DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.11.026

文章编号: 1000-5404(1999)11-0843-03

pSV PoMcat微基因修饰雪旺细胞脊髓内移植对损伤脊髓细胞的保护作用

陈礼刚[1],高立达[2],曾凡俊[1],毛伯镛[2] ([1]成都军区总医院神经外科; [2]华西医科大学附一院神经外科,成都 610083)

【提要】 目的: 观察 pSV PoMcat微基因修饰雪旺氏细胞(SC)脊髓内移植对损伤组织的作用的影响。方法: 将脊髓半横断损伤 SD大鼠模型随机分为 pSV PoMcat微基因修饰 SC移植组(A组)、SC移植组(B组)、损伤对照组(C组)和正常对照组(D组)。8 h后一半动物取伤段脊髓标本测水离子含量。另一半动物采用联合行为记分(CBS)评价其神经功能。结果: 脊髓损伤(SCI)后组织水肿, Na^+、Ca^{2+} 离子浓度升高, K^+、Mg^{2+} 离子浓度降低, pSV PoMcat微基因修饰 SC脊髓内移植可显著改善这些变化,且使 SCI后神经功能有显著改善。结论: pSV PoMcat微基因修饰 SC脊髓内移植对 SCI具有保护作用,其机制可能与减少神经细胞离子失衡,改善细胞内环境有关。

关键词 基因修饰;雪旺细胞;移植;脊髓损伤
中图法分类号 R622.3; R651.2 文献标识码 A

我们在国际上首次构建 P0-5′-flanking介导的 21.5 Ku人髓鞘碱性蛋白微基因(暂命名为 pSV PoMcat)的基础止,证实该基因能增强雪旺细胞(Schwann cell, SC)的功能、延长其生存时间[1],如将 pSV PoMcat微基因修饰的 SC移植入损伤的脊髓内,能抑制脊髓损伤(Spinal cord injury, SCI)后的细胞凋亡,并促进损伤脊髓的再生[2,3]。本研究进一步观察 pSV PoMcat微基因修饰 SC脊髓内移植对损伤脊髓组织的作用,为临床应用基因治疗 SCI提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 SCI模型的建立及基因修饰 SC的脊髓内移植

受体健康 SD大鼠 80只,体重 180~250 g,雌雄不拘(由华西医科大学动物中心提供),随机分为四组: 含 pSV PoMcat微基因的 SC组为 A组(pSV PoMccat微基因在华西医科大学基础医学院重组 DNA室构建。pSV PoMcat转染至 SC中,在华西医科大学分子实验室进行,参照 Lipofectnmine试剂盒说明书进行);高钝化的 SC移植组为 B组; SCI对照组为 C组;正常对照组(D组);每组 20只。受体鼠用 10 g/戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉后,按我们前有的方法[2,3],在 T8平面用自制双刀片将左半侧的脊髓横向切断,再用微玻管吸除约 2 mm脊髓组织,使其形成一个间隙,用棉球、明胶海绵轻压止血后,待移植。

按我们前有的方法[2,3],将含 pSV PoMcat微基因的 SC悬液重悬于一定体积的盐溶液,使之成为 2.5×10^4 cells/μl悬液,然后将上述悬液 3 ml浸透在与宿主脊髓间隙大小一致的可吸收明胶海绵上,并将其植入 A组动物模型中。确认植入后用 8~0无创缝线缝合(间断)硬脊膜、肌层及皮肤。同样,B组动物仅植入含 3μl(2.5×10^4 cell/μl)高纯化的 SC的明胶海绵。C组动物仅植入明胶海绵,为假移植组。

1.2 观察指标

1.2.1 脊髓水肿程度及离子含量 移植术后 8 h,每组各 10只动物取伤段脊髓约 4 cm,将上述标本置于称量瓶中称量;于 100°C中烤 24 h,称干质量,按 Elliot公式记算水的质量分数。干燥标本加入浓硝酸 1 ml和高氯酸 0.25 ml硝化 1~2 h,用去离子水稀释后在日立 Z-8 000型偏振塞曼原子吸收分光光度计上用原子吸收火焰光谱分析法测定溶液中的离子质量浓度(μg/ml)并计算脊髓标本中离子的质量摩尔浓度(μmol/kg)。

1.2.2 运动功能评分 每组 10只动物。在移植术后 2周、4周、8周、12周,由未知情者按 Gele等[4]介绍的包括后肢运物、伸趾、立足回缩、端正体位、斜坡试验、热板试验和游泳等八个项目的脊髓功能综合评定方法即联合行为记分(Combined behavioral Score, CBS)来反映脊髓神经功能状态。其最大值为 100分,代表神经功能完全丧失,最小为 0分,表示神经功能正常。

1.2.3 统计学处理 实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组平均数的比较采用单因素方差分析,(One-way, ANOVA), SNK方法两两比较。

2 结果

2.1 移植 pSV PoMcat微基因修饰 SC对 SCI后组织水肿及离子含量的影响

C组含水量及 Na^+、Ca^{2+} 离子含量比正常对照组增加非常显著($P<0.01$), K^+、Mg^{2+} 离子含量与正常组相比有显著下降。A组的含水量及 Na^+、Ca^{2+} 离子含量则有非常显著降低, K^+、Mg^{2+} 离子含量有非常显著恢复,见表 1。

作者简介: 陈礼刚,男,34岁,副主任医师,博士
收稿日期: 1998-12-08; 修回日期: 1999-10-28

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

表 1 pSVPoMcat微基因修饰 SC对 SCI后组织水肿及离子含量的影响($n=10, \bar{x}\pm s$, mb/μmol·kg^{-1})

Tab 1 Effect of microgene pSVPoMcat implantation to modify SC genetically on H_2O, K^+, Na^+, Mg^{2+} contents at injured segment after SCI($n=10, \bar{x}\pm s$, mb/μmol·kg^{-1})

Group	H_2O(%)	Na^+	Ca^{2+}	K^+	Mg^{2+}
A△	54.95± 3.8	209.83± 20.18	7.14± 0.86	198.02± 23.14	15.18± 0.12
B△△	57.98± 5.59	216.72± 18.03	8.02± 0.68	190.32± 16.57	15.02± 0.96
C*	79.19± 6.83	323.03± 15.32	9.86± 1.24	86.37± 32.46	12.16± 0.48
D*	63.18± 8.32	131.06± 6.72	4.86± 1.02	200.32± 18.43	17.36± 0.87

*: $P<0.01$ *vs* group A, B, D; △, △△: $P<0.01$ *vs* group D; △: $P>0.05$ *vs* group B

2.2 移植 pSVPoMcat微基因修饰 SC对 SCI大鼠神经功能评分的影响

正常组 CBS为 0分,术后 2周、4周、8周和 12周,A、B、C三组 CBS评分,见表 2比较,差异非常显著($P<0.01$)。

表 2 移植 pSVPoMcat微基因修饰 SC对 SCI大鼠神经功能评分的影响

Tab 2 Effect of mircrogene pSVPoMcat implantation to modify SC genetically on neuroscore of rats after SCI

Group	2周	4周	8周	12周
A△	53± 4.62	50± 2.84	25± 2.84	14± 2.26
B△△	56± 4.82	47± 3.12	47± 3.12	35± 4.32
C△△△	87± 4.52	68± 5.23	68± 5.23	63± 4.62

△: $P<0.01$ *vs* B; △△: $P<0.01$ *vs* C;
△△△: $P<0.01$ *vs* C

3 讨论

SCI后神经元上神经营养因子(Neurotrophic factor, NTF)受体表达增加或重新表达,大量受伤神经元相互竞争 NTF,那些得不到足够 NTF的神经元即发生死亡[5,6]。这为 NTF治疗 SCI提供了生物学依据。SC不仅能分泌多种 NTF,而且能产生细胞外基质成分(Extracellular matrix, ECM)和细胞粘连分子(Cell adhesion molecules, CAM),为轴突提供良好的环境,支持和引导轴突再生,当其被移植到损伤中枢神经系统(Central nervous system, CNS)的微环境中,它们能继续存活、分裂、迁移和分化,并能促进 CNS的再生、髓鞘的重建和部分功能的恢复。但是移植的 SC存活时间不长,功能低下,远不能满足临床的需要,有必要进行基因修饰后的移植[7,8]。

本研究通过向 SCI灶内移植 pSVPoMcat微基因修饰 SC,观察到 SCI大鼠神经功能评分(CBS: A < B < C, $P<0.05$)得到显著改善。作者前有的研究已证实移植 pSVPoMcat微基因修饰 SC能抑制 SCI后的细胞凋亡对 SCI再生修复有促进作用[2,3]。这表明受损脊髓内移植 pSVPoMcat微基因修饰 SC能保护受伤脊髓。但其机制尚不清楚,为此,我们选择离子内环境的变化进行了观察。结果表明 SCI后 Na^+、Ca^{2+} 离子含量显著升高,K^+、Mg^{2+} 则显著降低,导致细胞水肿、功能紊乱、组织内压增高,从而引起微循环障碍,组织缺血缺氧加重,最终导致胞溶。Ca^{2+} 细胞内超载(Overload)使线粒体氧化磷酸化脱偶联导致 ATP耗竭、激活磷脂酶 A和 C造成组织损伤、激活蛋白酶和核酸酶等使蛋白和核酸分解,最终导致细胞死亡。Mg^{2+} 对 Na^+-K^+ 梯度的维持,Ca^{2+} 的转运和累积有重要的调节功能。Mg^{2+} 含量的降低不仅影响膜的通透性,还进一步损害 Na^+、K^+、Ca^{2+} 浓度梯度,在继发性组织损害中起重要作用。由于 SCI继发损害的高峰在 6~8 h[9],因此,我们选择移植术后 8 h测量离子浓度。

实验表明移植 pSVPoMcat微基因修饰 SC能降低组织水肿程度,使受损伤脊髓内后增高的 Na^+、K^+ 显著降低($P<0.01$),损伤后降低的 K^+、Mg^{2+} 显著升高($P<0.01$)。这提示移植 pSVPoMcat微基因的修饰 SC的保护作用可能与其减少神经细胞离子失衡,改善细胞内环境有关。我们认为这种作用可能主要与 SC所分泌的 NTF有关,与文献报道一致[10,11]。同时,这也是 A、B二组离子含量水平在统计学无显著差异的原因,因为移植术后 8 h,此时 A、B二组的 SC浓度及活性均差不多,由 SC所分泌的 NTF也大致相等[1]。然而,移植术两周以后,其神经功能评分 A、B两组有显著差异,这一方面,说明单纯移植 SC其存活时间有限,另一方面,进一步证明了 pSVPoMcat微基因修饰 SC能增强 SC的功能和延长其生时间,与我们的体外试验[1]相一致。

结合作者前有的研究[1~3],作者认为 pSVPoMcat微基因修饰 SC脊髓内移植为 SCI具有潜在的临床意义。

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

参考文献

[1] 陈礼刚,高立达,曾凡俊,等. pSV PoMcat微基因在雪旺细胞中的表达研究[J].中华实验外科杂志, 1998, 15(6): 584

[2] 陈礼刚,高立达,曾凡俊,等.移植 pSV PoMcat微基因修饰雪旺细胞对脊髓损伤后细胞凋亡的影响[J].中华创伤杂志, 1998, 14(3): 157

[3] 陈礼刚,高立达,毛伯镛,等. pSV PoMcat微基因修饰雪旺氏细胞脊髓内移植对损伤脊髓再生的影响[J].中国修复重建外科杂志, 1998, 12(5): 257

[4] Gele K, Keraside H, Hrathal J R. Spinal cord contusion in the rat behaviroal analysis of functional neurological impairment[J]. Exp Neurol, 1985, 88(1): 129

[5] Brunclllo N, Reynolds M, Wrathall J R, *et al*. Increased nerve growth factor mRNA rat spinal cord[J]. Neurosci Lett, 1990, 118(2): 238

[6] Frisen J, Vergo V M K, Cullheim S, *et al*. Increased levels of trkB mRNA and trk B Protein-like immunoreactivity in the injured rat and cat spinal cord[J]. Proc Nat Acad SCI USA, 1993, 33(5): 889

[7] Xu Xiaoming. Roles of schwann cells in the repair and regeneration of the central nervous system[J]. Chinese Journal of Neuroanatomy, 1996, 12(4): 291

[8] Li Y, Raisman G. Schwann cells induce sprouting in motor and sensory axons in the adult rat spinal cord[J]. J Neurosci, 1994, 14(3): 4050

[9] Charles H, Michael G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanism[J]. J Neurosurg, 1991, 75(2): 15

[10] Koliatos V E, Sheiton D L, Moblly W E, *et al*. A novel group of nerve growth factor receptor-immunoreactive neurons in the ventral horn of the lumbar spinal cord[J]. Brain Res, 1991, 54(1): 121

[11] Chen B, Mcmhon D G, Mattson M P. Modulation of calcium current, intracellular calcium levels and cell surival by glucose deprivation and growth factor in hippocampal neurons[J]. Brain Res, 1993, 607(1): 275

(编辑　张大春)

Protective effects of intracord transplantation of pSVPoMcat modified Schwann cells on spinal cord injury

CHEN Li-gang, GAO Li-da, ZENG Fang-jun, MAO Bo-yong (Department of Neurosurgery, General Hospital of Chngdu Command, Chengdu, 610083)

Abstract Objective: To study the protective effects of the intracord transplantation of microgen pSV PoMcat-genetically-modified Schwann cells (MSCs) on spinal cord injury (SCI). Methods: Rats with semi-division (SD) of the spinal cord was divided into 4 groups. Group A consisted of the rats with SD treated with the transplantation of MSCs, Group B of the rats with SD treated with the transplantationof SCs without genetic modification, Group C of the rats with SD without treatment and Group D was the normal control. 8 h after operation, half of the rats of each group were killed and the injured segment of the spinal cord was resected to be examined with atomic absorption spectrophotometry. Another half of the rats of all the groups were examined with neurological function tests to have a combined behavioral score (CBS). Results: There was a significant increase of water content and Na^{+} and Ca^{2+} ions and a decrease of K^{+} and Mg^{2+} ions in the injured cord segment of Group C and a statistically significant recovery was obserbed in Group A. The intracord transplantation of pSV PoMcat genetically modified SCs improved the neurological outcome of spinal cord injury. Conclusion: Our findings indicate that intracord transplantation of pSV PoMcat-genetically-modified-Schwann cells exerts protective effects on the injured segment of the spinal cord through the improvement of the internal ion environment of the spinal cord.

Key words genetic modification; Schwann cell; intracord transplantation; microgene; pSV PoMcat; spinal cord injury; rat

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