

基础研究

神经营养素-3 基因修饰嗅鞘细胞移植
对急性脊髓损伤作用的实验研究

吴 军, 孙天胜, 王献章, 任继鑫, 张立仁, 陈迎朝

(北京军区总医院全军骨科中心 100700 北京市)

【摘要】目的:观察神经营养素-3(NT-3)基因转染嗅鞘细胞(OEG)移植对急性大鼠脊髓损伤的作用。**方法:**将自行构建的质粒 pEGFP-NT3 应用脂质体介导的方法导入体外培养的嗅鞘细胞, 并移植入急性脊髓损伤大鼠体内, 连续观察 12 周, 与接受单纯 OEG、空白质粒转染 OEG 移植的脊髓损伤大鼠进行比较。**结果:**移植转染 pEGFP-NT3 后的 OEG 能在体内长期存活, 表达 NT-3 基因, 与对照组比较能更好地促进脊髓损伤区轴突的再生和后肢功能的恢复。**结论:**OEG 是脊髓损伤基因治疗较好的受体细胞。转染 NT-3 基因的 OEG 移植后可以在体内较长时间存活, 能明显促进急性脊髓损伤神经纤维的再生和功能恢复, 为基因修饰嗅鞘细胞在脊髓损伤治疗中的应用提供了实验和理论依据。

【关键词】脊髓损伤; 基因治疗; 神经营养素-3; 嗅鞘细胞; 再生; 非病毒载体; 大鼠

中图分类号: R681.5, Q786 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2006)-02-0147-05

A study of intraspinal implantation of neurotrophin-3 modified olfactory ensheathing glia in rats with acute spinal cord injury/WU Jun, SUN Tiansheng, WANG Xianzhang, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2006, 16(2): 147~151

【Abstract】Objective: To observe the therapeutic effect of olfactory ensheathing glia(OEG) transfected with neurotrophin-3 (NT-3) gene in rats with thoracic spinal cord injury. **Method:** Primary OEG were transfected with cationic liposome-mediated recombinant plasmid pEGFP-NT3 and subsequently implanted into adult Wistar rats directly after contusion of the thoracic spinal cord (T9). Implanted animals were subjected to transfection with pEGFP-NT3, pEGFP alone, or no plasmid, respectively. **Result:** At 3 months after transplantation, all OEG grafts were filled with neurofilament-positive axons, and cationic liposome-mediated expression of NT-3 by implanted cells significantly enhanced regenerative axonal sprouting. Behavioral analysis revealed that recovery of hind limb function improved after implantation of OEG transfected with a NT-3-encoding plasmid vector. **Conclusion:** OEG may be a good candidate for neurotrophic factor delivery. Genetic engineered OEG not only resulted in cells that were more effective in promoting axonal outgrowth but also can enhance recovery of neurological function after spinal cord injury.

【Key words】 Spinal cord injury; Gene therapy; Neurotrophin-3; Olfactory ensheathing glia; Regeneration; Non-viral vectors; Rat

【Author's address】 Orthopaedics Center, Beijing Army General Hospital, Beijing, 100700, China

脊髓损伤(SCI)往往导致损伤平面以下运动和感觉功能的丧失, 其原因是相应的下行运动通路和上行感觉通路的中断。成年哺乳动物 SCI 后神经不能再生, 从而导致功能的永久丧失和瘫痪。对此目前还无有效的治疗方法。许多学者正在致

力于 SCI 后神经功能恢复的研究。大量实验证实嗅鞘细胞(OEG)能促进损伤脊髓感觉、运动功能的恢复。但研究也发现, 在损伤较远处再生轴突的数量仍较少, 部分原因是由于 OEG 本身表达神经营养因子的水平较低, 尚不能满足轴突再生的需要^[1,2]。NT-3 是神经营养素家族众多成员中最有效的一种, 在皮质脊髓束及一些大的感觉轴突上均存在 NT-3 受体, 而这些神经司职的正是我们在脊髓损伤治疗中想得到的运动及感觉功能^[3-5]。

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30170950)

第一作者简介: 男(1980-), 住院医师, 医学硕士, 研究方向: 脊柱脊髓损伤

电话: (010)66721209 E-mail: johnwoo_cn@hotmail.com

为此我们将自行构建的 NT-3 基因真核表达载体转入 OEG 中,并移植入脊髓损伤大鼠体内,以期能更好地发挥其促进再生的能力。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂

成年 Wistar 雌性大鼠(体重 240~260g),由协和动物中心提供。质粒 pEGFP-NT3,由我院实验室自行构建。兔抗 NF(神经丝蛋白)一抗,购自 Boehringer Mannheim 公司,转染剂 lipfectmine 2000,购自 Invitrogen 公司。

1.2 OEG 的培养与转染

取新生 Wistar 大鼠的嗅球,按文献^[1]的方法用 D/F-10S 培养 3d 后换无血清纯化培养液培养。纯化后按照转染剂说明书进行转染。

1.3 SCI 模型与手术方法

100 只大鼠,随机分为 A、B、C、D 四组,每 25 只。0.4%戊巴比妥钠 30mg/kg 腹腔注射麻醉动物。咬除椎板,暴露 T8~T10 脊髓,不切开硬膜。术中注意咬除椎板时不要损伤脊髓。用 NYU 脊髓打击器,以 25mm 高度落下打击 T9 脊髓。A 组脊髓损伤后注入 NT-3 转染的 OEG 细胞悬液;B 组损伤后注入未转染的 OEG 细胞悬液;C 组损伤后注入 pEGFP 空载体转染的 OEG 细胞悬液。以上三组每只大鼠注射细胞 4×10^5 个;D 组只损伤脊髓,不作任何治疗。

1.4 后肢运动功能测试(BBB 评分)

所有手术动物分别在术后 2 周、4 周、6 周、8 周、10 周、12 周,根据后肢体位、活动方式、活动范围等做 BBB 21 分测试^[6,7]。

1.5 电生理检查

将大鼠置于肌电仪上,于动物左下肢上份内后侧胫神经表面安放一电极表面刺激电极,接收电极置于对侧双耳根后缘连线后方 1cm,矢状线右侧旁开 4mm 皮下(左下肢皮层感觉代表区),参考电极置于对侧双耳根前缘连线相应位置,记录皮层体感诱发电位(CSEP)。实验过程中,随时滴入生理盐水以防刺激与接收电极表面皮肤干燥,各电极放置点用美蓝标记,各电极阻抗均小于 1.0Ω ,刺激强度以引起动物受刺激的后肢足趾轻微颤动时的电流强度为最佳刺激强度,刺激参数为:波宽 0.2ms,频率 2Hz,强度 $(0.86 \pm 0.35)\text{mA}$ 。灵敏度数 MV/D,分析时间 250ms,高频滤波 256~

512Hz,低频波 10~30Hz,叠加次数 100~500 次。术后 2~12 周,每 2 周测量 1 次,每次 CSEP 均清晰显示在荧光屏上,测量其波幅及潜伏期,存档以供分析。

1.6 RT-PCR

术后 4 周,每组取 2 只大鼠处死,迅速取出损伤局部的脊髓组织,经 RNA 抽提后,按照 cDNA 合成试剂盒推荐的方法操作合成 cDNA。取 2 μl 反转录产物为模板,按常规 PCR 的反应条件,先将样品于 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5min,加入 Taq 聚合酶 0.5 μl ,内参照 β -actin 引物 3 μl ,按下列参数循环 35 次:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1min,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1min,最后一个循环 72 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10min。取 2 μl 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.7 组织学检查

术后 12 周,所有存活大鼠经腹腔内注射麻醉后,用等渗盐水及 4%多聚甲醛做心脏灌注固定,取脊髓全长,保存于质量浓度为 200g/L 的蔗糖溶液(4 $^{\circ}\text{C}$)过夜。取出后手术显微镜下剥去硬膜。取损伤区及其远近端常规石蜡包埋、连续切片,包括纵切和横切,切片厚度为 10 μm 。用 NF 单克隆抗体,采用 S-P 法作免疫组化染色。

1.8 图像分析

采用同济大学多媒体彩色病理图文分析系统,对 A、B、C 组脊髓挫伤区上下缘,头尾各 5mm 和 D 组相同节段皮质脊髓束(CST)部分区域进行神经纤维计数,取其平均值。

1.9 统计学分析

对所有动物运动功能 BBB 得分、CSEP 波幅及潜伏期和损伤段脊髓神经纤维计数结果进行 *t* 检验,比较各组之间 BBB 得分和神经纤维数量的差异。对 BBB 得分和神经纤维数目之间进行相关分析。分析软件为 SPSS 10.01。

2 结果

所有实验动物无术中及术后 1 周内死亡。观察过程中,因手术后伤口感染、其它鼠攻击或自残死亡 10 只,其中 A 组 1 只,B 组 3 只,C 组 3 只,D 组 3 只。由于手术损伤及截瘫后摄食困难,动物术后均出现体重减轻,术后 3 周动物的体重减少约 30~50g,术后 6 周时恢复至术前水平,之后逐渐稳步增长。

2.1 后肢运动功能测定结果

见表 1。术后 2 周 A 组 19 大鼠后肢有少许功能恢复(BBB 得分 0~2 分),B、C 两组大鼠后肢没有任何运动功能,BBB 得分均为 0 分;4 周时 B、C 两组开始有少许功能恢复(BBB 得分 1~2 分),D 组 11 只大鼠有 1 分的功能恢复,其余没有功能恢复,A 组进一步恢复。4 周后四组得分都逐渐增高。A 组在各个时间段得分均高于 B、C、D 组,B、C 两组得分均值差别无统计学意义。但 A 组平均得分与正常值差别仍很大。

2.2 CSEP 检查结果

刺激左侧胫神经,在对侧皮层可以记录到一稳定的“W 型”波,波峰向下定义为正波,波峰向上为负波(N 波)。从波形上可以看出,由于 P1N1 出现较稳定,我们选用 N1 波作为测量指标,正常

表 1 SCI 后不同时间各组动物 BBB 得分 ($\bar{x} \pm s$)

	A 组	B 组	C 组	D 组
2 周	1.10±0.57	0	0	0
4 周	3.10±0.74	1.11±0.47	1.11±0.33	0.44±0.53
6 周	5.60±0.84	3.06±0.64	2.89±0.60	1.33±0.50
8 周	7.80±0.63	5.83±0.86	5.44±0.73	2.22±0.67
10 周	10.50±0.85	9.17±0.86	8.89±0.93	3.11±0.60
12 周	12.50±1.18	10.39±1.04	10.22±0.97	3.78±0.67

注:术后 12 周,A 组与 B 组比较 $P<0.001$;B 组与 C 组比较 $P>0.5$

大鼠的 N1 潜伏时和波幅分别为 (19.09 ± 1.01) ms 和 (1.92 ± 0.84) μV。术后不同时间点各组动物的 CSEP 潜伏时(ms)和波幅(将正常鼠的波幅作为 100%)见表 2。同一时间点各组间潜伏期比较 $P<0.05$;12 周时 A 组与正常组比较 $P>0.05$;同一时间点各组间波幅比较 $P<0.05$,12 周时 A 组与正常组比较 $P>0.05$ 。

2.3 NT-3 mRNA 表达

经 RT-PCR 扩增后各组 NT-3mRNA 表达见图 1。转基因组 NT-3 mRNA 表达量较空载体组和单纯 OEG 组明显增加(500bp 附近为 β -actin 基因,作为内参照),表明转染后 OEG 在大鼠脊髓内能够表达 pEGFP-NT3 基因。

2.4 免疫组化抗 NF 染色结果

A、B、C 组脊髓损伤区纵切面和损伤远端横切面以及 D 组相同节段抗 NF 染色,都有染成浅棕色的神经纤维。A 组神经纤维数目多于 B 组和 C 组,D 组的神经纤维数目最少,且损伤区神经纤维排列较乱,有较多较大的空洞形成(图 2,后插图 II)。在损伤远端横切面上 OEG 移植的大鼠神经纤维数目明显少于损伤近端,而 D 组的大鼠在该处几乎没有神经纤维。

2.5 神经纤维计数和图像分析

表 2 A、B、C、D 四组损伤后不同时间点 CSEP N1 波的潜伏时和波幅 ($\bar{x} \pm s$)

2 周			4 周			8 周			12 周		
n	潜伏时(ms)	波幅(%)	n	潜伏时(ms)	波幅(%)	n	潜伏时(ms)	波幅(%)	n	潜伏时(ms)	波幅(%)
A 24	23.4±0.6	21±6	24	22.6±0.4	30±9	22	22.1±0.2	52±8	22	21.6±0.2	75±10
B 22	23.7±1.3	22±7	22	23.0±0.9	28±6	20	22.5±0.6	46±5	20	22.4±1.0	60±2
C 22	23.8±1.0	21±9	22	23.1±1.1	27±5	20	22.7±0.5	44±6	20	22.5±0.9	58±4
D 22	24.1±0.7	20±3	22	24.0±0.4	21±2	20	23.9±0.3	22±4	20	24.0±0.3	22±3

注:对于潜伏期同一时期各组间比较 $P<0.05$;12 周时 A 组与正常组比较 $P>0.05$;对于波幅同一时期各组间比较 $P<0.05$,12 周时 A 组与正常组比较 $P>0.05$



图 1 转染 4 周时 RT-PCR 分析结果

转基因组 NT-3 mRNA 表达量较空载体组和单纯 OEG 组明显增加(500bp 附近为 β -actin 基因,作为内参照)

M:Marker

A:空载体转染组

B:未转染组

C:未治疗组

D:实验组

正常大鼠相同节段纤维计数 2171.1 ± 228.6 。利用图像分析系统对 A、B、C 组脊髓损伤远端和 D 组相同节段 CST 区域 NF 染色进行神经纤维计数,分别为 (698.9 ± 41.9) , (566.0 ± 101.6) , (550.9 ± 67.0) , (144.6 ± 40.7) 。A 组神经纤维数量多于 B、C、D 组,经统计学处理, $t=5.37$, $P<0.001$,有统计学意义;B 组神经纤维数量与 C 组比较差异无显著性($t=0.53$, $P>0.1$);A 组与正常大鼠神经纤维数量相比,差异有显著性($t=28.33$, $P<0.001$)。

2.6 神经纤维数量和运动功能的关系

为明确神经纤维数量和运动功能之间的关

系,将损伤近端神经纤维计数结果和对应时间点的 BBB 得分进行相关分析(表 3),相关系数 $r=0.9585$,经统计学检验, $t=5.82, P<0.05$ 。说明神经纤维数目与 BBB 得分成正相关,即神经纤维数目越多, BBB 得分越高,运动功能越好。

表 3 神经纤维数目与 BBB 得分的关系

	神经纤维数目(抗 NF 染色)	BBB 得分
A 组	698.9	12.50
B 组	566.0	10.39
C 组	550.9	10.22
D 组	144.6	3.78
正常大鼠	2171.1	21

3 讨论

脊髓损伤的治疗是研究了近百年的世界性难题,到目前尚未取得突破性进展。以前人们一致认为成年哺乳动物中枢神经系统(CNS)损伤后不能再生。近年来,有研究发现 CNS 有再生功能,最主要的问题是 CNS 神经纤维再生的长度不够,与远端不能形成完整的突触联系^[8]。OEG 能促进损伤脊髓感觉、运动功能的恢复,其机制也阐述较多^[2,3,9],但仍存在很多问题,很多作者寄希望于基因治疗^[2-4,9]。

3.1 转染 NT-3 的 OEG 移植后大鼠运动功能和电生理改变

BBB 功能评分是较为客观反映大鼠运动功能的一项评分标准,可以间接反映脊髓损伤的恢复情况。没有运动功能为 0 分,运动功能完全正常为 21 分^[6,7]。本实验结果显示,脊髓损伤以后无论是移植治疗组还是无治疗组在 1 周时均无运动功能恢复, BBB 均为 0 分,说明为完全性脊髓损伤。而到第 4 周以后,动物均有部分功能恢复,但每个时段转染后 OEG 移植组的 BBB 分值均高于其它组。到损伤后 12 周,转染后 OEG 移植组 BBB 平均得分为 12.5 分;单纯 OEG 移植组和空载体转染 OEG 移植组平均分各为 10.4 分和 10.22 分;而未治疗组 12 周时 BBB 平均得分为 3.78 分。三者差别十分明显。比较转染 NT-3 后 OEG 移植组和单纯 OEG 移植组及空载体转染 OEG 移植组在术后第 12 周时 BBB 得分均值,转染 NT-3 后 OEG 移植组运动功能恢复明显好于后两组。但 OEG 移植组 12 周时得分与正常组相比,差距也很明显。从 BBB 得分可以看出转染后 OEG 移植能够更好

地促进脊髓损伤后运动功能的恢复。

术后 12 周,未治疗组 N1 潜伏期仍明显延长,而且波幅亦低,而 A 组与正常相比无显著性差异,4 组比较差异有显著性。由于波幅反映脊髓电位的强度,潜伏期反映传递速度,故两者结合可作为判断脊髓功能的重要测量标志,尽管 CSEP 仅代表脊髓感觉通道受损情况,但由于 SCI 感觉与运动通道常同等受累,因而多数情况下 CSEP 的改变可代表 SCI 的程度。在 SCI 后进行脊髓 CSEP 动态监测,可以从定性和定量两方面反映出脊髓的功能恢复状态和变化。

3.2 转染 NT-3 的 OEG 移植后大鼠轴突再生情况

NF 为神经丝蛋白,是轴突的“框架”结构,可反映轴突的数量和再生情况。通过 NF 免疫组化染色显示,在脊髓损伤区域上下缘 5mm 范围内的 CST 内,转染后 OEG 移植组神经纤维数目明显多于其他组。在脊髓损伤处尾侧 10mm 处, NF 染色发现转染 OEG 移植组确有神经纤维通过了损伤区达到了损伤远端,但其数目已经比脊髓损伤处头侧 5mm 处明显较少。这可能有两方面原因:一是时间短再生神经纤维尚未到达该处;另一个原因可能是胶质瘢痕的仍然阻断了部分神经纤维的通过,而无法到达远端。未治疗组在脊髓损伤处尾侧 10mm 处已经几乎没有神经纤维。说明不施加治疗措施,神经纤维再生的长度不够,而且不能通过胶质瘢痕的阻挡。就本实验来说,转染后 OEG 移植组轴突染色均显示神经纤维数目多于其他组,但这些神经纤维到穿过损伤区后能否和远端形成突触联系还没有证实,需要以后进一步研究。

3.3 轴突再生与功能恢复的关系

本实验发现,完全损伤性脊髓大鼠移植 OEG 后,随着时间的延续,大鼠运动功能从第 4 周开始逐渐有所恢复,但到第 10 周左右恢复缓慢,10~12 周进展不大。此时 BBB 得分在 12 分左右,距离正常功能的 21 分还很远。经过统计学分析,神经纤维数目和 BBB 得分之间存在正相关性,说明大鼠运动功能的恢复是在神经纤维再生的基础上获得的。通过神经纤维计数可以看出,尽管 OEG 移植组神经纤维数目较未治疗组多,但与正常对照组大鼠神经纤维数目相比仍然少很多。也就是说大鼠脊髓损伤后功能恢复的程度最终取决于再生神经纤维通过损伤区的数目,当然这些通过损

伤区的神经纤维必须和远端发生突触联系。未治疗组功能也有部分恢复,说明大鼠脊髓完全损伤以后有一定的自我修复能力。

Li 在实验中发现^[10,11],皮质脊髓束(CST)再生神经纤维只要达到正常的 10%~15%,功能就应该有明显恢复。本实验 A 组损伤近端 CST 神经纤维计数超过了正常组的 1/4,但运动功能得分还不到正常组的一半,原先我们猜测可能是因为本实验观察时间短,再生的神经纤维尚未到达损伤远端或未和远端形成突触联系。但通过后来的长期试验观察(最长至术后 6 个月),BBB 分值仍不能明显增加^[12]。按照神经轴突正常生长速度,应该有更多的神经纤维通过损伤区域,然而我们未能观察到这一现象,其原因有待探讨。因此 OEG 移植联合神经生长因子作为外加措施,有明显促进脊髓损伤神经纤维再生和功能恢复的作用,但这种作用也是有限的。

4 参考文献

1. Boruch AV, Connors JJ, Pipitone M, et al. Neurotrophic and migratory properties of an olfactory ensheathing cell line[J]. *Glia*, 2001, 33(3): 225-229.
2. Woodhall E, West AK, Chuah MI. Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 88 (1-2): 203-213.
3. Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, et al. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after spinal cord lesion[J]. *Nature*, 1994, 367(6459): 170-173.
4. Tetzlaff W, Kobayashi NR, Giehl KM, et al. Response of rubrospinal and corticospinal neurons to injury and neurotrophins[J]. *Prog Brain Res*, 1994, 103: 271-286.
5. Liebl DJ, Huang W, Young W, et al. Regulation of Trk receptors following contusion of the rat spinal cord [J]. *Exp Neurol*, 2001, 167(1): 15-26.
6. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. *J Neurotrauma*, 1995, 12(1): 1-21.
7. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability[J]. *J Neurotrauma*, 1996, 13(7): 343-359.
8. Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord [J]. *Physiol Rev*, 1996, 76(2): 319-370.
9. Blits B, Boer GJ, Verhaagen J. Pharmacological, cell, and gene therapy strategies to promote spinal cord regeneration[J]. *Cell Transplant*, 2002, 11(6): 593-613.
10. Li Y, Field PM, Raisman G. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells[J]. *Science*, 1997, 277(5334): 2000-2002.
11. Li Y, Field PM, Raisman G. Regeneration of adult rat corticospinal axons induced by transplanted olfactory ensheathing cells[J]. *J Neurosci*, 1998, 18(24): 10514-10524.
12. 孙天胜, 任继鑫, 吴军. 嗅鞘细胞移植促进脊髓损伤修复的长期实验和临床观察[J]. *中国临床康复*, 2005, 9(2): 122-124.

(收稿日期: 2005-07-14 修回日期: 2005-10-24)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

全国胸椎管狭窄症专题研讨会征文通知

由中华医学会骨科学分会脊柱外科学组和《中华骨科杂志》编辑部主办、北京大学第三临床医学院、天津医科大学总医院、第四军医大学附属西京医院、宁夏医学院附属医院联合承办的全国胸椎管狭窄症专题研讨会, 将于 2006 年 6 月 16 日至 18 日在塞上湖城宁夏回族自治区首府银川市召开。

本次专题研讨会采取分节段专题发言、座谈讨论的形式, 拟对胸椎管狭窄症(特别是胸椎黄韧带骨化症)的病因与分类、临床诊断、手术方式选择、远期疗效观察、影响疗效的因素等问题进行深入细致的讨论。期望通过本次研讨会, 能对胸椎管狭窄症的研究与诊断治疗水平的提高起到推动作用。欢迎大家踊跃投稿。本次研讨会为国家级继续医学教育项目, 将授予 I 类学分。

投稿请寄 A4 纸 4 号宋体打印的 800~1000 字论文摘要一份, 并附 Word 电子文档(E-mail 或软盘)。征文截止日期 2006 年 5 月 15 日(以当地邮戳为准)。会议注册费 800 元人民币, 资料费 50 元, 食宿由会议统一安排, 费用自理。

联系地址: 宁夏银川市兴庆区胜利街 804 号 宁夏医学院附属医院骨科, 邮政编码: 750004, 联系人: 乔永东 (0951) 6743242, 6743243, 13709581257; 李平 (0951) 6743328。E-mail: nyfyguke@126.com。

详情请登录中国脊柱结核网 <http://www.sptb.com.cn> 查询。