

神经干细胞联合胶原蛋白支架移植脊髓损伤大鼠脑细胞的凋亡

朱宗昊, 沈 强(上海市第一人民医院骨科, 上海市 200080)

文章亮点:

与以往研究相比, 实验的创新在于将脊髓损伤后大脑皮质的变化与现有对脊髓局部变化的研究结果进行整合, 即观察神经干细胞联合胶原蛋白支架移植对脊髓损伤后鼠大脑神经细胞凋亡的影响, 是对脊髓损伤相关研究的补充和完善, 另外对于全面反映脊髓损伤后的神经系统的基本状态, 以及探讨脊髓损伤新的诊疗策略有着相当重要的意义。

关键词:

生物材料; 材料相容性; 组织工程神经材料; 胶原凝胶; 神经干细胞; 细胞凋亡; 脊髓损伤; 干细胞移植

主题词:

生物相容性材料; 胶原; 水凝胶; 细胞凋亡; 神经干细胞; 脊髓损伤

基金资助:

上海市科学技术委员会(12441900700)

摘要

背景: 目前的研究表明, 从胚胎大鼠大脑皮质分离的神经干细胞在胶原蛋白凝胶中可增殖并分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。

目的: 观察神经干细胞联合胶原蛋白支架移植对脊髓损伤后鼠大脑神经细胞凋亡的影响。

方法: 取 45 只 SD 大鼠制作脊髓半切损伤模型, 随机分为 3 组, 造模 1 周后, 细胞移植组大鼠运动皮质后部在脊髓损伤部位注入同种异体神经干细胞悬液, 联合组在脊髓损伤部位注入同种异体神经干细胞结合胶原蛋白悬液, 模型组不植入任何物质。

结果与结论: 移植后 1-8 周, 3 组大鼠肢体运动功能均有不同程度恢复, 且联合组移植后 8 周 BBB 运动评分明显高于其他两组($P < 0.05$)。移植后 1 周苏木精-伊红染色显示 3 组均可见少量凋亡细胞及 Bcl-2 抗凋亡蛋白阳性细胞, 大量 Bax 阳性细胞; 随着时间的推移, 3 组 Bax 凋亡蛋白阳性细胞、Bcl-2 抗凋亡蛋白阳性细胞逐渐减少, 并且移植后 8 周联合组、细胞移植组 Bax 阳性细胞明显低于模型组($P < 0.05$), Bcl-2 抗凋亡蛋白阳性细胞高于模型组($P < 0.05$), 此时 3 组均无凋亡细胞。表明神经干细胞联合胶原蛋白支架移植可抑制脊髓损伤后鼠大脑神经细胞的凋亡, 促进脊髓神经功能的恢复。

朱宗昊, 沈强. 神经干细胞联合胶原蛋白支架移植脊髓损伤大鼠脑细胞的凋亡[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(3):341-347.

Effect of combination of neural stem cells transplantation and collagen gel scaffold on apoptosis of brain cells in rats after spinal cord injury

Zhu Zong-hao, Shen Qiang (Department of Orthopedics, First People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200080, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that neural stem cells isolated from embryonic rat cerebral cortex can proliferate and differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes in collagen gels.

OBJECTIVE: To investigate the effect of neural stem cells combined with collagen gel on the apoptosis of nerve cells in the brain of rats after spinal cord injury.

METHODS: Forty-five spinal cord injury rat models were made through spinal cord hemisection and randomly divided into three groups. At 1 week after modeling, rats in the cell transplantation group were injected allogeneic neural stem cell suspension into the injured site, rats in the combination group were administered with allogeneic neural stem cells/collagen gel suspension into the injured site, and rats in the model group received no treatment.

RESULTS AND CONCLUSION: From 1 to 8 weeks after injury, the Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) locomotion scores in the combination group were significantly higher than those in the other two groups ($P < 0.05$). Hematoxylin-eosin staining showed that at 1 week after transplantation, there were a few necrotic cells and Bcl-2 positive cells, but a large amount of Bax positive cells in the three groups. Then, the number of Bax- and Bcl-2-positive cells was reduced gradually in the three groups. At 8 weeks after transplantation, the number of Bax-positive cells was significantly higher in the model group than the other two group ($P < 0.05$), but the number of Bcl-2-positive cells were dramatically lower ($P < 0.05$). Meanwhile, there were no necrotic cells in the three groups. These findings indicate that neural stem cell transplantation combined with collagen gel scaffold can arrest apoptosis of nerve cells in the brain of rats after spinal cord injury, and promote functional recovery after

朱宗昊, 男, 1977 年生, 浙江省鄞县人, 汉族, 2001 年上海第二医科大学毕业, 主治医师, 主要从事脊柱脊髓损伤专业。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.03.003

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)03-00341-07

稿件接受: 2013-10-06

Zhu Zong-hao, Attending physician, Department of Orthopedics, First People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200080, China

Accepted: 2013-10-06

spinal cord injury.

Subject headings: biocompatible materials; collagen; hydrogels; apoptosis; neural stem cells; spinal cord injury

Funding: a grant from Shanghai Commission of Science and Technology, No. 12441900700

Zhu ZH, Shen Q. Effect of combination of neural stem cells transplantation and collagen gel scaffold on apoptosis of brain cells in rats after spinal cord injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(3):341-347.

0 引言 Introduction

目前脊髓损伤普遍的治疗方法包括手术、药物和物理康复治疗等, 虽有一定疗效, 但很难阻止病变的发展。到目前为止, 对脊髓损伤研究的重点主要集中在脊髓受损节段, 然而这些研究却忽略了脊髓损伤后大脑的变化, 所以大多数有关损伤后的治疗都是在假设大脑结构和功能正常的情况下进行的; 另外治疗的重点也主要集中在促进损伤轴突的再生和修复。随着实验设备和方法的改进, 人们发现脊髓损伤后大脑皮质在组织形态、结构功能上发生了一些变化, 这些变化可能对脊髓损伤患者的康复治疗和功能恢复产生一定影响。因此必须认识到, 防止大脑皮质神经元发生凋亡、死亡、萎缩等病理变化是促进轴突再生、功能恢复的必要条件。

近20年来的大量实验证实干细胞移植在脊髓损伤治疗中是可行的、有效的、有发展前途的。在多种干细胞中尤其是神经干细胞, 由于其具有来源广泛、取材容易、在体外长期培养过程中始终保持多向分化潜能、体内移植反应弱且克服了有关伦理学及免疫排斥问题等优点^[1-2], 故常被当作主要的选择对象用于移植治疗脊髓损伤。但对于脊髓损伤患者干细胞移植能否改善脊髓损伤后大脑皮质神经元凋亡的情况, 目前尚无类似研究。实验希望通过构建大鼠脊髓半切洞损伤模型, 在损伤处植入神经干细胞, 通过术后BBB行为学评分和大脑皮质处病理学表现, 以及神经元细胞凋亡情况, 探讨神经干细胞移植对脊髓损伤引起脑细胞凋亡的影响, 为进一步动物实验及临床应用提供理论依据。至于承载神经干细胞的介质, 实验选择了胶原蛋白支架, 因为胶原蛋白支架可以提供一个类似于生物体内的三维微环境以利于细胞生长和分化; 胶原呈三重螺旋状, 能够自行组装形成纤维状结构的类生理环境, 从而使胶原蛋白在神经组织再生中成为最佳候选的水凝胶。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物观察实验。

时间及地点: 于2011年4月至2012年4月在上海市第一人民医院骨科实验室完成。

材料:

实验动物: 孕14 d SD大鼠3只, 体质量300 g左右, 取其胚胎用于提取神经干细胞; 成年雌性SD大鼠60只, 体质量220-250 g, 用于制作脊髓损伤动物模型; 每日给予足量全营养鼠粮和清洁饮水, 在上海市第一人民医院动物室喂养。所有实验动物均由中科院上海实验动物中心提供,

实验动物许可证号: 10042438, 清洁级, 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

主要试剂与仪器:

试剂与仪器	来源
胎牛血清、青霉素溶液、链霉素溶液、DMEM/F12 培养基、谷氨酰胺、B27	Gibco 公司, 美国
碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子	Peptrotech 公司, 美国
胶原	广州瑞特生物有限公司, 中国
I 型胶原酶、Accutase 酶、兔抗大鼠 β III-tubulin 单克隆抗体、兔抗大鼠 GFAP 单克隆抗体、兔抗大鼠 CNPase 单克隆抗体	Sigma 公司, 美国
PE 小鼠抗大鼠 nestin 多克隆抗体	BD 公司, 美国
正常山羊封闭血清	武汉博士德公司, 中国
苏木精、伊红、Triton-x -100	上海碧云天生物技术有限公司, 中国
免疫组化湿盒	福州迈新生物技术有限公司, 中国
CO ₂ 恒温培养箱、常温离心机、低温高速离心机	Thermo Fish 公司, 美国
正置及倒置显微镜	Nikon Corporation, 日本

实验方法:

大鼠胚胎神经干细胞的分离培养: 进行大鼠胚胎手术前, 紫外线照射超净工作台1 h以上, 将动物固定器经体积分数75%乙醇消毒后放入层流室中, 消毒完全后, 10%水合氯醛将SD孕鼠腹腔麻醉后, 用体积分数75%乙醇浸泡5 min, 在无菌条件下剪取胎鼠大脑前侧皮质放入DMEM/F12培养液中, 用眼科剪将大脑皮质组织块剪成约1 cm³大小, 吸取上清液, 用200目滤网过滤, 收集单细胞悬液800 r/min离心10 min, 弃去上清液, 加入含有2%B27、20 μ g/L 碱性成纤维生长因子和表皮生长因子的DMEM/F12培养液重新悬浮细胞, 调整细胞浓度为 2×10^8 L⁻¹接种到50 mL的培养瓶中, 放置在37 $^{\circ}$ C, 体积分数为5%的CO₂饱和湿度孵育箱中培养。

神经干细胞的纯化及传代: 将培养5-7 d的神经干细胞用吸管吸入到离心管中, 800 r/min(离心半径120 mm)离心5 min后, 弃去上清液加入0.5 mL accutase酶, 37 $^{\circ}$ C孵育10 min后, 用吸管轻轻吹打至单细胞悬液, 800 r/min(离心半径120 mm)离心5 min后, 弃上清液, 加入定量培养液, 将 2×10^8 L⁻¹的细胞接种到50 mL培养瓶中, 置于37 $^{\circ}$ C, 体积分数为5%CO₂的饱和湿度孵育箱中培养。以后每3 d进行一次半量换液, 每6 d传代1次。

神经干细胞的诱导分化:取第3代神经干细胞球在去生长因子培养基中加入体积分数1%的胎牛血清诱导神经干细胞贴壁分化, 每2 d半量换液1次。

神经干细胞免疫荧光鉴定:取第3代的神经球用酶消化成单细胞悬液, 接种到放有多聚赖氨酸包被的载玻片的24孔细胞培养板中, 37 °C培养24 h后, 取出载玻片, 用0.01 mol/L PBS洗涤干净, 进行nestin免疫荧光检测, 鉴定培养的细胞是否为神经干细胞。

大鼠脊髓半切损伤模型制备^[3]:实验SD大鼠术前夜禁食不禁水, 称质量后给予1%戊巴比妥钠40 mg/kg腹腔注射麻醉。麻醉成功后, 将大鼠俯卧于手术台上, 分别固定头和四肢。肥皂水清洁背部皮毛, 剪去背部鼠毛暴露正中皮肤。安尔碘常规消毒后, 以T₈为中心, 沿脊柱正中纵行切开皮肤, 切口约5 cm长, 逐层分离皮下筋膜及肌肉, 纱布止血, 暴露T₇₋₉节段棘突和椎板, 用撑开器撑开椎旁肌肉暴露手术视野。用手术刀仔细刮除椎板上残留肌肉, 纹氏钳咬除椎间肌肉、韧带等软组织后, 有齿镊夹持固定T₈椎体, 将T₈轻微上提, 暴露右侧上下关节突关节间隙, 将纹氏钳插入关节间隙, 仔细咬除T₇₋₈右侧椎板及棘突至暴露右侧脊髓为止, 可见位于脊髓后正中沟的粗大脊髓后正中静脉。手术期间注意小心操作, 避免过度牵拉造成T₈损伤脊髓, 提拉及撑开T₈时避免撑开器及有齿镊进入胸腹腔, 钳除椎板时避免损伤后正中静脉或压迫脊髓。此后操作在SM-2000J眼科手术显微镜下进行。以脊髓后正中沟为界, 先用显微剪在T₈脊髓右半节段横行垂直刺下行脊髓右半横断, 可见相应的右半躯干及右后肢抽搐表明脊髓已半横断。然后从刺入点开始沿脊髓后正中静脉作“L”切口, 如此切除长约3 mm脊髓组织, 造成脊髓右半侧约3 mm×2 mm×2 mm缺损区域, 用少许明胶海绵覆盖伤口, 逐层缝合分离的肌肉和皮肤, 制成脊髓损伤模型。将大鼠置于干燥、新换的垫料上, 注意观察大鼠排尿情况, 必要时人工辅助排尿。术后注意大鼠手术切口情况, 如出现渗血渗液及时处理。

神经干细胞移植:于造模后7 d进行。移植前先将准备好的神经干细胞悬液用吸管轻轻吹打混匀, 放置于离心管中并且冰浴。将造模成功的45只大鼠随机抽签法分为模型组、细胞移植组及联合组, 每组15只。将大鼠称质量后1%戊巴比妥钠40 mg/kg腹腔注射麻醉。麻醉成功后将大鼠俯卧位固定, 肥皂水清洁背部皮毛, 剔除鼠毛暴露背部正中皮肤, 安尔碘常规消毒后, 拆除皮肤和肌肉的缝线, 暴露T₈脊髓损伤处, 细胞移植组在脊髓损伤部位注射 $1.0 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$ 神经干细胞悬液10 μL ; 联合组在脊髓损伤部位注射10 μL 神经干细胞+胶原的细胞悬液, 细胞浓度为 $1.0 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$, 胶原质量浓度为0.5 g/mL; 模型组不移植任何物质。植入后局部用无菌明胶海绵覆盖伤口, 缝合肌肉与皮肤。

大鼠Basso, Beattie, Bresnahan(BBB)行为学评分评价脊髓功能:BBB评分标准是美国Ohio大学研究人员于1995年正式提出的一种新的神经功能评定法。它将大鼠的

后肢运动分为22个等级, 后肢全瘫为0分, 完全正常为21分^[4]。基本内容为: 关节活动的数目和范围, 负重程度, 前后肢的协调性, 前后爪和尾部的活动情况。BBB评分基本与大鼠脊髓损伤情况平行, 是一种有效的行为学评价标准, 评分越高说明肢体功能恢复越好。

细胞移植后1, 2, 4, 6, 8周对大鼠后肢运动情况进行观察, 行BBB评分并记录。每次评分时大鼠在围绕直径约3 m圆形空旷地区自由活动5 min, 对每组每只动物右侧患肢分别予以评分, 取其平均分并记录。

实验大鼠脑部的组织形态变化:细胞移植后1, 4, 8每组各处理5只SD大鼠, 取出大脑运动皮质后部组织, 先观察大体形态, 再作横断面苏木精-伊红染色进行比较, 观察大脑运动皮质后部组织横断面组织形态学的变化。

石蜡切片:取材, 标本脱水各级乙醇脱水, 体积分数75%乙醇放置2 h; 体积分数80%乙醇放置2 h; 体积分数95%乙醇放置2 h, 无水乙醇放置30 min; 二甲苯放置15 min, 更换二甲苯放置15 min。浸蜡2 h后包埋。将包埋的组织用病理切片机切片, 每片厚约5 μm , 放置在60 °C烘烤箱内12 h过夜, 进行苏木精-伊红染色。

主要观察指标:移植后不同时间点各组大鼠脑组织凋亡细胞数、Bcl-2抗凋亡蛋白阳性细胞及Bax阳性细胞数量。

统计学分析:所有实验数据均用SPSS13.0统计软件计算, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表达, 成组t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物一般情况的观察 实验中共投入60只大鼠, 动物死亡原因多为创伤过大失血、泌尿系统感染等, 常于1周内死亡。所有手术存活的动物切口均为I期愈合, 未发现明显感染。术后动物部分出现后肢瘫痪、肠麻痹、尿滞留等症状。

动物筛选:脊髓损伤半切模型建立7 d后按BBB评分标准, 评分不超过4的大鼠进入神经干细胞移植实验, 最后45只BBB评分为0-4的SD大鼠成功造模并纳入到最后的分析, 无脱失。

2.2 各组大鼠BBB运动评分结果 脊髓损伤后大鼠右下肢均有不同程度的功能丧失, 出现相应后肢的瘫痪, 右侧后肢内旋并且无法支持身体质量, 伴有肌力下降, 为0-4级, 可见动物右后肢拖地爬行, 并且随着时间的推移, BBB运动评分缓慢升高。在大鼠脊髓损伤处植入细胞1周后, 大部分动物右下肢牵拉刺激以后可见挛缩反应, 下肢关节可见一定的活动, 到第2周时, 患侧右下肢功能恢复明显加快, 4周时细胞移植组大鼠脊髓损伤后右侧后肢外旋, 而联合组的大鼠右侧后肢偶尔可负重站立行走; 移植后第6周时, 细胞移植组和联合组评分均大于11, 这表明右侧后肢能够部分支持大鼠身体重量; 8周后联合组部分能够持续的足底站立, 甚至前后肢协调运动。在移植后不同阶段, 3组动物肢

表 1 在脊髓损伤处植入不同物质 1, 2, 4, 6, 8 周的肢体运动功能 BBB 评分比较

Table 1 Comparison of Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) locomotion scores among the three groups at 1, 2, 4, 6, 8 weeks after implantation ($\bar{x} \pm s$)

组别	1 周	2 周	4 周	6 周	8 周
模型组	3.10±1.02	5.25±1.62	5.95±1.50	6.70±1.75	6.80±1.15
细胞移植组	3.93±0.88	6.65±1.11	9.15±1.23 ^a	10.8±1.15 ^a	12.40±0.96 ^a
联合组	4.53±1.14 ^a	7.95±0.96 ^a	10.35±1.25 ^a	12.80±1.53 ^a	14.60±1.71 ^{ab}

表注: 模型组未植入任何物质, 细胞移植组植入同种异体神经干细胞, 联合组植入同种异体神经干细胞与胶原蛋白。表明联合组肢体功能恢复最好。与模型组比较, ^a $P < 0.05$; 与细胞移植组比较, ^b $P < 0.05$ 。

表 2 在脊髓损伤处植入不同物质 1, 4, 8 周的 Bax 凋亡蛋白及 Bcl-2 抗凋亡蛋白阳性细胞率

Table 2 Rate of Bax- and Bcl-2 positive cells in the three groups at 1, 4, 8 weeks after implantation ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	Bax 凋亡蛋白			Bcl-2 抗凋亡蛋白		
	1 周	4 周	8 周	1 周	4 周	8 周
模型组	52.00±0.95	47.00±0.83	38.00±1.13	10.12±0.82	5.45±1.22	1.80±1.23
细胞移植组	58.00±1.21	40.00±0.85	16.00±0.86 ^a	11.83±1.08	6.35±0.78	4.80±0.91 ^a
联合组	56.00±1.06	38.00±1.25	14.00±1.16 ^a	13.63±1.14	6.26±1.34	5.30±1.45 ^a

表注: 模型组未植入任何物质, 细胞移植组植入同种异体神经干细胞, 联合组植入同种异体神经干细胞与胶原蛋白。与模型组比较, ^a $P < 0.05$ 。表明同种异体神经干细胞与胶原蛋白联合移植可抑制凋亡蛋白表达, 促进抗凋亡蛋白的表达。

BBB 后肢运动功能评分标准^[4]:

分值	评价标准
0 分	无可见后肢运动
1 分	一或两个关节轻微运动, 通常为髻和/或膝关节
2 分	一个关节广泛活动或一个关节广泛活动且有另一关节轻微活动
3 分	2 个关节广泛活动
4 分	后肢全部 3 个关节可轻微活动
5 分	两个关节轻微活动, 第 3 个关节可广泛活动
6 分	两个关节广泛活动, 第 3 个关节可轻微活动
7 分	后肢全部 3 个关节可广泛活动
8 分	非承重情况下可以爪掌面着地
9 分	间或爪掌面承重支撑或爪背面承重移动, 无爪掌面支撑移动
10 分	偶见爪掌面承重移动; 无前肢协调动作
11 分	可较多的见到掌面承重移动, 但无前肢协调动作
12 分	可较多的见到掌面承重移动, 偶见前后肢协调动作
13 分	常见掌面承重移动, 可常见前后肢协调动作
14 分	有持续性掌面承重移动和前后肢协调动作; 或出现常见的掌面移动, 持续型前后肢协调动作, 偶有爪背侧移动
15 分	持续性掌面移动和持续性前后肢协调动作, 前肢前进过程中无或偶有抓地; 初接触时主动爪位置与身体平行
16 分	步态中可见持续性掌面移动和持续性前后肢协调动作, 前肢前进过程中常见爪抓地; 初接触时主动爪位置与身体平行, 负重转移后旋转
17 分	步态中可见持续性掌面移动和持续性前后肢协调动作, 前肢前进过程中常见爪抓地; 初接触时和负重转移后主动爪位置均与身体平行
18 分	步态中可见持续性掌面移动和持续性前后肢协调动作, 前肢前进过程中可持续性爪抓地; 初接触时主动爪位置均与身体平行, 负重转移后旋转
19 分	步态中可见持续性掌面移动和持续性前后肢协调动作, 前肢前进过程中可持续性爪抓地; 初接触时和负重转移后主动爪位置均与身体平行。尾巴有时或总是下垂
20 分	持续性掌面移动, 持续性协调步态, 足趾持续抓地, 初接触时和负重转移后主动爪位置均与身体平行, 躯干不稳定, 尾巴持续翘起
21 分	持续性掌面移动, 持续性协调步态, 足趾持续抓地, 活动过程中主动爪位置始终与身体平行, 躯干持续稳定, 尾巴持续翘起

体运动功能均有不同程度恢复, 但细胞移植组和联合组大鼠右后肢功能恢复情况优于模型组(表1)。

2.3 各组苏木精-伊红染色结果 3组移植后1周均可见脑组织内少量凋亡细胞, 细胞核小而深染, 细胞质减少且密

度增加, 染色质的凝聚, 细胞萎缩, 各组凋亡情况基本一致。

移植后4周, 模型组脑组织内可见较多的凋亡细胞, 凋亡细胞数要明显多于其他两组; 另外, 细胞移植组的凋亡细胞数要略多于联合组。移植后8周3组中均不见凋亡细胞

(图1A)。

2.4 各组相关凋亡细胞检测结果 由表2可见, 移植后1周, 3组均可见大量Bax阳性细胞, 之后均逐渐减少, 但到移植后8周, 细胞移植组和联合组的Bax阳性细胞数明显低于模型组($P < 0.05$)(图1B)。

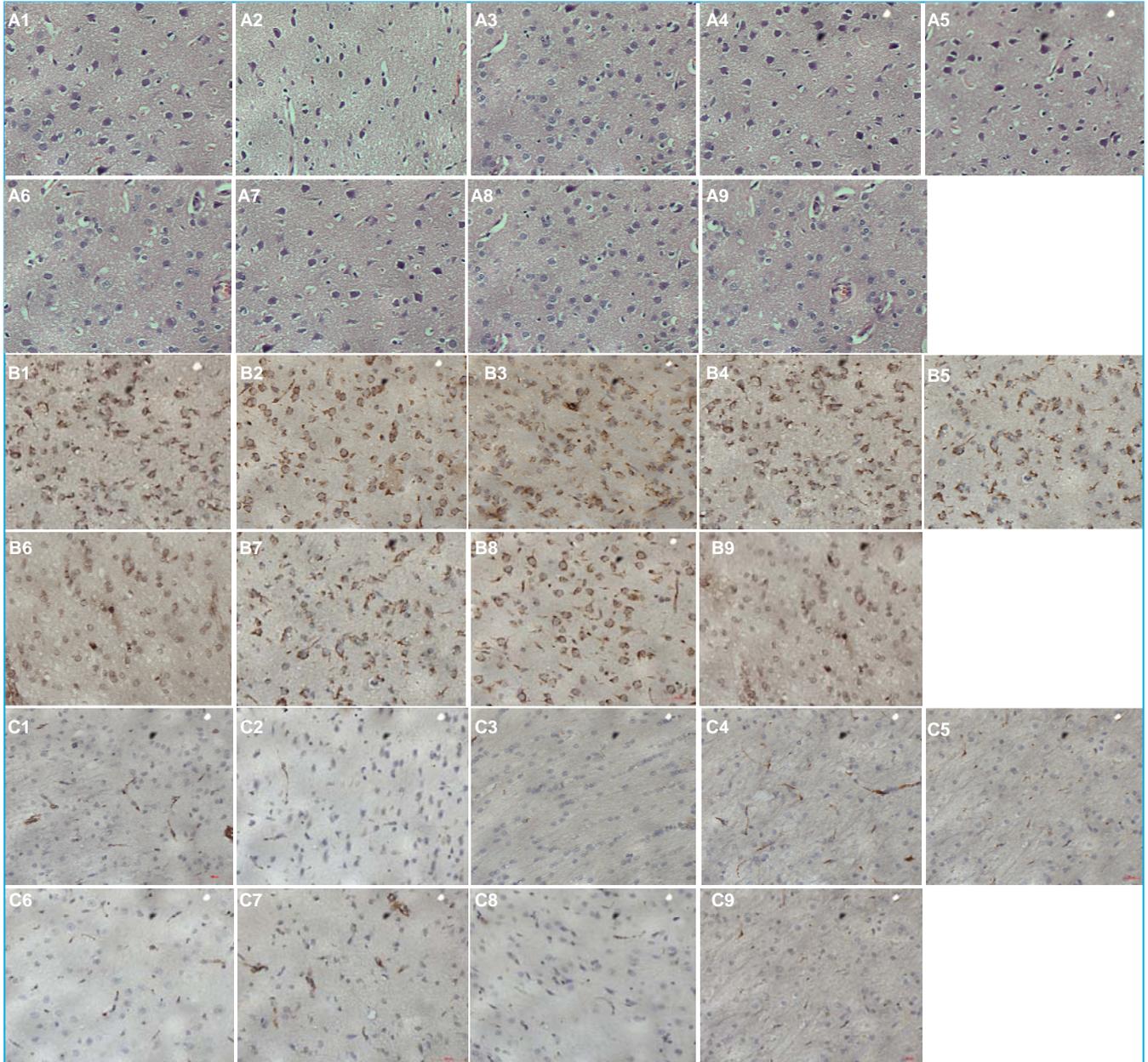


图1 采用不同方法治疗SD大鼠脊髓损伤后脑组织苏木精-伊红染色及Bax凋亡蛋白和Bcl-2抗凋亡蛋白阳性细胞的比较($\times 400$)

Figure 1 Hematoxylin-eosin staining of brain tissues in rats with spinal cord injury subjected to different treatments and comparison of Bax and Bcl-2 positive cells ($\times 400$)

图注:

(1) 图中 A1-A3 为未干预的模型组移植后 1, 4, 8 周, A4-A6 为神经干细胞组移植后 1, 4, 8 周, A7-A9 为神经干细胞联合胶原蛋白组移植后 1, 4, 8 周。苏木精-伊红染色显示, 3 组移植后 1 周均可见脑组织内少量凋亡细胞, 细胞核小而深染, 细胞质减少且密度增加, 染色质的凝聚, 细胞萎缩, 各组凋亡情况基本一致。移植后 4 周, 模型组脑组织内可见较多的凋亡细胞, 凋亡细胞数要明显多于其他两组。另外, 神经干细胞组的凋亡细胞数要略多于神经干细胞联合胶原蛋白组。移植后 8 周 3 组中均不见凋亡细胞。

(2) 图中 B1-B3 为未干预的模型组移植后 1, 4, 8 周, B4-B6 为神经干细胞组移植后 1, 4, 8 周, B7-B9 为神经干细胞联合胶原蛋白组移植后 1, 4, 8 周。移植后 1 周, 3 组均可见大量 Bax 阳性细胞, 之后均逐渐减少, 但到移植后 8 周, 神经干细胞细胞组和神经干细胞联合胶原蛋白移植组的 Bax 阳性细胞数明显低于模型组($P < 0.05$)。

(3) 图中 C1-C3 为未干预的模型组移植后 1, 4, 8 周, C4-C6 为神经干细胞组移植后 1, 4, 8 周, C7-C9 为神经干细胞联合胶原蛋白组移植后 1, 4, 8 周。移植后 1 周, 3 组均可见少量 Bcl-2 抗凋亡蛋白阳性细胞, 之后逐渐减少; 然而至移植后 8 周, 模型组 Bcl-2 抗凋亡蛋白阳性细胞数明显低于其他两组($P < 0.05$)。

另外, 移植后1周, 3组均可见少量Bcl-2抗凋亡蛋白阳性细胞, 之后逐渐减少; 然而至移植后8周, 模型组Bcl-2抗凋亡蛋白阳性细胞数明显低于其他两组($P < 0.05$)(图1C)。

3 讨论 Discussion

急性脊髓损伤所引起的神经损伤常常可导致患者生理和心理的改变^[5], 这种神经损伤一般由2部分叠加而成, 即原发性损伤和继发性损伤^[6]。原发损伤是由于创伤所直接造成的机械性组织损伤; 继发损伤是通过由细胞和分子途径介导的生化反应对组织造成损害^[7]。原发损伤和继发损伤均可造成神经元细胞和支持细胞的死亡。细胞的死亡一般通过2种形式的途径: 坏死和凋亡。细胞的坏死一般发生于机械性的细胞损伤; 而细胞的凋亡一般被认为是细胞在某种特定刺激和诱导而产生的生理性或程序性死亡^[8]。然而, 在继发性损伤中细胞的凋亡扮演着重要角色。创伤虽然对脊髓造成的即刻的物理性损伤, 然而随之而来的继发性损伤通常会持续数天或是数月。

创伤性损伤对脊髓的伤害会引起神经元细胞和神经胶质细胞的坏死和凋亡。Li等^[9]发现在脊髓受压后的4-9 d, 凋亡细胞逐渐跨越分布于脊髓的多个节段。Yong等^[10]发现当大鼠的脊髓发生严重的挫伤时, 可出现迟发性的脊髓神经细胞凋亡(其中包括神经元细胞, 星形细胞, 少突胶质细胞, 小神经胶质细胞)。因此, 由于继发性损伤所导致的细胞凋亡在脊髓损伤后导致的行为障碍中起到了重要作用。以上研究结果表明神经细胞凋亡是脊髓损伤继发损伤期的重要病理改变, 而且凋亡细胞可以出现在远离损伤中心的其他部位。

细胞凋亡发生的原因和途径是复杂多样的, 许多基因参与细胞凋亡的基因调控, 包括致死基因和存活基因。其中**bcl-2**家族成员在细胞凋亡的基因调控过程中起着至关重要的作用, **bcl-2**家族可以分为两类: 一类是抗细胞凋亡基因, 代表基因是**bcl-2**基因; 另一类是促细胞凋亡基因, 代表基因是**bax**基因, 他们通过激活一系列下游基因发挥调节凋亡作用。实验中神经干细胞移植治疗4, 8周后, 细胞移植组Bax蛋白表达明显高于联合组, 而Bcl-2则相反, 说明神经干细胞联合胶原移植能够促进抗凋亡蛋白表达增加而使促凋亡蛋白相应减少, 提示胶原可能更有利于神经细胞的存活, 其作用机制可能与Bax和Bcl-2蛋白水平有一定相关性。Bax和Bcl-2是一对作用相反的凋亡调控蛋白, 在病理条件下Bax上调加速细胞凋亡, 而Bcl-2上调则促进细胞的存活。Bax与Bcl-2的比值常常决定了细胞在受到凋亡刺激时的生存或死亡。Bcl-2可以和Bax等结合形成异构二聚体抑制细胞凋亡, Bax表达水平增加可拮抗Bcl-2的作用并促进细胞凋亡^[11]。Bcl-2抑制凋亡、保护细胞是通过与Bax形成异源二聚体、阻止Bax的释放来实现的^[12]。而在实验中神经干细胞联合胶原移植的脊髓损伤大鼠的脑组织Bax

也明显下调, 这为神经干细胞联合胶原蛋白支架移植治疗脊髓损伤, 通过调节细胞凋亡蛋白的表达, 进而保护神经细胞提供了重要实验资料。

大脑运动皮质的前部投射到脊髓颈部控制前肢, 大脑运动皮质的后部投射到脊髓腰部控制后肢。在实验中当损伤了大鼠的T₉平面脊髓后, 大鼠表现出后肢运动障碍。因此, 作者选择运动皮质后部来检测该区域神经细胞凋亡情况。实验发现, 在脊髓损伤的大鼠中其大脑运动皮质后部出现了凋亡细胞。这也再次证明, 在脊髓损伤的模型中凋亡细胞可出现在远离受伤中心的区域。Kato等^[13]也有过类似报道, 脊髓损伤后3 d在受伤部位的相邻2个节段发现了细胞凋亡。Crowe等^[14]报道, 在上胸椎损伤的猴子体内发现, C₅水平的脊髓后索和 C₆水平的脊髓小脑束均有凋亡细胞出现。Hains等^[15]报道, 脊髓横断损伤后1周, 在运动皮质锥体细胞层发现了凋亡细胞, 但一旦时间超过2周, 就看不到凋亡细胞了。在实验中脊髓损伤后, 凋亡细胞在运动皮质中的出现也有类似双相性。Kato等^[16]报道, 出现在脊髓背侧角的凋亡细胞只有在伤后一两天才能被观察到。Crowe^[12]认为, 脊髓损伤后的6 h至3周都可在脊髓内发现凋亡细胞。Mattson等^[17]认为, 脊髓受伤后神经细胞的凋亡在8 h后到达峰值, 随后逐渐降低。同时, 他们还发现, 神经胶质细胞的凋亡也存在双相性的改变, 他们在伤后4 h出现, 24 h达到峰值, 然后在伤后第7天出现第二个凋亡峰值。根据Hains等^[15]的研究认为, 虽然运动神经元细胞的凋亡和神经胶质细胞的凋亡之间是否存在什么联系目前尚不清楚, 但皮质脊髓束细胞的凋亡可能会对脊髓内少突神经胶质细胞的死亡起到一定作用。

实验结果显示, 脊髓损伤后大脑运动皮质神经元出现凋亡, 可能在一定程度上限制了肢体功能的恢复。虽然, 目对于大脑皮质神经元凋亡究竟在脊髓损伤后扮演着什么角色, 以及脊髓损伤后大脑皮质神经元的病理变化的机制尚不清楚。但由于对脊髓损伤后大脑皮质神经元凋亡的认识, 不难想到设法阻止大脑皮质神经元发生凋亡可能是促进脊髓损伤患者功能恢复的一种有效方法。

实验就是希望通过在脊髓损伤处植入神经干细胞来研究神经干细胞移植是否能够改善大鼠大脑皮质神经元凋亡的情况。目前对于神经干细胞的特性及它对脊髓损伤的治疗作用已经有了大量研究。神经干细胞是一种存在于中枢神经系统内的, 能够分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞的原始母细胞。2000年Gage^[18]概括神经干细胞的特性为: ①可生成神经组织或来源于神经系统。②具有自我更新能力。③具有迁移能力, 能到达损伤部位并产生新的神经细胞。④通过不对称分裂产生除自身以外的其他细胞。

神经干细胞对于大脑皮质细胞凋亡的影响可能是通过产生神经营养因子来实现的。神经营养因子是神经系统中重要的调节蛋白, 可调节神经元的存活、轴突生长、突触

可塑性和神经递质的产生。体外实验表明, 神经干细胞能分泌脑源性神经营养因子、神经生长因子、血管内皮生长因子、肝细胞生长因子和白细胞介素等营养因子^[19]。Kamei等^[20]将神经干细胞移植到脊髓损伤大鼠体内, 通过免疫组化等手段发现神经干细胞可分泌BDNF、NT-3、NGF等神经营养因子并促进皮质脊髓束轴突的生长。张国庆等^[21]认为, BDNF基因修饰神经干细胞可在损伤脊髓中有效表达, 促进脊髓损伤后Bcl-2的高表达, 同时抑制Bax的表达, 从而降低细胞的凋亡率, 抑制神经细胞的凋亡。Isele等^[22]认为神经干细胞分泌的神经保护因子, 如脑源性神经营养因子, 神经生长因子和血管内皮生长因子等, 可通过激活PI3K/Akt和MAPK/Erk1, 2t信号系统抑制细胞凋亡, 从而保护神经元细胞。实验发现神经干细胞移植能显著减少大脑皮质神经元细胞的凋亡, 进一步证实了以上观点。

综上所述, 脊髓损伤后大脑皮质细胞的改变已开始被人们所认识, 这些变化可能会影响到轴突的再生和功能恢复, 这些变化及其机制有待进一步研究。将脊髓损伤后大脑皮质的变化与现有对脊髓局部变化的研究结果进行整合, 是对脊髓损伤相关研究的补充和完善, 另外对于全面反映脊髓损伤后的神经系统的基本状态, 以及探讨脊髓损伤新的诊疗策略有着相当重要的意义。

结论: 神经干细胞联合胶原蛋白支架移植可抑制脊髓损伤后大脑神经细胞的凋亡, 促进脊髓神经功能的恢复。

致谢: 向上海交大医学院动物实验室、上海市第一人民医院中心实验室、丁浩及赵际童致谢。

作者贡献: 沈强进行实验设计, 实验实施为朱宗昊, 实验评估为丁浩, 资料收集为赵际童, 朱宗昊成文, 丁浩审校, 朱宗昊对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 胶原-是细胞外最重要的水不溶性纤维蛋白, 是构成细胞外基质的骨架。胶原在细胞外基质中形成半晶体的纤维, 给细胞提供抗张力和弹性并在细胞的迁移和发育中起作用。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, et al. Multipotent Mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*. 2005; 80(6): 836-842.
- [2] 韩冰, 付小兵. 间充质干细胞的研究进展与临床应用前景[J]. 中国修复重建外科杂志, 2006, 20(12): 1257-1261.
- [3] 沈强, 赵定麟, Gunther SCHLAG. 颈髓段下行传导束诱发电位动物模型研究[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(7): 633-635.
- [4] 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.
- [5] Collins WF, Piepmeier J, Ogle E. The spinal cord injury problem: a review. *Cent Nerv Syst Trauma*. 1986; 3(4): 317-331.
- [6] Anderson TE, Stokes BT. Experimental models for spinal cord injury research: physical and physiological considerations. *J Neurotrauma*. 1992; 9 Suppl 1: S135-142.
- [7] O'Brien MF, Lenke LG, Lou J, et al. Astrocyte response and transforming growth factor- β localization in acute spinal cord injury. *Spine*. 1994; 19: 2321-2330.
- [8] Williams GT, Smith CA, McCarthy NJ, et al. Apoptosis: final control point in cell biology. *Trends Cell Biol*. 1992; 2(9): 263-267.
- [9] Li GL, Brodin G, Farooque M, et al. Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996; 55: 280-289.
- [10] Yong C, Arnold PM, Zoubine MN, et al. Apoptosis in cellular compartments of rat spinal cord after severe contusion injury. *J Neurotrauma*. 1998; 15(7): 459-472.
- [11] Brooks C, Dong Z. Regulation of mitochondrial morphological dynamics During apoptosis by Bcl-2 family proteins: a key in Bak? *Cell Cycle*. 2007; 6(24): 3043-3047.
- [12] Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 647-656.
- [13] Katoh K, Ikata T, Katoh S, et al. Induction and its spread of apoptosis in rat spinal cord after mechanical trauma. *Neurosci Lett*. 1996; 216(1): 9-12.
- [14] Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, et al. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med*. 1997; 3(1): 73-76.
- [15] 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.
- [16] Kato H, Kanellopoulos GK, Matsuo S, et al. Neuronal apoptosis and necrosis following spinal cord ischemia in the rat. *Exp Neurol*. 1997; 148: 464-474.
- [17] Mattson MP, Rychlik B, Chu C, et al. Evidence for calcium-reducing and excitatory-protective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28k in cultured hippocampal neurons. *Neuron*. 1991; 6(1): 41-51.
- [18] Gage FH. Mammalian neural stem cell. *Science*. 2000; 287(5457): 1433-1438.
- [19] Kuan WL, Barker RA. New therapeutic approaches to Parkinson's disease including neural transplants. *Neurorehabil Neural Repair*. 2005; 19(3): 155-181.
- [20] Kamei N, Tanaka N, Oishi Y. BDNF, NT-3, and NGF released from transplanted neural progenitor cells promote corticospinal axon growth in organotypic cocultures. *Spine*. 2007; 32(12): 1272-1278.
- [21] 张国庆, 燕景锋, 刘世勤. BDNF基因修饰神经干细胞移植对大鼠脊髓损伤后神经细胞凋亡的影响[J]. 山东医药, 2006, 46(14): 22-23.
- [22] Isele NB, Lee HS, Landshamer S, et al. Bone marrow stromal cells mediate protection through stimulation of PI3-K/Akt and MAPK signaling in neurons. *Neurochem Int*. 2007; 50(1): 243-250.