DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.019
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)01-0047-04

论著

大鼠脊髓损伤BDNF基因修饰神经干细胞移植后HRP逆行示踪

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 检测大鼠脊髓损伤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后,神经纤维的再通及后肢功能恢复情况。方法 大鼠L4脊髓全横断后,在横断处立即移植BDNF基因修饰神经干细胞,分四个时相点(1周,1、2、3个月)进行辣根过氧化物酶(HRP)逆行示踪,并观察损伤移植处的形态学变化及大鼠后肢运动功能恢复情况。结果 损伤移植处脊髓的形态学明显好转;损伤移植处上段脊髓中,移植1个月组有HRP阳性细胞,以后两组逐渐增多;移植组大鼠后肢运动功能明显恢复。结论 大鼠脊髓损伤BDNF基因修饰神经干细胞移植后,在损伤移植处有HRP阳性神经元和神经纤维,大鼠后肢运动功能明显恢复,提示BDNF基因修饰神经干细胞有修复大鼠脊髓损伤的作用。

关键词:脊髓损伤;基因修饰;神经干细胞;HRP
中图法分类号:R394.2;R617;R651.2 文献标识码:A

Retrograde HRP tracing after transplantation of BDNF genetically modified NSCs at spinal cord injury in rat

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 investigate the nerve recanalization and the motor function of hind legs after transplantation of BDNF genetically modified neural stem cells (NSCs) at spinal cord injury site in rat. Methods After L4 spinal cord transection of rat, BDNF genetically modified NSCs were transplanted immediately. Retrograde HRP tracing through sciatic nerve were practiced at 1 week, 1 month, 2 month, 3 month after transplantation of BDNF genetically modified NSCs. The morphological changes were observed at section of spinal cord and the motor functions of both hind legs of rat were detected. Results The morphology of the injured spinal cord sections turned better. Retrograde HRP tracing through sciatic nerve showed some HRP positive neurons and nerve fibers at the site of near rostral end of the nearly injured part at one month after transplantation and increased with the time going by. Motor function of hind legs of rats recovered significantly in all transplantation groups. Conclusion BDNF genetically modified NSCs have repairing effect on spinal cord injury in rat.

Key words: spinal cord injury; genetically modification; neural stem cell; HRP

中枢神经系统(CNS)损伤后再生修复的研究一直是神经科学领域的前沿课题之一。脊髓损伤无论是在战时还是在平时都有较高的发生率,给患者和社会造成极大危害。探索脊髓损伤后的再生修复,使截瘫病人站起来,是病人和神经科学工作者的最高理想。

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,使损伤或蜕变神经组织自我修复作用微乎其微。采用外源性的神经干细胞和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入大鼠全横断脊髓损伤处,观察移植物与宿主体的整合和通过辣根过氧化物酶(HRP)逆行追踪显示神经再通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NSC的制备

方法参见文献[1]。

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),正常对照

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:2002-12-10

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

组、手术对照组、NSCs 移植组、BDNF 基因修饰 NSC 移植组，每组分为 4 个时相点，即损伤后 1 周，1、2、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 NSCs 和 BDNF 基因修饰神经干细胞 10μl(约 6×10^5 个细胞)细胞悬液，分别种入损伤处。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 运动功能检测

各组动物分别在术前、术后 1 周，1、2、3 个月，进行肢体运动功能的恢复程度检测，按改良的 Tarlov Motor Scote 法进行，共分为 6 级。0 级：后肢无活动能力；1 级：可见后肢轻度活动；2 级：可见明显的后肢活动，但不能站立；3 级：后肢可站立；4 级：可走动，但动作不稳或有肌强直；5 级：后肢运动正常。

1.4 HRP 逆行示踪

动物被麻醉后，固定在自制木板上，剪掉后腿部的毛，碘酒、酒精消毒皮肤，切开皮肤，仔细分离肌肉，寻找坐骨神经。用眼科镊轻轻托起坐骨神经，用微量注射器慢慢注入 30% HRP 0.5 μl 左右，留针 10 min，24～48 h 后取脊髓横断伤上端靠近损伤处脊髓，4% 多聚甲醛固定 8～12 h 后冷冻切片，行 HRP-DAB-硫酸镍胺增强法显色。在普通光镜下计数脊髓横断面上 HRP 阳性细胞数目，各组各时相点随机抽取 5 张切片进行阳性细胞计数。

1.5 苏木精-伊红染色(HE)

常规 HE 染色。

1.6 X-gal 组化染色

取脊髓冰冻切片，0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次，5 min/次。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，$MgCl_2$ 或 $MgSO_4$ 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。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组间比较选用 t 检验。

2 结果

2.1 神经干细胞或 BDNF 基因修饰神经干细胞与宿主脊髓的整合

从 HE 染色切片看，移植的 BDNF 基因修饰神经干细胞能在宿主脊髓内存活，并分化成各种细胞，有的部位细胞呈密集球团状生长，有的部位细胞则呈与脊髓纵轴方向一致的纵行生长，有的部位细胞则比较稀疏、散在。在移植物内还可见到许多毛细血管。动物存活的时间越长，移植物与宿主脊髓的整合情况越好见图 1～3。

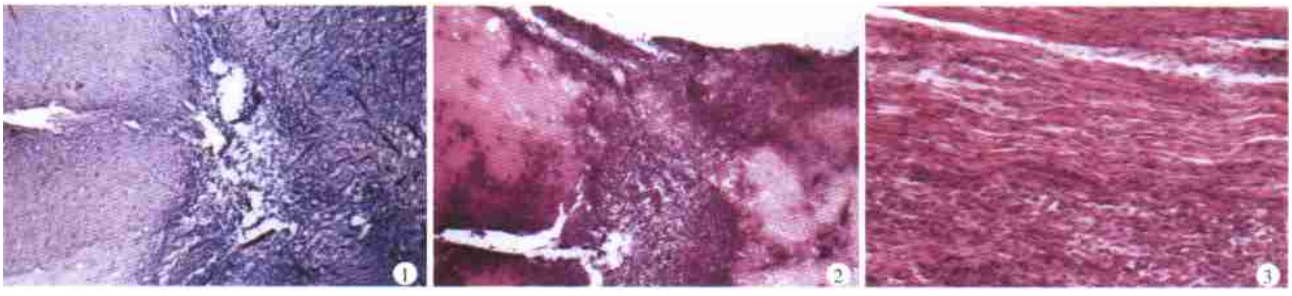


图1 手术对照组 1 个月后，大鼠脊髓损伤处纵切面 (HE× 40)

Fig 1 One month after operation, the longitudinal section of spinal cord injury of rat (HE× 40)

图2 **BDNF-NSC** 移植 1 个月后，大鼠脊髓损伤移植处 (HE× 40)

Fig 2 One month after BDNF-NSC transplantation, the longitudinal section of spinal cord injury of rat (HE× 40)

图 3 **BDNF-NSC** 移植 3 月后，大鼠脊髓损伤移植处有与脊髓纵轴方向一致的细胞和纤维形成 (HE× 200)

Fig 3 Three months after BDNF-NSC transplantation, cells and fibers parallelling with longitudinal axon of spinal cord at the spinal cord injury site (HE× 200)

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，在移植 3 个月组，见有蓝色的神经元样 X-gal 阳性反应细胞，见图 4。

2.2 HRP 逆行示踪

在移植后 1 周组，未见有 HRP 标记神经元和神经纤维。移植后 1 个月组，有少量 HRP 标记神经元，以后逐渐增多，在移植后 3 个月组，见有许多 HRP 标记神经元和神经纤维见图 5，与手术对照组相比，相差非常显著($P<0.01$)。移植 BDNF 基因修饰神经干细胞组好于移植神经干细胞组。HRP 阳性细胞计数见表 1。

2.3 大鼠存活情况及后肢运动功能检测

正常组动物的肢体运动功能为 5 级，爬坡的最大角度为(60.0±5.2)°。手术对照组动物在术后的检查中，后肢的运动障碍明显，伤后 3 个月无明显恢复迹象。而移植组动物术后的各项检测中，后肢的运动能力均优于对照组，尤其是 BDNF 基因修饰 NSC 移植组动物，3 个月时，个别动物后肢的运动功能有很大改善，可达到 4 级，大多数动物的运动功能可恢复到 3 级，见表 2。

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

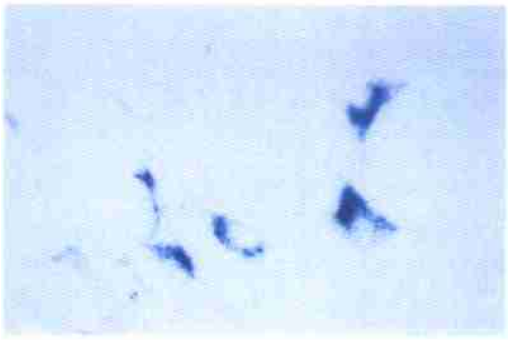


图 4　BDNF-NSC 移植 3 月后, 脊髓损伤移植处 X-gal 组化染色阳性细胞 (X-gal 组化染色× 400)

Fig 4　Three months after BDNF-NSC transplantation, X-gal histochemical positive cells at the longitudinal section of spinal cord injury of rat (X-gal histochemical staining× 400)

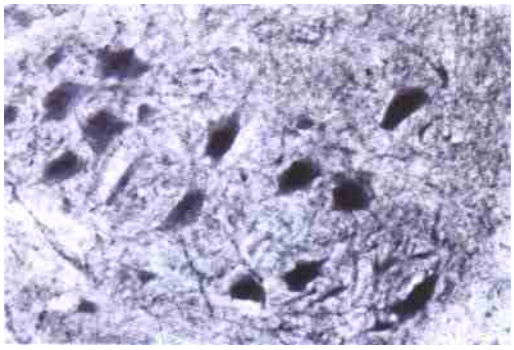


图 5　BDNF-NSC 移植 3 月后, 移植处头侧脊髓内 HRP 阳性细胞 (硫酸镍胺增强法× 400)

Fig 5　Three months after BDNF-NSC transplantation, HRP positive cells at rostral site of the spinal cord injury of rat (Nickel ammonium sulfate enhancement× 400)

表 1　移植后接近脊髓全横断损伤处头侧脊髓内 HRP 阳性细胞数(n=5, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The number of HRP positive cells in rostral site of spinal cord injury(n= 5, $\bar{x}\pm s$)

Group	1 week post-operation	1 month post-operation	2 month post-operation	3 month post-operation
Normal control	51±3.5	51±3.5	51±3.5	51±3.5
Operation control	0.00	0.00	0.00	0.00
NSC transplantation	0.00	6±1.4	25±3.6	33±2.4※
BDNF-NSC transplantation	0.00	11±3.2	34±3.2	45±2.1※

※: P< 0.01 *vs* operated control group

表 2　各组动物运动功能评级结果($\bar{x}\pm s$, n= 5)

Tab 2　The motive functional grade in each group($\bar{x}\pm s$, n=5)

Group	1 week post-operation	1 month post-operation	2 month post-operation	3 month post-operation
Normal control	5.0±0	5.0±0	5.0±0	5.0±0.0
Operation control	0.0±0	0.5±0.5	1.0±0.5	1.6±0.5
NSC transplantation	1.5±0.4	2.8±0.7	3.2±0.6#	3.6±0.8#
BDNF-NSC transplantation	1.8±0.6	3.4±0.6	4.0±0.8#	4.4±0.6#

#: P> 0.05 *vs* the control group

表 3　大鼠存活情况(各组各时相 7 只大鼠)

Tab 3　The survival number of rats (7 rats/group)

Group	1 week post-operation	1 month post-operation	2 month post-operation	3 month post-operation
Operation control	4	3	3	2
NSC transplantation	6	6	5	4
BDNF-NSC transplantation	6	6	6	5

3　讨论

治疗脊髓损伤(SCI)的关键是中枢神经再生, 尽管目前尚未彻底揭示神经轴索的再生机制, 但研究表明, 合适的微环境可以促进中枢神经再生。目前, 常通过转基因技术向损伤局部提供神经营养因子 (Neurotrophic factors, NTFs)。将 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, 刺激脊髓神经生长。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复。主要有神经营养因子(Nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、睫状神经营养因子(Cilia neurotrophic factor, CNTF)、神经营养素 3(Neurotrophic 3, NT 3)、神经营养素 4/5(Neurotrophic 4/5, NT 4/5), 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(Basic fibroblast growth factor, bFGF)等。在 SCI 基因治疗研究中最早使用的受体细胞, 且目前仍然使用较多的是雪旺细胞 (Schwan cell, SC)和成纤维细胞。Blesch 等[2] 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[3] 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, 他们用同样的方法完成 NGF 的基因转移, 并在 14 个月后用 RT-PCR 的方法鉴定了 NGF mRNA 的表达, 并利用免疫组化技术, 发现了感觉、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[4]。

BDNF 的基本功能是促进神经元的存活和突起的再生。柯尊记等[5] 将 BDNF 逆转录病毒包装细胞移植到穹窿-海马伞切除的大鼠脑内, 观察其对隔海马系统胆碱能神经纤维侧枝长芽的促进作用及其功能恢复情况。结果显示, 产毒包装细胞株移植可明显促进空间学习记忆功能的恢复, 表现为在 Morris 水迷宫平台搜寻任务中的平均逃避潜伏期较对照组明显缩短(P< 0.01); 在空间记忆测试实验中, 在原平台所在位置象

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

限的游泳距离明显多于对照组($P<0.05$)。同时可明显增加海马齿状回分子层内胆碱能纤维的侧支长芽。余科炜等[6]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结果相似,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,而基因修饰细胞所分泌的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。Menei等[7]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。Kim等[8]用重物下落的方法导致T8椎板切开术的暴露区发生脊髓挫伤,形成暂时性截瘫模型,用可分泌NGF、BDNF的成纤维细胞移植,6周后可见大鼠的运动能力恢复较单纯成纤维细胞移植组快。

目前,神经干细胞移植越来越受到人们的重视,体外培养的神经干细胞作为供体的优点是:①在可控制的培养条件下实现快速体外扩增,满足移植所需的细胞数量。②根据拟移植部位的细胞类型及细胞结构特异性,在体外使神经干细胞分化成与受者部位细胞类型与构成相似的细胞群体后再行移植。也就是说为了满足特殊部位移植的需要可事先在体外对供者细胞进行"裁剪加工",使之定向分化,能更容易掺入靶组织,提高移植物存活率。③利用神经干细胞可低温冻存,而且复苏后仍能维持原来的生物学性征这一特点,可构建各种不同类型的神经干细胞库。④另外利用神经干细胞或永生化神经干细胞系可实现克隆培养,能够持续分裂增殖,并能较顺利地与宿主组织整合,可将其做为"治疗性基因"的载体,对损伤或病变部位施行基因治疗,以实现外源性治疗基因的准确定位,高效表达,是修复和替代受损脑组织的有效方法,能部分重建神经环路和功能。

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完全整合,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,移植物周围见不到胶质瘢痕或仅出现较少的反应性星形胶质细胞;X-gal组化染色结果显示,移植物内有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,提示移植的BDNF基因修饰神经干细胞仍然存活;HRP逆行示踪显示在移植处的上端脊髓中有HRP阳性神经元和神经纤维,提示移植1个月后有神经纤维的再通,以后逐渐增多;大鼠后肢功能也有较为明显的改善。免疫组化和原位杂交结果显示,BDNF基因修饰神经干细胞移植入脊髓后,可以在宿主体内分化为神经元和星形胶质细胞,神经纤维丰富,且有BDNF免疫反应阳性细胞和大量BDNF mRNA阳性细胞(另文叙述),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。BDNF-NSCs移植优于单纯NSCs移植,但均可作为脊髓损伤的移植材料。

参考文献:

[1] 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):1425-1427.

[2] Blesch A, Uy H S, Grill R J, *et al*. Leukemia Inhibitory Factor Augments Neurotrophin Expression and Corticospinal Axon Growth after Adult CNS Injury [J]. Neurosci, 1999, 19(9): 3556-3566

[3] Tuszynski M H, Gage F H. Bridging grafts and transient nerve growth factor infusions promote long-term central nervous system neuronal rescue and partial functional recovery[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(10): 4621-4625.

[4] Rosario C M, Yandava B D, Kosaras B, *et al*. Differentiation of engrafted multipotent neural progenitors towards replacement of missing granule neurons in meander tail cerebellum may help determine the locus of mutant gene action[J]. Development, 1997, 124(21): 4213-4224.

[5] 柯尊记,刘志敏,姜德鸣,等. 脑内转移脑源性神经营养因子基因促进穹窿切断大鼠神经纤维侧枝长芽及功能恢复[J]. 中国神经科学杂志, 1998, 14(3): 127-133.

[6] 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

[7] 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.

[8] Kim D H, Cutin P H, Noble L T, *et al*. Treatment with genetically engineered fibroblasts producing NGF or BDNF can accelerate covery from traumatic spinal cord injury in the adult rat[J]. Neuroreport, 1996, 7(13): 2221-2225

(编辑 陈聪连)

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