

· 基础研究 ·

嗅鞘细胞移植对脊髓损伤后损伤区髓鞘相关轴突生长抑制因子受体表达的影响

袁普卫¹, 贺西京², 王国毓²

(1. 陕西中医学院骨伤研究所骨病关节研究室, 陕西 咸阳 712000; 2. 西安交通大学第二医院骨二科)

【摘要】 目的:观察嗅鞘细胞移植前后脊髓损伤区髓鞘相关轴突生长抑制因子受体(NgR)的变化,探讨嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤的有关机制。**方法:**实验于2006年9月至2007年5月在西安交通大学医学院环境与基因重点实验室完成。①实验动物:成年健康SD雄性大鼠40只,用随机数字表法分为正常组、模型组、嗅鞘细胞组和DF12对照组,每组10只。另取30只健康成年雄性SD大鼠作为嗅鞘细胞的来源。②实验方法:除正常组外,其余各组均建立全横切脊髓损伤模型。嗅鞘细胞组将原代培养12d的嗅鞘细胞悬液调整为(1×10^{11})个/L,在距损伤缘上下各1mm处分4点应用微量注射器注射,深度1.0mm,每处各注射1 μ l;DF12对照组同法每点注射等量DF12培养液;模型组、正常组不进行任何处理。③观察项目与方法:各组分别于移植后1、4、8周采用免疫组化技术动态检测脊髓损伤区NgR表达的变化。同时在移植后8周后行嗜银染色检测组织形态学变化。**结果:**①NgR表达的变化:正常组NgR表达的吸光度值明显低于其余3组($P < 0.05$)。嗅鞘细胞组于移植后1、4、8周脊髓损伤区NgR的表达均明显低于模型组和DF12对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而模型组和DF12对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。②组织形态学变化:嗅鞘细胞移植8周后除正常组外,其余各组均可见明显的神经纤维再生,但模型组与DF12对照组大部分纤维排列紊乱,再生纤维方向性较差;嗅鞘细胞组可见明显的新生轴突,且神经纤维跨越损伤部位修复脊髓损伤,无论在数量还是质量上均优于模型组及DF12对照组。**结论:**嗅鞘细胞移植可能通过降低脊髓损伤区NgR蛋白的表达,从而促进损伤脊髓的修复。

【关键词】 脊髓损伤; 髓鞘相关轴突生长抑制因子受体; 免疫组织化学; 细胞移植

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2011.01.015

Effect of olfactory ensheathing cells transplantation on level of NgR in the injured region after spinal cord injury

YUAN Pu-wei*, HE Xi-jing, WANG Guo-yu. *Laboratory of Bone Disease and Joint, Institute of Orthopaedics, Traditional Chinese Medical College of Shan'xi, Xi'an Yang 712000, Shaanxi, China

ABSTRACT Objective: To observe the change of NgR in the region of spinal cord injury (SCI) before and after transplantation of olfactory ensheathing cells (OECs) and explore the relevant mechanism of OECs transplantation in treating SCI. **Methods:** The experiment was enforced from September 2006 to May 2007 in the Key Laboratory of Environment and Genes Related to Diseases of Ministry of Education of Xi'an Jiaotong University. ①Forty adult SD rats were divided into normal group, model group, OECs group and DF12 control group with random digits table. Each group had 10 rats. In addition, 30 healthy male SD rats were accepted as the material for cell culture. ②The rats in model group, OECs group and DF12 control group were cut off T₁₀ spinal cord to establish SCI model. Then the primary culture OECs suspension [(1×10^{11}) piece/L] was injected into the region about 1 mm from the margin of injury (about 1.0 mm depth and every place with 1 μ l) of OECs group and DF12 culture fluid was injected into DF12 control group in a same dose and method. The normal group and model group did not any disposal. ③In the 1st, 4th and 8th weeks after injection, immunohistochemistry were used to evaluate the results of OECs transplantation. And the histological silver staining was applied to evaluate the effect of OECs transplantation in the 8th week after injection. **Results:** All 40 rats survived and were accepted for analysis. ①At the 1st, 4th and 8th weeks after injection, immunohistochemistry and western blot results showed the level of NgR in normal group were obviously lower than other groups ($P < 0.05$), and in OECs group was obviously lower than that of DF12 control and model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was no significant difference between model group and DF12 control group. ②At the 8th week after injection, histological silver staining showed that nerve fibre obviously regenerated in model group, OECs group and DF12 control group, but the regenerated fiber in model group and DF12 control group arranged in disorder compared with that of OECs group. **Conclusion:** OECs transplantation may enhance the repair of spinal cord injury by depressing the level of NgR.

KEYWORDS Spinal cord injury; NgR; Immunohistochemistry; Cell transplantation

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2011, 24(1):51-54 www.zggszz.com

轴突生长抑制因子 (NogoA、MAG 及 OMgp) 及其相关信号轴突抑制因子受体 NgR (Nogo-66 receptor)、RhoA 在脊髓损伤中的作用成为近年来脊髓损伤的研究热点。嗅鞘细胞 (OECs) 因自身特点曾被誉为 21 世纪治疗脊髓损伤最有前景的移植材料^[1]。基础及临床研究均表明 OECs 移植能够促进脊髓功能的恢复, 但其是否能通过影响 NgR 的表达来促进损伤脊髓的再生目前尚不十分明确, 本实验通过观察 OECs 移植前后 NgR 的动态变化, 从而进一步探讨 OECs 移植治疗脊髓损伤的可能机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组 实验于 2006 年 9 月至 2007 年 5 月在西安交通大学医学院教育部环境与基因重点实验室完成。成年 SD 大鼠 40 只 (由西安交通大学实验动物中心提供), 8 周龄, 体质量 250~300 g, 雄性大鼠, 随机数字表法分为正常组、模型组、嗅鞘细胞组 (OECs 组)、DF12 对照组, 每组 10 只。另取 30 只健康成年雄性 SD 大鼠用于嗅鞘细胞的取材, 体质量 200~250 g。

1.2 实验仪器与试剂 胎牛血清、DF12、胰蛋白酶 (均为 GIBCO 产品); 兔抗鼠 P75 NTR 单克隆抗体, 羊抗兔二抗、DAB 显色试剂盒 (均为武汉博士德公司产品); 小鼠抗大鼠 NgR、羊抗小鼠二抗 (均为 CHEMICON 公司产品); 25 cm² 斜口细胞培养瓶 (Hyclone 产品), 超净工作台 (BCM-1000A, 苏州苏净集团安泰公司); 荧光显微镜 (AFX-IIA, 日本 Nikon); 体式显微镜 (S6D, 德国 Leica); 荧光倒置显微镜 (DMIL, 德国 Leica); 手术显微镜 (德国 Leica); CO₂ 培养箱 (BB16, 美国 Heraeus); Leica Q500IW 图像处理分析系统; 立体定向仪 (Narishige SR-6)。

1.3 实验方法

1.3.1 嗅鞘细胞的取材、培养、鉴定及纯化 按参考文献^[2]进行。大鼠断颈处死, 头部浸入 75% 的乙醇 3 min。在超净台内迅速取出两侧嗅球, 置于 D-Hanks 平衡盐溶液中除去软膜, 然后用 D-Hanks 液冲洗 2 遍。在手术显微镜下用眼科剪剪取嗅球最外 2 层 (嗅神经层和小球层), 并将其剪碎, 将剪碎组织按 800 r/min 离心 3 min, 取出弃上清液, 滴加质量浓度为 2.5 g/L 的胰蛋白酶消化液 2 ml, 转移至底面积 25 cm² 斜口细胞培养瓶, 置 37 °C CO₂ 培养箱 20 min。之后加 DF12-FCS 培养基 (DF12 与 20% 胎牛血清按 4:1 配制) 2 ml 终止消化 3 min, 800 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 加 D-Hanks 液约 2 ml, 移至 25 cm² 斜口细胞培养瓶, 用火焰抛光后的 pasteur 移液管反复吹打 15~20 次, 获单细胞悬浮液, 800 r/min 再离心 5 min, 弃上清液, 滴加 DF12-FCS 培养基 2 ml, 同时

滴加双抗。台盼蓝检测细胞活性后, 按密度为 (8×10⁸) 个/L 种植于未经多聚右旋赖氨酸处理的培养瓶, 置 37 °C 的 CO₂ 温箱内培养, 24 h 后按 Nash 差时贴壁法, 将培养上清连同未贴壁细胞吸出, 重新种植于经多聚右旋赖氨酸处理的 6 孔板, 加 DF12 培养液 (含 10% 胎牛血清) 3 ml 进行培养。培养 1 周后加入 Ara-C (终浓度 5~10 mol/L) 作用 48 h, 清洗后培养液中加入 20 μmol/L Forskolin 和 20 mg/L 牛垂体提取液, 继续进行培养。2 d 换液 1 次, 观察细胞生长情况, 间断摄片。培养至 12 d, 应用 P75 单抗行免疫组化染色鉴定。

1.3.2 脊髓损伤模型的制备^[2] 除正常组外, 其余各组均建立全横切脊髓损伤模型。大鼠应用 10% 水合氯醛按 1 ml/100 g 腹腔麻醉, 手术野周围剪毛备皮, 碘伏消毒。以 T₁₀ 棘突为中心, 作 3 cm 长的纵行手术切口, 依次切开皮肤、皮下组织及深筋膜, 切开椎旁肌肉, 用自动拉勾向两侧拉开, 显露棘突和椎板, 组织剪剪除 T₉₋₁₁ 棘突, 用小弯钳咬除椎板, 充分显露硬脊膜。手术显微镜下沿后正中中线纵行切开硬脊膜 3.0~5.0 mm, 显露脊髓, 约在 T₁₀ 椎体水平用尖刀片横向切断脊髓。

1.3.3 嗅鞘细胞的移植^[2] 脊髓损伤模型制备后, 嗅鞘细胞组将原代培养 12 d 的嗅鞘细胞悬液调整为 (1×10¹¹) 个/L, 在距损伤缘上下各 1 mm 处分 4 点用微量注射器注射, 深度均为 1 mm, 每处注射 1 μl。DF12 对照组同法每点注射等量 DF12 培养液, 模型组、正常组均不进行任何处理。

1.4 观察项目及方法

1.4.1 组织学检查 各组在细胞移植后 8 周取材行嗜银染色。

1.4.2 免疫组化染色^[3] 各组动物分别于移植后 1、4、8 周麻醉, 经左心室依次灌注肝素生理盐水和 40 g/L 多聚甲醛, 取脊髓, 4 °C 下将其移入 40 g/L 多聚甲醛中固定 6 h 后, 依次移入 20% 和 30% 蔗糖中直到沉底。行水平冰冻切片, 片厚 5 μm。每个时间点从损伤区及邻近部位各切 10 张组织片备用。取各时间点、不同部位各 4 张组织片与小鼠抗大鼠 NgR 抗体 (1:100) 于 4 °C 孵育过夜, 二抗为生物素标记羊抗 IgG, 三抗链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液, 显色底物为 DAB, 常规脱水, 透明封固。同时用 Leica Q 500 IW 图像处理分析系统于损伤区及邻近区域内各取 3 个视野, 测量单位面积 NgR 吸光度 (A) 值的变化。

1.4.3 Western blot 免疫印迹检测 NgR 表达^[4] 各组动物分别于移植后 1、4、8 周进行 Western blot 检测。①动物蛋白的抽提: 动物处死后, 迅速置于冰上,

分别取距脊髓横断临近 5 mm 处脊髓组织。取材后将组织按 1:20 加入匀浆液 (pH 8.0 的 10 mmol/L Tris-HCl、140 mmol/L NaCl、300 mmol/L KCl、pH 8.0 的 1 mmol/L EDTA、0.5% Triton X-100、0.5% 脱氧胆酸钠、完全蛋白酶抑制剂按 1:50 体积比加入), 玻璃匀浆器将组织研碎。匀浆后悬液置于冰上孵育 1 h, 13 000 r/min 离心 10 min, 收集上清。②SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot 免疫印迹: 蛋白质样品加入上样缓冲液后, 混匀, 煮沸 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 加样于 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶孔中, 每个泳道约 100 μg 蛋白, 电泳后电转移到 NC 膜上, Western 免疫印迹检测参照文献[5]进行。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 12.0 软件进行统计处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较行方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织形态学变化 嗜银染色结果显示, 嗅鞘细胞移植 8 周后除正常组外, 其余各组均可见明显的神经纤维再生, 但模型组与 DF12 对照组大部分纤维排列紊乱如乱发状, 明显迂曲, 再生纤维方向性较差, 无明显沿脊髓纵轴方向再生的纤维; 嗅鞘细胞组可见明显的新生轴突, 且神经纤维跨越损伤部位修复脊髓损伤, 无论在数量还是质量上都优于模型组及 DF12 对照组。

2.2 NgR 表达免疫组化检测结果 Leica Q 500 IW 图像分析系统显示, 嗅鞘细胞组于移植后 1、4、8 周脊髓损伤区 NgR 的表达均明显低于模型组和 DF12 对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而模型组和 DF12 对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组脊髓损伤区不同时期 NgR 表达的 A 值见表 1。

表 1 实验动物各组脊髓损伤区不同时期 NgR 表达的 A 值
($n=6, m^{-2}, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Absorbance of NgR in the zone of spinal cord injury in different period ($n=6, m^{-2}, \bar{x} \pm s$)

组别	1 周	4 周	8 周
模型组	4.56±0.21	6.80±0.36	5.80±0.45
DF12 对照组	4.26±0.35	6.40±0.16	5.32±0.43
OECs 组	3.45±0.62 ^{*△}	2.78±0.51 ^{***△△}	2.50±0.45 ^{***△△△}

注: 在 1、4、8 周与模型组比较, ^{*} $q=4.89, P < 0.05$; ^{**} $q=12.84, P < 0.01$; ^{***} $q=10.96, P < 0.01$; 在 1、4、8 周与 DF12 对照组比较, [△] $q=4.14, P < 0.05$; ^{△△} $q=6.52, P < 0.01$; ^{△△△} $q=6.34, P < 0.01$

Note: Compared with model group at 1, 4, 8 weeks, ^{*} $q=4.89, P < 0.05$; ^{**} $q=12.84, P < 0.01$; ^{***} $q=10.96, P < 0.01$. Compared with DF12 group at 1, 4, 8 weeks, [△] $q=4.14, P < 0.05$; ^{△△} $q=6.52, P < 0.01$; ^{△△△} $q=6.34, P < 0.01$

2.3 OECs 移植后各组 NgR 表达 Western blot 检测结果 移植后 1、4、8 周 OECs 组 NgR 的表达明显低于模型组、DF12 对照组。各组电泳结果见图 1。

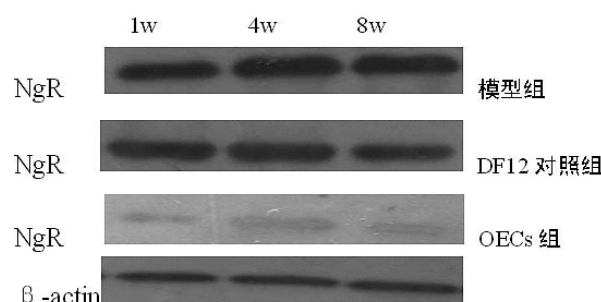


图 1 各组脊髓损伤区不同时期电泳结果

Fig.1 Electrophoresis result of different groups in different time

3 讨论

3.1 NgR 在神经再生中的作用 轴突生长抑制因子的发现是中枢神经再生研究的重大成果, 给脊髓损伤研究带来了新的希望。目前髓鞘相关轴突生长抑制因子主要有 NogoA、MAG, 及 OMgP, 但研究发现抑制作用的发挥要通过一系列的机制才能完成, 首先它与其共同受体 NgR 相结合, 在神经生长营养因子 (NGF) 的低亲和力受体 P75 NTR 的参与下, 激活下游信号分子 RhoA, 进而再通过一系列机制诱导生长锥塌陷, 从而发挥其抑制作用^[5-6]。

NgR 是最近发现并克隆的一种糖基磷脂酰肌醇 (glycosyl-phosphatidyl inositol, GPI) 锚定膜蛋白, 因其在髓磷脂抑制轴突再生信号转导过程中特殊的靶分子效应, 日益受到重视。Li 等^[7] 制备了抗 NgR 的单克隆抗体 7E11。体外实验显示, 7E11 能促进大鼠背根节神经突起在中枢髓鞘微环境中的生长。Li 等^[8] 应用 NgR 拮抗肽 NEP1-40 治疗脊髓损伤证实, NEP1-40 能减少中枢神经髓鞘的抑制活性, 当局部注射或全身应用时, 它能够促进皮质脊髓束 (CST) 的再生, 同时能提高尾段脊髓的血清素纤维密度, 这种结果甚至在伤后 7 d 应用 NEP1-40 也可见到。Liu 等^[9] 制备了含有鼠 NgR 27-310 氨基酸残基的重组可溶性 NgR (NgREcTo), 发现它能减少 Nogo-A 与转染了 NgR 的细胞的结合, 并且能部分逆转 Nogo 和 CNS 髓磷脂对体外培养的胚胎鸡 DRG 的生长抑制作用。其他实验发现, NgREcTo 还能减低 MAG 对轴突的抑制作用。将 NgREcTo 与 Fc 片段融合, 观察到它能有效地阻抑 Nogo-66、MAG 与 OMgP 与 NgR 的结合。这些研究的结果都提示, 可溶性 NgR 可能是 3 种髓磷脂蛋白的有效抑制物。

3.2 嗅鞘细胞治疗脊髓损伤的机制^[2] 嗅鞘细胞移植一直是近期脊髓损伤研究的重要内容, 目前认为其治疗脊髓损伤的可能机制包括: ①分泌神经营养因子如神经生长因子、脑源性神经营养因子、神经营养因子 3 和神经营养因子 4 等; ②表达促进脊髓再生的细胞外基质如 Fn、Ln、N-CAM 及 PSA-NCAM 等; ③促进神经髓鞘的再生及具有轴突导向作用;

④帮助神经轴突穿越胶质瘢痕^[10-13]。我们通过本实验也证实嗅鞘细胞能促进损伤脊髓髓鞘的再生。

轴突生长抑制因子及其相关抑制信号研究是近年中枢神经再生研究的热点方向,近年来我们就嗅鞘细胞移植是否对轴突生长抑制因子及其相关抑制信号的影响进行了深入研究,初步发现它能够降低脊髓损伤区 nogoA、髓磷脂相关糖蛋白及下游抑制信号分子 RhoA 的表达变化^[2-4]。本研究结果发现嗅鞘细胞移植后损伤区 NgR 表达明显降低,再次表明嗅鞘细胞移植可能通过降低轴突抑制因子如 nogoA, MAG, NgR 及其相关抑制信号的表达来促进损伤脊髓的再生。

我们研究发现 NgR 在脊髓损伤后即刻就有表达,同时我们发现 NgR 及 RhoA 不像 NogoA 那样表达短暂,他们的表达可长时间持续在一个较高水平,其中一个可能原因是 NgR 不仅是 NogoA 的受体,同时也是 MAG 和 OMgP 的受体, MAG 和 OMgP 可能伴随 NogoA 同时激活,从而增加了 NgR 的表达,使其保持在一个较高的水平。由于下游 RhoA 信号受 NgR 的转录。NgR 长时间的激活又造成了 RhoA 相应的表达, NgR 和 RhoA 的升高分别定位于轴突和胞质,实际上 NogoA 在神经损伤后胶质瘢痕形成之前扮演了重要和主要的抑制神经再生的作用。

同时本研究发现脊髓损伤早期植入嗅鞘细胞后能明显降低 NgR 水平,由此结合我们前期研究结果可以推测嗅鞘细胞移植通过降低 NogoA, NgR 及 RhoA 水平,来促进轴突的再生损伤的修复。

参考文献

[1] Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, et al. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia[J]. *Neuron*, 2000, 25(2): 425-435.

[2] 袁普卫, 贺西京, 王国毓, 等. 嗅鞘细胞移植对脊髓损伤区勿动蛋白表达的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(38): 7522-7524.

Yuan PW, He XJ, Wang GY, et al. Effect of olfactory ensheathing cell transplantation on NogoA protein levels in the injured spinal cord region[J]. *Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Ju Yu Lin Chuang Kang Fu*, 2008, 12(38): 7522-7524. Chinese.

[3] 袁普卫, 贺西京, 李浩鹏, 等. 嗅鞘细胞移植后脊髓损伤区髓磷脂相关糖蛋白表达的动态变化[J]. *中国组织工程与临床康复*, 2006, 30(33): 27-29.

Yuan PW, He XJ, Li HP, et al. Effect of olfactory ensheathing cells

transplantation on the expression of myelin-associated glycoprotein in the injured region after spinal cord injury[J]. *Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Ju Yu Lin Chuang Kang Fu*, 2006, 30(33): 27-29. Chinese.

[4] 袁普卫, 贺西京, 楚向东, 等. 嗅鞘细胞移植对脊髓损伤区 RhoA 表达的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(5): 10053-10055.

Yuan PW, He XJ, Chu XD, et al. Effect of olfactory ensheathing cells transplantation on RhoA expression in injured region after spinal cord injury[J]. *Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Ju Yu Lin Chuang Kang Fu*, 2007, 11(5): 10053-10055. Chinese.

[5] Goldberg JL, Barres BA. Nogo in nerve regeneration[J]. *Nature*, 2000, 403(6768): 369-370.

[6] Prinjha R, Moore SE, Vinson M, et al. Inhibitor of neurite outgrowth in humans[J]. *Nature*, 2000, 403(6768): 383-384.

[7] Li W, Walus L, Rabacchi SA, et al. A neutralizing anti-Nogo66 receptor monoclonal antibody reverses inhibition of neurite outgrowth by central nervous system myelin[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(42): 43780-43788.

[8] Li S, Strittmatter SM. Delayed systemic Nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury[J]. *J Neurosci*, 2003, 23: 4219-4227.

[9] Liu BP, Fournier AE, GrandPre T, et al. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor[J]. *Science*, 2002, 297(5584): 1190-1193.

[10] 胡志俊, 马迎辉. 嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤的研究进展[J]. *中国骨伤*, 2009, 22(1): 68.

Hu ZJ, Ma YH. An update of repairing spinal cord injury by olfactory ensheathing cells [J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2009, 22(1): 68. Chinese with abstract in English.

[11] 邢时通, 王丹, 温晓红, 等. A 型肉毒素水电视针穴注射治疗脊髓损伤后肌痉挛的临床研究[J]. *中国骨伤*, 2010, 23(5): 350-353.

Xing ST, Wang D, Wen XH, et al. Clinical research of electroacupuncture combined with acupoint-injection of botulinum toxin A in treating the muscle spasticity by spinal cord injury [J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2010, 23(5): 350-353. Chinese with abstract in English.

[12] 钱苏林, 陈安民. 脊髓损伤药物治疗新进展[J]. *中国骨伤*, 2008, 21(2): 164-166.

Qian SL, Chen AM. Advancement in drug therapy of spinal cord injury [J]. *Zhongguo Gu Shang /China J Orthop Trauma*, 2008, 21(2): 164-166. Chinese.

[13] 李盛华, 郭平德, 王文晶. 脊髓损伤的治疗现状与进展[J]. *中国骨伤*, 2010, 23(1): 70-73.

Li SH, Guo PD, Wang WJ. Current situation and progression in the treatment of spinal cord injury [J]. *Zhongguo Gu Shang /China J Orthop Trauma*, 2010, 23(1): 70-73. Chinese with abstract in English.

(收稿日期: 2010-04-14 本文编辑: 王宏)