

## 神经干细胞与嗅鞘细胞移植对脊髓全横断大鼠后肢运动功能的影响

杨金伟, 杨慧娟, 殷露玮, 刘 佳, 李力燕, 王廷华  
(昆明医学院神经科学研究所, 云南昆明 650031)

**[摘要]** **目的** 探讨神经干细胞 (NSCs) 与嗅鞘细胞 (OECs) 移植对脊髓全横断大鼠后肢运动功能的影响。 **方法** SD 大鼠行 T<sub>11</sub> 脊髓全横断术后, 随机分为 NSCs 移植组、OECs 移植组、联合移植组和对照组。术后将取自绿色荧光蛋白 (GFP) 转基因胚胎小鼠海马和新生小鼠嗅球的、经培养鉴定后的 NSCs 和 OECs, 以明胶海绵做载体分别或联合移植到各移植组动物脊髓损伤处, 对照组不移植细胞, 用 BBB 评分法评价 1~8 周大鼠后肢运动功能恢复的程度。8 周后移植各组动物行左心室主动脉内 4% 多聚甲醛灌注, 取横断处上下各约 1 mL 脊髓, 连续冰冻切片 (片厚 20 μm), 置于荧光显微镜下观察切片中有无绿色荧光细胞, 确定 NSCs 及 OECs 的存活情况。 **结果** NSCs 及 OECs 细胞在移植脊髓损伤后能存活, 并向周围迁移; 术后 3 和 4 周末, NSCs 组、OECs 组和联合移植组大鼠运动功能均较对照组有明显改善 ( $P < 0.05$ ); 且 3 周时, 联合移植组和 OECs 组比 NSCs 组后肢运动功能变化显著 ( $P < 0.05$ ); 而联合移植组和 OECs 组比较后肢运动功能未见显著差别 ( $P > 0.05$ )。 **结论** NSCs、OECs 和联合移植在早期均可促进脊髓全横断大鼠运动功能恢复; OECs 组、联合移植组效果均优于 NSCs 组; 联合移植对大鼠运动功能恢复在早期没有显现最佳作用。

**[关键词]** 脊髓损伤; 神经干细胞; 嗅鞘细胞; 大鼠

**[中图分类号]** R322.81 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2007) 06-0019-05

## Neural Stem Cells Combined with Olfactory Ensheathing Cells Improve the Recovery of Motor Function in Rats Subjected to Spinal Cord Transected Injury

YANG Jin-wei, YANG Hui-juan, YIN Lu-wei, LIU Jia, LI Li-yan, WANG Ting-hua  
(Institute of Neuroscience, Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the engrafted effect of NSCs combined with OECs on the motor function repair of hindlimbs in rats subjected to spinal cord transected injury. **Methods** The NSCs and OECs were isolated from the Transgenic Green Fluorescent Protein (GFP) embryo mouse' hippocamp and neonatal mouse' olfactory bulb. Rats were divided into NSCs group, OECs group and co-transplantation group as well as control group. The recovery of posterior limb motor function in rats subjected to spinal cord transected injury was evaluated by the BBB locomotion score respectively in each weekend among eight weeks. This was followed by a histochemical observation to know the engrafted cells survival and migration in the spinal cord of host under the fluorescence microscope. **Results** The NSCs and OECs cells survived and migrated in the spinal cord of transplantation groups; the motor functional improvement of hindlimb in rats was seen in all cell transplanted groups; NSCs group, OECs group and co-transplantation

**[作者简介]** 杨金伟 (1980~), 男, 河北张家口市人, 在读硕士, 主要从事发育神经生物学研究工作。

**[通讯作者]** 王廷华. E-mail: tinghua\_neuron@263.net

group demonstrated a significant increase than that of control group at 3 and 4 weeks post operation ( $P < 0.05$ ); The changes of BBB scores in OECs group and co-transplantation group were more obvious than seen in the NSCs group, especially at three weeks ( $P < 0.05$ ); There was no obvious difference between the OECs group and co-transplantation group in observed time points ( $P > 0.05$ ).

**Conclusions** The engrafted NSCs, OECs and co-transplantation can improve partly the motor function recovery of hindlimb in rats at 3 to 4 weeks following cord transection; The OECs group and co-transplantation have better effects than that of NSCs group, but there is no obvious difference between the OECs group and co-transplantation group at observed time point in this investigation.

**[Key words]** Spinal cord injury; Neural stem cells; Olfactory ensheathing cells; Rat

脊髓损伤修复治疗一直未取得突破性进展.近十年来,细胞移植被认为是修复脊髓损伤最有前景的治疗方法之一.以往研究表明,神经干细胞(neural stem cells, NSCs)和嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OECs)均对损伤脊髓有一定作用<sup>[1,2]</sup>,但未见两细胞独立及联合作用的比较.本实验探讨NSCs和OECs及其联合移植对全横断脊髓损伤大鼠后肢运动功能的改善情况,为临床应用细胞移植治疗脊髓损伤提供理论依据.

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物及试剂

选用健康成年SD雌性大鼠(昆明医学院动物科提供)24只,体重(235±15)g;绿色荧光蛋白(GFP)转基因小鼠孕鼠(昆明医学院神经科学研究所提供)2只.DMEM/F12 1:1,胎牛血清,Hank's液(Hyclone);bFGF(Invitrogen);多聚赖氨酸(Sigma),以上试剂由昆明倍捷科技有限公司提供;谷氨酰胺,胰蛋白酶(Amresco);N2(Gibico),以上试剂由晶美生物工程有限公司提供;Nestin单克隆抗体(1:200)、P75单克隆抗体(1:200),北京中杉金桥生物技术有限公司提供;青霉素、链霉素、盐酸阿糖胞苷为医用试剂.

### 1.2 制备神经干细胞和嗅鞘细胞

取孕12~14d GFP转基因胚胎小鼠大脑皮质制成1mm<sup>3</sup>组织块,加入神经干细胞培养基(DMEM/F12 1:1,其中添加1%N<sub>2</sub>,20μg/L bFGF,2mmol/L谷氨酰胺,50000U/L青霉素,50mg/L链霉素);用吸管吹打20~30次,细胞滤网过滤后制成单细胞悬液,调整细胞浓度为2.5×10<sup>8</sup>/L;接种于6孔培养板里,置37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养,隔日半量换液1次.Nestin鉴定培养的是否是神经干细胞.

取孕12~14d GFP转基因新生小鼠嗅球后,0.25%胰蛋白酶于37℃15min;离心除去胰蛋白酶,加入2~3mL全培养基(DMEM-F12 1:1,其中添加10%胎牛血清,2mmol/L谷氨酰胺,50000U/L青霉素,50mg/L链霉素),少许吹打后静置3min以中和胰蛋白酶,再1000r/min离心3~5min,去除全培养基;再次加入全培养基,吸管吹打,细胞滤网过滤后制成单细胞悬液,接种于25cm<sup>2</sup>玻璃培养瓶中,37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养.p75鉴定培养的是否是嗅鞘细胞.

### 1.3 实验动物分组

SD大鼠手术后随机分为4组:NSCs组、OECs组、NSCs-OECs联合移植组和对照组,每组6只.3.6%水合氯醛(1mL/100g)腹腔注射麻醉大鼠,俯卧固定,暴露T<sub>10</sub>~T<sub>12</sub>脊椎节段行椎板切除术,暴露脊髓,T<sub>11</sub>横断.把培养好的神经干细胞和嗅鞘细胞用20mL EP管收集,再用消毒过的1.5mL EP管分装(每只装细胞数约2.00×10<sup>5</sup>个)后,用约2mm<sup>3</sup>大小明胶海绵蘸取细胞,把明胶海绵塞到脊髓横断处.其中NSCs组蘸取NSCs细胞悬液、OECs组蘸取OECs细胞悬液,NSCs-OECs联合移植组蘸取NSCs-OECs(约1.00×10<sup>5</sup>:1.00×10<sup>5</sup>个)细胞混合悬液,缝合切口.对照组只行脊髓横断,不移植细胞.术后腹腔注射青霉素预防感染,每天定时排尿.所有动物均在相同条件下饲养,自由进食.

### 1.4 运动功能评价

参照Basso等<sup>[3]</sup>提出的大鼠SCI(spinal cord injury)后功能评判标准Basso-Beattie-Bresnahan评分法(简称BBB评分法),分别于术后第1周至第8周对各实验动物后肢运动功能进行双盲法评分.

### 1.5 移植后NSCs和OECs存活的观察

动物BBB评分8周后,分别用3.6%水合氯

醛 (1 mL/100 g) 腹腔注射麻醉大鼠, 开胸后经左心室主动脉插管. 先快速灌注生理盐水, 随后用 4% 多聚甲醛灌注、固定动物. 取 T<sub>11</sub> 脊髓横断节段上下各约 1 mL 节段, 放入新鲜固定液内后固定 24 h, 再入 30% 蔗糖溶液, 置 4 °C 下至沉底, 作连续冰冻纵切片, 厚度为 20 μm. 荧光显微镜 350 nm 的紫外光下观察 NSCs 和 OECs 绿色荧光细胞的存活情况.

### 1.6 统计学处理

BBB 评分以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件包对 BBB 评分结果组间各时间段采用 *t* 检验.  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 BBB 评分结果

大鼠经脊髓全横断手术后, 双后肢完全瘫痪, 各组实验大鼠 1 周内均有明显排尿障碍, 排便障碍不明显. 早期 3 周和 4 周, NSCs 组、OECs 组、联合组比对照组大鼠后肢 BBB 运动功能评分高 ( $P < 0.05$ ). 3 周时, 联合组和 OECs 组比 NSCs 组 BBB 评分高 ( $P < 0.05$ ), OECs 组和联合组之间没有显著区别 ( $P > 0.05$ ), 其它时间段比较没有显著区别 ( $P > 0.05$ ), 见表 1, 图 1.

### 2.2 荧光显微镜观察结果

荧光显微镜下可见: 对照组脊髓横断上、下两端均未见荧光细胞; NSCs 移植组、OECs 移植

组和联合移植组脊髓横断上、下两端及瘢痕处均可见绿色荧光细胞, 散在或聚集成片, 可迁移至 T<sub>9</sub>、L<sub>2</sub> 脊髓节段 (图 2A、B、C)

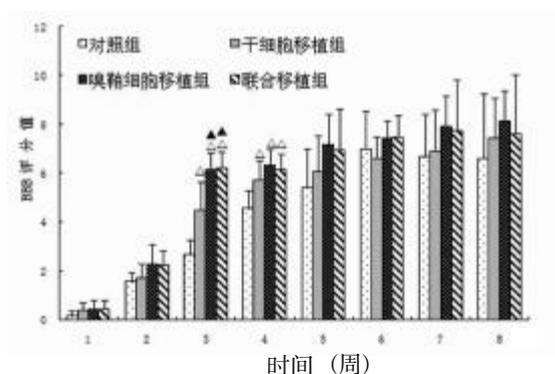


图 1 NSCs 移植、OECs 移植和联合移植对脊髓全横断大鼠运动功能恢复的影响

Fig.1 The effect of NSCs transplantation, OECs transplantation and co-transplantation on the recovery of motor function in rats subjected to spinal cord transected injury

## 3 讨论

近年来, 随着对脊髓损伤 SCI 病理生理及修复相关因素认识的深入, 以及细胞生物学、分子生物学技术的飞速发展, 对脊髓损伤的修复治疗有了新的认识. 目前的治疗方法主要有: ①改善

表 1 脊髓全横断术后各时间点各组动物后肢运动功能 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Motor function of hindlimb in each time point ( $\bar{x} \pm s$ )

时间	对照组	神经干细胞组	嗅鞘细胞组	联合组
1 周	0.1667 ± 0.1826	0.3889 ± 0.3278	0.4445 ± 0.3443	0.4444 ± 0.3443
2 周	1.5556 ± 0.4037	1.7222 ± 0.5741	2.2778 ± 0.8278	2.2222 ± 0.5837
3 周	2.6667 ± 0.5963	4.5000 ± 1.1499 <sup>△</sup>	6.1667 ± 0.6912 <sup>△▲</sup>	6.2222 ± 0.6554 <sup>△▲</sup>
4 周	4.5556 ± 0.7201	5.7222 ± 0.8005 <sup>△</sup>	6.3333 ± 0.6324 <sup>△</sup>	6.1667 ± 0.6236 <sup>△</sup>
5 周	5.3889 ± 1.6251	6.0556 ± 1.4669	7.1667 ± 1.2605	6.9444 ± 1.6920
6 周	7.0000 ± 1.5492	6.6111 ± 0.9047	7.4444 ± 0.7201	7.5000 ± 0.8628
7 周	6.6667 ± 1.7512	6.9167 ± 1.6857	7.9000 ± 1.2806	7.7500 ± 2.0676
8 周	6.6111 ± 2.6451	7.4444 ± 1.6285	8.1333 ± 1.2401	7.6111 ± 2.4533

与对照组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与 NSCs 组比较, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ ;  $n = 6$ .

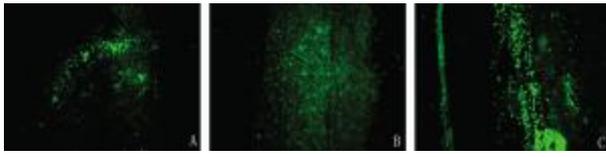


图 2 各移植组脊髓损伤区 8 周时倒置相差显微镜观察  
Fig.2 The injured spinal cord of each groups after eight weeks

A: NSCs 移植组; B: OECs 移植组; C: 联合移植组

损伤轴突的功能;④细胞移植、基因治疗。其中细胞移植和基因治疗被认为是种最有前途的方法<sup>[4]</sup>。用于移植治疗的细胞主要有神经干细胞、嗅鞘细胞、骨髓基质干细胞、造血干细胞、胚胎干细胞、雪旺细胞和巨噬细胞等<sup>[5]</sup>。研究发现,神经干细胞和嗅鞘细胞是最有希望和前景的用于移植治疗脊髓损伤的干细胞和成体细胞<sup>[6]</sup>。

Reynolds<sup>[7]</sup>等于 1992 年提出了 NSCs 的概念,现认为 NSCs 是一类具有多向分化潜能,可分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞能力的细胞,且可分泌多种神经营养因子,易于被多基因修饰和干细胞样属性<sup>[8]</sup>。本实验中,3 周和 4 周 NSCs 组 BBB 评分比对照组明显增高( $P < 0.05$ ),说明 NSCs 移植对大鼠后肢运动功能有明显改善。这可能与移植的神经干细胞替代了坏死的神经细胞<sup>[9]</sup>,分化成神经元、星形胶质细胞或少突胶质细胞,填充了因损伤造成的空洞有关<sup>[10]</sup>。此外,分化出来的神经元和损伤脊髓形成广泛的神经纤维联系和突触连接亦可能是损伤脊髓功能改善的原因之一<sup>[11]</sup>。

Golgi 等首次描述了嗅鞘细胞 OECs 的存在,证明在嗅球内, OECs 是唯一接触和包被嗅神经轴突的胶质细胞,以防止嗅神经轴突与 CNS 其他细胞接触<sup>[12]</sup>。本研究发现,3 周和 4 周 OECs 组 BBB 评分比对照组明显增高( $P < 0.05$ ),说明 OEC 移植对大鼠后肢运动功能亦有明显改善。这可能是因为移植的 OECs 分泌了多种细胞粘附分子和细胞外基质,为神经轴突生长提供了适宜的微环境,并促进了被切断的轴突再生后与神经元重建建立联系<sup>[13]</sup>。OECs 还可以抑制一些阻碍髓鞘再生的因子,并分泌 NGF、BDNF、NT-4/5、GDNF<sup>[14]</sup>等神经营养因子促进髓鞘的再生。另外,移植入的

OECs 可能包绕住受损的神经突轴,防止了不利的微环境对轴突再生的影响。研究发现,猪的 OEC 移植到非洲绿猴的 SCI 部位进行首次灵长类 SCI 治疗获得成功<sup>[15]</sup>。因此, OECs 对损伤脊髓的修复作用是肯定的。

本实验发现,联合移植在早期(3、4 周) BBB 评分比对照组显著增高( $P < 0.05$ ),说明把 NSCs 和 OECs 联合移植仍然可以对受损伤脊髓产生修复作用。然而在术后 3 周和 4 周末, NSCs 组和 OECs 组对大鼠运动功能恢复也有修复作用,且联合移植组和 OECs 组比较 BBB 评分未见显著差别,说明 NSCs 或 OECs 的联合应用对损伤脊髓的功能改善相当有限,当修复发挥到一定程度后就不能再有明显的作用。从理论上, OECs 可促进 NSCs 存活、分化、成熟和增殖<sup>[16]</sup>;据此推理,移植后, NSCs 在 OECs 的促进下,会更好发挥作用,再加上 OECs 本身也可以促进神经元的再生,联合移植组的效果应该好于 OECs 组。Ao 等也提出了类似假设<sup>[17]</sup>。但本研究中,联合移植组 BBB 评分只在 3 周比 NSCs 组高( $P < 0.05$ ),其可能的原因是: NSCs 移植到损伤脊髓后,多数分化为星形胶质细胞,在某种程度上限制了 NSCs 治疗 SCI 的作用;而联合组和 OECs 组之间 BBB 评分无显著差异,可能是 NSCs 和 OECs 共同竞争靶细胞,而靶细胞的数量有限,这样就会使部分 NSCs 或 OECs 失去作用,从而表现为和 OECs 移植组 BBB 评分无明显的差异( $P > 0.05$ )。各组的 BBB 评分在 3~4 周均有一个大幅度的增高( $P < 0.05$ ),推测可能 3~4 周<sup>[18]</sup>是一个有利于神经损伤修复的关键时期。此外,本实验还观察到 OECs 组比 NSCs 组 BBB 评分高,说明 3~4 周时 OECs 对损伤脊髓运动功能的修复作用优于 NSCs 组。进而提示 NSCs 移植虽对损伤脊髓有一定作用,但不是最好的策略。

本研究从 SCI 后大鼠运动功能指标评价了神经干细胞和嗅鞘细胞在促进脊髓损伤修复过程中单用与联用的效果,研究结果对应用这些细胞治疗脊髓损伤有一定参考价值。至于其各自或相互的作用机制仍待进一步研究。

## [参考文献]

- [1] CUMMINGS B J, UCHIDA N, TAMAKI S J. Human neural stem cell differentiation following transplantation into spinal cord injured mice: association with recovery of locomotor function [J]. *Neurol Res*, 2006, 28 (5): 474-481
- [2] BOYD J G, SKIHAR V, KAWAJA M. Olfactory ensheathing cells: historical perspective and therapeutic potential [J]. *Anat Rec B New Anat*, 2003, 271 (1): 49-60
- [3] BASSO D M, BEATTIE M S, BRESNAHAN J C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. *J Neurotrauma*, 1995, 12 (1): 1-21
- [4] 郑启新, 吴永超. 脊髓损伤的细胞移植和基因治疗研究现状与展望 [J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22 (2): 136-138
- [5] 梅晰凡, 范广宇. 细胞移植治疗脊髓损伤 [J]. *中国临床康复*, 2003, 7 (32): 4384-4385
- [6] 尹国栋, 汤逊, 林月秋, 等. 人胚胎嗅鞘细胞与神经干细胞联合移植修复大鼠脊髓全横断损伤的研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2006, 21 (8): 680-682
- [7] REYNOLDS B A, WEISS S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system [J]. *Science*, 1992, 255 (5052): 1707-1710
- [8] GALLI R, GRITTI A, BONFANTI L, et al. Neural stem cells: an overview [J]. *Circ Res*, 2003, 92 (6): 598-608
- [9] PARKK I, LIUS, FLAX J D. Transplantation of neural progenitor and stem cells: developmental insights may suggest new therapies for spinal cord and other CNS dysfunction [J]. *J Neurotrauma*, 1999, 16 (8): 675-687
- [10] LUNDBER G C, MARTINEZ-SERRANO A, CATANELO E, et al. Survival, integration and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum [J]. *Exp Neurol*, 1997, 145 (2): 342-360
- [11] OKANO H. Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application [J]. *Keio J Med*, 2002, 51 (8): 115-128
- [12] 马政文, 陆佩华, 徐晓明. 嗅神经鞘细胞及其在脊髓损伤中的应用前景 [J]. *中华创伤杂志*, 2004, 20 (10): 638-640
- [13] NAVARRO X, VALERO A, GUDINO G, et al. Ensheathing glia transplants promote dorsal root regeneration and spinal reflex restitution after multiple lumbar rhizotomy [J]. *Ann Neurol*, 1999, 45 (2): 207-215
- [14] BORUCH A V, CONNERS J J, PIPITONE M, et al. Neurotrophic and migratory properties of an olfactory ensheathing cell line [J]. *Glia*, 2001, 33 (3): 225-229
- [15] RADTKE C, AKIYAMA Y, BROKAW J, et al. Remyelination of the nonhuman primate spinal cord by transplantation of H-transferase transgenic adult pig olfactory ensheathing cells [J]. *FAS EBJ*, 2004, 18 (8): 335-337
- [16] 唐洲平, 王萍, 康慧聪, 等. 嗅鞘细胞对神经干细胞增殖分化的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22 (9): 1123-1124
- [17] AO Q, WANG A J, CHEN G Q. Combined transplantation of neural stem cells and olfactory ensheathing cells for the repair of spinal cord injuries [J]. *Med Hypotheses*, 2007, 69 (6): 1234-1237
- [18] 马希峰, 杨波, 任新民, 等. 神经干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤 [J]. *郑州大学学报*, 2003, 38 (2): 21-23

(2007-08-10 收稿)