

嗅鞘细胞移植损伤脊髓组织的超微结构变化*★

刘晓阳, 孙建民, 崔新刚, 蒋振松

Ultrastructure of injured spinal cord following olfactory ensheathing cells transplantation

Liu Xiao-yang, Sun Jian-min, Cui Xin-gang, Jiang Zhen-song

Abstract

BACKGROUND: Neural function automatically recovers a little after spinal cord injury. Because of the capacity of myelination belonging to both peripheral and central glial cells, olfactory ensheathing cells (OECs) become the most promising cells for repairing damaged nerves. The histological and ultrastructural changes of spinal cord after OECs grafting may help to explain the mechanism of neural restoration.

OBJECTIVE: To assess the effect of transplantation of OECs originating from the olfactory bulbs to repair spinal cord injury, and explore the influence of grafted OECs on histology and ultrastructure of neurons and axons.

METHODS: Wistar rat models were randomly divided into three groups: the control group (group A, no treatment), DMEM/F12 group (group B, administrated with DMEM/F12 medium) and the OECs group (group C, treated with OEC suspension). The Basso, Beattie and Bresnahan locomotor rating scale (BBB) was observed each week. Histological changes and immunohistochemical staining were observed 8 weeks later. Reparation of spinal cord injury was assessed. Effects of OEC transplantation on spinal cord tissue and ultrastructure were observed.

RESULTS AND CONCLUSION: The posterior limb motor function was recovered in three groups. The BBB grade of groups C was higher than that of group A and group B, especially in the last 4 weeks post operation. Histology revealed that both stumps were connected by nerve fibers through the injury site in group C. Less damage of nerve fibers and neurons at the vicinity of damage site was observed in group C than that in group A and group B. The percentage of caspase-3 positive cells in group C was smaller than that in group A and group B. The ultrastructure showed that morphology of fiber and neuron in group C was better than that in groups A and B. Results suggest that transplantation of OECs has significant promotory effects on restoration of spinal cord injury in the rat, and can improve part function of nerve fibers and shows neuroprotection on neurons and nerve fibers.

Liu XY, Sun JM, Cui XG, Jiang ZS. Ultrastructure of injured spinal cord following olfactory ensheathing cells transplantation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(49): 9167-9171. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 脊髓损伤后神经功能难以自行恢复, 嗅鞘细胞具有外周性和中枢性两种胶质细胞的成鞘功能, 是修复受损神经最有前途的种子细胞。嗅鞘细胞移植到受损脊髓后的组织学和超微结构的变化可能帮助解释嗅鞘细胞发挥修复作用的机制。

目的: 验证嗅球源性嗅鞘细胞移植对脊髓损伤功能恢复的促进作用, 并观察移植的嗅鞘细胞对神经元和轴突组织和超微结构的影响。

方法: 将已制备脊髓模型的 Wistar 大鼠随机分为 3 组, 对照组不做任何注射操作, DMEM/F12 组注射 DMEM/F12 培养基, 嗅鞘细胞组注射嗅鞘细胞悬液。每周进行肢体活动 BBB 评分, 8 周后取脊髓标本进行组织学和免疫组织化学观察, 评价脊髓损伤的修复情况, 并观察嗅鞘细胞移植对脊髓组织和超微结构的影响。

结果与结论: 3 组动物均出现后肢运动功能的恢复, 嗅鞘细胞组优于对照组和 DMEM/F12 组, 在 4 周后更为明显。组织学观察可见, 在嗅鞘细胞组可见有神经纤维通过损伤处。损伤处附近, 嗅鞘细胞组脊髓腹侧的神经纤维和神经元形态较好, 损伤较轻。而对照组和 DMEM/F12 组神经纤维和神经元损害严重。嗅鞘细胞组的 caspase-3 阳性细胞数少于对照组和 DMEM/F12 组。超微结构观察可见, 嗅鞘细胞组的神经纤维和细胞形态均优于对照组和 DMEM/F12 组。结果表明嗅鞘细胞移植对大鼠脊髓损伤修复有明显的促进作用, 并可恢复损伤神经的部分功能, 对受损神经纤维和神经元有保护作用。

关键词: 嗅鞘细胞; 大鼠; 移植; 脊髓损伤; 组织; 超微结构

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.49.011

刘晓阳, 孙建民, 崔新刚, 蒋振松. 嗅鞘细胞移植损伤脊髓组织的超微结构变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(49):9167-9171. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

脊髓损伤后可引起细胞的坏死和神经纤维的断裂, 而原发性损害引起的继发性退变包括电解质紊乱, 脂质过氧化, 谷氨酸的释放, 炎症反应过程, 血液流变学异常和缺血等^[1]。这一继发性损害过程持续数天或数周, 加重细胞死

亡和神经纤维受损的程度, 严重影响轴突的再生和神经功能的恢复。目前很多实验研究重在通过阻断继发性损害来促进脊髓功能的恢复。基于损伤引起的神经传导功能丧失是运动功能障碍的主要原因, 促进受损神经修复和再生以达到神经功能的恢复成为治疗脊髓损伤的最佳选择。抑制脱髓鞘和胶质瘢痕的形成, 补充外源性营养因子和细胞移植成为主要的治疗措施。

Department of Spinal Surgery, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China

Liu Xiao-yang, Studying for master's degree, Department of Spinal Surgery, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China
shuilanwenqing@163.com

Correspondence to: Sun Jian-min, Doctor, Chief physician, Department of Spinal Surgery, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China
spine163@163.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Shandong Province, No. Y2007C010

Received: 2010-07-05
Accepted: 2010-08-05

山东大学附属省立医院脊柱外科, 山东省济南市 250021

刘晓阳★, 男, 1984 年生, 山东省青州市人, 汉族, 在读硕士, 主要从事脊髓损伤修复的研究。
shuilanwenqing@163.com

通讯作者: 孙建民, 博士, 主任医师, 山东大学附属省立医院脊柱外科, 山东省济南市 250021
spine163@163.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)49-09167-05

收稿日期: 2010-07-05
修回日期: 2010-08-05
(20100705012/M·Q)

许多实验已经证实嗅鞘细胞移植可以对部分横断脊髓产生神经保护作用, 促进轴突再生和功能的恢复^[2-3], 而且在完全横断脊髓损伤模型中也观察到了轻微的神经营养恢复^[4]。因此嗅鞘细胞是治疗脊髓损伤的理想种子细胞^[5-6]。本实验主要观察嗅鞘细胞移植在脊髓损伤中的神经保护修复作用, 以及对神经超微结构的影响。

1 材料和方法

设计: 随机区组实验设计。

时间及地点: 实验于2009-03/2010-02在山东大学附属省立医院动物实验中心和中心实验室进行。

材料:

实验动物: 新生两三天的Wistar大鼠12只, 成年雌性Wistar大鼠45只, 体质量200~250 g, 购自山东大学动物实验中心。实验过程中对动物的处置参照国家科学技术部2006年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[7]。

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM-F12 培养基、胎牛血清	Hyclone 公司
多聚左旋赖氨酸、神经生长因子	R&D Systems Inc., USA
兔抗大鼠低亲和力神经生长因子受体 NGFRp75	Abcam 公司
阿糖胞苷(Ara-c)	上海华联制药有限公司
青/链霉素	石药集团
兔抗 caspase-3 单克隆抗体	武汉博士德生物公司
SABC 即用型免疫组化试剂盒、DAB 显色剂	武汉博士德生物公司
HERA cell 二氧化碳培养箱	德国 Heraeus 公司
解剖显微镜	德国 Zeiss 公司
IX71 倒置相差显微镜	日本 OLYMPUS 公司

实验方法:

新生大鼠嗅球细胞的分离纯化培养: 取两三天的新生Wistar大鼠12只, 体积分数为75%乙醇浸泡消毒30 s, 无菌条件下切开头皮和颅骨, 暴露大脑前方的嗅球, 仔细操作完整取下双侧嗅球, 置于冰上已加冷D-hanks缓冲液的培养皿中, 解剖显微镜下用显微镊仔细剥除嗅球表面的软脑膜及血管网, 将嗅神经层和嗅小球层剥下置于加DMEM-F12培养基的青霉素小瓶中, 眼科剪将组织剪成0.5 mm×0.5 mm×0.5 mm大小, 加入0.25%胰蛋白酶, 37 °C孵育箱孵育15~20 min。加入含体积分数为10%胎牛血清的DMEM-F12培养基 1 mL终止消化。将消化后的组织液用150目钢网滤过, 不断用玻璃棒研磨和DMEM-F12冲洗, 将滤液1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 加入含体积分数为20%胎牛血清、20 g/L的牛垂体提取物、25 μg/L神经生长因子的DMEM-F12培养基

3.5 mL, 火焰抛光的吸管轻轻吹打数次, 成为单细胞悬液, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 均匀加入6 cm培养皿中, 2 d后吸取上清重新接种已用多聚左旋赖氨酸处理的25 cm²培养瓶中, 48 h后观察到成纤维细胞即将生长的时候换用含10 mg/L阿糖胞苷的完全培养基继续培养24 h, 然后换完全培养基培养。隔日半量换液一次。每日镜下观察细胞变化并记录。

脊髓损伤模型的制备: 成年雌性Wistar大鼠45只, 体质量200~250 g, 10%的水合氯醛腹腔注射麻醉动物(30 mg/kg)。背部中线切开皮肤以及软组织, 在T₁₀水平分离背阔肌, 切除棘突。后路腰椎板切除术暴露硬脊膜。动物固定在NYU机械损伤仪器上, 打击质量为10 g, 高度为10 cm。损伤部位停留1 s, 确保不完全挫伤。此时出现下肢痉挛和抽搐现象, 证明脊髓损伤成功。常规缝合肌肉和软组织, 结束手术过程。术后每日人工排尿两次, 直至膀胱自主排尿功能恢复。

实验动物分组: 将45只脊髓挫伤的Wistar大鼠随机分为3组, 每组15只, ①对照组, 不做任何注射操作。②DMEM/F12组, 脊髓损伤后第1天在距离损伤处头尾端各0.5 mm处, 中线旁开0.5 mm处进行4点注射。进针深度为1 mm。每点注射DMEM/F12培养基2.5 μL。③嗅鞘细胞组, 术后1 d进行嗅鞘细胞移植。注射时调整细胞浓度为 $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$, 在距离损伤处头尾端各0.5 mm处, 中线旁开0.5 mm处进针1 mm。每点注射嗅鞘细胞悬液2.5 μL。两组的注射速度为均1 μL/min, 每点注射完毕后停针半分钟。术前和术后每周同一时间进行两次BBB行为评分。

组织学观察: 术后8周, 灌注后将脊髓完全取出, 切取损伤区及其相邻远近端脊髓, 标记远近端及前后面。用40 g/L的多聚甲醛溶液固定过夜, 取出后手术显微镜下剥去硬膜。常规石蜡包埋、连续纵切片, 切片厚度为5 μm。各组损伤区纵切面切片分别行苏木精-伊红染色、免疫组化染色, 观察组织增生和腹侧的残存神经纤维和神经元的形态及凋亡情况。

电镜观察: 术后8周, 每组3只动物进行透射电镜观察。取材区域包括脊髓损伤处及其两断端, 先后行2%的戊二醛和1%的锇酸固定, 环氧树脂包埋。半薄切片甲苯胺蓝定位染色, 取损伤处两断端之间腹侧的神经纤维和细胞区进行超薄切片, JEM-100SX透射电镜观察超微结构的变化。

主要观察指标: BBB行为评分, 苏木精-伊红染色观察脊髓的组织学改变, 免疫组化观察神经元中caspase-3的表达, 透射电镜观察细胞和轴突的超微结构改变。

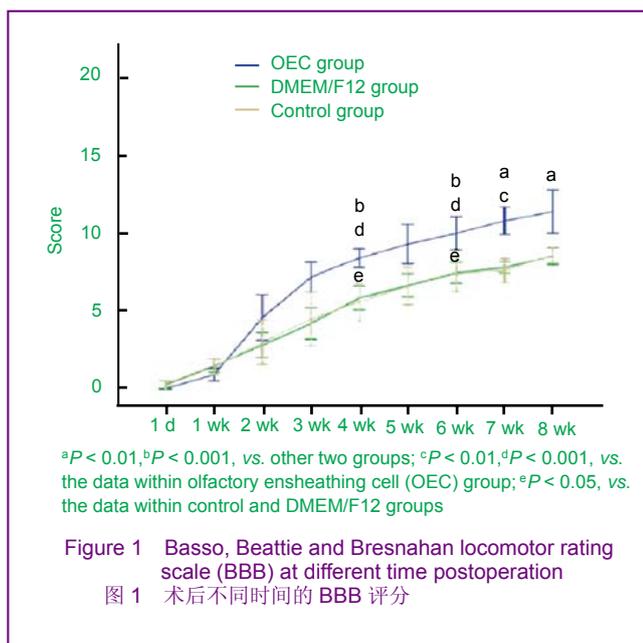
设计、实施、评估者: 设计为第二作者, 实施为第一作者, 资料整理和收集为第三作者, 评估为第四作者, 采用双盲法对实验结果进行评估。

统计学分析: 应用SPSS 16.0统计软件进行处理分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。BBB评分组内比较采用配对 t 检验, 将术后8周BBB评分与术后4, 6, 7周BBB评分比较, 判断行为恢复情况。其他数据的组间比较采用两样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

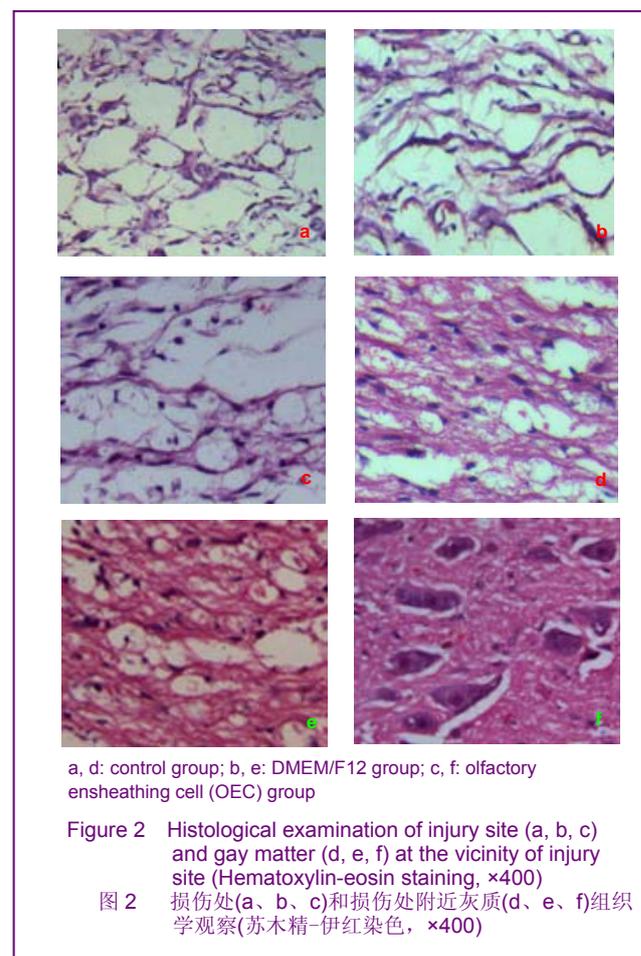
2.1 实验动物数量分析 实验采用45只Wistar大鼠, 术前和术后每天观察大鼠活动及饮食情况。对照组1只死于麻醉意外, 1只大鼠于术后3周死于肠梗阻, DMEM/F12组1只于术后2周死于肠梗阻, 1只死于刀口感染, 嗅鞘细胞组1只大鼠于术后1周出现自残倾向。以上5只大鼠从实验中剔除。对照组和DMEM/F12组各13只, 嗅鞘细胞组14只大鼠完成实验。

2.2 行为评分 手术前对大鼠进行行为评分, 所有大鼠均得到21分。术后1 d行为观察显示所有动物评分均未超过1分。对照组10只、DMEM/F12组9只和嗅鞘细胞组9只评分为0分, 即双下肢无活动, 证明手术成功。对照组和DMEM/F12组各时间点组间比较差异均无显著性意义($P > 0.05$)。在损伤后4周时间里, 3组的行为评分都显示逐渐提高, 但嗅鞘细胞组恢复的更快。术后4, 6, 7, 8周同一时间点, 嗅鞘细胞组的评分明显高于DMEM/F12组和对照组, 差异有显著性意义($P < 0.01$), 见图1。对照组和DMEM/F12组组内比较发现, 8周评分与4, 6周比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。嗅鞘细胞组组内比较发现, 8周评分与2, 4, 6周比较差异有显著性意义($P < 0.01, P < 0.001$)。



2.3 组织学观察结果 细胞移植后2周, 取嗅鞘细胞组3只大鼠脊髓标本进行抗p75NGF免疫染色, 可见

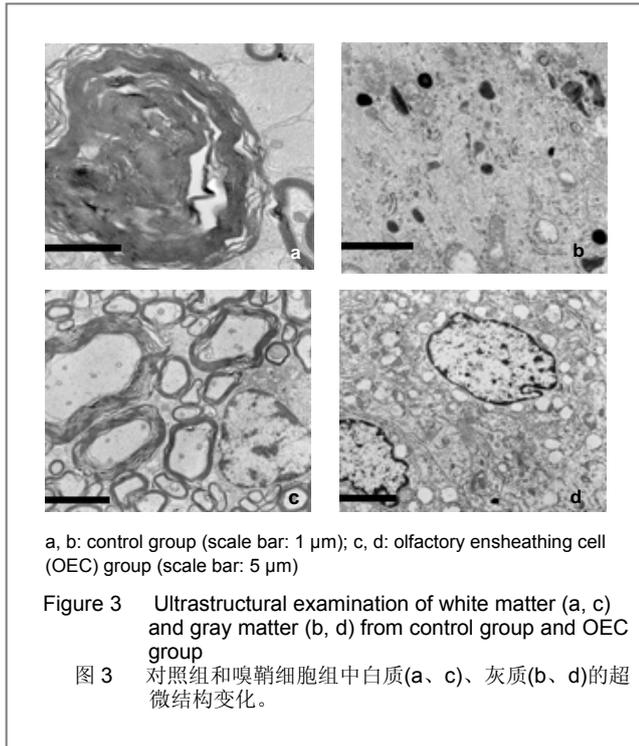
p75NGF阳性长梭形或多角形移植嗅鞘细胞。术后8周的脊髓标本进行苏木精-伊红染色显示, 两组损伤处均有明显的组织增生, 对照组和DMEM/F12组更为明显(图2a, b), 在嗅鞘细胞组的损伤处可见稀疏的神经纤维样结构通过损伤处(图2c)。对照组损伤处附近腹侧的神经纤维严重受损, 结构稀疏; 神经元失去正常的多角形形态(图2d), 部分区域的神经元完全消失或残存神经元的碎片。DMEM/F12组损伤处附近的灰质改变与对照组相似(图2e)。嗅鞘细胞组损伤处附近腹侧的神经纤维显示出较好的形态, 排列整齐紧密, 但其间可见部分神经纤维中断; 神经元的形态较好, 呈多角形(图2f)。



2.4 凋亡细胞分析 免疫组化显示, 对照组和DMEM/F12组损伤部位附近有大量caspase-3阳性细胞存在, 每高倍视野的阳性细胞数分别为 25.97 ± 11.23 , 25.79 ± 10.85 , 两者比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 嗅鞘细胞组每高倍视野的阳性细胞数较对照组少, 为 23.07 ± 8.43 , 但两者比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。嗅鞘细胞组的阴性细胞多于对照组, 差异有显著性意义($P < 0.001$)。嗅鞘细胞组阳性细胞百分数小于对照组, 差异有显著性意义($P < 0.001$)。

2.5 超微结构的变化 对照组和DMEM/F12组的神经纤维受损严重, 大量有髓纤维的髓鞘崩解, 中央的轴突

完全消失, 呈高电子密度的无形结构(图3a)。神经元中出现大量空泡化的线粒体, 线粒体嵴断裂消失。胞浆中出现大量高电子密度的次级溶酶体(图3b)。嗅鞘细胞组可见大量髓鞘松解的有髓纤维, 轴突形态尚好, 内有线粒体和大量的微丝微管细胞骨架结构(图3c)。在大量髓鞘松解的有髓纤维中有大量薄髓鞘纤维, 髓鞘包绕的轴突形态好, 其中的线粒体和微丝微管的细胞结构好。胞浆中线粒体数量明显增多, 嵴断裂, 部分消失, 空泡化(图3e)。可见畸形和巨大线粒体(图3d)。



3 讨论

在众多嗅鞘细胞移植实验中, 细胞移植的时间多有不同。在脊髓横断模型中, 损伤后立即进行嗅鞘细胞移植的神经恢复结果优于损伤后7 d进行细胞移植。然而在挫伤模型中, 脊髓损伤后立即进行细胞移植未能获得功能的恢复, 损伤后7 d进行细胞移植却获得了轻微的功能恢复, 尽管不同时间细胞移植在组织学上未见明显差异。先前的许多研究结果都对何时进行细胞移植持有异议。在损伤后2 d, 损伤部位未见GFAP阳性的星形胶质细胞^[8]。本实验在损伤后1 d进行嗅鞘细胞移植, 损伤部位的出血已经停止, 此时进行移植期望获得更好的存活率, 更好的迁移到损伤处对侧, 重建神经传导功能。另外, 由实验结果可见, 注射操作未对脊髓造成额外损伤。

脊髓损伤后的自发性恢复到术后2周时已经结束^[9]。实验结果显示所有脊髓挫伤大鼠在手术后2周内都有一定程度的行为恢复, 2周时嗅鞘细胞组与DMEM/F12组

和对照组相比较差异无显著性意义。此时的行为恢复与大鼠逐渐从脊髓休克中恢复和残存的神经纤维建立新的联系有关^[10]。2周后嗅鞘细胞组行为恢复明显快于DMEM/F12组和对照组。嗅鞘细胞移植后多种运动相关的轴突在轴突脊髓横断后可以长距离的再生, 到达脊髓远端, 重建神经传导性^[11]。移植的嗅鞘细胞可以分泌多种物质, 改变损伤局部的微环境, 促进轴突再生。嗅鞘细胞分泌的富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白, 可诱导神经的再生修复, 调节细胞对损伤环境的应答, 改变有害的损伤环境, 并启动内源性修复过程^[12]。另外, 移植的嗅鞘细胞可以产生促进轴突再生和神经元存活的各种营养因子, 如: 神经营养因子, 脑源性神经生长因子、胶质细胞源性神经生长因子和神经调节蛋白。嗅鞘细胞分泌的脑源性神经生长因子调节神经元的存活和分化, 神经调节蛋白则调节少突胶质祖细胞的增殖分化, 以及神经上皮干细胞向损伤位点迁移^[13]。脊髓损伤后, 星形胶质细胞活化增殖, 形成胶质瘢痕, 阻碍再生轴突重建脊髓断端之间的连接。嗅鞘细胞移植可以明显降低活化星形胶质细胞胶质纤维酸性蛋白合成^[14], 减少胶质形成, 延长皮质脊髓束和红核脊髓束的轴突延长距离^[15]。嗅鞘细胞移植到挫伤脊髓后, 可以明显降低受损程度和空洞面积, 保护更多的残存组织, 为轴突再生提供支架^[16]。嗅鞘细胞组损伤区有神经纤维连接, 两断端间距较对照组和DMEM/F12组要小, 残存组织多, 凋亡细胞减少。此结果都与先前的研究一致。然而, 对照组在未观察到切断轴突再生的情况下也出现了神经功能的恢复。原因可能是损伤部位头端或其他部位的皮质脊髓束纤维的出芽生长, 或者是移植嗅鞘细胞的出芽生长^[17]。

脊髓损伤后, 损伤处及断端附近有大量的凋亡细胞^[18], 嗅鞘细胞组凋亡阳性细胞数较对照组少, 而且caspsase-3阴性细胞数明显多于对照组和DMEM/F12组, 这说明嗅鞘细胞移植可以保护神经元, 降低损伤程度。由于缺少嗅鞘细胞的保护作用, 对照组和DMEM/F12组两断端间隙增大, 神经纤维和神经元受损严重。嗅鞘细胞移植可以明显降低凋亡细胞数量, 保护神经元和神经纤维。线粒体是神经元凋亡信号的整合者和执行者, 不论是细胞内还是细胞外诱导的细胞凋亡, 在各种凋亡刺激下, 线粒体发生重大改变, 例如线粒体内膜电位消失和通透性增加等^[19]。这些改变引起了线粒体内外膜间隙中的多种分子的释放, 包括前caspsase酶, 细胞色素C和凋亡诱导因子。

脊髓挫伤后, 损伤部位及其附近的整段脊髓都受到损伤, 出血和炎症反应都不利于轴突的再生。受损轴突发生自发性脱髓鞘, 2周时达到顶峰。受损轴突能否形成髓鞘, 重建神经传导的连续性是修复损伤的关键。许多学者认为移植嗅鞘细胞可以直接促进脊髓损伤轴突再髓鞘化^[20-21]。本实验中没有观察到与报道相似的嗅鞘

细胞形成的髓鞘, 只观察到了大量薄髓鞘纤维。如此不能确定嗅鞘细胞直接参与了轴突的再髓鞘化, 但是嗅鞘细胞通过分泌神经生长因子、脑源性神经营养因子可阻止髓鞘相关糖蛋白对轴突再生的抑制作用^[13,22]。一些国外的最新研究表明, 嗅鞘细胞不是直接支持神经轴突的生长, 也并不直接参与髓鞘的形成, 而是间接通过分泌一种蛋白刺激自身许旺细胞, 真正参与髓鞘形成的则是这些自身许旺细胞^[23]。

另外, 嗅鞘细胞组动物脊髓中仍可见大量嵴断裂和空泡化的线粒体, 可能是脊髓损伤后血液供应障碍, 影响了线粒体功能。由此可见, 单独嗅鞘细胞移植难以承担修复脊髓损伤的重任。将嗅鞘细胞与其他干细胞或者神经营养因子联合应用于脊髓损伤是将来的研究方向^[24]。鉴于脊髓损伤后局部处于缺血缺氧状态, 嗅鞘细胞移植结合改善脊髓血液循环的干预措施可能会取得更好的恢复效果。

4 参考文献

- Josephson A, Greitz D, Klason T, et al. A spinal thecal sac constriction model supports the theory that induced pressure gradients in the cord cause edema and cyst formation. *Neurosurgery*. 2001;48(3):636-645.
- Plant GW, Christensen CL, Oudega M, et al. Delayed transplantation of olfactory ensheathing glia promotes sparing/regeneration of supraspinal axons in the contused adult rat spinal cord. *J Neurotrauma*. 2003;20(1):1-16.
- Verdú E, García-Álías G, Forés J, et al. Olfactory ensheathing cells transplanted in lesioned spinal cord prevent loss of spinal cord parenchyma and promote functional recovery. *Glia*. 2003;42(3):275-286.
- López-Vales R, Forés J, Verdú E, et al. Acute and delayed transplantation of olfactory ensheathing cells promote partial recovery after complete transection of the spinal cord. *Neurobiol Dis*. 2006;21(1):57-68.
- Radtke C, Sasaki M, Lankford KL, et al. Potential of olfactory ensheathing cells for cell-based therapy in spinal cord injury. *J Rehabil Res Dev*. 2008;45(1):141-151.
- Eftekharpour E, Karimi-Abdolrezaee S, Fehlings MG. Current status of experimental cell replacement approaches to spinal cord injury. *Neurosurg Focus*. 2008;24(3-4):E19.
- The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- Casella GT, Marcillo A, Bunge MB, et al. New vascular tissue rapidly replaces neural parenchyma and vessels destroyed by a contusion injury to the rat spinal cord. *Exp Neurol*. 2002;173(1):63-76.
- Park JP, Kim KJ, Phi JH, et al. Simple measurement of spinal cord evoked potential: a valuable data source in the rat spinal cord injury model. *J Clin Neurosci*. 2007;14(11):1099-1105.
- Courtine G, Song B, Roy RR, et al. Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nat Med*. 2008;14(1):69-74.
- Ramón-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, et al. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron*. 2000;25(2):425-435.
- Au E, Richter MW, Vincent AJ, et al. SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates Schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair. *J Neurosci*. 2007;27(27):7208-7221.
- Pastrana E, Moreno-Flores MT, Avila J, et al. BDNF production by olfactory ensheathing cells contributes to axonal regeneration of cultured adult CNS neurons. *Neurochem Int*. 2007;50(3):491-498.
- O'Toole DA, West AK, Chuah MI. Effect of olfactory ensheathing cells on reactive astrocytes in vitro. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(10):1303-1309.
- López-Vales R, Forés J, Navarro X, et al. Olfactory ensheathing glia graft in combination with FK506 administration promote repair after spinal cord injury. *Neurobiol Dis*. 2006;24(3):443-454.

- Gorrie CA, Hayward I, Cameron N, et al. Effects of human OEC-derived cell transplants in rodent spinal cord contusion injury. *Brain Res*. 2010;1337:8-20.
- Toft A, Scott DT, Barnett SC, et al. Electrophysiological evidence that olfactory cell transplants improve function after spinal cord injury. *Brain*. 2007;130(Pt 4):970-984.
- Hains BC, Black JA, Waxman SG. Primary cortical motor neurons undergo apoptosis after axotomizing spinal cord injury. *J Comp Neurol*. 2003;462(3):328-341.
- Ruitenbergh MJ, Levison DB, Lee SV, et al. NT-3 expression from engineered olfactory ensheathing glia promotes spinal sparing and regeneration. *Brain*. 2005;128(Pt 4):839-853.
- Sasaki M, Black JA, Lankford KL, et al. Molecular reconstruction of nodes of Ranvier after remyelination by transplanted olfactory ensheathing cells in the demyelinated spinal cord. *J Neurosci*. 2006;26(6):1803-1812.
- Dombrowski MA, Sasaki M, Lankford KL, et al. Myelination and nodal formation of regenerated peripheral nerve fibers following transplantation of acutely prepared olfactory ensheathing cells. *Brain Res*. 2006;1125(1):1-8.
- Runyan SA, Phelps PE. Mouse olfactory ensheathing glia enhance axon outgrowth on a myelin substrate in vitro. *Exp Neurol*. 2009;216(1):95-104.
- Au E, Richter MW, Vincent AJ, et al. SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates Schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair. *J Neurosci*. 2007;27(27):7208-7221.
- Cai ZX, Li YH, Qi L, et al. Shandong Daxue Xuebao. 2007;45(5):470-473. 蔡中续, 李玉华, 祁磊, 等. 嗅粘膜源性嗅鞘细胞移植联合 NGF 对脊髓损伤的修复[J]. 山东大学学报: 医学版, 2007, 45(5):470-473.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 山东省自然科学基金资助项目 (Y2007C010)。课题名称: VEGF 基因转染联合嗅鞘细胞移植对脊髓损伤再生修复作用的实验研究。

致谢: 在制作动物模型和术后行为观察中孟繁东和王国栋给予大量工作支持, 张捷老师在细胞培养过程中给予大量技术指导, 在此一并表示感谢。

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。

课题的意义: 将体外培养的嗅鞘细胞用于脊髓挫伤的动物模型, 观察移植后大鼠的神经行为的变化过程并进行组内和组间的比较, 同时研究移植嗅鞘细胞对细胞凋亡和超微结构的影响, 更深入地了解脊髓挫伤后的修复机制。

课题评估的“金标准”: 目前尚缺少评价脊髓损伤后神经功能恢复效果的“金标准”, 国内外的研究主要从神经行为学评分、组织学观察观察来评价脊髓损伤后的恢复情况, 本文章借鉴国内外的研究成果, 从神经行为学评分、组织学观察和超微结构 3 个方面评价嗅鞘细胞对挫伤脊髓的修复作用, 进一步阐明嗅鞘细胞的作用机制。

设计或课题的偏倚与不足: 课题从行为学和组织学方面阐述了移植嗅鞘细胞对挫伤脊髓的修复作用, 缺少神经电生理方面的相关数据来支持神经传导功能恢复的结果。另外, 单独的嗅鞘细胞移植对严重挫伤脊髓的修复作用还是有限的, 需要与其他的措施相结合才能达到更好的神经修复效果。

提供临床借鉴的价值: 嗅鞘细胞移植有利于神经功能的恢复, 但作用有限, 细胞胞浆中大量空泡化的线粒体提示, 脊髓损伤后存在线粒体功能障碍, 给予保护线粒体的措施可能会收到意想不到的效果, 给予损伤的脊髓以保护线粒体的药物也是将来的研究方向之一。通过对动物的动态观察发现, 脊髓损伤后 4 周内下肢 BBB 评分逐渐增加, 4 周后恢复减慢, 因此可以嗅鞘细胞移植后 4 周及以后一段时间给予某种干预措施可能会促进神经功能的更快恢复。