

施万细胞移植促进大鼠脊髓全横断损伤后大脑皮质锥体神经元和红核神经元的存活

吴立志, 曾园山, 丁英, 郭家松, 李海标

(中山大学中山医学院组织学与胚胎学教研室, 神经科学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨施万细胞移植对大鼠脊髓全横断损伤后大脑皮质感觉运动区神经元和脑干红核神经元存活的影响。【方法】大鼠脊髓全横断损伤后移植吸附施万细胞的胶原或明胶, 术后3个月计数大脑皮质感觉运动区锥体神经元和脑干红核神经元密度以及红核体积。同时以单纯移植胶原或明胶或不移植物体的脊髓损伤大鼠为对照。【结果】脊髓全横断损伤后, 大脑皮质感觉运动区锥体神经元密度和脑干红核神经元密度明显较正常大鼠相应区域内的神经元密度降低; 移植施万细胞的两个组(胶原施万细胞组和明胶施万细胞组)上述两个区域的神经元密度较未移植施万细胞的3个组(对照组, 胶原组和明胶组)高, 差异有统计学意义; 而移植施万细胞的两个组之间比较或未移植施万细胞的3个组之间比较, 上述区域的神经元密度无显著性差异。【结论】脊髓全横断损伤可导致大脑皮质感觉运动区锥体神经元和脑干红核神经元发生死亡, 施万细胞移植能够促进脊髓损伤后大脑皮质感觉运动区锥体神经元和脑干红核神经元的存活。

关键词: 脊髓损伤; 施万细胞; 移植; 红核; 皮质感觉运动区; 神经元

中图分类号: R338.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)01-0010-05

Transplanted Schwann Cells Promote the Neuronal Survival of Cerebral Cortex and Red Nucleus After Rat Spinal Cord Transection

WU Li-zhi, ZENG Yuan-shan, DING Ying, GUO Jia-song, LI Hai-biao

(Division of Neurosciences, Department of Histology and Embryology, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou, 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effects of transplanted Schwann cells on the neuronal survival in sensorimotor cortices of cerebrum and red nuclei of brain stem after rat spinal cord transection. 【Methods】 Three months after the collagen or gelform saturated with cultured Schwann cells was transplanted into the completely transected site of rat spinal cord, the pyramidal neuronal densities of sensorimotor cortices and the neuronal densities of red nuclei were counted, and the volumes of red nuclei were measured. Animals received collagen transplantation, gelatin transplantation only or no transplantation were used as control groups. 【Results】 After spinal cord transection, the neuronal densities in sensorimotor cortices and red nuclei of rats decreased significantly compared with normal rats. The neuronal densities of sensorimotor cortices and red nuclei in the two groups of transplanted Schwann cells (collagen + SCs group and gelatin + SCs group) after spinal cord transection were significantly higher than any one of the three groups not transplanted Schwann cells (collagen group, gelform group and control group). There were no significant differences in the neuronal densities between the two groups of transplanted Schwann cells or among the three groups of not transplanted Schwann cells. 【Conclusion】 Spinal cord transection can lead to neuronal death in sensorimotor cortices of cerebrum

收稿日期: 2003-06-12

基金项目: 国家 973 基金资助项目 (G1999054009); 国家自然科学基金资助项目 (30270700); 广东省社会发展攻关基金资助项目 (2003C33808)

作者简介: 吴立志 (1970-), 男, 四川三台人, 博士后, 讲师; 曾园山, 教授, 合作导师, 课题负责人, 通讯作者. E-mail: yzeng@gz-sums.edu.cn

and red nuclei of brain stem. Schwann cell transplantation may promote the neuronal survival in sensorimotor cortices and red nuclei after spinal cord injury.

Key words: complete spinal cord transection; Schwann cell transplantation; red nucleus; sensorimotor cortex; neuronal survival; rat

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(1): 10-14]

中枢神经系统的神经元是高度分化的,不能分裂和增殖。当其受到损伤而发生死亡后,不能由邻近的神经元增殖替换,因而产生永久性的功能丧失。虽然中枢神经元的轴突受损伤后不能再生,但给予一定条件后仍可以诱导其再生,前提是这些轴突受损伤的神经元必须要存活^[1]。当脊髓发生损伤后,常会引起发出皮质脊髓束和红核脊髓束的神经元胞体的死亡。因此,有必要采取一些治疗策略保护受损伤的神经元,阻止其发生死亡。为此,本文采用胶原或明胶吸附施万细胞移植到大鼠脊髓全横断损伤处,探讨这种移植方法对大脑皮质感觉运动区神经元和脑干红核神经元存活的影响,为深入研究脊髓损伤后下行神经传导束的结构和功能修复提供实验资料。

1 材料和方法

1.1 施万细胞的培养和鉴定

无菌条件下取新生SD大鼠坐骨神经,剥膜、剪碎。胶原酶消化后离心,DMEM/F12培养液悬浮细胞,细目筛网过滤,离心,收集细胞接种在预铺有多聚赖氨酸的培养瓶中。细胞贴壁后用阿糖胞苷抑制成纤维细胞,纯化培养的雪旺细胞。S-100免疫组化鉴定雪旺细胞纯度在90%或以上。

1.2 实验动物分组

雌性SD大鼠25只,体质量175~200g,随机分为5组,各组均行脊髓全横断术。其中,对照组($n=5$)脊髓损伤处不植入异物,胶原组($n=5$)和明胶组($n=5$)于脊髓横断面分别植入I型胶原(中山大学附属第三医院蔡道章教授提供)和明胶海绵(南京制药三厂),施万细胞胶原组和施万细胞明胶组术后以明胶海绵($n=5$)或I型胶原($n=5$)为细胞支架,吸附培养的施万细胞一起移植到脊髓横断处。

1.3 脊髓全横断模型的制备

参考Ramon-Cueto等^[2]的方法。10g/L戊巴比妥钠(25mg/kg)麻醉大鼠,正中切开背部皮肤和皮

下组织,分离肌肉层,暴露T9和T10胸椎,切除T9和T10椎板,暴露其下脊髓节段,于T10和T11节段交界处全横断脊髓,将头尾两侧断端轻轻提起,证实完全横断后放回原位。根据实验设计在横断处植入或不植入相应的移植材料。关闭术口。术后每日3-4次人工排尿直至动物恢复自主排尿。

1.4 脊髓全横断处移植施万细胞

施万细胞用胰蛋白酶消化后制备成密度为 $(1.0\sim 5.0)\times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液。移植时吸取25 μL 细胞悬液滴加到厚约2mm,约同脊髓直径大小的胶原或明胶薄片上,含有施万细胞的胶原或明胶镶嵌入脊髓两横断面之间的间隙中,圆柱形的薄片长轴与脊髓长轴相平行。

1.5 灌注固定、取材和染色

脊髓横断术后90d,麻醉动物,开胸,经左心室插管至主动脉弓。先灌注血管冲洗液,后灌注多聚甲醛固定液。取大脑和脑干组织后固定过夜,300g/L蔗糖浸泡下沉。大脑和脑干做连续冰冻额状切片,片厚25 μm ,每隔4张取一张烘干备用。所有大脑和脑干切片做中性红染色。

1.6 大脑皮质躯体感觉运动区和脑干红核神经元计数

1.6.1 大脑皮质躯体感觉运动区细胞计数 按照大鼠脑立体定位图谱^[3],选取距耳间线约8.6~8.8mm部位的切片,计数大脑皮质感觉运动区内锥体神经元的密度,只将含有清晰细胞核的神经元计算在内。每张切片的每一侧随机选取两个部位,计数单位面积内锥体神经元的数目。每只动物共计数5张切片,共20个计数部位,计算出其平均值。

1.6.2 脑干红核神经元计数 对照大鼠脑立体定位图谱^[3],光镜下用显微网格测量系统测出每张切片每侧红核的面积,同时计数红核内存活的神经元数目。分别以两侧红核面积和存活神经元数目的平均值代表该切片红核面积和存活神经元数目。以该切片的存活神经元数目除以红核面积,即为该切片的存活神经元密度。某只大鼠红核神经元密度即用该大鼠所有切片神经元密度的平均

值表示。

根据卡瓦列里原理(Kawalieli principle)红核体积可由下式算出: $V = t \cdot m \cdot p \cdot d^2 / (M^2 \cdot fc)$

其中 V 为被测物体的体积, t 为切片厚度, m 为切片间隔(即每隔 $m-1$ 张切片取一张用于测量), p 为所有切片上被计数的测点总数, d 为网格测量系统内最小方格的边长, M 为放大倍数, fc 为压缩系数。本文中, $t = 0.025 \text{ mm}$, $m = 5$, $d = 0.5 \text{ mm}$, $M = 10$, fc 视为 1, 则有: $V = 0.3125 \times 10^{-3} P$ (mm^3)

即可以根据被计数的所有切片红核内的测点总数(相当于红核的总面积),求得红核体积。

1.7 统计学处理

各组间大脑皮质感觉运动区存活神经元密度和红核内存活神经元密度分别用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行两两比较,统计软件为SPSS10.0;红核体积用秩和检验进行两两比较。

2 结果

2.1 大脑皮质感觉运动区细胞计数结果

脊髓横断的各组,大脑皮质感觉运动区锥体神经元密度比正常大鼠该区域锥体神经元密度明显降低($P < 0.05$)。脊髓横断后,移植施万细胞的两个组(施万细胞胶原组和施万细胞明胶组)大脑皮质感觉运动区锥体神经元的密度较未移植施万细胞的3个组(对照组,胶原组和明胶组)高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而移植施万细胞的两个组之间锥体神经元的密度没有显著性差异,且未移植施万细胞的3个组之间锥体神经元的密度也没有显著性差异,说明脊髓横断后导致大脑皮质感觉运动区部分锥体神经元死亡,锥体神经元数目减少。单纯移植胶原或明胶对大脑皮质感觉运动区内锥体神经元的存活无影响,而移植施万细胞后,可促进该区域内锥体神经元的存活(表1,图1A,B,C)。

2.2 脑干红核神经元计数结果

各组之间脑干红核体积无显著性差异,但是神经元密度之间存在显著性差异。脊髓横断的各组红核神经元密度较正常大鼠红核神经元密度明显降低;移植施万细胞的两组脑干红核神经元密度显著比未移植施万细胞的两组高;移植施万细胞的两组之间的神经元密度无显著性差异,且未移植施万

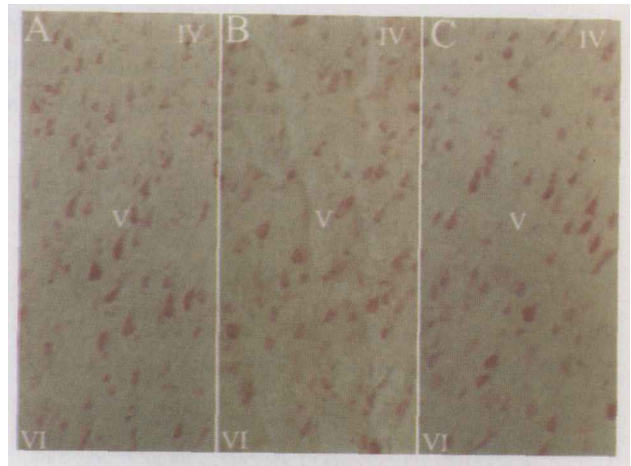


图1 各组动物大脑皮质感觉运动区内锥体细胞层(第V层)锥体神经元密度的变化(IV:第IV层,V:第V层,VI:第VI层)

Fig. 1 The differences of neuronal densities in internal pyramidal layer (layer V) of the sensorimotor cortices between different groups. (IV: layer IV, V: layer V, VI: layer VI). Stained with neutral red ($\times 100$)

A: rats without spinal cord transection; B: spinal cord transection without Schwann cell transplantation; C: spinal cord transection and Schwann cell transplantation

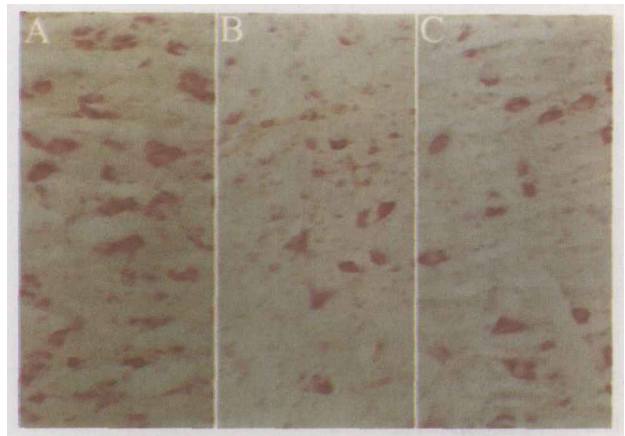


图2 各组动物脑干红核神经元密度的变化

Fig. 2 The differences of neuronal densities in red nuclei of the brain stem between different groups. Stained with neutral red ($\times 100$)

A: rats without spinal cord transection; B: spinal cord transection without Schwann cell transplantation; C: spinal cord transection and Schwann cell transplantation

细胞的3个组之间神经元密度也无显著性差异。说明脊髓横断后导致红核内部分神经元死亡,红核神经元数目减少。单纯移植胶原或明胶对脑干红核内神经元的存活无影响,而移植施万细胞后,可促进该区域内神经元的存活(表2,图2A,B,C)。

表1 大脑皮质感觉运动区内锥体细胞层锥体神经元密度
Table 1 The pyramidal neuronal densities of internal pyramidal layer of the sensorimotor cortices in different groups

Groups	n	Neuronal densities (neurons/mm ²)
Normal	5	875 ± 52
Control	5	442 ± 82 ¹⁾
Collagen	5	448 ± 108 ¹⁾
Gelfoam	5	435 ± 104 ¹⁾
SCs + Collagen	5	660 ± 151 ²⁾
SCs + Gelform	5	642 ± 137 ²⁾

SPSS 11.0, one way ANOVA, between groups (combined) $F = 15.064$, $P = 0.000$.

Compared with normal group, 1) $P < 0.01$ (control group vs normal group $P = 0.000$, collagen vs normal $P = 0.000$, collagen group vs normal group $P = 0.000$); Compared with control group, 2) $P < 0.05$ (SCs + collagen group vs control group $P = 0.037$, SCs + gelform group vs control group $P = 0.043$); Compared with collagen group, 2) $P < 0.05$ (SCs + collagen group vs collagen group $P = 0.039$, SCs + gelform group vs collagen group $P = 0.046$); Compared with gelform group, 2) $P < 0.05$ (SCs + collagen group vs gelform group $P = 0.031$, SCs + gelform group vs gelform group $P = 0.038$)

表2 脑干红核体积及其神经元密度

Table 2 The volumes and neuronal densities of red nuclei of brain stem in different groups

Groups	n	Volumes of red nuclei V/(mm ³)	Neuronal densities n/neurons/(mm ²)
Normal	5	0.43 ± 0.08	279 ± 12
Control	5	0.43 ± 0.08	165 ± 21 ¹⁾
Collagen	5	0.47 ± 0.08	167 ± 19 ¹⁾
Gelfoam	5	0.43 ± 0.06	170 ± 22 ¹⁾
SCs + Collagen	5	0.41 ± 0.05	230 ± 36 ^{2),3)}
SCs + Gelatin	5	0.40 ± 0.12	236 ± 29 ^{2),4)}

SPSS 11.0, one way ANOVA, Volumes of red nuclei, between group (combined) $F = 0.581$, $P = 0.714$.

Neuronal densities, between group (combined) $F = 12.851$, $P = 0.000$.

Compared with normal group, 1) $P < 0.01$ (control group vs normal group $P = 0.000$, collagen group vs normal group $P = 0.000$, gelform group vs control group $P = 0.000$), 2) $P < 0.05$ (SCs + collagen group vs normal group $P = 0.047$, SCs + gelform group vs normal group $P = 0.049$); Compared with control group, 2) $P < 0.01$ (SCs + collagen group vs control group $P = 0.002$, SCs + gelform group vs control group $P = 0.000$); Compared with collagen group, 2) $P < 0.01$ (SCs + collagen group vs collagen group $P = 0.003$, SCs + gelform group vs control group $P = 0.000$); Compared with gelfoam group, 3) $P < 0.01$ (SCs + collagen group vs gelform group $P = 0.004$, 4) $P < 0.05$ (SCs + gelform group vs gelform group $P = 0.02$)

3 讨论

脊髓损伤可致红核脊髓束和皮质脊髓束损伤,往往引起脑干红核和大脑皮质感觉运动区部分神经元的死亡。有报道,在颈段脊髓半横断损伤后,4~8周内约有25%~40%的红核神经元死亡,即使存活神经元其胞体也发生萎缩^[4,5]。而Novikova等^[6]报道颈段脊髓损伤后,红核神经元死亡率可达51%。在以前的研究中,我们注意到脊髓半横断损伤后移植施万细胞,可以促进损伤部位尾侧端司感觉的背核神经元的存活^[7],因此我们考虑施万细胞是否也可以促进损伤部位头侧端司运动的神经元存活。本文观察到,与正常大鼠相比,脊髓横断的大鼠大脑皮质感觉运动区锥体神经元密度和脑干红核神经元密度明显降低,提示横断后这两个部位有部分神经元死亡。脊髓损伤后移植施万细胞,3个月后两个组大鼠(胶原施万细胞组和明胶施万细胞组)大脑皮质感觉运动区锥体神经元的密度较未移植施万细胞的3个组(对照组,胶原组和明胶组)高,差异有统计学意义;同时,这两个组脑干红核神经元密度也显著比未移植施万细胞的3个组高,说明施万细胞移植也能够促进脊髓损伤大鼠大脑感觉运动区和脑干红核神经元的存活。目前未见有关脊髓损伤后大脑感觉运动区神经元存活情况的研究报道。也没有见到有关施万细胞移植促进全横断脊髓损伤动物大脑感觉运动区和红核神经元存活的报道。我们认为,全横断脊髓损伤后移植施万细胞能够促进损伤动物大脑感觉运动区和红核神经元的存活,可能和植入的施万细胞分泌的多种神经营养因子有关。神经营养因子不仅能减轻被切断的脊髓小脑束和皮质脊髓束溃变程度^[8],促进损伤的神经元存活^[6]。还可以阻止损伤的神经元胞体萎缩,并促进它们的轴突再生^[9-11]。据报道,施万细胞能够促进与其共同培养的视网膜神经细胞突起的生长有促进作用,这可能也和施万细胞合成分泌的多神经营养因子有关^[12]。当然也不排除还有其它因素存在。我们曾经报道,施万细胞促进脊髓背核内受损伤神经元存活可能与其胞体内一氧化氮合酶活性适度增加有关^[7]。

本文注意到,脊髓横断的各组动物脑干红核体积与正常动物脑干红核体积相比没有显著性差异,提示脊髓横断后虽然有红核神经元死亡,但红核体

积变化不大,这可能与红核内反应性神经胶质细胞增生,填补了死亡神经元的位置有关。

存活神经元是脊髓损伤后结构和功能恢复的基础,动物运动功能恢复程度同存活神经元的分布、轴突再生情况正相关^[1]。在新生大鼠全横断脊髓并移植胚胎神经组织的研究中发现,脑干神经轴突有再生的动物,可出现不同程度的后肢协调运动,而脑干和大脑运动神经元均有轴突再生的动物,其运动功能几乎与正常动物无异。此前,我们^[13]曾报道胶原或明胶吸附施万细胞移植能促进全横断脊髓损伤结构和功能的修复。该文中 3 只自主运动功能恢复最好的动物其脑干红核和大脑感觉运动区均能观察到被荧光金逆行标记的神经元胞体,表明这些神经元发生了轴突再生。而其它动物这两个部位被逆行标记的神经元较少或没有被标记上,与它们运动功能恢复较差的结果相一致。

根据本文的结果,我们认为,施万细胞移植能够保护大脑皮质感觉运动区和脑干红核内受损伤的神经元,这是它促进损伤脊髓内断裂的皮质脊髓束和/或红核脊髓束再生的原因之一。

参考文献:

- [1] Hase T, Kawaguchi S, Hayashi H, *et al.* Spinal cord repair in neonatal rats: a correlation between axonal regeneration and functional recovery[J]. *Eur J Neurosci*, 2002, 15(6): 969-74.
- [2] Ramon-Cueto A, Cordero M I, Santos-Benito F F, *et al.* Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia[J]. *Neuron*, 2000, 25(2): 425-35.
- [3] 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 17-60.
- [4] Mori F, Himes B T, Kowada M, *et al.* Fetal spinal cord transplants rescue some axotomized rubrospinal neurons from retrograde cell death in adult rats[J]. *Exp Neurol*, 1997, 143(1): 45-60.
- [5] Houle J D, Ye J H. Survival of chronically-injured neurons can be prolonged by treatment with neurotrophic factors[J]. *Neuroscience*, 1999; 94(3): 929-36.
- [6] Novikova L N, Novikov L N, Kellerth J O, *et al.* Survival effects of BDNF and NT-3 on axotomized rubrospinal neurons depend on the temporal pattern of neurotrophin administration[J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12(2): 776- 80.
- [7] 张燕青, 曾园山, 吴立志, 等. 施万细胞对大鼠脊髓半横切后背核神经元存活及其表达 NOS 的影响 [J]. *解剖学报*, 2003, 34(1): 67-72.
- [8] Sayer F T, Oudega M, Hagg T. Neurotrophins reduce degeneration of injured ascending sensory and corticospinal motor axons in adult rat spinal cord[J]. *Exp Neurol*, 2002, 175(1): 282-96.
- [9] Kwon B K, Liu J, Messerer C, *et al.* Survival and regeneration of rubrospinal neurons 1 year after spinal cord injury[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(5): 3246-51.
- [10] Hiebert G W, Khodarahmi K, McGraw J, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor applied to the motor cortex promotes sprouting of corticospinal fibers but not regeneration into a peripheral nerve transplant[J]. *J Neurosci Res*, 2002, 69(2): 160-8.
- [11] Kobayashi N R, Fan D R, Giehl K M, *et al.* BDNF and NT- 4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP- 43 and α 1-tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration[J]. *J Neurosci*, 1997, 17(24): 9583-95.
- [12] 杨智宽, 葛 坚, 刘海泉, 等. 大鼠雪旺细胞对视网膜神经成活及突起生长的影响 [J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(4S): 64-7.
- [13] 吴立志, 曾园山, 李海标, 等. 胶原或明胶吸附雪旺细胞移植促进全横断脊髓损伤修复的研究 [J]. *解剖学报*, 2003, 34 (3): 250-6.

(编辑 张恩健)

· 简 讯 ·

我校在全国学术榜取得好成绩

根据 2003 年 12 月中国科技信息研究所公布的统计数据,我校在 2002 年度全国科技论文学术榜中被收录、引证的论文大幅增加。在《SCI》检索系统中,我校被收录论文 442 篇,在全国高校排名第 11 位;被引证论文 403 篇,1 034 次,在全国高校排名第 10 位。根据 1 553 种国内科技统计源期刊统计,我校发表论文共 2 428 篇,居全国高校第 11 位;论文被引证 3 396 次,居全国高校第 5 位。

来源:新闻中心 2003-12-16