

高压氧对大鼠脊髓损伤后内源性神经干细胞的诱导作用

刘海,王忠诚,安沂华,崔勇,晋强

[摘要] 目的 探讨高压氧对脊髓损伤后内源性神经干细胞的诱导修复。方法 脊髓半横断后高压氧治疗,进行行为学评分、电镜及免疫组化检查。结果 内源性神经干细胞治疗后较对照组增多。结论 高压氧使实验动物内源性神经干细胞增殖、分化加强,脊髓损伤后的功能得到改善。

[关键词] 脊髓损伤;高压氧;内源性神经干细胞;大鼠

Induction of Endogenous Neural Stem Cells with Hyperbaric Oxygen after Half Cut-off of Spinal Cord in Rats LIU Hai, WANG Zhong-cheng, AN Yi-hua, et al. Beijing Institute of Neurosurgery, Beijing 100050, China

[Abstract] Objective To investigate the effect of hyperbaric oxygen (HBO) on proliferation and differentiation of endogenous neural stem cells after acute spinal cord half cut-off in rats. Methods The differences of proliferation and differentiation of endogenous neural stem cells between injured group and intervention group were compared. Results There were remarkable differences between injured group and intervention group. Conclusion HBO can promote the proliferation and differentiation of the neural stem cells in rats after spine cord injury.

[Key words] spinal cord injuries; hyperbaric oxygen; endogenous neural stem cells; rats

中图分类号:R651.2 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2006)05-0369-03

[本文著录格式] 刘海,王忠诚,安沂华,等.高压氧对大鼠脊髓损伤后内源性神经干细胞的诱导作用[J].中国康复理论与实践,2006,12(5):369-371.

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种严重损伤,常带来各种严重的伤残,甚至造成死亡。高压氧治疗(hyperbaric oxygen, HBO)是神经康复最常用而有效的治疗^[1]。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)治疗脑、脊髓等中枢神经疾病是当今神经科学研究的一个热点,而内源性干细胞作为其中一种方法亦被广泛关注^[2]。当中枢神经系统(CNS)受到损伤或出现某些病理性变化,如脑缺血、损伤等的情况下,静息的神经干细胞会被激发,大量增殖,并向病变部位迁移,发生分化,以修复损伤的神经系统。早在1999年,瑞典的Johansson等已经证实,成年哺乳动物脊髓中央管周围的室管膜细胞就是NSC,在脊髓损伤后能通过不对称分裂增殖,并向损伤区移行进行损伤修复^[3];但多数情况下分化为胶质细胞参与瘢痕形成。因此,重建损伤局部微环境,诱导NSC向神经元方向转化,成为脊髓修复的一项重要内容^[4]。本实验分别以BrdU和nestin作为神经干细胞的增生标记物,胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)作为神经干细胞分化的标记物,探讨脊髓损伤后在HBO干预下,是否有利于体内干细胞增殖、分化及修复脊髓功能。

1 材料和方法

作者单位:北京市神经外科研究所,北京市100050。作者简介:刘海(1971-),男,四川成都市人,博士,主要研究方向:神经外科。通讯作者:王忠诚。

1.1 动物模型的制备及分组 成年SD雄性大鼠,体重300~350g,由首都医科大学动物部提供,清洁级动物,符合国家实验用动物标准。将麻醉后的大鼠行T₉₋₁₀椎板切除术,沿脊髓后动脉右侧切入,并适度旋转以搅毁局部脊髓,从而在半切脊髓的基础上又造成直径约1mm深达脊髓腹侧硬脊膜的盲洞损伤^[3]。伤后模型以动物清醒后出现双后肢痛觉过敏,右后肢运动不能,拖于身后,左后肢活动减弱为成功指标。46只大鼠被随机分为3个组:①A组:假手术组,6只,仅咬除椎板,不损伤脊髓;②B组:损伤组,20只;③C组:损伤后高压氧组,20只。

1.2 高压氧治疗 C组实验动物置入02-10型钢制实验动物高压舱内,纯氧加压致0.02MPa(表压)洗舱10min后,在15min内匀速加压至2.5ATA(0.15MPa),稳压90min,中间用氧通风5min,舱内氧浓度为(96.5±2.0)%,温度20℃~25℃,相对湿度60%~80%。治疗完毕用15min匀速减压出舱。2次/d,术后3h即开始,分别治疗1~2周。

1.3 组织病理学及免疫组织化学 伤后分别于1、2周处死实验动物。分别以T₉₋₁₀为中心,取上下各1mm组织,形成厚为2~3mm的组织块,经脱水、浸蜡、包埋、切片(厚5μm)、摊片、烤片及脱蜡后进行免疫组化染色。用ABC法测定BrdU(小鼠抗单克隆抗体1:300, Sigma公司)、GFAP(兔抗单克隆抗体1:300, Chemicon公司)、nestin(兔抗单克隆抗体1:

300, Beckton Dickinson 公司)、NSE(兔抗多克隆抗体 1:200, Biogenex 公司)在脊髓组织中的表达。碱性磷酸酶 AEC(红色)单染试剂盒为过氧化物酶标记的链霉卵白素染色试剂盒(SABC);双染试剂盒为碱性磷酸酶标记的链霉卵白素和过氧化物酶标记的链霉卵白素染色试剂盒(SABC-DS, SABC-AP 用 BCIP/NBT 显色,呈紫蓝色;SABC-POD 用 AEC 显色,呈红色):北京中山生物技术有限公司。

1.4 电镜观测 A、B、C 组于术后 1、2 周每组随机取 1 例 T₉₋₁₀ 损伤局部脊髓组织,电镜包埋,切片观察锥体细胞核的形态,胞浆内线粒体、内质网等细胞器的变化及髓鞘、线粒体的改变。

1.5 图像采集及统计学分析 采用相差倒置显微镜及全自动照相装置(TE2000-U 型:Nikon)和数字信号采集分析系统(AXIOV-MRC 型:ZEISS)对组织切片进行图像分析,以细胞内棕黄色或/和红色颗粒者为阳性。分析项目包括在 10×40 倍显微镜下对阳性细胞进行细胞计数和半定量分析。各组数据以($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 10.0 软件包进行方差分析和组间比较。

1.6 运动功能评估 对大鼠后肢运动功能的恢复情况使用 Basso 改良法评价(the Basso, Beattie, Bresnahan locomotor rating scale, BBB),隔日 1 次。双人独立观察记录,取均值。

2 结果

2.1 运动功能 B 组动物死亡 3 只,C 组死亡 2 只。A 组动物术前术后评分基本一致,B 组动物术后第 1 日都呈右下肢拖于身后,不能活动,评分为 0 分。C 组术后 1 d 时 BBB 评分低至 0~1 分,随后逐渐上升,1~2 周内不同幅度的恢复。见表 1。

表 1 各组的 BBB 评分

损伤时间	A 组	B 组	C 组
伤后 1 d	21 ± 0.00	0	0
伤后 7 d	21 ± 0.00	3.2 ± 0.32	7.7 ± 0.67 ^a
伤后 14 d	21 ± 0.00	5.6 ± 0.45	8.2 ± 0.50 ^a

注:a:与 B 组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 电镜检测 电镜结果显示,正常神经元细胞结构清晰完整,核膜完整,核染色质颗粒细致,分布均匀。损伤后坏死的细胞结构模糊,细胞核溶解,细胞器肿胀,核膜和胞膜崩解,髓鞘板层结构消失。C 组可见新生髓鞘明显增多。

2.3 免疫组化 A 组脊髓组织中,仅有少量的 nestin 阳性细胞及 BrdU 阳性细胞(即新生细胞),排列稀疏。脊髓损伤大鼠模型后 nestin 阳性细胞数迅速上升,7 d、14 d 检测持续有阳性细胞存在,C 组与 B 组有非常显著性差异($P < 0.01$)。见表 2。B、C 组 BrdU 阳性细胞数较 A 组增多,7 d 后达到高峰;C 组与 B 组相比,有非常显著性差异($P < 0.01$),半定量分析, BrdU

阳性细胞 C 组较 A 组增多大约 10 倍,较损伤组亦增多 2 倍。14 d 时统计学分析及半定量分析与 7 d 时相似。见表 3。

表 2 各组 nestin 阳性细胞数的变化(/视野)

组别	7 d	14 d
A 组	18.3 ± 4.5	17.5 ± 3.0
B 组	32.2 ± 5.5	31.6 ± 4.8
C 组	87.3 ± 4.6 ^a	65.2 ± 3.8 ^a

注:a:与 B 组比较, $P < 0.01$ 。

表 3 各组 BrdU 阳性细胞数的变化(/视野)

组别	7 d	14 d
A 组	3.5 ± 1.04	3.0 ± 0.70
B 组	15.3 ± 1.82 ^a	15.4 ± 4.03 ^a
C 组	31.5 ± 7.39 ^{a, b}	35.6 ± 6.26 ^{a, b}

注:a:与 A 组比较, $P < 0.01$; b:与 B 组比较, $P < 0.01$ 。

脊髓损伤后,组织内的 GFAP 阳性细胞的形态发生改变,胞体变大,胞浆丰富,突起增多延长,免疫组化染色增强。A 组 7 d 时偶见 GFAP/ BrdU 双阳性细胞,B 组及 C 组 7 d 出现 GFAP/ BrdU 双阳性细胞,C 组 14 d 时 GFAP/ BrdU 双阳性细胞明显增多,与 A 组和 B 组相比均有非常显著性差异($P < 0.01$)。见表 4。

表 4 各组织 GFAP/ BrdU 阳性细胞数量的变化(/视野)

组别	7 d	14 d
A 组	0.33 ± 0.51	0.33 ± 0.57
B 组	6.6 ± 2.50	9.6 ± 2.07
C 组	2.2 ± 1.22 ^a	3.4 ± 1.14 ^a

注:a:与 B 组和 A 组比较, $P < 0.01$ 。

术后 7 d、14 d 时,B、C 组有 NSE/ BrdU 双阳性细胞持续存在,14 d 时与 7 d 时无明显变化,C 组较 B 组有非常显著性差异($P < 0.01$)。A 组未见 NSE/ BrdU 双阳性细胞。见表 5。

表 5 各组 NSE/ BrdU 阳性细胞数的变化(/视野)

组别	7 d	14 d
A 组	0	0
B 组	1.2 ± 0.78	1.8 ± 0.83
C 组	2.8 ± 1.03 ^a	3.6 ± 0.89 ^a

注:a:与 B 组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

NSCs 具有分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的潜能和自我更新并足以提供大量神经组织细胞的潜能。在成年动物的大脑皮层、海马齿状回、室管膜下层、纹状体、脊髓中央管室管膜区也证实有 NSCs 存在^[5]。干细胞治疗中枢神经系统损伤有两种策略:移植外源性干细胞及激活内源性干细胞。与外源性 NSCs 相比,内源性 NSCs 有以下优势^[6]:①无免疫源性;②具有正常 NSC 自我更新、多潜能分化功能;③治疗简单,疗程短,疗效好;④无动物致病基因存在可能,成瘤性低;⑤可以像药物一样使用内源性 NSCs,有利于制定合理的治疗规范及指南。

在病理状态下, NSCs 的迁移、分化所需的微环境都被破坏,即使存在干细胞,修复也难以进行。目前有关 SCI 的干细胞修复研究,主要集中在干细胞移植方面;而有关内源性干细胞治疗的应用报道,主要集中在缺血性损伤和帕金森等疾病,脊髓损伤的报道不多。David 等曾报道,通过向成年小鼠第四脑室体内灌注外源性生长因子增加第四脑室和脊髓中央管周围神经干细胞的增殖。他们认为,在小鼠颈髓组织中有干细胞存在,并主要分布在以中央管为中心的 $400\ \mu\text{m}$ 范围内,和中央管的距离与细胞数成反比,经过外源性生长因子灌注,可诱导 NSC 增殖,但主要分化为星形胶质细胞和少突胶质细胞,不会分化为神经元^[7]。在成年个体脊髓后索被切断之后,脊髓中央管有丝分裂活跃的室管膜细胞的数量显著增加,而且这些活跃增殖的多能 NSC 向损伤部位迁移,然而它们最终只产生星形胶质细胞。另一方面,有人认为,移植 NSCs 可以替代损伤的神经元,建立神经通路,修复神经功能^[8]。

脊髓半切损伤继发性损伤程度轻,其瘫痪症状直接归因于脊髓横断的原发损伤,瘫痪恢复与否完全取决于脊髓能否以及在多大程度上修复再生。BBB 评分结果与损伤程度紧密相关,并能反映损伤后的恢复过程^[9]。电镜能够显示细胞的超微形态结构,在一定程度上反映脊髓损伤的程度及恢复情况。

HBO 用于中枢神经系统损伤已有大量基础和临床报道^[10-12]。本实验表明,脊髓损伤后,内源性 NSCs 发生增殖,在 HBO 的作用下,内源性 NSCs 的增殖得到了加强;增殖的内源性 NSCs 少部分分化为神经元(NSE/BrdU 双染阳性细胞)和星形胶质细胞(GFAP/BrdU 双染阳性细胞),约占 BrdU 阳性细胞数的 $5\% \sim 10\%$,分化为星形胶质细胞与分化为神经元之间差异不大。14 d 分化细胞数较 7 d 时增多,表明随时间的推移分化过程亦在进行。C 组分化明显优于 B 组。这也与运动功能评分相吻合。以上结果提示 HBO 能够促进损伤脊髓组织内源性神经干细胞的增殖、分化。

HBO 因何种因素的改变而诱导干细胞增殖、分化,目前尚无明确的答案。Okano 曾报道,电镜下观察到移植细胞与原细胞建立突触联系^[8],本实验中未发现。有报道,成年脊髓 NSC 移植入海马齿状回后分化为神经元,但当移植回成年脊髓后则未表现神经源性分化潜能^[13]。同样,由成年海马获得的干细胞在植入成年大鼠的侧脑室下区或嘴侧迁移路径时,可产生嗅球神经元,并表达嗅球而非海马中的神经递质表型;但是再植入成年海马时,这些细胞则产生新的海马神经元^[14]。上述研究表明,较之 NSC 的内在特性,局部环境才是决定移植细胞分化的主导因素。尽管 NSC 在谱系分化潜能方面表现出显著可塑性,但这种内源性

动力不足以克服局部环境下的影响。目前人们仍不了解这种谱系限制的调节机制。或者激活神经元 NSC 分化所必需的分子信号在受损的 CNS 组织有无表达,或者神经胶质诱导信号起决定作用?

目前研究证实, HBO 可提高机体的血氧分压,增加脑血氧含量,促进脑组织有氧代谢;同时,使脊髓内血管收缩,血管床变小,血流量减少,血流速度加快,椎管内压力降低,从而减轻组织水肿,缓解脊髓压迫,恢复微循环功能。此外,高压氧可使丙二醛和钙离子含量降低,抑制自由基介导的脂质过氧化,提高细胞膜脂结构的抗氧化能力,减少钙离子内流,保护脊髓细胞和组织结构,延长损伤后神经细胞的再生期,促进神经纤维的再生^[15]。

总之,本研究表明,高压氧能加强实验动物内源性 NSCs 的增殖、分化能力,并使脊髓损伤后的运动功能得到改善。但对于其机制尚不明确;且动物脊髓损伤与人类不尽相同,观测时间不长,还需进一步加以研究。

[参考文献]

- [1] Gage FH. Mammalian neural stem cells[J]. Science, 2000, 287: 1433 - 1441.
- [2] Ishihara H, Kanamori M, Kawaguchi Y, et al. Prediction of neurologic outcome in patients with spinal cord injury by using hyperbaric oxygen therapy[J]. J Orthop Sci, 2001, 6 (5): 385 - 389.
- [3] Johansson CB, Momma S, Clarke DL, et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system[J]. Cell, 1999, 96: 25 - 34.
- [4] Jin K, Minami M, Jing Q. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat[J]. PNAS, 2001, 98: 4710 - 4715.
- [5] Weiss S, Dunne C, Hewson J, et al. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spine cord and ventricular neuroaxis[J]. J Neurosci, 1996, 16: 7599 - 7609.
- [6] 蒋海山, 陆兵勋. 内源性神经干细胞与缺血性脑损伤[J]. 国外医学脑血管病分册, 2003, 11: 209 - 211.
- [7] Martens DJ, Seaberg RM, Derek V. In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord[J]. Eur J Neurosci, 2002, 16: 1045 - 1057.
- [8] Okano H. The application of stem cells in spinal cord injury[C]. New Orleans: Soc Neurosci 2000 Conference, 2000: 6.
- [9] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability[J]. J Neurotrauma, 1996, 13(2): 343 - 354.
- [10] 郭根平, 张谦, 杨玲玲. 早期高压氧治疗对脊髓损伤患者功能恢复的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2005, 11(9): 758 - 758.
- [11] 叶建新, 姚丽青. 高压氧对血管性痴呆大鼠海马胆碱能神经元的影响及行为学疗效[J]. 中国康复理论与实践, 2004, 10(9): 529 - 531.
- [12] 潘钰, 张朝东. 高压氧对成年大鼠脑梗死灶体积和基质金属蛋白酶的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2004, 10(12): 726 - 728.
- [13] Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, et al. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus[J]. J Neurosci, 2000, 20: 8727 - 8735.
- [14] Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, et al. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo[J]. Nature, 1996, 383: 624 - 628.
- [15] Sukoff MH. Effects of hyperbaric oxygenation[J]. J Neurosurg, 2001, 95(3): 544 - 546.

(收稿日期: 2005-12-30)