

施万细胞长期植入中枢神经系统后存活及迁移的实验研究

万虹¹, 李德志¹, 杨飞², 历俊华¹, 王身国²

[摘要] 目的 观察施万细胞长期移植入中枢神经系统后是否存活。方法 取大鼠施万细胞体外培养,一部分经 5-溴脱氧尿嘧啶(BrdU)标记后移植至电针损伤的大鼠中脑网状结构,另一部分经 Hoechst 33342 标记后置于 PLGA 支架内再移植至大鼠全横断脊髓损伤处,分别于移植后的 8 个月和 11 个月处死动物,行 BrdU 免疫组织化学染色及荧光显微镜观察。结果 施万细胞移植入脑内 8 个月后可见较多 BrdU 阳性细胞,褐色椭圆形,并向大脑皮层迁移;移植于脊髓 11 个月后荧光显微镜下可见许多 Hoechst 33342 阳性细胞,发蓝色荧光,形态不规则,在 PLGA 支架内及其头、尾端脊髓实质内都可见到。结论 施万细胞移植入中枢神经系统后可长期存活,并向远端迁移。

[关键词] 施万细胞;中枢神经系统;5-溴脱氧尿嘧啶;Hoechst 33342;大鼠

Study of Survival and Migration of Schwann Cells Transplanted to Central Nervous System for A Long term WAN Hong, LI De-zhi, YANG Fei, et al. Beijing Neurosurgical Institute, Beijing 100050, China

Abstract: **Objective** To investigate Schwann cells whether survival and migration after transplanted to central nervous system for a long-term. **Methods** The Schwann cells of rat were expanded in vitro, the part of them were labeled with 5-bromodeoxyuridine (BrdU) and transplanted to rats middle brain injured by electric needle stimulus, the others were labeled with Hoechst 33342, seeded to PLGA scaffold, and transplanted to rats transected spinal cord. 8 and 11 months later, rat brain and spinal cord were taken out respectively, examined by BrdU immunohistochemistry and fluorescence microscope. **Results** BrdU positive cells could be seen after 8 months and migrated toward cerebral cortex. Hoechst 33342 positive cells could be identified in scaffold and transected spinal cord after 11 months under fluorescence microscope. **Conclusion** Grafted Schwann cells can survive in central nervous system for a long-term and migrate toward distance.

Key words: Schwann cell; central nervous system; 5-bromodeoxyuridine (BrdU); Hoechst 33342; rat

[中图分类号] R329.2 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2006)08-0645-02

[本文著录格式] 万虹,李德志,杨飞,等.施万细胞长期植入中枢神经系统后存活及迁移的实验研究[J].中国康复理论与实践,2006,12(8):645-646.

施万细胞(Schwann cells, SCs)移植于中枢神经系统(central nervous system, CNS)后能否长期存活,由于实验方法的不同结论也不同。Xu 等将 SCs 借助于一个微小导管移植入大鼠半横断的脊髓腔内,结果发现,移植后 30 d,生长旺盛的有髓和无髓神经轴突长入含 SCs 的微小导管中,而且轴突再生总是与种植的 SCs 的存活相关^[1]。Stichel 等把 SCs 悬液注入到成年大鼠急性全横断的后联合穹隆中,结果发现,SCs 移植后迅速扩散到大脑的广泛区域,8 个月以后仍然存活,但增殖力很低,切断的神经纤维在 SCs 的诱导下可经过损伤点,沿原路延伸至靶组织^[2]。然而, Yasushi 等在观察移植后的 SCs 存活状况时发现,转染报告基因 Lac-Z 的 SCs 移植至大鼠脑白质后 4 周,标记细胞消失,代之的是增生的瘢痕组织^[3]。Hill 等用人胎盘碱性磷酸酶(human placental alkaline phosphatase, PLAP)标记 SCs,并移植入大鼠脊髓挫伤处,在急性移植后的 2 周几乎见不到 PLAP 标记的 SCs,如果延迟

细胞移植至损伤后的第 7 天,细胞存活状况被改善^[4]。以上结果表明,明确 SCs 移植入 CNS 后是否存活是实验的关键。

1 材料与方法

1.1 试剂及动物 5'-溴脱氧尿嘧啶(5'-bromodeoxyuridine, BrdU)、抗 BrdU 抗体和 Hoechst 33342 均购自 Sigma 公司(美国)。丙交酯-乙交酯共聚物(poly(lactide-co glycolide), PLGA)由中国科学院化学研究所王身国教授提供。Wistar 大鼠及新生鼠购自中国医学科学院实验动物研究所。荧光倒置相差显微镜为 Nikon 公司产品(日本)。

1.2 新生大鼠 SCs 体外培养及标记 按文献方法^[5],待细胞生长良好,将 BrdU 以 10 $\mu\text{mol/L}$ 终浓度标记一部分细胞,培养 24 h 后用于脑损伤移植;将 Hoechst 33342 以 5 $\mu\text{g/ml}$ 终浓度标记另一部分细胞,培养 12 h 后用于脊髓损伤移植。

1.3 电针损伤大鼠中脑网状结构及 SCs 微量移植

Wistar 大鼠以 3% 戊巴比妥钠麻醉,头部固定于立体定位仪上,暴露前囟至后囟视野,按大鼠脑立体定位图谱,损伤靶点为 B: -5.2 mm,中线旁 1.5 mm,背侧深 6.0 mm。缓慢插入电极绝缘针,通阳极电流 1.5 mA, 30 s,留针 2 min,缓慢拔针,然后用微量注射器将 BrdU 标记的 SCs 悬液 5 μl (1×10^5 个细胞)缓慢注入损伤点,缝合切口。共用实验动物 10 只。

基金项目:1. 国家自然科学基金(No. 30370543);2. 国家自然科学基金国际合作研究项目(No. 30540450581)

作者单位:1. 北京市神经外科研究所损伤修复室,北京市 100050;2. 中国科学院化学研究所高分子与化学国家重点实验室,北京市 100080。作者简介:万虹(1963-),女,吉林长春市人,研究员,博士,长期从事中枢神经系统损伤及修复机理的研究。

1.4 体外构建 SCs-PLGA 复合体 用微量移液器吸取 SCs 3×10^5 个接种于 PLGA 支架内,置于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中,在 37°C 5% CO_2 、饱和湿度培养箱中培养,2 h 后进行移植。

1.5 大鼠全横断脊髓损伤及移植 SCs-PLGA 复合物

大鼠术前禁水 6 h,麻醉(10%水合氯醛 0.4 ml/100g,腹腔注射),常规消毒。切口以 T_9 为中心,长约 2 cm,切开皮肤、皮下、棘突、椎板骨膜下剥离肌肉,暴露 $T_8 \sim T_{11}$ 棘突、椎板,行 $T_8 \sim T_9$ 椎板切除术,咬除 $T_8 \sim T_9$ 棘突、椎板,暴露脊髓硬膜,手术显微镜下纵向切开硬膜约 7 mm,悬吊硬膜;滴加 0.5%利多卡因于脊髓,切除 $T_8 \sim T_9$ 长约 3~4 mm 脊髓,并将术野可见的邻近神经根全部切除,显微镜下见到腹侧硬膜证实脊髓全横断。明胶海绵止血后,将 SCs-PLGA 复合物轻柔地植入缺损处,12-0 显微缝线缝合硬膜,缝合肌肉、皮下、皮肤。术毕舌静脉注射甲强龙(30 mg/kg)。所有手术操作在无菌条件下和手术显微镜下进行。动物清醒后出现双后肢不能运动,拖于身后为模型成功指标。共用动物 10 只。

1.6 脑组织标本制备及 BrdU 免疫组织化学染色

电针损伤后移植了 SCs 的大鼠于移植后的第 8 个月灌注固定,取脑,石蜡包埋,切片 $5 \mu\text{m}$ 厚;微波提呈抗原,加抗 BrdU 抗体(1:1000), 4°C 过夜;PBS 冲洗,加生物素化 IgG,室温 4 h;PBS 冲洗,加过氧化物酶标记的链霉卵白素,室温 20 min;PBS 冲洗,DAB 显色,封片,显微镜下观察。

1.7 脊髓组织标本制备及荧光显微镜观察

全横断脊髓损伤并移植了 SCs-PLGA 复合物的大鼠于移植后第 11 个月灌注固定,脊髓原切口切开,小心切开椎板,以损伤点为中心,取出含移植组织块的脊髓组织,4%多聚甲醛溶液后固定,石蜡包埋,切片 $5 \mu\text{m}$ 厚,荧光显微镜(紫外光激发)下观察。

2 结果

2.1 动物存活情况 实验共用大鼠 20 只,麻醉无死亡,电针损伤大鼠中脑网状结构死亡 3 只,后期饲养死亡 2 只;大鼠全横断脊髓损伤动物模型死亡 2 只,后期饲养死亡 5 只。

2.2 SCs 移植入脑内 8 个月的存活及迁移 脑组织标本经 BrdU 免疫组织化学染色后,镜下可见阳性细胞较多,为褐色椭圆形,并向大脑皮层迁移(见中插图 1.1)。

2.3 SCs 移植入脊髓内 11 个月的存活及迁移 荧光显微镜下观察可见,有许多阳性细胞,形态不规则,发蓝色荧光,在 PLGA 支架内及其头、尾端脊髓实质内都可见到(见中插图 1.2)。

3 讨论

PLGA 是乙交酯(lactic acid, LA)和丙交酯(glycolic acid, GA)按一定比例聚合而成的生物相容性良好的可降解材料,分子量约 10 万,可在体内保持形状 3 个月左右,在 37°C 水中完全降解大约需要 4 个月。PLGA 是半结晶性高分子,具有良好的力学强度,降解产物 L-乳酸能被人体完全代谢吸收,无毒、无不良组织反应,因此被作为人工骨钉等内植骨固定装置以及骨组织修复中的细胞支架而得到广泛应用,近年来,作为脊髓桥接物及细胞支,被应用于周围神经和脊髓损伤的研究^[6]。本实验将 PLGA 移植于大鼠全横断脊髓,损伤后第 11 个月取材发现,PLGA 仍有部分残留,但非常柔软,与脊髓组织完全融合,无界限。PLGA 体内、体外降解速度的不同,作者认为与周围环境有关,尤其是机体损伤后,在整个炎症反应过程中,酸碱度是在不断变化的。

CNS 再生比周围神经系统再生困难是因为 CNS 损伤后缺少神经再生的微环境,如细胞膜及基质板等物质及结构。近期的研究证明,SCs 虽为周围神经胶质细胞,但可提供神经再生的微环境,可促进 CNS 再生^[7]。所以,SCs 移植入 CNS 后是否存活是实验的关键。本研究观察到 SCs 移植于电针损伤大鼠脑内后 8 个月仍然存活,且可向大脑皮层迁移;以 PLGA 为支架移植 SCs 于全横断脊髓损伤处后 11 个月细胞仍然存活,并向脊髓段端迁移,提示 SCs 移植入 CNS 后可长期存活。综合其他资料及本实验结果,表明 SCs 的存活与宿主的环境状况如酸碱度、炎细胞浸润及损伤程度等有关。因此,寻找细胞移植的最佳时间窗是我们下一步工作的重点。

[参考文献]

- [1] Xu XM, Zhang SX, Li HY. Regrowth of axons into the distal spinal cord through a Schwann cell-seeded mini-channel implanted into hemisectioned adult rat spinal cord[J]. Eur J Neurosci, 1999, 11: 1723-1740.
- [2] Stichel CC, Lips K, Wunderlich G, et al. Reconstruction of transected postcommissural fornix in adult rat by Schwann cell suspension grafts[J]. Exp Neurol, 1996, 140: 21-36.
- [3] Yasushi L, John CA, Blake more WF. Redistribution of Bis-benzimide Hoechst 33342 from transplanted cells to host cells[J]. Neuroreport, 2000, 11: 1013-1016.
- [4] Hill CE, Moon LD, Wood PM, et al. Labeled Schwann cell transplantation: cell loss, host Schwann cell replacement, and strategies to enhance survival[J]. Glia, 2006, 53(3): 338-343.
- [5] 万虹,孙梅珍,张亚卓,等.施万细胞培养方法的比较[J].中国危重病急救医学, 2001, 13: 530-532.
- [6] Moore MJ, Friedman JA, Lewellyn EB, et al. Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration[J]. Biomaterials, 2006, 27(3): 419-429.
- [7] 万虹,张亚卓,王忠诚.施万细胞在中枢神经系统损伤修复中的作用[J].国外医学:神经病学神经外科分册, 2001, 28: 332-335.

(收稿日期:2006-04-30 修回日期:2006-07-04)



图1.1 BrdU掺入的施万细胞微量移植于电针损伤的大鼠中脑网状结构后8个月。BrdU免疫组织化学染色示阳性细胞为褐色椭圆形，并主要迁移至大脑皮层(箭头示，100 \times)

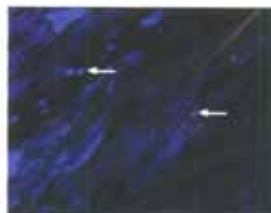


图1.2 Hoechst 33342 标记的施万细胞移植入大鼠全横断脊髓损伤后11个月，荧光显微镜观察见阳性细胞形态不规则，发蓝色荧光(箭头示，400 \times)

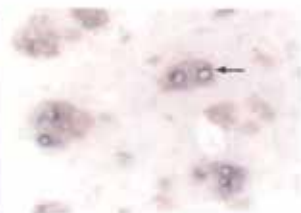


图2.1 大鼠脑出血施万细胞移植后1周，BrdU/MBP免疫组织化学双染，施万细胞核呈紫蓝色扁平半月形或环形(BrdU阳性，↑所示)，周围为褐色团块状(MBP阳性)



图2.2 大鼠脑出血施万细胞移植后12周，BrdU/GAP-43免疫组织化学双染，神经元的胞浆内充满褐色颗粒(GAP-43阳性，↑所示)，海马部位尤其明显(↑所示)