DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.20.013

论著

文章编号:1000-5404(2004)20-1826-04

GDNF基因修饰的雪旺细胞对大鼠坐骨神经缺损的修复作用

张文捷[1],周 跃[1],陈 菁[2],王建忠[1],陈建梅[2] (第三军医大学:[1]新桥医院骨科,重庆 400037,[2]大坪医院野战外科研究所第六研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 应用携带胶质细胞源性神经营养因子基因的逆转录病毒载体质粒(pLXSN-GDNF)对体外培养的雪旺细胞进行基因修饰,并结合细胞外基质凝胶及生物可降解聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物(PLGA)管构建神经移植复合体,用于大鼠坐骨神经缺损的修复,同时对其促轴突再生及神经元保护作用予以检测评价。方法 40只成年Wistar大鼠随机分为4组:A组(n=10)细胞外基质凝胶-PLGA管桥接组;B组(n=10)雪旺细胞-细胞外基质凝胶-PLGA管桥接组;C组(n=10)GDNF基因修饰的雪旺细胞-细胞外基质凝胶-PLGA管桥接组;D组(n=10)自体神经桥接组。损伤各组12周时应用神经电生理及甲苯胺蓝染色和透射电镜观测神经再生情况,辣根过氧化物酶神经逆行示踪技术用于脊髓前角运动神经元再生评价。结果 12周时再生神经运动传导速度检测、甲苯胺蓝染色轴突形态计量学分析、透射电镜超微结构观察以及脊髓前角运动神经元再生评价结果提示:C组优于A、B组,而与D组相比无明显差异。结论 雪旺细胞的转基因处理可能弥补单纯细胞移植神经营养因子含量的不足,而可能达到与自体神经移植相似的效果。

关键词:胶质细胞源性神经营养因子;雪旺细胞;坐骨神经损伤修复;大鼠
中图法分类号:R329.24;R745.023 文献标识码:A

Effects of GDNF-modified Schwann cells on repair of sciatic nerve defect in rats

ZHANG Wen-jie[1], ZHOU Yue[1], CHEN Jing[2], WANG Jian-zhong[1], CHEN Jian-mei[2]([1]Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of GDNF-modified Schwann cells on the repair of sciatic nerve defects in rats. Methods Forty adult Wistar rats were randomly divided into four groups: group A (nerve grafts, fabricated by extracellular gel and PLGA conduits, n=10), group B (Schwann cells and extracellular gel and PLGA conduits, n=10), group C (GDNF-modified Schwann cells and extracellular gel and PLGA conduits, n=10), and group D (autograft, n=10). Motoneuron conduction and morphology (including anatomical measures and ultrastructure) of the regenerated axons were investigated at 12 weeks postoperatively. Regeneration rate of the motoneuron in spinal cord was also evaluated by using HRP label technique. Results Higher rate of nerve regeneration or number of labeled motoneurons in spinal cord was observed using PLGA conduits seeded with GDNF enhanced expressing Schwann cells (group C) than that with PLGA conduits (group A) alone or PLGA conduits seeded with control Schwann cells (group B), but there was no significant difference as compared with that in the autograft group (group D). Conclusion These results suggest that using gene transfer techniques to increase neurotrophic factor expression in Schwann cells added to nerve grafts may be a promising method for improving nerve regeneration.

Key words: glial cell line-derived neurotrophic factor; Schwann cell; sciatic nerve injury and repair; rat

20多年来,尽管神经科学领域取得了大量的研究成果及进展,但周围神经损伤的外科重建仍然属于富于挑战性的难题[1],自体神经移植术仍然是周围神经修复的"黄金"手段。

近年来大量的采用雪旺细胞作为移植细胞而应用于周围神经损伤的研究显示出许多令人鼓舞的成绩,但目前取得的效果与自体神经移植相比尚有较大差距[2,3]。

由于应用基因转染技术可改变或增强种植细胞的神经营养因子水平,可能为神经再生提供相对持久而有效的营养支持[4,5]。因此本实验将应用携带胶质细胞源性神经营养因子基因的逆转录病毒载体质粒(pLXSN-GDNF)对体外培养的雪旺细胞进行基因修饰,而后应用所获取的GDNF基因修饰的雪旺细胞结合细胞外基质凝胶及生物可降解PLGA管构建新型的神经移植复合体,用于大鼠坐骨神经缺损的修复。并通过电生理学及组织形态学等方法观测其修复效果,探讨其作用机制,

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054206);国家自然科学基金资助项目(3017096)
National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054206) and the Supported by the National Natural Science Foundation of China (3017096)
作者简介:张文捷(1969-),男,江西省鹰潭市人,博士,主治医师,主要从事周围神经损伤与修复方面的研究,发表论文11篇。电话:(023)68774908
收稿日期:2003-11-29;修回日期:2004-05-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

以寻求一种替代自体神经移植的方法及策略。

1　材料和方法

1.1　实验动物及分组

选用健康成年 Wistar 大鼠 40 只(购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心), 雌雄不拘, 体质量 180~200 g, 采用完全随机分段分组法分为 4 组: A 组: 细胞外基质凝胶-PLGA 管复合体桥接组(n= 10); B 组: 雪旺细胞-PLGA-细胞外基质凝胶复合体桥接组(n= 10); C 组: GDNF 基因修饰雪旺细胞-PLGA-细胞外基质凝胶复合体桥接组(n= 10); D 组: 自体神经桥接组(n= 10), 其中各实验组取 5 只用于脊髓前角运动神经元再生辣根过氧化物酶神经逆行示踪评价。

1.2　PLGA 管-细胞外基质凝胶-雪旺细胞神经移植复合体的体外构建

1.2.1　PLGA 管的制备　　应用组织工程方法[6,7]将聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物[poly(DL-lactide-co-glycolide), PLGA(85∶15)](sigma-aldrich)制备成长 15 mm、内径 1.5 mm、壁厚 0.3 mm 的导管, 干燥机内真空(20 L/h; -0.1 MPa)抽提溶剂 24 h, 于真空干燥机内保存备用。

1.2.2　雪旺细胞的培养及 GDNF 基因修饰的雪旺细胞的获取和神经移植复合体的构建　　无菌条件下切取 1~2 d 龄的新生大鼠坐骨神经置于 D-Hanks 液中, 解剖显微镜下仔细剥离神经外膜组织, 眼科剪将神经组织剪切成约 1.0 mm^3 的组织块, 0.25%胰酶+0.03%胶原酶Ⅳ消化 30 min, 常规细胞培养液(90% DMEM+10%胎牛血清+青霉素 100 U/ml+链霉素 100 U/ml)清洗 3 次后, 接种于 6 孔培养板中。24 h 待细胞贴壁后, 以含 1×10^{-5} mol/L 阿糖胞苷的除成纤维细胞培养液(1×10^{-5} mol/L 的阿糖胞苷+常规细胞培养液)培养 48 h, 而后更换雪旺细胞增生刺激培养液(10 μg/ml Bovine pituitary extracts+2 μmol/L forskolin+常规细胞培养液)继续培养。待细胞达 80%汇合后, 0.25%的胰酶消化制成细胞悬液, 调整细胞浓度为 3×10^{7}/ml, 与等体积的细胞外基质凝胶(ECM GEL sigma)混合均匀后, 微量注射器抽取 20 μl 注入已完成动物坐骨神经缺损桥接的 PLGA 管内(参见 1.3)。由于细胞外基质凝胶在体内环境下快速凝胶化, 因此细胞外基质凝胶泄漏很少。

GDNF 基因修饰的雪旺细胞的获取, 是将以上方法培养的雪旺细胞经重组逆转录病毒[携带 GDNF 的重组逆转录病毒载体质粒 pLXSN-GDNF(第三军医大学基础医学部神经生物学教研室阮怀珍教授惠赠)经 PA317 细胞包装、病毒提取、滴度测定而获取的高生物活性的重组逆转录病毒]转染、RT-PCR 及 Westen blotting 鉴定、细胞扩增后, 按上述方法(1.2)构建神经移植复合体。

1.3　动物模型制作

实验大鼠 3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉, 右侧大腿后外侧入路, 无菌条件下显露坐骨神经, 追踪至梨状肌下缘 5.0 mm 处, 切断并切除远断端 10 mm 神经干。A 组, 将细胞外基质凝胶直接注入 PLGA 管内组成的复合体用以桥接坐骨神经缺损; B 组, 如 1.2 方法构建以雪旺细胞、细胞外基质凝胶和 PLGA 管组成的复合体用以桥接坐骨神经缺损; C 组, 如 1.2 构建以 GDNF 基因修饰的雪旺细胞、细胞外基质凝胶和 PLGA 管组成的复合体用以桥接坐骨神经缺损; D 组, 自体坐骨神经切下 10 mm 后返转 180°与两断端对接, 各损伤组均保持 10 mm 的坐骨神经缺损区。

1.4　神经电生理检测

各实验大鼠 12 周时以 3%戊巴比妥钠, 按 40 mg/kg 腹腔注射麻醉, 俯卧位固定。无菌条件下在大鼠实验侧(右侧)及正常侧大腿后外侧显露坐骨神经, 游离桥接管及远近段神经干。应用八道电生理仪(Power Lab/8spAD instruments Australia)进行再生神经运动传导速度测定。

1.5　标本固定、取材及检测

各实验大鼠 12 周时 3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠后, 固定于解剖台、剖胸、显露心脏、剪开右心耳, 同时左心室插管, 快速灌注生理盐水 100~150 ml, 待流出液体清亮后, 灌注 3%多聚甲醛/2.5%戊二醛/0.1 mol/L PB(pH 7.3)混合液 200 ml。灌注后切取桥接管远端 2 mm 以远 1 mm 长神经段置于上述固定液中固定 6 h, 1%锇酸 4 ℃固定 2 h, 漂洗后丙酮梯度脱水, 醋酸铀 4 ℃染色 4 h, 环氧树脂 618 包埋。先行横截面半薄切片 1 μm, 用于甲苯胺蓝特殊染色, 光镜观察; 而后超薄切片, 枸橼酸铅染色, JEM-2000EX 透射电镜观察。

1.6　各实验组脊髓前角运动神经元再生辣根过氧化物酶(CB-HRP)神经逆行示踪评价

1.6.1　示踪剂注射　　取 12 周时相点实验大鼠, 麻醉后显露正常侧和实验侧坐骨神经, 用 25 μl 微量注射器斜形刺入神经干远端(注射前将拟注射区域以止血钳压榨一下), 双侧坐骨神经各注入 8 μl CB-HRP(含辣根过氧化物酶 1 μg/μl, 霍乱毒素 B 0.42 μg/μl sigma)后, 分层缝合切口。

1.6.2　固定取材及染色　　动物存活 60 h 后, 在麻醉下进行生理盐水 200 ml 而后 3%多聚甲醛/2%戊二醛/0.1 mol/L PB(pH 7.4)溶液 300 ml 心脏灌注固定(方法同前), 切取 L4 脊髓节段标本, 继续后固定 6 h 后, 30%蔗糖/0.1 mol/L PB 液中浸泡至组织块沉底, 冰冻切片, 片厚 30 μm, 间隔 5 张抽取 1 张, 收集于 5%蔗糖/0.1 mol/L PB 液中备用。采用 TMB 法显色。

1.7　图像分析及统计学处理

新生神经甲苯胺蓝染色半薄切片应用 Tiger920 图像分析软件(重庆大学设计)检测再生神经髓鞘厚度、纤维平均直径、轴突数及神经组织所占面积百分比, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。脊髓前角运动神经元 HRP 逆行示踪评价: 随机选取 5 张染色切片, 光镜(10× 20)下观察计数具有胞核或胞体轮廓完整、突起明显的 CB-HRP 标记的脊髓前角运动神经元, 求出实验侧标记神经元数占正常侧标记神经元数的百分率(轴突再生神经元的百分率)。采用 SPSS10.0 统计软件行单因素方差分析及 Turkey 多样本均数的两两比较。

2　结果

2.1　神经电生理检测结果

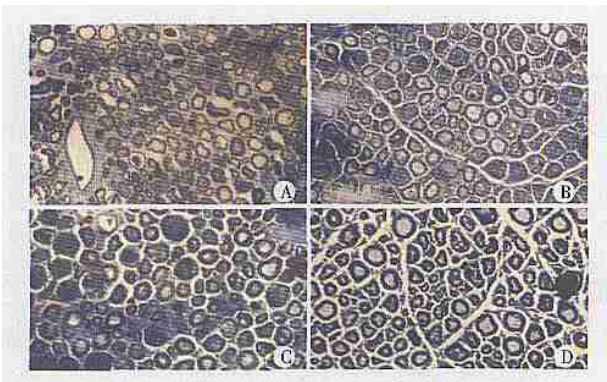
12 周时 C、D 两组运动神经传导速度最高(分别为 24.8±1.0 m/s 及 24.6±1.9 m/s), 两组相比无显著差异; A 组的运动神经传导速度最低(18.4±0.9 m/s), 与 B(22.6±0.8 m/s)、C 和 D 组相比, 差异有显著性意义(分别为 $P<0.05$、$P<0.01$ 和 $P<0.01$); 而 B 组与 C 或 D 组的比较, 差异有显著意义($P<0.01$)。

2.2　各实验组 12 周时再生坐骨神经横截面半薄切片甲苯胺蓝染色结果

见表 1, C 组再生轴突数量明显低于 D 组($P<0.01$), 但髓

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

鞘厚度却高于 D 组($P<0.01$),其他两个指标(神经纤维平均直径及神经组织所占面积比)的比较,显示两组无显著差异;单纯充填细胞外基质凝胶的 A 组各项指标检测结果与其它各组相比均显示较低水平,但令人感兴趣的是,其再生轴突数量却较 B 组显著为高,统计分析结果显示差异有显著性意义($P<0.01$);两种雪旺细胞移植组(C、B)的比较显示,除髓鞘厚度两组无显著差异外,其他指标的检测结果显示 C 组均高于 B 组($P<0.05$)(图 1)。



A: Group A; B: Group B; C: Group C; D: Group D

图 1 各实验组再生神经远段横截面半薄切片 (甲苯胺蓝染色×200)

Fig 1 Histological section of the toluidine blue-stained regenerated nerves at 12 weeks in each group (Toluidine blue staining×200)

表 1 各实验组 12 周时再生坐骨神经远端横截面相关指标($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Histomorphometric analysis at 12 weeks in each group ($\bar{x}\pm s$)

Group	TMS * (μm)	Fiber width (μm)	Axon count (number/mm²)	Percent neural tissue (%)
A	0.55±0.18△△	4.35±1.19△△	13 089±1 870△△	25.8±2.5△△
B	1.00±0.22△	5.89±1.72△	9 846±779△△	33.5±1.6△△
C	1.03±0.29△△	7.59±2.08	11 990±986△△	40.1±2.5
D	0.80±0.17	7.13±1.98	15 834±600	39.8±2.9
F	2.004	13.851	22.817	38.738
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

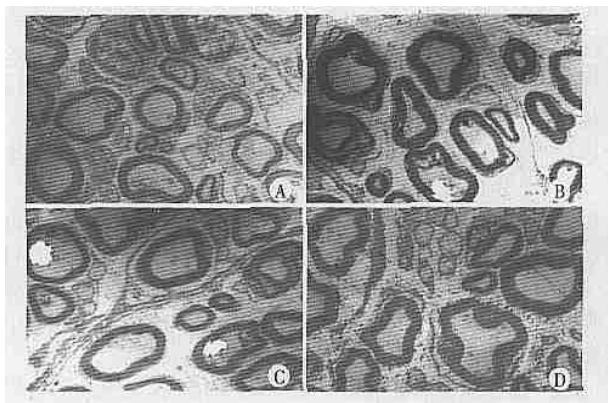
△: $P<0.05$, △△: $P<0.01$, *vs* D group

*: TMS Thickness of myelin sheath

2.3 各实验组 12 周时再生坐骨神经横截面超微结构观察

透射电镜超微结构观察显示,各实验组 12 周时再生的神经已表现出较成熟的形态学表现:粗细不等的有髓及无髓纤维较均匀地分布,髓鞘板层清晰可见,周围可见附着的雪旺细胞,形成的神经内膜包裹并分隔神经纤维,整个视野未见有变性崩解的髓鞘或轴突碎片残留。

各实验组超微形态学的比较结果与甲苯胺蓝半薄切片的染色结果一致,C、D 两组的再生神经髓鞘厚度、纤维直径及分布密度均优于 A、B 两组,其中 C、D 两组间比较无明显差异,而 A 组的结果显然较其它实验组为差(图 2)。



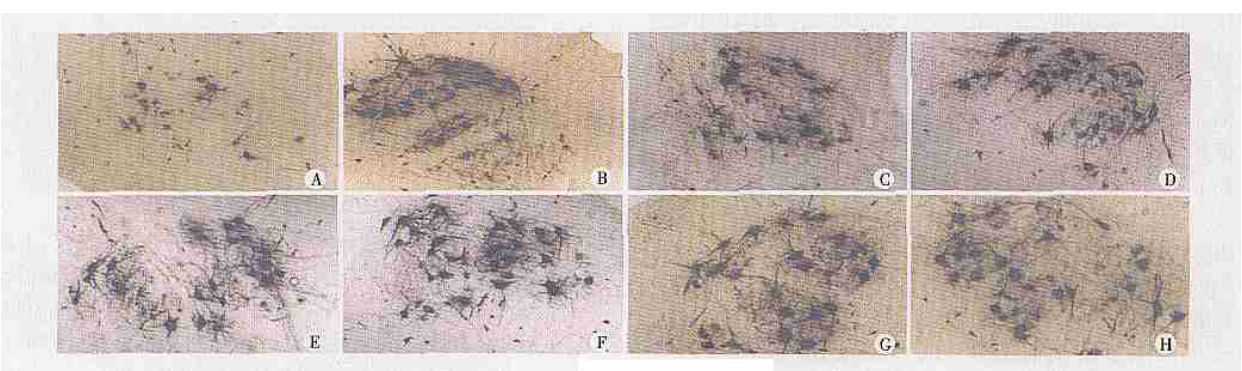
A: Group A; B: Group B; C: Group C; D: Group D

图 2 各实验组 12 周时再生神经远端横截面超微结构观察 (透射电镜×2 900)

Fig 2 Histological section of the regenerated nerves at 12 weeks in each group (TEM ×2 900)

2.4 各实验组脊髓前角运动神经元再生辣根过氧化物酶神经逆行示踪评价

光镜下观察,CB-HRP 阳性标记的运动神经元集中于前角外侧运动核区域,胞体呈深蓝色,核中空,具树枝状突起。各组实验侧与正常侧 CB-HRP 标记神经元数目百分比结果 12 周时 C、D 两组,CB-HRP 标记神经元数目百分比最高,分别为 84.2±2.1 及 83.9±2.5,两组相比无显著差异;A 组 CB-HRP 标记神经元数目百分比最低(59.5±4.1),与 B(70.5±3.9)、C、和 D 组相比,差异有显著性意义($P<0.01$);而 B 组与 C 和 D 组相比的统计学分析结果显示,$P<0.01$(图 3)。



A: Group A, experimental side; B: Group A, control side; C: Group B, experimental side; D: Group B, control side; E: Group C, experimental side; F: Group C, control side; G: Group D, experimental side; H: Group D, control side

图 3 各实验组 12 周时脊髓前角运动神经元再生 CB-HRP 逆行示踪观察 (×200)

Fig 3 CB-HRP labeled motoneurons of anterior horn in spinal cord at 12 weeks in each group (×200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

雪旺细胞是周围神经结构及功能的基本单位。神经损伤后,正常情况下静止的雪旺细胞立即进入增殖相,参与变性轴突及髓鞘的吞噬、上调细胞结构及粘附因子的表达,合成和释放生物活性因子以及提供轴突再生所必需的基质等,为周围神经损伤后修复创造良好的环境。正因为如此,雪旺细胞即成为组织工程人工神经理想的种植细胞[8]。

近年来许多研究者正在尝试应用以雪旺细胞为种植细胞的神经移植体,用于周围神经缺损的修复。虽然这些研究已显现出许多令人鼓舞的进展和成果,但目前所取得的效果与自体神经移植相比,仍有较大差距[2,8]。

我们知道神经营养因子在神经元发育、成熟以及损伤后再生、存活过程中起着关键性作用。研究显示增加移植体内的神经营养因子含量可以显著增强其保护神经元及促轴突再生作用[2,9]。

GDNF 是最近发现的一种对运动神经元具有强大营养作用的因子之一,研究表明 GDNF 的应用可以缓解损伤诱导的乙酰胆碱酯酶活性的降低及阻止面运动神经元的死亡[10,11],应用于坐骨神经损伤时也显示出相似的效果,而且显示良好的促进轴突的再生作用[12~14]。

由于基因转移方法可能提供相对长期而有效的神经营养因子的释放而且可以避免重组蛋白应用的半衰期短,须反复追加,且易引起炎性反应等不利因素[4,5,15]。因此本实验应用基因工程技术对雪旺细胞进行GDNF 基因的修饰并结合细胞外基质凝胶及生物可降解 PLGA 管构建神经移植复合体,用于坐骨神经缺损的再生修复。实验的结果显示 12 周运动神经传导速度、轴突再生相关形态学指标较单纯细胞外基质凝胶组(A 组)及添加雪旺细胞移植组(B 组)明显为优;而与自体神经移植组相比,无明显差异。这一结果提示GDNF 对神经再生修复具有显著的作用,同时也提示雪旺细胞的转基因处理可能弥补单纯雪旺细胞移植神经营养因子含量的不足,而可能达到与自体神经移植相似的效果。

HRP 逆行示踪技术可以准确而特异性追踪显示神经纤维与脊髓神经元胞体的相互联系,因此成为神经生物学的重要研究手段之一[16]。

各实验组脊髓前角运动神经元再生辣根过氧化物酶神经逆行示踪计数结果显示 C 或 D 组的神经元再生百分率显著高于 A 或 B 组($P<0.01$),而 C、D 两组的神经元再生百分率无显著差异,这一结果进一步说明外源性神经营养因子基因修饰的方法是一种显著增强细胞移植体修复效果的有效措施。

参考文献:

[1] Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance[J]. J Hand Surg Am, 2000, 25(3): 391—414.

[2] Rodriguez F J, Verdu E, Ceballos D, *et al*. Nerve guides seeded with autologous schwann cells improve nerve regeneration[J]. Exp Neurol, 2000, 161(2): 571—584.

[3] Mosahebi A, Fuller P, Wiberg M, *et al*. Effect of allogeneic Schwann cell transplantation on peripheral nerve regeneration[J]. Exp Neurol, 2002, 173(2): 213—223.

[4] Sorensen J, Haase G, Kranup C, *et al*. Gene transfer to Schwann cells after peripheral nerve injury: a delivery system for therapeutic agents[J]. Ann Neurol, 1998, 43(2): 205—211.

[5] Loh N K, Woerly S, Bunt S M, *et al*. The regrowth of axons within tissue defects in the CNS is promoted by implanted hydrogel matrices that contain BDNF and CNTF producing fibroblasts[J]. Exp Neurol, 2001, 170(1): 72—84.

[6] 张文捷, 周　跃, 王建民, 等. 组织工程人工神经诱导管的制作及其生物相容性观测[J]. 中国临床康复, 2004, 8(23): 4705—4707.

[7] 张文捷, 李兵仓, 王建民, 等. 组织工程人工神经诱导管的制备及其在体外与大鼠体内降低性能方面的研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(13): 1165—1168.

[8] Hudson T W, Evans G, Schmidt C E. Engineering strategies for peripheral nerve repair[J]. Orthop Clin North Am, 2000, 31(3): 485—498.

[9] Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neuotrophic factors[J]. J Anat, 1999, 194(Pt 1): 1—14.

[10] Watabe K, Sakamoto T, Ohashi T, *et al*. Adenoviral gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor to injured adult motoneurons[J]. Hum Cell, 2001, 14(1): 7—15.

[11] Chen Z Y, Cao L, Lu C L, *et al*. Protective effect of exogenous glial cell line derived neurotrophic factor on neurons after sciatic nerve injury in rats[J]. Sheng Li Xue Bao, 2000, 52(2): 295—300.

[12] Chen Z Y, Chai Y F, Cao L, *et al*. Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances axonal regeneration following sciatic nerve transection in adult rats[J]. Brain Res, 2001, 902(2): 272—276.

[13] Golgen J P, Demaro J A, Osborne P A, *et al*. Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse[J]. Exp Neurol, 1999, 158(2): 504—528.

[14] Jubran M, Widenfalk J. Repair of peripheral nerve transections with fibrin sealant containing neurotrophic factors[J]. Exp Neurol, 2003, 181(2): 204—212.

[15] Jimenez Hamann M C, Tsai E C, Tator C H, *et al*. Novel intrathecal delivery system for treatment of spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2003, 182(2): 300—309.

[16] LaVail J H, LaVail M M. Retrograde axonal transport in the central nervous system[J]. Science, 1972, 176(42): 1416—1417.

（编辑　陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net