

· 基础研究 ·

游离 NgR 基因修饰的骨髓基质细胞移植对脊髓损伤后轴突再生的影响

潘丽华 马永刚 李亚明 刘世清

【摘要】目的 观察游离 NgR 基因修饰的骨髓基质细胞(BMSCs)移植对大鼠脊髓轴突再生及神经功能恢复的影响。**方法** 将编码游离 NgR 蛋白的基因克隆、转染至第 3 代 BMSCs,通过荧光显微镜观察游离 NgR 蛋白在 BMSCs 中的表达。另同时制备 SD 大鼠脊髓挫伤模型,并将其随机分为对照组及实验组,于脊髓损伤 1 周后分别移植普通 BMSCs 和游离 NgR 基因修饰的 BMSCs。于细胞移植第 1 周时采用免疫组化技术检测游离 NgR 蛋白在损伤区的表达,于细胞移植第 4 周、第 6 周时在脊髓损伤区取材,采用髓鞘碱性蛋白过氧化物酶逆行染色观察轴突再生情况,并选用 BBB 评分评估 2 组大鼠后肢神经功能恢复情况。**结果** 经慢病毒载体转染后 BMSCs 胞浆内可见明显 NgR 荧光表达。细胞移植第 1 周时实验组大鼠脊髓损伤区呈现 NgR 免疫组化染色阳性;细胞移植第 6 周时实验组髓鞘染色清晰,分布均匀呈条索状,内有少量空洞形成;对照组髓鞘排列紊乱,内有大量空洞形成。细胞移植第 4 周及第 6 周时,发现实验组大鼠 BBB 评分均显著优于对照组($P < 0.05$)。**结论** 通过向脊髓损伤大鼠移植经游离 NgR 基因修饰的 BMSCs,能够通过多种机制促进受损脊髓轴突再生和神经功能恢复。

【关键词】 NgR 蛋白; 骨髓基质细胞; 轴突再生; 脊髓损伤; 康复

Effect of free NgR-modified bone marrow stromal cell transplantation on axon regeneration after spinal cord injury PAN Li-hua, MA Yong-gang, LI Ya-ming, LIU Shi-qing. Department of Orthopaedics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: MA Yong-gang, Email: martin1354@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of free NgR-modified bone marrow stromal cell (BMSC) transplantation on axon regeneration in rats after spinal cord injury. **Methods** Genes encoding free NgR protein were cloned and transduced into BMSCs at passage 3 using a lentivirus vector. Indirect immunofluorescence was used to detect the expression of free NgR protein. Meanwhile a spinal cord contusion model was established in 36 adult Sprague-Dawley rats at the T₁₀ segment. The rats were then divided randomly into an experimental group and a control group. NgR + BMSCs were transplanted into the injured site 1 week post-trauma in the experimental group. BMSCs were also transplanted at the same time into the control group. Expression of free NgR at the injury site was detected by immunohistochemical staining at 1 week post-transplantation. The functional recovery of both groups was evaluated at 4 and 6 weeks post-transplantation. Longitudinal sections of the spinal cord were studied for axon regeneration using horseradish peroxidase staining. **Results** Expression of free NgR was found in the cell plasma of BMSCs by indirect immunofluorescence post-transfection. Positive immunohistochemical staining for NgR was found at the transplant site in the experimental group 1 week post-transplantation. Better axon plasticity could be observed in the experimental group. The Basso-Beattie-Bresnahan scoring of the experimental group was significantly higher than that of the controls at both observation times. **Conclusions** Free NgR-modified BMSCs can prompt injured axons to regenerate and thus to promote the recovery of neurological function. This might provide a new strategy to treat spinal cord injury.

【Key words】 NgR protein; Bone marrow stromal cells; Axon regeneration; Spinal cord injury; Rehabilitation

轴突再生障碍是脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)预后不良的主要病理机制,它是外伤后脊髓微环境中多种因素协同作用的结果,轴突再生抑制成

分表达上调在其中发挥重要作用。Nogo-A、MAG 和 OMgp 是目前已知 3 种重要的髓鞘源性神经突生长抑制物,可作为配体与神经元表面 NgR 结合,诱导生长锥崩解、抑制轴突发芽或侧支形成^[1-3]。本课题前期实验曾将编码 NgR 细胞外功能区(即游离 NgR)的基因通过慢病毒表达系统转染至骨髓基质细胞

(bone marrow stromal cells, BMSCs), 并在 BMSCs 中检测到游离 NgR 表达^[4]。本研究进一步将这种经基因修饰的 BMSCs 移植到大鼠脊髓损伤部位, 观察其对神经轴突再生和神经功能恢复的影响。现报道如下。

材料与方法

一、慢病毒介导游离 NgR 基因转染 BMSCs

取大鼠 BMSCs 并体外传代培养后, 选取第 3 代细胞加入能表达 NgR 细胞外功能区的重组慢病毒悬液 1 ml, 于转染后 48 h 加入兔抗大鼠 NgR 抗体(美国 Santacruz 公司产品), 室温下孵育 30 min, 加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG, 于荧光显微镜下观察 BMSCs 中 NgR 蛋白表达。

二、脊髓挫伤模型制备及分组处理

选取健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 36 只, 体重 200 ~ 250 g, 雌雄不拘, 采用 10% 水合氯醛按每千克体重 3 ml 进行腹腔注射麻醉, 钝性分离椎旁肌显露 T₉₋₁₁ 椎板和棘突, 以蚊式血管钳咬椎板充分显露 T₁₀ 节段脊髓, 用自制打击装置将 5 g 物体从 8 cm 高度自由落下并致伤脊髓。如打击瞬间大鼠双后肢回缩抽动, 伴小便失禁, 大鼠清醒后双后肢呈弛缓性瘫痪, 提示 SCI 模型制作成功。采用随机数字表法将制模成功的 36 只 SD 大鼠分成 2 组, 其中实验组大鼠于脊髓损伤 1 周后移植 NgR(310)⁺-BMSCs, 对照组大鼠于脊髓损伤 1 周后移植普通 BMSCs; 其具体操作如下: 将大鼠麻醉、固定后, 打开原切口暴露脊髓, 在原损伤部位远侧约 5 mm 处进针, 进针点为中线旁开约 5 mm, 进针深度为 1.3 mm; 选用 10 μ l Hamilton 注射器经微量注射泵(泰盟科技)进行 BMSCs 移植, 移植细胞总数约为 12×10^6 个, 移植速度为 1.5 μ l/min。待注射完毕后保持 Hamilton 注射器于原位约 1 min, 随后缓慢退出, 常规分层缝合大鼠肌肉及皮肤。

三、NgR 免疫组化染色

于细胞移植 1 周后, 2 组分别取 6 只大鼠经 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 剖胸行 4% 多聚甲醛心脏灌注固定, 以原手术部位损伤区为中心剪取脊髓组织约 2 cm, 置于 4% 多聚甲醛(4 $^{\circ}$ C)中过夜; 然后置于 30% 蔗糖生理盐水(4 $^{\circ}$ C)中直至沉底, 冰冻连续横切片(片厚 8 μ m), 分别加入 NgR 兔多抗(1:100)和生物素化山羊抗兔 IgG 二抗(均购于武汉博士德公司), 37 $^{\circ}$ C 温水浴 40 min; SABC 孵育, DAB 显色, 苏木素复染。

四、髓鞘辣根过氧化物酶逆行染色

于细胞移植后第 6 周时, 2 组分别取 6 只大鼠经 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 循原手术切口远端进入, 暴露 T₁₁₋₁₂ 节段, 在损伤平面下方 5 mm 处用微量加样

器缓慢注入 30% 辣根过氧化物酶(HRP VI 型, 美国 Sigma 公司产品) 3 ~ 5 μ l, 注射速度为 0.05 μ l/min。于大鼠注射完毕 48 ~ 72 h 后再次麻醉, 经 4% 多聚甲醛液行心脏灌注后取出脊髓组织, 脊髓标本在 4% 多聚甲醛中固定 12 h(4 $^{\circ}$ C), 随后转入 30% 蔗糖生理盐水中直至沉底。采用冰冻切片连续纵切片(切片厚约 8 μ m), 选用四氨基联苯胺法进行显色。

五、大鼠行为学评分及统计学分析

于细胞移植后第 4 周及第 6 周时, 根据 Basso-Beattie-Bresnahan(BBB) 评分法^[5]对各实验大鼠右后肢运动功能进行评分。评定者非本研究人员, 并且对评分标准十分熟悉。各组大鼠评分数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠脊髓损伤区 NgR 蛋白表达

NgR 经慢病毒转染至 BMSCs 后, 通过间接免疫荧光检测可见 BMSCs 胞浆内有明显荧光表达(图 1)。实验组大鼠于细胞移植 1 周后, 发现其脊髓损伤区组织切片 NgR 免疫组化染色呈阳性, 可见较多清晰 NgR 阳性细胞分布, 呈胞浆染色(图 2); 对照组 NgR 免疫组化染色呈弱阳性, 仅可见少许 NgR 阳性细胞分布(图 3)。

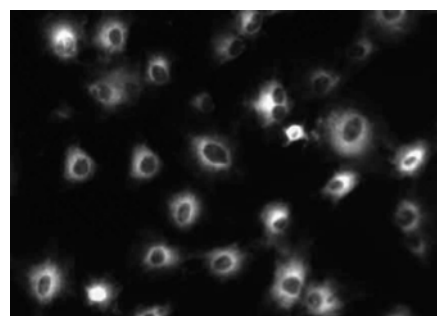


图 1 NgR 蛋白在 BMSCs 中的表达(免疫荧光染色, $\times 400$)

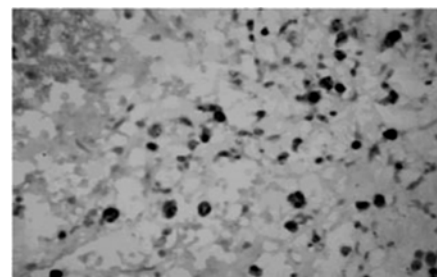


图 2 细胞移植后第 1 周时实验组大鼠脊髓损伤区 NgR 表达(免疫组化染色, $\times 200$)

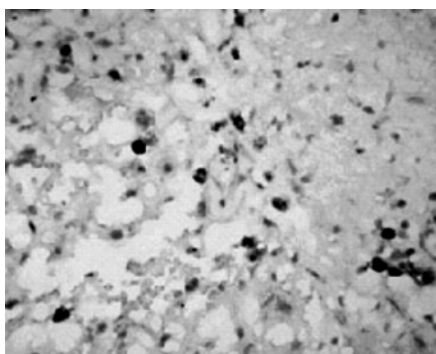
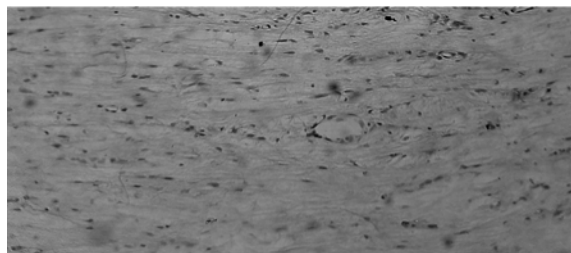


图3 细胞移植后第1周时对照组大鼠脊髓损伤区 NgR 表达 (免疫组化染色, $\times 200$)

二、各组大鼠神经轴突生长情况比较

通过观察各组大鼠髓鞘辣根过氧化物酶染色结果 (阳性染色呈棕褐色) 发现, 实验组大鼠在细胞移植后第6周时其髓鞘染色清晰, 分布均匀呈条索状, 内有少量空洞形成 (图4); 而对照组此时可见神经髓鞘排列紊乱, 内有大量空洞形成 (图5)。



注: 可见髓鞘染色清晰, 轴突分布均匀呈条索状, 内有少量空洞形成

图4 细胞移植后第6周时实验组髓鞘生长情况观察 (髓鞘辣根过氧化物酶逆行染色, $\times 100$)



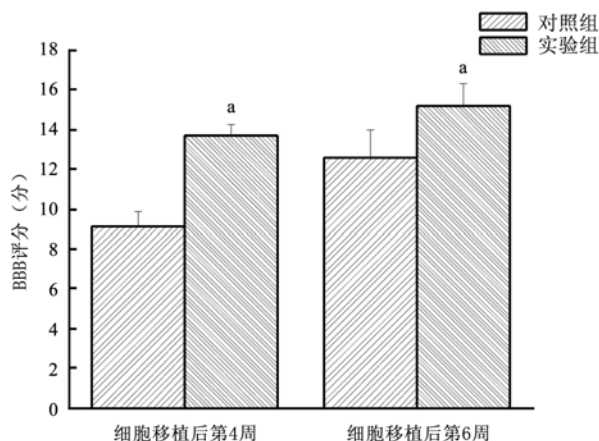
注: 可见髓鞘排列紊乱, 内有大量空洞形成

图5 细胞移植后第6周时对照组髓鞘生长情况观察 (髓鞘辣根过氧化物酶逆行染色, $\times 100$)

三、各组大鼠行为学 BBB 评分

本研究所有大鼠在脊髓遭撞击后均出现双后肢迟缓性瘫痪, 只能用前肢拖着躯体移动, 并出现肉眼血尿, 对照组有1只大鼠于脊髓损伤第2天死亡。细胞移植2周后, 发现2组大鼠均逐渐出现髋、膝关节活动, 其中以实验组大鼠功能恢复速度明显提高, 在细胞

移植后第6周时能用爪掌持续爬行, 且后肢动作协调, 同时该组大鼠 BBB 评分在细胞移植后第4周及第6周时均显著优于对照组, 组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 具体情况详见图6; 对照组大鼠肢体功能恢复速度则相对较慢, 如细胞移植后第4周时其后肢仅有3个关节能广泛活动, 且动作协调性较差。



注: 与对照组同时间点比较, $^a P < 0.05$

图6 细胞移植后第4周及第6周时2组大鼠 BBB 运动功能评分

讨 论

神经元缺失和轴突再生抑制是脊髓损伤导致永久性残疾的重要原因, 也是当前脊髓再生领域研究的焦点问题之一。Nogo-A、MAG 和 OMgp 是中枢神经系统3种重要的髓鞘源性神经突生长抑制物, 它们可作为配体与 NgR 结合, 诱导生长锥崩解、抑制轴突发芽或侧支形成。如采取有效措施阻断 NgR 与其配体结合, 则可能有助于促进受损神经轴突再生, 目前该治疗途径已受到国内、外学者广泛关注^[6-7]。可溶性 NgR 的细胞外功能区能竞争性与 Nogo-A、MAG 和 OMgp 3种物质结合, 从而消耗脊髓损伤后局部产生的轴突再生抑制物, 减少其与神经元及轴突上的 NgR 结合, 从而中和对轴突再生的抑制作用。Li 等^[8]将纯化的 NgR (310) ecto-Fc 蛋白鞘内注射入胸髓半切伤大鼠模型体内, 发现大鼠皮质脊髓束和红核脊髓束轴突出芽明显增强, 后肢功能及神经传导速度也显著改善。Wang 等^[9]于大鼠脊髓损伤3d后向脑室内注入 NgR (310) ecto-Fc 蛋白, 发现脊髓损伤后第7周时大鼠 BBB 运动功能评分显著提高, 而且这种行为学改善与脊髓近端红核脊髓束、远端皮质脊髓束出芽密切相关。本课题前期实验亦有类似结果发现, 如将新生大鼠背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 神经元分为2组, 对照组直接将神经元种植到经中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 髓鞘蛋白包被的培养皿中培养, 实验组则先将 NgR 基因修饰的 BMSCs 培养上清液加入到含 CNS

髓鞘蛋白的培养皿中,孵育 4 h 后再植入 DRG 神经元,结果发现对照组 DRG 细胞很少有突起长出,而实验组 DRG 细胞中有 60% 神经元长出突起,且突起较长^[10]; Marklund 等^[11]发现脑外伤后 7 d 内,在脑皮质、外囊和丘脑中均可检测到 Nogo-A 表达上调;Eslamboli 等^[12]通过制备猴局灶性脑缺血模型,发现伤后 2 个月内损伤近端白质中 Nogo-A 阳性少突胶质细胞数量显著增加。上述结果均提示 CNS 损伤后轴突再生抑制物释放是一个持续、动态过程;单次阻断抑制信号传递,无论是鞘内或是脑室内注射封闭剂,其意义可能均不显著。本研究将游离 NgR 编码基因通过慢病毒载体转染至 BMSCs,发现培养上清液中有较高浓度的游离 NgR 蛋白表达,成功实现了 NgR(310)ecto 蛋白的内源化。将这种经基因修饰的 BMSCs 移植到胸髓挫伤 SD 大鼠体内,1 周后可在移植局部检测到游离 NgR 表达;通过与对照组比较,发现实验组大鼠脊髓损伤区可见明显轴突塑形,而且神经功能恢复程度也显著提高,提示经 NgR(310)ecto 转染的 BMSCs 能够拮抗髓鞘活性,有效促进轴突再生,其可能机制包括:BMSCs 本身能填充组织坏死形成的空洞,抑制胶质瘢痕增生,为受损神经轴突再生创造有利条件;BMSCs 在局部可分泌神经生长因子或脑源性神经营养因子等^[13],能促进生长锥延伸,甚至能分化为神经元成为神经冲动传导的中继站;经基因修饰的 BMSCs 能在局部分泌游离 NgR,持续消耗创伤后表达的髓鞘源性轴突再生抑制物,使其不能与生理性 NgR 结合,进而促进神经轴突再生。

参 考 文 献

- [1] Schwab ME. Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 2004, 14:118-124.

- [2] Kim JE, Liu BP, Park JH, et al. Nogo-66 receptor prevents raphespinal and rubrospinal axon regeneration and limits functional recovery from spinal cord injury. *Neuron*, 2004, 44:439-451.
- [3] Nyatia E, Lang DM. Localisation and expression of a myelin associated neurite inhibitor, Nogo-A and its receptor Nogo-receptor by mammalian CNS cells. *Res Vet Sci*, 2007, 83:287-301.
- [4] 马永刚,刘世清,陶海鹰. 慢病毒介导 NgR 基因转染骨髓基质细胞的研究. *中华实验外科杂志*, 2009, 26:232-234.
- [5] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol*, 1996, 139:244-256.
- [6] 侯巍,冯世庆,陈家童,等. Nogo 抗体治疗脊髓损伤的实验研究. *中华骨科杂志*, 2007, 27:609-613.
- [7] Grandpre T, Li S, Strittmatter SM. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature*, 2002, 417:547-551.
- [8] Li S, Liu BP, Budel S, et al. Blockade of Nogo-66, myelin-associated glycoprotein, and oligodendrocyte myelin glycoprotein by soluble Nogo-66 receptor promotes axonal sprouting and recovery after spinal injury. *J Neurosci*, 2004, 24:10511-10520.
- [9] Wang X, Baughman KW, Basso DM, et al. Delayed Nogo receptor therapy improves recovery from spinal cord contusion. *Ann Neurol*, 2006, 60:540-549.
- [10] 马永刚,刘世清,范里,等. 游离 NgR 促进新生大鼠背根神经节突起体外生长. *中华创伤杂志*, 2009, 25:1029-1032.
- [11] Marklund N, Fulp CT, Shimizu S, et al. Selective temporal and regional alterations of Nogo-A and small proline-rich repeat protein 1A but not Nogo-66 receptor (NgR) occur following traumatic brain injury in the rat. *Exp Neurol*, 2006, 197:70-83.
- [12] Eslamboli A, Grundy RI, Irving EA. Time-dependent increase in Nogo-A expression after focal cerebral ischemia in marmoset monkeys. *Neurosci Lett*, 2006, 408:89-93.
- [13] Yaghoobi MM, Mahani MT. NGF and BDNF expression drop off in neurally differentiated bone marrow stromal stem cells. *Brain Res*, 2008, 1203:26-31.

(修回日期:2012-02-16)

(本文编辑:易 浩)

· 外刊摘英 ·

Intermittent hypoxia to treat incomplete spinal cord injury

BACKGROUND: Neural plasticity may contribute to motor recovery following spinal cord injury (SCI). In rat models of SCI with respiratory impairment, acute intermittent hypoxia (AIH) strengthens synaptic inputs to phrenic motor neurons, thereby improving respiratory function by a mechanism known as respiratory long-term facilitation. Similar intermittent hypoxia-induced facilitation may be feasible in somatic motor pathways in humans.

OBJECTIVE: Using a randomized crossover design, the authors tested the hypothesis that AIH increases ankle strength in people with incomplete SCI.

METHODS: Ankle strength was measured in 13 individuals with chronic, incomplete SCI before and after AIH. Voluntary ankle strength was estimated using changes in maximum isometric ankle plantar flexion torque generation and plantar flexor electromyogram activity following 15 low oxygen exposures ($F_{IO_2} = 0.09$, 1-minute intervals). Results were compared with trials where subjects received sham exposure to room air.

RESULTS: AIH increased plantar flexion torque by $82 \pm 33\%$ ($P < 0.003$) immediately following AIH and was sustained above baseline for more than 90 minutes ($P < 0.007$). Increased ankle plantar flexor electromyogram activity ($P = 0.01$) correlated with increased torque ($r(2) = 0.5$; $P < 0.001$). No differences in plantar flexion strength or electromyogram activity were observed in sham experiments.

CONCLUSIONS: AIH elicits sustained increases in volitional somatic motor output in persons with chronic SCI. Thus, AIH has promise as a therapeutic tool to induce plasticity and enhance motor function in SCI patients.

【摘自:Trumbower RD, Jayaraman A, Mitchell GS, et al. Exposure to acute intermittent hypoxia augments somatic motor function in humans with incomplete spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair*, 2012, 26:163-172.】