DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.018
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)01-0043-04

论著

BDNF基因修饰神经干细胞移植后大鼠脊髓损伤移植处的基因表达变化

李 巍,李成仁,蔡文琴,周德山 (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 了解脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)基因修饰神经干细胞移植到大鼠脊髓损伤处后的基因表达变化,为脊髓损伤修复提供基础研究资料。方法 大鼠随机分为4组:正常对照组,手术对照组,神经干细胞(Neural stem cells, NSCs)移植组,BDNF-NSCs移植组,各组分4个时相点(7 d、1个月、2个月、3个月),利用细胞移植、X-gal组化、免疫组化、原位杂交等方法,观察了移植处细胞的标记基因(LacZ)表达和BDNF、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、神经丝-200(NF-200)的表达。结果 大鼠脊髓损伤移植处细胞中,有标记基因阳性细胞,BDNF强烈表达,尤其是BDNF-NSCs移植组的移植后1周和1个月时。各组各时相点均有GFAP和NF-200免疫反应阳性细胞和纤维。结论 BDNF基因修饰神经干细胞能在脊髓损伤移植处存活,强烈表达BDNF,BDNF基因修饰神经干细胞可以作为脊髓损伤修复的移植材料。

关键词:神经干细胞;脊髓损伤;BDNF;基因修饰
中图法分类号:R329.2;R651.2;R394.2 文献标识码:A

The gene expressions at the spinal cord injury site of rat after transplantation of BDNF genetically modified NSCs

LI Wei, LI Cheng-ren, CAI Wen-qin, ZHOU De-shan (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the changes of the gene expressions at spinal cord injury site of rat after transplantation of BDNF genetically modified neural stem cells(NSCs) so as to provide basic data for the repair of spinal cord injury. Methods The Wistar rats were randomly divided into 4 groups: control group, operation group, NSCs transplantation group, BDNF-NSCs transplantation group. Four time points(7 day, 1 month, 2 month, 3 month) were divided for each group. The expressions of β-galactosidase and BDNF, GFAP, NF-200 at the site of spinal cord injury were observed by cell transplantation, X-gal histochemistry, immunocytochemistry, *in situ* hybridization, etc. Results After transplantation of BDNF genetically modified NSCs, some X-gal positive cells were found at the sections of spinal cord injury. The expressions of BDNF were strong, especially at 1 week and 1 month post-transplantation in transplantation group. The GFAP and NF-200 positive cells were also found at each time point in each group. Conclusion BDNF genetically modified NSCs can survive at the site of spinal cord injury and can strongly express BDNF, suggesting that BDNF genetically modified NSCs can be used as the material for the repair of spinal cord injury.

Key words: neural stem cells; spinal cord injury; BDNF; gene modification

过去认为,中枢神经系统(CNS)损伤后神经元或轴突不能再生。但现代观点认为哺乳动物CNS损伤后神经元/轴突仍有再生潜力,有新的神经元产生并能形成新的突触联系,只是由于CNS内部微环境不适合,致使绝大部分轴突的再生努力归于失败,即所谓"夭折性再生(Abortive regeneration)"[1]。其中神经营养因子或诱导因子不足是最重要的限制因素之一[2,3]。由于血脑屏障的影响,给予外源性神经营养因子的疗效不佳,人们用神经营养因子基因修饰细胞(肌细胞或成纤维细胞等)移植的方法使之在体内分泌所需因子,取得一定效果。而神经干细胞是中枢神经系统中具有自我更新能力和多种分化潜能的细胞,虽然终身存在,但其绝对数量和局部微环境所限,致中枢神经系统损伤或变性时,自我修复作用微乎其微。神经干细胞的基本特性是能在体外大量增殖,并可诱导分化成中枢

基金项目:第三军医大学校管课题(1999)
作者简介:李 巍(1964-),女,四川省双流县人,博士,实验师,主要从事神经发育和再生方面的研究。电话:(023)68752229
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68752233,E-mail:wenqin@public.cta.cq.cn
收稿日期:2002-09-10;修回日期:2002-12-11

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

神经系统内主要的3种细胞：神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞，是CNS损伤后再生修复的理想材料和基因载体。因此，采用神经营养因子基因修饰细胞移植已被公认为具有前景的治疗方法之一。本研究采用BDNF基因修饰神经干细胞移植入大鼠全横断脊髓损伤处，观察移植物与宿主体的整合和基因表达情况以及损伤大鼠的肢体功能恢复情况，为基因修饰神经干细胞治疗脊髓损伤提供基础研究资料。

1 材料和方法

1.1 BDNF基因修饰神经干细胞的制备方法

方法见文献[4]。

1.2 动物分组及动物脊髓全横断损伤模型

80只成年Wistar大鼠随机分为4组(20只/组)，即正常对照组、手术对照组、神经干细胞移植组、BDNF基因修饰神经干细胞移植组，每组分为4个时相点，即损伤后7 d，1个月，2个月，3个月，每时相点5只大鼠。手术动物用0.3%戊巴比妥麻醉后，固定于自制木板上，去掉背部鼠毛，常规碘酒、酒精消毒。找准胸12至腰1椎骨，用手术刀切开皮肤，剥离脊椎两侧肌肉，用特制血管钳打开椎管，暴露脊髓，用眼科剪横向剪断L4脊髓，将制备好的神经干细胞或BDNF基因修饰神经干细胞10 μl(约6×10^5个细胞)细胞悬液，种入损伤处。立即缝合肌肉后，再缝合皮肤。每天给术后大鼠排尿、排便及常规护理。

1.3 X-gal组化染色

以检测移植入的BDNF神经干细胞(带有Lac Z基因)。①取脊髓冰冻切片，0.1 mol/L PBS漂洗3次，5 min/次。②入X-gal染色液，37℃温育过夜，阳性细胞被染蓝。用0.1 mol/L PBS配制以下X-gal染色液：$K_3Fe(CN)_6$ 5～35 mmol/L，$K_4Fe(CN)_6$ 5～35 mmol/L，$MgCl_2$，$MgSO_4$ 1～2 mmol/L。临用前加入溶于二甲基甲酰胺中的40× X-gal(40 mg/ml)至终浓度为1 mg/ml。(注意：液体中铁和亚铁氰化物的量对获得最佳效果十分关键，量越多形成吲哚沉淀越快，这样可减少扩散，但量过多或染色时间过长，会引起绿色背景)。③常规脱水，透明、封片，光镜观察。

1.4 BDNF cRNA探针的原位杂交

取各组冷冻切片根据博士德公司提供的染色程序行原位杂交染色。主要步骤为：①切片漂洗。②蛋白酶K(2 μg/ml)消化，37℃孵育30 min。③4%多聚甲醛后固定5 min。④浸入新鲜配制的1.333%三乙醇胺+0.25%乙酸酐/0.1 mol/L Tris-HCl，pH8.0。室温下10 min。⑤杂交：取杂交液(10 μl/片)于1.5 ml新Eppendorf管，按每100 μl杂交液加2 μl探针标记液，离心使杂交液沉于管底，将切片放入杂交管中，加盖，于43℃保温20 h。BDNF cRNA浓度为0.05～0.5 μg/ml杂交液。⑥杂交后漂洗及在2× SSC中加RNase A(20 μg/ml)消化未结合的cRNA探针。⑦将切片移入含Anti-Dig-AP抗体(1∶1 000)，37℃ 1 h转入4℃ 20 h。⑧0.05 mol/L PBS漂洗10 min，3次。⑨TSM1漂洗切片10 min，2次。TSM1：0.1 mol/L NaCl，0.1 mol/L Tris，10 mmol/L $MgCl_2$，0.1 mmol/L HCl调pH到8.0。⑩TSM_2漂洗10 min，2次。TSM2：0.1 mol/L NaCl，0.1 mol/L Tris，50 mmol/L $MgCl_2$，0.1 mol/L HCl调pH到9.5。⑪显色，室温3～4 h。终止显色反应。脱水，透明，DPX封片，光镜观察阳性细胞被染成深蓝。分别将各组、各组织的原位杂交切片和免疫组织化学切片各10张，每张随机采集3～5个视野(物镜40倍)，将阳性细胞摄入图像分析系统，用德国LEICA公司的"MDIO型彩色图像分析系统，检测阳性细胞的平均吸光度，所得结果用医用数理统计程序处理，并制图。

原位杂交对照实验：①在杂交前，将切片用20 μg/ml Rnase A，37℃处理30 min，其它步骤与以上相同。②在杂交液中不加核酸探针，其它与以上杂交步骤相同。结果均为阴性。

1.5 BDNF、NF-200、GFAP免疫组化检测

取各组冰冻切片行常规免疫组化程序(博士德公司提供)：一抗：BDNF(1∶100，博士德公司分装)，NF-200(1∶1 000，Sigma)，GFAP(1∶100，博士德公司分装)，于湿盒内37℃孵育1 h后，转入4℃ 24 h。二抗：37℃ 1 h。(8)0.01 mol/L PBS漂洗3次，每次5 min。SABC复合物37℃ 1 h。0.05%DAB 0.25%硫酸镍铵0.01%H_2O_2 TBS(0.05 mol/L，pH7.5)显色，在显微镜下观察染色深浅，至适当程度终止反应。脱水，透明，DPX封片，光镜观察阳性细胞被染成紫蓝色。对照试验：用正常兔血清或0.01 mol/L PBS代替一抗进行免疫组化(ICC)染色，结果均为阴性。

1.6 统计学处理

数据以$\bar{x} \pm s$表示，用SPSS统计学软件处理，两组间差异比较选用t检验。

2 结果

2.1 BDNF基因修饰神经干细胞在宿主脊髓损伤移植处存活

从X-gal组化染色的切片看，在移植了BDNF基因修饰神经干细胞组，见到许多呈X-gal阳性反应蓝色细胞，有的呈散在分布，有的呈小团状分布，且在移植3个月组，也见有蓝色的神经元样X-gal阳性反应细胞见图1。移植的神经干细胞和BDNF基因修饰神经干细胞均能在宿主脊髓内存活，并分化成各种细胞，有的地方细胞呈密集球团状生长，有的地方细胞则呈与脊髓纵轴方向一致的纵行生长，有的地方细胞则比较稀疏、散在，在移植处还可见到许多毛细血管。

2.2 BDNF基因在脊髓损伤处的表达

BDNF原位杂交结果，在损伤后各组各时相点，脊髓损伤移植处切片上，BDNF mRNA阳性数目很多，尤其是移植了BDNF基因修饰神经干细胞的大鼠，阳性细胞数目明显高于只移植了神经干细胞的大鼠，而且从手术后7 d到手术后3个月，各组的细胞形态有渐变过程，即在移植后7 d，损伤处的细胞形态大部分为圆形或不规则形，到移植后3个月时，可见形态较为明显的BDNF mRNA阳性神经元样细胞见图2。图像分析结果显示，BDNF mRNA阳性细胞的平均吸光度值在移植7 d时最高，移植7 d组和1个月组与手术对照组相比平均光密度值差异有显著性意义($P<0.01$)，以后呈逐渐下降趋势，到3个月时与正常组差异无显著性意义。NSCs移植组与BDNF-NSCs移植组相比的平均吸光度值差异有显著性意义($P<0.05$)，见表1。

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

表 1　大鼠脊髓 BDNFmRNA 阳性细胞平均吸光度值($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Average optical density in BDNFmRNA positive cells at the section of spinal cord in rat($\bar{x}\pm s$)

Group	1 week post-operation	1 month post-operation	2 month post-operation	3 month post-operation
Operation control	43.35±6.23	52.67±6.78	58.34±6.13	60.34±5.45
NSC transplantation	230.22±8.90 *	200.78±9.78 *	168.55±7.56 *	127.45±9.78
BDNF-NSC transplantation	340.56±10.67 **	325.67±11.23 *	223.67±9.98 **	166.89±11.12
Normal Control	125.34±6.89	112.78±6.56	132.23±7.13	121.45±6.89

*: $P<0.05$ vs NSC transplantation group; **: $P<0.01$ vs Opration control group

2.3　BDNF、NF-200、GFAP 免疫组化结果

BDNF 免疫组化结果: 脊髓损伤处, BDNF 免疫反应阳性细胞呈紫蓝色, 细胞大小不一, 有的阳性细胞有明显的突起, 有的细胞体较大, 在移植后 3 个月组, 见有 BDNF 免疫反应阳性神经元样细胞见图 3。

NF-200 免疫组化结果: 在神经干细胞和 BDNF 基因修饰神经干细胞移植后各组各时相点, 均可见 NF-200 阳性神经纤维及很少量的 NF-200 阳性细胞胞体, 阳性纤维的排列无序, 交织成网, 见图 4, 移植 BDNF 基因修饰神经干细胞组的 NF-200 阳性神经纤维密度高于其它组。

GFAP 免疫组化结果: 在术后 7 d, 见 GFAP 阳性细胞呈团或散在分布, 细胞呈圆形或梭形, 细胞突起较少或无; 在术后 2 个月时, GFAP 阳性细胞长出许多突起, 术后 3 个月时, GFAP 阳性细胞的突起较长, 形态与正常形态接近。

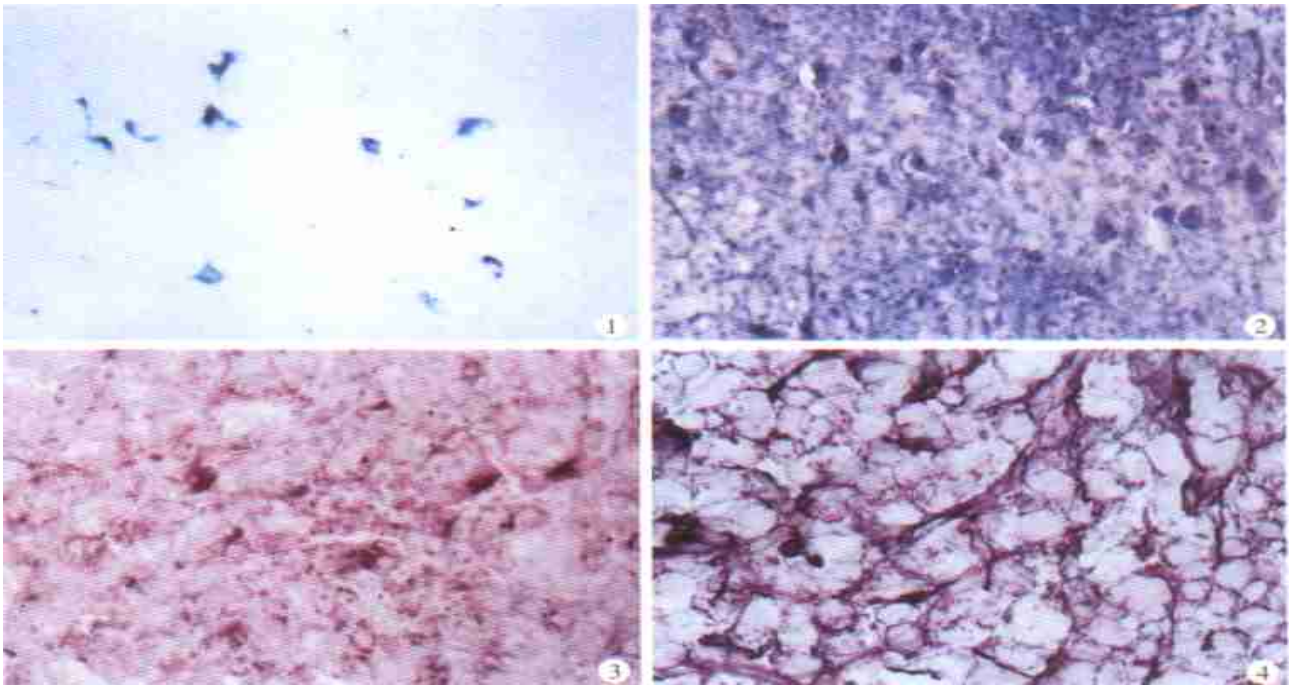


图 1　BDNF-NSC 移植 3 月后, 脊髓损伤移植处 X-gal 组化染色阳性细胞　(X-gal 组化方法× 200)

Fig 1　**Three months after BDNF-NSC transplantation, X-gal histochemical positive cells at the longitudinal section of spinal cord injury in rat** (X-gal histochemistry method× 200)

图 2　BDNF-NSC 移植 3 月后, 脊髓损伤移植处纵切面 BDNF mRNA 阳性细胞　(原位杂交× 200)

Fig 2　**Three months after BDNF-NSC transplantation, BDNF mRNA positive cells at the longitudinal section of spinal cord injury in rat(in situ hybridization** (ISH× 200)

图 3　BDNF-NSC 移植 3 月后, 脊髓损伤移植处纵切面 BDNF 免疫反应阳性细胞　(SABC-硫酸镍铵增强法× 200)

Fig 3　**Three months after BDNF-NSC transplantation, BDNF immuno-positive cells at the longitudinal section of spinal cord injury in rat** (SABC-Nickel ammonium sulfate enhancement× 200)

图 4　BDNF-NSC 移植 2 月后, 脊髓损伤移植处纵切面 NF-200 免疫反应阳性纤维　(SABC-硫酸镍铵增强法× 400)

Fig 4　**Two months after BDNF-NSC transplantation, NF-200 positive nerve fibers at the longitudinal section of spinal cord injury in rat** (SABC-Nickel ammonium sulfate enhancement× 400)

3　讨论

3.1　细胞移植结合神经营养因子是治疗脊髓损伤(SCI)的有效方法之一

目前, 基因治疗 SCI 的基本策略主要是通过转基因技术给损伤局部提供合适微环境。将神经生长因子(NTFs)基因以一定的方法转染合适的受体细胞, 再移植到损伤区, 让其在体内表达并发挥效应, 刺激脊髓生长。主要的因子有神经营养因子(NGF)、脑源性神经营养因子 (BDNF)、睫状神经营养因子 (CNTF)、神经营养素 3(NT 3)、神经营养素 4/5(NT4/5), 以及同时具有保护神经元和促细胞分裂作用的碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等。这些因子不仅对中枢神经系统有营养作用, 而且可能参与中枢神经系统损伤后的修

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

复。最早进行基因治疗研究的是加利福利亚大学的Tuszynki等[5]，他们将NGF转至培养的SC后，移植到损伤部位的脊髓，发现SC能在体内稳定表达NGF并促进轴索再生。然后，Tuszynski等[6]又以逆转录病毒为载体，将重组NGF病毒载体感染培养的成纤维细胞后移植到脊髓损伤区，观察1年仍有NGF表达，并有大量感觉神经元的轴索生长。以后，他们用同样的方法王成NGF的基因转移，并在14个月后用RT－PCR的方法鉴定了NGFmRNA的表达，并发现感觉、运动和去甲肾上腺素能神经元的轴索都有不同程度的生长。BDNF的基本功能是促进神经元的存活和突起的再生。Sayers等[7]将BDNF或NT-3cDNA通过逆转录病毒载体转染雪旺细胞，酶联免疫吸附分析（ELISA）证实雪旺细胞较高水平地分泌BDNF或NT-3，免疫组化染色显示这两种因子定位在细胞核周围颗粒。

3.2 BDNF基因修饰神经干细胞在宿主脊髓内的存活、分化和基因表达

以往脑内移植或神经组织移植研究进展缓慢，主要受到胚胎脑组织的来源、数量以及社会法律和伦理等方面的限制。神经干细胞的存在、分离和培养成功，尤其是人神经干细胞系的建立可以无限地提供神经元和胶质细胞[8,9]，解决了胎脑移植数量不足的问题，同时避免了伦理学方面的争论，为损伤后进行替代治疗提供了充足的材料。

本研究将神经干细胞直接作为靶细胞并将其用BDNF基因修饰后移植入大鼠脊髓全横断损伤处，结果显示，BDNF基因修饰神经干细胞移植入脊髓后，可较好的存活，形态学观察可见移植物与宿主脊髓整合，宿主对移植物的反应较轻，移植物内还可见到许多毛细血管；我们使用的是带有Lac-Z基因的复制缺陷型腺病毒感染神经干细胞，X-gal组化染色结果显示，损伤移植处有BDNF基因修饰神经干细胞来源的细胞，且在移植后3个月时，见到了X-gal染色阳性的神经元样细胞，提示移植入的BDNF神经干细胞依然存活；BDNF基因修饰神经干细胞移植入脊髓后，其分化情况和BDNF基因表达情况是我们关注的一个重要问题，结果显示，有大量BDNF mRNA阳性细胞和BDNF免疫反应阳性细胞，图像分析结果显示在移植7 d组和1月组均明显高于其他各组，说明它能合成和分泌BDNF神经营养因子，促进神经损伤后的功能恢复，随着时间的推移，在自身或其他因素的调节下，细胞的合成和分泌BDNF的功能逐渐下降至正常水平，细胞形态也接近正常，但其具体的调节机制目前还不清楚。NF-200免疫组化显示移植组细胞移植处有相互交错的神经纤维。移植组大鼠的存活率和肢体功能恢复情况明显好于手术对照组。这些结果与其他作者的试验结果相似，如余科炜等[10]用逆转录病毒介导的BDNF基因修饰成肌细胞移植对大鼠脊髓横断损伤的研究，他们发现BDNF基因修饰细胞移植3个月后，部分大鼠皮质体感诱发电位（CSEP）和运动诱发电位（MEP）信号恢复，但波幅减低，潜伏期延长。说明神经轴突已经再生并通过损伤断端，而基因细胞所分泌的BNDF促进了轴突的再生。通过后肢功能的检查，BDNF基因修饰细胞移植组较对照组也有显著的改进。Liu等[11]用携带人BDNF基因的逆转录病毒载体修饰成纤维细胞，移植到大鼠的脊髓半横断区，通过一系列研究证明移植物能明显地促进红核脊髓束轴突再生，肢体运动功能明显改善。Menei等[12]用相似的方法，通过携带人BDNF基因的逆转录病毒载体，转染雪旺氏细胞，使其分泌BDNF，促进大鼠脊髓横断区的轴突生长。

总之，BDNF基因修饰神经干细胞移植治疗大鼠脊髓全横断损伤取得了较为满意的结果，但人和动物之间的差别，急性损伤与陈旧性损伤的差别及动物实验与临床治疗间的差别等，要使脊髓损伤达到康复，截瘫的病人站起来，尚需广大科研工作者坚持不懈的努力。

参考文献：

[1] Weidner N, Grill R J, Tuszynski M H. Related articles elimination of basal lamina and the collagen "scar" after spinal cord injury fails to augment corticospinal tract regeneration[J]. Exp Neurol, 1999, 160(1): 40－50.

[2] Tuszynski M H, Gahriel K, Gage F H, *et al*. Nerve growth factor delivery by gene transfer induce differential growth of sensory, motor, and noradrenergic neuritis after adult spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 1996, 137(1): 157－173.

[3] Varon S, Conner J M. Nerve growth factor in CNS repair[J]. J Neurotrauma, 1994, 11(5): 473－486.

[4] 李 巍，蔡文琴，姚忠祥. 大鼠神经干细胞的分离培养及基因转染研究[J]. 第三军医大学学报，2001，23(12)：1 425－1 427.

[5] Tuszynski M H, Peterson D A, Ray J, *et al*. Fibroblasts genetically modified to produce nerve growth factor induce robust neutritic ingrowth after grafting to the spinal cord[J]. Exp Neurol, 1994, 126(1): 1－14.

[6] Tuszynski M H, Megers, Makahara Y, *et al*. Fibroblasts and Schwann cells genetically modified to produce neurotrophic factor induce robust neuritic growth after transplantiation to the spinal cord[J]. Soc Neurosci Abstr, 1994, 20(1): 10－17.

[7] Sayers H, Tonge D A. A study of factors influencing synapse formation by a foreign nerve in skeletal muscle of Rana pipiens[J]. J Physiol, 1986, 375: 449－460.

[8] Villa A, Snyder E Y, Vescovi A, *et al*. Establishment and properties of a growth factor-dependent perpetual neural stem cell line from the human CNS [J]. Experimental Neurology, 2000, 161(1): 67－84.

[9] 李 巍，蔡文琴，吴 康，等. 人胚胎脑皮层神经干细胞的分离培养[J]. 解剖学报，2002，33(3)：241－243.

[10] 余科炜，叶晓健，冯 红，等. 基因修饰细胞移植治疗大鼠脊髓损伤的电生理评价[J]. 第二军医大学学报，2000，21(7)：621－624.

[11] Liu Y, Kim D, Himes B T, *et al*. Transplanlations of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function[J]. J Neurosci, 1999, 19(11): 4 370－4 387.

[12] Menei P, Monteromenei C, Whittemor S R, *et al*. Schwann cells genetically modified to secrete human BDNF promote enhanced axonal regrowth across transected adult rat spinal cord[J]. Eur J Neurosci, 1998, 10(2): 607－621.

（编辑 王 红）

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