

· 基础研究 ·

# 低温保存神经干细胞移植促进脊髓损伤后轴突再生的实验研究

王岩峰<sup>1</sup>, 吕刚<sup>2</sup>, 许卫兵<sup>1</sup>, 金哲<sup>1</sup>, 黄涛<sup>1</sup>

(1.中国医科大学附属第一医院骨科, 辽宁 沈阳 110001; 2.辽宁医学院)

**【摘要】** 目的:观察低温保存(-70℃)的神经干细胞(NSCs)复苏后移植对大鼠脊髓损伤(SCI)后轴突再生的影响。方法: NSCs 在处于对数生长期阶段冻存 2 周,复温后由 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)标记,制备大鼠 SCI 模型。实验分为 3 组: NSCs 移植组(A 组)、DMEM 填充组(B 组)、正常对照组(C 组)。脊髓损伤后立即进行移植干预,应用免疫组化法观察 BrdU 标记的移植细胞的存活及迁移情况,应用辣根过氧化物酶(HRP)逆行示踪法观察损伤处轴浆运输的重建。结果:复苏的 NSCs 经 BrdU 标记后移植到 SCI 区,在损伤脊髓区域可检测到标记的阳性细胞,辣根示踪技术显示细胞移植组较 DMEM 填充组阳性细胞明显多,组间差别有统计学意义。结论:低温保存的 NSCs 在移植到脊髓损伤区域后可存活,并参与脊髓损伤处轴浆通路的结构重建。

**【关键词】** 脊髓损伤; 神经干细胞; 移植; 轴突; 再生

**Effects of cryopreserved neural stem cells transplantation on rat axonal regeneration after spinal cord injury** WANG Yan-feng\*, LÜ Gang, XU Wei-bing, JIN Zhe, HUANG Tao. \*Department of Orthopaedics, the First Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China

**ABSTRACT Objective:** To observe the effects of cryopreserved(-70℃)neural stem cells(NSCs)transplantation on the axon regeneration after the spinal cord injury (SCI) of rats. **Methods:** Neural stem cells were cultured from the hippocampus of the rat's embryo and identified by immunocytochemistry of nestin, then NSCs in logarithmic phase were cryopreserved(-70℃) for 2 weeks. Seven days after the operation of SCI, the NSCs in were transplanted into the injured site immediately. Thirty six adult Wistar rats were randomly divided into three groups: spinal cord injury treated with transplantation of NSCs to the injured site(Group A), spinal cord injury received DMEM solution(Group B), control group(Group C). Then NSCs labeled with BrdU were detected by immunohistochemistry, and the reconstruction of spinal cord were detected by horseradish peroxidase(HRP) staining. **Results:** NSCs can be detected in the spinal cord after transplantation. The number of HRP positive cells of Group A was higher than that of Group B. **Conclusion:** The transplantation of cryopreserved NSCs can survived in the injured site and promote the reconstruction. It may be a progress in the repairing of the SCI by cells transplantation.

**Key words** Spinal cord injuries; Neural stem cells; Transplantation; Axons; Regeneration

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(6):427-429 www.zggszz.com

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种继发于高能量创伤的中枢神经系统疾患,常伴随脊柱骨折或脱位,受伤患者脊髓损伤平面以下感觉、运动及二便功能障碍,严重影响患者的生活质量。细胞移植治疗脊髓损伤是神经科学领域的重要研究方向之一。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)具有增殖能力强、免疫原性低、利于进行细胞移植和基因调控等优点<sup>[1]</sup>。同时 NSCs 因具有与脊髓组织同源、分化后易与宿主相整合等特点,使其在中枢神经系统疾病的治疗方面具有重要意义<sup>[2]</sup>。本研究将分离培养的 NSCs 于-70℃冻存,复温后移植于大鼠

损伤的脊髓,通过形态学方法观察移植细胞的存活、迁移以及轴浆运输的重建,为神经干细胞移植治疗脊髓损伤提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 动物与试剂** Wistar 雄性大鼠 48 只,新生 Wistar 大鼠(24 h 内)6 只,DMEM(dulbecco's modified eagle medium)/F12 培养基,胰蛋白酶,胎牛血清(BSA),二甲基亚砜(DMSO)。5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)检测试剂盒,辣根过氧化物酶(HRP)检测试剂盒,DAB 显色剂,二抗及 SABC 试剂盒。

**1.2 NSCs 的培养** 参照既往研究,见文献[3]。

**1.3 NSCs 的冻存、复苏与标记** 将含有体积分数 5%的 DMSO 和 10%的小牛血清(FBS)的高糖 DMEM 配成冻存液,调整 NSCs 的浓度为 10<sup>5</sup>/ml,将冻存液与 NSCs 移至冻存管

基金项目:教育部高校博士点专项科研基金(编号:20060159019);辽宁省自然科学基金(编号:20052096)

通讯作者:王岩峰 Tel:024-83282772 E-mail:wyf\_doctor@163.com

中,梯度降温并移至-70℃深低温冰箱中。2周后取出,以快速复温法在37-42℃水浴中解冻,离心洗脱冻存液,放入培养液中,吹打细胞球,使NSCs重新悬浮于培养液中,应用台盼蓝拒染法检测NSCs的存活率。培养1周后调整细胞密度约为 $5 \times 10^4/\mu\text{l}$ ,移植前72h按20 $\mu\text{mol/L}$ 的终浓度加入BrdU标记细胞。

**1.4 脊髓损伤动物模型制作与分组** Wistar大鼠,10%水合氯醛(0.3 ml/100 g, i.p.)腹腔麻醉后打开椎板,无菌条件下用尖刀全横断T<sub>10</sub>节段脊髓,以鼠尾痉挛性摆动、双下肢瘫为损伤标准,缝合切口。移植实验共分3组:在脊髓损伤后第7天,NSCs移植组(A组,12只)以微量注射器缓慢注入复苏后的NSCs细胞悬液5 $\mu\text{l}$ 到脊髓断端;DMEM填充组(B组,12只)注入等量DMEM培养液,逐层缝合,术后每日膀胱挤尿;空白对照组(C组,12只)未制作脊髓损伤。术后因麻醉过量死亡6只,感染死亡6只,均予补足。

**1.5 观测指标及方法**

**1.5.1 复苏NSCs形态学观察** 复苏NSCs重新悬浮于培养液之后,应用台盼蓝拒染法检测NSCs的存活率,即成活的细胞数与冻存前计数细胞之间的比值。用光镜观察复苏后NSCs形态。

**1.5.2 BrdU及HRP阳性细胞检测** HRP示踪: NSCs移植后第7、14、28天取材,取材前36h于麻醉下,在大鼠后肢外侧显露单侧的坐骨神经,用5 $\mu\text{l}$ 微量注射器将浓度25%的HRP稀释液3 $\mu\text{l}$ 缓慢注入坐骨神经束内,留针3min,逐层缝合。BrdU呈色:大鼠在深麻醉下,以0.4%多聚甲醛行心脏灌注固定,取材,包埋,二甲苯脱蜡,乙醇水化,PBS液漂洗,胰酶滴片,BSA封闭。弃封闭液,加入一抗BrdU小鼠抗大鼠单克隆抗体,二抗孵育30min,PBS阻断内源性过氧化物酶,SABC液滴片,PBS液漂洗,DAB显色,苏木素复染,脱水,二甲苯透明,封片,镜下观察。HRP呈色:冰冻切片干燥,室温1h,PBS阻断内源性过氧化物酶,室温10min,PBS液洗,DAB显色,蒸馏水漂洗,苏木素复染,冲洗,脱水,二甲苯透明,封片,镜下观察。

**1.6 统计学处理** 每张切片在高倍镜下随机选取20个视野,统计的阳性细胞数以均数 $\pm$ 标准差表示,应用SPSS 10.0统计学软件作方差分析和组间t检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 复苏NSCs形态学观察** NSCs存活率的平均值为61.5%。复苏早期的细胞胞体较小,折光性较好,细胞呈圆形,部分细胞有聚集生长的趋势。2d后,死亡细胞增多,另有部分细胞胞体增大,折光性增强,出现分裂相,渐形成细胞构成的细胞团,7d时形成较大的克隆球。

**2.2 BrdU阳性细胞的检测** A组,BrdU阳性细胞在移植术后第7天可检测到,为棕黄色核标记的小圆形细胞,在临近损伤区阳性细胞增多,向头尾端及脊髓前后角放射状排列过程中阳性细胞趋于减少,远处可达1cm。B组及C组均未见阳性细胞。第14天细胞移植组BrdU阳性细胞平均每高倍镜视野阳性细胞数为 $14.5 \pm 5.0$ ,B组与C组无阳性细胞。移植术后第28天,随着细胞分化,A组BrdU阳性细胞逐渐减少并消失。

**2.3 HRP阳性细胞的检测** 见表1。损伤脊髓的近端于显微镜下观察:A和B组在术后第7天偶见阳性细胞,而C组可见较多的阳性细胞,棕色颗粒定位于灰质的神经元和白质的神经纤维;术后第14天A组可检测到少量的HRP阳性细胞,平均数多于B组;移植术后第28天,A组的平均阳性细胞数增多,平均每高倍镜视野阳性细胞数为 $(12.5 \pm 2.5)$ 个,B组的平均阳性细胞数为 $(2.0 \pm 2.0)$ 个,组间差别有统计学意义( $P = 0.006, P < 0.01$ )。

表1 SCI后各组的HRP阳性细胞数( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 The number of HRP-positive cells after SCI in each group( $\bar{x} \pm s$ )

组别	镜下视野数 (个)	HRP阳性细胞数(个)		
		7 d	14 d	28 d
NSCs移植组	20	1.5 $\pm$ 1.0	8.5 $\pm$ 2.5	12.5 $\pm$ 2.5
DMEM填充组	20	1.0 $\pm$ 1.0	2.5 $\pm$ 2.0	2.0 $\pm$ 2.0
空白对照组	20	19.5 $\pm$ 2.0	20.0 $\pm$ 2.0	18.5 $\pm$ 1.5

**3 讨论**

研究脊髓损伤的治疗目前包括:①应用药物及神经营养因子控制继发性损伤。②移植神经干细胞、嗅球鞘细胞、骨髓基质细胞、胚胎组织或基因调控的功能细胞并桥接损伤部位。③研究细胞信号的转导机制,刺激或调节细胞内生长锥的信号途径。④消除抑制脊髓再生的多种因素,如降解胶质瘢痕、消除抑制轴突再生的蛋白多糖等。⑤使脱髓鞘的轴突重新髓鞘化<sup>[4]</sup>。研究发现神经干细胞在移植到脊髓损伤区域后可分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞等,桥接脊髓断端并且重建神经传导通路,改善了损伤平面以下的运动及感觉功能<sup>[5]</sup>。Lu等<sup>[6]</sup>研究证实将神经干细胞在脊髓损伤后直接移植到大鼠的脊髓损伤区,可观察到脊髓神经营养因子表达的上调。有研究证明,将神经干细胞体外分化为星形胶质细胞后移植,可促进脊髓损伤区空洞的修复,并认为幼稚的星形胶质细胞与反应性的胶质瘢痕对脊髓的作用机制不同,胶质细胞对轴突的生长起到支持作用,而胶质瘢痕表面较多的硫酸软骨素蛋白多糖是轴突再生失败的主要原因。而将神经干细胞诱导分化为少突胶质细胞后移植到脊髓损伤区,可明显促进损伤区脱髓鞘神经的髓鞘化<sup>[7]</sup>。

本研究在将神经干细胞移植到大鼠脊髓损伤区,并于伤后检测到移植的细胞存活、迁移。BrdU是胸腺苷类似物,可通过碱基互补配对的原则整合到处于S期的原始干细胞双链DNA中,在半保留复制过程中逐渐消减。BrdU标记简单、方便,检测手段与常规组化反应类似。缺点在于随着移植后细胞的分化,标记强度逐渐减弱,无法追踪细胞的转归。本实验仅证实移植的细胞可以存活于脊髓损伤区域,并且可迁移到距离损伤断面1.0cm的脊髓前、后角,随着标记强度的减弱,脊髓组织结构也趋于恢复,可以认为移植的细胞起到了一定的修复作用。HRP示踪始于20世纪70年代,通过轴浆的逆行运输将标记物带到损伤处,实验组在移植后4周检测到HRP阳性的神经细胞,而对照组未见有阳性细胞存在,表明神经干细胞在移植后可能通过桥接及分泌神经营养因子等方式重建

· 基础研究 ·

# 强骨宝方载药血清灭活与否对成骨细胞增殖功能的影响

陈智能<sup>1</sup>, 苏友新<sup>2</sup>, 杨连梓<sup>2</sup>, 郑良朴<sup>3</sup>, 林久茂<sup>3</sup>, 王培清<sup>4</sup>

(1. 杭州市萧山骨伤医院, 浙江 杭州 311261; 2. 福建中医学院骨伤系; 3. 福建中医学院中心实验室; 4. 福建省中医研究院检验科)

**【摘要】** 目的: 探讨强骨宝方糖尿病鼠血清灭活与否对成骨细胞增殖的影响。方法: 采用胰蛋白酶-II 型胶原酶消化法从 1~2 日龄 SD 大鼠颅盖骨中分离出成骨细胞, 倒置显微镜下观察其形态, 碱性磷酸酶 (ALPase) 染色法、钙化结节染色、Van-Gieson 染色鉴定细胞后用灭活和不灭活的不同时效 (灌胃 3、5 d, 末次灌胃 1、3 h)、不同浓度 (5%、10%、20%) 的强骨宝方糖尿病模型鼠血清加入成骨细胞培养体系, 作用一定的时间, 应用 MTT 比色法检测载药血清灭活对成骨细胞增殖能力的影响。结果: 强骨宝方灌胃 3、5 d, 末次灌胃 1、3 h 的 5%、10%、20% 糖尿病鼠不灭活血清与灭活组相比差异有统计学意义, 以不灭活载药血清对成骨细胞增殖功能的促进作用较强 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。结论: 强骨宝方糖尿病模型鼠血清灭活与否影响成骨细胞的增殖功能, 以不灭活载药血清的作用最佳。

**【关键词】** 成骨细胞; 细胞增殖; 血清学试验; 中药疗法

**Experimental study on the effects of inactivated and un-inactivated pharmaco-serum of diabetic rats fed with Chinese herbs *Qianggubao* decoction (强骨宝方) on the proliferation of osteoblast cultured in vitro** CHEN Zhi-neng\*, SU You-xin, YANG Lian-zi, ZHENG Liang-pu, LIN Jiu-mao, WANG Pei-qing. \*The Traumatology and Orthopaedics Hospital of Xiaoshan, Hangzhou 311261, Zhejiang, China

**ABSTRACT Objective:** To study the effect of inactivated and un-inactivated pharmaco-serum of diabetic rats fed with Chinese herbs *Qianggubao* decoction (强骨宝方) on the proliferation of osteoblast cells (OB) cultured in vitro. **Methods:** OB was isolated from the skull of newly born SD rats aged 1 to 2 days by means of Trypsin-collagenase digestion and identified by image analysis under inverted microscope, V-G collagen staining, ALP staining, calcification nod staining etc. After the OB was identified, in activated and un-inactivated pharmaco-serum of diabetic rats fed with *Qianggubao* decoction (强骨宝方) of different phase (rats were fed with medicine 3 days or 5 days after last fed with medicine 1 hour or 3 hours) and concentration (5%, 10%, 20%) were added to the OB and incubated. After determined times, the effects of the proliferation of osteoblasts

基金项目: 福建省青年科技人才创新项目 (编号: 2001J062)

通讯作者: 陈智能 Tel: 0571-82239093 E-mail: czneng@126.com

脊髓结构, 从而将损伤的神经传导通路重建。

本研究在形态学方面证实神经干细胞移植可促进轴浆运输的恢复, 具体治疗机制及肢体功能的恢复还有待深入研究。

### 参考文献

- 1 Park KI, Himes BT, Stieg PE, et al. Neural stem cells may be uniquely suited for combined gene therapy and cell replacement; evidence from engraftment of neurotrophin-3-expressing stem cells in hypoxic-ischemic brain injury. *Exp Neurol*, 2006, 199(1): 179-190.
- 2 王岩峰, 吕刚, 李雷, 等. 神经干细胞移植对大鼠脊髓损伤后胶质细胞源性神经营养因子及生长相关蛋白 43 基因表达的影响. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19(6): 416-419.
- 3 王岩峰, 吕刚, 刁延娜, 等. 神经干细胞移植对大鼠脊髓损伤后 PLP 基因表达的影响. *中国矫形外科杂志*, 2005, 13(4): 605-607.

- 4 Pluchino S, Zanotti L, Deleidi M, et al. Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005, 48(2): 211-219.
- 5 Nakamura M, Toyama Y, Okano H. Transplantation of neural stem cells for spinal cord injury. *Rinsho Shinkeigaku*, 2005, 45(11): 874-876.
- 6 Lu P, Jones LL, Snyder EY, et al. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 2003, 181(2): 115-129.
- 7 Profyris C, Cheema SS, Zang D, et al. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis*, 2004, 15: 415-436.

(收稿日期: 2007-11-14 本文编辑: 连智华)