DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.014
第25卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 1
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

文章编号:1000-5404(2003)01-0033-03

论著

NOV基因修饰神经干细胞移植对损伤大鼠脊髓功能恢复的影响

李成仁,李 巍,蔡文琴,苏炳银,陈德英 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察NOV基因修饰神经干细胞(NSCs)移植对损伤大鼠脊髓功能的治疗作用。方法 40只Wistar大鼠随机分为对照组(A组)、损伤组(B组)、NSCs组(C组)和NOV/NSCs组(D组),每组10只;将NSCs悬液注入C组切断脊髓处,D组注入等量的NOV基因修饰NSCs悬液,B组注射等量的生理盐水。术后2个月,采用BBB评分和皮层体感诱发电位(CSEP)观察大鼠脊髓功能的恢复程度。结果 ①术后2月BBB评分B、C、D组大鼠有所恢复,但都未达到正常水平;C组和D组的大鼠恢复较好,评分较高,与B组有显著性差异;其中D组比C组恢复要好。②脊髓损伤后,各组的CSEP波均消失,术后2月除B组外C组和D组的波形均有不同程度的恢复,但潜伏期延长,其中C组比D组更长,两者之间有显著性差异。结论 NOV基因修饰NSCs脊髓内移植比单纯NSCs移植能较好地促进损伤脊髓运动和传导功能的恢复。

关键词:肾母细胞瘤过度表达基因;神经干细胞;脊髓损伤;大鼠
中图法分类号:R329.5;R394.2;R651.2 文献标识码:A

Effects of neural stem cells modified by nephroblastoma overexpressed gene transplantation on the function recovery in rats with spinal cord injury

LI Cheng-ren, LI Wei, CAI Wen-qin, SU Bing-yin, CHEN De-ying (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of neural stem cells (NSCs) modified by nephroblastoma overexpressed gene (NOV) on function recovery in rats with spinal cord injury. Methods Forty Wistar rats were randomly divided into four groups: control group (A), injury group (B), NSCs group (C) and NOV group (D). Two months after operation, the function recovery of spinal cord was determined using BBB scores and cortical somatosensory evoked potential (CSEP). Results ① Assessed by BBB scores, function recovery was found in groups of B, C and D, but it did not reach normal level. There was significant difference between group B and groups C and D (group D superior to group C). ② CSEP in group B disappeared, and the latency time of CSEP in groups C and D was prolonged, but it was shorter in group D than that in group C. Conclusion NSCs modified by NOV gene transplantation could improve partial recovery of motor function and conduction function of injured spinal cord in rats.

Key words: nephroblastoma overepressed gene; neural stem cells; spinal cord injury; rat

脊髓损伤(Spinal cord injury, SCI)后的再生修复问题一直是困扰神经科学工作者的大难题,也一直是神经科学领域的前沿课题之一。采用基因修饰细胞移植已被公认为最新、最有前途的治疗方法之一。神经干细胞(Neural stem cells, NSCs)作为细胞移植材料用于治疗SCI损伤前景可观。将NSCs移植入CNS损伤部位后,NSCs可以整合入宿主组织中,然后分化成神经元和其他神经组织细胞,并且和宿主细胞之间可以形成突触样的结构,使神经组织损伤区域得以修复[1~3]。这些发现使NSCs可能成为一种重要细胞工具,为神经系统疾病(特别是CNS损伤)的移植学研究和治疗提供了稳定充足的供体细胞。肾母细胞瘤过度表达基因(Nephroblastoma overexpressed gene, NOV)是1991年发现的一种原癌基因,其编码的NOV蛋白是一种胰岛素样生长因子(IGF)结合蛋白,属于IGF家族的成员。我室以前的研究显示NOV基因是神经系统发育的一个调控因子,一些线索提示NOV基因可能参与CNS损伤后的再生和修复过程[4,5]。体外实验显示,NOV蛋白具有促进NSCs向神经元方向分化和新生神经元轴突生长的作用。本研究将NOV基因修饰的NSCs移植到大鼠损伤脊髓内,采用BBB评分和皮层体感诱发电位

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900078);全军医学科研"十五"计划青年基金资助项目(01Q097);重庆市科委应用基础研究项目(2001)
作者简介:李成仁(1970-),男,浙江省东阳市人,博士,讲师,主要从事神经干细胞与神经损伤方面的研究。电话:(023)68752231
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68753460,E-mail:wenqin@public.cta.cq.cn
收稿日期:2002-09-10;修回日期:2002-12-12

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

(CSEP)检测损伤脊髓功能的恢复情况,探讨基因修饰细胞移植治疗SCI的可行性,为将来基因治疗SCI应用于人类提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 SCI模型与分组

40只成年Wistar大鼠,体重(250±50)g,雌雄不拘,用1%戊巴比妥钠腹腔注射(30 mg/kg)麻醉后,背部剪毛,消毒后沿脊柱正中切开皮肤,分离肌肉,暴露椎骨,用咬骨钳仔细咬去椎板,在T12与L1椎骨平面打开椎管,充分暴露L4节段脊髓背面及两侧,用眼科镊将脊髓轻轻挑起,用眼科剪完全剪断,用肌肉缝合封闭椎管缺损,缝合皮肤,制成SCI模型。模型动物随机分为4组,每组10只大鼠:① 对照组(A组):动物只施行切皮、打开椎管,不施行SCI;②损伤组(B组):L4节段脊髓全横断损伤;③NSCs组(C组):在脊髓完全横断后注入NSCs悬液;④移植组(D组):注入NOV基因修饰NSCs悬液。

1.2 NSCs和NOV基因修饰NSCs的脊髓内移植

首先按本实验室方法制备大鼠NSCs和NOV基因修饰NSCs[6]。C组和D组在脊髓全横断后立即应用细胞悬液定向注射法用微型注射器分别注射10 μl NSCs与NOV基因修饰NSCs至大鼠SCI区(细胞密度约为5×10^4/μl),B组注射等量的生理盐水。

在伤口局部滴加青霉素防止感染。术后20 d内每天给动物腹腔注射青霉素(1×10^4 U/100 g),每天将动物的膀胱人工排空两次,直到动物自身排尿反射恢复。

1.3 BBB评分评价大鼠下肢功能

所有模型大鼠在术前及术后1 d和2个月进行BBB评分,BBB评分共分22级,具体评分等级参见Basso等[7,8]的方法。

由于动物昼夜活动量差异较大,所有观察均在上午进行。评价前将所有动物的膀胱排空,以免因膀胱充盈而影响活动。BBB评分观察期为4 min。

1.4 动物皮层体感诱发电位(CSEP)的测定

所有模型大鼠在术前及术后1 d和2个月行CSEP检查。麻醉动物,将刺激电极捆扎于一侧下肢腓肠肌外的皮肤上,周围以温盐水湿润。经Nihon Kohden电刺激仪给予直流方波电脉冲刺激,强度为50 mA,波宽0.1 ms,频率3 Hz。记录电极置于动物对侧感觉皮质表面,参考电极插入左额皮下。信号以FA-92放大器放大,滤波带通100~1 000 Hz,平均200次,电脑采样并贮存信号。每只动物均测双下肢。

1.5 统计学处理

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 动物后肢功能评价

所有大鼠在术前和A组术后的评分均为21,B、C、D组动物在脊髓全横断后,后肢完全瘫痪,术后1 d评分为0。术后2个月,B组大鼠有所恢复,但都远未达到正常;C组和D组的大鼠恢复较好,评分较高,与B组相比有显著性差异($P<0.01$),但也未达到正常水平,与A组相差显著($P<0.05$);其中C组与D组之间有显著性相差($P<0.05$),D组的动物比C组的恢复要好,结果见表1。

表1 各组动物的BBB评分结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 BBB scores of rats in each group($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Before operation	One day	Two months
A	10	21±0	21±0	21±0
B	10	21±0	0±0**	6±2**
C	10	21±0	0±0**	14±2**##
D	10	21±0	0±0**	18±3**##※

*: $P<0.05$ *vs* A; **: $P<0.01$ *vs* A; ##: $P<0.01$ *vs* B; ※: $P<0.05$ *vs* C

2.2 CSEP测定

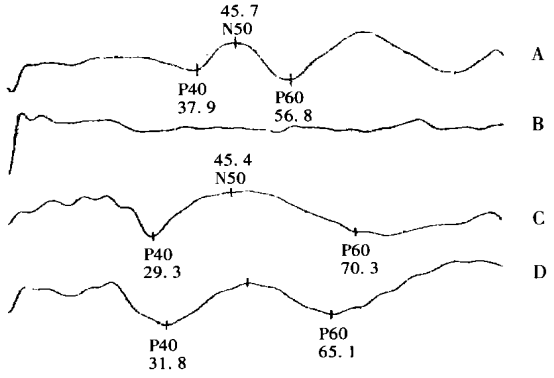
大鼠CSEP的波形为"W"形,所有大鼠在术前和A组术后的潜伏期正常;SCI后1 d,B、C、D组的CSEP消失,术后2个月B组的波形仍无,C组和D组的波形恢复,但潜伏期延长($P<0.01$),提示脊髓传导速度明显下降,其中C组与D组的潜伏期之间有显著性差异($P<0.05$),D组的潜伏期较短。表明移植细胞治疗使动物的CSEP有明显改善,但仍未恢复到大鼠未受损前的水平。各组的CSEP及潜伏期见表2、图1。

表2 各组动物的皮层体感诱发电位潜伏期($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Latency time of CSEP of rats in each group($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Latent Period(ms)	
		1 Day	2 Monthes
A	10	55.4±1.4	54.9±3.1
B	10	0**	0**
C	10	0**	71.4±1.7**##
D	10	0**	65.7±2.3**##※

**: $P<0.01$ *vs* A; ##: $P<0.01$ *vs* B; ※: $P<0.05$ *vs* C



A: Control group; B: Injury group; C: NSCs group; D: Transplantation group

图1 各组大鼠左下肢的皮层体感诱发电位波形

Fig 1 CSEP of left lower extremity of rats in each group

3 讨论

NSCs的移植被认为是修复CNS疾病包括退行性疾病和损伤最有希望的治疗方案,尤其是对于SCI[9]。科学家希望通过移植的NSCs来替代损伤、死亡的神经

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

元, 重建神经元回路, 并在损伤部位的近端和远端间起连接中断作用。此外, 还希望可通过对 NSCs 的基因修饰使 NSCs 能表达外源性基因, 然后将其移植到脊髓受损部位, 使它们能分泌大量的治疗性因子, 以防止神经元死亡并促进神经再生。因此, 移植到损伤脊髓内的干细胞要求容易大量获得、扩增和储存, 并且易于基因操作。它们也应该能在损伤部位存活相当长的时期, 与宿主脊髓组织整合。

NOV 基因是 IGF 家族的成员之一, IGFs 在 CNS 中起重要作用, 有研究表明, IGF 可以减少兔子脊髓缺血模型中神经元的死亡以及防止动物截瘫[10]。也有一些研究指出, IGF 能促进动物脑内神经元的生成、突起的生长以及突触的形成, 可以促进 CNS 的髓鞘化。NOV 和 NOV 基因修饰的 NSCs 移植对 SCI 的作用未见文献报道。我们在构建含 NOV 基因的真核表达载体的基础上, 将其转染入 NSCs 内, 然后移植入损伤大鼠的脊髓中, 行为学检测显示模型大鼠的后肢功能得到明显的恢复, 电生理学检测显示脊髓的传导功能得到部分恢复, 另外我们用形态学研究显示脊髓远段神经元数量较对照组明显增多, HRP 束路追踪显示脊髓的部分束路得到恢复(此部分数据正在整理中)。移植 NOV 基因修饰的 NSCs 与移植单纯 NSCs 相比较, 移植 NOV 基因修饰的 NSCs 使脊髓功能恢复的效果要显著一些。根据这几部分的研究结果, 结合以前研究的结果, NOV 基因能促进 NSCs 向神经元方向分化, 我们有理由推测 NOV 基因修饰的 NSCs 移植入脊髓后可以分化成各种类型的细胞, 包括神经元和胶质细胞, 填充因损伤造成的脊髓空洞。NOV 基因修饰的 NSCs 和分化出来的子代细胞能恒定表达 NOV 蛋白, 使移植区(损伤区)具有高浓度的 NOV, 促使脊髓内本身的 NSCs 和移植进去的 NSCs 往神经元方向分化的比例增高, 替代因损伤而死亡的神经元, 而分化出来的不成熟星形胶质细胞可以引导神经元的迁移和轴突的伸长。NOV 还可以通过调节 IGFs 的作用, 来发挥促进神经元的生成、减少损伤神经元的死亡、促进突起的生长和突触的形成等作用。简而言之, 为脊髓再生修复提供合适的微环境, 促进脊髓功能的恢复。但是目前我们的研究表明, 移植 NSCs 和 NOV 基因修饰 NSCs 仍不能使脊髓的功能得到完全的恢复, 因此需要进行进一步的研究。在 NSCs 应用于治疗人类 CNS 疾病包括 SCI 之前还有更多的问题需要解决, 但对 NSCs 的性能进一步研究和制作适合的动物模型将为 NSCs 和 NSCs 结合基因治疗成功地应用于 SCI 临床治疗奠定了基础。

参考文献:

[1] Lundberg C, Martinez-Serrano A, Cattaneo E, *et al*. Survival, integration and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum[J]. Exp Neurol, 1997, 145(2): 342—360.

[2] Nishida A, Takahashi M, Tanihara H, *et al*. Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(13): 4268—4274.

[3] Toda H, Takahashi J, Mizoguchi A, *et al*. Neurons generated from adult rat hippocampal stem cells form functional glutamatergic and GABAergic synapses *in vitro*[J]. Exp Neurol, 2000, 165(1): 66—76.

[4] Su B Y, Cai W Q, Zhang C G, *et al*. The expression of ccn3 (nov) RNA and protein in the rat central nervous system is developmentally regulated [J]. Mol Pathol, 2001, 54(3): 184—191.

[5] Su B Y, Cai W Q, Zhang C G, *et al*. A developmental study of novH gene expression in human central nervous system[J]. C R Acad Sci III, 1998, 321(11): 883—892.

[6] 李　巍, 蔡文琴, 姚忠祥. 大鼠神经干细胞分离培养及基因转染研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(12): 1425—1427.

[7] Basso D M, Beattie M S, Bresnahan J C, *et al*. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and team work on reliability[J]. J Neurotrauma, 1996, 13(2): 343—359.

[8] Basso D M, Beattie M S, Bresnahan J C. A sensitive and reliable locomtor rating scale for open field testing in rats[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1—21.

[9] Ray J, Palmer T D, Shihabuddin L S, *et al*. The use of neural progenitor cells for therapy in the CNS disorders[A]. In: Tuszynski M H, Kordower J H, eds. CNS Regeneration[M]. Academic Press, 1999. 183—197.

[10] Nakao Y, Otani H, Yamamura T, *et al*. Insulin-like growth factor 1 prevents neuronal cell death and paraplegia in the rabbit model of spinal cord ischemia[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2001, 122(1): 136—143.

(编辑　张大春)

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》, 本刊实行三位分节法(即从小数点算起, 向左向右每 3 位分一节, 节间留出一定空隙), 废除千分撇分节法(如 2,431 改为 2 431)。但年份、页数、部队番号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字, 凡属计数数值, 一律用阿拉伯数字表示。

(本刊编辑部)

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