

Rolipram联合少突胶质前体细胞移植治疗大鼠脊髓损伤*****☆

祁全¹, 毕郑钢¹, 杨卫良¹, 李学钊¹, 杨鑫¹, 张磊², 潘尚哈³

Rolipram combined with oligodendrocyte precursor cell transplantation for treatment of spinal cord injury in rats

Qi Quan¹, Bi Zheng-gang¹, Yang Wei-liang¹, Li Xue-zhao¹, Yang Xin¹, Zhang Lei², Pan Shang-ha³

Abstract

¹Department of Orthopaedics, ²Central Laboratory, First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China; ³Department of Pathology, Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Qi Quan☆, Doctor, Associate chief physician, Department of Orthopaedics, First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
qiqian999@sina.com

Correspondence to: Bi Zheng-gang, Master, Professor, Department of Orthopaedics, First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
bizhenggang@54dr.com

Supported by: the Youth Foundation of Heilongjiang Province, No. QC06C073*; the Grant of Health Department of Heilongjiang Province, No. 2006-078*; the Grant of Education Department of Heilongjiang Province, No. 10551170*; the Postdoctoral Foundation of Heilongjiang Province*; the Scientific Research Foundation of First Hospital of Harbin Medical University, No. 2007037*

Received: 2010-07-21
Accepted: 2010-08-24

BACKGROUND: There are many reasons for the difficult regeneration of the injured spinal cord axon, and a comprehensive application of several methods will be more effective.
OBJECTIVE: To observe axonal regeneration and remyelination using Rolipram combined with oligodendrocyte precursor cells (OPCs) transplantation in rats after spinal cord injury (SCI).
METHODS: Wistar rat models of SCI were established using ALLEN method. Alzet osmotic pumps contained Rolipram 200 μL were embed subcutaneously in Rolipram treatment and combination groups, release 0.5 μL per hour, 2 mg/(kg·d) for 14 days. After one week, 0.012 5 μmol dibutyl cyclic-adenosine monophosphate was infused in the injured spinal cord. OPCs were infused to cell transplantation and combination groups. An equal volume of saline was injected in the SCI group. Basso Beattie and Bresnahan score was assessed weekly postoperation until 4 weeks when all rats were killed and spinal cords were made into frozen sections. Hematoxylin-eosin staining and immunofluorescence method were performed.
RESULTS AND CONCLUSION: At 4 weeks postoperation, Basso Beattie and Bresnahan score was greater in the Rolipram treatment and combination groups compared with SCI and cell transplantation groups. Immunofluorescence method showed: the expression of NF200 was strong in Rolipram treatment and combination groups. OPCs were alive and positive for myelin basic protein, which was predominant and myelinated nerve fiber increased in latter. These suggest that Rolipram elevated cyclic adenosine monophosphate levels, promoted functional recovery after SCI, especially combined with OPC transplantation.

Qi Q, Bi ZG, Yang WL, Li XZ, Yang X, Zhang L, Pan SH. Rolipram combined with oligodendrocyte precursor cell transplantation for treatment of spinal cord injury in rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(40): 7462-7469. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 脊髓损伤轴突难以再生涉及到多方面原因,综合运用多种治疗方法应该更有效。
目的: 应用 Rolipram 联合少突胶质前体细胞移植治疗大鼠脊髓损伤,观察轴突再生和再髓鞘化的情况。
方法: Wistar 大鼠利用 ALLEN 法打击形成脊髓损伤模型。Rolipram 治疗组和联合治疗组背部皮下埋置 ALZET 渗透性微泵内装 Rolipram 200 μL,每小时释放 0.5 μL, 2 mg/(kg·d),可持续 14 d,1 周后局部注入 0.012 5 μmol 的双丁酸环腺苷酸;细胞移植组和联合治疗组移植少突胶质前体细胞,脊髓损伤组注入同等量的生理盐水,术后每周测定 BBB 运动评分,4 周取材,冰冻切片,苏木精-伊红染色,免疫荧光染色。
结果与结论: 伤后 4 周 Rolipram 治疗组和联合治疗组 BBB 运动评分高于脊髓损伤组和细胞移植组;免疫荧光显示 Rolipram 治疗组和联合治疗组损伤局部 NF200 表达旺盛;细胞移植组和联合治疗组少突胶质前体细胞存活并表达髓鞘碱性蛋白,后者存活数量更多,并且有髓纤维增多。说明应用 Rolipram 提高环磷酸腺苷水平促进了大鼠脊髓损伤功能的恢复,联合少突胶质前体细胞移植可产生协同促进作用。
关键词: 脊髓损伤;环磷酸腺苷;少突胶质前体细胞;细胞移植;协同作用
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.40.012

祁全, 毕郑钢, 杨卫良, 李学钊, 杨鑫, 张磊, 潘尚哈. Rolipram 联合少突胶质前体细胞移植治疗大鼠脊髓损伤[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(40):7462-7469. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

脊髓损伤治疗关键在于神经传导束的恢复,即轴突的再生^[1-2]。细胞移植所能起的作用是改善损伤局部内环境,添充、桥接脊髓损伤后产生的囊腔,减少胶质瘢痕,通过分泌神经营养因子以促进神经元轴突的再生^[3],也许正是这种局限性使以往实验中轴突难以跨越移植-损伤远段交界面的原因。体外实验中,髓鞘膜蛋白抑制体外培养神经突起生长的同时可降低胞内的环磷酸腺苷水平^[4-5]。这意味着环磷酸腺苷

水平的降低与轴突损伤有关,通过提高环磷酸腺苷水平促进轴突再生、运动功能恢复成为可以利用的手段^[4]。在前期实验已经证实外周应用 Rolipram 可以有效的提高中枢神经系统中环磷酸腺苷的水平,并对脊髓损伤产生一定的保护作用^[6-8]。单一而过分地强调它们的作用会使实验进入误区,将它作为联合治疗的一部分来考虑也许更为合适。

本实验拟通过 Rolipram 联合少突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cells, OPCs)移植治疗大鼠脊髓损伤,观察轴突再生和再髓鞘化的情况,初步揭示环磷酸腺苷在神经元与胶

质细胞相互信号影响的内在机制。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2006-05在哈尔滨医科大学第一临床医学院中心实验室完成。

材料:

实验动物: 健康Wistar大鼠35只, 雌雄不限, 体质量180~220 g, 新生Wistar大鼠35只(P0), 均由哈尔滨医科大学第一临床医学院动物室提供。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学要求^[9]。

实验试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
Rolipram	Alexis, USA
DMEM/12 培养基	HyClone laboratories
A2B5 小鼠单克隆抗体(IgM)	R&D Systems, USA
Dibutylryl cyclic AMP、纯化山羊抗小鼠 IgM(u-chain specific)	SIGMA, USA
BrdU 小鼠单克隆抗体、FITC 标记山羊抗小鼠 IgM(u-chain specific)	SIGMA, USA
MBP 兔单克隆抗体、GFAP 兔单克隆抗体、NF200 小鼠神经微丝蛋白单克隆抗体	博士德生物工程有限公司
FITC 标记山羊抗兔 IgG(H+L)、Rhodamin 标记山羊抗小鼠 IgG	北京中杉金桥生物技术有限公司
alzet®植入式胶囊渗透压泵	Model2002, 美国 DURECT 公司

实验方法:

混合胶质细胞取材培养: 取新生Wistar大鼠(P0), 体积分数为75%乙醇浸泡消毒。在显微镜下无菌条件取大脑, 剥去硬膜, 置于4℃的PBS液中, 细剪成1.0~2.0 mm²的组织块, 用0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA在37℃下消化30 min, 含体积分数为20%小牛血清的DMEM/12培养基终止消化, 过滤, 离心5 min(1 200 r/min), 除去上清液, 再次加入含体积分数为20%小牛血清的DMEM/12培养基, 吸管吹匀, 离心去上清液, 待用。每72 h换液, 共培养11 d。

振荡分离和免疫黏附纯化OPC:

免疫黏附培养皿预先准备: 纯化山羊抗小鼠IgM被TBS(50 mmol/L, pH9.5)稀释为5 mg/L。10 mL抗小鼠IgM在直径9.2 cm的塑料

培养皿在4℃中孵育12 h, 每次6 mL, PBS洗3遍, 然后加入5 mL小鼠源性A2B5单克隆抗体(用含1 g/L BSA的DMEM稀释1:1 000), 室温下孵育2 h, 培养皿再次PBS洗3遍待用。

原代混合胶质细胞吸去旧培养液, 培养液洗涤2次。在培养瓶中再加10 mL培养液。在37℃恒温摇床上摇动培养12 h(250 r/min)收集培养瓶中的悬浮细胞, 过滤, 离心5 min(1 200 r/min), 用培养液将细胞团重新制成细胞悬液。

免疫黏附培养皿中加入细胞悬液, 每个平皿约加入细胞数 3×10^6 。37℃孵育45 min, 未黏附的细胞被吸出弃掉, 黏附的细胞用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/12培养基洗脱, 离心10 min(1 000 r/min)。细胞用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/12培养基重悬, 部分细胞甩片后免疫荧光(FITC)鉴定A2B5⁺细胞所占比例, 加入BrdU(溶于培养基经过滤除细菌后), 终浓度10 μmol/L, 加入培养瓶内培养24 h后移植。

移植前细胞吹打离壁, 贴壁细胞用胰酶消化离壁, 体积分数为10%胎牛血清的DMEM/12培养基中止, 离心5 min(1 000 r/min), 少量培养液重悬达到细胞浓度 $1 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$, 利用锥虫蓝拒染率分析移植细胞活性, 留待移植用。

动物分组: 35只Wistar大鼠随机抽取分为5组: 椎板切除组, 脊髓损伤组, Rolipram治疗组, OPCs移植治疗组(简称细胞移植组), OPCs联合Rolipram治疗组(简称联合治疗组), 每组7只。

动物模型制备及治疗: 1%戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉(30 mg/kg), 无菌条件下, 以T₁₀为中心暴露椎管, 显露脊髓硬膜, 利用ALLEN法(10 g/5 cm)打击形成脊髓损伤模型。Rolipram治疗组和联合治疗组在大鼠切口近端颈背部皮下使用止血钳分离皮下结缔组织, 形成小囊腔, 埋置ALZET渗透性微泵(2002型), 流出调节点远离切口, 内装Rolipram 200 μL, 每小时释放0.5 μL, 2 mg/(kg·d), 持续14 d, 第21天手术取出。肌肉、筋膜、皮肤缝合。术后注意保持恒温。术后第7天再次手术, 分别于损伤脊髓中线两侧旁开0.5 mm处, 细胞移植组和联合治疗组以微量注射器注入5 μL OPCs细胞悬液, 进针深度0.5 mm, 细胞总量约 5×10^5 , 注射后5 min退针。Rolipram治疗组和联合治疗组在损伤局部中线两侧注入1 μL 12.5 mmol/L的双丁酸环腺苷酸(db-cAMP); 脊髓损伤组采用同样方法注入等量的生理盐水。术后人工挤压膀胱帮

哈尔滨医科大学附属第一医院, ¹骨科, ³中心实验室, 黑龙江省哈尔滨市 150001; ²哈尔滨医科大学病理教研室, 黑龙江省哈尔滨市 150001

祁全☆, 男, 1972年生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族, 2006年哈尔滨医科大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事脊柱脊髓损伤方面的研究。
qiquan999@sina.com

通讯作者: 毕郑钢, 硕士, 教授, 哈尔滨医科大学附属第一医院骨科, 黑龙江省哈尔滨市 150001
bizhenggang@54dr.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)40-07462-08

收稿日期: 2010-07-21
修回日期: 2010-08-24
(20100721004/M·Q)

助排尿, 2次/d, 到能自行排尿为止。ALZET渗透性微泵在使用21 d后取出。

行为学检测(BBB运动评分): 在伤后5周内每周将动物放入一固定场地, 观察动物的臀、膝、踝关节运动、重力支撑、步态和躯干运动稳定性及协调性、尾的位置等, 根据BBB运动评分法标准^[10], 由熟悉该评分标准的实验人员进行盲法评分。

病理学检测: 处理后4周过量麻醉处死, 切开背部, 打开椎管, 显露脊髓, 切断神经根, 以T₁₀损伤段为中心, 1.5 cm脊髓节段取出, 恒温箱内纵向矢状面冰冻切片, 片厚10 μm, 丙酮固定5 min。切片进行苏木精-伊红染色。

免疫荧光染色: Brdu、NF200利用罗丹明标记二抗免疫荧光染色, GFAP、MBP进行FITC染色。

设计、实施、评估者: 设计、实施为第一、二、三、六作者, 评估为第四、五、七作者, 均经过系统培训。

统计学分析: 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 由第一作者利用SPSS 13.0统计软件(哈尔滨医科大学)进行one-way ANOVA统计学处理, 组间均数比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 大鼠脊髓撞击成功标准为撞击的脊髓组织水肿, 出血, 大鼠尾巴出现痉挛性摆动, 双后肢躯体回缩样扑动, 呈弛缓性瘫痪。伤后爬行两后肢呈拖行, 足背着地。所有损伤动物清醒后BBB运动评分为0分, 非0分者弃用, 补充新鼠。最终35只Wistar大鼠均进入结果分析。

2.2 少突胶质前体细胞的纯化 神经细胞原代培养约9 d 时细胞开始分层, OPCs 呈卵圆形状生长在星形胶质细胞层上, 见图1。



Figure 1 Neural cells begin to delaminate on d 9 of primary culture and oligodendrocyte precursor cells show orbicular-ovate shape and grow on the layer of astrocytes ($\times 200$)

图1 神经细胞原代培养约9 d 时细胞开始分层, OPCs 呈卵圆形状生长在星形胶质细胞层($\times 200$)

振荡分离和免疫黏附法纯化后的少突胶质前体细胞经甩片后免疫荧光鉴定 A2B5⁺细胞约占 94.5%, 见图2; 移植细胞锥虫蓝拒染率约 92.8%。

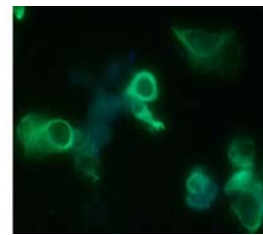


Figure 2 A2B5-positive cells with immune fluorescent marks of FITC under the high power lens ($\times 400$)
图2 高倍镜下FITC免疫荧光标记的A2B5阳性细胞($\times 400$)

2.3 动物行为观察(BBB运动评分) 见表1。

表1 各组 BBB 运动评分结果
Table 1 Results of Basso Beattie and Bresnahan (BBB) movement scale in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

Group	BBB score				
	1 wk	2 wk	3 wk	4 wk	5 wk
Laminectomy	21	21	21	21	21
Spinal cord injury	5.3 $\pm$ 1.0	6.6 $\pm$ 1.3	7.3 $\pm$ 1.3	7.7 $\pm$ 1.3	8.3 $\pm$ 1.4
Rolipram treatment	6.1 $\pm$ 1.7	7.9 $\pm$ 1.3	8.6 $\pm$ 1.4	9.0 $\pm$ 1.1	9.9 $\pm$ 1.1
Cell transplantation	5.3 $\pm$ 0.8	6.4 $\pm$ 1.0	7.4 $\pm$ 1.1	8.0 $\pm$ 1.3	8.4 $\pm$ 1.4
Combination	6.0 $\pm$ 1.6	8.3 $\pm$ 1.1	9.4 $\pm$ 1.5	10.6 $\pm$ 1.9	11.1 $\pm$ 1.8 ^a

^a $P < 0.05$, vs. spinal cord injury and cell transplantation groups

因为第1周末进行细胞移植或注入药物, 所以个别大鼠出现了短时间的评分降低, 但整体未有大的改变。随着时间延长, 各组BBB评分均开始上升, 至术后28 d, 大部分大鼠都有了不同程度的恢复, Rolipram治疗组和联合治疗组动物前后肢的活动明显比脊髓损伤组和细胞移植组协调, 爬行活动较灵活, 恢复行走较快。尤其联合治疗组比Rolipram治疗组效果明显。

2.4 病理学检测

苏木精-伊红染色: 大鼠脊髓纵向切片上, 术后4周各组脊髓不同程度变细, 脊髓损伤组和Rolipram治疗组脊髓组织结构杂乱, 呈网状, 连续性欠缺, 其中含数量、大小不等的空洞, 见图3~5。细胞移植组和联合治疗组蛋白质结构损伤处, 相对致密, 存在少量小的空洞, 见图6, 7。



Figure 3 Normal spinal cord in laminectomy group ($\times 200$)
图3 椎板切除组正常脊髓($\times 200$)

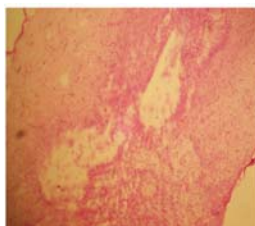


Figure 4 In spinal cord injury group, the denaturation of spinal cord is quite serious and the structure of the gray matter and white matter is loose and vacant with few axons ($\times 40$)

图4 脊髓损伤组脊髓变性较严重, 脊髓灰白质结构松散, 空洞, 轴突少($\times 40$)

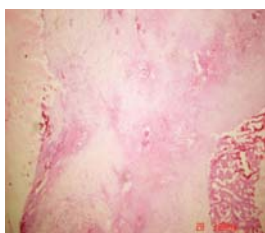


Figure 5 In Rolipram treatment group, the capsular space is unseen and cicatrix hyperplasia is apparent without axons ($\times 40$)

图5 Rolipram 治疗组未见明显囊腔, 瘢痕增生明显, 未见轴突($\times 40$)

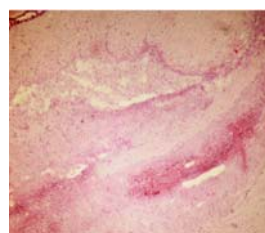


Figure 6 In cell transplantation group, obvious repair of spinal cord cavity, without capsular space, with a few cicatrix tissues, obvious marginal vessel hyperplasia ($\times 100$)

图6 细胞移植组脊髓空洞修复明显, 未见囊腔, 可见少量瘢痕组织, 边缘血管增生明显($\times 100$)

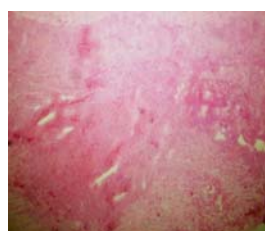


Figure 7 In combination group, without capsular cavity and injury margins, with a few cicatrix tissues, apparent hyperplasia of nerve fibers and blood vessels, ruptures caused by newborn axons ($\times 200$)

图7 联合治疗组未见囊腔及损伤边缘, 可见较少的瘢痕组织, 神经纤维和血管增生明显, 新生轴突穿过断面($\times 200$)

NF-200免疫荧光: NF-200的表现可以看出神经元和轴突的走行及分布, 见图8。

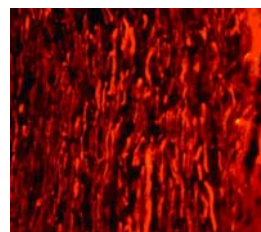


Figure 8 Normal spinal cord in laminectomy in group ($\times 400$)

图8 椎板切除组正常脊髓($\times 400$)

在脊髓损伤组和细胞移植组损伤中心NF密度低, 杂乱无序排列, 未见有NF伸入损伤空洞, 见图9, 10。

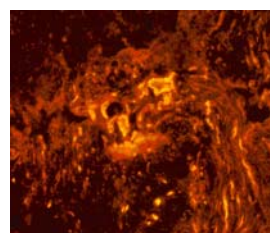


Figure 9 In spinal cord injury group, NF density of the injured center is low and arrayed in disorder, and cavity being injured by NF is not visible ($\times 200$)

图9 脊髓损伤组损伤中心 NF 密度低, 杂乱无序排列, 未见有 NF 伸入损伤空洞($\times 200$)

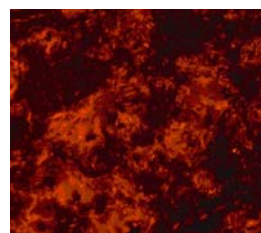


Figure 10 In cell transplantation group, NF density of the injured center is low and is arrayed in disorder, and cavity being injured by NF is not observed ($\times 400$)

图10 细胞移植组损伤中心 NF 密度低, 杂乱无序排列, 未见有 NF 伸入损伤空洞($\times 400$)

Rolipram治疗组神经纤维密度高, 形状不规则, 分布杂乱, 部分阳性纤维穿过损伤及移植区, 有些纤维沿损伤区边缘向尾端延伸, 见图11, 12。

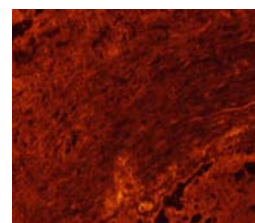


Figure 11 In Rolipram treatment group, the density of neural tissues is high with irregular shapes and disorderly array, and some positive tissues come through injury and the transplanted zone ($\times 100$)

图11 Rolipram 治疗组神经纤维密度高, 形状不规则, 分布杂乱, 部分阳性纤维穿过损伤及移植区($\times 100$)

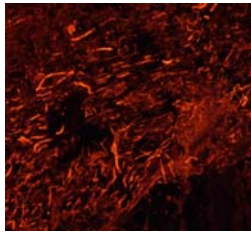


Figure 12 In combination group, the density of neural tissues is high with irregular shapes and disorderly array, some positive tissues come through injury and the transplanted zone, and some tissues extend towards the end along the injured zone ($\times 200$)

图 12 联合治疗组神经纤维密度高, 形状不规则, 分布杂乱, 部分阳性纤维穿过损伤及移植物区, 有些纤维沿损伤区边缘向尾端延伸($\times 200$)

MBP 与 Brdu 免疫荧光双染: Brdu 整合在 OPCs 细胞核中, 罗丹明标记的二抗显示红色, 联合治疗组可见到较多存活的阳性细胞, 见图 13; 细胞移植组单纯 OPCs 移植阳性细胞相对较少, 见图 14, OPCs 多被 FITC 标记(绿色)的 MBP 阳性胞质所包绕。

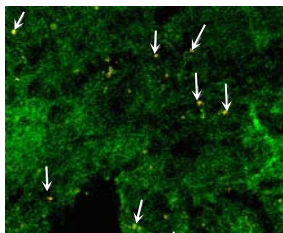


Figure 13 In combination group, many living positive cells were seen (white arrows) ($\times 200$)

图 13 联合治疗组可见到较多存活的阳性细胞(白箭头)($\times 200$)

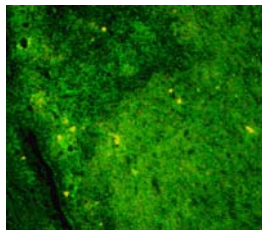


Figure 14 In cell transplantation group, relatively few simply oligodendrocyte precursor cells transplanted positive cells ($\times 200$)

图 14 细胞移植组单纯 OPCs 移植阳性细胞相对较少($\times 200$)

MBP 与 NF-200 免疫荧光双染: MBP 及 NF-200 免疫荧光染色能够反映轴突和髓鞘关系及损伤和修复的情况, 见图 15。各组损伤区均可见破碎的排列混乱的 MBP 阳性物质, 脊髓损伤组和细胞移植组有髓神经纤维少, 可见损伤区边缘残存白质中脱髓鞘的神经纤维和尚未完全崩解的髓鞘, 见图 16。Rolipram 治疗组和联合治疗组可见围绕损伤中心部分很多 NF-200 阳性纤维绕过空洞在残存白质中向下走行, 见图 17。同时各组均有一些切片可看到损伤边缘保留少许白质含残存的有髓纤维沿脊髓长轴走行, 见图 18。

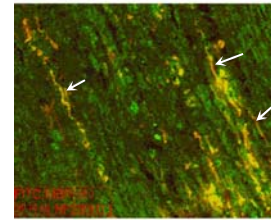


Figure 15 In the laminectomy group, the immune fluorescence neurofilament protein-200 (red) and myelin basic protein (green) double dyeing make more medullated neural tissues appear in white matters ($\times 200$)

图 15 椎板切除组 NF200(红)和 MBP(绿)免疫荧光双染可见较多有髓神经纤维在白质中($\times 200$)

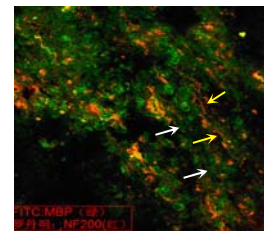
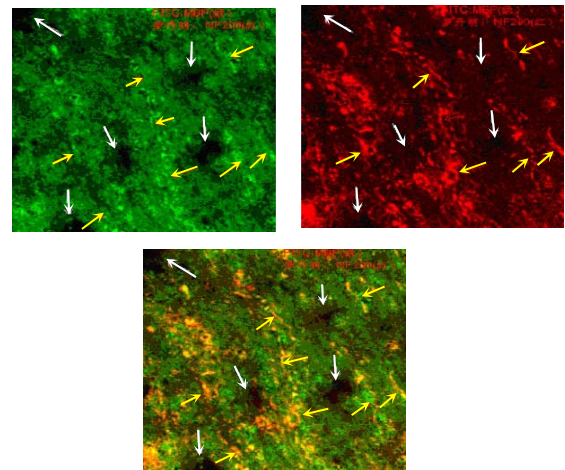


Figure 16 In spinal cord injury group the immune fluorescence neurofilament protein-200 (red) and myelin basic protein (green) double dyeing, the margins of injured center remain in the white matters, demyelinated neural tissues (yellow arrows) and not completely disintegrated medullary sheath (white arrows) ($\times 100$)

图 16 脊髓损伤组 NF200(红)和 MBP(绿)免疫荧光双染: 损伤中心边缘残存白质中, 脱髓鞘的神经纤维(黄箭头)和尚未完全崩解的髓鞘(白箭头)($\times 100$)



Under laser confocal microscopy, (ZEISS MET510), in the same visual field, two kinds of wave length (543/488) were used; the laser aroused red and green fluorescence separately; Left top: fluorescein isothiocyanat e-labeled myelin basic protein; Right upper: Rhodamine-labeled neurofilament protein-200; Left lower: coincidence

Figure 17 In combination group, the immune fluorescence neurofilament protein-200 (NF-200) (red) and myelin basic protein (green) double dyeing make the movement of many positive fibers NF-200 (yellow arrows) in the remaining white matters bypassing the cavity (white arrows) seen ($\times 200$)

图 17 联合治疗组 NF200(红)和 MBP(绿)免疫荧光双染可见在损伤中心很多 NF-200 阳性纤维(黄箭头)绕过空洞(白箭头)在残存白质中向下走行($\times 200$)

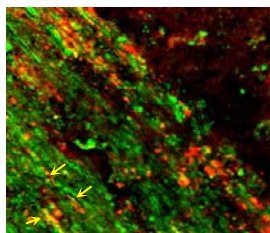


Figure 18 In cell transplantation group the immune fluorescence neurofilament protein-200 (NF200) (red) and myelin basic protein (green) double dyeing, the positive fibers NF200 (yellow arrows) of the retained part of injured margins of the sections are moving in the remaining white matters ($\times 200$)

图 18 细胞移植组 NF200(红)和 MBP(绿)免疫荧光双染:切片可见在损伤边缘保留部分 NF200 阳性纤维(黄箭头)在残存白质中向下走行($\times 200$)

3 讨论

3.1 环磷腺苷提高了轴突的再生能力, 克服髓磷脂抑制作用 本实验中合并局部使用双丁酸环腺苷酸(dp-cAMP)(一种环磷腺苷的类似物, 具有膜穿透性), 进一步提高环磷腺苷水平, 并利用渗透性微泵持续皮下输注Rolipram, 这一方法已被证实可以将中枢神经系统中环磷腺苷维持在较高水平^[11]。

环磷腺苷处理组(Rolipram治疗组和联合治疗组)损伤区可以见到明显的NF200阳性表达大量聚集, 而对对照组表达相对弱, 提示轴突再生能力或可塑性增强, 与其运动功能评分及MEP潜伏期的表现相一致, 明显促进了大鼠脊髓损伤后的康复。有动物脊髓损伤实验显示环磷腺苷单独使用时损伤轴突可以长入损伤区, 但不能超越, 而环磷腺苷和神经营养因子3联合应用促使轴突超越损伤区, 说明提高环磷腺苷克服髓磷脂抑制作用可能至少一部分原因是促进了神经元对营养因子或多肽类信号的反应^[12]。

体内环磷腺苷能被许多信号途径激活, 包括细胞黏附分子、 Ca^{2+} 、神经递质、神经调节剂^[13-15]。这些基因转录和信号转导途径仍需要进一步探寻, 从中发现治疗的线索。

3.2 选择OPCs细胞移植的意义 一方面脊髓损伤后存在相当数量的幸存白质纤维, 即使更严重的损伤, 也会在软膜下残存少许纤细的轴突^[16-17]。这些传导束中的很多可能会由于炎症反应和少突胶质细胞凋亡而脱髓鞘^[18], 郎飞节节间部电压门控性钾通道的暴露导致动作电位的传导中断, 这是脊髓损伤的一个突出特点, 也是其造成严重后果的原因之一^[19-20]。因此, 再髓鞘化会促进动作电位的传导, 功能的康复。

另一方面, 细胞移植的中心意义是为损伤裂隙提供区域细胞地带的桥接, 改善轴突周围的内环境, 以期达

到理想的轴突再生, 重建传导路恢复功能^[21-22]。而局部重建平衡的胶质网络对于神经传导的正常功能也是必要的。星形细胞的增殖是损伤后自发形成的, 移植增加少突胶质细胞对于重建平衡可能是有利的。

根据这样两方面的原因, 课题组提高环磷腺苷的同时选择了具有迁移性、增殖性和髓鞘形成能力的OPCs细胞移植实验, OPCs也可以释放神经营养因子促进神经元生存和轴突生长^[23]。结果令人兴奋, Brdu荧光染色显示细胞移植组和联合治疗组在移植后4周, 均显示出细胞核染色阳性的细胞, 在联合治疗组的表现尤为明显, 并通过MBP与Brdu免疫荧光双染证实了细胞核周围表达MBP, 成为成熟的少突胶质细胞。然而, 实验中并未发现移植细胞的长距离迁移, 可能与成熟的少突胶质细胞诱导突触的塌陷和运动功能的丧失, 阻止OPCs的有效迁移有关。细胞移植组的空洞小于非移植组, 组织相对致密, 提示OPCs起到了填充空洞的作用, 为神经轴突通过损伤区提供了潜在条件。

值得注意的是在移植过程中, 操作小心而谨慎, 微量注射器缓慢注射5 μL 液体, 但依然出现了个别大鼠运动功能的减退, 可能是脊髓损伤后残存的传导束使得危险和利益成为潜在的矛盾。在任何侵袭性治疗脊髓损伤的临床试验设计中必须考虑解剖学和功能上的关系。越多的轴突保留意味着更多恢复的潜在机会, 也意味着越大的外科风险。

3.3 环磷腺苷促进了移植的OPCs存活 单纯OPCs移植组, 虽然发现少量细胞可以存活, 但在各方面检测中均未发现明显的促进作用。而联合治疗组可见到较多的阳性细胞。

其原因可能有3方面: ①损伤后局部继发性变化导致内环境紊乱, 包括局部血流变化、自由基产生、兴奋性氨基酸中毒、炎症、细胞凋亡等, 不利于细胞的存活^[24-25], Rolipram对脊髓的保护作用有可能对局部产生有益的影响。②Barres等^[26]研究证实在大鼠视神经发育过程中约50%少突胶质细胞正常死亡, 凋亡发生过程中使得轴突匹配并减少过剩少突胶质细胞, 与轴突接触的细胞得以存活并髓鞘化, 这竞争营养的学说可以解释单纯细胞移植组的结果, 那么如果用提高神经元环磷腺苷水平促进其内在生长能力, 再生轴突周围可能产生某些营养信号肽促进了OPCs的存活并形成髓鞘来解释提高环磷腺苷水平后存活细胞增加的结果, 似乎也有道理。③有体外实验证实通过联合IBMX和forskolin提高OPCs胞内环磷腺苷水平, OPCs被刺激加速分裂增殖^[27]。

3.4 环磷腺苷与OPCs移植产生协同促进作用 本实验将OPCs移植作为环磷腺苷治疗内容中的一个部分, 发现环磷腺苷与OPCs移植联合促进功能恢复的效果超过了其他损伤组。MBP和Brdu荧光双染显示说明OPCs

胞体内具有定向分化成少突胶质细胞的能力并且成为髓磷脂的一部分。这意味着环磷腺苷与OPCs移植产生协同促进作用,可能机制如下:环磷腺苷促进了移植的OPCs的存活,同时提高了神经元对周围营养信号的反应能力^[28-29];而移植的幼稚的OPCs可能改善了轴突周围的局部环境,分泌胶质细胞源性神经营养因子等,给予神经元很大的促进作用,并进一步形成髓鞘,无论对于脱髓鞘的残余轴突,还是新生轴突可能都产生了有益的影响。联合治疗组MBP与NF-200免疫荧光双染所见残余白质中的有髓神经纤维的增多可能与此有关。

虽然各组均未得到再生轴突穿过损伤中心到达对侧的直接证据,但Rolipram治疗组和联合治疗组瘢痕中广泛的NF200阳性表达的轴突提供了间接证据,这一结果尚有待于通过大鼠脊髓横断模型进一步研究。尽管脊髓损伤研究的目的通常是大范围的长距离轴突再生,它无疑是由病理学、影像学和神经电生理所定义的最理想的和最合理的治疗标准。可这并不一定是必需的,因为大多数情况都会保留部分上行和下行传导束(正如本实验所见)。

事实上,在动物和人脊髓损伤后如果保留10%~15%的白质即可得到相对明显的功能保留^[30]。这提示小数量轴突的再生即可能提供有意义的功能恢复,也说明如果使残余白质中因脱髓鞘而失去功能的轴突再髓鞘化,可能会有一定程度的恢复。

尽管损伤的中枢神经系统自身存在少许再髓鞘化的能力,但更多的例子显示再髓鞘化是失败的和不彻底的。经过移植OPCs的联合治疗组的功能恢复较快一部分原因可能是对残余皮质中因脱髓鞘而失去功能的轴突再髓鞘化。

3.5 损伤脊髓“幼稚化”的尝试 内源性环磷腺苷水平调解着神经元对中枢神经系统环境的反应,幼稚神经元环磷腺苷水平高并随着发育成熟而下降,伴随发生的是神经元再生能力的逐渐消失。作者通过药物手段(PDE4抑制剂和db-cAMP)还原成熟中枢神经系统神经元环磷腺苷至幼稚阶段水平,同时轴突生长锥周围移植与轴突联系最为紧密的幼稚的OPCs,得到了肯定的答案。

这种初步的相对简单的实验正在尝试着一个全新的理念:通过多方面手段,重新“幼稚化”损伤神经元自身及周围环境,创造类似胚胎期的幼稚状态,达到促进轴突再生的目的。

这种新的构思需要对胚胎期神经发育进行进一步更彻底的研究,详细了解细胞间相互依存的关系及各种细胞因子意义等,每当这些基础研究有新的发现,都会对构建“损伤脊髓环境幼稚化”这一理念进行补充,据此才有可能利用一系列方法的联合,寻求脊髓损伤治疗的突破。本实验进一步证实了多种方法联合治疗脊髓损伤是未来取得突破的重要方向。

4 参考文献

- [1] Blesch A, Tuszynski MH. Transient growth factor delivery sustains regenerated axons after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2007;27(39):10535-10545.
- [2] Fenrich KK, Rose PK. Spinal interneuron axons spontaneously regenerate after spinal cord injury in the adult feline. *J Neurosci*. 2009;29(39):12145-12158.
- [3] Albert T, Ravaud JF; Tetragap group. Rehabilitation of spinal cord injury in France: a nationwide multicentre study of incidence and regional disparities. *Spinal Cord*. 2005;43(6):357-365.
- [4] Cai D, Shen Y, De Bellard M, et al. Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron*. 1999;22(1):89-101.
- [5] Bregman BS, McAtee M, Dai HN, et al. Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat. *Exp Neurol*. 1997;148(2):475-494.
- [6] Lu P, Yang H, Jones LL, et al. Combinatorial therapy with neurotrophins and cAMP promotes axonal regeneration beyond sites of spinal cord injury. *J Neurosci*. 2004;24(28):6402-6409.
- [7] Qi Q, Bi ZG, Zhang L, et al. Zhongguo Jizhu Jisui Zazhi. 2008;18(10):766-770.
祁全, 毕郑钢, 张磊, 等. Rolipram 对大鼠急性脊髓损伤的保护作用[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2008, 18(10):766-770.
- [8] Pearse DD, Pereira FC, Marcillo AE, et al. cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *Nat Med*. 2004;10(6):610-616.
- [9] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals. 1988-10-31.
国家科委. 实验动物管理条例. 1988-10-31.
- [10] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995;12(1):1-21.
- [11] Johnson JR, Chu AK, Sato-Bigbee C. Possible role of CREB in the stimulation of oligodendrocyte precursor cell proliferation by neurotrophin-3. *J Neurochem*. 2000;74(4):1409-1417.
- [12] Qi Q, Bi ZG, Gao HL, et al. Zhonghua Xianwei Waik Zazhi. 2005;28(6):248-250.
祁全, 毕郑钢, 高宏雷, 等. 洛立普兰口服髓鞘脂轴突生长抑制作用的实验研究[J]. 中华显微外科杂志, 2005, 28(6):248-250.
- [13] Hannila SS, Filbin MT. The role of cyclic AMP signaling in promoting axonal regeneration after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2008;209(2):321-332.
- [14] Douglas MR, Morrison KC, Jacques SJ, et al. Off-target effects of epidermal growth factor receptor antagonists mediate retinal ganglion cell disinhibited axon growth. *Brain*. 2009;132(Pt 11):3102-3121.
- [15] Nishiyama M, Hoshino A, Tsai L, et al. Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature*. 2003;423(6943):990-995.
- [16] Kanellopoulos GK, Xu XM, Hsu CY, et al. White matter injury in spinal cord ischemia: protection by AMPA/kainate glutamate receptor antagonism. *Stroke*. 2000;31(8):1945-1952.
- [17] Rosenberg LJ, Teng YD, Wrathall JR. Effects of the sodium channel blocker tetrodotoxin on acute white matter pathology after experimental contusive spinal cord injury. *J Neurosci*. 1999;19(14):6122-6133.
- [18] Park SK, Miller R, Krane I, et al. The erbB2 gene is required for the development of terminally differentiated spinal cord oligodendrocytes. *J Cell Biol*. 2001;154(6):1245-1258.
- [19] Eftekharpour E, Karimi-Abdolrezaee S, Wang J, et al. Myelination of congenitally dysmyelinated spinal cord axons by adult neural precursor cells results in formation of nodes of Ranvier and improved axonal conduction. *J Neurosci*. 2007;27(13):3416-3428.
- [20] Black JA, Waxman SG, Smith KJ. Remyelination of dorsal column axons by endogenous Schwann cells restores the normal pattern of Nav1.6 and Kv1.2 at nodes of Ranvier. *Brain*. 2006;129(Pt 5):1319-1329.
- [21] Chen J, Li Y, Chopp M. Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAo in rat. *Neuropharmacology*. 2000;39(5):711-716.
- [22] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2001;32(4):1005-1011.
- [23] Wilkins A, Majed H, Layfield R, et al. Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 2003;23(12):4967-4974.

- [24] Byrnes KR, Stoica BA, Fricke S, et al. Cell cycle activation contributes to post-mitotic cell death and secondary damage after spinal cord injury. *Brain*. 2007;130(Pt 11):2977-2992.
- [25] Mautes AE, Weinzierl MR, Donovan F, et al. Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis. *Phys Ther*. 2000;80(7):673-687.
- [26] Barres BA, Hart IK, Coles HS, et al. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*. 1992;70(1):31-46.
- [27] Nikulina E, Tidwell JL, Dai HN, et al. The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(23):8786-8790.
- [28] Cai D, Qiu J, Cao Z, et al. Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J Neurosci*. 2001;21(13):4731-4739.
- [29] Gao Y, Nikulina E, Mellado W, et al. Neurotrophins elevate cAMP to reach a threshold required to overcome inhibition by MAG through extracellular signal-regulated kinase-dependent inhibition of phosphodiesterase. *J Neurosci*. 2003;23(37):11770-11777.
- [30] Raineteau O, Schwab ME. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(4):263-273.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 黑龙江省青年基金资助项目(QC06C073); 黑龙江省卫生厅基金资助项目(2006-078); 黑龙江省教育厅基金资助项目(10551170); 黑龙江省博士后资助项目; 哈医大一院科研基金资助项目(2007037)。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 对于少突胶质前体细胞

的研究近年来受到人们的重视, Rolipram 也是中枢神经再生研究中最重要进展之一, 尚未见两者联合治疗脊髓损伤实验研究。从最新理论上讲, 两者联合有望应用于临床且存在成功治疗脊髓损伤的可能性, 具有突破性意义, 并初步揭示 cAMP 在神经元与胶质细胞相互信号影响作用的内在机制。

课题的偏倚与不足: 目前 cAMP 对于少突胶质细胞分化及其分子信号通路的作用机制尚未明确, 本实验初步探索了这一崭新

领域, 但其内在奥秘仍有待下一步工作继续研究探讨。

提供临床借鉴的价值: 通过细胞水平实验和动物实验证实 Rolipram 与少突胶质前体细胞移植联合对脊髓损伤具有一定保护作用, 对神经元轴突再生存在一定程度的促进作用, 以及 cAMP 对神经再生的影响, 初步探讨了其可能的内在机制; 并为未来进一步开发临床新型药物打下了理论和实验基础。



ISSN 1673-8225 CN 21-1539/R 2010 年版权归《中国组织工程研究与临床康复》杂志社所有

外国专家修饰的医学英语句型: 本刊英文部

中文	修饰前	修饰后
核磁共振影像学检查提示脑白质非对称性 T2 长信号	Magnetic resonance image indicated that high signals of T2-weighted image .	Magnetic resonance imaging demonstrated high T2-weighted signals .
患儿无神经系统疾病病史及相关家族史。	Previously, she had no history of nervous system disease or family history.	The patient and her family had no previous history of nervous system disease.
患儿体温恢复正常	Her temperature dropped to normal .	Body temperature returned to normal levels .
可以进食	She could take food .	The patient was able to eat .
大鼠未损毁侧(左侧)STN 神经元成条带状分布, 尼氏体清晰, 着色深且均匀。大鼠损毁侧 STN 神经元数目显著减少, 尼氏体模糊, 着色较浅。	The STN neurons in the control side of Parkinson's disease rats distributed as stripped cluster , with clear Nissl body and dark stained color; whereas the number of the STN neurons in the lesion side of Parkinson's disease rats was significantly decreased, with the presence of vague Nissl body and light stained color.	STN neurons in the control hemisphere of the PD rats were distributed in a cluster, contained clear Nissl bodies , and were darkly stained. In contrast , the number of STN neurons in the lesion hemisphere significantly decreased, the Nissl bodies were vague, and the cells were lightly stained.