

· 论 著 ·

嗅鞘细胞移植对脊髓前角神经元保护作用的实验研究*

董玉珍¹, 梁秋冬^{1△}, 段永壮², 施新革¹

(1. 新乡医学院第一附属医院骨科, 河南卫辉 453100; 2. 郑州大学第一临床学院骨科, 河南郑州 450000)

摘要:目的 观察嗅鞘细胞(OECs)脊髓内移植对坐骨神经损伤后脊髓前角运动神经元的作用。方法 将培养、纯化 OECs 采用倒置相差显微镜、细胞免疫组织化学染色观察并计算纯度。48 只大鼠坐骨神经夹伤后随机分为 OECs 实验组与生理盐水组。通过尼氏染色计数并计算运动神经元的存活百分率, 观察神经元的超微结构。结果 神经生长因子受体 p75 抗体(NGFRp75)细胞免疫组化染色观察 OECs 胞体清晰, 纯度大于 90%。尼氏染色 OECs 组相应节段运动神经元再生数目和存活百分率明显增加, 细胞器及大部分神经纤维的髓鞘结构清晰。对照组脊髓神经元细胞器变性, 髓鞘严重变形。结论 OECs 移植对大鼠坐骨神经损伤后的脊髓前角运动神经元具有促进存活和再生双重保护作用。

关键词: 细胞移植; 神经损伤; 前角神经元; 嗅鞘细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.21.006

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)21-2096-03

The study of protective effect of olfactory ensheathing cells on motoneurons in ventral horn of the spinal cord*Dong Yuzhen¹, Liang Qiudong^{1△}, Duan Yongzhuang², Shi Xin'ge¹

(1. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui, Henan 453100, China;

2. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Zhenzhou University, Zhenzhou, Henan 450000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of OECs transplant on the regeneration of motoneurons in ventral horn after sciatic nerve crush injury. **Methods** The primary OECs isolated and cultured were observed by inverted phase contrast microscope and immunocytochemistry. 48 rats of Sciatic nerve crush injury were randomly divided into OECs and NS groups. Nissl staining was carried out to label the survival and regeneration motoneurons respectively. The numbers of the motoneurons were counted. Neuron ultrastructure was observed by transmission electron microscopy. **Results** The immunocytochemistry of OECs by NGFRp75 showed that membrane was stained. The degree of purity was more than 90%. By light microscope observing after nissl staining, the numbers of both surviving and regenerating motoneurons were significantly higher in the experimental group than that of the control group. The ultrastructure of the spinal cord neurons in NS group were changed for cytoplasm vacuolation, mitochondrias and myelin sheath degeneration. **Conclusion** Transplant of OECs treatment can promote the survival and regeneration ability of motoneurons after sciatic nerve crush injury.

Key words: cell transplantation; nerve injury; motoneurons; olfactory ensheathing cells

周围神经一旦损伤, 逆向运输的雪旺细胞(schwann cells, SC)和神经营养因子缺乏是造成运动神经元死亡的主要原因。因此, 能使脊髓前角神经元自主表达 SC 和神经营养因子, 将会成为治疗周围神经及运动神经元损伤的有效方法。嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OECs)是一种处于中枢与外周神经系统过渡区的胶质细胞, 具有 SC 和星形胶质细胞的双重特性, 其功能极为活跃, 可包裹再生轴突生长和再髓鞘化, 还表达一些神经营养因子和胞黏附分子, 促进神经生长, 诱导神经长入正确的位置^[1]。本实验通过 OECs 移植到坐骨神经损伤后的脊髓内, 研究其对坐骨神经损伤后脊髓前角运动神经元的保护作用。

1 材料与方

1.1 实验动物、试剂和仪器 健康成年雄性 SD 大鼠 50 只, 体质量 200~220 g。均由新乡医学院实验动物中心提供。胰蛋白酶、胶原蛋白酶、透明质酸酶、S-100、ABC 试剂盒、甲苯胺蓝染色试剂盒均购自武汉博士德生物工程公司, 兔抗大鼠低亲和神经生长因子受体 p75 抗体(nerve growth factor receptor p75, NGFRp75)细胞免疫组织化学染色由北京塞百盛生物工程公司合成提纯。DMSL1000 光镜(Leica 公司, 德国), 倒

置相差显微镜(Philips, 美国)、Tiger 图像分析系统、光学显微镜(Nikon, 日本)、透射电子显微镜(Philips, 美国)。

1.2 OECs 的培养、纯化、鉴定 (因为不同来源及年龄嗅鞘及嗅鞘细胞的作用经实验证实无明显区别, 故本实验与多数国内外实验一样取成年大鼠) 取成年的 SD 大鼠 2 只, 2% 戊巴比妥腹腔内注射麻醉(30 mg/kg), 在无菌条件、16 倍显微镜下取出双侧嗅球, 置入含双抗的无血清 DMEM/F12 培养、清洗, 去膜、剪碎, 加 0.25% 的胰蛋白酶培养。采用相差贴壁法培养、纯化, 细胞融合后倒置相差显微镜观察, 常规 NGFRp75 细胞免疫组织化学染色鉴定, 随机选取 10 个视野计数 OECs 阳性染色, 并计算纯度。达 70% 左右, 细胞数量达 3×10^6 个/培养瓶, 取上清, -20°C 保存备用。

1.3 实验动物模型及分组 实验动物为体质量 200~220 g 的雄性 SD 大鼠 48 只, 随机均分为 OECs 实验组和生理盐水组。用 2% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠, 常规消毒、铺巾 16 倍显微镜下显露右侧坐骨神经, 于犁状肌下孔 0.5 cm 处镊夹 2 min 造成坐骨神经损伤。实验组及生理盐水组用微量注射器分别将 $2 \mu\text{L}$ 滴度为 3×10^6 个/培养瓶 OECs 或生理盐水注射于 L_{4-5} 及 L_{5-6} 之间的脊髓腹角前外侧沟外侧(因

脊髓灰质前角运动神经元组成前根自前外侧沟发出,大鼠脊髓约为人的 1%,相当于 1/4 线外侧)2 点,注射深度为 1.5 mm 缓慢注入后留针 2 min,缓慢退出。手术结束后动物常规饲养。因本课题主要观察坐骨神经损伤后 OECs 通过促使脊髓前角神经元自主分泌表达 SC 和神经营养因子的作用,从而使脊髓前角运动神经元避免逆行性缺乏 SC 和神经营养因子而变性坏死,未对剂量滴度做定量观察,采用的是国内外常用的有效剂量滴度;OECs 细胞移植后利用其扩增、传代特征可以繁殖迁移,并且结合以前实验结果不需要再行第 2 次注射。

1.4 OECs 形态学与免疫学观察测纯度 在 OECs 培养后 1、3、6、9 d 不同时间用倒置相差显微镜观察,常规 NGFRp75 细胞免疫组织化学染色鉴定,随机选取 10 个视野计数 OECs 阳性染色,计算纯度。

1.5 组织处理及染色 分别于术后 1、4、8 周各取 8 只实验组和对照组大鼠,2%戊巴比妥钠腹腔麻醉下开胸,左心室升主动脉插管,灌注温生理盐水 100 mL 冲净血液。用预冷的 4%多聚甲醛 500 mL 灌注、固定。取 L₄₋₆ 节段脊髓,置于 4℃、25%蔗糖磷酸盐缓冲液(PBS)溶液中过夜。待组织沉底后行冰冻切片,片厚 20 μm,每 5 张留取 2 张,采用 1%甲苯胺蓝进行神经元尼氏染色后光镜观察。使用 LEICAM550 采集图像。每套片子均于 L₄₋₆ 各随机抽取 3 张,分别计数双侧脊髓前角运动神经元数目,计数标准为能辨认出细胞核的神经元轮廓者。结果以损伤侧与健侧二者的神经元数目相对比表示。并计算平均值。在 8 000 倍透射电子显微镜下进一步观察脊髓前角运动神经元的超微结构。

1.6 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件包进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 OECs 形态学观察与免疫学观察及纯度 倒置相差显微镜观察,OECs 在差时贴壁纯化 24 h 后生长,胞体呈圆形或椭圆形,未见或少见突起生长;培养 6~9 d 后,细胞大多呈双极形或梭形,少量呈多极形或椭圆形,细胞突起细长,彼此交织成网格状,亦可见少量成纤维细胞生长(彩插 III 图 1)。NGFRp75 细胞免疫组织化学染色观察示 OECs 细胞膜棕色深染,胞体清晰,呈梭性或三角形(彩插 III 图 2);成纤维细胞仅细胞核深染,胞膜不着色。计算所得纯度大于 90%。

2.2 尼氏染色计数结果 坐骨神经夹伤后 1、2 周光镜观察两组脊髓前角运动神经元数目差别不明显;4 周后 OECs 实验组可观察到脊髓前角运动神经元数目较对照组有所增生,但不太明显;8 周后尼氏染色光镜观察,伤侧生理盐水组与正常健侧相比,脊髓前角运动神经元数目下降明显,一部分神经元染色变淡,轮廓不清,伤侧存活神经元只占健侧的(58.4±5.4)%。OECs 实验组伤侧脊髓前角运动神经元数目下降较生理盐水组明显增加,神经元染色较深,轮廓较清晰,运动神经元存活比例提高至(87.2±4.6)%。两组运动神经元存活率比较差异有统计学意义($P < 0.01$) (彩插 III 图 3A、B)。(尼氏染色计数是观察神经元数目的特征性实验方法,只有神经元染色显示,根据运动神经元计数和光镜、电镜结果判断运动神经元的活力及成熟程度和再生能力。)

8 周后 OECs 组电子显微镜下脊髓神经元核较规则,核膜较清晰,胞质中的线粒体、粗面内质网及高尔基复合体等细胞器数量较多、较清晰,神经纤维及髓鞘规则(彩插 III 图 3C)。生理盐水组脊髓多数神经元出现多种异常改变,主要表现为细胞核变形、胞质内出现空泡,内质网、高尔基体肿胀,线粒体数

量减少,尤其明显的是髓鞘严重变形,部分髓鞘松散呈网状,常伴有呈块状的高电子密度沉积物(彩插 III 图 3D)。

3 讨 论

外周神经损伤后肢体运动功能的恢复往往较差,其原因除了神经元再生能力差、肌肉萎缩之外,与损伤后相应节段脊髓前角运动神经元的继发性死亡密切相关。Rogerio 等^[2] 实验显示大鼠坐骨神经损伤后,L₄₋₆ 脊髓前角运动神经元内 SC 和 NT-3 表达明显降低。

OECs 是起源于嗅基底膜中的一种特殊独立神经胶质细胞,它不仅能伴随嗅束进入中枢神经系统,迁徙到周围神经和中枢神经;并且有星形胶质细胞和 SC 的双重特性;还能分泌大量不同种类的神经营养和支持因子。OECs 可以包绕脱髓鞘的轴突重新形成髓鞘,它在形态学、亚显微结构、生化等方面都和神经膜细胞类似,但不像 SC 那样包裹单条神经轴突,而是由 OECs 系膜紧密包裹成束的无髓神经纤维,可能就是这种特殊的成鞘作用使损伤神经纤维与周围胶质环境绝缘,使这些胶质细胞在损伤时产生的轴突再生抑制因素不能作用于损伤神经纤维,从而为轴突生长提供了适宜的微环境。因此,OECs 可以同时起到 SC 和多种神经营养和支持因子的作用,它对周围及中枢神经系统损伤后的再生起重要作用^[3-5]。Raisman 等^[6] 实验证实 OECs 在其细胞膜上表达出许多与细胞黏附和轴突生长相关的分子,而且分泌大量不同种类的神经营养和支持因子。国外学者实验研究报道,脊髓损伤后 OECs 可以再生穿过背根与脊髓的移行区从而进入脊髓,并且与神经元细胞建立进一步功能联系,在其膜上表达很多与细胞结合和轴突生长相关的分子,OECs、神经生长因子和支持因子的作用可能产生相互叠加,创造了神经元再生的微环境,在成年期促进 SC 不断更新和轴突再生^[7-8]。

OECs 细胞移植不但可通过促进残存神经元轴突再生,而且能发挥细胞替代作用从而重建周围神经损伤时受损的神经通路,受到人们越来越多的重视。它不但能够支持中枢神经系统的轴突再生和延伸,修复髓鞘的神经元;并且可以在神经组织内自由迁移并与星形胶质细胞共存等作用^[9-10]。Fairless 等^[11] 通过实验发现嗅鞘细胞能促进雪旺细胞在星形胶质细胞环境下迁移,并且这种作用是通过分泌神经生长因子实现的。Feng 等^[12] 证实,嗅鞘细胞条件培养液能通过调节内源性的凋亡信号通路抑制 6-羟多巴胺诱导的 PC12 细胞的凋亡。此外,嗅鞘细胞能通过分泌可溶性的分子激活 Notch 信号通路,从而刺激神经前体细胞增殖并抑制其分化。这些数据表明,嗅鞘细胞分泌的可溶性蛋白可能参与了嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤的修复过程^[13]。

大量文献表明,由于外周神经损伤发生后直接损伤的神经元发生急性坏死,相应节段脊髓运动神经元由于神经轴突受到损伤因素的作用,可发生 Waller 变性和逆行性退变,并且得不到靶器官来源的神经营养因子等共同所致。损伤后的轴突再生是一个动态的过程,最早的轴突再生发生在损伤后的 6 h^[14-15]。所以,本实验周围神经损伤后立即给予 OECs 细胞移植,尽早给脊髓中枢神经元和轴突再生提供条件。实验显示,4 周后 OECs 细胞移植组既可观察到脊髓前角运动神经元数目有所增加,随着时间增长(8 周)观察到运动神经元存活比例明显提高至(87.2±4.6)%,而对对照组则伤侧存活神经元只占健侧的(58.4±5.4)%,两组运动神经元存活率比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。8 周 OECs 组电子显微镜下脊髓神经元的超微结构清晰、规则,较接近正常;而 NS 组多数神经元出现多种异常改变,细胞数量减少,髓鞘严重变形,常伴有呈块状

的高电子密度沉积物。经实验结果观察,本实验采用微量注射器未对大鼠脊髓造成任何损伤。

通过 OECs 移植不但可以促进神经元和轴突再生,并且可以通过分泌补充神经营养因子来挽救濒死的神经元成为研究者的共识。本研究显示,脊髓内 OECs 移植后 4、8 周结果,能够显著促进尼氏染色中脊髓运动神经元的存活百分比,并且可以显著提高再生运动神经元的数目,修复神经元的超微结构。并且随时间增长作用逐渐增强。因此,本研究通过脊髓内 OECs 细胞直接移植观察到其对脊髓运动神经元存活和再生的双重促进作用,希望能为临床治疗中枢和周围神经损伤提供新的思路。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Rogerio F, Teixeira SA, Junior HJ, et al. mRNA and protein expression and activities of nitric oxide synthases in the lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection and melatonin administration [J]. *Neurosci Lett*, 2006, 407(2): 182-187.
- [3] 李绍波, 路会侠, 周雪. 嗅鞘细胞与脊髓损伤再生修复 [J]. *重庆医学*, 2008, 37(19): 2244-2247.
- [4] Cao L, Zhu YL, Su Z, et al. Olfactory ensheathing cells promote migration of Schwann cells by secreted nerve growth factor [J]. *Glia*, 2007, 55(9): 897-904.
- [5] Curtis MA, Kam M, Nannmark U. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension [J]. *Science*, 2007, 315(11): 1243-1249.
- [6] Raisman G. Repair of spinal cord injury by transplantation of olfactory ensheathing cells [J]. *C R Biol*, 2007, 330(6-7): 557-560.
- [7] Martin LJ, Liu Z. Adult olfactory bulb neural precursor cell grafts provide temporary protection from motor neuron de-

generation, improve motor function, and extend survival in amyotrophic lateral sclerosis mice [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2007, 66(11): 1002-1018.

- [8] Kawaja MD, Boyd JG, Smithson LJ, et al. Technical strategies to isolate olfactory ensheathing cells for intraspinal implantation [J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(2): 155-177.
- [9] Yang LY, Huang TH, Ma L. Bone marrow stromal cells express neural phenotypes in vitro and migrate in brain after transplantation in vivo [J]. *Biomed Environ Sci*, 2006, 19(5): 329-335.
- [10] Radtke C, Wewetzer K. Translating basic research into clinical practice or what else do we have to learn about olfactory ensheathing cells? [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 456(3): 133-136.
- [11] Fairless R, Frame MC, Barnett SC. N-cadherin differentially determines Schwann cell and olfactory ensheathing cell adhesion and migration responses upon contact with astrocytes [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 28(2): 253-263.
- [12] Feng L, Meng H, Wu F, et al. Olfactory ensheathing cells conditioned medium prevented apoptosis induced by 6-OHDA in PC12 cells through modulation of intrinsic apoptotic pathways [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2008, 26(3-4): 323-329.
- [13] Zhang J, Wang B, Xiao Z, et al. Olfactory ensheathing cells promote proliferation and inhibit neuronal differentiation of neural progenitor cells through activation of Notch signaling [J]. *Neuroscience*, 2008, 153(4): 406-413.
- [14] Bunge MB. Novel combination strategies to repair the injured mammalian spinal cord [J]. *J Spinal Cord Med*, 2008, 31(3): 262-269.
- [15] Shen YX, Zhang P, Zhao JG. A potential therapeutic approach for human spinal cord injuries; subarachnoid puncture for OECs transplantation [J]. *Med Hypotheses*, 2009, 73(5): 863-864.

(收稿日期: 2010-12-29 修回日期: 2011-02-15)

(上接第 2095 页)

霉烯类耐药鲍曼不动杆菌金属酶阳性率较高, 达到了 45.1% (23/51)。当然, 可以看出利用虽然 EDTA 增强、协同实验检测金属酶都出现假阳性, 但是用该方法筛选金属酶还是具有一定的临床意义。

总之, 碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌逐年增多, 给医务工作者再次敲响了警钟, 临床医生一定要注意合理用药, 而实验室工作人员应加强耐药菌的监测以及对产酶菌株进行筛选, 及时发现产酶菌株, 以便早期预防, 同时配合医院控感部门, 做好感染控制工作, 防止产酶菌的暴发流行。

参考文献:

- [1] Shiri NV, Ronen BA, Yehuda C. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the

health care setting [J]. *Curr Opin in Infect Dis*, 2005, 18(4): 306-311.

- [2] Rello J. *Acinetobacter baumannii* infection in the ICU; customization is the key [J]. *Chest*, 1999, 115: 1226-1229.
- [3] 张晓兵, 龚雅利, 余军校, 等. 鲍氏不动杆菌 16S rRNA 甲基化酶、氨基糖苷类修饰酶基因研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(11): 1513-1515.
- [4] Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *acinetobacter baumannii*; mechanisms and epidemiology [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2006, 12(9): 826-836.
- [5] Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases; a problem in waiting [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2000, 3(5): 489-495.

(收稿日期: 2010-11-02 修回日期: 2011-02-03)