

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.49.013 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

孔建, 张宏男, 贾丹, 王铎, 陈明伟, 薛萌萌, 李岩, 范业文, 刘欣, 刘声亮, 刘京晶, 葛小平, 姜哲, 吴树亮. 少突胶质前体细胞修复损伤脊髓的组织学变化[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(49):9192-9195.

少突胶质前体细胞修复损伤脊髓的组织学变化***

孔建¹, 张宏男², 贾丹³, 王铎³, 陈明伟¹, 薛萌萌², 李岩², 范业文², 刘欣¹, 刘声亮³, 刘京晶³, 葛小平¹, 姜哲⁴, 吴树亮¹

¹ 哈尔滨医科大学解剖学教研室, 黑龙江省哈尔滨市 150081; ² 黑龙江中医药大学, 黑龙江省哈尔滨市 150081; ³ 哈尔滨医科大学附属第一医院, 黑龙江省哈尔滨市 150081; ⁴ 黑龙江护理高等专科学校, 黑龙江省哈尔滨市 150089

孔建, 男, 1983年生, 汉族, 黑龙江省哈尔滨市人, 2007年哈尔滨医科大学毕业, 讲师, 主要从事解剖学方面的研究。sayyear@163.com

通讯作者: 吴树亮, 博士, 教授, 哈尔滨医科大学解剖学教研室, 黑龙江省哈尔滨市 150081 wusl66@hotmail.com

并列通讯作者: 姜哲, 副教授, 黑龙江护理高等专科学校, 黑龙江省哈尔滨市 150089 ewxjz@163.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344 (2012)49-09192-04

收稿日期: 2012-04-13
修回日期: 2012-05-13
(20120113016/D·C)

文章亮点: 实验将少突胶质前体细胞移植到脊髓损伤动物模型中, 以观察少突胶质前体细胞对脊髓损伤的治疗作用, 移植后发现, 在损伤及其周边区域均可见到较多的少突胶质前体细胞, 提示少突胶质前体细胞移植后不仅可迁移到损伤区, 而且能够存活并与宿主细胞较好的整合。

关键词: 少突胶质前体细胞; 脊髓损伤; 模型; 移植; 神经再生

摘要

背景: 脊髓损伤的发病率呈上升趋势, 而脊髓损伤后的修复机制尚不完全清楚。

目的: 探讨少突胶质前体细胞在脊髓损伤修复过程中的作用。

方法: 采用 Allen's 重物撞击法建立小鼠脊髓损伤模型。病理学检测脊髓损伤程度, 体外分离、纯化和诱导分化绿色荧光蛋白转基因鼠的少突胶质前体细胞并移植到脊髓损伤模型鼠体内。按照不同的治疗方式分为模型组、假手术组、治疗组和对照组。

结果与结论: 小鼠脊髓损伤模型建模成功率 100%。培养的少突胶质前体细胞具有自我增殖能力, 并且可以分化为少突胶质细胞。移植后的少突胶质前体细胞不仅可以与宿主脊髓组织较好的整合, 并可迁移到损伤部位, 替代损伤组织。说明外源性少突胶质前体细胞可以在脊髓损伤小鼠受损部位存活并与宿主细胞较好的整合。

Histological changes of oligodendrocyte precursor cells for repair of spinal cord injury

Kong Jian¹, Zhang Hong-nan², Jia Dan³, Wang Duo³, Chen Ming-wei¹, Xue Meng-meng², Li Yan², Fan Ye-wen², Liu Xin¹, Liu Sheng-liang³, Liu Jing-jing³, Ge Xiao-ping¹, Jiang Zhe⁴, Wu Shu-liang¹

Abstract

BACKGROUND: The incidence of spinal cord injury shows an increasing tendency, but the repair mechanism after spinal cord injury is not fully understood.

OBJECTIVE: To investigate the effect of oligodendrocyte precursor cells in repair of spinal cord injury.

METHODS: According to Allen's method, models of spinal cord injury were established in mice. The morphological change of spinal cord was detected by pathological method. Oligodendrocyte precursor cells were isolated and purified from green fluorescence protein transgenic mice *in vitro*, and induced to differentiate into oligodendrocytes.

Furthermore, oligodendrocyte precursor cells were transplanted into mice model of spinal cord injury. The experiment was divided into four groups according to different treatment methods: model group, sham-operation group, treatment group and control group.

RESULTS AND CONCLUSION: The success rate for establishing the mice model of spinal cord injury was 100%. The cultured oligodendrocyte precursor cells had the ability to self-proliferate and differentiate into oligodendrocytes. After being transplanted, oligodendrocyte precursor cells could not only integrate with the host tissue of spinal cord, but also could migrate to the injury zone and replace the damaged tissue. Motor function of mice was significantly recovered by oligodendrocyte precursor cells transplantation. Exogenous oligodendrocyte precursor cells can survive in the injury zone and integrate with the host tissue of the mice after spinal cord injury.

Kong J, Zhang HN, Jia D, Wang D, Chen MW, Xue MM, Li Y, Fan YW, Liu X, Liu SL, Liu JJ, Ge XP, Jiang Z, Wu SL. Histological changes of oligodendrocyte precursor cells for repairing of spinal cord injury. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(49):9192-9195.

0 引言

随着社会经济水平不断提高, 脊髓损伤的发病率呈持续升高的趋势^[1-3]。大量的体内、外实验已经证实, 脊髓损伤患者普遍伴随着轴突脱髓鞘病理改变^[4-5]。少突胶质细胞是中枢神经系统中惟一形成髓鞘的细胞, 而少突胶质前体细胞是少突胶质细胞的未成熟细胞, 能在体内增殖、分化最后形成少突胶质细胞并形成髓鞘发挥作用^[6-7]。为此, 实验将少突胶质前体细胞移植到脊髓损伤动物模型中, 以观察少突胶质前体细胞对脊髓损伤的治疗作用。

1 材料和方法

设计: 动物模型观察。

时间及地点: 于2010年1月至2011年10月在哈尔滨医科大学解剖学实验室(科室)完成。

材料:

实验动物: 健康成年雌性C57BL/6小鼠32只, 体质量18-20 g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司; 0-2 d新生B6C3-Tg(EGFP)绿色荧光蛋白转基因小鼠12只购自南京大学模式动物研究所, 实验过程中对动物的处置符合医学伦理学标准。

主要试剂:

试剂	来源
DMEM/F12(1:1)培养基,	Gibico 公司
碱性成纤维细胞生长因子、PDG	
胰蛋白酶、胎牛血清、多聚赖氨酸	Sigma 公司
兔抗鼠单克隆抗体 A2B5、O4、Cy3	Chemicon 公司
标记山羊抗兔 IgG(H+L)、4', 6-二脒基-2-苯基吲哚盐酸(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)	

方法:

脑皮质混合细胞培养: 在解剖显微镜下, 取0-2 d新生B6C3-Tg(EGFP)绿色荧光蛋白转基因小鼠12只, 断头后迅速取出双侧大脑皮质, 置于预冷的D-Hank's液中漂洗2次, 转入含无血清DMEM/F12培养液的离心管内, 用巴氏吸管反复吹打至组织块基本消失, 200目不锈钢筛网过滤, 取滤液以1 000 r/min, 离心5 min。收

集沉淀, 加入完全培养液(DMEM/F12、体积分数10%FBS、1%双抗)1 mL, 用吸管吹打制成细胞悬液, 计数后接种到T-75培养瓶中, 细胞浓度为 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 37 °C体积分数5%CO₂条件下培养, 以后每两三天换液1次。

少突胶质前体细胞的分离和纯化^[8-9]: 原代细胞培养至9-11 d时, 将培养瓶转移至恒温振荡器上进行初步振荡(220 r/min, 37 °C, 30 min)。弃掉旧培养基, 加入新鲜培养基后, 再次将培养瓶置于恒温振荡器上进行振荡(300 r/min, 37 °C, 4-6 h)。收集振荡后细胞悬液, 将其接种于未包被多聚赖氨酸的培养皿内, 静置20-30 min。取悬液并离心(1 000 r/min, 4 °C, 5 min)可去除大部分星形胶质细胞和小胶质细胞。将细胞接种于包被多聚赖氨酸的培养瓶中。

免疫细胞化学染色鉴定: 分别将纯化后的少突胶质前体细胞和少突胶质细胞用PBS洗涤2次, 用40 g/L多聚甲醛固定20 min, 分别进行A2B5和O4免疫细胞化学检测。

小鼠脊髓损伤模型建立及分组: 32只C57BL/6小鼠随机数字表法均分模型组、假手术组、治疗组和对照组。将麻醉后小鼠俯卧于手术台上, 根据棘突的体表定位确定手术切口, 充分暴露T₁₀脊髓节段, 除假手术以外其他3组根据Allen's等的重物撞击法建立小鼠不完全性脊髓损伤模型^[10-11], 以5.0 g, 0.5 mm/s的致伤速率打击脊髓造成小鼠脊髓损伤, 造模成功后逐层缝合切口, 损伤部位为T₉-T₁₁。假手术组不进行造模, 只暴露脊髓; 模型组仅造模不进行干预; 治疗组和对照组在模型制备后第7天分别经眶静脉丛注射少突胶质前体细胞(2×10^6 个细胞)和培养基, 均为100 μL/只。

取材: 分别于细胞移植后7, 14, 21 d, 先用生理盐水再用40 g/L多聚甲醛进行心脏灌注固定。取出脊髓组织进行后固定, 经10%、20%及30%蔗糖梯度脱水后进行冰冻切片, 片厚5 μm。

主要观察指标: ①观察少突胶质前体细胞的分离培养与诱导分化。②移植的少突胶质前体细胞与宿主脊髓组织的整合情况。

统计学分析: 由第一作者采用 SPSS 10.0 统计软件进行处理 *t* 检验, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, *P* < 0.05 为差异有显著性意义。

¹Department of Anatomy, Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China;
²Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China;
³Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China;
⁴Heilongjiang Nursing College, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China

Kong Jian, Lecturer, Department of Anatomy, Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China sayyear@163.com

Corresponding author: Wu Shu-liang, Doctor, Professor, Department of Anatomy, Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China wusl66@hotmail.com

Corresponding author: Jiang Zhe, Lecturer, Associate professor, Heilongjiang Nursing College, Harbin 150089, Heilongjiang Province, China ewxjz@163.com

Supported by: Scientific Research Foundation of the Heilongjiang Province for Returned Chinese Scholars, No.LC201016*; The National Natural Science Foundation of China, No.81073162*; National Postdoctoral Sustentation Fund, No.20100471023*

Received: 2012-04-13
 Accepted: 2012-05-13

2 结果

2.1 实验动物数量分析 造模实验成功率为100%，纳入小鼠32只，均分为模型组、假手术组、治疗组和对照组，实验过程中无脱失，全部动物都进入结果分析。

2.2 脊髓损伤模型小鼠的行为学观察 模型组小鼠于术后1 h左右苏醒，醒后观察发现，双下肢呈瘫痪状态，运动功能完全丧失。头部、前肢运动功能正常，可以拖着后肢移动。而假手术组行动正常，无上述截瘫症状。

2.3 少突胶质前体细胞的增殖与分化 刚接种的少突胶质前体细胞呈圆形小亮点，折光性强，培养2 h后，细胞贴壁生长，呈现出具有双极突起的典型少突胶质前体细胞形态。免疫荧光检测发现细胞呈A2B5阳性表达。随着培养时间增加，细胞不断增殖且逐渐相互连接，细胞突起增多。加入含有体积分数10%胎牛血清，48 h后即发现细胞开始伸出多个突起，少突胶质前体细胞分化形成少突胶质细胞，见图1。

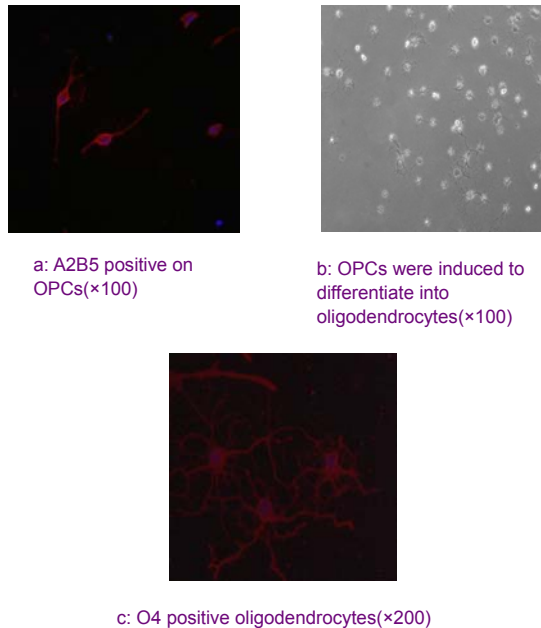


Figure 1 Proliferation and differentiation of oligodendrocyte precursor cells (OPCs) under immunofluorescence and phase contrast microscopes

图1 免疫荧光和相差显微镜观察少突胶质前体细胞的增殖与分化

2.4 脊髓组织组织学鉴定 模型组小鼠脊髓损伤部位与周围组织明显不同，较正常脊髓变细。脊髓横断面观察，见损伤处结构紊乱，组织结构疏松，甚至出现大量的空泡变性，可见凋亡的神经元及大量增生、浸润的炎性细胞，见图2。假手术组脊髓组织基本正常，组织结

构致密，神经纤维排列整齐，神经元胞核圆大，核仁清晰，其内未见增生、浸润的炎性细胞。治疗组较对照组和模型组病变有所减轻，组织结构排列紧密，空洞变小，损伤灶的中心和周边均可见到移植的呈绿色的少突胶质前体细胞，见图3。在对照组的脊髓中未见到移植的少突胶质前体细胞。

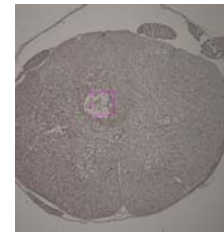


Figure 2 Immunohistochemical staining of the neurofilament protein in the mouse spinal cord of model group, spinal cord injury caused the death or apoptosis of cells in the central area of the spinal cord (arrow), and led to the honeycomb or vacuolar changes in the center of injury zone (x100)

图2 模型组小鼠脊髓的神经丝蛋白免疫组化染色，脊髓损伤导致脊髓中央区细胞坏死或凋亡(箭头)，损伤区呈蜂窝状或空泡变性(x100)。

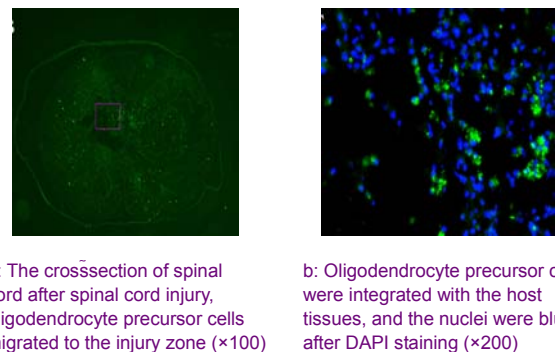


Figure 3 Immunohistochemical staining and immunofluorescence staining of the spinal cord in the treatment group

图3 治疗组小鼠脊髓的免疫组化染色及免疫荧光

3 讨论

脊髓损伤所致的截瘫，主要由脊髓损伤后神经元和少突胶质细胞死亡，轴突变性和脱髓鞘所致，目前尚无有效的治疗方法。如何提高轴突再生能力、替代损伤细胞、阻止脱髓鞘和使髓鞘再生等成为脊髓损伤治疗策略中最重要的部分。近年来，少突胶质前体细胞移植在脊髓损伤修复方面展示了良好前景，为脊髓损伤的修复带来了新的希望^[12-16]。

实验结果发现，取自2 d幼鼠的少突胶质前体细胞

具有很强的增殖能力。随着培养时间的延长, 细胞相互连接, 呈现出典型的少突胶质前体细胞形态, 结果与报道的一致^[17-18]。分离培养的细胞经免疫荧光染色证实, 呈A2B5阳性表达, 并可分化成少突胶质细胞, 说明本研究成功分离和培养出少突胶质前体细胞。

利用撞击法建立的脊髓损伤模型是一种类似于人脊髓外伤的动物模型, 是常用的脊髓损伤实验模型。撞击法建立的脊髓损伤模型因制作方法简单、损伤机制单一、致伤程度较一致和重复性好而为众多研究者所利用^[19-20]。

为了证明本实验培养的细胞具有迁移能力, 并能与宿主细胞较好的整合, 实验将少突胶质前体细胞经眶静脉丛移植到小鼠体内。移植后发现, 在损伤及其周边区域均可见到较多的少突胶质前体细胞, 提示少突胶质前体细胞移植后不仅可迁移到损伤区, 而且能够存活并与宿主细胞较好的整合。实验结果提示少突胶质前体细胞移植可能具有修复脊髓损伤的作用。

4 参考文献

- [1] Kohout RK, Saunders LL, Krause JS. The relationship between prescription medication use and ability to ambulate distances after spinal cord injury. Arch Phys Med Rehabil. 2011;92(8):1246-1249.
- [2] Gorzkowski J, Kelly EH, Klaas SJ, et al. Obstacles to community participation among youth with spinal cord injury. J Spinal Cord Med. 2011;34(6):576-585.
- [3] Tuğcu I, Tok F, Yılmaz B, et al. Epidemiologic data of the patients with spinal cord injury: seven years' experience of a single center. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg. 2011;17(6): 533-538.
- [4] Lee JH, Chung WH, Kang EH, et al. Schwann cell-like remyelination following transplantation of human umbilical cord blood (hUCB)-derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury. J Neurol Sci. 2011;300(1-2): 86-96.
- [5] Ward RE, Huang W, Curran OE, et al. Docosahexaenoic acid prevents white matter damage after spinal cord injury. J Neurotrauma. 2010;27(10):1769-1780.
- [6] Faulkner J, Keirstead HS. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors for the treatment of spinal cord injury. Transpl Immunol. 2005;15(2):131-142.
- [7] Tian B, Liu HW, Wu SL, et al. Zhongguo Linchuang Kangfu. 2003;9(25):3430-3431.
田波, 刘慧雯, 吴树亮, 等. 大鼠胎脑神经细胞与胶原复合体移植对脑损伤的修复[J]. 中国临床康复, 2003, 9(25):3430-3431.
- [8] Mekhail M, Almazan G, Tabrizian M. Oligodendrocyte-protection and remyelination post-spinal cord injuries: a review. Prog Neurobiol. 2012;96(3):322-339.
- [9] Lü HZ, Wang YX, Zhou JS, et al. Cyclosporin A increases recovery after spinal cord injury but does not improve myelination by oligodendrocyte progenitor cell transplantation. BMC Neurosci. 2010;11:127.
- [10] Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. JAMA. 1911;57:878-880.
- [11] 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.
- [12] Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. Physiol Rev. 2001;81(2):871-927.
- [13] Siebert JR, Stelzner DJ, Osterhout DJ. Chondroitinase treatment following spinal contusion injury increases migration of oligodendrocyte progenitor cells. Exp Neurol. 2011;231(1):19-29.
- [14] Lü HZ, Wang YX, Zou J, et al. Differentiation of neural precursor cell-derived oligodendrocyte progenitor cells following transplantation into normal and injured spinal cords. Differentiation. 2010;80(4-5):228-240.
- [15] Cao Q, He Q, Wang Y, et al. Transplantation of ciliary neurotrophic factor-expressing adult oligodendrocyte precursor cells promotes remyelination and functional recovery after spinal cord injury. J Neurosci. 2010;30(8): 2989-3001.
- [16] Lytle JM, Chittajallu R, Wrathall JR, et al. NG2 cell response in the CNP-EGFP mouse after contusive spinal cord injury. Glia. 2009;57(3):270-285.
- [17] Mayer-Proschel M, Kalyani AJ, Mujtaba T, et al. Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. Neuron. 1997;19(4):773-785.
- [18] Kerr CL, Letzen BS, Hill CM, et al. Efficient differentiation of human embryonic stem cells into oligodendrocyte progenitors for application in a rat contusion model of spinal cord injury. Int J Neurosci. 2010;120(4):305-313.
- [19] Saxena T, Gilbert JL, Stelzner D, et al. Mechanical Characterization of the Injured Spinal Cord Following Lateral Spinal Hemisection Injury in the Rat. J Neurotrauma. 2012 Mar 21.
- [20] Lee SM, Yune TY, Kim SJ, et al. Minocycline reduces cell death and improves functional recovery after traumatic spinal cord injury in the rat. J Neurotrauma. 2003;20(10):1017-1027.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 黑龙江省留学归国科学基金项目 (LC201016); 国家自然科学基金(81073162); 中国博士后基金(20100471023)。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。