

高压氧对大鼠脊髓损伤后移植神经干细胞增殖分化的影响

陈星星^{1a}, 晏丹^{1b}, 袁修学^{1a}, 刘亚昆^{1a}, 尤春景², 秦开蓉², 徐江²

【摘要】 目的:探讨高压氧(HBO)对大鼠脊髓全横断损伤后移植的神经干细胞存活、增殖及分化的影响。方法:成年健康SD大鼠20只,随机分为神经干细胞移植组(NSCs组)和HBO联合神经干细胞移植组(HBO+NSCs组)各10只。2组均采用脊髓全横断损伤模型,术后均给予NSCs移植治疗,HBO+NSCs组在移植后辅以HBO治疗。治疗后检测移植在脊髓损伤处的神经干细胞存活、增殖及分化的情况。结果:术后第28d,HBO+NSCs组移植的神经干细胞存活数量显著多于NSCs组($P<0.05$)。2组大鼠的脊髓损伤处及其相邻的组织均可观察到较多移植的神经干细胞分化为胶质纤维酸性蛋白(GFAP)阳性染色细胞。HBO+NSCs组中移植的神经干细胞分化为神经元特异性烯醇化酶(NSE)阳性染色细胞百分率显著高于NSCs组($P<0.05$)。结论:HBO能够促进大鼠脊髓损伤处移植的神经干细胞存活、增殖,并能促进这些细胞能分化为NSE阳性神经元。

【关键词】 脊髓损伤;神经干细胞;高压氧

【中图分类号】 R49;R683.2 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2013.02.001

Effect of hyperbaric oxygen therapy on proliferation and differentiation of transplanted neural stem cells of rats with spinal cord injury CHEN Xing-xing, YAN Dan, YUAN Xiu-xue, et al. Department of Pathophysiology, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China

【Abstract】 Objective: To explore the effects of hyperbaric oxygen (HBO) therapy on the survival, proliferation and differentiation of neural stem cells (NSCs) transplanted in the injured site of spinal cord transection in rats. Methods: Twenty adult SD rats were divided into NSCs transplantation group (NSCs group) and HBO therapy plus NSCs transplantation group (HBO+NSCs group). T10 spinal cord segments of all animals were completely transected. The rats in HBO+NSCs group and NSCs group were treated with neural stem cells transplantation after operation, and the rats in HBO+NSCs group received HBO treatment additionally. The spinal cords were taken for observing the survival, and differentiation of neural stem cells transplanted in the injured site of spinal cord transection after 28 days in rats. Results: The surviving number of transplanted NSCs in HBO+NSC group was more than that in NSCs group. In many transplanted NSCs at injured site of transected completely spinal cord and neighboring tissue, glial fibrillary acidic protein (GFAP) positive staining was observed in HBO+NSCs group or NSCs group. The percentage of neuron-specific enolase (NSE) positive staining cells differentiated from transplanted NSCs in HBO+NSCs group was higher than that in NSCs group. Conclusion: HBO may prolong the survival of NSCs transplanted in the injured site of rat spinal cord transected completely, and can promote the differentiation of these cells into NSE positive cells.

【Key words】 spinal cord injury; neural stem cells; hyperbaric oxygen

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是中枢神经系

统的严重创伤,SCI后功能的恢复一直是神经科学研究的一大难题。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)具有增殖能力强、多分化潜能、免疫原性低、利于进行细胞移植等优点^[1],使NSCs移植成为治疗SCI的新研究热点。但NSCs移植后向成熟神经元方向分化率低,严重制约了其在临床上的应用,其原因可能与损伤脊髓局部微环境有关。临床上,高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗是神经康复中常用和有

基金项目:湖北省教育厅优秀中青年人才科研项目(Q20091109),武汉科技大学青年科技骨干培养计划项目(2011XG007)

收稿日期:2012-12-06

作者单位:1. 武汉科技大学医学院 a. 病理生理学教研室, b. 病理教研室, 武汉 430065; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院康复科, 武汉 430030

作者简介:陈星星(1980-),女,副教授,主要从事神经生理学方面的研究。

通讯作者:徐江。

效治疗手段之一,能有效改善损伤脊髓的局部微环境^[2-3]。因此,本实验拟用大鼠 SCI 的模型,尝试将 NSCs 移植和 HBO 治疗结合起来,将体外分离培养并用核荧光标记的 NSCs 移植入大鼠损伤的脊髓,采用免疫荧光组化技术通过形态学的方法观察 HBO 对移植的神经干细胞存活和分化的影响,为 HBO 与 NSCs 移植联合应用促进受损伤的脊髓结构修复机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 ①动物:成年健康雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 20 只,体质量 200~250g,平均(225.3±23.7)g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。②试剂:DMEM/F12、胎牛血清(GIBCO 公司),B27、EGF、bFGF(美国 Peprotech 公司),神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)抗体、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司),倒置相差显微镜及荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 方法 ①分组:大鼠适应性喂养 7d 后,随机分为神经干细胞移植(NSCs)组与 HBO 联合 NSCs 移植(HBO+NSCs)组各 10 只。②NSCs 培养及标记:选取孕 14d 的 SD 大鼠,麻醉后在无菌条件下取出胎鼠,在解剖显微镜下仔细分离获得胎鼠大脑皮层,再用 D-Hank's 液漂洗,用眼科剪反复切割组织,用 0.133%胰酶消化 30min(恒温 37℃)。用含 10%胎牛血清的 D-Hank's 液中止消化,吸管反复吹打约 50 次,经 220 目铜网滤过后,离心去上清,再用 200 目细胞筛过滤,收集入离心管中,反复吹打,制成单细胞悬液,经细胞计数后,分装入 50ml 培养瓶中。培养条件:DMEM/F12+B27 2%+BFGF 20ng/ml+EGF 20ng/ml,37℃,5%CO₂;每隔 60h 换培养液 1 次。6~7d 左右行第 1 次传代,然后每 6~7d 用 0.125%+0.02%EDTA 酶解分离细胞克隆球传代 1 次。免疫荧光标记显示为 Nestin 阳性细胞,经诱导分化后 NSE、GFAP 染色呈阳性,提示其具有 NSCs 特性^[4]。收集第 3 代培养 7~8d 的 NSCs 悬液,用核荧光标记液 Hoechst33342(10mg/L,DMEM/F12 培养液配制)孵育 2h。收集核荧光标记好的 NSCs,经细胞计数后制备浓度为 5×10⁵ 个细胞/μl 的神经干细胞悬液,4℃下冷藏备用。③造模:2 组均行脊髓全切术造模。1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠(50mg/kg)成功后,常规消毒,纵行切开背部皮肤,钝性分离皮下和肌肉组织,咬除 T₁₀ 棘突并去除椎板至横突根部,暴露脊髓,纵行剪开硬脊膜后,用钝头的钩针完整地挑起脊髓,显微手

术剪完全横行剪断脊髓。脊髓剪切后见鼠尾痉挛性摆动、双下肢回缩扑动后瘫痪,表明造模成功。④NSCs 移植:向损伤腔内植入 1mm³ 大小、含有 5μl NSCs 细胞悬液约的明胶海绵,之后逐层缝合。术后连续 3d 每只动物每日腹腔内注射青霉素 20 万单位预防感染,每日早、晚各 1 次人工按摩大鼠腹部协助排尿直至其形成反射性排尿。⑤HBO 治疗:HBO+NSCs 组大鼠在术后 3h 置入实验动物高压舱内,首先用纯氧充分洗舱 10min 后,在 20min 内匀速加压至 2.0ATA (0.2MPa),稳压 60min,其间用纯氧通风 10min,舱内氧浓度>96%。稳压结束后用 20min 匀速减压至常压出舱。每天 1 次,共 4 周。⑥灌注、固定和取材:在术后 28d 用 1%的戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉大鼠,开胸,经左心室主动脉插管,用 37℃生理盐水 200ml 快速冲洗血管后,再用 4%多聚甲醛 400ml 固定,取出相应节段脊髓,用新鲜的 4%多聚甲醛后固定 4h,再置于 30%蔗糖溶液中浸泡至组织下沉到瓶底。用恒冷箱冰冻切片机做连续纵切片。

1.3 检测指标 ①计数移植的存活 NSCs 数量:将 2 组大鼠的脊髓切片置于荧光显微镜下用 410nm 激光波长进行移植的存活干细胞计数。用 Image Pro Plus 程序对采集的图像进行半定量分析,测定发出蓝色核荧光的细胞计数。计数时,以发出蓝色荧光,呈椭圆形或圆形,大小较均一的细胞核作为活的神经干细胞的胞核。以 10 个视野的均值作为评价该样本的数值。②免疫荧光组织化学检测移植的存活 NSCs 分化:取 2 组大鼠的相应脊髓节段切片分别做 NSE 和 GFAP 抗体免疫荧光细胞化学染色。0.01mol/L PBS 洗 5min×3 次,分别加入兔抗 NSE(1:100)和 GFAP(1:100),于 4℃过夜,0.01mol/L PBS 洗 5min×3 次,分别加入异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的羊抗兔 IgG(1:100)后 37℃避光孵育 1h,0.01mol/L PBS 洗 5min×3 次,封片后荧光显微镜下观察。胞核呈蓝色、胞质呈绿色荧光的分别为 Hoechst33342 与 NSE、GFAP 双阳性细胞,分别代表移植入脊髓的 NSCs 所分化的神经元和星形胶质细胞。计算各组双阳性细胞占蓝色荧光标记的百分率,并进行比较。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

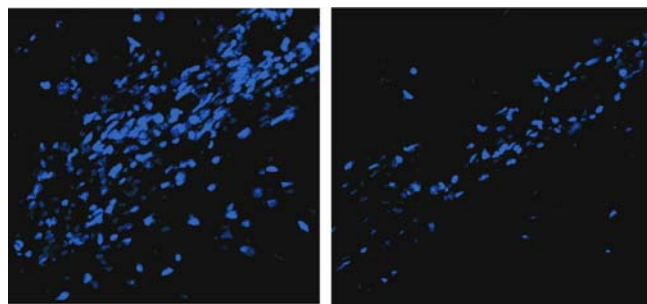
2 结果

2.1 受损伤脊髓内移植的 NSCs 的存活情况 在荧光显微镜下,可观察到 2 组的 SCI 处及其相邻的组织

有许多被核荧光标记的移植 NSCs。移植细胞多集中于 SCI 处,有部分迁移至邻近脊髓组织内。HBO+NSCs 组的移植 NSCs 数量明显多于 NSCs 组 $[(258.3 \pm 24.16) \text{ 个/每高倍镜视野}, (74.2 \pm 12.76) \text{ 个/每高倍镜视野}, P < 0.05]$, 见图 1a~b。

2.2 受损伤脊髓内移植的 NSCs 的分化情况 2 组的 SCI 处及其相邻的组织均可观察到较多的 Hoechst33342/GFAP 双标阳性细胞,可见胞体中央大而圆的核,及多个较长的神经突起,见图 2a~c,3a~c,这提示有较多移植的 NSCs 分化为星形胶质样细胞,且细胞形态已发育成熟。同样在 2 组的 SCI 处及其相邻的组织均可观察到少量的 Hoechst33342/NSE 阳性染色细胞,细胞核都被核荧光标记,见图 4a~c,5a~c,这提示有少量移植的 NSCs 分化为形态成熟的神经元样细胞。但可观察到这些神经元样细胞在 HBO+NSCs 组多于 NSCs 组,而且长出典型的神经突起,并进一步发出分支,见图 4a~c。

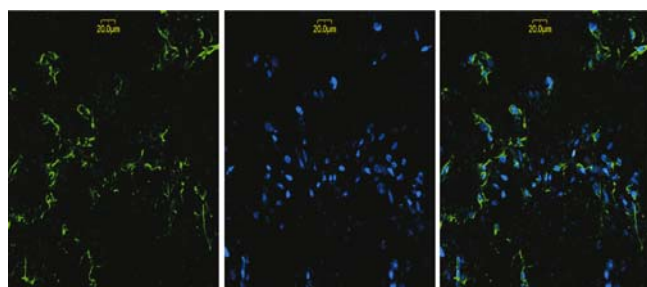
2.3 双阳性细胞占蓝色荧光标记百分率 HBO+NSCs 组大鼠 Hoechst33342/NSE 双阳性细胞占 Hoechst33342 阳性细胞的比例明显高于 NSCs 组 $[(6.13 \pm 0.89) \%, (3.69 \pm 0.76) \%, P < 0.05]$, Hoechst33342/GFAP 双阳性细胞占 Hoechst33342 阳性细胞的比例与 NSCs 组大鼠比较差异无统计学意义 $[(64.48 \pm 10.27) \%, (61.75 \pm 11.85) \%]$ 。



a HBO+NSCs 组

b NSCs 组

图 1a~b 2 组受损伤脊髓内 NSCs 存活情况比较 (胞核呈蓝色核荧光染色, $\times 400$)

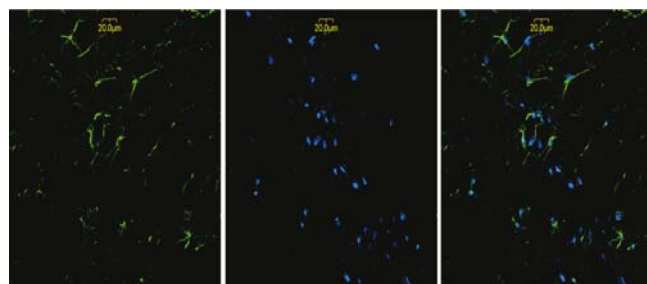


a. GFAP 阳性细胞

b. Hoechst33342

c. 免疫荧光双标
标记细胞

图 2a~c HBO+NSCs 组在脊髓损伤处 Hoechst33342/GFAP 免疫荧光细胞化学染色 ($\times 400$)

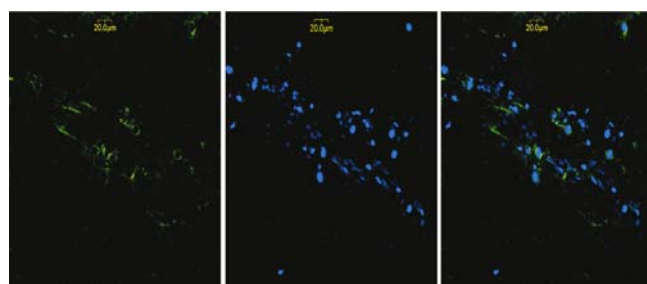


a. GFAP 阳性细胞

b. Hoechst33342

c. 免疫荧光双标
标记细胞

图 3a~c NSCs 组在脊髓损伤处 Hoechst33342/GFAP 免疫荧光细胞化学染色 ($\times 400$)

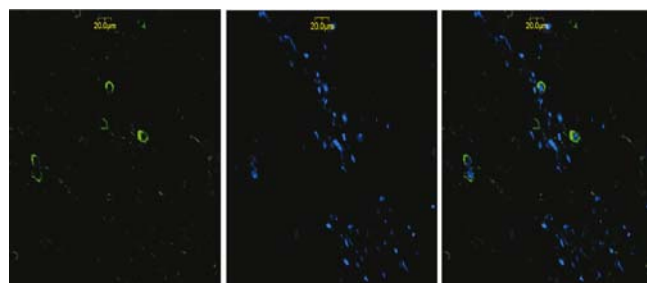


a. GFAP 阳性细胞

b. Hoechst33342

c. 免疫荧光双标
标记细胞

图 4a~c HBO+NSCs 组在脊髓损伤处 Hoechst33342/NSE 免疫荧光细胞化学染色 ($\times 400$)



a. GFAP 阳性细胞

b. Hoechst33342

c. 免疫荧光双标
标记细胞

图 5a~c NSCs 组在脊髓损伤处 Hoechst33342/NSE 免疫荧光细胞化学染色 ($\times 400$)

3 讨论

SCI 的治疗一直是医学界研究的热点和难点。由于目前临床缺乏有效的治疗方法,积极探索治疗 SCI 的有效方法具有重要的意义。各国学者对 SCI 的治疗作了较多探索。随着 NSCs 的发现和研发发展,NSCs 移植为 SCI 的治疗带来了曙光^[5]。NSCs 移植入体内,其存活和分化可能受到两方面因素的影响:一是 NSCs 本身的纯度和活性,二是 NSCs 受到植入部位微环境的影响。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^[6]。同样,从成年动物海马获得的 NSCs 当植入到成年大鼠侧脑室室管膜下区后,能分化为表达嗅球内相应的神经递质的神经元,而不是海马内的神经递质;但是再植入成年海马时,这些细胞则产生新的海马神经元^[7-8]。这些研究结果提示,NSCs 移植入体内后,是受到植入部位微环境的影响而不是神经干细胞本身决定分化方向。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^[9]。

HBO 是指机体处于高压环境中所呼吸的与环境等压的纯氧,而利用吸入 HBO 治疗疾病的方法称为 HBO 疗法。HBO 用于中枢神经系统损伤已有大量基础和临床报道^[2,10,11]。刘海等^[12]的实验表明,HBO 能够促进损伤脊髓组织内源性 NSCs 的增殖、分化。但由于内源性 NSCs 数量不足或调节始动、聚集、迁移、分化、成活、轴突延伸和突触形成的细胞因子不足而使新生的神经细胞数量和功能受限。而通过移植外源性的 NSCs 可以有效解决这个问题。而且,研究发现植入的 NSCs 拥有一种独特的适应性治疗功能,它们能够向有利的小环境迁移、生存,并通过与那里的不同类型细胞相互作用发挥治疗作用^[13]。基于此,本研究将 NSCs 移植与 HBO 联合应用治疗大鼠急性 SCI 损伤^[14]。

在前期研究中我们发现 NSCs 移植与 HBO 联合应用治疗大鼠急性 SCI,具有明显的协同作用^[4]。SCI 大鼠经 HBO+NSCs 联合治疗后,行为学评分(BBB 运动功能评分)及电生理检查(运动诱发电位检测)与 SCI 组及 NSCs 组大鼠相比均有显著改善。本研究中,HBO+NSCs 组的移植 NSCs 存活的数量多于 NSCs 组,这表明 HBO 能够促进损伤脊髓内移植的 NSCs 存活和增殖。同时移植在大鼠 SCI 处的 NSCs 发生分化,可分化成 NSE 染色阳性的神经元细胞和 GFAP 染色阳性的星形胶质细胞。我们观察到神经元样细胞分化百分率在 HBO+NSCs 组中要显著高于 NSCs 组,而且长出典型的神经突起,并进一步发出分支,说明 HBO 还能促进移植的 NSCs 向神经元方向分化。我们推测 HBO 正是通过改善损伤脊髓局部微环境,创造利于 NSCs 生存和分化的条件,从而促进了大鼠损伤脊髓功能的部分恢复。

综上所述,HBO 能促进移植的 NSCs 的增殖以及向神经元方向的分化,HBO 和 NSCs 移植联合治疗 SCI 大鼠后能产生协同作用,共同促进损伤脊髓的恢复,这为进一步有效提高 SCI 的治疗疗效提供了理论基础。

【参考文献】

- [1] Mothe AJ, Zahir T, Santaguida C, et al. Neural stem/progenitor cells from the adult human spinal cord are multipotent and self-renewing and differentiate after transplantation[J]. PLoS One, 2011, 6(11): 27079-27079.
- [2] Asamoto S, Sugiyama H, Doi H, et al. Hyperbaric oxygen (HBO) therapy for acute traumatic cervical spinal cord injury[J]. Spinal Cord, 2000, 38(9): 538-540.
- [3] Cristante AF, Damasceno ML, Barros Filho TE, et al. Evaluation of the effects of hyperbaric oxygen therapy for spinal cord lesion in correlation with the moment of intervention[J]. Spinal Cord, 2012, 50(7): 502-506.
- [4] 陈星星, 晏丹, 尤春景, 等. 高压氧联合神经干细胞移植对脊髓损伤大鼠功能恢复的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2012, 34(6): 406-410.
- [5] Tsuji O, Miura K, Fujiyoshi K, et al. Cell therapy for spinal cord injury by neural stem/progenitor cells derived from iPS/ES cells[J]. Neurotherapeutics, 2011, 8(4): 668-676.
- [6] Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, et al. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus[J]. J Neuro Sci, 2000, 20(23): 8727-8735.
- [7] Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, et al. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo[J]. Nature, 1996, 383(6601): 624-628.
- [8] Giovanni S, Biase A, Yakovlev A, et al. In vivo and in vitro characterization of novel neuronal plasticity factors identified following spinal cord injury[J]. J Biol Chem, 2005, 280(3): 2084-2091.
- [9] 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(8): 4710-4715.
- [10] 种玉飞, 陈红, 尤春景. 高压氧对干细胞增殖与分化的影响[J]. 中国康复, 2011, 26(3): 227-228.
- [11] 李志才, 宋一平, 穆小萍, 等. 高压氧治疗脊髓损伤的疗效观察[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2008, 30(3): 150-151.
- [12] 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, 15(5): 369-371.
- [13] Thored P, Wood J, Arvidsson A, et al. Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke[J]. Stroke, 2007, 38(11): 3032-3039.
- [14] Lu PG, Hu SL, Hu R, et al. Functional recovery in rat spinal cord injury induced by hyperbaric oxygen preconditioning[J]. Neurol Res, 2012, 34(10): 944-951.