

硫酸软骨素酶 ABC 及 Nogo-66 受体拮抗剂联合鼠胚神经干细胞移植对大鼠脊髓损伤的影响

余永涛, 廖烨晖, 唐 强, 彭道璇, 钟德君

(四川医科大学附属医院脊柱外科 646000 四川省泸州市)

【摘要】目的:研究硫酸软骨素酶 ABC(chondroitinase ABC, ChABC)、Nogo-66 受体拮抗剂[Nogo-66(1-40) antagonist peptide, NEP1-40]及鼠胚神经干细胞(neural stem cells, NSCs)联合移植对大鼠损伤脊髓功能恢复的影响。**方法:**体外应用全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)(浓度 1.0 μ mol/L)诱导 NSCs(前期实验分离、培养并冻存的鼠胚 NSCs),诱导后鉴定 NSCs 特异性标志物,移植前通过 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-Bromo-2-deoxyUridine, Brdu)标记 NSCs。将 60 只 SD 大鼠随机分为假手术组(A 组, $n=10$)、损伤对照组(B 组, $n=10$)、NSCs 治疗组(C 组, $n=10$)、NSCs 联合 ChABC 治疗组(D 组, $n=10$)、NSCs 联合 NEP1-40 治疗组(E 组, $n=10$)、NSCs 联合 ChABC 和 NEP1-40 治疗组(F 组, $n=10$)。移植前分别对 B、C、D、E 及 F 组的大鼠制作胸段脊髓全横断损伤模型。术后 3d, E 和 F 组经留置的导管注入 NEP1-40 20 μ l/d, 连续 28d; 术后 8d, C、D、E 及 F 组经留置导管注入经 ATRA 干预和 Brdu 标记的 NSCs 10 μ l; 术后 8d, D 组和 F 组经留置导管注入 ChABC 10 μ l/d, 连续 7d; 各时间点通过留置导管注入生理盐水保持各组移植液等量。术前及术后不同时间点, 用 BBB 评分和体感诱发电位(somatosensory evoked potentials, SEP)潜伏期对大鼠后肢神经功能进行评价。移植后 8 周通过 HE 染色观察损伤脊髓组织情况, 免疫荧光染色观察移植 NSCs 存活、神经元分化及轴突生长情况。**结果:**体外应用 1.0 μ mol/L 的 ATRA 诱导 NSCs 培养, 可提高 NSCs 向神经元分化的比例。移植后 2 周开始各组大鼠 BBB 评分、SEP 潜伏期开始观察到改善, 移植治疗各组均优于损伤对照组, 组间 BBB 评分和 SEP 潜伏期有差异($P<0.05$); 移植后 2 周、5 周、8 周各时间点, B 组与 C、D、E 及 F 组比较, BBB 评分和 SEP 潜伏期较差($P<0.05$); 在移植治疗各组中, F 组神经功能的恢复最明显, F 组与 C、D 及 E 组比较具有较高的 BBB 评分和较短 SEP 潜伏期($P<0.05$)。移植后 8 周, HE 染色显示: A 组细胞结构完整、排列规则; B 组组织结构严重破坏, 细胞排列紊乱, 见大量较大的囊腔及胶质瘢痕形成; C、D、E 及 F 组细胞增生明显, 囊腔较少。免疫荧光染色显示: C、D、E 及 F 组内可见橘红色 Brdu 标记阳性细胞, F 组阳性细胞数多于 C、D 和 E 组, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。C、D、E、F 组微管相关蛋白-2(microtubule-associated protein 2, MAP-2)标记阳性细胞数多于 B 组, F 组多于 C、D、E 组, 差异有统计学意义($P<0.05$); C、D、E、F 组 MAP-2 标记阳性细胞面积大于 B 组, F 组大于 C、D、E 组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**ATRA 诱导后 NSCs 移植可促进大鼠脊髓损伤功能的恢复, 且联合 ChABC 和 NEP1-40 移植对损伤脊髓功能的恢复具有协同促进作用。

【关键词】脊髓损伤; 细胞移植; 全反式维甲酸; 神经干细胞; 硫酸软骨素酶 ABC; Nogo-66 受体拮抗剂; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2016.06.08

中图分类号: R683.2, Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2016)-06-0527-10

Effects of ChABC, NEP1-40 combined with neural stem cell transplantation on the recovery of neurological function in rats with spinal cord injury/YU Yongtao, LIAO Yehui, TANG Qiang, et al// Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2016, 26(6): 527-536

【Abstract】Objectives: To investigate the effects of combined transplantation of chondroitinase ABC(ChABC), Nogo-66(1-40) antagonist peptide(NEP1-40) and rat embryonic neural stem cells(NSCs) on the recovery of neurological function in rats with spinal cord injury. **Methods:** The NSCs cryopreserved in our preliminary experiment were cultured and induced by all-trans-retinoic acid (ATRA)(the concentration of 1.0 μ mol/L) in vitro, the immunofluorescence techniques were used to detect the expressions of NSCs specific markers of

第一作者简介: 男(1989-), 硕士研究生在读, 研究方向: 脊柱脊髓损伤

电话: (0830)3165441 E-mail: yuyongtao726038@163.com

通讯作者: 钟德君 E-mail: zdj-1974@163.com

glial fibrillary acidic protein(GFAP) and neuron-specific enolase(NSE). The NSCs were marked by 5-Bromo-2-deoxy Uridine (BrdU) before implantation. 60 adult Sprague-Daw female rats were randomly divided into six groups, namely, the sham operation group(group A, $n=10$), the injury control group(group B, $n=10$), the NSCs treatment group(group C, $n=10$), the NSCs combined with ChABC treatment group(group D, $n=10$), the NSCs combined with NEP1-40 treatment group (group E, $n=10$), and NSCs combined with ChABC and NEP1-40 treatment group(group F, $n=10$). Complete thoracic spinal cord transected injury models of rats were performed in all rats except group A before transplantation. On the third day after surgery, group E and group F were injected with NEP1-40 for 20 μ l/d through the indwelling catheter for 28 days consecutively; on the eighth day after surgery, group C, D, E and F were injected with 10 μ l of NSCs that were intervened with ATRA and labeled with BrdU through the indwelling catheter; and on the eighth day after surgery, group D and F were injected with ChABC for 10 μ l/d through the indwelling catheter for 7 days consecutively. Equal quantity of transplant liquid was kept through injection with normal saline through the indwelling catheter at all time points. Basso, Beattie, Bresnahan(BBB) score and somatosensory evoked potential(SEP) test were used to evaluate the functional changes preoperatively, postoperatively as well as 2 weeks, 5 weeks and 8 weeks after transplantation, respectively. The injured spinal cords were sampled for observing 8 weeks after transplantation and HE staining were performed to observe the morphological alteration in the injured spinal cord. The number, distribution and differentiation of transplanted NSCs were examined by double immunofluorescence staining, by using microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and BrdU. **Results:** ATRA could remarkably promote the differentiation of NSCs into neurons. 2 weeks after operation, the recovery of the BBB score and the SEP latent period were observed in SCI groups, and the recovery of all transplanted treatment groups was better than that of SCI model group. The BBB score and SEP latent period showed significant difference at any observing point after transplantation ($P<0.05$). BBB score of group B at each time point was significantly lower than that of group C, D, E and F, and SEP latent period was significantly longer than that of group C, D, E and F ($P<0.05$); the outcome of neurological functional recovery in group F remarkably surpassed than that of group C, D and E among all post-transplantation observing time points, and group F had higher BBB score and shorter SEP latent period than group C, D, E($P<0.05$). 8 weeks after transplantation, HE staining in group A showed complete morphological structure and regular arrangement of cells; while the morphological structure was seriously damaged in group B, where irregular arrangement of cells as well as a large number of scar and cysts could be seen; and there were obvious cells and capillary hyperplasia and a few small cysts in group C, D, E, and group F in particular. The viable positive cells labeled by BrdU could only be observed in group C, D, E and F, and the number of BrdU-positive cells in group F were greater than that of group C, D and E($P<0.05$), with the difference being statistically significant. Using Fluorescence microscope, the double positive cells for MAP-2 and BrdU could be detected in group C, D, E and F. The axonal regeneration and growth was distinctly promoted in group F. The number and surface area of positive cells labeled by MAP-2 showed significant difference($P<0.05$), and group F had greater number of cells and larger surface area when compared with group A, B, C, D and E($P<0.05$). **Conclusions:** The transplantation of NSCs induced by ATRA can improve the functional recovery of the SCI in rats, moreover, combined chondroitinase ABC and NEP1-40 has a synergistic effect on the recovery of neurological function in rats with spinal cord injury.

【Key words】 Spinal cord injury; ATRA; Neural stem cells; ChABC; NEP1-40; Cell transplantation; Rat

【Author's address】 Department of Spinal Surgery, Affiliated Hospital of Sichuan Medical university, Luzhou, Sichuan, 646000, China

脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)后,受损脊髓组织神经细胞大量丢失,周围微环境发生不利改变,主要包括:内源性生长因子缺乏、损伤脊髓周围硫酸软骨素蛋白多糖(chondroitin sulphate

proteoglycans,CSPGs)及鞘磷脂相关抑制因子表达上调,致使轴突的再生和生长受到限制,脊髓功能的恢复非常有限^[1,2]。神经干细胞(neural stem cells,NSCs)移植为SCI治疗带来了新的希望。

NSCs为具有自我增殖和多向分化潜能的神经祖细胞,在一定条件下可分化神经元、星型胶质细胞和少突胶质细胞;将 NSCs 移植到大鼠 SCI 处,可促进大鼠的神经功能恢复^[3]。CSPGs 对轴突的再生和生长具有明显的抑制作用,而硫酸软骨素酶 ABC(ChABC)是具有催化分解 CSPGs 的一种酶,通过 ChABC 分解 CSPGs 可有效地促进损伤脊髓功能的恢复^[4,5]。鞘磷脂相关抑制因子是中枢神经系统突的再生主要的抑制因子,包括可溶性相关糖蛋白(myelin-associated glycoprotein, MAG)、少突胶质细胞鞘磷脂糖蛋白(oligodendrocyte myelin glycoprotein)和 Nogo 蛋白三种^[6-8],上述抑制因子与 Nogo-66 的特异性受体(NR)结合,可抑制轴突的再生和生长^[9]。NEP1-40 能有效地阻断 Nogo-66 与 NR 结合,促进轴突的再生、生长^[10]。全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)是维生素 A 类的衍生物,可以透过血脑屏障,其在胚胎发育、细胞分化和成熟中均有作用,能在体外诱导 NSCs 向神经元方向分化,是形成神经元之间永久突触联系必不可少的物质^[11,12]。本研究旨在探讨 ChABC、NEP1-40 及 ATRA 诱导培养的 NSCs 联合移植对大鼠损伤脊髓功能恢复的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

成年健康雌性 SD 大鼠 60 只(体重 200~500g,由泸州医学院实验动物中心提供)。鼠胚 NSCs 由前期实验冻存细胞提供^[13]。ATRA、4,6-二脒基-2-苯吲哚盐酸(4,6-diamidino-2-phenylindole-2-hci, DAPI)(Signa 公司, USA); DMEM/F12、B27 辅助生长因子、胎牛血清(Gibco 公司, USA); 抗神经元特异性烯醇化酶(neurone specific enolase, NSE)、抗胶质细胞原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、小鼠抗微管相关蛋白-2(microtubule-associated protein 2, MAP-2)IgG、FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(武汉博士德生物工程有限公司);兔抗-BrdU 多克隆抗体;罗丹明标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥);NEP1-40(北京博奥生物技术有限公司);ChABC(PeproTech 公司, 美国)。

1.2 NSCs 的培养及诱导分化后鉴定

将冻存 NSCs 复苏、培养^[14]。取三代的 NSCs,接种到 6 孔培养板(预先经多聚赖氨酸包被),接

种密度为 1×10^6 个/ml,实验组中加入 ATRA(浓度 $1.0 \mu\text{mol/L}$),连续 7d^[12],对照组不加 ATRA, ATRA 干预培养 7d 后,行免疫双标染色鉴定神经元和星型胶质细胞,并同时用 DAPI 对细胞核进行染色。荧光显微镜计算 DAPI 染色阳性的细胞核数目、NSE 阳性细胞数及 GFAP 阳性细胞数。通过以下公式计算百分比:NSE 阳性细胞百分比=NSE+/DAPI+;GFAP 阳性细胞百分比=GFAP+/DAPI+,比较实验组与对照组神经元和星型胶质细胞分化差异。

1.3 实验分组及脊髓全横断模型建立

将 60 只 SD 大鼠随机分为 6 组:假手术组(A 组, $n=10$)、损伤对照组(B 组, $n=10$)、NSCs 治疗组(C 组, $n=10$)、NSCs 联合 ChABC 治疗组(D 组, $n=10$)、NSCs 联合 NEP1-40 治疗组(E 组, $n=10$)、NSCs 联合 ChABC 和 NEP1-40 治疗组(F 组, $n=10$)。分别对 B 组、C 组、D 组、E 组及 F 组的大鼠进行胸段脊髓全横断损伤模型制作:将 SD 大鼠用 2%戊巴比妥钠进行腹腔注射麻醉,以 T9~T11 为中心暴露待损伤脊髓节段,用尖刀片横断脊髓,解剖显微镜下将 PE-10 号导管经蛛网膜下腔向头端植入脊髓横断处,固定导管后逐层缝合,体外导管热压封闭,已备后期细胞移植。A 组只做椎板切除术,放置蛛网膜下腔导管。实验过程中动物死亡后立即补充。

1.4 ATRA 诱导的 NSCs 移植

NSCs 移植前 1d 采用 Brdu 标记 NSCs,标记成功后调节浓度细胞为 2×10^5 个/ μl 备用。术后 3d, E 组和 F 组经留置的 PE-10 号导管向脊髓横断处蛛网膜下腔注入 NEP1-40 $20 \mu\text{l/d}$ (浓度: $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$),连续 28d^[10];术后 8d, C、D、E 及 F 组在无菌条件下用微量注射器经留置导管向脊髓横断处蛛网膜下腔注入经 ATRA 诱导和 BrdU 标记的 NSCs $10 \mu\text{l}$ (细胞浓度: 2×10^5 个/ μl);术后 8d, D 组和 F 组经留置导管向脊髓横断处蛛网膜下腔注入 ChABC $10 \mu\text{l/d}$ (浓度: 5U/ml),连续 7d;各时间点各组通过留置导管注入生理盐水保持移植液等量,进行对照。

1.5 双后肢运动功能评估

采用 Basso 等^[15]提出的大鼠后肢运动评估量表,每组大鼠分别于造模术前 1d、术后 1d 及移植后 2、5、8 周时对大鼠进行评估:将各组大鼠放在 $70 \times 90 \text{cm}$ 塑料模板上,观察大鼠双侧后肢运动情

况,观察 4min,观察结果按照 BBB 测试评分表进行评分。

1.6 体感诱发电位(SEP)检测

采用体感诱发电位(SEP)分别于术前 1d、术后 1d 及移植后 2、5、8 周对大鼠感觉神经传导通路进行检测,记录 SEP 潜伏期的变化。

1.7 组织染色观察

移植后 8 周,完成 BBB 评分和电生理检查后,各组大鼠均给予生理盐水和 4%中性多聚甲醛磷酸盐缓冲液心脏灌注固定。原入路暴露脊髓,以横断面为中心取长约 4cm 脊髓组织,将取出的损伤脊髓进行修整为约 1×1cm,石蜡包埋、连续 5 μ m 切片。每组标本随机取 10 张切片行 HE 染色,光镜下观察损伤区域组织改变。

1.8 免疫荧光染色观察轴突生长情况

每个标本取 8 张石蜡切片,经脱水、抗原修复、封闭,采用一抗兔抗-BrdU 标记神经元、二抗罗丹明标记山羊抗兔 IgG 显色,DAPI 复染,荧光显微镜观察 BrdU 阳性细胞;每个标本取 8 张石蜡切片,加入一抗兔抗-BrdU 多克隆抗体(工作浓度 1:50)/小鼠抗-MAP-2 单克隆抗体(工作浓度 1:50)共 50 μ l,二抗罗丹明-山羊抗兔 IgG 和 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(工作浓度 1:50),常规 DAPI 复染,甘油封片,荧光显微镜下观察神经元分化情况。从每组随机选取 10 张切片,每张切片随机选 5 个视野,计算机图像分析仪测定 Brdu 标记阳性细胞数、MAP-2 的阳性细胞表达的均数及面积。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件统计学分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间差异用单因素方差分析,SNK-q 进行组间的两两比较;不同干预处理间交互效应应用析因设计方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCs 特异性表面标志物鉴定

NSCs 免疫荧光 NSE 染色阳性细胞(红色),胞体呈椭圆或扁三角形;荧光 GFAP 染色阳性细胞(绿色),细胞向周围发出数条突起,并相互交织成网,DAPI 细胞核染色呈蓝色(图 1)。ATRA 诱导组中,平均每个视野 DAPI 阳性细胞数为 138.66 $\pm$ 16.93 个、神经元(NSE)阳性细胞数为 152.35 $\pm$ 12.23 个、星形胶质细胞(GFAP)阳性细胞

数为 35.83 $\pm$ 9.76 个;对照组中,平均每个视野 DAPI 阳性细胞数为 132.66 $\pm$ 15.21 个、神经元(NSE)阳性细胞数为 26.17 $\pm$ 9.32 个、星形胶质细胞(GFAP)阳性细胞数为 55.53 $\pm$ 12.58 个。两组比较,神经元细胞分化比例,ATRA 诱导组明显增高对照组($P<0.05$),而分化星形胶质细胞比例,对照组高于 ATRA 诱导组($P<0.05$)。

2.2 大鼠后肢功能评分

术前各组大鼠评分均为 21 分。移植前 1d,A 组均为 21 分,B、C、D、E、F 组的后肢功能完全丧失,评分均为 0 分。移植后从 2 周开始大鼠后肢开始有轻微活动,移植后 2、5、8 周各时间点,组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。组间两两比较结果显示;C、D、E、F 组评分均高于 B 组($P<0.05$);D、E 和 F 组评分均高于 C 组,F 组高于 D 和 E 组($P<0.05$),D、E 组之间差异无统计学意义($P>0.05$)(表 1)。ChABC 及 NEP1-40 联合移植的效应估计值为 2.212,大于两者单独移植效应之和 1.085。

2.3 神经传导功能

移植前 1d,B、C、D、E、F 组体感诱发电位(SEP)潜伏期与 A 组比较明显延长($P<0.05$),B、C、D、E、F 各组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。移植后 2、5、8 周各时间点,潜伏期逐渐缩短,组间比较差异有统计学意义($P<0.05$),组间两两比较结果显示;C、D、E、F 组 SEP 潜伏期短于 B 组($P<0.05$),D、E 和 F 组潜伏期短于 C 组,F 组潜伏期短于 D、E 组($P<0.05$),D、E 组之间差异无统计学意义($P>0.05$)(表 2)。ChABC 及 NEP1-40 联合移植的效应估计值为 2.308,大于两者单独移植效应之和 1.556。

2.4 组织染色观察

脊髓组织 HE 染色显示,A 组灰、白质分界清楚,纤维束排列规则,细胞轮廓清楚,结构完整;移植后 8 周时 B 组细胞结构消失,见大量囊腔、胶质瘢痕形成;C、D、E、F 组细胞增生明显并聚集在瘢痕周围,囊腔较少(图 2)。

2.5 移植细胞存活情况观察

移植后 8 周损伤处脊髓组织免疫荧光染色观察发现,A 组、B 组内未见 Brdu 标记阳性的 NSCs;C、D、E 及 F 组内可见橘红色 Brdu 标记阳性细胞,细胞呈圆形或椭圆形聚集于纤维束和空洞周围(图 3)。平均每个视野 BrdU 阳性细胞数:C

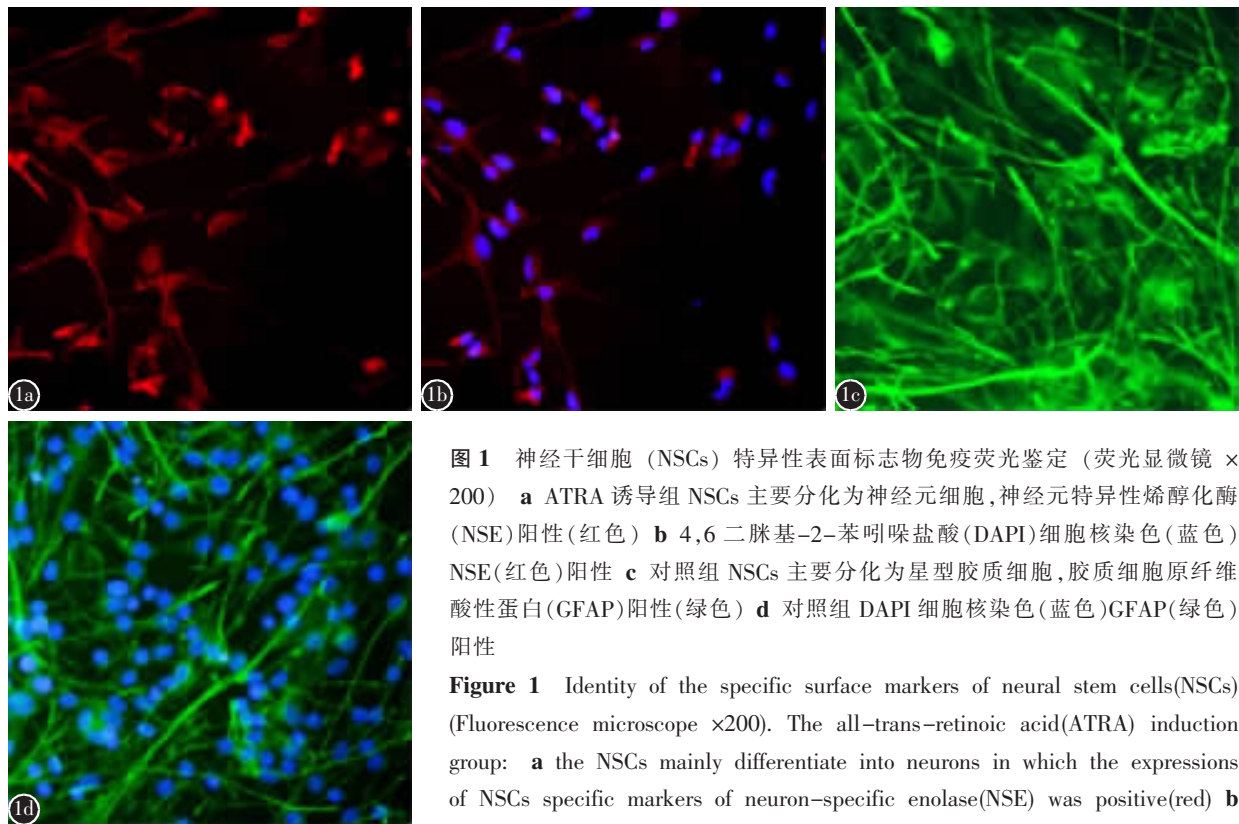


图 1 神经干细胞 (NSCs) 特异性表面标志物免疫荧光鉴定 (荧光显微镜 $\times 200$) a ATRA 诱导组 NSCs 主要分化为神经元细胞, 神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 阳性 (红色) b 4,6 二脒基-2-苯吲哚盐酸 (DAPI) 细胞核染色 (蓝色) NSE (红色) 阳性 c 对照组 NSCs 主要分化为星型胶质细胞, 胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 阳性 (绿色) d 对照组 DAPI 细胞核染色 (蓝色) GFAP (绿色) 阳性

Figure 1 Identity of the specific surface markers of neural stem cells (NSCs) (Fluorescence microscope $\times 200$). The all-trans-retinoic acid (ATRA) induction group: a the NSCs mainly differentiate into neurons in which the expressions of NSCs specific markers of neuron-specific enolase (NSE) was positive (red) b the nuclei were stained blue by 4, 6-diamidino-2-phenylindole-2-hydrochloride (DAPI)

The control group: c the NSCs mainly differentiate into astrocytes in which the expressions of NSCs specific markers of glial fibrillary acidic protein (GFAP) was positive (green) d The nuclei were stained blue by DAPI, and showed positive GFAP (green)

表 1 各组大鼠在不同时间点后肢运动功能 BBB 评分比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Table 1 The BBB score of hind limb in sham, SCI control and treatment group at different time

组别 Group	术前 1d 1d before operation	术后 1d 1d after operation	移植后 2 周 2w after transplantation	移植后 5 周 5w after transplantation	移植后 8 周 8w after transplantation
A 组 Group A	21	21	21	21	21
B 组 Group B	21	0	6.40 $\pm$ 0.30	7.58 $\pm$ 0.22	7.59 $\pm$ 0.15
C 组 Group C	21	0	6.95 $\pm$ 0.21 ^①	7.98 $\pm$ 0.17 ^①	8.0 $\pm$ 0.20 ^①
D 组 Group D	21	0	7.55 $\pm$ 0.24 ^{①②}	8.54 $\pm$ 0.20 ^{①②}	8.57 $\pm$ 0.22 ^{①②}
E 组 Group E	21	0	7.51 $\pm$ 0.26 ^{①②}	8.47 $\pm$ 0.31 ^{①②}	8.52 $\pm$ 0.25 ^{①②}
F 组 Group F	21	0	8.48 $\pm$ 0.37 ^{①②③}	10.39 $\pm$ 0.53 ^{①②③}	10.71 $\pm$ 0.45 ^{①②③}

注: ①与 B 组比较 $P<0.05$; ②与 C 组比较 $P<0.05$; ③与 D、E 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with group B, $P<0.05$; ②Compared with group C, $P<0.05$; ③Compared with group D and E, $P<0.05$

组为 43.2 ± 9.5 个, D 组为 88.1 ± 7.5 个, E 组为 86.6 ± 6.9 个, F 组为 96.2 ± 6.2 个, C、D、E 及 F 组多组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$); D、E 及 F 组细胞数多于 C 组, F 组多于 D 与 E 组 ($P<0.05$), D 与 E 组之间差异无统计学意义 ($P>$

0.05)。

2.6 轴突生长情况

移植后 8 周, 各组 BrdU+MAP-2 免疫荧光染色显示, A 组和 B 组未检测到 BrdU+MAP-2 双染细胞。C、D、E 及 F 组 BrdU 染色阳性细胞呈暗

表 2 各组大鼠在不同时间点 SEP 潜伏期比较 (n=10, $\bar{x}\pm s$, ms)
Table 2 The average reaction latency of SEP at different time

组别 Group	术前 1d 1d before operation	术后 1d 1d after operation	移植后 2 周 2w after transplantation	移植后 5 周 5w after transplantation	移植后 8 周 8w after transplantation
A 组 (Group A)	6.79±0.28	6.86±0.29	6.94±0.37	6.90±0.34	6.73±0.28
B 组 (Group B)	6.90±0.35	21.36±1.51	20.39±1.11 ^①	18.93±1.05 ^①	17.07±1.51 ^①
C 组 (Group C)	6.89±0.34	21.32±1.54	19.17±1.05 ^①	17.59±0.94 ^①	15.79±1.08 ^①
D 组 (Group D)	6.91±0.42	21.17±1.50	18.01±0.91 ^{①②}	16.23±0.97 ^{①②}	14.51±1.30 ^{①②}
E 组 (Group E)	6.95±0.37	21.45±1.42	18.00±0.94 ^{①②}	16.17±1.04 ^{①②}	14.38±1.21 ^{①②}
F 组 (Group F)	6.88±0.34	21.29±1.36	16.38±0.96 ^{①②③}	14.38±1.68 ^{①②③}	11.10±1.40 ^{①②③}

注:①与 B 组比较 $P<0.05$;②与 C 组比较 $P<0.05$;③与 D、E 组比较 $P<0.05$
Note: ①Compared with group B, $P<0.05$; ②Compared with group C, $P<0.05$; ③Compared with group D and E, $P<0.05$

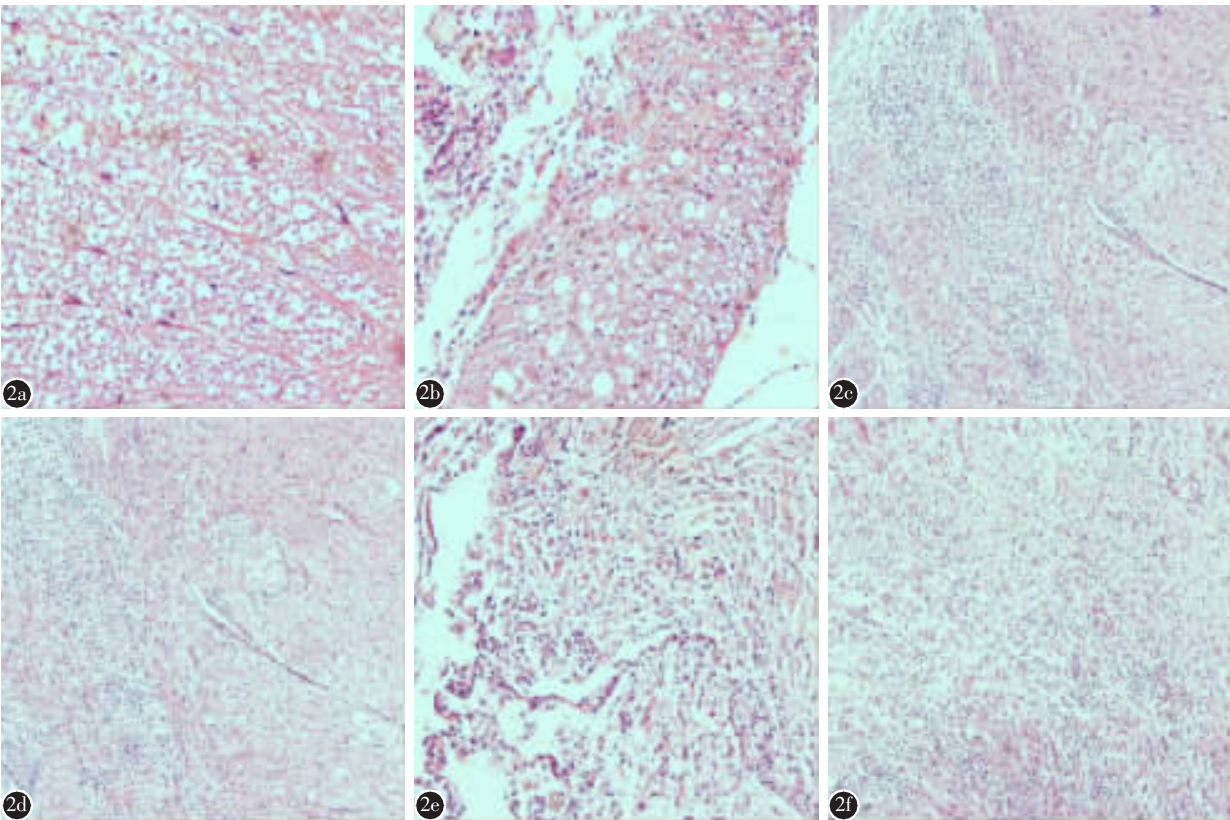


图 2 移植 8 周,脊髓组织横断面 HE 染色观察(光学显微镜×200) a A 组灰、白质分界清楚,纤维束排练规则,细胞轮廓清楚,结构完整 b 损伤对照组细胞结构消失,见大量囊腔、胶质瘢痕形成 c~f C、D、E 和 F 组细胞增生明显并聚集在瘢痕周围,囊腔较少

Figure 2 HE staining of spinal cord 8 weeks after transplantation:(microscope×200) a the morphological structure was complete and arrangement of cells was regular in group A b the morphological structure was seriously damaged, and irregular arrangement of cells as well as a large number of scar and cysts could be seen in group B c~f there were obvious cell and capillary hyperplasia and a few small cysts in group C, D, E, and group F in particular

红色荧光。MAP-2 染色阳性细胞主要分布于神经元的胞体和突起,而胶质细胞无染色,MAP-2 染色阳性细胞的轴突呈草绿色荧光,向四周放射、迁移(图 4)。B、C、D、E 及 F 组多组间比较差异有统

计学意义 ($P<0.05$);C、D、E、F 组 MAP-2 阳性细胞数多于 B 组,D、E 和 F 组多于 C 组,F 组多于 E 组和 D 组 ($P<0.05$)。C、D、E、F 组 MAP-2 阳性细胞面积大于 B 组,D、E 和 F 组大于 C 组,F 组大

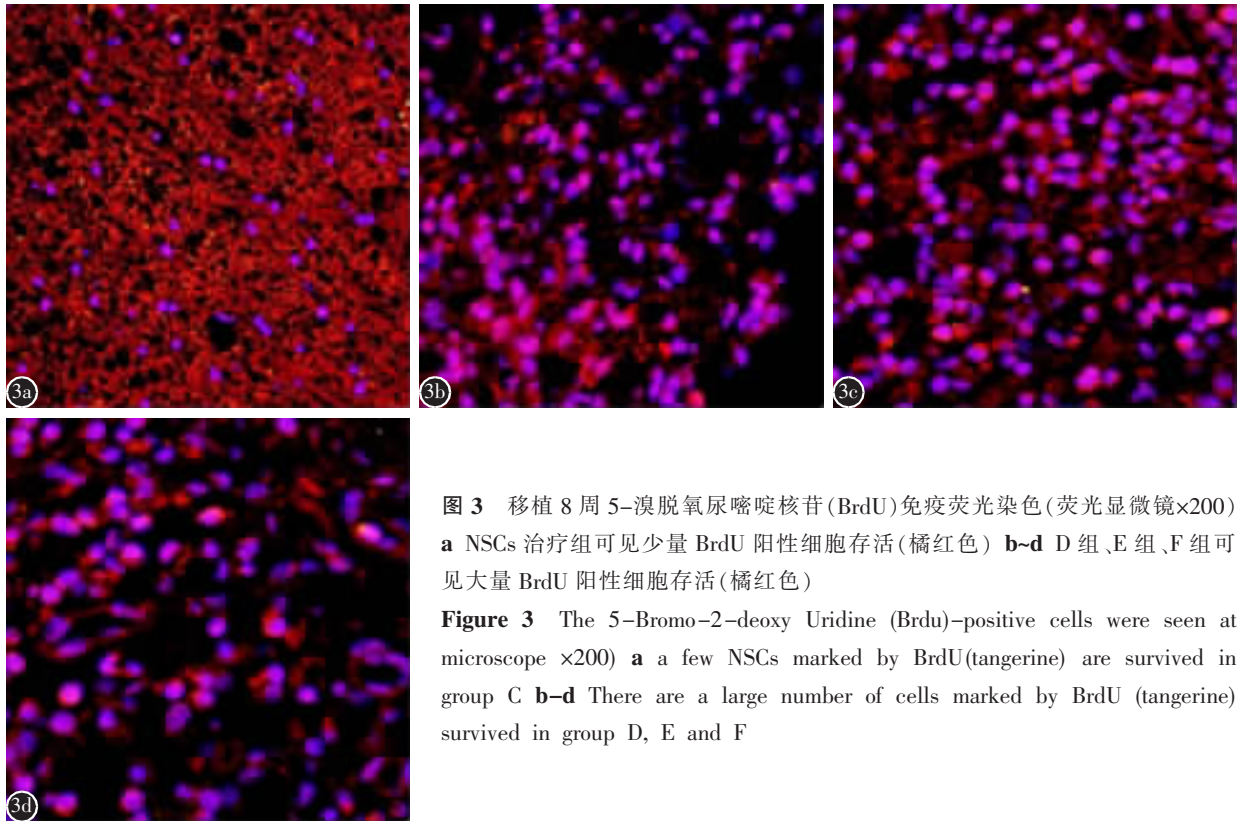


图3 移植8周5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)免疫荧光染色(荧光显微镜×200)
a NSCs 治疗组可见少量 BrdU 阳性细胞存活(橘红色) b~d D 组、E 组、F 组可见大量 BrdU 阳性细胞存活(橘红色)

Figure 3 The 5-Bromo-2-deoxy Uridine (BrdU)-positive cells were seen at microscope ×200) a a few NSCs marked by BrdU(tangerine) are survived in group C b~d There are a large number of cells marked by BrdU (tangerine) survived in group D, E and F

于 D 组和 E 组($P<0.05$), D 组和 E 组差异无统计学意义($P>0.05$, 表 3)。

3 讨论

NSCs 的发现以及随后的 NSCs 移植治疗,为脊髓损伤提供了一种新的治疗方式。移植的 NSCs 不仅可以补充丢失的神经细胞,还可以分泌神经营养因子,促进损伤脊髓的恢复^[16]。Salewski 等^[3]将鼠胚 NSCs 移植到大鼠脊髓损伤处,大鼠的神经功能得到明显改善。然而,脊髓损伤后,损伤脊髓局部缺乏内源性的生长因子, CSPGs 以及磷脂相关抑制因子的增加,致使移植到损伤脊髓处的 NSCs,大部分向星型胶质细胞分化,向对脊髓有修复作用的神经元分化的比例较低^[17],移植的神经细胞迁移及外源神经细胞与宿主细胞之间的整合受到阻碍,移植神经细胞的轴突生长受到抑制。以上这些不利因素,致使单一的干细胞移植治疗对损伤脊髓功能的恢复有限。如何改善损伤脊髓周围的微环境,补充丢失的神经细胞,将脊髓损伤处的 NSCs 诱导分化为神经元、分解瘢痕组织中的 CSPGs、阻止磷脂相关抑制因子对轴突生长的抑制作用,促进轴突的生长、恢复神经的传导通路

表3 移植8周后 MAP-2 阳性细胞数目和表达面积
($\bar{x}\pm s, \mu\text{m}^2$)

Table 3 The number of MAP-2 positive cells and surface area after transplantation

组别 Group	MAP-2 阳性细胞 MAP-2 positive cells	MAP-2 阳性细胞 表达面积 Surface area of MAP-2 positive cells
A组 Group A	8.6±1.4	64.83±5.35
B组 Group B	6.5±1.2	48.03±7.38
C组 Group C	8.94±1.3 ^①	71.33±5.66 ^①
D组 Group D	11.5±1.6 ^{①②}	100.8±5.36 ^{①②}
E组 Group E	11.1±1.5 ^{①②}	103.52±8.03 ^{①②}
F组 Group F	13.8±3.5 ^{①②③}	135.42±10.94 ^{①②③}

注:①与 B 组比较 $P<0.05$;②与 C 组比较 $P<0.05$;③与 D、E 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with group B, $P<0.05$; ②Compared with group C, $P<0.05$; ③Compared with group D and E, $P<0.05$

是目前治疗脊髓损伤急需解决的问题。

目前认 CSPGs 由胶质瘢痕中的受刺激的星形细胞分泌,主要和胶原形成胶质瘢痕,对损伤脊髓周围神经细胞的迁移、移植外源神经细胞与宿

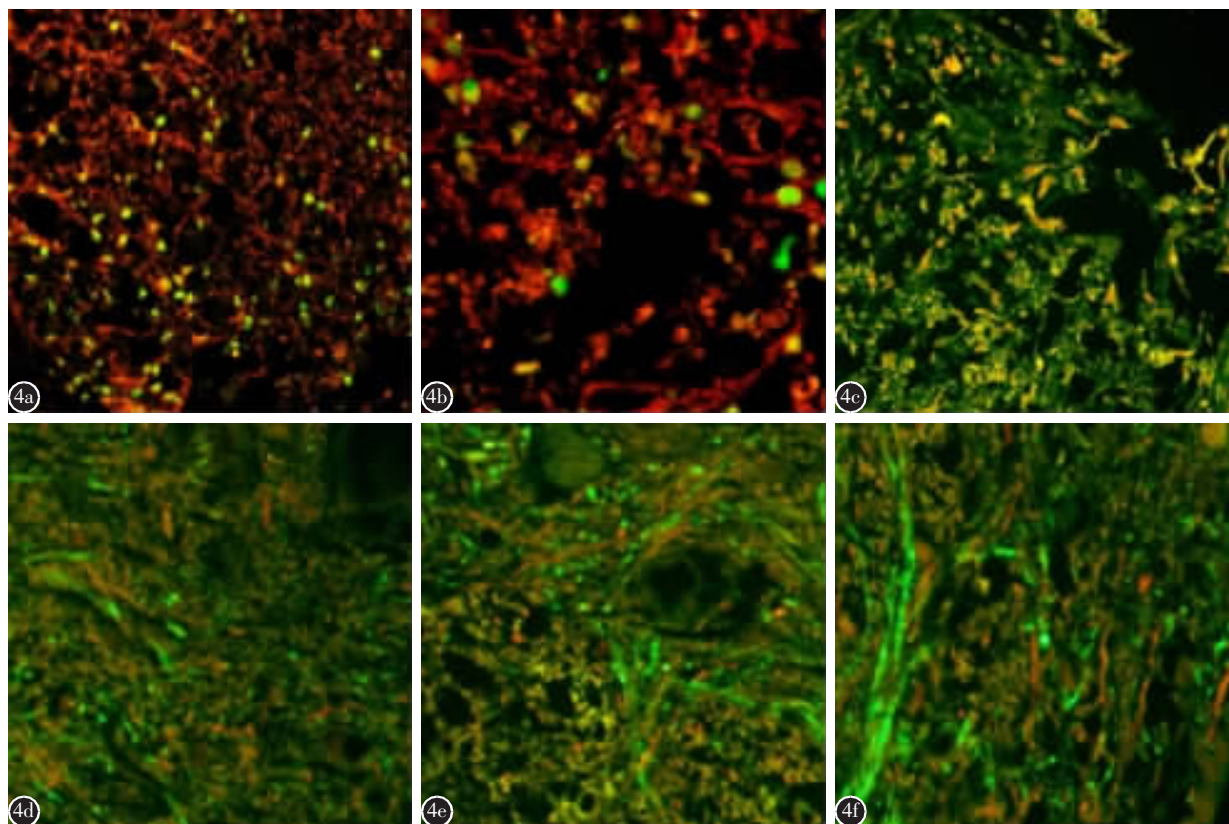


图 4 移植后 8 周各组微管相关蛋白 2(MAP-2)免疫荧光染色观察(荧光显微镜 $\times 200$) a、b A 组及 B 组未检测到 BrdU/MAP-2 阳性双染细胞 c~f C 组、D 组、E 组及 F 组可见大量胞体呈现出草绿色荧光细胞

Figure 4 Immunofluorescence staining of Microtubule-associated protein 2 (MAP-2)-positive cells 8 weeks after transplantation (Fluorescence microscope $\times 200$) a, b The BrdU/MAP-2 positive cells were not detected in group A and B c-f A large number of cells with green fluorescence could be seen in group C, D, E and F

主细胞之间的整合产生的抑制作用, CSPGs 通过与 PTPsigma 受体结合, 抑制轴突生长^[18]。大量的研究证实, 硫酸软骨素酶 ABC (ChABC) 具有催化分解粘多糖类的功能, 可以通过降低损伤脊髓局部 CAPGs, 从而促进损伤轴突的生长和再生以及脊髓损伤后功能障碍的恢复^[19, 20]。中枢神经系统损伤后, 神经的绝缘层鞘磷脂释放出外源性抑制因子, 主要包括可溶性相关糖蛋白 (myelin-associated glycoprotein, MAG)、少突胶质细胞鞘磷脂糖蛋白 (oligodendrocyte myelin glycoprotein, OMG) 和 Nogo 蛋白三种, 这些抑制因子可以与 Nogo-66 的特异性受体复合体结合, 主要包括 (NgR1、Lingo-1、p75NTR^[21, 22]), 激活 RhoA 信号通路, 传递抑制神经生长的信号, 当阻断 RhoA 信号通路后, 可以发现神经组织的再生^[23, 24]。所以, 以 NgR 作为干预靶, 阻止 NgR 与相应的配体结合, 阻断 Nogo-A、MAG 和 OMG 介导的抑制中枢神经

元轴突再生 RhoA 信号的传递, 可有效促进中枢神经系统损伤后神经元轴突的再生^[25]。NEP1-40 是针对 Nogo-66 氨基酸序列设计 NgR 拮抗剂, 可竞争性抑制磷脂相关抑制因子与 NgR 结合, 可促进脊髓损伤后轴突再生、生长和功能的恢复^[26, 27]。Nakamae 等^[28]的研究发现, 结合使用 ChABC 及 NEP1-40 与单独使用 ChABC 或 NEP1-40 一样, 均能促进皮质脊髓轴突的生长, 但未发现三者之间对轴突的生长有协同作用。然而, Zhao 等^[29]的研究显示, 联合应用 ChABC 及 Nogo 抗体对损伤脊髓功能恢复的效果优于单一的移植。目前未发现有关 ATRA、NSCs、ChABC 及 NEP1-40 联合移植对脊髓损伤恢复影响的报道。

我们早期实验研究已证实, ATRA 可促进 NSCs 的增殖, 诱导 NSCs 向神经元分化, 而将经 ATRA 诱导培养的 NSCs 移植到受损的脊髓, 可明显促进损伤脊髓功能的恢复^[12, 13]。本研究中, 我们

进行 NSCs、ChABC 及 NEP1-40 进行联合移植。我们使用 ATRA (浓度 $1.0\mu\text{mol/L}$) 诱导 NSCs 体外培养, 促进 NSCs 增殖, 诱导 NSCs 向神经元细胞分化, 提高移植 NSCs 中神经元的比例。然后, 将经 ATRA 诱导培养的 NSCs 联合 ChABC 及 NEP1-40 进行移植, 观测移植神经细胞的分化、轴突的生长及损伤脊髓功能的恢复情况。结果提示, 联合移植组、NSCs 组、NSCs+ChABC 组和 NSCs+NEP1-40 组对损伤部位神经元轴突再生、生长及损伤脊髓功能的恢复有促进作用, 联合组与 NSCs+ChABC 组和 ATRA+NEP1-40 组比较, 对损伤脊髓功能的恢复促进作用效果更明显, 且 ChABC 及 NEP1-40 联合移植的效应估计值大于两者单独移植效应之和, 表明 ChABC 和 NEP1-40 对损伤脊髓功能的恢复具有协同促进作用。Karimi-Abdolrezaee 等^[30]进行神经干细胞、ChABC 及神经生长因子联合移植, 也发现明显促进损伤脊髓功能恢复, 且具有协同作用。

近年来的研究发现, 神经的生长和轴突的再生与 RA-RAR β 信号通路有关, RA 主要通过 RA 受体 (RAR β) 结合, 通过 RA-RAR β 信号通路, 促进神经生长, 而使用 RAR β 兴奋剂治疗脊髓后柱损伤的大鼠, 可促进轴突的生长和大鼠后肢功能的恢复^[31-33]。研究还发现, 在鞘磷脂抑制的环境之中, RA-RAR β 信号通路可以降低 RhoA 活性和抑制 Lingo-1 基因和蛋白的表达, 而添加 Lingo-1 可以消除 RA-RAR β 诱导的轴突生长^[34]。而脊髓损伤后, RA 治疗可以降低 Lingo-1 基因的表达, 而使用 Lingo-1 抑制剂可以促进轴突生长, 神经功能的恢复, 降低 RhoA 活性, 增加少突胶质细胞和神经元的存活^[34, 35]。此外, Monnier 等^[36]的研究发现, CSPGs 通过 RhoA/ROCK 信号通路抑制神经生长。Walker 等^[37]通过应用 CSPGs 引起轴突内 RhoA 的合成上调, 抑制轴突的生长, 敲除 RhoA 转录因子后, 即使 CSPGs 存在, 也可以促进轴突的生长, 从而证实 CSPGs 通过 RhoA 信号通路介导对轴突生长的抑制作用。因此, 我们认为 ATRA、ChABC 和 NEP1-40 的协同作用可能与 RhoA 信号通路有关, 但它们之间相互作用机制复杂, 仍需要进一步研究。

4 参考文献

1. Yiu G, He Z. Inhibition of CNS axon regeneration[J]. Nat Rev

Neurosci, 2006, 7(8): 617-627.

2. Zhu W, Sun Y, Chen X, et al. Glial scar size, inhibitor concentration, and growth of regenerating axons after spinal cord transection[J]. Neural Regen Res, 2012, 7(20): 1525-1533.
3. Salewski RP, Mitchell RA, Shen C, et al. Transplantation of neural stem cells clonally derived from embryonic stem cells promotes recovery after murine spinal cord injury [J]. Stem Cells Dev, 2015, 24(1): 36-50.
4. Bradury EJ, Moon LD, Popat RJ, et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal injury [J]. Nature, 2002, 416(6881): 636-640.
5. Starkey ML, Bartus K, Barritt AW, et al. Chondroitinase ABC promotes compensatory sprouting of the intact corticospinal tract and recovery of forelimb function following unilateral pyramidotomy in adult mice[J]. Eur J Neurosci, 2012, 36(12): 3665-3678.
6. Mukhopadhyay G, Doherty P, Walsh F, et al. A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration[J]. Neuron, 1994, 13(3): 757-767.
7. Kottis V, Thibault P, Mikol D, et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth[J]. J Neurochem, 2002, 82(6): 1566-1569.
8. Oertle T, van der Haare ME, Bandtlow CE, et al. Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions[J]. J Neurosci, 2003, 23(13): 5393-5406.
9. Domenicini M, Cao ZX, Spencer T, et al. Myelin-associated glycoprotein interacts with Nogo-66 Receptor to inhibit neurite outgrowth[J]. Neuron, 2002, 35(2): 283-290.
10. GrandPré T, Li S, Strittmatter SM. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration[J]. Nature, 2002, 417(6888): 547-551.
11. Manden M. Retinoic acid in the development, regeneration, and maintenance of the nervous system[J]. Nat Rev Neurosci, 2007, 8(10): 755-765.
12. 钟德君, 张德胜, 宋跃明. 全反式维甲酸对鼠胚神经干细胞增殖和分化的作用[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(2): 206-211.
13. 姚帅辉, 钟德君, 康敏, 等. ATRA 干预培养鼠胚神经干细胞联合 GDNF 移植对脊髓损伤再生修复的影响 [J]. 山东医药, 2014, 54(22): 29-31.
14. 钟德君, 张德胜, 宋跃明. 鼠胚神经干细胞体外培养方法的优化 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(50): 10088-10092.
15. 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.
16. Lu P, Jones LL, Snyder EY, et al. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury [J]. Exp Neurol, 2003, 181(2): 115-129.

17. Yang H, Lu P, McKay HM, et al. Endogenous neurogenesis replaces oligodendrocytes and astrocytes after primate spinal cord injury[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(8): 2157–2166.
18. Shen Y, Tenney AP, Busch SA, et al. PTPsigma is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration[J]. *Science*, 2009, 326(5952): 592–596.
19. Wang D, Ichihara RM, Zhao R, et al. Chondroitinase combined with rehabilitation promotes recovery of forelimb function in rats with chronic spinal injury [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(25): 9332–9344.
20. Lee HJ, Bian S, Jakovcevski I, et al. Delayed applications of L1 and Chondroitinase ABC promote recovery after spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2012, 29(10): 1850–1863.
21. Wong ST, Henley JR, Kanning KC, et al. A p75 (NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein[J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5(12): 1302–1308.
22. Mi S, Lee X, Shao Z, et al. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex[J]. *Nat Neurosci*, 2004, 7(3): 221–228.
23. Lehmann M, Fournier A, Selles-Navarro I, et al. Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration[J]. *J Neurosci*, 1999, 19(17): 7537–7547.
24. Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM. Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(4): 1416–1423.
25. Dergham P, Ellezam B, Essagian C, et al. Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(15): 6570–6577.
26. Li S, Strittmatter SM. Delayed systemic Nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(10): 4219–4227.
27. Cao Y, Shumsky JS, Sabol MA, et al. Nogo-66 receptor antagonist peptide (NEP1 –40) administration promotes functional recovery and axonal growth after lateral funiculus injury in the adult rat[J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2008, 22(3): 262–278.
28. Nakamae T, Tanaka N, Nakanishi K, et al. The effects of combining chondroitinase ABC and NEP1 –40 on the corticospinal axon growth in organotypic co-cultures [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 476(1): 14–17.
29. Zhao RR, Andrews MR, Wang D, et al. Combination treatment with anti-Nogo-A and chondroitinase ABC is more effective than single treatments at enhancing functional recovery after spinal cord injury[J]. *Eur J Neurosci*, 2013, 38(6): 2946–2961.
30. Karimi-Abdolrezaee S, Eftekharpour E, Wang J, et al. Synergistic effects of transplanted adult Neural stem/progenitor cells, chondroitinase, and growth factors promote functional repair and plasticity of the chronically injured spinal cord[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(5): 1657–1676.
31. Wong LF, Yip PK, Battaglia A, et al. Retinoic acid receptor beta2 promotes functional regeneration of sensory axons in the spinal cord[J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9(2): 243–250.
32. Yip PK, Wong LF, Pattinson D, et al. Lentiviral vector expressing retinoic acid receptor beta2 promotes recovery of function after corticospinal tract injury in the adult rat spinal cord[J]. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(21): 3107–3118.
33. Agudo M, Yip P, Bradbury E, et al. A retinoic acid receptor beta agonist (CD2019) overcomes inhibition of axonal outgrowth via phosphoinositide 3-kinase signalling in the injured adult spinal cord[J]. *Neurobiol*, 2010, 37(1): 147–155.
34. Puttagunta R, Schmandke A, Floriddia E, et al. RA-RAR-beta counteracts myelin-dependent inhibition of neurite outgrowth via Lingo-1 repression[J]. *J Cell Biol*, 2011, 193(7): 1147–1156.
35. Ji B, Li M, Wu W, et al. LINGO-1 antagonist promotes functional recovery and axonal sprouting after spinal cord injury[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2006, 33(3): 311–320.
36. Monnier PP, Sierra A, Schwab JM, et al. The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 22(3): 319–330.
37. Walker BA, Ji SJ, Jaffrey SR. Intra-axonal translation of RhoA promotes axon growth inhibition by CSPG[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(41): 14442–14447.

(收稿日期:2015-11-18 末次修回日期:2016-05-16)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)