

基础研究

丙戊酸对大鼠脊髓损伤后内源性神经干细胞的影响

南国新¹, 廖维宏¹, 李红运¹, 伍亚民¹, 王 旭², 王 莉¹, 龙在云¹

(1 第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室 400042 重庆市;

2 兰州大学附属二院骨科研究所 730030 甘肃省兰州市)

【摘要】目的:探讨丙戊酸(valproic acid, VPA)对大鼠脊髓损伤后内源性神经干细胞的影响。**方法:**45 只 Wister 成年大鼠, 随机分为正常对照组(A 组, $n=5$)、单纯损伤组(B 组, $n=20$)、损伤后 VPA 治疗组(C 组, $n=20$)。B 组和 C 组采用 Allen's 打击模型(25gcm), 在 T10 段造成急性脊髓损伤, C 组损伤后半小时内给予 VPA 治疗, 每日 300mg/kg, 经腹腔分两次注射, 直至取材; B 组以相同方法给予等量生理盐水。于损伤后 1d、3d、1 周、4 周、8 周进行取材, 对距离损伤中心 5mm 处脊髓进行巢蛋白 Nestin 免疫组化检测, 应用图像分析软件进行 Nestin 阳性区域面积测算。**结果:**A 组脊髓室管膜细胞中极少数细胞胞浆内有 Nestin 表达, 白质中几乎无表达。B 组损伤后 24h Nestin 表达于室管膜以及软膜, 1 周达到高峰($P<0.05$), 并相向延伸至脊髓白质和灰质; 损伤后 4 周 Nestin 表达明显下降, 8 周时很少或几乎无表达。C 组 Nestin 表达在伤后 24h 与 B 组无显著性差异, 1 周时在中央管周围 Nestin 阳性细胞明显较 B 组多($P<0.05$), 持续至 4 周时仍高表达, 8 周时仍有表达。**结论:**VPA 在大鼠脊髓损伤后能够激活内源性神经干细胞。

【关键词】脊髓损伤; 内源性神经干细胞; 丙戊酸; 大鼠

中图分类号: Q813.5, R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2007)-05-0368-04

Effects of valproic acid on endogenous neural stem/progenitor cells after spinal cord injury in rats/NAN Guoxin, LIAO Weihong, LI Hongyun, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2007, 17(5):368-371

【Abstract】Objective:To investigate the effect of valproic acid (VPA) on neural stem cells/neural progenitor cells after spinal cord injury (SCI) in rats.**Method:**45 female Wister rats were randomly divided into three groups; the control group (group A, $n=5$); spinal cord injury at T10 level by Allen's method (group B, $n=20$) and vipral acid treatment group after spinal cord injury (group C, $n=20$). The rats in group C were injected with VPA 300mg/kg/d after SCI, while the animals in group B received equivalent amount of 0.9% normal saline likewise. The rats were killed at 1d, 3d, 1, 4 and 8 weeks after injury, and two levels of the spinal cord with the length of 5mm harvested both rostral and caudal region to the injury center were the samples were analyzed by Nestin immunoreactivity.**Result:**There was little Nestin expression in ependymal cells and seldom observed in white matter in group A. In group B, Nestin expression was observed in ependymal cells and pia matter at 24h postinjury, which reached peak at 1 week after injury ($P<0.05$). Moreover, Nestin expression was also observed in the white matter of ventral spinal cord, extending into arborizing processes centripetally from the pial surface toward the central canal. It decreased in ependyma at 4 weeks after injury. In group C, Nestin expression was no different at 24h with group B, but it was observed more than group B at 1w ($P<0.05$), and it reached peak at 4 weeks. Until 8 weeks postinjury, Nestin expression was still observed.**Conclusion:**VPA can activate endogenous neural stem/progenitor cells after SCI in rat.

【Key words】Spinal cord injury; Nestin; Endogenous neural stem/progenitor cells; Valproic acid; Rats

【Author's address】Research Institute of Surgery, the Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China

近年来的研究发现, 在成年哺乳动物包括人类

的中枢神经系统存在着神经干细胞 (neural stem cells, NSCs), 并已从大鼠的脊髓中分离培养出多潜能神经干细胞^[1]。正常情况下这些 NSCs 处于“静止”或“休眠”状态, 在损伤等特定因素的作用

第一作者简介: 男(1968-), 副主任医师, 博士在读, 研究方向: 脊髓损伤与修复

电话: (023)68757433 E-mail: ngx1215@126.com

下其分裂、分化的潜能被激活,从而出现增殖现象。近年来有研究发现丙戊酸(valproic acid, VPA)对大鼠脑组织损伤后具有保护神经元、降低炎症反应、促进神经再生、减少胶质细胞增生等作用^[2,3]。本研究采用 VPA 作为干预因素,旨在观察脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后 VPA 对脊髓内源性神经干细胞的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

45 只 Wister 成年雌性大鼠,体重 240~250g,由第三军医大学野战外科研究所动物中心提供。随机分为正常对照组(A 组, $n=5$)、单纯损伤组(B 组, $n=20$)和损伤后 VPA 治疗组(C 组, $n=20$)。B、C 组按取材时间不同分为术后 1d、3d、1 周、4 周、8 周共 5 个时相点,每个时相点 4 只。

1.2 动物模型的制备

用 10g/L 的戊巴比妥钠(40mg/kg)经腹腔注射麻醉大鼠,固定后备皮,常规消毒,铺无菌手术洞巾,以 T10 为中心,沿脊柱方向取一长约 2.0cm 的切口,切开皮肤、肌肉,分离并显露棘突,游离附着于棘突两侧的骶棘肌,将 T10 椎板全部切除,保留硬膜。A 组只暴露脊髓;实验组采用改良 Allen's 打击法,即在暴露的脊髓上方,置一薄铜片,并竖一带有刻度的玻璃管,将质量为 10g 的金属物自 2.5cm 高度自由落下,打击薄铜片,并立即移开,打击后尾部出现卷曲、摆动为打击成功标准,随机分为 B 组和 C 组。

1.3 给药剂量和方式

A 组不作任何处理;C 组术后 30min 开始给予 VPA(Sigma)治疗,300mg/kg/d,经腹腔分 2 次注射,直至取材;B 组以相同方法给予等剂量生理盐水。

1.4 动物饲养及护理

各组于术后 1h 经腹腔给予 2 万 U/kg 青霉素,每日 2 次,连续 3d。饲养于配有空调的专用室,自由饮食。每日膀胱区按压排尿 3 次。B 和 C 组共有 5 只大鼠于损伤后 6~72h 死亡,用备用鼠补充。

1.5 标本的采集

在各时相点采用 4%多聚甲醛灌注,在距损伤中心 5mm 的头侧和尾侧进行取材,梯度脱水,石蜡包埋。制备 5 μ m 组织切片,用于巢蛋白

(Nestin McAb Sigma)的免疫组化染色。

1.6 Nestin 免疫组化染色

采用 Powervision 二步法进行 Nestin 免疫组化染色(Powervision 检测剂为上海长岛生物技术有限公司生产),切片脱蜡水化,柠檬酸缓冲液中进行微波抗原修复,3%的 H₂O₂ 封闭内源性过氧化酶。PBS 洗 3 次,每次 2min,加一抗 Nestin(1:500 稀释),室温 60min;PBS 洗 3 次,每次 2min;加一滴 Powervision 检测试剂,室温 30min, PBS 洗 3 次,每次 2min;DAB 显色 5~10min;苏木素复染,脱水,封片。用正常山羊血清(1:50)代替一抗,其余同前。

1.7 图像分析

采用 NIH 图像分析软件对 Nestin 表达阳性的区域进行统计,应用数码照相技术在放大 400 倍的光学显微镜下对中央管区和灰质区进行拍照,每个标本随机抽取 4 张切片,每张切片拍取中央管区和灰白质区各一张。由对本实验不知情的两位工作人员对结果进行统计分析。

1.8 统计学处理

所有计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 软件包,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

各组不同时间测得的 Nestin 表达阳性区域面积见表 1。A 组极少数脊髓室管膜细胞胞浆内 Nestin 表达阳性,白质中几乎无表达(图 1,后插页 I)。B 组伤后 24h 室管膜细胞部分胞浆中 Nestin 表达阳性,外周亦出现表达(图 2,后插页 I),3d 时开始上升,1 周达到高峰,主要集中于室管膜细胞,灰质中表达较少(图 3,后插页 I),4 周明显下降,8 周时很少或几乎无表达。C 组伤后 24h 与 B 组比较 Nestin 表达无显著性差异;1 周时在中央管周围 Nestin 阳性细胞明显较 B 组多,表达于室管膜以及环绕脊髓的软膜,并向室管膜区周围延伸,软膜区阳性表达向中央延伸。灰质和白质中出现点片状和丝状表达(图 4,后插页 I),室管膜区周围也出现许多阳性细胞(图 5,后插页 I);持续至 4 周仍高表达(图 6,后插页 I),Nestin 表达阳性的树状突起延伸至灰质,在灰质中的表达主要分布于神经元附近和血管周围,个别细胞形态类似星形胶质细胞(图 7,后插页 I),同时在灰质可

表 1 对照组与损伤组、VPA 治疗组损伤后不同时间中央管区和灰白质区 Nestin 表达阳性的面积 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}^2$)

	n	Nestin 表达阳性面积				
		伤后 1d	伤后 3d	伤后 1 周	伤后 4 周	伤后 8 周
对照组(A 组)	5	98.45±6.21	—	—	—	—
损伤组(B 组)	4	410.19±21.34 ^①	678.58±48.23 ^①	987.34±46.43 ^①	543.21±41.89 ^①	112.08±10.15
VPA 治疗组(C 组)	4	421.21±23.13 ^①	834.97±49.78 ^{①②}	1389.51±51.46 ^{①②}	1233.75±49.32 ^{①②}	632.76±48.09 ^{①②}

注:①与 A 组比较 $P < 0.05$, ②与 B 组比较 $P < 0.05$

见少量类似神经元样 Nestin 阳性细胞(图 8, 后插页 I), B 组中偶尔也可见到, 但数量极少; 8 周时 C 组仍有 Nestin 表达。

3 讨论

Johansson 等^[4]认为室管膜细胞就是 NSCs。也有学者认为除室管膜细胞外, 室管膜下细胞也具有 NCSs 的特性^[5]。Doetsch 等^[6]认为室管膜下区的胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)阳性细胞也是 NSCs 细胞。随着神经科学的发展, 不同的神经前体细胞的标记物相继被发现。Nestin 是其中之一, 而且应用最为广泛。

Nestin 也称为巢蛋白或巢素, 是一种中间丝(intermediate filament)蛋白, 存在于神经上皮前体细胞^[7]; 也存在于成年多能干前体细胞^[8]。通过检测 Nestin 的表达可以确定多潜能干细胞的存在。在神经发育过程中 Nestin 还表达于神经上皮细胞和放射状胶质细胞。放射状胶质细胞在胚胎发育过程中发挥了引导神经元定向迁移的作用, 但 Malacsta 等^[9]发现在发育期的放射状胶质细胞还具有神经元前体细胞的特性, 可以分化为神经元。Noctor 等^[10]更进一步通过体外培养证实放射状胶质细胞就是神经元前体细胞。但成年动物的放射状胶质细胞是否在某种环境下具有神经干细胞生物学特性, 目前还不清楚。

Shibuya 等^[11]认为成年哺乳动物脊髓中的前体细胞可能有两种来源: 软膜表面的放射状胶质细胞和位于中央管的室管膜细胞, 并认为这两种细胞在功能方面有所不同。他们的研究表明, 脊髓损伤后白质中 Nestin 表达阳性的细胞可能来源于星形胶质细胞。采用 GFAP 和 Nestin 双标观察到, 白质中的这些细胞大部分都能共表达, 其中 Nestin 阳性而 GFAP 阴性的细胞可能是由前体细胞分化而来的少突胶质细胞或小胶质细胞, 在功能恢复中发挥着一定的作用。他们认为这些 GFAP 阴性细胞是由放射状胶质细胞分化而来,

而不是由神经上皮细胞分化而来。双标还显示中央管周围来自室管膜的细胞不表达 GFAP, 表明它们未向星形胶质细胞分化, 但是具体向胶质细胞以外的何种细胞分化, 尚需进一步实验证实。Mothe 等^[12]采用 Dil 细胞示踪技术发现室管膜上增生的细胞向周围游走, 而软膜下的细胞向白质中游走。进一步说明两种 Nestin 表达阳性的前体细胞在脊髓修复过程中发挥着不同的作用。脊髓损伤后 Nestin 表达阳性的细胞在脊髓修复中可能发挥着积极的作用。通过本实验观察, 我们也可以初步确定脊髓损伤后室管膜细胞或亚群首先发生反应, 这些细胞具有早期神经外胚层细胞所特有的 Nestin 表达, 而且在灰质和白质中出现零星的丝状表达。

VPA 是一种分子量很小的短链脂肪酸, 在体外细胞培养中有抗细胞凋亡、促进神经干细胞向神经元分化, 抑制其向神经胶质细胞分化的作用, 其促进神经生长的效果优于脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和神经营养素 3(Neurotrophin-3, NT-3)^[13, 14]。具有迅速透过血脑屏障的特性。

本研究表明, 大鼠脊髓损伤后在损伤区附近脊髓中央管周围出现 Nestin 表达阳性的细胞, 同时在白质和灰质中也出现少量阳性的树突状结构。1~2 周达到高峰, 4 周开始下降, 8 周时几乎无表达。而应用 VPA 治疗组则自 1 周开始 Nestin 表达量明显高于单纯损伤组, 并持续表达, 4 周时在脊髓前角内也出现一些 Nestin 染色阳性的细胞, 体积较大, 有的类似星形胶质细胞, 有的类似神经元。这可能是内源性神经干细胞分化而来的星形胶质细胞和神经元。单纯损伤组偶尔也可见到, 但数量极少。至第 8 周时 VPA 治疗组脊髓中央管区仍有 Nestin 表达。说明 VPA 能够在大鼠脊髓损伤后促进室管膜细胞向神经前体细胞转化, 在分化过程中可能形成新的神经元, 在脊髓损伤后的功能恢复中发挥着重要作用。因此脊髓损伤后恰当地

应用外源性的刺激因素激发内源性前体细胞进行增殖分化和迁移将有可能替代在损伤中丧失的神经细胞,达到脊髓修复的目的。

4 参考文献

1. Gage FH, Coates PW, Palmer TD, et al. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1995, 92(25): 11879-11883.
2. Cui SS, Yang CP, Bowen RC, et al. Valproic acid enhances axonal regeneration and recovery of motor function after sciatic nerve axotomy in adult rats[J]. Brain Res, 2003, 975(1-2): 229-236.
3. Fukumoto T, Morinobu S, Okamoto Y, et al. Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain[J]. Psychopharmacol, 2001, 158(1): 100-106.
4. Johansson CB, Momba S, Clarke DL, et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system[J]. Cell, 1999, 96(1): 25-34.
5. Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, et al. Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics[J]. Neurosci, 1999, 19(11): 4462-4471.
6. Doetsch F, Caille I, Lim DA, et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain[J]. Cell, 1999, 97(6): 703-716.
7. Cattaneo E, McKay R. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor[J]. Nature, 1990, 347(6295): 762-765.
8. Gritti A, Parati EA, Cova L, et al. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor[J]. Neurosci, 1996, 16(3): 1091-1100.
9. Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage[J]. Development, 2000, 127(24): 5253-5263.
10. Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, et al. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex[J]. Nature, 2001, 409: 714-720.
11. Shibuya S, Miyamoto O, Auer RN, et al. Embryonic intermediate filament, nestin, expression following traumatic spinal cord injury in adult rats[J]. Neurosci, 2002, 114(4): 905-916.
12. Mothe AJ, Tator CH. Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat[J]. Neurosci, 2005, 131(1): 177-187.
13. Laeng P, Pitts RL, Lemire AL, et al. The mood stabilizer valproic acid stimulates GABA neurogenesis from rat forebrain stem cells[J]. Neurochem, 2004, 91(1): 238-251.
14. Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, et al. Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(47): 16659-16664.

(收稿日期: 2006-10-26 修回日期: 2007-01-28)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

第七届全国《脊柱畸形》医学继续教育学习班通知

由南京鼓楼医院脊柱外科举办的第七届全国“脊柱畸形”学习班, 将于 2007 年 6 月 14~19 日在南京举办, 届时将邀请国内外著名脊柱外科专家作专题报告。

授课内容: (1) 理论授课。脊柱畸形的临床评价和支具治疗原则; 脊柱侧凸和单一矢状面畸形的外科矫治策略、方法和最新进展; 脊柱畸形矫形的美学与平衡理念; 脊柱畸形微创矫形术; 脊柱畸形全脊椎截骨和翻修手术策略; 强直性脊柱炎后凸畸形及外伤性迟发性后凸畸形的截骨矫形; 各种新型脊柱内固定技术的生物力学和临床应用。(2) 模型操作。学员有机会在脊柱侧凸模型上进行三维去旋转矫形器械操作。(3) 手术观摩。学员将分组参观脊柱侧凸的后路和前路矫形手术。(4) 病例讨论。学习班将提供大量复杂脊柱畸形的临床病例, 学员可利用现代矫形理论进行讨论。

本次学习班结业合格授继续教育 I 类学分, 有关此继续教育的详细内容请访问南京鼓楼医院脊柱外科网站 www.soscoliosis.com 或 www.scoliosis-china.com。

报名截止日期: 2007 年 6 月 1 日。

报到时间: 2007 年 6 月 14 日 12:00-22:00。

来信请寄: 南京中山路 321 号南京鼓楼医院脊柱外科 张林林 收, 邮编: 210008。

联系电话: (025) 83105121。