· 专题 ·

胚胎脊髓移植联合应用 bFGF 对脊髓神经组织损伤的早期保护作用

郭风劲　李新志　许涛　陈安民

[摘要]　目的　探讨脊髓损伤后,联合应用胚胎脊髓(FSC)移植和外源性碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对损伤脊髓组织早期 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的影响。方法　利用 Wistar 大鼠建立脊髓损伤模型;造模后,A 组经蛛网膜下腔导管注入 5 ml FSC 细胞悬液;B 组注入 20 μl bFGF 与 FSC 细胞悬液;C 组(对照组)不做处理。术后 6 h、24 h 取 A 组、B 组和 C 组动物损伤区脊髓组织测定水和 Ca^{2+}、Mg^{2+} 含量;术后 5 d 取损伤脊髓组织电镜下观察结构变化。结果　C 组损伤区脊髓组织水含量增多,Ca^{2+} 水平升高,Mg^{2+} 水平下降,白质内髓鞘结构紊乱,囊性变严重;A 组和 B 组上述变化均较 C 组改善。结论　脊髓损伤后应用 FSC 移植和 bFGF 可减轻离子失衡,从而对继发性损害有抑制作用。

[关键词]　胚胎脊髓细胞;碱性成纤维细胞生长因子;脊髓损伤

Early protective effects of transplantation of fetal spinal cord and bFGF on spinal cord injury in adult rats

GUO Feng-jin, LI Xin-zhi, XU Tao, et al. The Department of Orthopaedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China

[Abstract]　**Objective**　To explore the early effects of transplantation of fetal spinal cord (FSC) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on calcium, magnesium of injured spinal cord. **Methods**　The spinal cord injury (SCI) animal model was established with Wistar rats. The rats were divided into 3 groups. The group A was received FSC cells suspension 5 ml after injury. The group B was received FSC cells suspension and bFGF 20 μl. The group C was not treated with any therapy. The values of Ca^{2+}, Mg^{2+} of injured spinal cord tissues were measured at 6, 24 hours after injury. The morphyological results were observed by electron microscope on the fifth day. **Results**　The degree of ionic disorder in FSC + bFGF treated rats was strikingly ameliorated and the contents of H_2O also decreased. The morphyological finding revealed that in FSC + bFGF treated rats, the damage of gray and white matters was slight in contrast to those of control group rats, which appeared a typically damage. **Conclusion**　Transplantation of FSC and bFGF has some protective effects on contused spinal cord in rats.

[Key words]　fetal spinal cord cell; basic fibroblast growth factor; spinal cord injury

中图分类号:　文献标识码:A　文章编号:1006-9771(2005)12-0968-03

[本文著录格式]　郭风劲,李新志,许涛,等.胚胎脊髓移植联合应用 bFGF 对脊髓神经组织损伤的早期保护作用[J].中国康复理论与实践,2005,11(12):968—970.

在脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)病理机制中,迄今已知的所有病理现象和继发性损伤中所有的病理因素(如脊髓血流量下降、花生四烯酸代谢、氧自由基反应和兴奋性氨基酸的毒性作用等)均可能与损伤区离子失衡,特别是细胞内 Ca^{2+} 超载有密切关系。细胞内 Ca^{2+} 超载已被认为是神经细胞死亡的共同途径[1]。SCI 的治疗,一是对抗继发性损害;二是既保护受伤神经元,也保护未受伤神经元,并促进神经再生。自 20 世纪 80 年代中期以来,国内外对胚胎脊髓(fetal spinal cord,FSC)移植治疗 SCI 进行了大量的实验研究,证明 FSC 可以在宿主体内存活、发育、生长、分化并形成神经连接促进功能恢复。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)是一种能广泛促进来源于中胚层及神经细胞层细胞增殖的生物活性物质,是一种多肽生长因子。为此,本实验选用较接近人类 SCI 的模型—Allen 氏 WD 法 SCI 模型[2],通过损伤区脊髓组织中水、Ca^{2+}、Mg^{2+} 含量测定以及电镜观察,探讨 FSC 和 bFGF 对 SCI 的早期保护作用。

1　材料与方法

作者单位:430030 湖北武汉市,华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科。作者简介:郭风劲(1966-),男,湖北武汉市人,博士,副教授,硕士研究生导师,主要研究方向:脊柱脊髓疾患。

1.1　实验动物及分组　健康 Wistar 大白鼠 42 只,雌雄不限,体重 220~280 g,随机分成 4 组:A 组 12 只、B 组 12 只、C 组(对照组)12 只和 D 组(正常组)6 只。

1.2　FSC 的取材与制备　选健康的壮年雄鼠 2 只、雌鼠 4 只,同笼过夜,次晨做雌鼠阴道涂片镜下观察,直至发现鼠精子者确定为孕鼠并记为 0 d。将正常妊娠 14 d 的 Wistar 大鼠麻醉后,无菌条件下剖腹取胎,用显微手术器械分离 FSC 组织,用 DMEM 培养液冲洗,除去血迹,并剪成约 1×1×1 mm 大小的组织块,放入含 20%同种鼠灭活血清、10%二甲基亚砜(dimethy sulfoxide,DMSO)的 DMEM 细胞培养液中,封口后放入 4℃冰箱平衡 1 h,依次置-20℃冰箱 30 min,-30℃冰箱 10 min 及-70℃冰箱 1 h,最后放入液氮中保存。FSC 组织保存 10~15 d 后取出,于 37℃恒温水浴槽中快速复温,完全融化后放入离心管,3000 r/min 离心 3 min,弃去上清液,再加入等量 DMEM 培养液,混匀,静置 3 min,反复冲洗 3 次,使 DMSO 及血清成分尽量洗净。吸管反复吹打,过 200 目细胞滤网,制成约 0.5 ml 细胞悬液备用。

1.3　动物模型建立　动物经 0.3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉后,俯卧位固定在手术台上,备皮,常规碘酒、酒精消毒,铺无菌巾,以 T_8 节脊髓为中心,纵行切开背部皮肤及皮下组织,剥离棘突旁肌肉,切除

T_8 棘突及椎板,暴露硬膜。显露直径约 3.0 mm 圆形区作为 SCI 区。采用 Allens WD 法,以 10 g×2.5 cm 致伤力损伤脊髓。大鼠出现摆尾反射,双下肢及躯体回缩扑动,双下肢瘫痪,表明撞击成功。成功后,A 组和 B 组经蛛网膜下腔置入细导管约 3.0 mm 深,A 组注入 5 ml FSC 细胞悬液;B 组注入 20 μl bFGF(珠海东大生物制药有限公司生产)和 5 ml FSC 细胞悬液;C 组不做处理。逐层缝合伤口。术后每 8 h 挤尿 1 次。

1.4 检测项目

1.4.1 脊髓组织中水及 Ca^{2+}、Mg^{2+} 含量测定 A 组、B 组和 C 组分别于术后 6 h、24 h 各取 4 只大鼠断头处死,显露 SCI 区,取以损伤区为中心的 4 mm 长脊髓节段测定水、Ca^{2+}、Mg^{2+} 含量;另取正常组 6 只大白鼠脊髓节段 4 mm,作为正常对照。

脊髓组织水含量测定:采用干湿法,用滤纸吸去脊髓组织表面液体,剪除硬脊膜,将组织置于称样杯中,用电子天平(分度值 0.1 mg)称湿重(W),然后放入恒温烤箱中,在 110 ℃下烘烤 24 h,取出样本测干重(D),按下述公式计算脊髓含水量:脊髓水含量(%) = (W－D)/W×100。

脊髓组织 Ca^{2+}、Mg^{2+} 含量(μmol/g)采用原子吸收光谱法测定。

1.4.2 电镜观察 术后第 5 天,A 组、B 组和 C 组各取 4 只大鼠麻醉后打开胸腔,暴露心脏,主动脉插管,切开右心房,由主动脉缓慢注入生理盐水,待右心房溢出液体无色透明后,改用 10%中性缓冲福尔马林溶液灌注。当右心房溢出刺激性气味液体,2 min 后停止灌注。从原入路暴露 T_8 水平脊髓,并切除 T_4 ~ T_{10} 段脊柱,取出脊髓,标记损伤中心,放入 10%福尔马林溶液固定。4%多聚甲醛灌注固定,取 SCI 区标本 1 mm,经 2.5%戊二醛固定,Epon 包埋,制作超薄切片,在透射电镜下观察。

1.5 统计学处理 所得数据以($\bar{x}\pm s$)表示,应用 SPSS 11.0 软件对同一时间点的组间差异进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 脊髓组织水、Ca^{2+}、Mg^{2+} 含量 正常脊髓组织中(D 组大鼠),水含量(59.42 ±2.43)%,Ca^{2+} 含量(10.82 ±0.71)μmol/g,Mg^{2+} 含量(11.00 ±1.34)μmol/g。SCI 模型鼠(A 组、B 组和 C 组)损伤区脊髓组织水及 Ca^{2+} 含量较正常组(D 组)明显升高,而 Mg^{2+} 含量明显降低,应用磁刺激和 bFGF 后上述变化明显改善($P<0.01$),见表 1、表 2。

2.2 透射电镜观察 造模后 5 d,C 组见脊髓白质内髓鞘结构紊乱,囊性变严重(见图 1);而 A 组、B 组神经组髓鞘结构较完整,囊性变较轻(见图 2、图 3)。

表 1 脊髓损伤区组织水含量(%,$\bar{x}\pm s$)

伤后时间	A 组	B 组	C 组
6 h	67.48[a]	66.29 ±0.86[a]	72.85 ±2.03
24 h	66.15[a]	64.80 ±0.62[a]	70.48 ±1.90

注:a:与 C 组同时间段比较,$P<0.01$。

表 2 脊髓损伤区组织 Ca^{2+}、Mg^{2+} 含量(μmol/g,$\bar{x}\pm s$)

伤后时间		A 组	B 组	C 组
6 h	Ca^{2+}	16.18 ±0.85[a]	15.20 ±1.28[a]	19.21 ±0.23
	Mg^{2+}	8.21 ±0.64[b]	9.18 ±0.32[b]	6.69 ±0.50
24 h	Ca^{2+}	13.86 ±1.12[b]	12.70 ±0.46[b]	16.58 ±1.30
	Mg^{2+}	8.54 ±0.95[a]	9.37 ±0.53[a]	6.90 ±1.20

注:a:与 C 组同时间段比较,$P<0.01$;b:与 C 组同时间段比较,$P<0.01$。

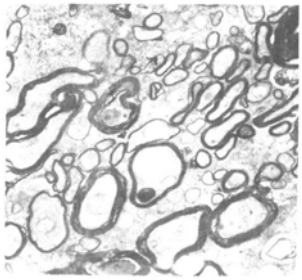


图 2 囊性变严重,A 组脊髓白质髓鞘结构较完整,囊性变较轻,B 组脊髓白质髓鞘结构较完整,囊性变轻,坏死物质较少(×3150)。

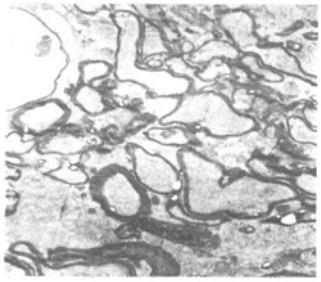
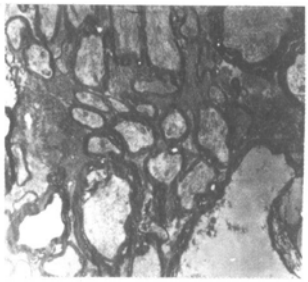


图 3 囊性变轻,坏死物质较少(×3150)。



3 讨论

3.1 SCI 区水、Ca^{2+}、Mg^{2+} 含量变化的机制与意义 大量研究表明,在神经系统损伤及退行性疾病过程中,可见凋亡发生,即死亡的神经元出现凋亡小体,核固缩,DNA 降解[3]。Ca^{2+} 是维持细胞生理功能的重要阳离子,作为细胞内第二信使,直接调控神经细胞信息的传递及递质的合成与释放。在病理条件下,Ca^{2+} 参与

细胞的损伤过程,胞内 Ca^{2+} 浓度升高是一切细胞死亡的必由之路[1,4]。正常生理情况下,神经细胞胞内 Ca^{2+} 浓度明显低于胞外。SCI 可直接导致细胞膜对 Ca^{2+} 的通透性明显增加,并导致 Ca^{2+} 清除功能障碍,使 Ca^{2+} 大量内流并在胞内聚集,造成伤段脊髓细胞内 Ca^{2+} 显著增加,细胞外 Ca^{2+} 明显下降的结果。Ca^{2+} 生理活性紊乱是 SCI 继发病理改变的始动因素之一,其机理在于[5]:①激活多种蛋白酶及磷脂酶 A_2,并产生大量病理性自由基,细胞内发生脂质过氧化反应,细胞器及膜结构广泛受损;②Ca^{2+} 参与微血栓形成,并收缩微血管导致局部微循环障碍;③大量 Ca^{2+} 内流沉积于线粒体,影响细胞代谢;④增加胞膜对其他离子的通透性,使细胞内 Na^{+} 聚集,引起细胞水肿。

Mg^{2+} 在 SCI 后继发性损害中起着非常重要的作用。由于 Mg^{2+} 参与 300 多种酶的生化过程,Mg^{2+} 不足或丢失将对神经组织产生严重的影响。Mg^{2+} 是 Ca^{2+} 的天然拮抗剂,Mg^{2+} 可拮抗兴奋性氨基酸的神经毒性作用,适当补充镁可减轻 NMDA 受体介导的 Ca^{2+} 内流并拮抗电压依赖性钙通道[6]。

3.2　FSC 细胞悬液的移植与 SCI 修复的关系　在过去的 20 多年里,胚胎中枢神经组织移植已取得一定的进展,成为一个有效的实验工具。在急性 SCI(≤24 h) 的研究中,实验证实胚胎中枢神经组织移植物能够在宿主体内存活和广泛分化[7]。移植物可以改变 SCI 区域的氧分压,减轻新陈代谢失调引起的病理变化。通过长传导束和节段间系统等在宿主和移植物间形成轴突投射,移植物神经细胞发出轴突到宿主脊髓,后者也投射纤维到移植区域[8]。有些研究还显示,大鼠 FSC 移植可以影响节段的功能和运动。在慢性损伤的研究中,同样观察到宿主移植物的联系方式,并且发现 FSC 移植物能减少神经胶质细胞的增生,甚至逆转神经胶质瘢痕的形成[9]。

3.3　bFGF 对 SCI 的早期作用　bFGF 是一种能广泛促进来源于中胚层及神经外胚层的细胞增殖的生物活性物质,是一种多肽生长因子,参与体内多种细胞的创伤保护和修复。近年来的研究表明,bFGF 不仅参与神经组织的修复,减少神经元的死亡和促进神经元的存活,并能诱导轴突向外生长,而且对损伤的神经细胞具有保护作用,包括改善微循环、抑制脂质过氧化、减少细胞外 Ca^{2+} 内流、抑制兴奋性氨基酸的毒性作用等[10,11]。SCI 后,大鼠脊髓灰质和白质中的星形胶质细胞、少突胶质细胞和神经元都出现了凋亡[12]。应用外源性 bFGF 研究显示,通过鞘内注射 bFGF 能显著减轻 SCI 后的组织损害,不仅可以减轻脊髓水肿,改善局部内环境,而且能够保护神经细胞,并通过调节神经元的应答创造一个有利于神经再生的环境[13]。

在本实验中,通过给予外源性 bFGF,并利用 FSC 组织创造一个减轻继发性损害、有利于修复的微环境,阻止或减轻脊髓细胞凋亡,并通过两者的协同作用促进神经的生长和修复。

[参考文献]

[1] McConkey DJ, Orrenius S. The role of calcium in the regulation of apoptosis[J]. J Leukoc Biol, 1996, 59(6): 775—783.

[2] Das GD, Wallace KB. Neural transplantation in the spinal cord under different conditions of lesions and their functional significance[A]. In: Das GD, Wallance RB. eds. Neural Transplantation and Regeneration[C]. New York: Springet-Verlag, 1986.1.

[3] Nakashima K, Yamashita K, Uesugi SJ, et al. Temporal and spatial profile of apoptotic cell death in transient intracerebral mass lesion of the rat[J]. J Neurotrauma, 1999, 16(2): 143—151.

[4] Yang Y, Piao Y. Effects of resveratrol on Ca^{2+}, Mg^{2+}-ATPase activities after spinal cord trauma in rats[J]. Zhong Yao Cai, 2002, 25(12): 882—885.

[5] Young W. Role of calcium in central nervous system injuries[J]. J Neurotrauma, 1992, 9(1): 9—25.

[6] Tsuda T, Kogure K, Nishioka K, et al. Mg^{2+} administered up to twenty-four hours following reperfusion prevents ischemic damage of the CA, neurons in the rat hippocampus[J]. Neurosci, 1991, 44: 359.

[7] McDonald JW, Howard MJ. Repairing the damaged spinal cord: a summary of our early success with embryonic stem cell transplantation and remyelination[J]. Prog Brain Res, 2002, 137: 299—309.

[8] Trok K, Palmer MR, Freund RK, et al. Functional interactions between spinal cord grafts suggest asymmetries dictated by graft maturity[J]. Exp Neurol, 1997, 145: 268—277.

[9] Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, et al. Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats[J]. J Neurosci Res, 2002, 69(6): 925—933.

[10] Lynch K, Fernandez G, Pappalardo A, et al. Basic fibroblast growth factor inhibits apoptosis of spontaneously immortalized granulose cells by regulating intracellular free calcium levels through a protein kinase C delta dependent pathway[J]. Endocrinology, 2000, 141(11): 4209—4217.

[11] Ay I, Sugimori H, Finklestein SP. Intravenous basic fibroblast growth factor (bFGF) decreases DNA fragmentation and prevents down regulation of Bcl-2 expression in the ischemic brain following middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2001, 87(1): 71—80.

[12] 刘文革,林桂俊,王锋,等. bFGF 对大鼠脊髓损伤后神经细胞凋亡的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(6): 406.

[13] Kojima A, Tator CH. Intrathecal administration of epidermal growth factor and fibroblast growth factor 2 promotes ependymal proliferation and functional recovery after spinal cord injury in adult rats[J]. J Neurotrauma, 2002, 19(2): 223—238.

(收稿日期:2005-07-01)