

基础研究

大鼠脊髓损伤后大脑运动皮质神经元凋亡的观察

刘亚东¹, 陈学明¹, 于振山¹, 关 骅²

(1 首都医科大学潞河教学医院骨科 101149 北京市; 2 中国康复研究中心脊柱外科 100068 北京市)

【摘要】目的:观察大鼠脊髓损伤后大脑运动皮质神经元的凋亡情况,探讨其相关因素。**方法:**SD 大鼠 72 只,随机分为 3 组:阴性对照组(正常大鼠)、假手术组(单纯椎板切除)、脊髓损伤组(椎板切除+脊髓横断损伤),每组 24 只,各组分别于造模后 1d、3d、7d、14d 处死 6 只动物取材。应用原位末端标记法(TUNEL 法)对脊髓损伤后大脑运动皮质区神经元凋亡检查,并检测该区域神经元诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达情况,分析神经元凋亡与 iNOS 表达的关系。**结果:**脊髓损伤组大鼠大脑运动皮质区神经元在术后 1d、3d、7d、14d 的凋亡指数分别为 $(10.11 \pm 4.02)\%$ 、 $(56.53 \pm 8.63)\%$ 、 $(35.03 \pm 11.66)\%$ 、 $(3.78 \pm 1.03)\%$,均高于相应时间点阴性对照组和假手术组 ($P < 0.05$),术后 3d 凋亡指数显著高于术后 1d、7d 和 14d ($P < 0.01$)。术后 1d、3d、7d、14d 脊髓损伤组大鼠大脑运动皮质 iNOS 阳性神经元百分数分别为 $(17.92 \pm 2.75)\%$ 、 $(60.65 \pm 8.78)\%$ 、 $(34.35 \pm 7.74)\%$ 、 $(6.12 \pm 1.99)\%$,1d、3d、7d 时均高于相应时间点阴性对照组和假手术组 ($P < 0.05$),14d 时三组间无显著性差异;脊髓损伤组术后 3d 时显著高于其余时间点 ($P < 0.01$)。脊髓损伤组大鼠大脑运动皮质区神经元凋亡指数与 iNOS 阳性神经元百分数之间存在显著性正相关关系 ($r = 0.89, P < 0.01$)。**结论:**大鼠脊髓损伤后大脑运动皮质区神经元凋亡增加,其可能与 iNOS 的表达增加有关。

【关键词】 脊髓损伤; 神经元; 凋亡; 运动皮质; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.06.12

中图分类号: R683.2, R361 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2013)-06-0546-07

Apoptosis of neuron in cerebral motor cortex after spinal cord injury in rat/LIU Yadong, CHEN Xueming, YU Zhenshan, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2013, 23(6): 546-552

【Abstract】 Objectives: To investigate the apoptosis of neuron in cerebral motor cortex after spinal cord injury (SCI) in rat. **Methods:** Seventy-two SD rats were divided into 3 groups randomly as follows: control group (intact), sham-operation group (laminectomy only) and SCI group (laminectomy and spinal cord transection injury at T10). There were 24 rats in each group. Six rats in each group were sacrificed respectively on the 1st day, 3rd day, 7th day and 14th day after operation. TUNEL was applied to detect apoptosis of neurons in motor cortex after spinal cord injury. Expression of iNOS of neurons in the same area was also investigated. Then the relationship of apoptosis and expression of iNOS of neurons in motor cortex was analyzed. **Results:** Apoptosis index (AI) of SCI group was $(10.11 \pm 4.02)\%$, $(56.53 \pm 8.63)\%$, $(35.03 \pm 11.66)\%$, $(3.78 \pm 1.03)\%$ on the 1st day, 3rd day, 7th day and 14th day after SCI respectively, which was higher than that of control group and sham-operation group ($P < 0.05$). Compared with the other time points (the 1st day, 7th day and 14th day), AI on the 3rd day was higher ($P < 0.01$) in SCI group. Percentage of iNOS positive neurons on the 1st day, 3rd day, 7th day and 14th day in SCI group was $(17.92 \pm 2.75)\%$, $(60.65 \pm 8.78)\%$, $(34.35 \pm 7.74)\%$, $(6.12 \pm 1.99)\%$ respectively. On the 1st day, 3rd day, 7th day, percentage of iNOS positive neurons in SCI group was higher than that of control group and sham-operation group ($P < 0.05$) respectively. But there was no significant difference among the 3 groups on the 14th day. Compared with the other time point, percentage of iNOS positive neurons on the 3rd day was higher in SCI group ($P < 0.01$). AI showed positive correlation with percentage of iNOS positive neurons in SCI group ($r = 0.89, P < 0.01$). **Conclusions:** Apoptosis of neuron in cerebral motor cortex increases after SCI in rat. After SCI, which may be related with the increased expression of iNOS.

【Key words】 Spinal cord injury; Neuron; Apoptosis; Motor cortex; Rat

第一作者简介: 男 (1978-), 住院医师, 医学博士, 研究方向: 脊柱外科

电话: (010)69543901-2045 E-mail: lydshh@126.com

通讯作者: 陈学明 E-mail: xuemingchen@sina.com

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Luhe Hospital, Capital Medical University, Beijing, 101149, China

在脊髓损伤的继发性损伤中,损伤部位神经细胞出现凋亡的观点已得到认同^[1-3],而关于脊髓损伤后相应大脑运动皮质神经元的病理变化却存在不同观点^[4-5]。如果在脊髓损伤后大脑运动皮质神经元发生继发性逆行性病理改变(如凋亡、死亡等),即使脊髓中受损轴突能够再生或结构功能重建,损伤平面以下的运动功能也不可能完全恢复。原位末端标记法(TUNEL法)能对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色,准确灵敏地反映细胞凋亡情况,在细胞凋亡的研究中被广泛采用。诱生型一氧化氮合酶(iNOS)在损伤状态下可异常增高,通过直接引起氧化损伤或作为信号介质介导细胞凋亡。本研究应用TUNEL法对大鼠脊髓损伤后大脑运动皮质区行神经元凋亡检查,并检测该区域神经元诱生型一氧化氮合酶(iNOS)的表达,以探讨大鼠脊髓损伤后大脑运动皮质区神经元的凋亡情况。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

健康雌性SD大鼠72只,体重150~175g,随机分为3组:阴性对照组(正常大鼠)、假手术组(单纯椎板切除)、脊髓损伤组(椎板切除+T10脊髓横断损伤)。每组24只,按造模后1d、3d、7d及14d不同时间点每组又随机分4个亚组,每亚组6只。

1.2 动物模型制作

脊髓损伤大鼠模型制作:应用10%水合氯醛(300mg/kg腹腔注射)将大鼠麻醉后,将其俯卧位固定于手术台。背部术区备皮、消毒,铺无菌巾。以T10棘突为中心,取后正中纵形切口,切开皮肤及皮下组织至深筋膜。在T9~T11水平紧贴棘突两侧将椎旁肌纵行钝性分离,咬除T9~T11棘突,显露并切除椎板,暴露脊髓。参照文献^[6]用刀片将脊髓在T10椎体水平完全切断,可见大鼠后肢抽搐数次后瘫痪。逐层缝合肌肉、筋膜、皮肤。术后立即予腹腔注射生理盐水10ml补充体液及抗生素预防感染。单纯椎板切除大鼠模型制作:同上述手术操作,但仅切除椎板而不损伤脊髓。阴性对照组大鼠只麻醉,不做手术处理。

1.3 标本制作和采集

各组大鼠于设定时间点麻醉下进行灌注固定。将灌注后大鼠头部固定于小动物立体定位仪上,定位前囟并做标志,完整取出大脑。将固定好的脑组织块常规石蜡包埋,在前囟后0.2mm处连续切片,层厚4 μ m,间隔24 μ m取1张切片,每只大鼠取6张切片,其中3张用于神经元凋亡的检测,另外3张用于iNOS检测。

1.4 神经元凋亡检测

取石蜡切片常规脱蜡至水,3% H₂O₂室温孵育10min,胰酶消化10min,正常血清封闭10min,滴加一抗NeuN(鼠抗),4℃过夜,滴加生物素标记二抗,室温孵育30min,滴加辣根酶标记链霉卵白素,室温孵育30min,DAB显色。4%多聚甲醛固定10min,蛋白酶K消化10min,滴加凋亡检测试剂盒(Roche公司)标记溶液,37℃孵育1h,碱磷酶标记二抗,室温孵育30min,NBT/BCIP显色。神经元胞核着棕褐色即为NeuN染色阳性细胞,胞核着蓝色与棕褐色即为NeuN和TUNEL染色均阳性细胞。每张切片在大脑运动皮质M1区高倍视野($\times 400$)下计算神经元凋亡指数(apoptotic index, AI):每张切片选取5个高倍视野,计数每个视野内NeuN染色阳性细胞数及NeuN和TUNEL染色均阳性的细胞数,NeuN和TUNEL染色均阳性的细胞数/NeuN染色阳性细胞数 $\times 100\%$ 即为凋亡指数。

1.5 iNOS检测

取石蜡切片脱蜡至水,3% H₂O₂室温孵育10min,胰酶消化10min,正常血清封闭10min,滴加一抗NeuN(鼠抗),4℃过夜,滴加生物素标记二抗,室温孵育30min,滴加辣根酶标记链霉卵白素,室温孵育30min,DAB显色,再滴加一抗iNOS(兔抗),4℃过夜,滴加生物素化二抗,室温孵育30min,滴加碱磷酶标记的链霉卵白素,室温孵育30min,NBT/BCIP显色。胞核着棕褐色即为NeuN染色阳性细胞,胞浆着蓝色、胞核着棕褐色即为NeuN和iNOS染色均阳性的细胞。每张切片在大脑运动皮质M1区取5个高倍视野($\times 400$),计数每个视野内NeuN染色阳性细胞数及NeuN和iNOS染色均阳性的细胞数,计算出平均iNOS阳

性神经元百分数,即 NeuN 和 iNOS 染色均阳性的细胞数/NeuN 染色阳性细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 统计学分析

使用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,凋亡指数及 iNOS 阳性神经元百分数以平均值 $\pm$ 标准差表示,两组之间比较使用独立样本 t 检验。同一组内不同时间点之间比较使用单因素方差分析(one way-ANOVA)。凋亡指数与 iNOS 阳性神经元百分数之间进行 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

脊髓横断损伤后大鼠均出现典型的截瘫表现,术后后肢均无自主活动,肌力 0 级,爬行时后肢拖行,3~7d 后后肢肌张力有一定增高,并伴有后肢挛缩。术后大鼠都伴有大便困难及硬结、尿潴留等。脊髓损伤模型组大鼠死亡 8 只,死亡率为 25%,补充相应数量。

阴性对照组与假手术组大鼠大脑运动皮质 M1 区在各时间点可见少量散在的 TUNEL 阳性

神经元,脊髓损伤组大鼠在术后 1d、3d、7d 及 14d 可见较多 TUNEL 阳性神经元(图 1)。三组大鼠不同时间点大脑运动皮质神经元凋亡指数见表 1。阴性对照组与假手术组各时间点的凋亡指数差异无统计学意义($P > 0.05$);脊髓损伤组的凋亡指数各时间点均高于阴性对照组和假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。脊髓损伤大鼠大脑运动皮质神经元凋亡于术后 1d 开始增多,3d 达高峰,7d 比 3d 时降低,14d 时进一步降低,但仍高于对照组和假手术组。

阴性对照组及假手术组大鼠各时间点大脑运动皮质 M1 区可见少量散在的 iNOS 标记阳性神经元,脊髓损伤组大鼠在术后 1d、3d 及 7d 可见较多 iNOS 标记阳性神经元,14d 时 iNOS 标记阳性神经元较同组前面时间点明显减少(图 2)。三组大鼠大脑运动皮质神经元 iNOS 阳性神经元百分数见表 2。阴性对照组与假手术组各时间点的 iNOS 阳性神经元百分数差异无统计学意义($P > 0.05$);脊髓损伤组术后 1d、3d、7d 时 iNOS 阳性神经元百分数高于阴性对照组和假手术组,差异有

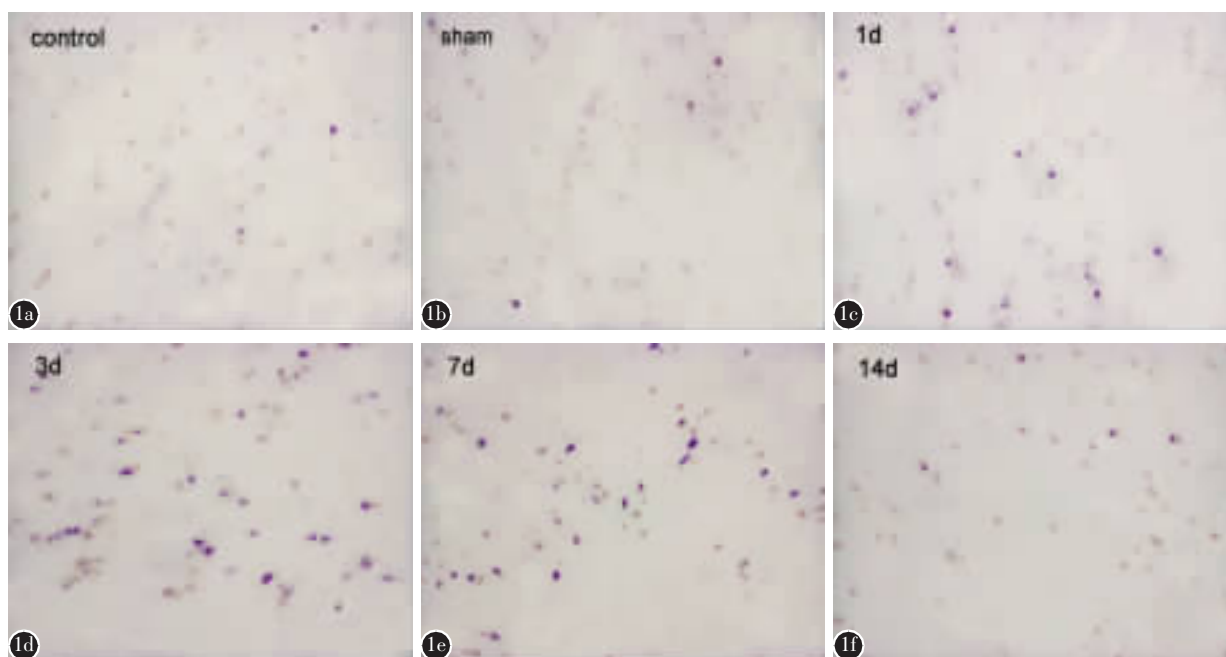


图 1 三组大鼠大脑运动皮质 M1 区 NeuN 与 TUNEL 染色结果(胞核着棕褐色为神经元,胞核着蓝色与棕褐色为凋亡神经元 $\times 400$) a 阴性对照组(control)可见少量散在的凋亡神经元 b 假手术组(sham)可见少量散在的凋亡神经元 c~f 脊髓损伤组术后 1d、3d、7d、14d 时可见较多凋亡神经元

Figure 1 TUNEL and NeuN staining results of motor cortex(M1 area) of rats in three groups(Nucleus of neuron was stained with brown, while nucleus of apoptosis neuron was stained with blue and brown $\times 400$) a In control group, there were a small quantity of apoptosis neurons b In sham-operation group, there were a small quantity of apoptosis neurons c~f On the 1st day, 3rd day, 7th day and 14th day in SCI group, more apoptosis neurons were found in this area

统计学意义 ($P<0.05$); 14d 时差异无统计学意义 ($P>0.05$)。脊髓损伤后大鼠大脑运动皮质 iNOS 阳

性神经元于术后 1d 开始增多, 3d 达高峰, 7d 开始降低, 14d 降至接近正常水平。

表 1 三组大鼠造模后不同时间点大脑运动皮质神经元凋亡指数 ($\bar{x}\pm s, \%$)

Table 1 Apoptotic index of neurons in motor cortex of each group

	阴性对照组 Control group	假手术组 Sham-operation group	脊髓损伤组 SCI group
术后 1d 1d after op	1.85±0.67	2.00±0.55	10.11±4.02 ^①
术后 3d 3d after op	2.37±0.75	1.93±0.46	56.53±8.63 ^②
术后 7d 7d after op	1.90±0.25	2.50±0.83	35.03±11.66 ^①
术后 14d 14d after op	2.43±0.87	1.98±0.72	3.78±1.03 ^①

注: ①与阴性对照组和假手术组比较 $P<0.05$, ②同组术后 3d 与术后 1d、7d 及 14d 比较 $P<0.01$

Note: ① Compared with control group and sham-operation group at the same time, $P<0.05$; ② Compared with other time point in SCI group, $P<0.01$

表 2 三组大鼠造模后不同时间点大脑运动皮质 iNOS 阳性神经元百分数 ($\bar{x}\pm s, \%$)

Table 2 Percentage of iNOS positive neurons in motor cortex of each group

	阴性对照组 Control group	假手术组 Sham-operation group	脊髓损伤组 SCI group
术后 1d 1d after op	3.72±1.08	3.15±0.67	17.92±2.75 ^①
术后 3d 3d after op	4.15±1.18	4.31±1.12	60.65±8.78 ^②
术后 7d 7d after op	3.95±1.11	3.82±1.31	34.35±7.74 ^①
术后 14d 14d after op	4.02±1.23	4.28±1.34	6.12±1.99

注: ①与阴性对照组、假手术组比较 $P<0.05$, ②与同组术后 1d、7d 及 14d 比较 $P<0.01$

Note: ① Compared with control group and sham-operation group at the same time, $P<0.05$; ② Compared with other time point in SCI group, $P<0.01$

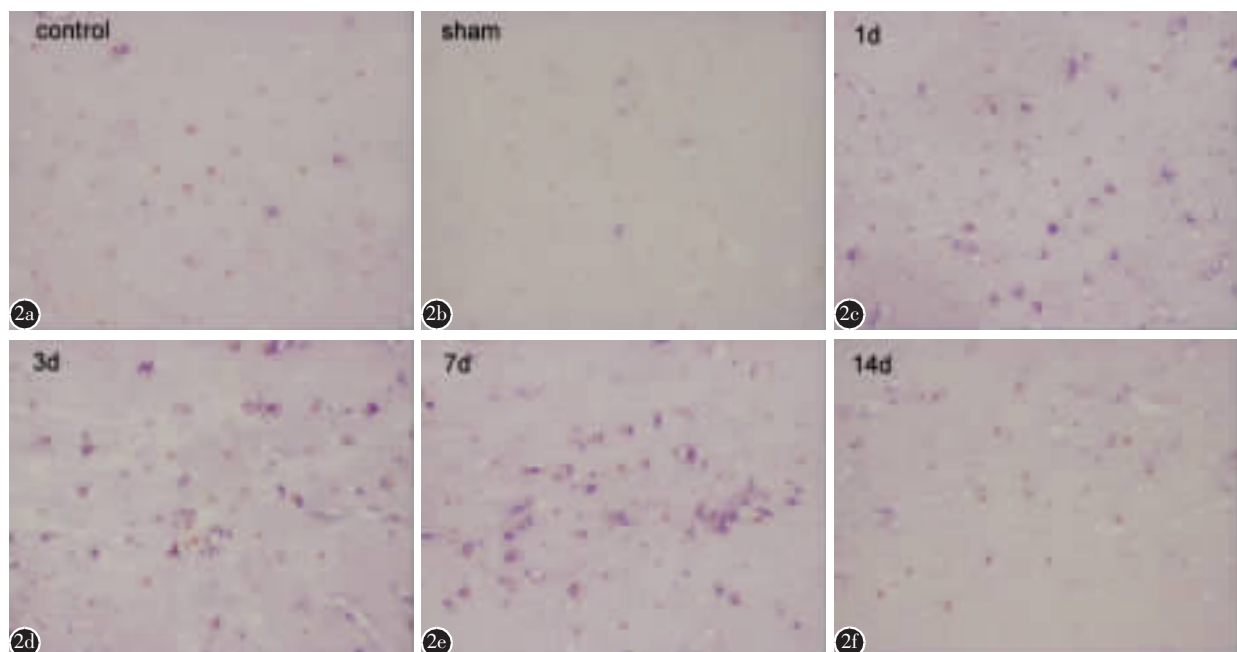


图 2 大脑运动皮质 M1 区 NeuN 与 iNOS 染色结果(胞核着棕褐色为神经元,胞浆着蓝色、胞核着棕褐色为 iNOS 染色阳性神经元 $\times 400$) **a** 阴性对照组(control)可见少量散在的 iNOS 标记阳性神经元 **b** 假手术组(sham)可见少量散在的 iNOS 标记阳性神经元 **c-f** 脊髓损伤组造模后术后 1d、3d 及 7d 可见较多 iNOS 标记阳性神经元, 14d 时 iNOS 标记阳性神经元明显减少

Figure 2 NeuN and iNOS staining of motor cortex (M1 area) of rats in three groups (Nucleus of neuron was stained with brown, while cytoplasm of iNOS positive neuron was stained with blue $\times 400$) **a** In control group, there were a small quantity of iNOS positive neurons **b** In sham-operation group, there were a small quantity of iNOS positive neurons **c-f** On the 1st day, 3rd day, 7th day in SCI group, more iNOS positive neurons were found in M1 area. While on the 14th day, iNOS positive neurons decreased obviously

脊髓损伤组大鼠大脑运动皮质神经元凋亡指数与 iNOS 阳性神经元百分数之间 Pearson 相关分析显示存在正相关关系($r=0.89, P<0.01$)。

3 讨论

脊髓损伤包括原发性损伤和继发性损伤两个病理过程^[7],它们共同决定脊髓损伤的最终结果。继发性损伤是原发性损伤后由分子和细胞介导的复杂的病理过程^[8],是一系列以生化反应为特征的主动自行破坏过程,可持续数小时、数天甚至数月,具有可逆性且可被控制^[9]。

在脊髓继发性损伤中,细胞凋亡可能起到主导作用,也是引起细胞死亡的主要方式^[10,11]。Crowe 等^[12]发现脊髓损伤后 6h 损伤部位出现神经元凋亡,伤后 8d 和 3 周凋亡细胞主要分布在损伤部位两端脊髓的传导束内,并提示凋亡可能同时伴有脊髓传导束的 Wallerian 变性。Liu 等^[13]在脊髓挫伤模型中发现 TUNEL 阳性神经元主要出现在损伤部位伤后 4~24h 内,伤后 8h 达高峰,而 TUNEL 阳性胶质细胞则可见于伤后 4h~14d,高峰出现在伤后 24h。Katoh 等^[14]报道脊髓损伤后 3d 在邻近损伤部位 2 个节段处发现了细胞凋亡。这些研究表明脊髓损伤后邻近损伤部位会出现细胞凋亡。目前,对脊髓损伤后受损的神经纤维束近侧端大脑皮质神经元是否出现逆行性病理变化存在不同的观点。Mcbride 等^[15]研究发现脊髓 T9 节段横断损伤后 20 周大脑皮质神经元数量无变化,只是神经元的大小显著减小。Wannier 等^[16]切断 2 只恒河猴皮质脊髓束 2 个月后,发现相应的皮质脊髓神经元大多未见明显变性。但这些研究结果受样本数少、计数及免疫组化方法等的影响,结论具有一定的局限性。近年来有研究发现大鼠脊髓损伤后 1 周大脑皮质脊髓束神经元出现凋亡并通过凋亡途径诱导神经元死亡^[4,5,17],脊髓损伤后 10 周只有少量的轴突受损的皮质脊髓束神经元存活^[18]。

本研究建立大鼠脊髓 T10 水平横断损伤模型,发现大鼠脊髓损伤后大脑相应运动皮质区神经元出现凋亡病理改变。本研究结果显示,正常大鼠大脑运动皮质神经元存在较低的凋亡指数,而脊髓损伤后 1d,大脑运动皮质神经元凋亡指数开始增加,损伤后 3d 神经元凋亡指数达到高峰,在损伤后 7d 开始下降,但 14d 时仍维持在较高水平。目前凋亡的时程及动力学特征还不明确并存

在多样性,这主要是由起始因子、组织类型及局部组织微环境所决定。一般来说细胞凋亡的过程需数小时至数天,比细胞坏死过程缓慢。轴突受损的神经元从 DNA 断裂到最终死亡需数天时间^[19,20]。本研究在时间窗上完善了脊髓损伤后大脑运动皮质神经元凋亡病理变化过程。Hains 等^[4]认为脊髓中少突胶质细胞的存活部分依赖于轴突衍生因子,脊髓损伤后皮质脊髓束神经元的凋亡可能促进了脊髓中少突胶质细胞的凋亡。可见脊髓损伤后大脑皮质与损伤局部的细胞凋亡之间可能存在一定关联,但目前还不明确,有待进一步研究。

Jurkiewicz 等^[21]发现脊髓损伤患者大脑躯体感觉皮质(S1 区)出现了萎缩表现;Wrigley 等^[22]研究发现完全性脊髓损伤患者大脑运动皮质(M1 区)的灰质容积较正常人明显减少。他们提出脊髓损伤患者大脑皮质感觉运动区会出现解剖结构变化。结合本研究结果,我们认为这可能是由于脊髓损伤后相应大脑皮层神经元凋亡等因素所致,由此推测这也可能是脊髓损伤后即使损伤局部残存神经纤维达到良好修复而感觉运动功能却不能有效或完全恢复的潜在原因。因此在脊髓损伤研究中不仅要专注损伤局部,还应关注整个神经系统的变化,这可能为将来脊髓损伤的治疗提供一定理论基础,也可能为评价各种脊髓损伤治疗手段的疗效提供了可参照的客观指标。

近年来,有研究显示 NO 在脊髓损伤后的继发性损伤中起着重要作用。周初松等^[23]以 RT-PCR 法检测大鼠脊髓损伤早期伤段脊髓组织中 NOS mRNA,发现各型 NOS mRNA 表达均增强。Xu 等^[24]用免疫组化和 Western blot 方法检测脊髓损伤后脊髓中 iNOS 及蛋白氧化应激代谢产物亚硝基酪氨酸(Nitrotyrosine, NT)的表达,发现两者均于损伤后 1d 增加,7d 达高峰;并且 iNOS 表达强度与其活性检测在时间变化上是一致的。Wu 等^[25]也发现脊髓损伤后脊髓中运动神经元表达 iNOS,而损伤后给予 NOS 抑制剂硝基精氨酸则可大大减少神经元死亡数目。Suzuki 等^[26]进一步研究发现脊髓损伤后早期给予 L-单甲基精氨酸(L-NMMA)抑制 NOS 活性可缩短后肢诱发电位的潜伏期,提高脊髓损伤后期后肢的运动功能,减轻髓鞘的空泡化。

本研究发现大鼠脊髓损伤后大脑运动皮质神经元 iNOS 表达增多,并与神经元凋亡的时程相

一致,即在损伤后 1d 开始增加,3d 达高峰,7d 仍维持在较高水平,这与 Xu 等^[24]报告的脊髓损伤后脊髓中 iNOS 表达情况相似。iNOS 表达与神经元凋亡指数间存在正相关。由此我们认为 iNOS 的诱导活化可能参与了大鼠脊髓损伤后大脑运动皮质神经元的凋亡过程,这可能是其发生凋亡的机制之一。关于 NO 诱导神经细胞死亡方式尚有争论,有研究者发现^[27],NO 能诱导培养的皮层神经元凋亡;但也有学者用不同浓度的 NO 孵育胶质细胞,引起少突胶质细胞的死亡而非凋亡^[28]。Bonfoco 等^[29]认为细胞凋亡还是死亡取决于损伤因素的严重程度。但脊髓损伤后炎性因子等因素诱导神经细胞中 iNOS 活化并表达增加导致 NO 产量增加,参与脊髓损伤后的继发损伤,引起神经细胞凋亡或死亡。因此 iNOS 表达增加可能在脊髓继发损伤的发生发展中起重要作用,选择性抑制 iNOS 可能是防治脊髓继发损伤的有效方法,并有可能对大脑运动皮质神经元起到保护作用。

4 参考文献

- Li GL, Brodin G, Farooque M, et al. Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1996, 55(3): 280-289.
- Yong C, Arnold PM, Zoubine MN, et al. Apoptosis in cellular compartments of rat spinal cord after severe contusion injury [J]. *J Neurotrauma*, 1998, 15(7): 459-472.
- Emery E, Aldana P, Bunge MB, et al. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury[J]. *J Neurosurg*, 1998, 89(6): 911-920.
- Hains BC, Black JA, Waxman SG. Primary cortical motor neurons undergo apoptosis after axotomizing spinal cord injury [J]. *J Comp Neurol*, 2003, 462(3): 328-341.
- Lee BH, Lee KH, Kim UJ, et al. Injury in the spinal cord may produce cell death in the brain [J]. *Brain Res*, 2004, 1020(1-2): 37-44.
- Valero-Cabre A, Fores J, Navarro X. Reorganization of reflex responses mediated by different afferent sensory fibers after spinal cord transection[J]. *J Neurophysiol*, 2004, 91(6): 2838-2848.
- Anderson TE, Stokes BT. Experimental models for spinal cord injury research: physical and physiological considerations[J]. *J Neurotrauma*, 1992, 9(Suppl 1): 135-142.
- O'Brien MF, Lenke LG, Lou J, et al. Astrocyte response and transforming growth factor-beta localization in acute spinal cord injury[J]. *Spine*, 1994, 19(20): 2321-2330.
- Ramer MS, Harper GP, Bradbury EJ. Progress in spinal cord research: a refined strategy for the International Spinal Research Trust[J]. *Spinal Cord*, 2000, 38(8): 449-472.
- Lu J, Ashwell KW, Waite P. Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis[J]. *Spine*, 2000, 25(14): 1859-1866.
- Profyris C, Cheema SS, Zang D, et al. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury [J]. *Neurobiol Dis*, 2004, 15(3): 415-436.
- Crowe M J, Bresnahan JC, Shuman SL, et al. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys[J]. *Nat Med*, 1997, 3(1): 73-76.
- Liu XZ, Xu XM, Hu R, et al. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury[J]. *J Neurosci*, 1997, 17(14): 5395-5406.
- Katoh K, Ikata T, Katoh S, et al. Induction and its spread of apoptosis in rat spinal cord after mechanical trauma [J]. *Neurosci Lett*, 1996, 216(1): 9-12.
- McBride RL, Feringa ER, Garver MK, et al. Prelabeled red nucleus and sensorimotor cortex neurons of the rat survive 10 and 20 weeks after spinal cord transection [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1989, 48(5): 568-576.
- Wannier T, Schmidlin E, Bloch J, et al. A unilateral section of the corticospinal tract at cervical level in primate does not lead to measurable cell loss in motor cortex [J]. *J Neurotrauma*, 2005, 22(6): 703-717.
- Sasaki M, Hains BC, Lankford KL, et al. Protection of corticospinal tract neurons after dorsal spinal cord transection and engraftment of olfactory ensheathing cells[J]. *Glia*, 2006, 53(4): 352-359.
- Feringa ER, Vahlsing HL. Labeled corticospinal neurons one year after spinal cord transection[J]. *Neurosci Lett*, 1985, 58(3): 283-286.
- McKay HA, Brannstrom T, Wiberg M, et al. Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat: timecourse of cell death and elimination[J]. *Exp Brain Res*, 2002, 142(3): 308-318.
- Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis[J]. *J Histochem Cytochem*, 1999, 47(9): 1101-1110.
- Jurkiewicz MT, Crawley AP, Verrier MC, et al. Somatosensory cortical atrophy after spinal cord injury: a voxel-based morphometry study[J]. *Neurology*. 2006, 66(5): 762-764.
- Wrigley PJ, Gustin SM, Macey PM, et al. Anatomical changes in human motor cortex and motor pathways following complete thoracic spinal cord injury[J]. *Cereb Cortex*, 2009, 19(1): 224-232.
- 周初松, 靳安民, 刘成龙, 等. 大鼠脊髓伤后伤段脊髓一氧化氮合酶基因表达及其活性动态变化 [J]. *中华医学杂志*, 2001, 81(3): 183-184.
- Xu J, Kim GM, Chen S, et al. iNOS and nitrotyrosine expression after spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2001, 18(5): 523-532.
- Wu W, Liuzzi FJ, Schinco FP, et al. Neuronal nitric oxide

综述

促进诱导多能干细胞向神经系统细胞分化的研究现状

State of the art review of pluripotent stem cell differentiating into nervous system cells

杨 阳, 刘 斌, 戎利民

(中山大学附属第三医院脊柱外科 510630 广州市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.06.13

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2013)-06-0552-04

诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSC) 是一种应用相关转录因子将细胞重编程、逆转其发育潜能而得到的类似于胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESC) 的一种多能性干细胞。2006 年, Takahashi 与 Yamanaka^[1]将 Oct3/4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 4 种因子转移至小鼠成纤维细胞, 首次获得 iPSC。由于其来源于自身细胞, 自体移植时不涉及伦理问题, 无免疫原性, 在替代治疗、药物筛选、疾病建模等方面均可以发挥潜在的巨大优势^[2]。iPSC 作为一种多能干细胞, 在适当条件下可实现神经分化, 即定向分化为神经干细胞 (neural stem cell, NSC)、神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞等组成神经系统的各种细胞^[3,4], 因而成为治疗神经系统疾病的理想选择。有学者总结了经典的胚胎干细胞神经分化的方法^[5-7], 这也成为确立 iPSC 神经分化方法的重要参考。但目前 iPSC 神经分化效率明显低于 ESC, 仅为 5%, 且机制不甚清楚^[8-10]。因而如何促进其神经分化, 最终发挥治疗潜能成

为临床应用的一个挑战。为总结促进 iPSC 神经分化的各种方法, 更好地生成神经细胞, 笔者就此综述如下。

1 iPSC 神经分化过程

多数文献中所报道的人和鼠类 iPSC 神经分化方法大体上需经历 4 个阶段^[3,11,12]: 首先悬浮培养形成拟胚体 (embryonic body, EB); EB 进一步分化为玫瑰花环样结构 (rosette structure); 后者被机械性分离, 并扩增形成神经球 (neurosphere); 神经球是 NSC 的聚集体, 悬浮生长呈球状, 将其置于纤维连接蛋白等基质包被的培养板中, 加入向神经元、神经胶质细胞分化的特定培养基即可以得到目的细胞。目前, 还出现了无需经过 EB 阶段的 iPSC 神经分化方法^[4]: 将 iPSC 置于添加或不添加 noggin 等分化刺激因子的培养基中, 直至单层神经上皮细胞 (neuroepithelial cell) 形成, 再使用机械法分离上述细胞, 置于神经球培养基中以形成神经球, 最后再进行向神经元或神经胶质细胞的定向分化。目前各种促进 iPSC 神经分化的方法多是作用于上述不同阶段而实现的。

2 神经上皮干细胞在 iPSC 神经分化中的作用

神经上皮干细胞 (neuroepithelial stem cell, NES),

第一作者简介: 男 (1987-), 硕士研究生, 研究方向: 干细胞基础研究

电话: (020)85252900 E-mail: yanghaiyang1987@sina.com

通讯作者: 戎利民 E-mail: ronglimin@21cn.com

synthase is induced in spinal neurons by traumatic injury[J]. Neuroscience, 1994, 61(4): 719-726.

26. Suzuki T, Tatsuoka H, Chiba T, et al. Beneficial effects of nitric oxide synthase inhibition on the recovery of neurological function after spinal cord injury in rats [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2001, 363(1): 94-100.
27. Palluy O, Rigaud M. Nitric oxide induces cultured cortical neuron apoptosis[J]. Neurosci Lett, 1996, 208(1): 1-4.
28. Mitrovic B, Ignarro LJ, Vinters HV, et al. Nitric oxide induces necrotic but not apoptotic cell death in oligodendro-

cytes[J]. Neuroscience, 1995, 65(2): 531-539.

29. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, et al. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(16): 7162-7166.

(收稿日期: 2012-08-28 末次修回日期: 2012-11-20)

(英文编审 蒋 欣/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)