

大鼠脑出血移植施万细胞的实验研究

张绍东, 历俊华, 万虹

[摘要] 目的 探讨施万细胞(SCs)移植于大鼠脑出血部位对神经再生的影响。方法 体外培养 SCs, 5-溴脱氧尿嘧啶(BrdU)标记后移植于脑出血模型大鼠的脑出血部位, 不同时间处死动物, 免疫组织化学双染检测 BrdU/髓鞘碱性蛋白(MBP)和 BrdU/生长相关蛋白-43(GAP-43)的表达。结果 SCs 移植 1 周后至 13 周, 脑内可见 BrdU/MBP 双染阳性细胞; 移植后第 12 周可见 BrdU 和 GAP-43 阳性细胞, 海马部位 GAP-43 阳性细胞尤其多见。结论 移植的 SCs 参与髓鞘形成和神经再生。

[关键词] 施万细胞; 髓鞘碱性蛋白; 生长相关蛋白-43; 大鼠

Experimental Study of Schwann Cells Transplanted into Cerebral Hemorrhage Area of Rats ZHANG Shao-dong, LI Jun-hua, WAN Hong. Beijing Neurosurgical Institute, Beijing 100050, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Schwann cells (SCs) transplanted into cerebral hemorrhage area on never restore in rat. **Methods** SCs were expanded and labeled with 5-Bromodeoxyuridine (BrdU) in vitro, then transplanted into cerebral hemorrhage area of model rat. Double immunohistochemistry staining was used to detect the expression of BrdU/myelin basic protein (MBP) and BrdU/growth associated protein-43 (GAP-43) respectively. **Results** BrdU/MBP positive cells could be seen one week after transplantation and up to 13 weeks. GAP-43 positive cells appeared in 12 weeks and 13 weeks, which was more in Hippocamp. **Conclusion** Grafted SCs can participate in remyelination and promoter nerve restore.

Key words: Schwann cells; myelin basic protein (MBP); growth associated protein-43 (GAP-43); rat

[中图分类号] R329.2 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2006)08-0647-02

[本文著录格式] 张绍东, 历俊华, 万虹. 大鼠脑出血移植施万细胞的实验研究[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(8): 647-648.

施万细胞(Schwann cells, SCs)由于可分泌多种神经营养因子、细胞外基质及细胞黏附因子, 因此其在促进中枢神经系统损伤修复中的作用越来越受到人们的重视^[1]。多年来, 我们一直在研究 SCs 移植对中枢神经系统损伤修复的影响。以往我们曾观察过 SCs 移植对电针损伤中脑的影响^[2], 本研究旨在观察 SCs 移植对脑出血损伤修复的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂和动物 髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)单克隆抗体购自 Chemicon 公司; 生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)单克隆抗体购自 Oncogene 公司; 5-溴脱氧尿嘧啶(5-Bromodeoxyuridine, BrdU)及抗 BrdU 单克隆抗体购自 Sigma 公司; 成年及新生 Wistar 大鼠购自中国医学科学院实验动物研究所; Eclips 倒置相差荧光显微镜为日本 Nikon 公司产品。

1.2 SCs 体外培养 新生 1~3 d 的 Wistar 大鼠经颈

动脉放血处死, 无菌条件下取双侧坐骨神经, 解剖显微镜下去除神经外膜, 剪碎, 0.25% 胰蛋白酶和 0.25% 胶原酶混合消化, 离心, 细胞悬于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中, 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养, 3~4 d 换培养液 1 次。

1.3 大鼠脑出血模型制作 将大鼠俯卧, 水合氯醛(400 mg/kg)腹腔麻醉, 剪开头皮, 在前囟左侧旁开 3 mm 处用牙钻钻透顶骨, 不破坏硬脑膜。将大鼠仰卧, 暴露股动脉, 用预先肝素化的头皮针取 100 μl 动脉血。将大鼠头部固定于立体定位仪上, 头皮针固定于推进器上, 以颅骨外板高度为零点, 将头皮针垂直刺入脑内, 进针深度为 6 mm, 用微量注射器将 40 μl 动脉血在 20 min 内注入基底节, 停针 10 min。抽出头皮针, 用骨蜡封闭骨孔, 缝合伤口。

1.4 SCs 移植及组织切片 动物随机分为两组: ①对照组: 制作脑出血模型, 3 d 后向基底节注入 10 μl PBS 缓冲液; ②实验组: 制作脑出血模型, 3 d 后向基底节注入 BrdU 标记的 SCs, 细胞浓度为 1×10^6 , 体积为 10 μl, 于原骨孔处垂直进针, 分别于 5 mm、6 mm、7 mm 三处注完。两组动物于手术后 3 d, 及 1、2、4、8、12、13 周分别行主动脉多聚甲醛灌流固定, 断头取脑后固定, 石蜡包埋, 切片厚度 5 μm。

1.5 免疫组织化学双染检测 石蜡切片常规脱蜡,

基金项目: 1. 国家自然科学基金资助项目(No. 30370543); 2. 国家自然科学基金国际合作研究项目(No. 00510497)

作者单位: 北京市神经外科研究所, 北京市 100050。作者简介: 张绍东(1964-), 男, 北京市人, 副研究员, 主要研究方向: 中枢神经系统损伤及修复机理。通讯作者: 万虹。

PBS 冲洗,枸橼酸缓冲液中微波抗原修复,正常羊血清阻断非特异性反应 10 min,加抗 BrdU 单克隆抗体(1:100),4℃过夜;PBS 冲洗,加通用型 II 抗室温 20 min;PBS 冲洗,加链亲和素-碱性磷酸酶室温孵育 20 min,NBT 显色(紫蓝色);PBS 冲洗,加封闭液室温 30 min,分别加抗 MBP 单克隆抗体(1:300)和抗 GAP-43 单克隆抗体(1:100),4℃过夜;PBS 冲洗,加通用型 II 抗室温 20 min;PBS 冲洗,加链亲和素-辣根过氧化物酶室温 20 min;PBS 冲洗,DAB 显色(褐色),甘油封片,显微镜下观察。

2 结果

2.1 动物的一般情况 实验共用大鼠 54 只,麻醉无死亡,制作动物模型后死亡 3 只,移植 SCs 和注入 PBS 缓冲液后死亡 14 只。

2.2 BrdU/MBP 免疫组织化学双染检测 SCs 移植后 3 d,在基底节部位可见损伤灶及大量血细胞,周围组织有充血、水肿及炎细胞浸润,并可见 MBP 阳性染色,呈褐色团块状。细胞移植后 1 周,脑内可见 BrdU/MBP 双染阳性细胞,紫蓝色扁平半月形或环形核,周围为褐色团块状,界限不明显(见中插一图 2.1),直至移植后 13 周都可见此阳性细胞。

2.3 BrdU/GAP-43 免疫组织化学双染检测 细胞移植后的第 1 周,可见 BrdU 阳性细胞,胞核圆形,紫蓝色。移植后第 12 周,除 BrdU 阳性细胞外,还可见 GAP-43 阳性细胞,在神经元的胞浆内有大小不一的褐色斑块状颗粒,多分布在核周围,突起内未见。此阳性细胞在海马部位尤其明显(见中插一图 2.2)。

3 讨论

研究证实,SCs 移植可促进中枢神经系统损伤的修复。以往我们曾用电针损伤制作大鼠脑损伤动物模型,但为更贴近临床,我们此次开展了脑出血的实验研究。制作脑出血动物模型方法有多种,如胶原酶溶血法、心脏采血注入法等。经过反复实验及摸索,最终我们选择了股动脉采血注入基底节部位的方法。同其他方法相比,此法稳定、易控制,且手术时间短、成功率高,是比较理想的实验方法。

SCs 为周围神经胶质细胞,包绕着周围神经的轴突,形成髓鞘。近年来人们发现,SCs 提供的微环境可促进中枢神经系统损伤神经元的再生。但由于异体 SCs 移植可引起免疫反应,所以自体 SCs 移植成为研究的热点。多年来,根据文献我们探讨了多种实验方法^[3],最终建立了常规 SCs 体外培养方法。

SCs 移植入中枢神经系统后能否存活是实验的关键环节。以往我们曾观察到,SCs 移植于电针损伤大鼠脑内 8 个月后仍然存活,且可向大脑皮层迁移。此次研究虽然只观察了 13 周,但通过动态观察我们发

现,SCs 在移植后的第 13 周细胞数量仍不见减少,损伤周围阳性细胞较多,脑皮质中也少量可见,表明 SCs 在增殖的同时在向远处迁移。

MBP 占髓鞘蛋白的 30%,只在中枢神经系统的少突胶质细胞和周围的 SCs 内合成,对神经纤维的绝缘和快速传递有重要作用。中枢神经系统的各种破坏性病变累及髓鞘时,MBP 均有不同程度的升高^[4]。本研究虽然在整个实验过程中都可见 MBP 单染阳性细胞,但在移植 1 周后即出现 BrdU/MBP 双染阳性细胞,且数量较多,提示移植的 SCs 参与了髓鞘的再生。

GAP-43 是一种特异性的存在于细胞膜下、与神经细胞的生长、发育及再生过程有关的糖蛋白,参与轴突的生长和突触的形成。研究发现,在中枢神经系统损伤时,GAP-43 有过性表达。Chen 等的研究显示,脊髓损伤后第 2 周 GAP-43 表达达峰值,以后逐渐下降^[5]。本实验结果显示,移植 SCs 12 周后脑内出现部分 GAP-43 阳性神经元,尤其是海马部位,此种阳性神经元更多见,表明移植的 SCs 可促进损伤神经元轴突的再生。但为何比 SCs 移植到电针损伤模型出现 GAP-43 阳性细胞的时间(1 个月)明显延迟,可能与脑损伤模型有关。电针损伤是直接损伤脑组织,所以修复的信息传递和反应都比较迅速,移植后 1 个月就出现 GAP-43 阳性细胞。而应用注血法制作脑出血模型,周围的神经元是在缺血、水肿的情况下发生继发性损伤,病理反应需要一个过程,诱发修复反应也需要一定时间,所以整个过程明显延迟。本实验只观察到细胞移植后 13 周,此时 GAP-43 表达仍为阳性。但 GAP-43 表达何时下降,何时消失,还有待于进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 万虹,张亚卓,王忠诚.雪旺氏细胞在中枢神经系统损伤修复中的作用[J].国外医学:神经病学神经外科学分册,2001,28(5):332—335.
- [2] 万虹,孙梅珍,王忠诚,等.雪旺氏细胞移植至大鼠中脑损伤区域的研究[J].中华实验外科杂志,2003,20(7):637—638.
- [3] 万虹,孙梅珍,张亚卓,等.雪旺氏细胞培养方法的比较[J].中国危重病急救医学,2001,13(9):530—532.
- [4] 胡福广,张庆俊.CNS 损伤与自身免疫神经保护的研究进展[J].国外医学:神经病学神经外科学分册,2005,31(5):442—444.
- [5] Chen L, Gao L, Mao B, et al. The effect of microgene pS-VP0 Meat to modify Schwann cell on GAP-43 expression after spinal cord injury in adult rats[J]. Modern Rehabil, 2001, 5:142—143.

(收稿日期:2006-05-12 修回日期:2006-07-03)



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×)

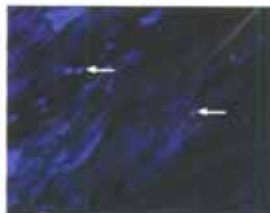


图1.2 Hoechst 33342 标记的施万细胞移植入大鼠全横断脊髓损伤后11个月，荧光显微镜观察见阳性细胞形态不规则，发蓝色荧光(箭头示，400×)

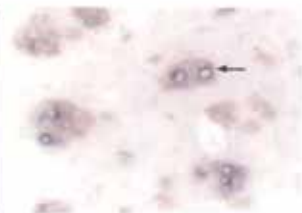


图2.1 大鼠脑出血施万细胞移植后1周，BrdU/MSP免疫组织化学双染，施万细胞核呈紫蓝色扁平半月形或环形(BrdU阳性，↑所示)，周围为褐色团块状(MSP阳性)



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)