

• 基础研究 •

神经干细胞移植促进脊髓损伤后脑源性神经营养因子的表达

王岩峰¹, 吕刚², 赵宇¹, 金哲¹, 黄涛¹, 于德水¹, 董宝铁¹
(1.中国医科大学附属第一医院骨科, 辽宁 沈阳 110001; 2.辽宁医学院)

【摘要】 目的:探讨神经干细胞(NSCs)移植对大鼠脊髓损伤后脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响及其意义。方法: NSCs提取自新生 Wistar 大鼠的海马区,经培养、鉴定。制作大鼠脊髓损伤(SCI)模型,于伤后第 7 天移植 NSCs。实验分为 3 组: NSCs 移植组(A 组), DMEM 填充组(B 组), 正常对照组(C 组)。应用 RT-PCR 法和免疫组化法观察细胞移植后 BDNF 基因表达的变化。结果: RT-PCR 结果分析,移植术后第 1、3、5 天, A 组 BDNF mRNA 的表达量明显高于 B 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。组化结果分析,移植术后第 7、14、28 天 BDNF 的表达量 A 组明显高于 B 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: NSCs 在移植后可上调脑源性神经营养因子 BDNF 基因的表达,是其修复脊髓损伤的机制之一。

【关键词】 脊髓损伤; 神经干细胞; 脑源性神经营养因子

Neural stem cells transplantation promote the expressions of brain derived neurotrophic factor after the spinal cord injury of rats WANG Yan-feng*, LÜ Gang, ZHAO Yu, JIN Zhe, HUANG Tao, YU De-shui, DONG Bao-tie. *Department of Orthopaedics, the first Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China

ABSTRACT Objective: To observe the effects of neural stem cells (NSCs) transplantation on the brain derived neurotrophic factor(BDNF) after the spinal cord injury(SCI) of rats, and to investigate the mechanism of repairing the SCI by NSCs transplantation. **Methods:** Neural stem cells were cultured from the hippocampus of rats' embryo and identified by immunocytochemistry. Seven days after the operation of SCI, the NSCs were transplanted into the injured site. Sixty adult Wistar rats were randomly divided into three groups: SCI cured with NSCs transplantation (group A), SCI received DMEM solution (group B), control group(group C). Then the expression of BDNF of the lesion and neighbor areas were examined by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) and immunohistochemistry, so as to investigated the mechanism of repairing the SCI after NSCs transplantation. **Results:** According the RT-PCR results analysis, the expression of BDNF mRNA of group A enhanced higher than that of group B on the 1st, 3rd, 5th day after transplantation of NSCs. According the immunohistochemistry results analysis, the expression of BDNF mRNA of group A enhanced higher than that of group B on the 7 th, 14 th, 28 th day similarly. **Conclusion:** The transplantation of NSCs can change the tiny-entirnement by upregulating the expression of BDNF. It maybe one of the mechanism of repairing the SCI by NSCs transplantation.

Key words Spinal cord injuries; Neural stem cells; Brain-derived neurotrophic factor

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(11): 836-838 www.zggszz.com

基金项目: 1.教育部高校博士点专项科研基金(编号:20060159019);
2.辽宁省自然科学基金项目(编号:20052096)

通讯作者:王岩峰 Tel:024-83283360 E-mail:wyl_doctor@163.com

tient controlled analgesia with morphine, continuous epidural analgesia, and continuous femoral nerve sheath block on rehabilitation after unilateral total hip arthroplasty. Reg Anesth Pain Med, 2005, 30(5):452-457.

[7] Biboulet P, Morau D, Aubas P, et al. Postoperative analgesia after total-hip arthroplasty: Comparison of intravenous patient-controlled analgesia with morphine and single injection of femoral nerve or psoas compartment block. a prospective, randomized, double-blind

study. Reg Anesth Pain Med, 2004, 29(2): 102-109.

[8] Singelyn FJ, Vanderelst PE, Gouverneur JM. Extended femoral nerve sheath block after total hip arthroplasty: continuous versus patient-controlled techniques. Anesth Analg, 2001, 92: 455-459.

[9] Auroy Y, Benhamou D, Bargues L, et al. Major complications of regional anesthesia in France: The SOS Regional Anesthesia Hotline Service. Anesthesiology, 2002, 97(5): 1274-1280.

(收稿日期: 2008-07-28 本文编辑: 王玉蔓)

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 后如何促进损伤脊髓的再生与修复是该领域的重要研究方向^[1]。神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 移植可补充坏死、凋亡的神经细胞, 桥接脊髓断端, 促进传导通路的重建从而恢复神经传导通路, 但具体机制缺乏深入的研究和定量的评价^[2]。本研究通过对神经干细胞的培养, 并在移植后通过 RT-PCR 和免疫组化方法检测脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 的表达, 为 NSCs 移植治疗脊髓损伤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂 Wistar 雄性大鼠 60 只, 新生 24 h 内 Wistar 大鼠 6 只 (中国医科大学实验动物中心)。DMEM/F12 (1:1) 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清 (美国 Gibco 公司)、B27; 抗巢蛋白 (Nestin) 抗体、BDNF 抗体, SABC 试剂盒、DAB 显色剂 (美国 Sigma 公司); mRNA 提取试剂盒 (Trizol 试剂盒)、PCR 反应试剂盒 (大连宝生生物公司)。

1.2 NSCs 培养与 SCI 动物模型的建立及分组 调整 NSCs 终浓度为 $1 \times 10^5 / \mu\text{l}$ 备用。参照既往研究^[3], 将 60 只 Wistar 大鼠, 雄性, 体重 (200±30) g, 随机分为 3 组, 建立大鼠脊髓损伤动物模型。在脊髓损伤后第 7 天, NSCs 移植组 (A 组, 24 只) 以微量注射器缓慢注入复苏后的 NSCs 细胞悬液 5 μl (约为 $5 \times 10^4 / \mu\text{l}$) 到脊髓损伤断端; DMEM 填充组 (B 组, 24 只) 注入等量 DMEM 培养液到脊髓损伤断端, 逐层缝合, 术后每日膀胱挤尿; 空白对照组 (C 组, 12 只) 未制作脊髓损伤。术后因麻醉过量死亡 6 只, 感染死亡 6 只, 均予补足。

1.3 观测项目与方法 主要观察指标: ①脊髓组织内 BDNF mRNA 的表达情况; ②脊髓组织内 BDNF 免疫阳性产物的表达变化。分别于移植术后 1、3、5 d 取材, 应用逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 法半定量检测脊髓内 BDNF mRNA 的表达。分别于移植术后 7、14、28 d 取材, 应用免疫组化法半定量分析 BDNF 在脊髓内的表达。

1.3.1 RT-PCR 法检测 BDNF mRNA 的表达 分别于移植术后 1、3 和 5 d 麻醉处死大鼠, A 组与 B 组取出损伤节段的脊髓 (4 只/时点), C 组于同一节段取出相应脊髓 (2 只/时点)。首先抽提总 mRNA, 以 RT 法先合成 cDNA, 再进行 PCR 扩增。BDNF 引物序列: F5'-TTTTATTCAAGCCACATCA-3', R5'-AGCCCAAACCCAAGTCAG-3', 预扩增产物长为 203 bp。以 β -actin 作内对照, 引物序列为 F5'-GATTGCCTCAGGACATTTCTG-3', R5'-GATTGCTCAGGACATTCTG-3', 扩增产物长为 690 bp。RT-PCR 产物经电泳后用图像分析仪扫描, 经凝胶图像分析系统, 对电泳条带进行光密度分析。

1.3.2 免疫组化法检测 BDNF 的形态学表达 分别于移植术后 7、14、28 d 麻醉下, 以 PBS 缓冲液及 4% 多聚甲醛行心脏灌注固定, 完整取出以 T₁₀ 为中心的脊髓节段, A、B 组 (4 只/时点), C 组 (2 只/时点), 经 HE 染色及常规 SABC 法检测 BDNF 的表达, 以 PBS 替代一抗作为阴性对照, 片厚 40 μm , DAB 显色, 光镜下 BDNF 的阳性反应物为突出背景的棕黄色颗粒。

1.4 指标检测 ①用 Fluor Chen 2.0 软件半定量分析测定扩增条带光密度值 (IDV) 来评估其表达, BDNF 和 β -actin 的整合光密度比值作为 BDNF mRNA 表达的标准值。②光镜下观

察, 细胞浆内的棕黄色颗粒者为阳性。每张切片自表达阳性区随机选取 6 个视野, 用图像分析软件进行各组切片 BDNF 阳性反应物的光密度值测定, 测量值与相应阴性对照切片测量值相减后的平均值作为各区域最终平均光密度值。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 13.0 处理试验数据, 所得数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析 (ANOVA) 及 t 检验进行组间的两两比较, 重复测量资料的方差分析比较不同时间点不同组间的指标变化趋势。

2 结果

2.1 BDNF mRNA 的表达变化 各组 BDNF mRNA 表达结果见表 1。BDNF mRNA 在正常成年大鼠脊髓 (C 组) 内表达较弱。NSCs 移植术后第 1 天, A 组与 B 组均检测到 BDNF mRNA 的表达, A 组平均 IDV 比值为 0.719, B 组为 0.513, A 组表达量较 B 组平均增加了 20.6% ($P < 0.05$)。移植术后第 3 天, A 组与 B 组 BDNF mRNA 表达量均有升高, A 组表达量较 B 组平均增加 24.8% ($P < 0.05$)。移植术后第 7 天, B 组表达量略有下降, 而 A 组仍有上升趋势 (见图 1)。

表 1 移植术后不同时间点 BDNF mRNA 的整合光密度值 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Integration optical density value of BDNF mRNA at different times after grafting in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	BDNF mRNA 的整合光密度值		
	1 d	3 d	5 d
A 组	0.719±0.051 ^d	1.028±0.035 ^e	0.927±0.031 ^f
B 组	0.513±0.044 ^a	0.889±0.091 ^b	0.665±0.101 ^c
C 组	0.178±0.036	0.177±0.023	0.181±0.065

注: 与 C 组比较, ^a $P=0.023$, ^b $P=0.008$, ^c $P=0.009$; 与 B 组比较, ^d $P=0.035$, ^e $P=0.041$, ^f $P=0.009$

Note: Compared with group C, ^a $P=0.023$, ^b $P=0.008$, ^c $P=0.009$; Compared with group B, ^d $P=0.035$, ^e $P=0.041$, ^f $P=0.009$

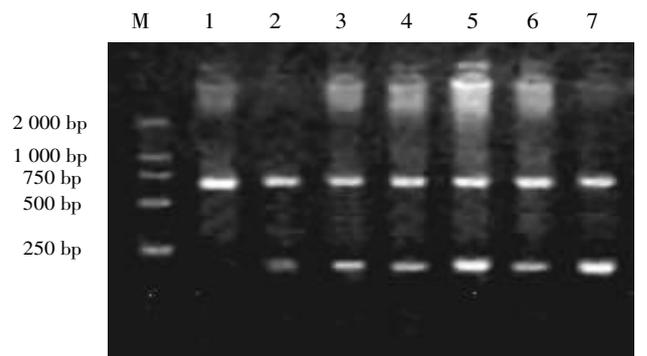


图 1 BDNF mRNA 表达的动态变化 M: Marker; 1: C 组; 2, 4 和 6 分别为 B 组 DMEM 移植后第 1, 3 和 5 天的表达量。3, 5 和 7 分别为 A 组 NSCs 移植后第 1, 3 和 5 天的表达量

Fig.1 Dynamic change of the expressions of BDNF mRNA M: Marker; line 1: group C; line 2, 4, 6: group B at 1, 3 and 5 days after DMEM transplantation respectively; line 3, 5, 7: group A at 1, 3 and 5 days after NSCs transplantation respectively

2.2 BDNF 免疫组化反应 各组 BDNF 免疫组化表达结果见表 2。BDNF 在正常成年大鼠脊髓 (C 组) 内表达略低, 定位

于神经元和胶质细胞的胞浆。NSCs 移植术后第 7 天, A 组平均 IDV 值 0.282, B 组平均 IDV 值 0.179。移植术后第 14 天, A 组平均 IDV 值为 0.293, B 组平均 IDV 值为 0.178, C 组平均 IDV 值为 0.176, A 组与 B 组数值经 *t* 检验, ^a*P*=0.008, 差别有统计学意义。移植术后第 28 天, B 组表达略增强, A 组表达量仍高于 B 组, ^b*P*=0.009, 组间差别有统计学意义。

表 2 移植术后不同时间点 BDNF 的平均光密度值 ($\bar{x}\pm s$)
Tab.2 Average optical value of BDNF at different times after grafted in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	BDNF 的平均光密度值		
	7 d	14 d	28 d
A 组	0.282±0.010	0.293±0.008 ^a	0.301±0.009 ^b
B 组	0.179±0.006	0.178±0.004	0.184±0.009
C 组	0.180±0.007	0.176±0.009	0.177±0.004

注: 与 B 组比较, ^a*P*=0.008, ^b*P*=0.009

Note: Compared group B, ^a*P*=0.008, ^b*P*=0.009

3 讨论

NSCs 是指存在于中枢神经系统内, 具有自我更新和分化为神经元、星型胶质细胞、少突胶质细胞能力的原始干细胞。由于 NSCs 分化不成熟, 不表达表面抗原, 同时脊髓被认为是免疫赦免区, 故移植后不会引起宿主强烈的免疫排斥反应^[4]。NSCs 移植治疗脊髓损伤的机制可能为: ①NSCs 分化为神经元和胶质细胞桥接损伤区域, 替代缺失的神经元和胶质细胞, 重新建立传导通路; ②分泌多种神经营养因子, 改善脊髓局部微环境并启动再生相关基因的顺序表达, 使轴突得以再生; ③移植后分化为少突胶质细胞, 使损伤的轴索再髓鞘化, 恢复神经的正常传导^[5-7]。Nakamura 等^[8]于 SCI 后第 9 天移植 NSCs, 结果显示 NSCs 分化为神经元与少突胶质细胞, 并指出延迟移植 NSCs 更适合于干细胞的存活与分化。Widenfalk 等^[9]研究发现正常大鼠 SCI 后 30 min 即可见 BDNF mRNA 的上调, 3 h 后达到高峰, 主要表达于神经元和小胶质细胞, 但持续时间较短。SCI 后微环境缺乏神经生长因子的支持是导致轴突再生受限的重要原因之一。通过 NSCs 移植有望使多种神经营养因子的表达时限延长从而有利于 SCI 的修复^[10]。本研究在大鼠 SCI 后第 7 天移植 NSCs, 目的避开炎症反应期, 通过 NSCs 移植激发神经再生分子级联 (Cascade of guidance molecules, CGM), 促进神经营养因子的释放使其向有利于轴突再生的方向发展。

BDNF 基因是 1982 年由德国神经生物学家 Barde 发现并纯化的蛋白质, 其单体以含有 252 个氨基酸残基的前体形式合成, 经加工形成 119 个残基、分子量为 13 KD 的成熟碱性蛋白, 等电点 (PI) 为 9.99。大鼠 BDNF 基因由 5 个外显子组成, 5' 端的 4 个外显子与相互分离的启动子相连, 3' 端的外显子则编码 BDNF 蛋白。BDNF 作为靶源性神经营养因子,

BDNF 通过逆行转运或旁分泌作用对损伤后的神经组织起到营养作用。具体表现在: ①上调神经元黏附分子等表达促进轴突再生。②形成浓度梯度引导趋化轴突。③被吞饮入轴突, 经轴浆运输到神经元胞体, 维持神经元存活。SCI 后残留神经元及胶质细胞均可分泌 BDNF, 后者通过靶源性, 自分泌和旁分泌方式与相应的受体 BDNFR α 及 Ret 结合, 激发多种信号通路促进中枢神经的分化生长与存活^[11]。本研究证实, 与对照组相比 NSCs 移植可明显上调 BDNF 基因在各水平的表达, 提示 NSCs 移植后存活于损伤区的神经元和胶质细胞促进 BDNF 的合成。

本实验证实通过 NSCs 移植可明显增加并延长 BDNF 基因的表达时相, 后者表达的上调是 NSCs 移植改变脊髓损伤微环境并修复脊髓的重要机制之一。

参考文献

- [1] Barrière G, Leblond H, Provencher J, et al. Prominent role of the spinal central pattern generator in the recovery of locomotion after partial spinal cord injuries. *J Neurosci*, 2008, 28(15): 3976-3987.
- [2] Lowry N, Goderie SK, Adamo M, et al. Multipotent embryonic spinal cord stem cells expanded by endothelial factors and Shh/RA promote functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 2008, 209(2): 510-522.
- [3] 王岩峰, 吕刚, 李花, 等. 神经干细胞移植对大鼠脊髓损伤后 BDNF 与 GAP-43 基因表达的影响. *中国矫形外科杂志*, 2004, 12(23, 24): 1870-1872.
- [4] Daniela F, Vescovi AL, Bottai D. The stem cells as a potential treatment for neurodegeneration. *Methods Mol Biol*, 2007, 399: 199-213.
- [5] Paul Lu, Li Jones, Ey Snyder, et al. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 2003, 181(2): 115-129.
- [6] Kamei N, Tanaka N, Oishi Y, et al. BDNF, NT-3, and NGF released from transplanted neural progenitor cells promote corticospinal axon growth in organotypic cocultures. *Spine*, 2007, 32(12): 1272-1278.
- [7] Takeuchi H, Natsume A, Wakabayashi T, et al. Intravenously transplanted human neural stem cells migrate to the injured spinal cord in adult mice in an SDF-1 and HGF-dependent manner. *Neurosci Lett*, 2007, 426(2): 69-74.
- [8] Nakamura M, Toyama Y. Transplantation of neural stem cells into spinal cord after injury. *Nippon Rinsho*, 2003, 61(3): 463-468.
- [9] Widenfalk J, Lundstromer K, Jubran M, et al. Neurotrophic factors and receptors in the immature and adult spinal cord after mechanical injury or kainic acid. *J Neurosci*, 2001, 21(10): 3457-3475.
- [10] Sveinsson OA, Gudjonsson T, Petersen PH. The application of stem cells for research and treatment of neurological disorders. *Laeknabladid*, 2008, 94(2): 117-122.
- [11] Vavrek R, Girgis J, Tetzlaff W, et al. BDNF promotes connections of corticospinal neurons onto spared descending interneurons in spinal cord injured rats. *Brain*, 2006, 129(6): 1534-1545.

(收稿日期: 2008-06-05 本文编辑: 连智华)