DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.017
第25卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 1
40 2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)01-0040-03

神经干细胞移植在恢复损伤脊髓传导功能中的作用

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 探讨神经干细胞(NSCs)移植在恢复损伤脊髓传导功能中的作用。方法 30只Wistar大鼠随机分为对照组(A组)、损伤组(B组)和移植组(C组),每组10只;将培养的大鼠NSCs悬液注入C组损伤脊髓处,B组注射等量的生理盐水。采用皮层体感诱发电位(CSEP)和HRP逆行示踪技术观察大鼠脊髓传导功能的恢复情况。结果 ①脊髓损伤后,B组的CSEP波消失,术后2月C组的波形有所恢复,但潜伏期延长;②A组脊髓前角可见到许多HRP标记阳性神经元,B组未见阳性神经元,C组可见有阳性神经元,但数目较A组少。结论 NSCs脊髓内移植能促进损伤脊髓传导功能的部分恢复。

关键词:神经干细胞;脊髓损伤;皮层体感诱发电位;HRP
中图法分类号:R322.8;R329.24;R651.2 文献标识码:A

Effects of neural stem cell transplantation on the recovery of conduction function 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 cell(NSC) transplantation on the recovery of conduction function in rats with spinal cord injury. Methods Thirty Wistar rats were randomly divided into three groups: control group(A), injury group(B) and transplantation group(C). After operation, recovery of conduction function of rats was determined using the techniques of cortical somatosensory evoked potential(CSEP) and horseradish peroxidase(HRP) retrograde tracing. Results ① After spinal cord injury, CSEP of group B disappeared, and the latent period of CSEP of group C was prolonged. ② HRP-labeled neurons were found in spinal cord anterior horn in group A, some in group C but not in group B. Conclusion NSC transplantation can improve partial recovery of conduction function of injured spinal cord in rats.

Key words: neural stem cells; spinal cord injury; cortical somatosensory evoked potential; horseradish peroxidase

过去认为,中枢神经系统损伤后神经元或轴突不能再生,但现代观点认为哺乳动物中枢神经系统损伤后神经元和轴突仍具有再生潜力。研究表明,将神经干细胞(Neural stem cells, NSCs)移植入损伤的脊髓后不仅可以存活,并能分化出神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞,填充因损伤造成的空洞[1,2]。虽然这些研究说明了NSCs在损伤脊髓结构修复中的作用,也证明了NSCs可以恢复损伤脊髓的大体解剖连接,但目前仍无充分证据表明NSCs能够恢复损伤脊髓的传导功能。为此,本研究我们采用皮层诱发电位和HRP逆行追踪技术,观察了NSCs移植后脊髓传导功能的变化,以探讨NSCs移植在恢复损伤脊髓传导功能中的作用。

1 材料与方法

1.1 大鼠NSCs的培养

按照我室建立的方法[3]培养。

1.2 脊髓损伤模型的制备与分组

30只成年Wistar大鼠,体重(250±50) g,雌雄不拘,由第三军医大学实验动物中心提供。动物腹腔注射麻醉后,背部剪毛,常规碘酒酒精消毒。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,用弯头眼科镊将脊髓轻

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,E-mail:lichengren@yahoo.com
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

轻挑起, 用眼科剪将脊髓完全剪断, 将分离的肌肉缝合封闭椎管缺损, 缝合皮肤, 制成脊髓损伤模型。模型动物随机分为 3 组, 每组 10 只大鼠: ①正常组(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; ③移植组(C 组): 在脊髓完全横断后立即移植大鼠 NSCs 悬液。

动物在手术后, 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　NSCs 的脊髓内移植

C 组用微型注射器定向注射 NSCs 悬液 10 μl 至大鼠脊髓损伤区(细胞密度约为 5×10^4/μl)。B 组注射等量的生理盐水。

1.4　取材及检测

1.4.1　动物皮层体感诱发电位(CSEP)的测定　模型动物在术后 1 d 及 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。

1.4.2　HRP 逆行追踪　在取材前 2 d, 麻醉动物, 切开动物左侧臀部皮肤, 钝性分离肌肉, 暴露股后中部的坐骨神经, 用微型注射器将 30% HRP(Sigma VI) 1 μl 注入动物的坐骨神经内; 注射历时 10 min, 缝合皮肤。

1.4.3　取材及切片　术后 1 个月和 2 个月, 大鼠麻醉后取出 L1 ~ L4 脊髓, 4% 多聚甲醛浸泡固定后常规冰冻切片机切片, 片厚30 μm。

1.4.4　HRP 的呈色反应　按 Mesulam 法[4] 进行四甲基联苯胺(TMB)呈色反应, 切片封片后光镜下观察。

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　CSEP 测定

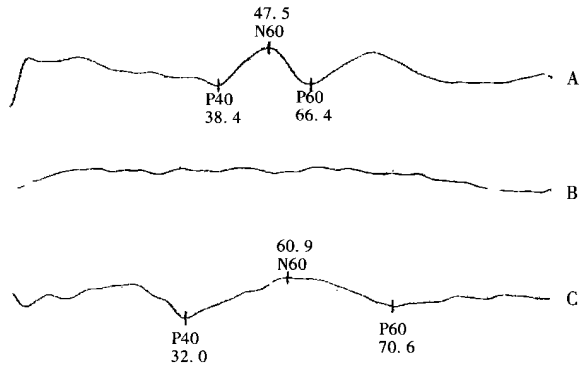
大鼠 CSEP 的波形为"W"形, 所有大鼠在术前和 A 组术后的潜伏期正常; 脊髓损伤后 1 d, B 组和 C 组的 CSEP 消失, 术后 2 个月 B 组的波形仍无, C 组的波形恢复, 但潜伏期延长($P<0.05$), 提示脊髓传导速度明显下降。表明移植 NSCs 治疗使动物损伤脊髓的传导功能有明显改善, 但仍未恢复到大鼠未受损前的水平。各组的 CSEP 及潜伏期见表 1、图 1。

表 1　各组动物的 CSEP 潜伏期(t/ms, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Latent periods of CSEP in each group(t/ms, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	Latent Period	
		1 d	2 month
A	10	55.4±1.4	54.9±3.1
B	10	0**	0**
C	10	0**	71.4±1.7**##

**: $P<0.01$ *vs* A; ##: $P<0.01$ *vs* B



A: control group; B: injury group; C: 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

2.2　HRP 逆行示踪显示

HRP 标记胞体位于脊髓前角外侧核, 胞体被染成蓝黑色, A 组可见到许多阳性神经元; B 组在术后 1 月和 2 月, 均未见阳性神经元; C 组在术后 1 月, 前角可见阳性神经元, 数量较少, 染色较淡; 2 月后阳性神经元增多, 但数目较 A 组少。见图 2 ~ 4。

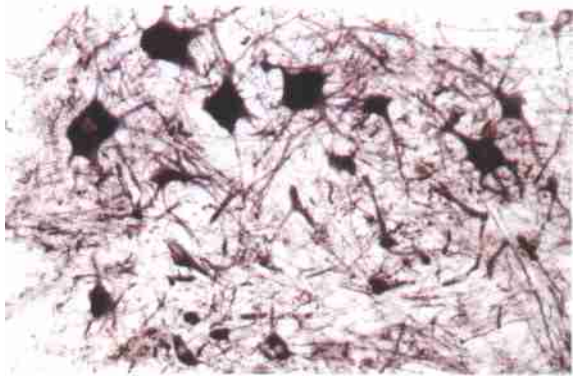


图 2　对照组脊髓横切面 HRP 阳性神经元　(TMB 显色× 400)

Fig 2　HRP-positive neurons of transverse section of spinal cord in control group　(TMB staining× 400)

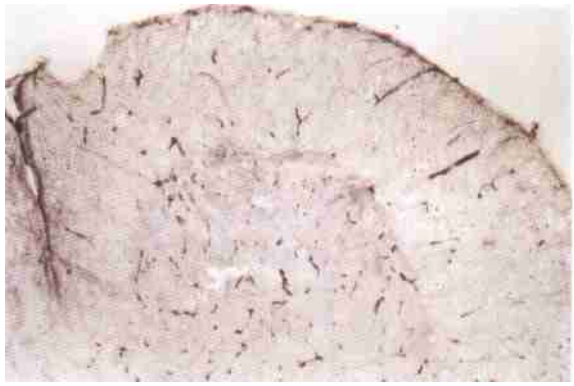


图 3　损伤组术后 2 月脊髓横切面 HRP 阳性神经元　(TMB 显色× 100)

Fig 3　HRP-positive neurons of transverse section of spinal cord in injury group 2 months after operation　(TMB staining× 100)

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



图 4 移植组术后 2 个月脊髓横切面 HRP 阳性神经元 (TMB 显色×200)

Fig 4 HRP-positive neurons of transverse section of spinal cord in transplantation group 2 months after operation (TMB staining× 200)

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[6]。科学家希望通过移植的NSCs 来替代损伤、死亡的神经元,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。研究显示,NSCs 移植入损伤的脊髓后不仅可以存活,并能分化出神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞,填充因损伤造成的空洞[1],同时分化出来的神经元可以和损伤脊髓形成广泛的神经纤维联系和突触连接[2,5]。我们在本研究中,用 HRP 逆行束路追踪技术显示,在正常成年大鼠脊髓前角可见到许多 HRP 标记神经元胞体,在损伤组大鼠脊髓中在术后 1 个月和 2 个月均未见标记神经元,在损伤的脊髓中移植了 NSCs 后 1 个月,前角可见有标记神经元的出现,虽然数量较少,染色较淡,但在 2 个月后脊髓前角的标记神经元明显增多。说明在损伤脊髓中移植了 NSCs 后,这些 NSCs 能分化出神经元,可能会在损伤局部形成一些神经元回路,使损伤脊髓远端和近端形成纤维联系,从而促进脊髓神经纤维传导的恢复,也可能这些神经元伸出的突起可延伸到远端从而支配效应器官。另外,治疗 SCI 的效果需要用适当的手段来检测,尽管可以采用多种评分来对损伤动物进行运动功能评定,但由于动物对检测手段的应答具有一定的局限性,灵敏度不高,为此电生理学及其他一些测试也是需要的。临床神经电生理检查灵敏度高,其变化与病理相平行,先于临床体征的变化[2,3]。我们的实验结果显示,移植 NSCs 组大鼠的 CSEP 明显的优于损伤组大鼠,术后两月,虽然移植组大鼠的 CSEP 的潜伏期延长,但已经接近正常,而损伤组大鼠的 CSEP 未见有恢复。说明了大鼠 NSCs 移植对大鼠脊髓损伤处可以促进损伤脊髓的修复和再生。目前我们的研究表明,移植 NSCs 仍不能使损伤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 疾病包括脊髓损伤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, Martínez-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] 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.

[4] Mesulam M M. The blue reactum produced in HRP neurohistochemistry incubation parameters and visibility[J]. J Histochem, 1976, 24(12): 1273—1280.

[5] 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.

[6] 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.

[7] Yamada S, Zinke D E, Sanders D. Pathophysiology of tethered cord syndrome[J]. J Neurosurg, 1981, 54(4): 495—503.

[8] Roy M W, Gilmore R, Walsh J W. Evaluation of children and young adults with tethered spinal cord syndrome: Utility of spinal and scalp recorded somatosensory evoked potentials[J]. Surg Neurol, 1986, 26(3): 241—248.

(编辑 王 红)

(上接 39 页)

2 讨论

用眼科电磁铁取颌面部金属异物鲜有报道。由于电磁铁产生的磁场作用于某些金属(如铁等)可产生较强的吸引力[1],用其取金属异物有以下优点: ① 异物容易定位,特别是在颌下及颈部间隙中,伤口区往往肿胀不易探查; ②手术时间大大缩短; ③切口小,常规的探查钳取往往切口要大一些; ④避免盲探可能造成的并发症。

关键词: 电磁铁; 颌下间隙; 金属异物
中图法分类号: R779.140.5 文献标识码: B

参考文献:

[1] 胡纪湘. 医用物理学[M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 145—159.

(编辑 谢义霞)

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