

TGF- β 1 和 CNTF 在大鼠移植神经干细胞后的损伤脊髓中的表达

巴迎春¹⁾, 范艳¹⁾, 王金德¹⁾, 唐少峰²⁾, 王廷华³⁾

(1) 昆明医学院人体解剖学教研室; 2) 成都军区昆明总医院, 云南昆明 650032; 3) 昆明医学院神经科学研究所, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 研究在受损伤脊髓移植神经干细胞后对其 TGF- β 1 和 CNTF 表达的影响. **方法** 将正常成年 SD 雌性大鼠 35 只, 分为: 单纯脊髓全横断组、假手术组、NSCs 移植组. NSCs 移植组在脊髓全横断后第 7 天时进行 NSCs 移植, 其它 2 组不移植 NSCs; 通过 RT-PCR 测定脊髓损伤局部头侧在移植术后 3, 7, 14 d TGF- β 1 和 CNTF 的表达. **结果** 移植术后 3 d, 7 d, 单纯全横断组 TGF- β 的表达大于神经干细胞组. CNTF 仅在术后 7 d, 前者表达大于后者, 其余时间段 2 组间 2 因子的表达无统计学意义. **结论** 神经干细胞移植使脊髓损伤局部 TGF- β 1 的表达降低, 但对 CNTF 表达的影响不大.

[关键词] 脊髓损伤; TGF- β ; CNTF

[中图分类号] R651 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 03-0001-05

Expression of TGF- β 1 and CNTF in Injured Spinal Cord after NSCs Transplantation

BA Ying-chun¹⁾, FAN Yan¹⁾, WANG Jin-de¹⁾, TANG Shao-feng²⁾, WANG Ting-hua³⁾

(1) Dept. of Human Anatomy; 2) Kunming General Hospital of Chengdu Military Command of Chinese PLA, Kunming Yunnan 650032; 3) Institute of Neuroscience, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of neural stem cells (NSCs) transplantation on the expression of TGF- β 1 and CNTF in injured spinal cord. **Methods** 35 SD Female rats were randomly divided into 3 groups: merely spinal cord transection group, sham operation group and NSCs transplantation group. NSCs transplantation was performed on 7th d after spinal cord transection in NSCs transplantation group, but was not performed in the other two groups. Expression of TGF- β 1 and CNTF in the proximum of the injury spinal cord were detected on 3rd d, 7th d, 14th d after NSCs transplantation by RT-PCR. **Results** Expression level of TGF- β 1 in merely spinal cord transection group was higher than that in NSCs transplantation group on 3rd d and 7th d. Expression level of CNTF in merely spinal cord transection group was only higher than that in NSCs transplantation group on 7th d. **Conclusion** NSCs transplantation can downregulate the expression of TGF- β 1, but has no effect on the expression of CNTF in injured spinal cord.

[Key words] Spinal cord injury; TGF- β 1; CNTF

脊髓损伤 (spinal cord Injury, SCI) 治疗仍是医学界的一大难题, SCI 的实验研究也是医学研究的热点. 脊髓损伤包括原发性损伤和继发性损伤, 原发性损伤是指原发损伤部位在机械力量的直接作用下, 首先形成出血坏死灶^[1], SCI 后长期功能

障碍和神经细胞难以再生与细胞凋亡有着重要关系^[2,3].

在本研究中, 将正常成年 SD 雌性大鼠, 分为: 单纯脊髓全横断组、假手术组、NSCs 移植组. NSCs 移植组在脊髓全横断后第 7 天时进行

[基金项目] 云南省自然科学基金资助项目 (2007C0048R)

[作者简介] 巴迎春 (1971~), 男, 云南麻栗坡县人, 医学博士, 副教授, 主要从事解剖学教学与研究工作.

[通讯作者] 王廷华. E-mail: tinghua_neuron@263.net

NSCs 移植, 其它 2 组不移植 NSCs; 通过 RT-PCR 测定脊髓损伤局部头侧在移植术后 3、7、14 d 转化生长因子 (transforming growth factor, TGF- β 1) 和睫状神经营养因子 (ciliary neurotrophic factor, CNTF) 的变化来探讨神经干细胞移植促进受损伤脊髓神经再生的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

DMEM/F12(1:1, Gibco), 小牛血清(Hyclone), 多聚赖氨酸 (Invitrogen), 鼠抗人 Nestin 单克隆抗体 (Chemicon), ABC 试剂盒 (Vecter)。

1.2 动物模型制作及分组

1.2.1 动物分组 正常成年 SD (Sprague-Dawley) 雌性大鼠 35 只 (来自昆明医学院动物科), 分为 3 组: 单纯脊髓全横断组 15 只, 假手术组 5 只 (仅仅打开椎板, 但不横断脊髓), NSCs 移植组 15 只。NSCs 移植组在脊髓全横断后第 7 天时进行 NSCs 移植, 而单纯全横断组在脊髓全横断后第 7 天时同法于损伤部位附近注射细胞培养液, 但是不含 NSCs, 假手术组也是在假手术后第 7 天时在同一部位注射细胞培养液, 也不含 NSCs。

1.2.2 脊髓全横断模型制作 将大鼠用小号弯头止血钳撬开 T₉ 椎板, 暴露脊髓后, 挑起脊髓, 用眼科剪贴着椎管的前壁和侧壁剪断脊髓, 在剪断脊髓后再用尖镊沿椎管壁反复绞断。术后每日用手挤压大鼠膀胱协助排尿 2 次, 连续 7 d, 1 次/d 腹腔注射青霉素抗感染, 7 d 后每天 1 次排尿以及腹腔注射青霉素。

1.3 神经干细胞体外培养及免疫组化鉴定

1.3.1 神经干细胞体外培养 选取孕 E12d 的 GFP 转基因小鼠, 无菌条件下取胎鼠海马, 制成 1 mm³ 组织块。加入 DMEM/F12 1:1, 其中添加 1% N2, 20 μ g/L bFGF, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 50 000 U/L 青霉素, 50 mg/L 链霉素, 用吸管吹打 20~30 次, 细胞滤网过滤后制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 2.5×10^8 /L, 接种于培养瓶里, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养。

1.3.2 免疫组化染色鉴定 将原代培养 7 d 的神经球, 接种到经多聚赖氨酸 (0.01%, 37 $^{\circ}$ C 1 h) 处理过的培养板中, 待其贴壁后用 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min。PBS 洗 3 次, 3% 过氧化氢 15 min, PBS 洗 3 次, 非免疫性动物血清封闭 30 min, 加入一抗 Nestin (1:200) 抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗 3 次, 第二代通用型二步法检测系统, 按说明书操

作, DAB 显色 5 min。

1.4 神经干细胞移植及免疫抑制剂的使用

在大鼠脊髓全横断后第 7 天时对 NSCs 移植组大鼠进行 NSCs 移植: 移植位点位于脊髓损伤局部以上 1 cm、0.8 cm、0.6 cm, 进针深度为 0.7 mm, 后退 0.2 mm 后注射细胞, 进针位置为皮质脊髓束所在的位置, 在立体定向仪下用 10 μ L 微量进样器将 10 μ L 体外培养的 NSCs (细胞量控制在 2×10^5 个/10 μ L, 来源于 GFP 转基因小鼠的胎鼠) 缓慢注入上述位点, 单纯全横断组与假手术组也与 NSCs 移植组同时同法同剂量注射免疫抑制剂 (环孢素)。

1.5 RT-PCR 组织取材

将单纯全横断组、神经干细胞移植组的大鼠在第 2 次手术 (指的是在脊髓全横断后的第 7 天对大鼠脊髓进行神经干细胞移植或细胞培养液注射的手术) 后 3 d、7 d、14 d, 假手术组在第 2 次手术后 7 d, 以 3.6% 水合氯醛按 1 mL/100 g 腹腔麻醉, 用经 0.1% DEPC 水浸泡、高压蒸汽消毒的剪子、止血钳等手术器械, 打开椎管, 暴露脊髓, 取脊髓损伤局部 (疤痕) 头侧, 用 DEPC 处理水冲洗去血迹, 小心去脊膜, 置于预先加有 1 mL TRIZOL 裂解液的 EP 管中, 遵照 Trizol 试剂盒说明书进行操作。而后其浓度用 Nanodrop 分光光度仪 (ND-1000) 测量, 总 RNA 行逆转录反应。用 Revert Aid First Strand cDNA 合成试剂盒 (Fermentas Company, U.S.A) 生成 cDNA。总 RNA (每次反应 4 μ g) 被加入 “master mix” (12 μ L) (含有终浓度的总 RNA, oligo-dT 引物和 DEPC 处理水)。标本混合液在 PCR 仪中 70 $^{\circ}$ C 反应 5 min。而后 5 \times 反应缓冲液, RNase 抑制剂和 10 mM dNTP Mix 被加入反应体系中。37 $^{\circ}$ C 反应 5 min, 加入 M-MLV 逆转录酶使其总体积达 20 μ L。标本混合液接着在 42 $^{\circ}$ C 下孵育 60 min, 并于 70 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 以行逆转录反应。然后进一步行 PCR 扩增, 以获得 cDNA 样品, 先 94 $^{\circ}$ C 5 min 变性, 然后 94 $^{\circ}$ C 1 min 变性, 在下列温度下退火: β -actin, 52.5 $^{\circ}$ C, 54 $^{\circ}$ C, 72 $^{\circ}$ C 1 min 延伸反应, 行 30 个循环, 而后最终 72 $^{\circ}$ C 10 min 延伸。25 μ L 整的 PCR 反应产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 反应产物的分子大小用溴化乙锭染色显示 (见表 1)。

1.6 统计学方法

电泳条带在用 Gene Tool 软件分析光密度值后, 以目的条带光密度/ β -actin 条带光密度的比值来进行统计学分析。采用 SPSS 统计软件包对所测得的各基因与 β -actin 平均光密度的比值进行方差分

析和 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示.

表 1 各个因子的引物、产物及退火温度

Tab. 1 The primers, products and annealing temperature of the factors

因子	上游引物	下游引物	产物长度 (bp)	退火温度 ($^{\circ}\text{C}$)
β -actin	5'GTAAAGACCTCTATGCCAACA 3'	5'GGACTCATCGTACTCCTGCT 3'	227	52.5
TGF- β 1	5'GTGAGCACTGAAGCGAAAAGC3'	5'TAATGGTGGACCGCAACAAC 3'	332	54
CNTF	5'CTTTCGCAGAGCAAACACCT 3'	5'CATCCCATCAGCCTCATTTT 3'	422	52

2 结果

2.1 神经干细胞在体内的存活

将原代培养 7 d 的 NSCs 接种后 24 h 神经球贴壁生长, 继续培养 24 h, 进行 Nestin 免疫细胞化学染色, 克隆球大部分细胞 Nestin 抗原呈阳性 (见图 1A). 12 周时在神经干细胞移植组大鼠脊髓的冰冻切片上可见到大量的绿色荧光细胞分布于细胞移植位点附近 (见图 1B).

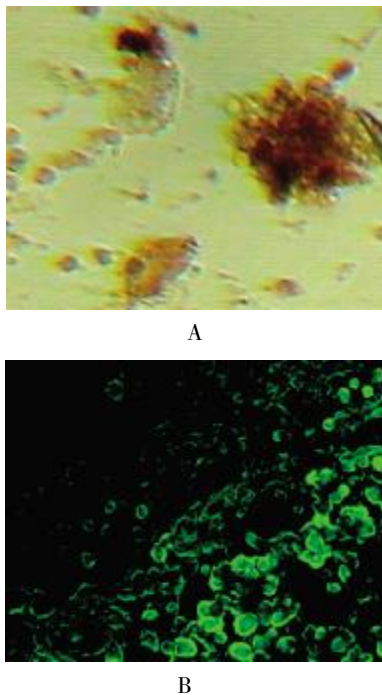


图 1 神经干细胞的鉴定及移植后的存活 ($\times 200$)

Fig. 1 The identification of NSCs and survival after transplantation ($\times 200$)

A: Nestin 阳性反应的克隆球; B: 神经干细胞移植组在 12 周时的绿色荧光细胞.

2.2 RT-PCR

TGF- β 1: 术后 3 d, 3 组间差异有统计学意

义 ($P < 0.05$), 单纯全横断组的表达大于神经干细胞组, 而神经干细胞组又大于假手术组, 术后 7 d 同术后 3 d. 术后 14 d, 假手术组和另 2 组有差异, $P < 0.05$, 但单纯全横断和神经干细胞移植组无差异 ($P > 0.05$).

CNTF: 术后 3 d, 单纯全横断和神经干细胞移植组无差异 ($P > 0.05$), 术后 7 d, 单纯全横断组和另 2 组有差异, 单纯全横断组表达最大 ($P < 0.05$). 术后 14 d, 假手术组和另 2 组有差异 ($P < 0.05$), 但单纯全横断组和神经干细胞移植组无差异 ($P > 0.05$), 见图 2 和表 2.

表 2 术后各组大鼠 2 种因子在 3 个时间段表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The comparison of the expression levels of these factors in three time stage among rats in the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TGF- β 1	CNTF
假手术组			
3 d	5	0.40 \pm 0.07	0.58 \pm 0.08
7 d	5	0.40 \pm 0.07	0.58 \pm 0.08 [#]
14 d	5	0.40 \pm 0.07	0.58 \pm 0.08
单纯横断组			
3 d	5	0.65 \pm 0.10*	0.85 \pm 0.09
7 d	5	0.87 \pm 0.1*	0.77 \pm 0.12
14 d	5	0.56 \pm 0.09*	0.76 \pm 0.11*
神经干细胞移植组			
3 d	5	0.54 \pm 0.06*	0.90 \pm 0.09
7 d	5	0.77 \pm 0.08*	0.55 \pm 0.11 [#]
14 d	5	0.61 \pm 0.10*	0.73 \pm 0.12*

与假手术组同期比较, * $P < 0.05$; 与单纯横断组同期比较, [#] $P < 0.05$.

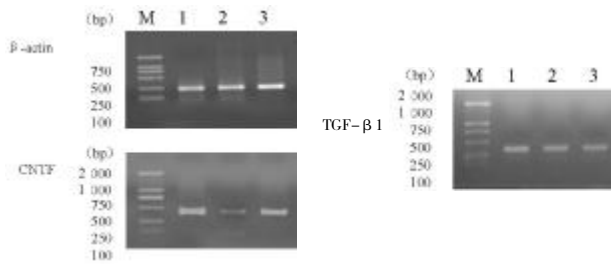


图 2 术后 14 d 各个因子在这 3 组大鼠的表达

Fig. 2 Expression of the three factors on 14d after operation in rats in three groups

M:Marker; 1:假手术组长; 2:单纯横断组; 3:神经干细胞移植组.

3 讨论

将培养的细胞进行 Nestin 免疫细胞化学染色, Nestin 抗原呈阳性, 说明所培养的细胞是 NSCs^[4], 12 周时在 NSCs 移植组大鼠脊髓的冰冻切片上可见到大量的绿色荧光细胞分布于细胞移植位点附近, 说明全横断脊髓后 12 周内, 移植的 NSCs 能够在大鼠脊髓内存活.

凋亡 (apoptosis, APO) 是机体在生理条件下受刺激后, 启动自身内部机制, 经过多途径信号传递, 使细胞产生形态、生化变化或是在细胞衰老过程中各种细胞功能逐渐丧失的结果^[5], 原发性损伤尽管可直接造成损伤部位的细胞死亡, 但脊髓大的损伤主要源于继发性损伤机制的存在, 凋亡在继发性损伤中起重要作用.

TGF- β 1 能够促进疤痕形成^[6], 而单纯全横断组 TGF- β 1 的表达在第 2 次手术后 3 d 和 7 d 都是最高的, 与脊髓疤痕开始形成有关^[7], 同时 TGF- β 1 又有调节细胞的生长及分化, 诱导细胞凋亡的作用^[8], 而神经干细胞移植组的 TGF- β 1 表达较单纯全横断组低, 提示神经干细胞移植后能够减少神经细胞凋亡的原因之一就是抑制了 TGF- β 1 的表达, 同时也通过抑制 TGF- β 1 的表达来减轻损伤局部的疤痕形成, 这些都能够有力地促进再生修复, 这与文献报道的神经干细胞移植可以减少脊髓周围组织坏死, 抑制炎症、胶质疤痕形成、减轻细胞的再损伤相符^[9,10].

CNTF: 睫状神经营养因子 (CNTF) 是 NTFs 中的一员, 具有明显的促进中枢和周围神经元存活、防止受损神经元退变和维持运动功能的作用^[11,12], 它广泛分布于 CNS 中, 在脊髓中主要分布在白质的前索和外侧索, 星形胶质细胞、少突胶质细胞和神经元胞质中都有表达. 一般认为白质中星形胶质细胞是正常脊髓中 CNTF 的主要来源^[13,14],

本研究中, CNTF 在术后 7 d, 单纯全横断组表达最大, 术后 14 d, 假手术组和另 2 组有差异, 但单纯全横断组和神经干细胞移植组无差异. 这些变化可能是由于在脊髓损伤早期, 神经元胞体、轴突和髓鞘直接破坏, 损伤的远侧端发生 Wallerian 变性激活星形胶质细胞, 活化的星形胶质细胞 CNTF 的表达量反应性增强, 短时间内产生并释放大量的 CNTF 聚集到损伤处, 参与局部修复过程, 这是 CNTF mRNA 表达量迅速而剧烈升高的主要原因^[15], 而术后 3 d, 单纯全横断组和神经干细胞移植组无差异可能是由于两者都能刺激损伤局部大量释放 CNTF, 而神经干细胞又刚移植到脊髓损伤局部, 其减轻细胞凋亡的作用还未充分发挥出来, 故与单纯全横断组一样都有着较强的炎症反应, 导致大量释放 CNTF, 但到了术后 7 d, 神经干细胞移植组的炎症快速消退, 因此 CNTF 表达降到最低, 甚至低于同期的单纯全横断组. 这些说明神经干细胞移植后通过减轻炎症反应使 CNTF 的表达下降.

从上可以得出结论: 神经干细胞移植后通过促进脊髓损伤区域神经细胞存活、减轻炎症和疤痕形成来促进脊髓损伤后的再生修复.

[参考文献]

- [1] TATOR C H. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury [J]. Brain Pathol, 1995, 5 (4):407-413.
- [2] BYRNES K R, STOICA B A, FRICKE S, et al. Cell cycle activation contributes to postmitotic cell death and secondary damage after spinal cord injury [J]. Brain, 2007, 130 (11):2977-2992.
- [3] CITTELLY D M, NESIC O, OHNSON K, et al. Determinantal effects of antiapoptotic treatments in spinal cord injury [J]. Exp Neurol, 2008, 210 (2):295-307.
- [4] 赵元元, 陈书达, 张卫华, 等. BDNF 修饰神经干细胞的建立及脑内移植研究 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2009, 26(4):399-402.
- [5] 曹炜, 牛建昭. 细胞凋亡 (apoptosis) 研究概况 [J]. 解剖学报, 1995, 26 (4):443.
- [6] 贾赤字, 陈璧. TGF- β 1 对疤痕形成的影响 [J]. 中华整形烧伤外科杂志, 1999, 15(1):72-73.
- [7] 李俊丽, 赵铎. 脊髓损伤机制研究进展 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2009, 12(24):72-73.
- [8] 黄君富, 房殿春, 鲁荣. TGF- β 家族的细胞信号转导 [J]. 生理科学进展, 1999, 30(3):255-258.
- [9] GAGE F H. Mammalian neural stem cell [J]. Science, 2000, 287(5457):1433-1438.

(下转第 7 页)

兴奋性氨基酸等内源性有害物质的释放,防止细胞凋亡,促进神经细胞结构和功能恢复;(6)抑制脑损伤和缺血缺氧后的炎性反应,影响信号传导及早期基因表达^[4,5]。亚低温可能是通过干预脑损伤病理级联反应的多个环节而最终产生可靠的神经保护作用^[6]。亚低温治疗强调掌握正确的时间窗、脑灌注压和平均动脉压,即早期(伤后12h以内)脑灌注压不低于50 mmHg、平均动脉压不低于70 mmHg^[7,8]。对于有严重脑干损伤表现而无脑干功能衰竭的病例,亚低温治疗能帮助患者度过水肿高峰期而生存,但对于严重脑干功能衰竭的患者,不主张亚低温治疗法,其具体机制有待于进一步研究^[9]。

本研究显示,亚低温治疗组神经功能缺损评分及显效率均明显优于对照组。亚低温疗法可明显改善神经功能缺损评分,提高原发性脑干损伤临床疗效,且并发症少,价格低廉,操作便捷,值得在临床上进行广泛推广。

[参考文献]

- [1] 江基尧,朱诚,徐蔚,等.现代颅脑损伤学[M].第3版.上海:第二军医大学出版社,2010:189-191.
- [2] 王忠诚.王忠诚神经外科学[M].武汉:湖北科学技术出版社,2005:374-455.
- [3] YAN Y,TANG W,DENG Z,et al. Cerebral oxygen metabolism and neuroelectrophysiology in a clinical study of severe brain injury and mild hypothermia[J]. Clin Neurosci, 2010,17(2):196-200.
- [4] CHENG S L,CHEN Y Q,REN A Z,et al. Treatment of primary trauma in the brainstem: analysis of 126 cases[J]. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao,2002,22(9):851-852.
- [5] YUE T L,GU J L,LYSKO P G,et al. Neuroprotective effects of phenyl-t-butyl-nitron in gerbil global brain ischemia and in cultured rat cerebellar neurons [J]. Brain Res,2007,574(1-2):193-197.
- [6] JIANG J Y,LYETH B G,KAPASI M Z,et al. Moderate hypothermia reduces blood-brain barrier disruption following traumatic brain injury in the rat [J]. Acta Neuro-pathol, 2008,84:495-499.
- [7] RESNIEK D K,MARION D W,DARBY J M. The effect of hypothermia on the incidence of delayed traumatic intracerebral hemorrhage [J]. Neurosurgery,2009,34:252-226.
- [8] YAMASHIRO T,MITSUHATA H,TAMAGAWA K,et al. Reevaluation of protective effect of mild hypothermia on brain ischemia following massive bleeding [J]. Masui, 2007,44(9):1273-1281.
- [9] KARIEBE H,ZAROW G J,WEISTEIN P R. Use of mild-hyperthermia vesus mannitol to reduce infarct size after temporary middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Neurosury,2011,83:93-97.
- (2012-01-19 收稿)
- (上接第4页)
- [10] BLITS B,KITAY B M,FARAHVAR A,et al. Lentiviral vector mediated transduction of neural progenitor cells before implantation into injured spinal cord and repair tissue [J]. Restor Neurol Neurosci,2005,23(5-6):313-324.
- [11] ISHII K,NAKAMURA M,DAI H,et al. Neutralization of ciliary neurotrophic factor reduces astrocyte production from transplanted neural stem cells and promotes regeneration of corticospinal tract fibers in spinal cord injury [J]. J Neurosci Res,2006,84(8):1669-1681.
- [12] 石向群,陆兵勋. CNTF对运动神经损伤后神经元的保护作用研究[J]. 现代康复,2000,4(10):1502-1503.
- [13] DALLNER C,WOODS A G,DELLER T,et al. CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain [J]. Glia,2002,37(4):374-378.
- [14] 顾晓松,严志强,范明,等. CNTF和NGF在损伤后变性神经组织中的表达与分布 [J]. 中华显微外科杂志,1998,21(2):121-123.
- [15] 赵彩霞,刘佳,章为. 大鼠脊髓横断损伤后CNTF mRNA的表达变化[J]. 四川大学学报(医学版),2009,40(3):412-414.
- (2012-02-10 收稿)