

神经干细胞静脉移植对大鼠脊髓损伤的修复作用

杜宁 陈志 申才良 张峰 宋旆文

摘要 制备阴性对照病毒转染的传代神经干细胞(NSCs),同期制作大鼠脊髓损伤模型,随机分为实验组、假手术组、空白组,并对其进行术后行为学评分。3 d后取实验组再次手术,尾静脉输注已用阴性对照病毒标记的大鼠NSCs浓缩液。于1周和6周时对假手术组、实验组大鼠行10%福尔马林灌注,以固定的大鼠脊髓段落,福尔马林浸泡存放去除的脊髓段1 d,石蜡包埋后切片。获得大量尚未分化、悬浮生长的NSCs球。完成NSCs的传代。实验组的行为学评分结果比假手术组分值高。实验组大鼠脊髓损伤区脊髓空洞体积较假手术组小。初步证明注射NSCs液的大鼠恢复速度高于假手术组和空白组,NSCs移植能够减小脊髓损伤处的空洞体积和促进血管生长,从而促进脊髓损伤后神经功能的恢复。
关键词 脊髓损伤;移植;慢病毒转染;行为学评分
中图分类号 R 681.5
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)11-1688-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.11.032

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是脊髓造成的一过性或者永久性损害,并使其正常功能发生改变的一种损伤。这种中枢神经系统损伤往往具有严重的致残性,导致患者出现不同程度的截瘫情况^[2]。SCI作为一种高致残率、低死亡率、高花费(美国每年需要花费一百亿美元于SCI上^[1])的疾病,其防治一直是各国学者研究的热点。自Reynolds et al^[2]以来,在动物实验中,人们发现移植的神经干细胞(neural stem cell, NSCs)有效促进了受损的脊髓组织结构和功能的恢复,且可整合入宿主组织并分化为神经元细胞、星形细胞和少突胶质细胞。这种明显强于仅使用药物治疗的方案更具优势,有望成为细胞代替治疗的首选^[3]。使用干细胞移植治疗SCI后遗症,经常使用的移植方法包括静脉输注法、腰椎穿刺蛛网膜下腔注射法、手术切开探查直

视下脊髓内注射等^[4]。该研究探讨经静脉输注骨髓NSCs移植治疗大鼠胸段脊髓损伤后遗症的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 新生SPF级大鼠1只。健康成年雌性大鼠60只, SPF级, (230±20) g。本实验所用动物、大鼠SCI手术场地由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 实验试剂 DMEM/F12培养基购自美国Gibco公司;慢病毒、Polybrene、Enhanced Infection Solution购自上海吉凯基因公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠NSCs的分离、培养、鉴定 取新生SPF级大鼠的全脑用于分离干细胞^[5]。生物安全柜下操作,10%水合氯醛腹腔注射麻醉,断头处死大鼠,75%酒精浸泡5 min,后紫外线消毒30 min。剪除大鼠脑膜及附着血管,剥出全脑, Hank's液漂洗3次,剔除杂质,剪碎脑组织,加入神经元基础培养基,1 ml胰酶细胞消化液,加入10%胎牛血清培养基终止消化;经70 μm孔径的筛网过滤掉血凝块与残渣,制单细胞悬液。过滤后的细胞液盛放于试管中,1 000 r/min离心10 min,弃上清液,用尖头抛光的长颈吸管反复吹打单细胞悬液,加入2 ml无血清培养基(DMEM/F12+2% B-27+20 ng/ml EGF+20 ng/ml bFGF+青霉素100 U/ml+链霉素0.1 mg/ml),再次600 r/min离心5 min,吸弃上清液,加入无血清培养基重悬,计数。以10⁵/ml接种于25 cm²培养瓶中,置37℃、5% CO₂恒温培养箱中培养,每3 d半换液1次,1周左右传代1次。培养2~3 d后,出现悬浮生长的细胞球,7 d后,600 r/min离心5 min后吸弃旧培养基,加入新鲜培养基,长颈吸管反复吹打细胞球成为小细胞球和单细胞悬液,按量将细胞悬液分别接种至新培养瓶中(1×10⁵个细胞/瓶),每7 d传代1次,每3 d离心更换半量培养基1次,培养条件不变。

1.2.2 大鼠悬浮NSCs的转染 为确认合适的感

2016-07-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81472088); 安徽省自然科学基金(编号: 1508085MH152)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院骨科, 合肥 230032

作者简介: 杜宁,男,硕士研究生;

申才良,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: shencailiang1616@163.com

染条件,按照不同培养条件将实验分为5组,A组:常规培养基组,观察常规培养条件下病毒对细胞的感染效果;B组:添加 Polybrene 的常规培养基组,观察 Polybrene 是否可以提升感染效果;C组: ENi. S. 组,观察用 ENi. S. 替代常规培养基时病毒对细胞的感染效果;D组:添加 Polybrene 的 ENi. S. 组,观察 Polybrene 和 ENi. S. 条件下病毒对细胞感染效果。Control 组:监控实验过程中细胞生长是否正常。提取2瓶传代培养3代的 NSCs,分别置于两支25 ml 试管中,3 000 r/min离心5 min,吸弃上清液,将细胞沉淀接种于96孔板上。取完全培养基稀释的细胞悬液80 μ l/孔加入96孔板中,接种9个孔(表1)。并取 ENi. S. 稀释的细胞悬液80 μ l/孔,接种6个孔。按照表1向各孔中加入相应体积的溶液,参考手册稀释 Polybrene 与 ENi. S.。感染后8~12 h,向每孔中加入100 μ l 常规培养基,保持细胞正常生长,不换液。在第2、3天继续培养,在此中途可以对细胞补液,维持细胞活性。于培养第4天确认感染效果。

感染后72~96 h, NSCs 荧光表达丰度较高时,用显微镜观察。感染效率80%左右,且细胞生长良好的组所对应的感染条件和复感染指数[感染时病毒和细胞数量的比值(multiplicity of infection, MOI)]。即可以作为后续感染实验的依据。正式实验改为6孔板(底面积10 cm² N,接种体积2 ml,换液体积1 ml) SCs 转染。培养7 d后, NSCs 形态上已出现明显的分化,于镜下观察转染 NSCs 的分化情况。

1.2.3 实验分组 SPF级雌性大鼠60只,将其分为空白组(control组,20只):SCI后不做任何输注处理;假手术组(A组,20只):胸9脊髓损伤后3 d尾静脉注射磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS) 2 ml;实验组(B组,20只):T9脊髓损伤后3 d尾静脉注射 POLY-M 转染后的第二代大鼠

NSCs 条件培养液2 ml。A组、B组再随机均分为两个亚组,其中A1、B1组分别于饲养7 d后处死,A2、B2组分别于饲养6周后处死。

1.2.4 大鼠胸9 SCI 模型的创建及尾静脉移植治疗 采用改良的 Allen 装置制作大鼠 SCI 模型,咬除大鼠胸9椎板后,暴露脊髓打击处。打击装置整合于立体定位仪上。将一直径为1.5 mm 圆形薄铜垫片(面积7.075 mm²,质量0.1 g)置于胸段第九脊椎表面,以重10 g的砝码5 cm 高度自由坠落打击该垫片,致伤量为50 g·cm,造成胸9/10椎间隙处脊髓的冲击伤。常规肌肉、筋膜、表皮3层缝合,予抗生素大腿肌注适量预防感染。对 Control 组、A组和B组大鼠进行分笼饲养,每6 h人工辅助排小便1次。并于术后12、24 h分别再次予以大腿肌肉注射抗生素1次。将培养72 h的A组大鼠经尾静脉注射 PBS 2 ml,B组大鼠经尾静脉注射单细胞浓度为1 $\times 10^6$ /ml 的 POLY-M 慢病毒转染后 NSCs 液体。

1.2.5 大鼠行为学、组织学评价方法 对伤后 SCI 大鼠分别进行 BBB 评分,作行为学观察。BBB 法将大鼠后肢运动分为22个等级,后肢全瘫为0分,完全正常为21分,两者间根据功能分为1~20分。基本内容:关节活动的数目和范围,负重程度及前后肢的协调性,前后爪和尾部的活动情况。评价方法见参考文献^[6],尽可能控制动物在行动范围的中心区域活动,观察期时间为4 min。于以下时间点评测:术后1、6、24、48、72、96、120、144 h。本组抽取3名课题组研究生参评,他们均预先学习、掌握 BBB 评价标准的观察方法。3人未参加之前的动物实验、对大鼠分组情况不了解,3人各自独立观察记录结果。

实验鼠分别于术后1周和6周取手术标本(10%福尔马林灌注以固定脊髓段)。对1周的A1、B1组在获得脊髓标本后于脊髓损伤区前后截取取材,连续20 μ m 厚度纵切 SCI 处脊髓标本,HE 染色

表1 96孔板转染大鼠神经干细胞加液成分表

病毒量	control 组	A 组	B 组	C 组	D 组
1 组: 1×10^8 MOI = 100	培养基: 20 μ l	培养基: 10 μ l 慢病毒: 10 μ l	P(M): 10 μ l 慢病毒: 10 μ l	ENi. S. : 10 μ l 慢病毒: 10 μ l	P(E): 10 μ l 慢病毒: 10 μ l
2 组: 1×10^7 MOI = 10	培养基: 20 μ l	培养基: 10 μ l 慢病毒: 10 μ l	P(M): 10 μ l 慢病毒: 10 μ l	ENi. S. : 10 μ l 慢病毒: 10 μ l	P(E): 10 μ l 慢病毒: 10 μ l
3 组: 1×10^6 MOI = 1	培养基: 20 μ l	培养基: 10 μ l 慢病毒: 10 μ l	P(M): 10 μ l 慢病毒: 10 μ l	ENi. S. : 10 μ l 慢病毒: 10 μ l	P(E): 10 μ l 慢病毒: 10 μ l

P(M) 为含 0.5% Polybrene 的培养基液, P(E) 为含 0.5% Polybrene 的 ENi. S. 液

观察损伤区血管生长情况。在移植后 6 周获得 A2、B2 组脊髓标本脱水后石蜡包埋,以损伤区中心每间隔 140 μm 做横切片行 HE 染色,取第 10 个切片来测量脊髓空洞的面积,以此方法顺序取 10 个样本。用 Image J1.38 版本的影像分析软件测量空洞的区域面积。空洞体积用下面方法计算: $V = a \times d$; a = 测量的面积; d = 切片间距; 空洞总体积 $V_{\text{tc}} = V_{\text{c1}} + V_{\text{c2}} \cdots + V_{\text{c10}}$ 。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18 软件进行统计分析,正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。将结果汇总,两组样本间数据比较采用 t 检验(并做方差齐性检验),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCs 的形态观察及鉴定 原代 NSCs 接种后,2~3 d 后可见 NSCs 呈球形悬浮生长,到第 7 天时培养瓶内可见球状的细胞集落,生长数目达数十甚至上百个,有桑葚状、折光性强等特点,未见到明显的贴壁和细胞突起形成(图 1)。将培养 7 d 悬浮 NSCs 球慢病毒转染预实验,确定合适的 MOI 值后进行批量制备(图 2)。

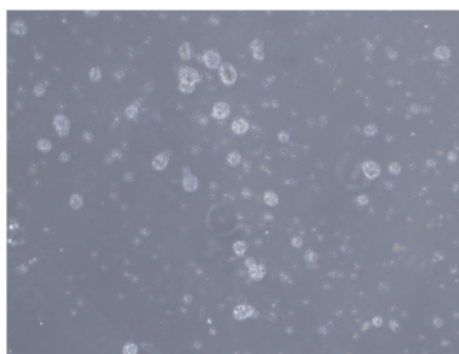


图 1 原代第 5 天 NSCs 的形态观察 $\times 200$

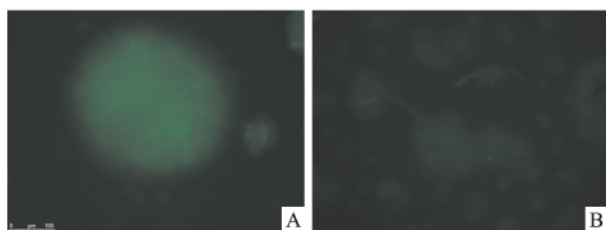


图 2 NSCs 的转染 $\times 200$

A: MOI = 10; B: MOI = 1

2.2 NSCs 的分化 在 NSCs 接种的用慢病毒转染 Polybrene、Eni. S. 诱导过的 6 孔板中,发现 NSCs 球逐渐贴壁,细胞逐渐从细胞集落中爬出,表现出

多种形态,细胞开始分化为各式神经元样细胞,部分圆形或椭圆形的可见突起,部分则出现粗长突起并呈梭样排列的神经胶质样细胞,并随着培养时间的延长,突起逐渐变长、增多。见图 3。

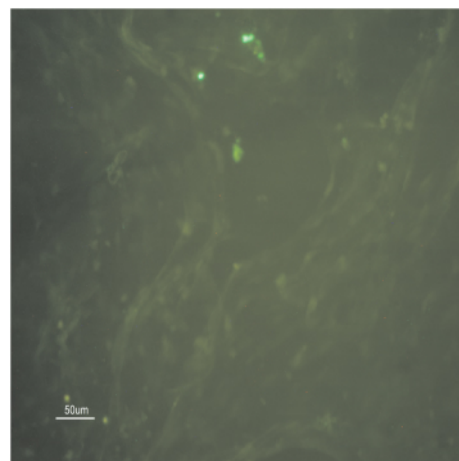


图 3 NSCs 的分化鉴定 $\times 100$

2.3 大鼠行为学评价结果 损伤 72 h 内,三组数据无明显区分,大鼠皆因 SCI 而评分较低,自损伤后第 4 天起,NSCs 尾静脉输注处理的大鼠 BBB 评分高于 control 组,差异有统计学意义,其中 96、120、144 h 时,实验组 $P < 0.05$ ($t = -3.354$, $P = 0.004$)。见表 2。

表 2 大鼠 BBB 评分表($\bar{x} \pm s$)

时间(h)	control 组	假手术组	实验组
1	0	0	0
6	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.3	$0.9 \pm 0.3^{\#}$
24	2.0 ± 0.4	2.0 ± 0.4	$2.1 \pm 0.5^{\#}$
48	2.2 ± 0.5	2.2 ± 0.4	$2.2 \pm 0.3^*$
72	3.1 ± 0.3	3.0 ± 0.4	$2.9 \pm 0.3^{\#}$
96	4.0 ± 0.5	4.0 ± 0.6	$5.0 \pm 0.4^* \#$
120	4.7 ± 0.4	4.7 ± 0.7	$5.4 \pm 0.6^* \#$
144	6.0 ± 0.5	5.9 ± 0.9	$7.4 \pm 1.0^* \#$

与假手术组比较: $^{\#}P < 0.05$; 与前一时间点比较: $^*P < 0.05$

2.4 组织学评价结果 对损伤区血管横径进行测距,经过 NSCs 尾静脉注射的 B1 组大鼠脊髓损伤区血管横径(13.50 ± 0.93) μm 较假手术组血管横径(6.90 ± 0.81) μm 大(图 4),且 control 组和实验组之间的差异有统计学意义($t = 18.856$, $P = 0.001$)。

Image J 1.38 检测损伤区脊髓空洞体积显示,经过 NSCs 静脉移植处理的实验(B2)组大鼠 SCI 区脊髓空洞体积(0.27 ± 0.09) mm^3 较对照(A2)组体积(0.57 ± 0.10) mm^3 小(图 5),得知 control 组和

移植组差异有统计学意义($t = -7.518$, $P = 0.001$)。

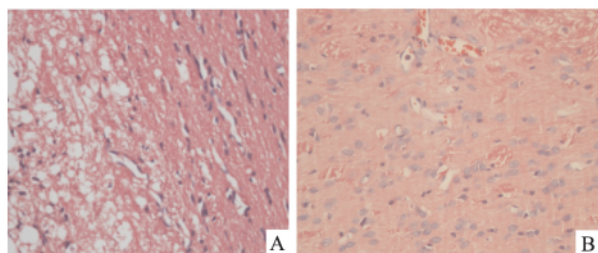


图4 SCI大鼠1周后观察SCI区血管生长情况 HE $\times 100$
A: 假手术组; B: NSCs 实验组

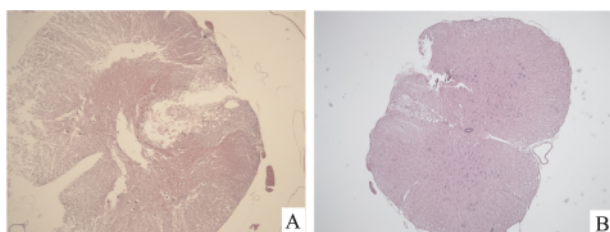


图5 SCI大鼠6周后观察脊髓空洞结果 HE $\times 40$
A: 假手术组; B: NSCs 实验组

3 讨论

3.1 评价大鼠脊髓功能 对于研究大鼠脊髓损伤及其治疗作用来说,能否正确评价脊髓功能是一项非常重要的内容,其不仅关系到实验设计的可行性,还影响着实验结果的分析。大鼠后肢 BBB 评分特点:操作简单,容易掌握,相较联合行为评分法^[7]有更多动物行为评估的细节;随分值提升,也体现了大鼠 SCI 恢复的整个过程。大鼠后肢 BBB 评分相对客观,但需熟悉评价方式。本研究对不知道大鼠实验与分组的观察员进行训练以减少主观因素的影响。从 BBB 评分法的评定细节看,它几乎涵盖了大鼠 SCI 后肢体运动功能恢复行为上的变化,并且与大鼠 SCI 程度相符。

3.2 NSCs 的旁分泌作用 经过尾静脉输注治疗过的 SCI 大鼠,虽然没有证明损伤区血管数量是否增加,但镜下显示血管直径较对照组大。研究表明 NSCs 能分泌多种细胞因子:如胶质细胞源性神经生长因子、血管内皮细胞生长因子、脑源性神经营养因子、神经生长因子等。目前细胞移植的研究无法证实细胞能够在受损脊髓处发挥替代效应,但分泌的因子能够对大鼠的脊髓神经起旁分泌作用,并促进内源性神经前体细胞的增生^[8-11]。

3.3 本实验不足之处及未来研究方向

3.3.1 流式细胞仪的引入以及慢病毒转染移植 SCI 大鼠的大体示踪技术开展 流式是较先进的细胞定量分析技术,有引用价值。由于盲筛 MOI 准确率不高,每批 NSCs 的数目不一致,细胞计数存在误差。流式细胞仪技术的引入对精确衡量细胞转染成功率有显著意义。目前本实验对于 NSCs 分化的研究仅停留在体外,不能百分百佐证其在体内的分化情况也与培养基中一致。而且 NSCs 出现分化也不代表细胞移植技术已将 NSCs 输送至伤处进行功能修复,故今后应开展大体示踪技术,如活体荧光摄像仪器可以充分显示被标记细胞在大鼠体内存在的位置(本实验由于资源和时间关系未引入)。

3.3.2 MSCs 的动脉序贯移植 间充质干细胞(MSCs)等的研究价值越来越被人们重视。目前至少 218 项临床试验研究已将骨髓间充质干细胞应用于治疗途径。在这之中,SCI 的治疗性研究主要集中在两个领域:即神经的保护和神经再生。前者旨在防止继发性的损伤对脊髓组织造成的危害,而后者则致力于研究重新连接断开、死亡的脊神经^[12-15]。对各种干细胞移植的研究一直是骨科热点,它能否成为治疗 SCI 的金标准尚不清楚,如 NSCs 和骨髓间充质干细胞相比,NSCs 的体外培养简单易行,而骨髓间充质干细胞在体外生长增殖力会下降,且更易老化等;而 NSCs 本身的移植治疗又存在脊髓微环境不适合 NSCs 生长、NSCs 移植疗效不可验证的一些问题等。在接下来的研究中,将逐渐把重心转移至骨髓间充质干细胞经髓内、腹主动脉的移植上。

参考文献

- [1] Noonan V K, Kwon B K. The Rick Hansen Spinal Cord Injury Registry (RHSCIR): a national patient-registry[J]. Spinal Cord, 2012, 50(1): 22-7.
- [2] Reynolds B A, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. Science, 1992, 255: 1707-10.
- [3] An Y H, Tsang K S, Zhang H. Potential of stem cell based therapy and tissue engineering in the regeneration of central nervous system[J]. Biomed Mater, 2006, 1: 38-44.
- [4] 陈涛,田增民,杜亚楠.神经干细胞移植途径的理论研究进展[J].中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(40): 7947-50.
- [5] White P M, Morrison S J, Orimoto K, et al. Neural crest stem cells undergo cell-intrinsic developmental changes in sensitivity to instructive differentiation signals[J]. Neuron, 2001, 29(1): 57-71.
- [6] 陈向荣,游思维,金大地. BBB 评分评估脊髓损伤大鼠后肢运

- 动功能的探讨[J]. 中国脊柱脊髓杂志 2004 ,14(9):547-9.
- [7] Gale K ,Kerasidis H ,Wrathall J R. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment [J]. *Exp Neurol* ,1985 88(1):123-34.
- [8] Dray C ,Rougon G ,Debarbieux F. Quantitative analysis by *in vivo* imaging of the dynamics of vascular and axonal networks in injured mouse spinal cord[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 ,106:9459-64 .
- [9] Jain A ,McKeon R J ,Brady - Kalnay S M ,et al. Sustained delivery of activated Rho GTPases and BDNF promotes axon growth in CSPG-rich regions following spinal cord injury [J]. *PLoS One* , 2011 6: e1613-5.
- [10] Ochodnick P ,Cruz C D ,Yoshimura N ,et al. Nerve growth factor in bladder dysfunction: contributing factor ,biomarker ,and therapeutic target[J]. *Neurol Urodyn* 2011 30(7):1227-41.
- [11] Sundberg L M ,Herrera J J ,Narayana P A. Effect of vascular endothelial growth factor treatment in experimental traumatic spinal cord injury: *in vivo* longitudinal assessment [J]. *Neurotrauma* , 2011 ,28:565-78.
- [12] Sharma R R ,Pollock K ,Hubel A ,et al. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices [J]. *Transfusion* ,2014 54(5):1418-37.
- [13] Beyer Nardi N ,da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation *in vitro* expansion and characterization [J]. *Stem Cells* , 2006 ,14:249-82.
- [14] Kabu S ,Gao Y ,Kwon B K ,et al. Drug delivery , cell-based therapies , and tissue engineering approaches for spinal cord injury [J]. *J Controlled Release* 2015 219:141-54.
- [15] Silva N A ,Sousa N ,Reis R L ,et al. From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury [J]. *Prog Neurobiol* , 2014 ,114:25-57.

Effect of neural stem cells vein transplantation on repair of spinal cord injury rats

Du Ning ,Chen Zhi ,Shen Cailiang ,et al

(*Dept of Orthopaedics , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022*)

Abstract Neural stem cell (NSCs) were taken from brain tissue of SPF newborn rat and NSCs transfected with virus were prepared. The model of rat spinal cord injury(SCI) was built by modified Allen method. All rats were divided into three groups ,including SCI group , control group and blank group. Afterwards , every rat was going on behavioral score. After three days , rats of SCI group were injected with NSCs through caudal vein. After one week and three weeks , rats of SCI group and control group were perfused with 10% formalin until rats muscles spasmed and rats became stiff. Then , fixed spinal cords from rats were taken from rats and were fixed in formalin paraffin section. NSCs of rats were isolated and cellular pellets were observed suspending in the medium. These cells showed long-term proliferation *in vitro*. Behavioral score of SCI group was higher than that of the control group. What's more , cavity volume in the injury site of spinal cord of SCI group was smaller than that of the control group (0.27 ± 0.09 , 0.57 ± 0.10 respectively) . The transplantation of NSCs could accelerate recovery process of rats and promote recovery of neurological function after spinal cord injury through reducing cavity volume in the injury site of spinal cord and facilitating the growth of blood vessel.

Key words spinal cord injury; transplantation; lentivirus infection; behavioral score