通透性的膜性结构,允许小分子物质自由通过,营养物质、氧气和代谢产物可进行物质交换;同时微囊能阻挡大分子物质包括免疫活性细胞和抗体复合物通过,有效地保护囊内细胞不遭受宿主的细胞和体液免疫反应。正是因为微囊具有一个半通透性的膜性结构,一方面可以减轻移植的排斥反应,降低继发性损伤的程度,利于脊髓功能恢复;另一方面使得囊内的许旺细胞存活,促进脊髓再生。

正常大鼠脊髓切片神经元胞体几乎无 GDNF 表达,脊髓损伤后其神经元胞体可见棕黄色、颗粒状 GDNF 表达。GDNF 在大鼠脊髓神经元大量表达,尤其是腹角和 Clarke 柱[6]。GDNF 表达还可见于室管膜上皮细胞及脊髓神经胶质细胞,神经胶质细胞核的表达较核周质明显,Ⅰ、Ⅱ板层纤维和末梢内亦有强的 GDNF 反应,而其余板层程度稍低。GDNF 通过靶源性、自分泌、旁分泌方式与相应的特异性受体结合,激发各种信号通路而发挥其特殊的生物作用,促进中枢神经分化、生长和存活。GDNF 对离体运动神经元也有促进存活作用[7]。

微囊组与其他组相比较,脊髓内的炎症反应轻,后肢运动功能恢复情况较好。这可能与微囊化兔坐骨神经组织细胞在脊髓损伤后改善微环境、抑制炎症后的继发性损伤以及释放更多的营养因子等作用有关。微囊组 GDNF 阳性细胞数密度在第 2 天较其他组无差异,而炎症反应却轻,提示在微囊化的过程中可能对其坐骨神经细胞造成了损伤,以致微囊组 GDNF 的表达与其他组比较无统计学意义。而在脊髓损伤后 7、14、21、28 d 微囊组的 GDNF 的阳性细胞数密度与其他组有差异,说明坐骨神经细胞能存活,并能分泌 GDNF,微囊化神经细胞移植能更好地提供脊髓损伤后的神经再生的微环境,同时微囊具有缓释作用。运用 BBB 计分显示,微囊组运动功能恢复从第 7 天时好于其他组,第 14 天时差异最突出,直到第 28 天都好于其他组。从计分变化提示,第 7 天至第 21 天是大鼠后肢功能恢复最快的阶段,可能是炎症期过后进入恢复期神经营养因子仍持续分泌的结果。

本文认为,微囊化兔坐骨神经组织细胞移植于大鼠损伤脊髓后,可以抑制炎症反应,从而促进 GDNF 的表达,有利于大鼠运动功能恢复。然而,微囊化坐骨神

经细胞的方法需要进一步改进和研究,从而为脊髓损伤的治疗提供更好的思路。

[参考文献]

[1] 虞 琴,王向义,陈 洪,等. 微囊化兔坐骨神经组织细胞移植对大鼠脊髓半横断脊神经节 P 物质表达的影响[J]. 中国医科大学学报,2009,38(8):569 - 571.

[2] Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, et al. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle[J]. Science, 1994, 266(5187): 1062 - 1064.

[3] 李洪波,江 红,段翠密,等. BPA 微囊与 APA 微囊机械强度和生物相容性的比较研究[J]. 组织工程与重建外科,2006,2(2):70 - 72.

[4] 王 民,王栋琪,宋焕瑾,等. 脊髓损伤后大鼠后肢运动功能恢复的评分标准比较[J]. 美中国际创伤杂志,2006,5(3):5 - 7.

[5] Oudega M, Moon LD, de Almeida Leme RJ. Schwann cells for spinal cord repair[J]. Braz J Med Biol Res, 2005, 38(6): 825 - 835.

[6] 袁 源,王廷华,杨志敏. 胶质细胞源性神经营养因子与脊髓损伤修复[J]. 国外医学·神经病学神经外科学分册,2003,30(1):39 - 42.

[7] Chou AK, Yang LC, Wu PC, et al. Intrathecal gene delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor ameliorated paraplegia in rats after spinal ischemia[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2005, 133(2): 198 - 200.

(编辑:余汇洋)

(上接第 601 页)

修复、结扎、电烙及缝合组织。EndoWrist 仿真手腕器械只能用于软组织牵拉和切割,不得用于软骨、骨、坚硬的结缔组织等。因此在器械的处理过程中不得使用硬质用具清洗,并避免与硬物碰撞。

3 机器人手术器械的清洗与灭菌

3.1 内窥镜的清洗与消毒

12 mm 和 8.5 mm 双目内窥镜为三维立体成像,为手术提供良好的视野,因其结构复杂、价格昂贵,不可使用清洗机和超声清洗,以免震动致使内部光纤损坏。清洗前应确认镜头完好无损,固定放置在较安全的位置。首次冲洗去除镜体表面污物,再将镜头放入含酶溶液内浸泡 5 ~ 10 min,取出用软布擦洗镜干,旋转镜头黑色环形螺母,用软毛刷轻轻刷洗螺母内槽以保证清洗彻底,注意远端视窗不能使用尖锐物品或金属刷进行清洁。清洗完毕使用软布擦干,用 75% 酒精擦拭消毒,彻底干燥后使用环氧乙烷或等离子灭菌。

3.2 EndoWrist 手术器械的清洗与灭菌

EndoWrist 手术器械直接与患者组织接触,受血液、脂肪和蛋白质污染严重,手术中护士在更换 EndoWrist 器械时即应去除销轴、尖端效应器上的血液及污渍,术后使用流动水及清洁软毛刷刷洗器械表面,移动器械腕从不同角度清洗器械尖端再放入酶溶液内浸泡 5 ~ 10 min,用软毛刷重复刷洗器械表面及端头,避免污物残留[5]。用压力不低于 30 Psi 的压力水枪冲洗主冲洗口至少 20 s,并移动器械腕使其彻底冲洗,直到冲洗口流出的水变清。在主清洗口内注入酶清洁液后立即把 EndoWrist 器械放入含酶的超声波清洗机内清洗 15 min,取出器械再次用流动水冲洗主清洗口、器械外壳及尖端部位,以保证每个部位清洗有效。清洗完毕使器械尖端向上垂直摆放,确保水从器械轴和主冲洗口排出。用高压气枪从所有冲洗口端吹气,待器械彻底干燥,用记号笔做使用次数记录,透明纸塑袋单个包装,便于观察使用次数(EndoWrist 器械为半重复利用的配套设备可重复使用 10 次左右),EndoWrist 器械材质可耐受高温高压,因此可选用压力蒸汽灭菌,但应避免受压及碰撞。

3.3 其他辅助器械的处理

金属穿刺鞘、无钩穿刺器、内窥镜头适配器、超声刀等耐湿器械可经预洗、酶泡、刷洗、超声波清洗、漂洗后润滑烘干,采用压力蒸汽灭菌。非耐湿配件有 PK 器械线缆、分叉光缆、双极电凝线、单极电凝线、器械套管封帽等接触无菌界面的配件,可采用酶溶液擦拭线缆的外表面,小毛刷轻轻去除线缆接口缝隙内的污垢,用半湿无絮毛巾来回擦除线缆表面污物及含酶液,直到目测无附着污物再擦干线缆,透明纸袋包装妥当使用低温灭菌法灭菌。

4 体会

外科手术无论是人手操作还是机械手操作,在进入人体前的清洗、消毒、灭菌处理是避免感染的重要环节。由于手术机器人的自动识别能力较强,EndoWrist 器械清洗不彻底,有污物残留,机械臂在使用前的自检中会自动识别,不予安装不洁的 EndoWrist 器械。达芬奇机器人的应用领域较广范,每类手术使用的 EndoWrist 器械在结构和材质上都有区别,要做好机器人手术器械的清洗与灭菌处理,器械清洗人员应接受专业的系统培训,了解机器人手术器械在术中的应用情况,安装及拆卸方法,使用性能等,才能做出正确有效的清洗,从而保障机器人手术的正常开展,真正为临床一线的外科医生解决后顾之忧。

[参考文献]

[1] 金讯波,张 栋,夏庆华. 机器人辅助技术的未来及展望[J]. 山东医药,2009,49(39):112.

[2] 张 丰,郑民华. 手术机器人在普通外科的应用[J]. 中国微创外科杂志,2007,7(6):570 - 572.

[3] 李丽霞,赵 悦,宋 烽. 全机器人系统手术的护理管理[J]. 中华护理杂志,2008,43(4):360 - 361.

[4] 何 丽,张友忠. 机器人辅助腹腔镜手术在妇科的应用[J]. 生殖与避孕,2009,29(12):830 - 834.

[5] 银蔡霞,赵 悦,董 薪. 达芬奇机器人手术器械规范化清洗管理的效果观察[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(6):1166 - 1167.

(编辑:余汇洋)