

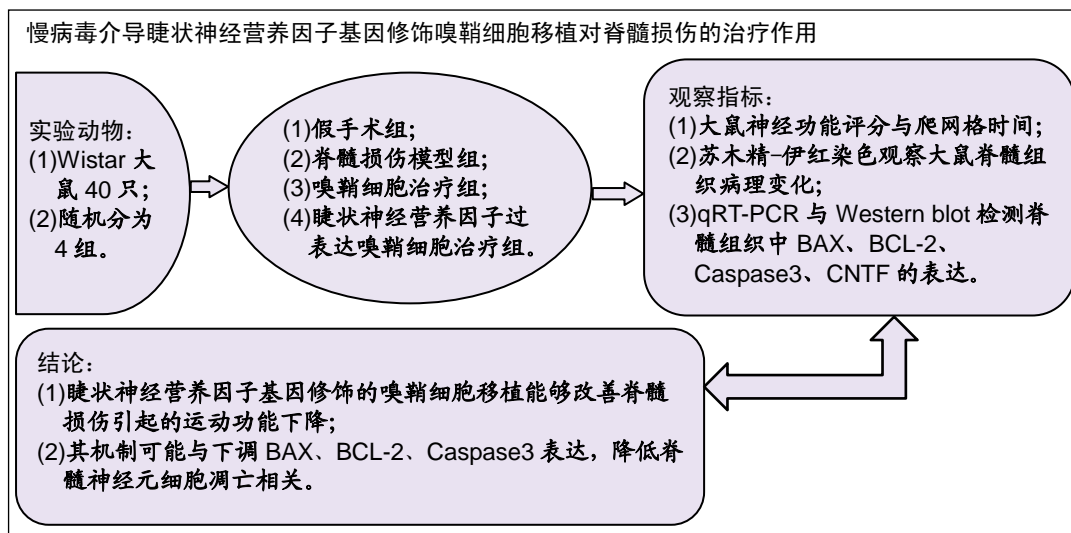
慢病毒介导睫状神经营养因子基因修饰嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤

马洁华¹, 张 丹², 霍艳丽¹, 魏亚伟¹, 孙 琳¹, 赵 宇¹ (¹河北北方学院人体解剖学教研室, 河北省张家口市 075000; ²河北张家口市第一医院口腔科, 河北省张家口市 075000)

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.1723

ORCID: 0000-0002-4848-6893(赵宇)

文章快速阅读:



马洁华, 女, 1980 年生, 河北省石家庄市人, 2013 年河北医科大学毕业, 硕士, 讲师, 主要从事脑损伤修复方面的研究。

通讯作者: 赵宇, 博士, 副教授, 河北北方学院人体解剖学教研室, 河北省张家口市 075000

文献标识码: B
稿件接受: 2019-01-22



文题释义:

睫状神经营养因子: 作为一种神经营养因子, 对颅内损伤后视神经纤维的再生具有关键作用, 可通过释放有丝分裂因子, 促进有丝分裂后神经元的存活以及未成熟背根神经节神经元的发生与分化; 此外, 过表达睫状神经营养因子对于脊髓损伤也具有一定的保护作用。

嗅鞘细胞: 是一种特殊的胶质细胞, 具有神经营养、抑制胶质增生等作用, 为轴突生长提供了适宜的环境, 能够促进中枢神经元再生。嗅鞘细胞移植用于治疗脊髓损伤已经多有报道, 但其效果有限以及作用机制尚不清晰, 同时也存在一些不足之处, 如目前无论是动物实验或是临床试验主要都是嗅球源性嗅鞘细胞, 需要加大嗅黏膜源性嗅鞘细胞的研究应用力度, 解决来源问题或者建立嗅鞘细胞系为后续的研究提供便捷。

摘要

背景: 以往研究证实, 睫状神经营养因子与嗅鞘细胞单独应用均对脊髓损伤具有一定的治疗作用, 但两者联合应用是否有更好的治疗效果尚未见报道。

目的: 慢病毒介导睫状神经营养因子基因修饰嗅鞘细胞移植对大鼠脊髓损伤的作用及其相关机制。

方法: ①体外实验: 实验分为 4 组, 对照组进行脊髓神经元细胞单独培养, 模型组进行脊髓神经元细胞单独培养, 正常嗅鞘细胞共培养组采用 Transwell 小室进行脊髓神经元细胞与正常嗅鞘细胞共培养, 过表达嗅鞘细胞共培养组采用 Transwell 小室进行脊髓神经元细胞与睫状神经营养因子过表达嗅鞘细胞共培养, 后 3 组给予海仁藻酸建立神经元细胞损伤模型。共培养 12 h 后, 采用 CCK8 法检测细胞活力。qRT-PCR 与 Western blot 检测脊髓神经元细胞中 BAX、BCL-2、Caspase3、CNTF 的表达; ②体内实验: 实验分为 4 组, 假手术组、模型组、治疗组、联合治疗组, 后 3 组采用改良 Allen's 重物打击法制作脊髓损伤大鼠模型, 造模 1 周后, 治疗组、联合治疗组分别在损伤区上、下 1 mm 处各注射 5 μ L 嗅鞘细胞悬液或睫状神经营养因子过表达嗅鞘细胞悬液, 假手术组与模型组大鼠依照同样的方法注射等量培养基; ③治疗后 4 周, 采用 BBB 评分与爬网格实验评估大鼠运动能力、苏木精-伊红染色检测脊髓损伤的病理进展、qRT-PCR 与 Western blot 检测脊髓组织中 BAX、BCL-2、Caspase3、CNTF 的表达。

结果与结论: ①睫状神经营养因子基因修饰的嗅鞘细胞能显著抑制细胞损伤以及脊髓损伤($P < 0.001$); 显著提高睫状神经营养因子的表达水平($P < 0.01$)以及显著降低凋亡相关分子 BAX、BCL-2、Caspase3 的表达水平($P < 0.01$); ②睫状神经营养因子基因修饰的嗅鞘细胞移植能够改善脊髓损伤引起的运动功能下降, 其机制可能与下调 BAX、BCL-2、Caspase3 表达, 降低脊髓神经元细胞凋亡相关。

关键词:

脊髓损伤; 嗅鞘细胞; 脊髓神经元细胞; 睫状神经营养因子; 神经元细胞凋亡

中图分类号: R459.9; R394.2

基金资助:

河北省卫生计生委医学科学研究项目(20180809), 项目负责人: 马洁华; 河北省教育厅重点项目(ZD2016094), 项目负责人: 赵宇

Ma Jiehua, Master, Lecturer, Department of Anatomy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

Corresponding author: Zhao Yu, MD, Associate professor, Department of Anatomy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

Lentiviral-mediated transplantation of olfactory ensheathing cells modified by ciliary neurotrophic factor for treatment of spinal cord injury

Ma Jiehua¹, Zhang Dan², Huo Yanli¹, Wei Yawei¹, Sun Lin¹, Zhao Yu¹ (¹Department of Anatomy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China; ²Department of Stomatology, the First Hospital of Zhangjiakou, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have confirmed that both ciliary neurotrophic factor and olfactory ensheathing cells have a certain therapeutic effect on spinal cord injury, but there is no report on whether their combination treatment has a better therapeutic effect.

OBJECTIVE: To explore the effect of lentiviral-mediated transplantation of olfactory ensheathing cells modified with ciliary neurotrophic factor gene in rats with spinal cord injury and its related mechanisms.

METHODS: (1) *In vitro* experiment: There were four groups in the *in vitro* experiment: spinal cord neurons in control group and model group were cultured alone, while in overexpression co-culture group and normal co-culture group, Transwell chamber was used to establish the co-culture model of spinal cord neurons and olfactory ensheathing cells modified by ciliary neurotrophic factor gene or not. Alginate was given to damage the cells in the latter three groups. After 12 hours of co-culture, cell counting kit-8 assay was used to detect cell viability; qRT-PCR and western blot were used to detect the expression of BAX, BCL-2, Caspase 3 and ciliary neurotrophic factor in spinal neurons. (2) *In vivo* experiment: There were four groups in the *in vivo* experiment: sham operation group, model group, treatment group, and combination treatment group. Modified Allen's method was used to make the rat model of spinal cord injury in the latter three groups. At 1 week after modeling, 5 μ L of olfactory ensheathing cell suspension or ciliary neurotrophic factor overexpressing olfactory ensheathing cell suspension was injected 1 mm above and below the injured site in the treatment and combination treatment groups, respectively; similarly, the same volume of culture medium was given in the sham operation and model groups. At 4 weeks after treatment, Basso, Beattie and Bresnahan score and grid-climbing test were conducted to evaluate the motor ability of rats; hematoxylin-eosin staining was used to detect the pathological progression of spinal cord injury; and qRT-PCR and western blot were used to detect the expression of BAX, BCL-2, Caspase 3 and ciliary neurotrophic factor in spinal cord tissues.

RESULTS AND CONCLUSION: Olfactory ensheathing cells modified with ciliary neurotrophic factor gene could significantly alleviate cell injury and spinal cord injury ($P < 0.001$), increase the expression of ciliary neurotrophic factor ($P < 0.01$) and decrease the expression of apoptosis-related molecules BAX, BCL-2 and Caspase 3 ($P < 0.01$). To conclude, transplantation of olfactory ensheathing cells modified by ciliary ganglion neurotrophic factor gene can improve the motor function after spinal cord injury, which may be related to the down-regulation of BAX, BCL-2 and Caspase-3 expression and reduction in the apoptosis of spinal cord neurons

Key words: spinal cord injury; olfactory ensheathing cells; spinal cord neurons; ciliary neurotrophic factor; neuronal apoptosis

Funding: the Medical Research Project of Hebei Provincial Health and Family Planning Commission, No. 20180809 (to MJH); and the Key Project of Hebei Provincial Department of Education, No. ZD2016094 (to ZY)

0 引言 Introduction

脊髓损伤是一种严重的中枢神经系统疾病,在世界范围内都是一种难以治愈的疾病,脊髓损伤的不同位置和程度可导致不同程度的残疾,从感觉或运动功能的部分丧失到受伤部位以下的完全瘫痪,以及急性和慢性并发症,威胁到患者的生命健康^[1]。脊髓损伤患者在生理以及心理上都承受着巨大的压力,随着脊髓损伤发病率的逐年升高,给社会的经济也带来了沉重的负担^[2-3]。根据脊髓损伤的流行病学调查,引发脊髓损伤最常见的原因是高空坠落以及交通事故^[4]。目前临床上用于治疗脊髓损伤的方式有传统药物治疗、手术治疗、基因治疗以及细胞治疗,然而单一因素疗法并不能完全修复脊髓损伤,只能部分缓解症状并减少并发症^[5]。

睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)属于白细胞介素6细胞因子家族成员,是中枢神经系统和外周神经系统具有广泛作用的神经细胞因子^[6]。睫状神经营养因子作为一种神经营养因子,促进颅内损伤后视神经纤维的再生^[7-8];在周围神经再生中也具有关键作用^[9];可通过释放有丝分裂因子,促进有丝分裂后神经元的存活以及未成熟背根神经节神经元的发生与分化^[10-11]。此外,睫状神经营养因子水平上调对于脊髓损伤也具有保护作用^[12]。因此,睫状神经营养因子在缓解神经系统损伤中具有重要作用,但具体的机制尚不明确。

嗅鞘细胞是一种特殊的胶质细胞,具有神经营养、抑

制胶质增生等作用,为轴突生长提供了适宜的环境,能够促进中枢神经元再生^[13]。嗅鞘细胞移植用于治疗脊髓损伤已经多有报道,但其效果有限以及作用机制尚不清晰^[14-16],同时也存在一些不足之处,如目前无论是动物实验或是临床试验主要都是嗅球源性嗅鞘细胞,需要加大嗅黏膜源性嗅鞘细胞的研究应用力度,解决来源问题或者建立嗅鞘细胞系为后续的研究提供便捷。此外,异体移植可能存在免疫排斥而给患者带来不必要的痛苦,因此该研究采用嗅鞘细胞与脊髓神经元细胞共培养以及睫状神经营养因子基因修饰嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤,以期能更好的发挥神经元再生能力并阐述具体的分子机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学与动物学实验分析。

1.2 时间及地点 实验于2016年8月至2018年8月在河北北方学院形态学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 6周龄健康雄性Wistar大鼠40只,体质量200~220 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。大鼠在SPF级环境下饲养,采用12 h交替的光暗周期,自由饮食。实验中对动物的处置严格遵循动物伦理学标准进行。

1.3.2 实验细胞 大鼠原代嗅鞘细胞购自武汉普诺赛公司,货号CP-R113;大鼠脊髓神经元细胞购自Sciencell公

司, 货号R1590。

1.3.3 实验试剂 大鼠嗅鞘细胞专用完全培养基(武汉普诺赛公司); 大鼠脊髓神经元细胞专用培养基(Sciencell公司); 睫状神经营养因子过表达慢病毒(汉恒生物); BAX、BCL-2、Caspase3、CNTF抗体(Abcam公司); BAX、BCL-2、Caspase3、CNTF引物于NCBI进行在线设计, 由上海生工合成; Transwell小室(Corning公司); CCK8试剂盒(东仁化学); TUNEL染色试剂盒(碧云天公司); 海仁藻酸(派克生物)。

1.3.4 实验仪器 酶标仪、超净工作台、细胞培养箱、涡旋振荡器、低温高速离心机、PCR仪、电泳仪、转膜仪、全自动脱水机。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠嗅鞘细胞和大鼠脊髓神经元细胞的培养及鉴定

大鼠嗅鞘细胞的培养及鉴定	
细胞来源:	武汉普诺赛公司
细胞培养基:	DMEM/F12
添加材料:	胎牛血清、碱性成纤维细胞生长因子、青霉素、链霉素
细胞传代:	传2代
细胞鉴定:	细胞经GFAP免疫荧光鉴定, 纯度可达90%以上, 且不含有HIV-1、HBV、HCV、支原体、细菌、酵母和真菌等

大鼠脊髓神经元细胞的培养及鉴定	
细胞来源:	Sciencell公司
细胞培养基:	大鼠脊髓神经元细胞专用培养基
添加材料:	神经生长补充物
细胞传代:	传2代
细胞鉴定:	经MAP2、 β -tubulin III鉴定, 不含有HIV-1、HBV、HCV、支原体、细菌、酵母和真菌等

1.4.2 睫状神经营养因子稳定过表达嗅鞘细胞株的建立 于嗅鞘细胞中加入过表达对照慢病毒或睫状神经营养因子过表达慢病毒, 并设立空白对照组。病毒感染6 h后, 加入嘌呤霉素, 2 d换液1次, 待空白对照组细胞全部死亡, 即初步获得稳定细胞株。继续使用低浓度嘌呤霉素培养基培养2周, 剩余的细胞即为稳定细胞株, 进行扩大培养, 培养液仍包含嘌呤霉素。

1.4.3 嗅鞘细胞与脊髓神经元细胞共培养 实验分组为4组: ①对照组: 脊髓神经元细胞单独培养; ②模型组: 脊髓神经元细胞单独培养+海仁藻酸干预; ③正常嗅鞘细胞共培养组: 脊髓神经元细胞与正常嗅鞘细胞共培养+海仁藻酸干预; ④过表达嗅鞘细胞共培养组: 脊髓神经元细胞与睫状神经营养因子过表达嗅鞘细胞共培养+海仁藻酸干预。

采用Transwell小室建立嗅鞘细胞与脊髓神经元细胞共培养模型。脊髓神经元细胞接种于上室, 细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 接种量为200 μL , 不同表达的嗅鞘细胞接种于下室, 细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 接种量为50 μL 。采用海仁藻

酸建立神经元细胞损伤模型。将海仁藻酸加入上室的脊髓神经元细胞中, 并与嗅鞘细胞进行共培养, 海仁藻酸的终质量浓度为100 mg/L, 共培养12 h后消化细胞接种于96孔板, 24 h后加入10 μL CCK8于培养箱孵育1 h, 检测脊髓神经元细胞的活力。根据测得的活力值, 判断嗅鞘细胞在体外对脊髓神经元细胞损伤是否具有保护作用。

1.4.4 脊髓损伤模型的建立 采用改良Allen's重物打击法制作脊髓损伤大鼠模型。实验前用水合氯醛麻醉大鼠, 大鼠以俯卧位固定, 对背部切口处进行剪毛, 消毒, 通过摸肋骨的方法, 定位T₁₀为中心, 做长约4 cm的切口, 依次切开各皮质组织, 暴露出T₁₀棘突, 用微型咬骨钳咬除T₁₀棘突及椎板, 将T₁₀段脊髓暴露。采用改良的Allen's装置, 先将一打击面直径约3.5 mm圆形薄塑料垫片置于T₁₀脊髓表面, 再用重10 g铁锤从30 mm高处自由落下, 撞击硬膜囊, 造成T₁₀段脊髓冲击伤, 撞击后进行消毒, 缝合, 术后注射青霉素防止感染。

1.4.5 细胞移植 40只Wistar大鼠随机分为4组, 每组10只。假手术组: 单纯暴露T₁₀棘突不进行击打; 模型组: 暴露T₁₀棘突并进行击打; 治疗组: 脊髓损伤+正常嗅鞘细胞移植; 联合治疗组: 脊髓损伤+睫状神经营养因子过表达嗅鞘细胞移植。收集细胞前, 弃去培养基, PBS清洗, 加入不含嘌呤霉素的培养基进行重悬, 细胞浓度为 $5 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$, 改良Allen's重物打击法制作脊髓损伤模型1周后, 分别在损伤区上、下1 mm处各注射5 μL 与实验分组相对应细胞悬液。假手术组与模型组实验动物依照同样的方法注射等量培养基。

1.4.6 BBB评分与行为学检测 细胞移植前1 d、注射后第4周, 将大鼠放入开口箱子, 轻敲箱壁, 使其爬行, 观察动物运动距离, 臀、膝、踝关节行走、躯干运动及其协调情况, 每只大鼠观察15 min, 对各组大鼠的运动能力进行BBB21分测试^[17], 评价各组大鼠脊髓损伤程度; 并于细胞注射前1 d以及注射后第4周对大鼠进行负重, 置于网格上, 网格间距为2.5 cm, 每只大鼠观察5 min, 观察各组大鼠爬网格协调性及负重能力。

1.4.7 苏木精-伊红染色检测脊髓损伤程度 各组动物均于细胞移植4周后处死, 经40 g/L多聚甲醛心脏灌注固定取脊髓组织样本, PBS清洗后置于40 g/L多聚甲醛中固定, 再行脱水、包埋、切片等步骤, 行苏木精-伊红染色, 镜下观察各组脊髓瘢痕和空洞的面积, 评价脊髓损伤程度。

1.4.8 荧光定量PCR检测脊髓神经元细胞与脊髓组织中BAX、BCL-2、Caspase3、CNTF mRNA表达 Trizol法提取脊髓神经元细胞与脊髓组织RNA, 检测RNA浓度、质量与RNA的完整性。根据反转录试剂盒操作说明书将RNA反转录成cDNA, 进行荧光定量PCR检测相关基因mRNA的表达, 检测的Ct值采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算, 引物序列见表1。

1.4.9 蛋白免疫印迹法检测脊髓神经元细胞与脊髓组织中BAX、BCL-2、Caspase3、CNTF的蛋白表达 取脊髓神经元细胞以及脊髓组织, 提取蛋白, 采用BCA法进行蛋

白定量, 计算最终的上样量。蛋白样品高温变性后用 SDS-PAGE凝胶进行分离, 然后将凝胶上的蛋白质转移到 PVDF膜上; 在室温下用5%BSA封闭2 h, 然后分别与BAX、BCL-2、Caspase3、CNTF抗体于4 ℃孵育过夜; 去除一抗, PBST洗涤, 二抗孵育1 h, PBST洗涤, 用ECL发光液进行孵育, X射线胶片于暗室中进行曝光显影。

表 1 RT-PCR 检测引物序列
Table 1 Primer sequences detected by RT-PCR

基因	引物序列(Forward/Reverse)
GAPDH	Forward: 5'- GCA AGA GAG AGG CCC TCA G -3' Reverse: 5'- TGT GAG GGA GAT GCT CAG TG -3'
BAX	Forward: 5'- AAG AAG CTG AGC GAG TGT CTC -3' Reverse: 5'- ATG GTT CTG ATC AGC TCG GG -3'
BCL-2	Forward: 5'- AGC ATG CGA CCT CTG TTT GA -3' Reverse: 5'- TCA CTT GTG GCC CAG GTA TG -3'
Caspase3	Forward: 5'- TGT CCC TAA ACC TGG CTA AGA -3' Reverse: 5'- GGC AGT AGT CGC CTC TGA AG -3'
CNTF	Forward: 5'- ATG GCT TTC GCA GAG CAA AC -3' Reverse: 5'- CAA CGA TCA GTG CTT GCC AC -3'

1.5 主要观察指标 ①睫状神经营养因子在体外对脊髓神经元细胞增殖的影响; ②各组大鼠行为学变化; ③各组大鼠脊髓组织的病理变化; ④各组大鼠BAX、BCL-2、Caspase3、CNTF的表达变化。

1.6 统计学分析 实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 12.0进行数据分析, 进行student's *t* 检验或ANOVA分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 荧光定量PCR与蛋白免疫印迹法验证睫状神经营养因子过表达稳定细胞株 稳定过表达组嗅鞘细胞中睫状神经营养因子mRNA显著升高($P < 0.001$), 睫状神经营养因子蛋白表达量显著增加($P < 0.001$), 见图1。

2.2 CCK8检测睫状神经营养因子过表达嗅鞘细胞对脊髓神经元细胞的保护作用 采用Transwell小室建立嗅鞘细胞与脊髓神经元细胞共培养体系, 并于脊髓神经元细胞中加海仁藻酸制作细胞损伤模型, 24 h后加入CCK8溶液, 测定细胞活力。与对照组相比, 海仁藻酸可以显著抑制脊髓神经元细胞的活性($P < 0.001$); 嗅鞘细胞与脊髓神经元细胞共培养可以抑制海仁藻酸对脊髓神经元细胞的损伤($P < 0.01$); 嗅鞘细胞过表达睫状神经营养因子以后对脊髓神经元细胞损伤的抑制效果更显著($P < 0.01$), 见图2。

2.3 睫状神经营养因子过表达嗅鞘细胞对脊髓损伤的影响 采用改良Allen's重物打击法制作脊髓损伤模型, 随后按照不同的实验分组进行嗅鞘细胞移植。BBB评分结果显示, 脊髓损伤模型建立之后, 大鼠的运动功能几乎丧失($P < 0.001$); 嗅鞘细胞移植4周后, 动物后肢运动能力得到了一定程度的恢复($P < 0.01$); 与正常嗅鞘细胞组相比, 睫状神经营养因子过表达嗅鞘细胞移植后动物运动能力显著改善

($P < 0.05$)。爬网格实验结果也证明, 嗅鞘细胞移植能够显著改善因脊髓损伤丧失的运动能力($P < 0.01$); 睫状神经营养因子过表达嗅鞘细胞组大鼠于网格上攀爬的时间更久($P < 0.05$), BBB评分与爬网格实验结果证实睫状神经营养因子过表达嗅鞘细胞更能有效改善因脊髓损伤引起的运动功能下降, 具有较好的治疗效果, 见图3。

2.4 苏木精-伊红染色检测脊髓损伤的病理进展 与假手术组相比, 脊髓损伤组大鼠脊髓出现明显的损伤, 表现出大量的空洞; 在嗅鞘细胞移植后, 脊髓形态得到了一定程度的恢复; 在移植过表达睫状神经营养因子的嗅鞘细胞后, 脊髓损伤得到了显著性的修复, 见图4。

2.5 荧光定量PCR检测脊髓神经元细胞与脊髓组织中BAX、BCL-2、Caspase3、CNTF的mRNA表达 在海仁藻酸致脊髓神经元细胞损伤以及动物脊髓损伤模型中, CNTF mRNA的表达明显下降($P < 0.001$), 而细胞凋亡因子BAX、BCL-2、Caspase3的mRNA表达显著升高($P < 0.001$); 嗅鞘细胞共培养或移植后, CNTF mRNA的表达得到了一定程度的恢复($P < 0.01$), 细胞凋亡因子BAX、BCL-2、Caspase3的mRNA表达明显被抑制($P < 0.01$); 在嗅鞘细胞中稳定过表达睫状神经营养因子后, CNTF mRNA表达显著升高($P < 0.01$), 细胞凋亡因子BAX、BCL-2、Caspase3的mRNA表达显著下降($P < 0.01$)。因此, 嗅鞘细胞可能是通过释放CNTF抑制细胞凋亡因子的表达, 减轻因脊髓损伤引起的运动功能障碍, 见图5。

2.6 蛋白免疫印迹法检测脊髓神经元细胞与脊髓组织中BAX、BCL-2、Caspase3、CNTF的蛋白表达 在海仁藻酸致脊髓神经元细胞损伤以及动物脊髓损伤模型中, CNTF的蛋白表达明显降低($P < 0.001$), 细胞凋亡相关分子BAX、BCL-2、Caspase3的蛋白表达显著升高($P < 0.001$); 嗅鞘细胞共培养或移植后, CNTF的蛋白表达得到了一定程度的恢复($P < 0.01$), 细胞凋亡因子BAX、BCL-2、Caspase3蛋白的表达明显被抑制($P < 0.01$); 在嗅鞘细胞中稳定过表达睫状神经营养因子后, CNTF的蛋白表达显著升高($P < 0.01$), 细胞凋亡因子BAX、BCL-2、Caspase3的蛋白表达显著下降($P < 0.01$)。因此, 嗅鞘细胞可能是通过CNTF抑制脊髓神经元的凋亡而对脊髓损伤起到了一定程度的保护作用, 见图6。

3 讨论 Discussion

脊髓损伤属于神经损伤的一种, 往往导致损伤节段以下肢体严重的功能障碍, 伴有极为严重的致残率, 对患者的生命造成威胁^[18]。脊髓损伤分为原发性和继发性损伤两种, 原发性损伤主要是由暴力损伤而引起, 可能会直接造成神经元、胶原的即刻性死亡。细胞凋亡是一种常见的生命现象, 脊髓发生损伤后, 多种因素引发脊髓神经元凋亡, 近年来脊髓损伤后的神经修复问题一直是医学界研究的热点和难点, 而其凋亡的机制研究受到广泛关注^[19-21]。睫状神经营养因子

能维持副交感神经节的存活,分布于脊髓灰质、脊髓白质前索以及星形胶质细胞和神经元^[22]。有证据表明睫状神经营养因子表达于正常大鼠的脊髓中,而通过全反式维甲酸降低睫状神经营养因子的表达导致大鼠神经管发育不全,更有研究发现大鼠在发生脊髓损伤后,损伤局部的脊髓神经元以及星形胶质细胞释放睫状神经营养因子至损伤部位,以促进脊髓运动神经元的存活,以及减少神经元的凋亡与坏死进而参与脊髓的修复过程^[23-26]。近期的研究表明,睫状神经营养因子的表达增加可激活信号通路CNTF-JAK-STAT3,调节细胞核转录因子,下调靶蛋白Caspase-9表达,来抑制细胞凋亡和神经元坏死,从而促进神经元存活,最终实现脊髓损伤大鼠后肢功能改善^[27-28]。嗅鞘细胞是目前能够诱导周围神经长入中枢神经的唯一一种胶质细胞,移植入脊髓后能诱导神经再生以及促进损伤脊髓的功能恢复^[29]。嗅鞘细胞主要位于嗅神经纤维和嗅球外层,是嗅觉系统中主要的非神经元细胞,但与大多数神经元细胞不同的是,嗅鞘细胞具有不断再生的能力,很多研究表明嗅鞘细胞移植可促进脊髓损伤的修复^[30],其主要抑制脊髓神经元的凋亡而达到治疗的目的^[31]。

该研究通过二维培养的方式建立嗅鞘细胞与脊髓神经元细胞共培养模型,并通过海仁藻酸对脊髓神经元细胞造成损伤,CCK8实验结果证实嗅鞘细胞可以减轻海仁藻酸对脊髓神经元细胞的损伤;过表达睫状神经营养因子后,嗅鞘细胞对脊髓神经元细胞的保护作用更为明显。荧光定量PCR与蛋白免疫印迹实验表明,嗅鞘细胞能够抑制海仁藻酸引起的脊髓神经元细胞凋亡;过表达睫状神经营养因子后,嗅鞘细胞更为显著地抑制凋亡分子的表达。

该研究还通过改良Allen's重物打击法制作大鼠脊髓损伤模型,并于脊髓损伤1周后在损伤部位注射过表达睫状神经营养因子的嗅鞘细胞,以观察其对大鼠脊髓损伤的治疗作用。BBB评分以及爬网格实验证实脊髓损伤模型建立是成功的,注射嗅鞘细胞4周后,大鼠行动能力得到一定程度的恢复,睫状神经营养因子过表达嗅鞘细胞移植组的改善效果更显著;苏木精-伊红染色结果表明睫状神经营养因子过表达嗅鞘细胞移植能够更好地减少脊髓瘢痕和缩小空洞面积;荧光定量与蛋白免疫印迹实验结果说明睫状神经营养因子过表达显著抑制凋亡相关分子的表达,即嗅鞘细胞过表达睫状神经营养因子后,可通过抑制脊髓神经元凋亡,从而减轻脊髓损伤的症状。

综上所述,体内、体外实验结果表明,睫状神经营养因子过表达的嗅鞘细胞可通过抑制脊髓神经元凋亡从而减轻脊髓损伤程度。然而,其中具体的分子作用机制还需进一步的研究去阐述。

作者贡献: 实验设计为赵宇,实验实施为马洁华、张丹、霍艳丽,实验评估为孙琳,资料收集为魏亚伟。

经费支持: 该文章接受了“河北省卫生计生委医学科学研究项目(20180809)”“河北省教育厅重点项目(ZD2016094)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经河北北方学院实验动物伦理委员会批准,批准号为 2017-1-0-03。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过河北北方学院生物统计学专家审核。

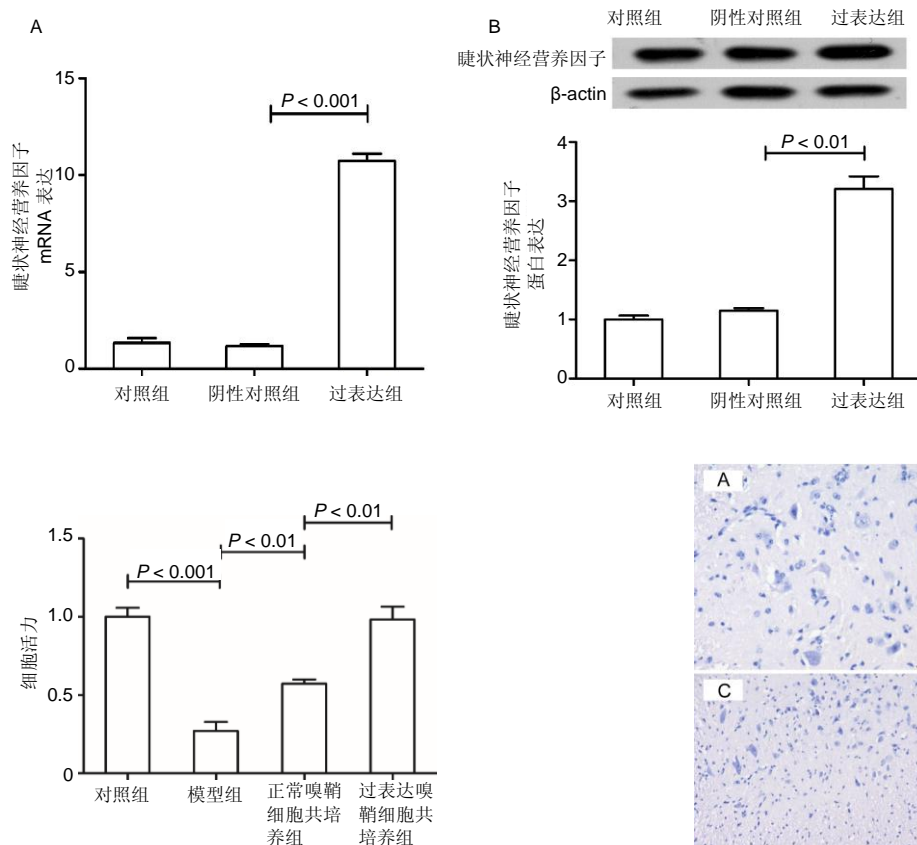
文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Fan B, Wei Z, Yao X, et al. Microenvironment Imbalance of Spinal Cord Injury. *Cell Transplant*. 2018;27(6):853-866.
- [2] Ahuja CS, Nori S, Tetreault L, et al. Traumatic Spinal Cord Injury- Repair and Regeneration. *Neurosurgery*. 2017;80(3S):S9-S22.
- [3] Furlan JC, Fehlings MG. The impact of age on mortality, impairment, and disability among adults with acute traumatic spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2009;26(10):1707-1717.
- [4] Wu Q, Li YL, Ning GZ, et al. Epidemiology of traumatic cervical spinal cord injury in Tianjin, China. *Spinal Cord*. 2012;50(10): 740-744.
- [5] Raspa A, Pugliese R, Maleki M, et al. Recent therapeutic approaches for spinal cord injury. *Biotechnol Bioeng*. 2016;113(2): 253-259.
- [6] Lee N, Rydyznski CE, Rasch MS, et al. Adult ciliary neurotrophic factor receptors help maintain facial motor neuron choline acetyltransferase expression in vivo following nerve crush. *J Comp Neurol*. 2017;525(5): 1206-1215.
- [7] Cen LP, Liang JJ, Chen JH, et al. AAV-mediated transfer of RhoA shRNA and CNTF promotes retinal ganglion cell survival and axon regeneration. *Neuroscience*. 2017;343:472-482.
- [8] Yin DP, Chen QY, Liu L. Synergetic effects of ciliary neurotrophic factor and olfactory ensheathing cells on optic nerve reparation (complete translation). *Neural Regen Res*. 2016;11(6):1006-1012.
- [9] Lee N, Serbinski CR, Braunlin MR, et al. Muscle and motor neuron ciliary neurotrophic factor receptor α together maintain adult motor neuron axons in vivo. *Eur J Neurosci*. 2016;44(12):3023-3034.
- [10] Gu Y, Wang J, Ding F, et al. Neurotrophic actions of bone marrow stromal cells on primary culture of dorsal root ganglion tissues and neurons. *J Mol Neurosci*. 2010;40(3):332-341.
- [11] Wen SY, Li AM, Mi KQ, et al. In vitro neuroprotective effects of ciliary neurotrophic factor on dorsal root ganglion neurons with glutamate-induced neurotoxicity. *Neural Regen Res*. 2017;12(10):1716-1723.
- [12] Feng GY, Liu J, Wang YC, et al. Effects of Alpha-Synuclein on Primary Spinal Cord Neurons Associated with Apoptosis and CNTF Expression. *Cell Mol Neurobiol*. 2017;37(5):817-829.
- [13] Yao R, Murtaza M, Velasquez JT, et al. Olfactory Ensheathing Cells for Spinal Cord Injury: Sniffing Out the Issues. *Cell Transplant*. 2018;27(6): 879-889.
- [14] Wright AA, Todorovic M, Tello-Velasquez J, et al. Enhancing the Therapeutic Potential of Olfactory Ensheathing Cells in Spinal Cord Repair Using Neurotrophins. *Cell Transplant*. 2018;27(6):867-878.
- [15] Haggerty AE, Maldonado-Lasunción I, Oudega M. Biomaterials for revascularization and immunomodulation after spinal cord injury. *Biomed Mater*. 2018;13(4):044105.

- [16] Nakhjavan-Shahraki B, Yousefifard M, Rahimi-Movaghar V, et al. Transplantation of olfactory ensheathing cells on functional recovery and neuropathic pain after spinal cord injury; systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2018;8(1):325.
- [17] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study. *J Neurotrauma*. 1996;13(7): 343-359.
- [18] 岳妍, 谭波涛, 刘媛, 等. FTY720对急性脊髓损伤大鼠神经功能及血脊髓屏障的影响[J]. 解放军医学杂志, 2015, 40(3): 200-205.
- [19] Stevens RD, Bhardwaj A, Kirsch JR, et al. Critical care and perioperative management in traumatic spinal cord injury. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2003;15(3):215-229.
- [20] Lang-Lazdunski L, Heurteaux C, Mignon A, et al. Ischemic spinal cord injury induced by aortic cross-clamping: prevention by riluzole. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2000;18(2):174-181.
- [21] Yu WR, Liu T, Fehlings TK, et al. Involvement of mitochondrial signaling pathways in the mechanism of Fas-mediated apoptosis after spinal cord injury. *Eur J Neurosci*. 2009;29(1):114-131.
- [22] Manthorpe M, Skaper SD, Williams LR, et al. Purification of adult rat sciatic nerve ciliary neurotrophic factor. *Brain Res*. 1986; 367(1-2): 282-286.
- [23] 习杨彦彬, 王廷华. CNTF基因在正常大鼠和猫脊髓组织中的表达[J]. 昆明医科大学学报, 2006, 27(6):34-37.
- [24] 曾洪艳, 李力燕, 郭小兵, 等. 神经营养因子、凋亡相关因子和轴突导向因子在大鼠神经管畸形发育中的表达[J]. 昆明医科大学学报, 2012, 33(11):13-18.
- [25] Tripathi RB, McTigue DM. Chronically increased ciliary neurotrophic factor and fibroblast growth factor-2 expression after spinal contusion in rats. *J Comp Neurol*. 2008;510(2):129-144.
- [26] Yetiser S, Kahraman E. An analysis of time-dependent changes of neurotrophic factors (BDNF, CNTF) in traumatic facial nerve injury of a nerve-cut and nerve-crush model in rats. *Otol Neurotol*. 2008; 29(3): 392-396.
- [27] Santos MD, Yasuike M, Kondo H, et al. A novel type-1 cytokine receptor from fish involved in the Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (Jak/STAT) signal pathway. *Mol Immunol*. 2007;44(13): 3355-3363.
- [28] 陈珊珊, 郭小兵, 金华, 动脉移植BMSCs对大鼠缺血再灌注损伤脊髓CNTF和STAT3的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2014, 31(6):492-496.
- [29] 李越, 余化霖, 陈莉发, 等. 嗅球成鞘细胞植入大鼠挫伤脊髓内的迁移分布特征[J]. 中华创伤杂志, 2011, 27(1):78-82.
- [30] 姜泳, 迟晓飞, 邹喜军, 等. 重复经颅磁刺激联合嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(1):98-102.
- [31] 布林, 郑鸿, 姜汉国, 等. 移植神经生长因子和脑衍生神经生长因子基因修饰的嗅鞘细胞对脊髓损伤后细胞凋亡的影响[J]. 中国组织工程研究, 2005, 9(18):124-125.



图注: 图中 A 表示睫状神经营养因子 mRNA 的表达量; B 表示睫状神经营养因子的蛋白表达量。

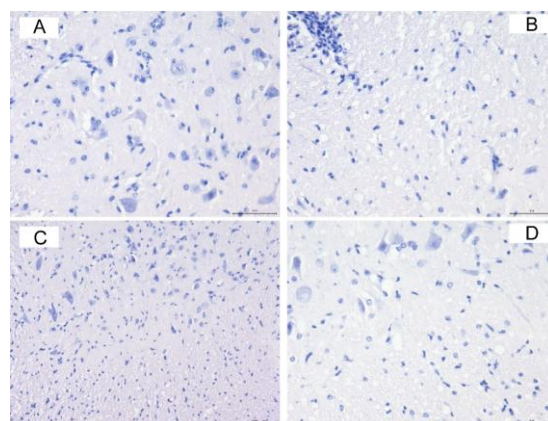
图 1 嗅鞘细胞中睫状神经营养因子的表达

Figure 1 Expression of ciliary neurotrophic factor in olfactory ensheathing cells

图注: 与对照组相比, 模型组细胞活力明显下降, 嗅鞘细胞共培养组细胞活力明显恢复, 而过表达嗅鞘细胞共培养组的治疗效果更佳。

图 2 睫状神经营养因子过表达嗅鞘细胞对脊髓神经元细胞活力的影响

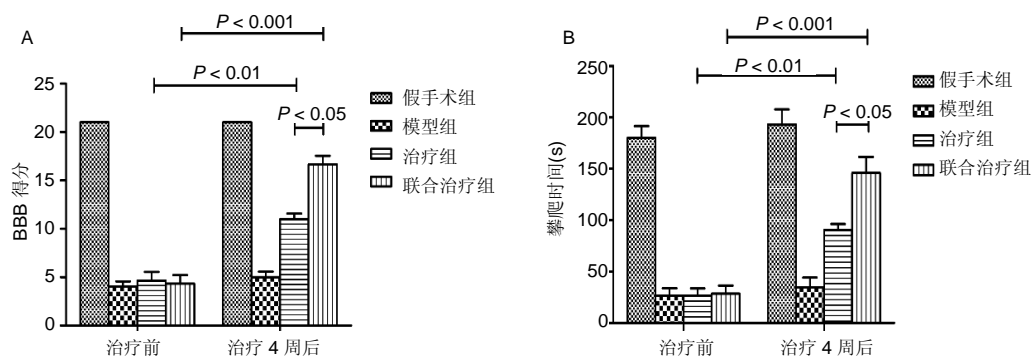
Figure 2 Expression of olfactory ensheathing cells overexpressing ciliary neurotrophic factor on the viability of spinal cord neurons



图注: 图中 A 为假手术组; B 为模型组; C 为治疗组; D 为联合治疗组。与假手术组相比, 模型大鼠脊髓出现明显的损伤, 表现出大量的空洞; 在嗅鞘细胞移植后, 脊髓形态得到了一定程度的恢复; 在移植过表达睫状神经营养因子的嗅鞘细胞后, 脊髓损伤得到了显著性的修复。

图 4 各组大鼠脊髓组织苏木精-伊红染色(x400)

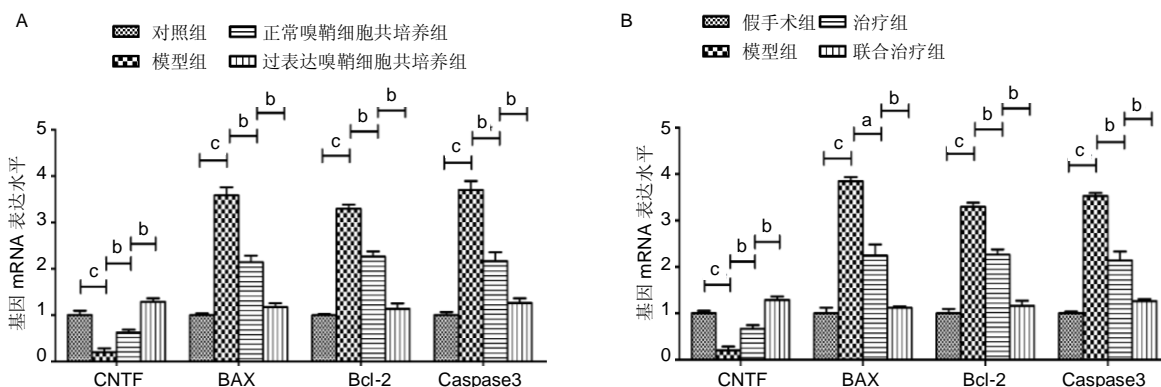
Figure 4 Hematoxylin-eosin staining of spinal cord tissue of rats in each group (x400)



图注: 图中 A 为神经功能评分, B 为爬网格时间。治疗前, 各组大鼠与假手术组大鼠相比, 其神经功能评分与爬网格能力明显下降; 治疗 4 周后, 治疗组与联合治疗组大鼠的神经功能评分与爬网格能力明显恢复, 而联合治疗组的恢复效果更好。

图 3 各组大鼠 BBB 评分与爬网格实验结果

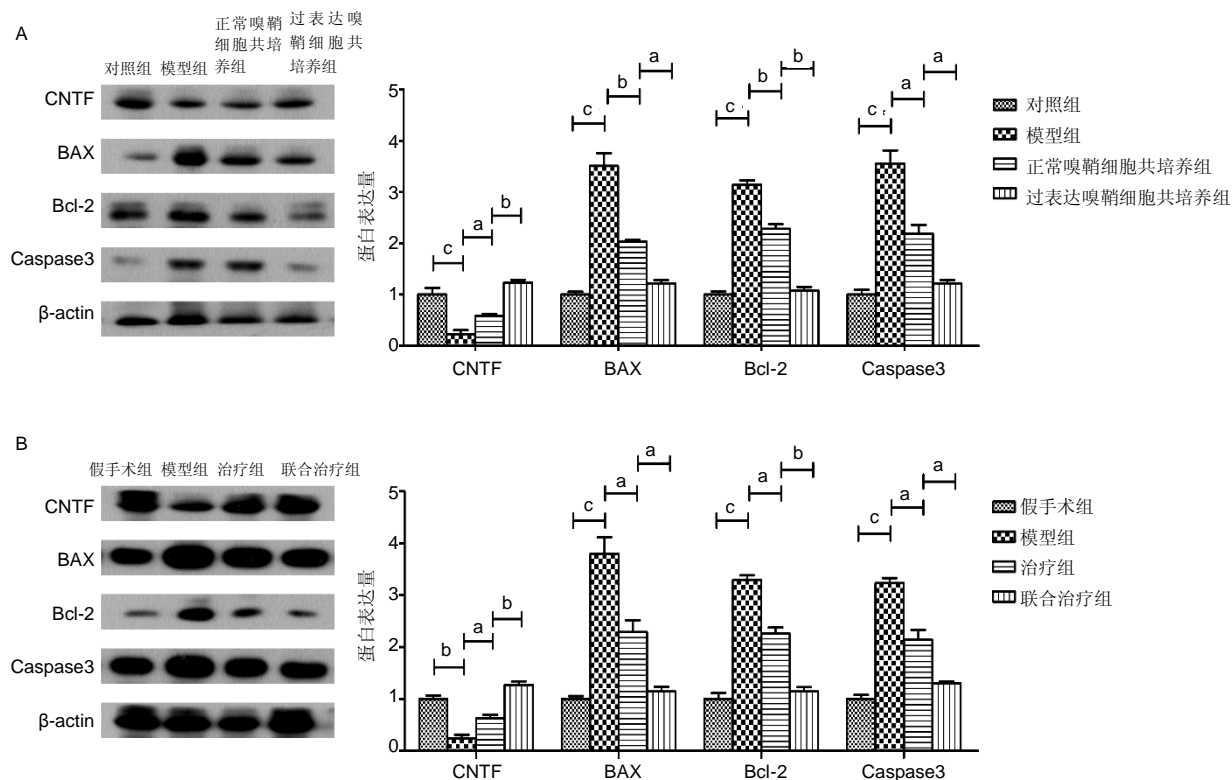
Figure 3 Basso, Beattie and Bresnahan score and grid-climbing test results of rats in each group



图注: 图中 A 为脊髓神经元细胞中相关因子的 mRNA 表达水平; B 为大鼠脊髓组织中相关因子的 mRNA 表达水平。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$ 。

图 5 脊髓神经元细胞与脊髓组织中 BAX、BCL-2、Caspase3、CNTF 的 mRNA 表达

Figure 5 Expression of BAX, BCL-2, Caspase3 and ciliary neurotrophic factor mRNA in spinal cord neurons and spinal cord tissues



图注: 图中 A 为脊髓神经元细胞中相关因子的蛋白表达水平; B 为大鼠脊髓组织中相关因子的蛋白表达水平。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$ 。

图 6 脊髓神经元细胞与脊髓组织中 BAX、BCL-2、Caspase3、CNTF 的蛋白表达

Figure 6 Expression of BAX, BCL-2, Caspase3 and ciliary neurotrophic factor proteins in spinal cord neurons and spinal cord tissues