

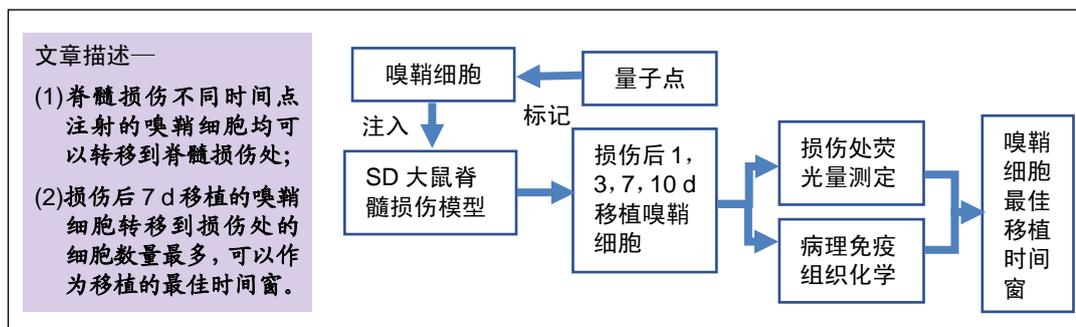
不同时间点静脉移植嗅鞘细胞修复脊髓损伤

陈 焱^{1,2}, 张利剑^{1,2}, 蓝远翔^{1,2}, 吴易洋¹, 夏鹤春^{2,3} (1宁夏医科大学临床医学院, 宁夏回族自治区银川市 750003; 2宁夏人类干细胞研究所, 宁夏回族自治区银川市 750004; 3宁夏医科大学总医院神经外科, 宁夏回族自治区银川市 750004)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2075

ORCID: 0000-0002-5853-5265(陈焱)

文章快速阅读:



陈焱, 男, 1993 年生, 陕西省西安市人, 汉族, 宁夏医科大学在读硕士, 主要从事脊髓损伤修复研究。

通讯作者: 夏鹤春, 主任医师, 教授, 博士生导师, 宁夏医科大学总医院, 宁夏回族自治区银川市 750004

文献标识码: B

投稿日期: 2019-09-21

送审日期: 2019-09-24

采用日期: 2019-11-15

在线日期: 2020-03-16



文题释义:

量子点(quantum dot, QD): 又可称为半导体纳米微晶体(semiconductor nanocrystal), 是一种由 II-VI 族或 III-V 族元素组成的稳定的、溶于水的、尺寸在 2-20 nm 之间的纳米晶粒。目前研究较多的是 CdS、CdSe、CdTe、ZnS 等。

干细胞示踪: 干细胞示踪是指应用外源示踪剂转染标记干细胞, 将干细胞移植到生物体内, 利用影像学等技术观察植入生物体内干细胞的分布、存活、迁移、分化和功能等, 称之为干细胞示踪。

摘要

背景: 嗅鞘细胞具有促进轴突再生、为受伤的宿主细胞提供营养支持以及调节炎症反应的能力, 是修复脊髓损伤具有潜力的细胞。

目的: 探讨通过静脉移植嗅鞘细胞治疗脊髓损伤的最佳移植时间窗。

方法: SPF 雄性 SD 大鼠 30 只, 采用脊髓半横断建立大鼠脊髓损伤模型, 并随机分为 5 组: 脊髓损伤后注射嗅鞘细胞 1 d 移植组、3 d 移植组、7 d 移植组、10 d 移植组及 PBS 对照组。应用荧光量子点标记嗅鞘细胞; 分别于 1, 3, 7, 10 d 时间点通过尾静脉移植应用量子点标记的嗅鞘细胞; PBS 对照组脊髓损伤后注射 PBS。注射后 1 d 取损伤处的脊髓; 应用小动物成像仪测定不同时间点转移到损伤处荧光的数值, 通过荧光的强度衡量转移到损伤处细胞的量; 应用嗅鞘细胞 Anti-p75 NGF Receptor 抗体做损伤处脊髓的免疫组织化学。实验方案经宁夏医科大学动物实验伦理委员会批准(编号: 2017-073)。

结果与结论: ① 荧光量子点可以标记嗅鞘细胞; ② 荧光测定结果与免疫组织化学染色结果: 1, 3, 7, 10 d 时间点通过尾静脉移植的嗅鞘细胞均有细胞转移到损伤处, 7 d 移植的嗅鞘细胞转移到损伤处的最多; ③ 结果说明, 脊髓损伤不同时间点注射的嗅鞘细胞均可以转移到脊髓损伤处, 损伤后 7 d 移植的嗅鞘细胞转移到损伤处的细胞数量最多, 可以作为移植的最佳时间窗。

关键词:

脊髓损伤; 嗅鞘细胞; 静脉移植; 量子点; 移植时间窗

中图分类号: R446; R496; R318

Intravenous transplantation of olfactory ensheathing cells at different time points for repairing spinal cord injury

Chen Yao^{1,2}, Zhang Lijian^{1,2}, Lan Yuanxiang^{1,2}, Wu Yiyang¹, Xia Hechun^{2,3} (1School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750003, Ningxia Hui Autonomous Region, China; 2Ningxia Human Stem Cell Institute, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; 3Department of Neurosurgery, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: Olfactory ensheathing cells promote axonal regeneration, provide nutritional support for the injured host cells and regulate inflammation reaction, which possess potential for spinal cord injury repair.

OBJECTIVE: To explore the optimal time window for intravenous transplantation of olfactory ensheathing cells in the treatment of spinal cord injury.

METHODS: Thirty male SPF level rats were used to establish the rat models of spinal cord injury by spinal cord hemisection. Rat models were then randomly divided into five groups: 1-, 3-, 7- and 10-day olfactory ensheathing cell transplantation and PBS groups. Olfactory ensheathing cells were labeled with fluorescent quantum dots. PBS was injected into the rats in the PBS group after spinal cord injury. The injured spinal cord was removed at 1 day after injection. A small animal imager was used to measure the fluorescence transferred to the lesion at different

Chen Yao, Master candidate, School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750003, Ningxia Hui Autonomous Region, China; Ningxia Human Stem Cell Institute, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Corresponding author: Xia Hechun, Chief physician, Professor, Doctoral supervisor, Ningxia Human Stem Cell Institute, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; Department of Neurosurgery, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

time points. The number of cells transferred to the lesion was measured based on the intensity of fluorescence. The Anti-p75 NGF Receptor antibody was used for immunohistochemistry detection of the injured spinal cord. The study was approved by the Ethics Committee of Animal Laboratory of Ningxia Medical University, No. 2017-073.

RESULTS AND CONCLUSION: Fluorescent quantum dots could label olfactory ensheathing cells. Results of fluorescence assay and immunohistochemistry indicated that transplanted olfactory ensheathing cells were transferred to the lesion at 1, 3, 7 and 10 days. Most cells were transferred to the lesion at 7 days. Therefore, these results indicate that olfactory ensheathing cells transplanted at different time points after spinal cord injury can be transferred to the lesion, with a number peak at 7 days that is the best time window for cell transplantation.

Key words: spinal cord injury; olfactory ensheathing cells; vein graft; quantum dot; time window of transplantation

0 引言 Introduction

脊髓损伤的特征是受损神经元无法自我修复或自我再生, 导致脊髓损伤患者在损伤部位以下永久性瘫痪。细胞移植是最有前途的治疗方法之一, 有望产生良好的效果。采用神经干细胞^[1]、许旺细胞^[2]、骨髓间充质细胞^[3-4]、嗅鞘细胞移植的方法^[4], 均有益于脊髓损伤的修复。在这些细胞中, 嗅鞘细胞是最有希望的移植细胞, 因为嗅鞘细胞可以自体移植降低自身免疫排斥反应^[5]; 另外嗅鞘细胞移植后, 有营养神经、瘢痕抑制以及成鞘作用的多种神经营养因子和神经黏附因子会被嗅鞘细胞释放, 提供了适宜轴突生长的微环境^[6]。但是, 嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤在向临床进行转化还有诸多困难问题需解决, 其中之一是选择移植嗅鞘细胞的最佳时间窗。该研究通过观察不同时间点移植嗅鞘细胞聚集到损伤处细胞量的多少, 探讨通过静脉移植嗅鞘细胞的最佳时间窗, 促进嗅鞘细胞治疗脊髓损伤向临床转化。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验观察。

1.2 时间及地点 实验于2018年12月至2019年4月在宁夏医科大学总医院人类干细胞研究所完成。

1.3 材料 SPF雄性SD大鼠30只, 体质量250-300 g, SD新生鼠用于嗅鞘细胞提取, 实验动物均由宁夏医科大学动物中心提供, 许可证号: SCXK(宁)2015-0001。DMEM/F12培养基、胰蛋白酶、青/链双抗、BSA小牛血清白蛋白、PBS、D-Hanks液(GIBCO公司); 胎牛血清(BI公司); 量子点(苏州星烁纳米公司); 异氟烷与大鼠麻醉机(深圳瑞沃得公司); P75NGFR(abcam公司); 恒温培养箱(Thermo公司), CKX-41荧光显微镜、IX51倒置显微镜、SZX16解剖显微镜(Olympus公司); 小动物成像仪(BRUKER公司); 切片仪(上海徕卡仪器有限公司, 型号: RM2245); 烘箱(上海精宏实验设备有限公司); 普通光学显微镜(重庆光电仪器有限公司, 型号: XSP-C204)。

1.4 实验方法

1.4.1 嗅鞘细胞的复苏、传代培养 将冻存的嗅鞘细胞置入38℃水浴锅中快速溶解, 在超净台中, 将含有细胞的冻存液移到15 mL离心管, 加入2 mL培养基, 离心后弃上清。加入2 mL新鲜培养基, 制成细胞悬液, 接种到培养皿里, 根据细胞的生长情况进行常规传代培养^[7]。

1.4.2 用荧光标记嗅鞘细胞

(1)量子点标记嗅鞘细胞: 选取生长状态良好的第3代细胞, 将含有血清的培养基吸出, 每个10 cm的大皿中加入4 mL无血清培养基, 之后将10 μL的量子点稀释到无血

嗅鞘细胞的培养及鉴定

细胞来源:	取SD新生鼠嗅黏膜, 按文献 ^[7] 的方法分离、纯化和培养嗅鞘细胞
培养基介绍:	DMEM/F12 培养基
添加材料:	体积分数5%胎牛血清, 青链霉素
培养时间:	48 h
细胞传代:	细胞生长融合至70%-80%按1:2进行传代, 冻存
细胞鉴定:	共聚焦显微镜下P75和GFAP双染均为阳性的为嗅鞘细胞
伦理学批准情况:	实验方案经宁夏医科大学总医院动物实验伦理委员会批准(批准号为2017-073)

清培养基中, 在细胞培养箱内(温度37℃, 体积分数5%CO₂)孵育2 h; 将含有量子点的无血清培养液洗出, 磷酸盐缓冲液清洗, 在荧光显微镜下用绿色荧光激发, 观察嗅鞘细胞标记状态及细胞转染状态^[8]。

(2)DIPA标记嗅鞘细胞: 弃掉旧液, 加入4 mL新鲜培养基, 加入0.2 mL DIPA工作液, 孵育2 h, 荧光显微镜观察细胞核。

上述方法进行量子点标记嗅鞘细胞后, 胰蛋白酶消化细胞, 细胞计数板计数, 调整浓度为 $1 \times 10^9 L^{-1}$, 备移植用。

1.4.3 脊髓损伤模型的建立 采用脊髓半横断建立大鼠脊髓损伤模型。用麻醉机对大鼠进行麻醉, 调节异氟烷在氧气中的浓度为2.0%-2.5%, 根据棘突的体表及腹肋定位确定T₁₃, 依次查找T₈-T₁₂确定手术切口后, 将手术区域剪毛处理, 用碘伏、体积分数75%乙醇彻底消毒皮肤。取背部正中切口, 逐层切开大鼠皮肤、皮下组织、筋膜、肌肉等。沿棘突向两侧剥离脊旁肌肉, 显露T₉-T₁₁棘突及相应椎板。咬除T₉-T₁₁棘突, 用弯血管钳从脊柱侧面缝隙进入, 咬除椎板, 充分暴露相应脊髓节段, 采用1 mL注射器针头, 切近脊髓中动脉垂直进针, 触及到椎板, 向外切断脊髓, 并反复切割3次, 以确保充分分离, 造成脊髓损伤大鼠脊髓半横断损伤模型。

1.4.4 动物分组与嗅鞘细胞注射 筛选出造模成功的大鼠, 随机分为5组, 每组5只: 分别于脊髓损伤1, 3, 7, 10 d后注射嗅鞘细胞(1 d移植组, 3 d移植组, 7 d移植组, 10 d移植组); 脊髓损伤后注射PBS(PBS对照组)。将准备好的1 mL嗅鞘细胞(细胞浓度为 $1 \times 10^9 L^{-1}$)用注射器通过尾静脉移植至造模成功大鼠。具体操作方法: 先用麻醉机将大鼠麻醉, 助手用血管钳轻轻夹持大鼠尾静脉, 使静脉充盈, 之后用1 mL注射器使针头平行尾静脉进针, 穿刺点为尾静脉中远端1/3处, 进针成功后回抽注射器有明显回血, 均匀用力2 min内注射完毕, 拔针后针眼处会有明显出血,

表明注射成功。

实验动物造模过程的相关问题

造模目的	探讨通过静脉移植嗅鞘细胞治疗脊髓损伤的最佳移植时间点
借鉴已有标准实施动物造模	建立大鼠脊髓半横断损伤模型 ^[6]
动物来源及品系	SD 大鼠由宁夏医科大学动物中心提供
造模技术描述	显露 T ₉ -T ₁₁ 棘突及相应椎板。咬除 T ₉ -T ₁₁ 棘突, 咬除椎板, 充分暴露相应脊髓节段, 采用 1 mL 注射器针头, 切近脊髓中动脉垂直进针, 触及到椎板, 向外切断脊髓, 并反复切割 3 次, 以确保充分离断
造模成功标志	行大鼠脊髓半切损伤术时, 以看到大鼠损伤侧脊髓后肢轻度抽搐及尾巴翘起视为造模成功
动物数量及分组方法	成功的大鼠分为 5 组: 1 d 移植组 n=5; 3 d 移植组 n=5; 7 d 移植组 n=5; 10 d 移植组 n=5; PBS 对照组 n=5
造模后动物处理	各组在注射嗅鞘细胞 24 h 后, 对照组在损伤后 24 h, 麻醉后, 以 T ₁₀ 为中心, 完整取出长约 2 cm 的脊髓组织, 待进一步检测
伦理委员会批准	实验方案经宁夏医科大学总医院动物实验伦理委员会批准(批准号为: 2017-073)

1.4.5 聚集在脊髓损伤处荧光值 各组在注射嗅鞘细胞 24 h 后, 对照组在损伤后 24 h, 麻醉后, 以 T₁₀ 为中心, 完整取出长约 2 cm 的脊髓组织。应用小动物成像仪检测脊髓损伤处的荧光。具体操作步骤为, 将待测脊髓按照分组摆放在成像平台, 软件控制平台的升降到一个合适视野, 自动开启照明灯拍摄第一次背景图(见图 1)。之后, 在没有外界光源的条件下拍摄由荧光发出的光, 即为荧光成像。下一步, 应用软件完成图像分析过程, 用圆形图标选取脊髓损伤处的区域, 当选定区域后, 软件可以计算出所选区域发出的光子数, 从而获得实验数据。

1.4.6 免疫组织化学染色

(1) 烤片: 将玻片放在玻片架上置于烘箱(温度 60 °C)中烘烤 30 min。脱蜡: 将玻片依次放入二甲苯 I, 二甲苯 II, 二甲苯 III 各 10 min。水化: 将玻片分别放入体积分数 100% 乙醇 5 min, 95% 乙醇 5 min, 90% 乙醇 5 min, 80% 乙醇 5 min, 70% 乙醇 5 min, 最后自来水冲洗 10 min。修复: 将玻片用 0.01 mol/L 的 PBS 浸泡 5 min, EDTA 高压热修复 3 min, 再用 PBS 洗涤 5 min×4 次。灭活: 将玻片放置在 0.01 mol/L PBS 浸泡 5 min×4 次, 然后将玻片放在湿盒内, 用吸水纸擦去玻片上过多的水分, 加入体积分数 3% H₂O₂ 的水溶液中 10 min(按照 100 mL 30% H₂O₂ 加 900 mL 的去离子水配制)。洗涤: 将玻片放置在 0.01 mol/L PBS 浸泡 5 min×4 次。封闭: 加上 100 μL 的血清室温孵育 40 min。一抗孵育: 擦去过多的血清, 勿洗, 加入一抗 NGFR5 N 4 °C 孵育过夜。复温: 室温复温 45 min, 然后用 0.01 mol/L PBS 浸泡 5 min×4 次。

(2) 二抗孵育: 滴加 HRP 标记的二抗, 37 °C 孵育 30 min。洗涤: PBS(0.01 mol/L)清洗 5 min×4 次。显色: DAB 显色 2-10 min, 直至镜检中棕黄色至理想的结果, 用

去离子水终止显色实验。洗涤: 将终止显色的玻片用自来水冲洗 10 min。复染: 苏木精染色 2 min, 用自来水冲洗 10 min。分化: 复染过的玻片, 然后用 1% 的盐酸乙醇分化数秒, 除去与组织非特异性结合的苏木素染液(苏木素染细胞核), 再用自来水冲洗 10 min。蓝化: 0.5% 的稀氨水浸泡 30 s, 再用自来水冲洗 10 min。脱水透明: 将已冲洗的玻片按照 70% 乙醇, 80% 乙醇, 90% 乙醇, 95% 乙醇, 100% 乙醇, 二甲苯各 5 min 进行实验。封固: 用中性树胶封固, 然后置于晾片板上在通风橱内凝固。显微镜下拍照。观察嗅鞘细胞在脊髓损伤区域的存活、分布等。

1.5 主要观察指标 ①大鼠荧光标记的嗅鞘细胞及形态; ②聚集在大鼠脊髓损伤处的荧光测定结果; ③大鼠脊髓组织免疫组织化学结果。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 21 统计软件进行统计学分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, 两两比较时用 S-N-K 法, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用造模成功大鼠 25 只, 分为 5 组, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 荧光标记的嗅鞘细胞及形态 嗅鞘细胞的生物学特性: 细胞大多数呈梭形, 形态呈现出典型的双极、三级(图 2A)。荧光量子点标记嗅鞘细胞: 用绿色荧光光源激发, 细胞质呈现出均匀的红色荧光, 细胞核无荧光, 并且有很高标记率(图 2B)。DIPA 转染嗅鞘细胞: 用青色荧光光源激发, 细胞核呈现出蓝色荧光, 细胞质无荧光(图 2C)。将不同的荧光标记图片整合, 细胞核在细胞中央(蓝色荧光), 胞质为均匀的红色荧光(图 2D)。

2.3 聚集在损伤处的荧光测定结果 除 PBS 对照各组大鼠脊髓损伤处均有荧光聚集, 单因素方差分析, 各组结果差异有显著性意义($P < 0.05$), 进行组间比较时, 1 d 移植组与 3 d 移植组、10 d 移植组之间差异无显著性意义($P > 0.05$), 7 d 移植组与 1 d 移植组、3 d 移植组之间差异有显著性意义($P < 0.05$), 7 d 移植组与 10 d 移植组之间差异无显著性意义($P > 0.05$), PBS 对照组与各组比较差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

各组均值比较, 1 d 移植组(37.01±9.01)、3 d 移植组(39.42±10.22)、7 d 移植组(51.58±6.08)、10 d 移植组(41.57±9.50)、PBS 对照组(0±0), 随着脊髓损伤时间的推移, 聚集在损伤处的荧光值逐渐升高, 7 d 移植组为最大值, 随后 10 d 移植组荧光均值小于 7 d 移植组, 呈下降趋势(图 3)。

2.4 免疫组织化学结果 1 d 移植组、3 d 移植组、7 d 移植组、10 d 移植组各组于损伤部位均可以观察到表现为棕黄色的阳性染色, 说明不同时间点通过尾静脉注射的嗅鞘细胞均可以转移到损伤处并且存活; PBS 对照组无染色, 说明无细胞聚集。但 7 d 移植组染色明显强于其他各组, 3 d 移植组染色强于 1 d 移植组、10 d 移植组, 说明 7 d 时移植的嗅鞘细胞转移到损伤处的最多(图 4)。

3 讨论 Discussion

大量的动物实验结果证明,通过尾静脉注射的嗅鞘细胞可以迁移到脊髓损伤处,并且对损伤有修复作用^[9-10]。临床试验也证明了嗅鞘细胞有益于脊髓损伤的修复^[11-14]。嗅鞘细胞起到治疗脊髓损伤作用的潜在机制有:①嗅鞘细胞分泌有助于轴突的伸长、生长的多种神经营养因子,如神经营养素、脑源性神经生长因子、神经生长因子、睫状神经营养因子等^[15];②嗅鞘细胞可以间接促进轴突再生,通过抑制阻碍轴突生长的胶质瘢痕的生成^[16];③嗅鞘细胞能够形成神经胶质桥来促进神经功能——嗅鞘细胞与中枢神经相整合在局部形成的支架桥结构^[17];④其他促进修复机制。嗅鞘细胞在治疗脊髓损伤的过程中,因血脊髓屏障的存在^[18],细胞一般很难跨过血脊髓屏障,在什么时间点注射嗅鞘细胞可以使转移到损伤处的嗅鞘细胞数量最多,从而更好地实现治疗作用,还未见到有统一的报道。根据此背景,以聚集在损伤处嗅鞘细胞的荧光强度与免疫组织化学为衡量标准,设计了该实验,来确认移植嗅鞘细胞的“最佳时间窗”。

嗅鞘细胞移植体内后,有一个问题需要探索,就是观察嗅鞘细胞在体内的生存和转归情况,同时如何从宿主辨别移植的嗅鞘细胞^[19]。目前示踪移植干细胞的技术有很多,其中包括核素标记、Y染色体标记以及报告基因转染等方法,在细胞移植后特定的时间点取出组织,检测聚集在组织的示踪物,以衡量转移到脊髓损伤处细胞的量^[20]。量子点由于其独特的光学性质,被广泛应用于物理、化学、生物等领域的研究。这些特性,特别是高量子产率、宽吸收光谱、窄发射光谱和抗光漂白性,使其广泛用于传感、标记和成像^[21-22]。此次实验结果证明,量子点可以成功嗅鞘细胞,且有很高的标记率。在不同时间点注射应用荧光量子点标记的嗅鞘细胞,用小动物成像仪均可以检测到脊髓损伤处的荧光聚集,并且免疫组织化学的结果显示移植后的嗅鞘细胞会聚集到脊髓损伤处,说明聚集在损伤处的荧光是嗅鞘细胞所携带。证明了用荧光量子点标记嗅鞘细胞以追踪嗅鞘细胞在体内的转归是可行的。

王强等^[23]应用双苯亚甲胺细胞核标记嗅鞘细胞,通过尾静脉注入大鼠体内,之后在避光下应用荧光显微镜对脊髓损伤处进行检测,结果说明静脉移植嗅鞘细胞后,细胞可以成功到达脊髓损伤处,并且可以存活。巫九官等^[23]研究嗅鞘细胞移植对脊髓损伤大鼠的作用实验中,得出了脊髓损伤后1 d移植嗅鞘细胞大鼠神经功能的恢复效果差于1周后移植嗅鞘细胞。此次实验将 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 个标记完好嗅鞘细胞(应用荧光量子点标记)注入大鼠体内,在移植后24 h后取出损伤处的脊髓,应用小动物成像仪测定损伤处聚集的荧光强度,不同组皆有荧光聚集,在各组均值进行比较时,7 d移植组的荧光强度最强。之后应用嗅鞘细胞特异性抗体(NGFRp75)免疫组织化学染色,各组皆有棕黄色的阳性染色,且7 d移植组的染色最强。证明在大鼠脊髓损伤后,不同时间点经过尾静脉注射的嗅鞘细胞,均能够透过血脊髓屏障迁徙到就是损伤处,且可以存活,并且在脊髓损伤

后7 d移植嗅鞘细胞聚集到损伤部位的细胞数量最多。提示脊髓损伤后7 d可以作为移植嗅鞘细胞的最佳时间窗。

影响嗅鞘细胞向脊髓损伤处迁移与存活的潜在因素有:①外部损伤因素导致血-脊髓屏障的固有结构破坏,同时血管活性因子和炎性递质的大量释放,使得血-脊髓屏障的通透性增加,为嗅鞘细胞的进入提供了窗口;②嗅鞘细胞可以通过脑室周围、下丘脑正中隆起、脉络丛、松果体、垂体等血-脊髓屏障固有的薄弱环节迁移到脊髓损伤处;③脊髓损伤不同时间损伤部位的微环境不同,损伤24 h处于急性炎症期,会有大量的炎症递质释放,影响到迁移细胞的存活;随着时间的推移,损伤部位的微环境已开始重建,会提供适合细胞生长的微环境^[24]。在脊髓损伤不同时间点移植的嗅鞘细胞转移到损伤处数量的不同,能够通过以上因素来解释,1, 3 d时移植的嗅鞘细胞转移到损伤处的数量较少的可能原因是,处于急性期损伤处的局部微环境不利于嗅鞘细胞的归巢;而在7 d之后组织损伤处微环境已适合嗅鞘细胞的聚集,出现10 d聚集的细胞数量低于7 d的可能原因是血脊髓屏障的通透性降低。

综上所述,应用荧光量子点标记嗅鞘细胞示踪其在体内的转归是可行的,在脊髓损伤后不同时间点注射嗅鞘细胞均可以迁移到损伤处,在脊髓损伤7 d时移植的细胞转移到损伤处数量最多,可以作为嗅鞘细胞移植的最佳时间窗。

作者贡献: 实验设计者及文章修改者为通讯作者,实验实施者以及文章撰写者为第一作者,在实验实施中以及文章写作中提供帮助者为第二、第三、第四作者。

经费支持: 该文章没有接受任何经费支持。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究 and 文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经宁夏医科大学总医院动物实验伦理委员会批准(批准号为2017-073)。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。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

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。

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] STENUDD M, SABELSTROM H, FRISEN J. Role of endogenous neural stem cells in spinal cord injury and repair. *JAMA Neurol*. 2015;72(2):235-237.
- [2] KANNO H, PEARSE D D, OZAWA H, et al. Schwann cell transplantation for spinal cord injury repair: its significant therapeutic potential and prospectus. *Rev Neurosci*. 2015;26(2):121-128.
- [3] LIN L, LIN H, BAI S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) improved functional recovery of spinal cord injury partly by promoting axonal regeneration. *Neurochem Int*. 2018;115:80-84.
- [4] ANNA Z, KATARZYNA J, JOANNA C, et al. Therapeutic Potential of Olfactory Ensheathing Cells and Mesenchymal Stem Cells in Spinal Cord Injuries. *Stem Cells International*. 2017;2017:1-6.
- [5] YANG H, HE BR, HAO DJ. Biological roles of olfactory ensheathing cells in facilitating neural regeneration: a systematic review. *Mol Neurobiol*. 2015;51(1):168-179.

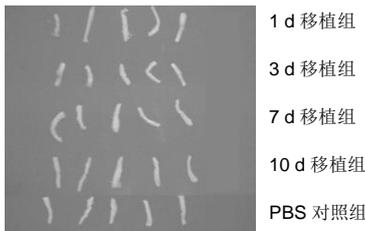
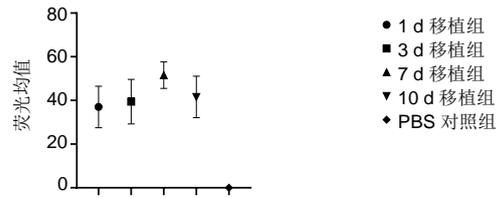


图 1 小动物成像仪拍摄的损伤处的脊髓
Figure 1 Observation of the injured spinal cord under the small animal imager



图注: 随着脊髓损伤时间的推移, 聚集在损伤处的荧光值逐渐升高, 7 d 移植组时为最大值, 随后 10 d 移植组荧光均值小于 7 d 移植组, 开始下降

图 3 各组大鼠脊髓损伤处荧光均值
Figure 3 Mean fluorescent value at the rat injured spinal cord of each group

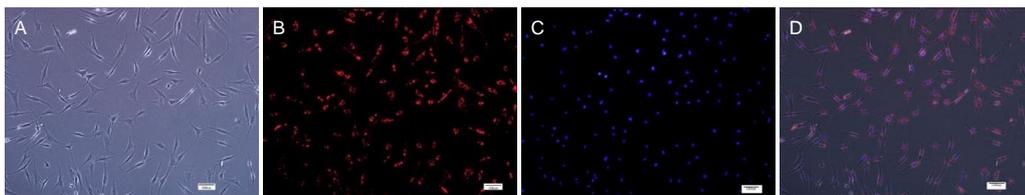
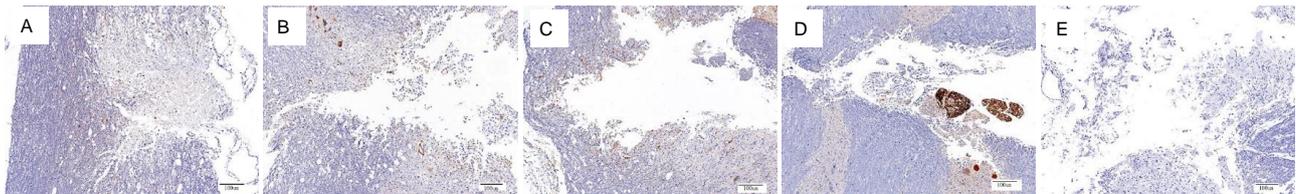


图 2 大鼠嗅鞘细胞形态(x10)
Figure 2 Morphology of rat olfactory ensheathing cells (x10)

图注: 图 A 为未被标记的嗅鞘细胞; B 为荧光量子点标记的嗅鞘细胞; C 为 DIPA 标记的嗅鞘细胞; D 为量子点与 DIPA 标记整合的图片



图注: 图 A 为 1 d 移植组; B 为 3 d 移植组; C 为 7 d 移植组; D 为 10 d 移植组; E 为 PBS 对照组。结果可见 7 d 时注射的嗅鞘细胞转移到损伤处的最多

图 4 各组大鼠脊髓损伤处纵切 p75 免疫组织化学染色(x10)
Figure 4 p75 immunohistochemistry of the longitudinal section of the rat injured spinal cord in each group (x10)

- [6] LIU Y, GONG Z, LIU L, et al. Combined effect of olfactory ensheathing cell (OEC) transplantation and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) intravitreal injection on optic nerve injury in rats. *Mol Vis*.2010; 16:2903-2910.
- [7] 王珺,张利剑,夏鹤春,等.低氧诱导的大鼠嗅黏膜来源嗅鞘细胞自噬及其对细胞增殖能力的影响[J].吉林大学学报(医学版), 2016,42(03):430-434.
- [8] ZHANG L, ZHUANG X, CHEN Y, et al. Intravenous transplantation of olfactory bulb ensheathing cells for a spinal cord hemisection injury rat model. *cell transplantation*.2019;28(12):1585-1602.
- [9] 赵启军,刘燕青,张朝.嗅鞘细胞治疗脊髓损伤的现状与移植途径[J].中国医学创新, 2014,11(6):154-156.
- [10] GÓMEZ RM, SÁNCHEZ MY, PORTELA LOMBA M, et al. Cell therapy for spinal cord injury with olfactory ensheathing glia cells (OECs). *Glia*. 2018;66(7):1267-1301.
- [11] RAO YJ, ZHU WX, DU ZQ, et al. Effectiveness of olfactory ensheathing cell transplantation for treatment of spinal cord injury. *Genet Mol Res*. 2014;13(2):4124-4129.
- [12] CHEN L, HUANG H, XI H, et al. A Prospective Randomized Double-Blind Clinical Trial Using a Combination of Olfactory Ensheathing Cells and Schwann Cells for the Treatment of Chronic Complete Spinal Cord Injuries. *Cell Transplantation*.2014;23(1_suppl):35-44.
- [13] RAO Y, ZHU W, LIU H, et al. Clinical application of olfactory ensheathing cells in the treatment of spinal cord injury. *J Int Med Res*. 2013;41(2):473-481.
- [14] SUN T, YE C, ZHANG Z, et al. Cotransplantation of Olfactory Ensheathing Cells and Schwann Cells Combined with Treadmill Training Promotes Functional Recovery in Rats with Contused Spinal Cords. *Cell Transplantation*.2013;22(1_suppl):27-38.
- [15] RAISMAN G, BARNETT SC, RAMON-CUETO A. Repair of central nervous system lesions by transplantation of olfactory ensheathing cells. *Handb Clin Neurol*.2012;109:541-549.
- [16] KHANKAN R R, GRIFFIS KG, HAGGERTY-SKEANS JR, et al. Olfactory Ensheathing Cell Transplantation after a Complete Spinal Cord Transection Mediates Neuroprotective and Immunomodulatory Mechanisms to Facilitate Regeneration. *J Neurosci*.2016;36(23): 6269-6286.
- [17] ZHONG W, BIAN K, HU Y, et al. Lysophosphatidic acid guides the homing of transplanted olfactory ensheathing cells to the lesion site after spinal cord injury in rats. *Exp Cell Res*.2019;379(1):65-72.
- [18] ARMULIK A, GENOVE G, MAE M, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*.2010;468(7323):557-561.
- [19] GU J, XU H, XU YP, et al. Olfactory ensheathing cells promote nerve regeneration and functional recovery after facial nerve defects. *Neural Regen Res*. 2019;14(1):124-131.
- [20] 贾全章,李东君,陈玉丙,等.骨髓间充质干细胞向脊髓损伤区的迁徙[J].中国组织工程研究, 2012,16(45):8390-8393.
- [21] YU M, ZHAO K, ZHU X, et al. Development of near-infrared ratiometric fluorescent probe based on cationic conjugated polymer and CdTe/CdS QDs for label-free determination of glucose in human body fluids. *Biosens Bioelectron*. 2017;95:41-47.
- [22] XU G, ZENG S, ZHANG B, et al. New Generation Cadmium-Free Quantum Dots for Biophotonics and Nanomedicine. *Chem Rev*.2016; 116(19):12234-12327.
- [23] 王强,于霞,焦延超,等.嗅鞘细胞静脉移植治疗陈旧性脊髓损伤的实验研究[J].泰山医学院学报, 2017,38(1):8-12.
- [24] 巫九官,李艳敏,郑晓晖.嗅鞘细胞移植对脊髓损伤大鼠的作用[J].齐鲁医学杂志, 2016,31(4):424-427.