

大鼠脊髓损伤亚急性期 NSCs 脊髓内移植对脊髓神经电生理的影响

巴迎春¹⁾, 范艳¹⁾, 王金德¹⁾, 王廷华²⁾

(1) 昆明医学院人体解剖学教研室; 2) 神经科学研究所, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 研究神经脊髓损伤的亚急性期(第7天)神经干细胞(neural stem cells, NSCs)脊髓内移植对大鼠受损伤脊髓神经电生理的影响。**方法** 正常成年SD雌性大鼠15只,分为3组:单纯全横断组、假手术组和神经干细胞移植组。测定3组大鼠的皮层体感诱发电位(cortical somatosensory evoked potential, CSEP)、运动诱发电位(motion evoked potential, MEP)和电针刺激大脑皮质运动区。**结果** 神经干细胞移植组的诱发电位CSEP、MEP的潜伏期短于单纯脊髓全横断组大鼠,电针刺激大脑皮质运动区发现NSC移植组大鼠双后肢出现明显收缩,且以对侧更为明显。**结论** 神经干细胞脊髓内移植后能部分促进损伤脊髓的感觉和运动传导功能的恢复。

[关键词] NSCs; CSEP; MEP; 电针

[中图分类号] R651 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706(2012)02-0035-05

Effects of Neural Stem Cells Transplantation on Spinal Nerves Electrophysiology in Subacute Stage

BA Ying-chun¹⁾, FAN Yan¹⁾, WANG Jin-de¹⁾, WANG Ting-hua²⁾

(1) Dept. of Human Anatomy; 2) Institute of Neuroscience, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of neural stem cells transplantation on spinal nerves electrophysiology in subacute stage. **Methods** 15 femal adult rats were divided into three groups: sham operation group, merely spinal cord transection group, and NSC transplantation group. The cortical somatosensory evoked potential (CSEP) and Motion Evoked Potential (MEP) were evaluated and the cortical motor area stimulation by electro-acupuncture was performed in the three groups. **Results** Latency of CSEP and MEP of rats in NSC transplantation group was shorter than merely spinal cord transection group. Neural stem cells transplantation led to hind limbs contraction after cortical motor area stimulation by electro-acupuncture. **Conclusion** Neural stem cells transplantation can partially promotes the recovery of sensory nerve and motor nerve conduction of injured spinal cord.

[Key words] NSCs; CSEP; MEP; Electroacupuncture

脊髓损伤是当今国内外疑难病症之一。随着现代科学的迅速发展,治疗方法较多,大多数学者早期以椎板切除减压,籍以改善脊髓的微循环,保护残存的神经元和传导束,取得了一定成效,但多数病例在手术后的数月内甚至终生仍然处于下肢瘫痪,二便失禁,肌肉萎缩,功能丧失,恢复无望的状态。近年来,国内外脊髓损伤后治疗的研究焦点之一集中在神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的研究上,以望取得突破性的进展。

NSCs 移植治疗脊髓损伤(spinal cord injury,

SCI)的机制可能为: NSCs 分化为神经元和胶质细胞桥接损伤区域,重新建立传导通路,形成功能性突触^[1];提供支持的环境促进神经元轴突的再生:如分泌多种神经营养因子^[2],改善脊髓局部微环境并启动再生相关基因的顺序表达,使损伤轴突开始再生。

本研究首先建立脊髓全横断模型然后进行NSCs移植,通过皮层体感诱发电位(cortical somatosensory evoked potential, CSEP)、运动诱发电位(motion evoked potential, MEP)和电针刺激大

[基金项目] 云南省科技厅应用基础研究基金资助项目(2007COO48R)

[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

脑皮质运动区的测定, 研究 NSCs 在大鼠脊髓损伤亚急性期移植对脊髓神经电生理的影响。

1 材料与方法

1.1 实验设备

超净工作台 (北京半导体设备一厂), CO₂ 恒温恒湿培养箱 (Shellab, USA)。

1.2 动物分组

成年 SD 雌性大鼠 15 只, 分为 3 组, 单纯全横断组 (全横断脊髓), 假手术组 (仅打开椎板, 但不横断脊髓), 神经干细胞移植组 (全横断脊髓后第 7 天时进行神经干细胞移植)。

进行诱发电位 CSEP、MEP 和电针刺激大脑皮质运动区的测定。神经干细胞移植组在脊髓全横断 (为第 1 次手术) 后第 7 天时进行神经干细胞移植 (为第 2 次手术), 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 (为第 2 次手术), 但是不含神经干细胞, 假手术组也是在假手术后第 7 天时在同样部位注射细胞培养液 (为第 2 次手术), 也不含神经干细胞。

1.3 脊髓全横断模型的制作

将大鼠用 3.6% 的水合氯醛麻醉后俯卧固定在木板上, 消毒铺巾, 剪毛。背部摸到大鼠的 T₂ 棘突, 用解剖刀切开皮肤, 精确定位第 9 胸椎棘突后用小号弯头止血钳撬开 T₉ 椎板, 暴露脊髓后, 可见红色的后正中动脉, 挑起脊髓, 用眼科剪贴着椎管的前壁和侧壁剪断脊髓 (横断的是 T₁₁ 脊髓节段^[6,7]), 脊髓水肿, 两断端迅速回缩, 为保证能彻底横断脊髓, 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, 每天 1 次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。

1.4 神经干细胞体外培养及免疫组化鉴定

1.4.1 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 (Hyclone), 其中添加 1% N₂ (Gibico), 20 μg/L bFGF (Invitrogen), 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 × 10⁶/L, 接种于培养瓶里, 置 37 °C、5%CO₂ 培养箱培养。每隔约 7 d 传代 1 次。

1.4.2 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 °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 (Chemicon, 1:200) 抗体 (0.1M PBS 稀释, 含 1% 羊血清和 0.1% Triton X-100), 4 °C 过夜, PBS 洗 3 次, 第二代通用型二步法检测系统 (北京中杉), 按说明书操作, DAB 显色 5 min。

1.5 神经干细胞移植, 免疫抑制剂使用的具体方法

在大鼠脊髓全横断 7 d 时对神经干细胞移植组大鼠 (在此之前该组还未移植细胞) 进行神经干细胞移植: 移植位点位于疤痕上缘以上 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, 进针位置在后正中动脉边缘, 皮质脊髓束所在的位置, 在立体定向仪下用 10 μL 微量进样器将 10 μL 体外培养的神经干细胞 (细胞量控制在 2 × 10⁵ 个/10 μL, 来源于 GFP 转基因小鼠的胎鼠) 缓慢注入上述位点, 在 10 min 内将细胞全部注入脊髓, 留针 5 min 后逐层缝合肌肉和皮肤。神经干细胞移植前 3 d 即开始给大鼠腹腔注射免疫抑制剂: 环孢素, 每天 1 次腹腔注射, 直到移植术后 2w, 腹腔注射的剂量: 1 mg/100 g 体重, 环孢素为针剂, 规格: 5 mL, 250 mg/支, 200 g 的大鼠需用原液 40 μL/只, 将 40 μL 环孢素原液用 1 mL 生理盐水稀释后注入大鼠腹腔, 每只大鼠大约每次注射 1 mL 稀释液。

单纯全横断组在脊髓全横断 7 d 时同法于脊髓相同部位注射细胞培养液 (为第 2 次手术), 但是不含神经干细胞, 假手术组也是在假手术 7 d 时在同样部位注射细胞培养液 (为第 2 次手术), 也不含神经干细胞。这两组大鼠也与神经干细胞移植组同时同法同剂量注射免疫抑制剂环孢素。

1.6 皮层体感诱发电位 (CSEP) 检测

大鼠脊髓全横断后 12 周 (即移植术后 11 周) 进行皮层体感诱发电位 (CSEP) 检测, 用全功能肌电图诱发电位仪 (规格型号: KEYPOINT 4ch) 测定, 将 3 个电极插在大鼠不同部位, 其中刺激电极插在左下肢胫神经上, 参考电极插在鼻子上, 记录电极 (作用电极) 插在相当于右侧大脑皮质感觉中枢表面的颅顶皮下。刺激电流以大鼠四肢开始抖动为准。记录先出现的两个波: P1、N1 的潜伏期作为组间比较的值, 两个波出现的位置在大脑皮质不同。潜伏期在表示感觉神经传导通路上具有重要意义。波形差甚至未引出波形表示神经传导通路恢复得不好。

1.7 经颅磁刺激运动诱发电位 (transcranial magnetic stimulation motor evoked po-

ntentials, TMS- MEP, 以下简称 MEP) 的检测

大鼠脊髓全横断后 12 周 (即移植术后 11 周) 进行经颅磁刺激运动诱发电位的检测, 以 3.6% 水合氯醛将 SD 大鼠麻醉, 仰卧置于鼠板床上. 采用 TMS 刺激仪 (丹麦, DANTEC), 圆形刺激线圈, 线圈内径 10 mm. 外径 50 mm, 2 × 10 匝, 记录电极、参考电极均为针电极, 地线为表面电极. 记录电极置于一侧腓肠肌, 地线置于耳朵. 以 50% 的磁刺激量单次刺激大脑皮质运动区, 采用信号采集系统 (丹麦, Medtronic, KEYPOINT), 采样率为 20 kHz, 使用 500 Hz 低通和 1 Hz 高速滤波记录波形, 并显示于荧光屏上, 重复刺激 3~5 次, 将磁刺激后有可重复性的波存于电脑, 并标记潜伏期和波幅.

1.8 电针刺激大鼠大脑皮质运动区后的后肢收缩检测

首先用微型电钻以前囟为原点钻开麻醉后的正常大鼠颅骨, 暴露大脑, 彻底止血后, 将改良自制的电针插入大脑皮质, 接通经穴仪电源后观察, 用

不同的电流和不同频率的波 (断续波、连续波、疏密波) 刺激正常大鼠的大脑皮质, 沿颅中缝由前向后逐点确认管理后肢的皮质运动区. 最后发现断续波效果最好, 而且刺激时两刺激电针针尖的距离最好在 0.5 mm, 此时经穴仪的波形调至断续波, 频率为 16 Hz, 电流强度为 2 mA. 确定了正常大鼠的皮质运动区后再按此法在各组大鼠检测.

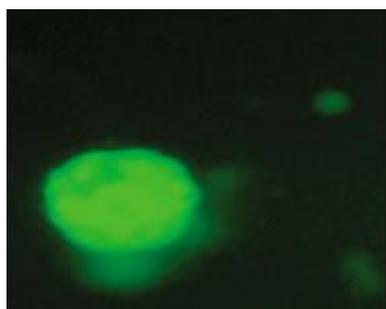
1.9 统计学分析

采用 SPSS 软件包进行方差分析或 q 检验, 做两两比较. $P < 0.05$ 为有统计学意义.

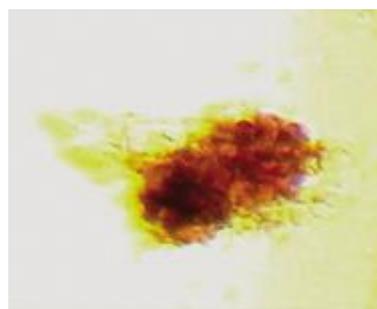
2 结果

2.1 神经干细胞的鉴定

在培养板上预先涂布多聚赖氨酸, 将原代培养 7d 的 NSCs (图 1A) 接种后 24 h 神经球贴壁生长, 继续培养 24 h, 部分细胞从神经球内迁出并向四周扩散, 此时进行 Nestin 免疫细胞化学染色, 克隆球大部分细胞 Nestin 抗原呈阳性 (图 1B).



A



B

图 1 神经干细胞的鉴定及存活 (×200)

Fig.1 The identification and survival of the neural stem cells

A:神经干细胞培养 7 d 形成的神经球; B:克隆球 Nestin 抗原呈阳性.

2.2 植入细胞在神经干细胞移植组大鼠脊髓内的存活

脊髓全横断 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 2).

2.3 诱发电位

2.3.1 皮层体感诱发电位 (Cortex somatosensory evoked potential, CSEP) 的潜伏期 (LATENCY, 单位 ms) 第 1 次手术后 12 周时, 诱发电位的潜伏期: 单纯全横断组的皮层体感诱发电位 CSEP 未出现. N1 波的潜伏期: 假手术组较神经干细胞移植组短, 有显著性差异 ($P < 0.05$). P1 波潜伏期: 神经干细胞移植组与假手术

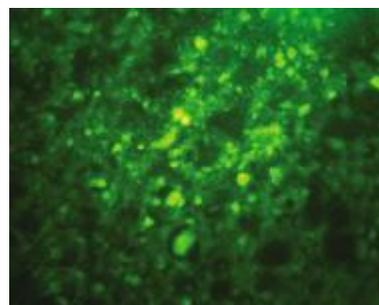


图 2 神经干细胞移植组 12 周时带绿色荧光的细胞, 脊髓冰冻切片 (×200)

Fig. 2 Neural stem cell transplantation group of 12 weeks with green fluorescent cells, spinal cord frozen section (×200)

组无显著性差异 ($P>0.05$), 见表 1 图 3.

2.3.2 运动诱发电位 (简称 MEP) 第 1 次手术后 12 周时, 潜伏期: 单纯全横断组的运动诱发电位 MEP 未出现, 整个波形似一直线. 神经干细胞移植组与假手术组无显著性差异 ($P>0.05$), 见表 2、图 4.

2.4 电针刺激大脑皮质运动区时的后肢收缩情况

正常大鼠的大脑皮质运动区受刺激时引起后肢收缩的最强区域是: 前凶后方约 0~4 mm 与颅中缝旁开 0~1.5 mm, 即前凶后 4 mm × 1.5 mm 的大脑皮质区域, 电针进入皮质深度约为 1~2 mm.

假手术组大鼠的大脑皮质运动区受电针刺激后引起对侧胸部和腹上部的肌肉强烈收缩, 而同侧胸部和腹上部也有肌肉收缩, 但幅度稍小, 同时后肢

收缩, 对侧明显, 同侧稍弱. 单纯全横断组大鼠两侧大脑皮质的四肢运动区受刺激时仅见双侧胸部和腹上部有肌肉收缩, 而双后肢未见收缩运动, 双后肢收缩出现率为 0. 神经干细胞移植组在大脑皮质运动区受刺激后全都有双后肢收缩, 以对侧明显, 双后肢收缩出现率达到 100%, 见表 3.

3 讨论

目前检测脊髓损伤后神经再生的方法主要有神经电生理、行为学、形态学. 神经电生理检测主要有皮层体感诱发电位 (CSEP)、运动诱发电位 (MEP). 行为学检测主要是进行后肢功能评分, 形态学上主要是使用组织病理技术、同时依赖免

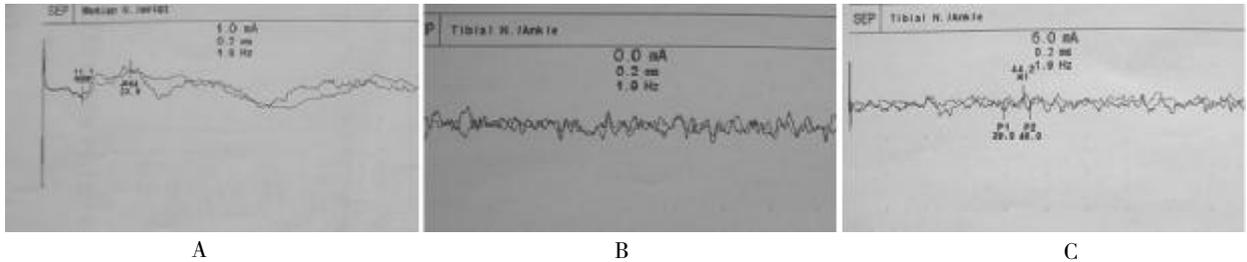


图 3 3 组大鼠 12 周时的 CSEP

Fig. 3 CSEP of rats in the three groups at 12 w

A: 假手术组 12 周时的 CSEP; B: 单纯全横断组 12 周时的 CSEP; c: 神经干细胞移植组 12 周时的 CSEP

表 1 假手术组与神经干细胞移植组 12 周时的 CSEP 潜伏期比较 $[(\bar{x} \pm s), ms]$

Tab. 1 The comparison of latency of CSEP at 12W between sham operation group and NSCs transplantation group $[(\bar{x} \pm s), ms]$

组 别	N1 波	P1 波
假手术组	24.880 0 ± 3.281 3	29.8 ± 4.2426
神经干细胞移植组	36.6 ± 0.989 9 [#]	36.26 ± 2.814 8

与假手术组比较, [#] $P<0.05$.

表 2 假手术组与神经干细胞移植组 12 周时的 MEP 潜伏期比较 $[(\bar{x} \pm s), ms]$

Tab. 2 The comparsion of latency of MEP at 12W between sham operation group and NSC transplantation group $[(\bar{x} \pm s), ms]$

组 别	潜伏期
假手术组	4.933 3 ± 0.230 9
神经干细胞移植组	5.975 0 ± 0.895 8

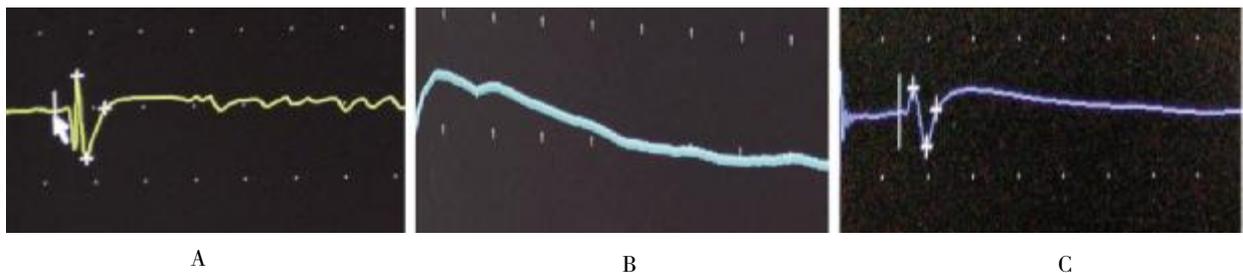


图 4 3 组大鼠 12 周的 MEP

Fig. 4 MEP of rats in the three groups at 12 w

A: 假手术组 12 周时的 MEP; B: 单纯全横断组 12 周时的 MEP; C: 神经干细胞移植组 12 周时的 MEP

表 3 电针刺激 3 组大鼠的大脑皮质运动区时双后肢收缩情况统计

Tab. 3 The evaluation of hind limbs contraction after cortical motor area stimulation by electro-acupuncture in the three groups

组 别	n	有后肢收缩的例数	无后肢收缩的例数	双后肢收缩出现率 (%)
单纯全横断组	5	0	5	0.00
神经干细胞移植组	5	5	0	100.00
假手术组	5	5	0	100.00

疫组织化学以及轴突示踪剂。

3.1 神经干细胞培养的鉴定结果及其在神经干细胞移植组大鼠脊髓内的存活检测

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神经干细胞。

12 周时在神经干细胞移植组大鼠脊髓的冰凍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, 表明: 全横断脊髓后 12 周内, 移植的神经干细胞能够在大鼠脊髓内存活。

3.2 诱发电位 CSEP 和 MEP 测定

诱发电位检查, 是一项能为临床提供直接了解和评定脊髓神经功能情况的辅助检查方法。有实验结果显示, MEP 和 CSEP 诊断 SCI 的准确率分别为 92.8% 和 91.3%^[3]。有文献报道^[4] 2 例临床体检为全瘫患者, 仍可记录到 MEP 及 CSEP, 随访证实为不全瘫。因此, MEP 及 CSEP 对 SCI 的诊断价值是不容置疑的。MEP 与运动功能间存在着很好的相关性。尽管目前对于不同情况下 MEP 的发生源和传导通路还存在着争议, 但无论是动物实验还是临床研究结果均显示, 运动功能的异常总是伴有 MEP 的改变, 如波幅的降低、潜伏期的延长、甚至 MEP 的完全消失等, 从而 MEP 成为评价运动功能的一个重要指标。许多利用 MEP 作为术中监测手段的作者报道了术中 MEP 的变化, 发现术中 MEP 的消失或变差是伴随着术后患者的运动功能障碍加重而发生的。

本研究中 CSEP 和 MEP, 在第 2 次手术 (移植术) 后 11 周时, 诱发电位潜伏期: 单纯全横断组的皮层体感诱发电位 CSEP 和运动诱发电位 MEP 均未出现, 而神经干细胞移植组的 CSEP 和 MEP 均出现, 但神经干细胞移植组 CSEP 的 N1 波潜伏期仍然长于假手术组, 说明虽然神经干细胞移植能够促进神经再生但对其感觉传导路的恢复作用仍是有限的。由于 CSEP 的变化可反映脊髓感觉通路的功能, MEP 的出现与否可推断运动通路的存在与否, 从而达到判断脊髓损伤预后的目的, 由于 MEP 可准确地反映运动功能, 与 CSEP 两者共同使用可客观全面地反映脊髓功能^[5], 因此本研究结

果说明神经干细胞移植后部分促进了受损伤脊髓感觉和运动通路的恢复。

3.3 电针刺激大脑皮质运动区

本研究中, 在电针刺激大脑皮质运动区的后肢收缩实验中, 单纯全横断组两侧大脑皮质的四肢运动区受刺激时仅见双侧胸部和腹上部有肌肉收缩, 而双后肢未见收缩运动, 双后肢收缩出现率为 0。神经干细胞移植组在大脑皮质受刺激后全都有双后肢收缩, 以对侧明显, 双后肢收缩出现率达到 100%。假手术组的测定结果同神经干细胞移植组。出现以上结果是由于平时正常大鼠支配后肢的大脑皮质运动区受到刺激后必然要向通过脊髓下行的皮质脊髓束传导^[6], 相比较神经干细胞移植组而言, 单纯全横断组由于脊髓横断后无明显再生发生, 皮质脊髓束传导的运动冲动不能到达后肢, 故未见后肢收缩; 这些结果提示神经干细胞移植后能在一定程度上促进皮质脊髓束的再生。

从上可见, 神经干细胞移植后能部分促进损伤脊髓的感觉和运动传导功能的恢复。

[参考文献]

- [1] OSTENFELD T, CULDWELLMA, PROWSE K R, et al. Human neural precursor cells express low levels of telomerase in vitro and show diminishing cell proliferation with extensive axonal outgrowth following transplantation [J]. *Expneurol*, 2000, 164 (1): 215 - 226.
- [2] LU P, JONES L L, SNYDER E Y, et al. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury [J]. *Expneurol*, 2003, 181 (2): 115 - 129.
- [3] MACHIDA M, YAMADA T, KRAIN L, et al. Magnetic stimulation: examination of motor function in patients with cervical spinal cord lesion [J]. *J Spinal Disord*, 1991, 4 (2): 123 - 130.
- [4] OWEN J H, JENNY A B, NATIO M, et al. Effects of spinal cord lesioning on somatosensory and neurogenic-motor evoked potentials [J]. *Spine*, 1989, 14(7): 673 - 682.
- [5] 刘雷, 裴福兴. 脊髓损伤模型制备及评价的研究进展 [J]. *华西医学*, 2005, 20 (3): 594 - 595.
- [6] 王艳, 曹宇, 汤浩, 等. 大鼠大脑皮质运动区投射到扣带回的神经元分布 [J]. *解剖科学进展*, 2002, 8(2): 125 - 127.

(2011 - 12 - 04 收稿)