

· 基础研究 ·

磁刺激对脊髓内源性神经干细胞增殖分化影响

许涛 郭风劲 陈安民 黄晓琳 郭铁成

【摘要】目的 探讨磁刺激对脊髓内源性神经干细胞(NSCs)增殖分化的作用。**方法** 将46只Wistar大鼠分为正常组、对照组和治疗组,对照组和治疗组采用改良的Allen重物坠落法造成大鼠脊髓损伤(SCI)模型,治疗组于SCI后24h开始,每天给予脉冲磁刺激,频率为0.5 Hz,强度为1.44 T,每次30个脉冲,每天1次,连续7 d。应用BBB运动功能评分评价磁刺激治疗后大鼠运动功能的改善,采用免疫组织荧光化学技术检测脊髓神经上皮干细胞巢蛋白的表达,采用免疫荧光三标技术结合激光共聚焦显微镜检测微管相关蛋白2(MAP2)/巢蛋白/4,6-二乙氧基-2-苯基吲哚(DAPI)的表达。**结果** SCI后,治疗组大鼠运动功能改善明显,治疗组脊髓中央管室管膜、室管膜下区、损伤病灶周围和血管周围巢蛋白阳性细胞数较对照组多($P < 0.05$),且尽管总体细胞数量有限,在上述部位的MAP2/巢蛋白双标阳性细胞数多于对照组。**结论** 磁刺激可以促进脊髓内源性NSCs的激活,并有可能诱导其向神经元细胞分化,该诱导分化作用是否在神经再生方面具有实质性意义值得进一步深入研究。

【关键词】 磁刺激; 脊髓损伤; 神经干细胞; 微管相关蛋白2; 巢蛋白

Effects of magnetic stimulation on proliferation and differentiation of endogenous neural stem cells/progenitor cells after spinal cord injury in rats XU Tao*, GUO Feng-jing, CHEN An-min, HUANG Xiao-lin, GUO Tie-cheng. * Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of magnetic stimulation (MS) on the proliferation and differentiation of endogenous neural stem cells (NSCs)/progenitor cells after spinal cord injury (SCI) in rats. **Methods** Forty-six Wistar rats were used, of which 40 were used to make an animal model of spinal cord injury (SCI) by administering a $10 \text{ g} \times 12.5 \text{ cm}$ impact at the T8 level. The other 6 served as the normal controls. The SCI model rats were evenly divided into a magnetic stimulation (MS) group ($n = 20$) and a control group ($n = 20$). The rats in the MS group received 0.5 Hz and 1.44 T magnetic stimulation 24 h post injury, then 30 pulses per day for 7 days. The rats in the other groups were not exposed to MS. The scale of Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) was used to assess hindlimb neurological function. Rats were sacrificed at the 24th hour, and at the 1st, 4th and 8th weeks after SCI. The ratio of nestin to microtubule associated protein 2 (MAP2)/nestin in the cells of the spinal cord was determined by immunofluorescence. **Results** The BBB scores in the MS group were significantly higher than those of the control group at 1, 4 and 8 weeks post SCI. Nestin and the MAP2/nestin ratios were mild in the normal spinal cords, but increased after SCI. They were higher in the MS group than that in the control groups at all time points. **Conclusions** MS can promote nestin expression in the spinal cord after SCI and facilitate neural differentiation.

【Key words】 Magnetic stimulation; Spinal cord injury; Neural stem cells; Microtubule associated protein 2; Nestin

成年哺乳动物的中枢神经系统终生保留处于“静止”状态的神经干细胞(neural stem cells, NSCs),当在某些因素作用下或者受到损伤刺激时可被激活,重新进入细胞增殖周期并进一步分化为特定功能的神经细

胞。脊髓中NSCs的发现改变了脊髓神经细胞不能再生的传统观念,内源性NSCs不像外源性NSCs存在免疫排斥的问题,因此利用各种外在刺激因素原位诱导内源性NSCs增殖分化,是治疗脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的一个新思路和值得探讨的领域。前期的研究已经发现,低频磁刺激具有诱导离体培养的NSCs向神经元细胞分化的作用^[1],本研究进一步探索磁刺激对内源性NSCs的作用。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.01.002

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科(许涛、黄晓琳、郭铁成),骨科(郭风劲、陈安民)

材料与方法

一、实验材料

实验动物:健康 Wistar 大鼠 46 只,清洁二级,雌雄各半,月龄 4~7 个月,体重 220~300 g,由本校实验动物中心提供。

抗单克隆抗体和多克隆抗体:兔抗巢蛋白单克隆抗体为 Chemicon 公司产品,鼠抗微管相关蛋白 2 (microtubule associated protein 2, MAP2) 单克隆抗体为 NeoMarkers 公司产品,4,6-二氨基-2-苯基吲哚(4,6-diamino-2-phenyl indole, DAPI) 核抗体、羊抗兔异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 二抗、羊抗鼠罗丹明二抗为 KPL 公司产品。

磁刺激器:应用丹麦 Dantec 公司生产的磁刺激器及圆形刺激线圈,直径为 9 cm,脉冲磁场的峰值强度为 1.9 T,由华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科提供。

脊髓损伤模型装置(采用改良的 Allen 重物坠落法):由支架台、砝码(重 10 g)和砝码控制筒组成。

二、动物分组

将 46 只大鼠分为正常组($n=6$)、对照组($n=20$)和治疗组($n=20$)。

三、动物模型的建立

对照组和治疗组用戊巴比妥钠 0.3% (30 mg/kg 体重)腹腔麻醉大鼠,无菌操作下以 T₈ 节段脊髓为中心显露直径约 3.0 mm 圆形区作为 SCI 区,Allen 重物坠落法^[2]选用 10 g × 12.5 cm 致伤力损伤脊髓。见大鼠出现摆尾反射,双下肢及躯体回缩扑动后,双下肢瘫痪,表明撞击成功。损伤后每天于 10,16,22 时行人工手法膀胱排尿,直至建立反射性膀胱排尿(约 1 周)。正常组仅做椎板切除术。

四、磁刺激治疗

治疗组于 SCI 后 24 h 开始,每天给予脉冲磁刺激,频率为 0.5 Hz,强度为 1.44 T,每次 30 个脉冲,每天 1 次,连续 7 d;对照组置于相同环境下,但未给予脉冲磁刺激。

五、运动功能评分

各组分别于造模后第 24 小时、第 1 周、第 4 周、第 8 周,采用 BBB (Basso, Beattie and Bresnahan) 运动功能评分^[3]对大鼠后肢功能,包括后肢髋膝踝关节主动活动范围、后足负重状况、前后肢运动协调性、后爪在抬起和触地时脚趾的动作、尾部运动、躯干稳定性等项目进行评价,满分为 21 分。

六、组织免疫荧光检测

1. 标本处理:对照组和治疗组分别于造模后 24 h、1 周、4 周、8 周取 5 只大鼠,用戊巴比妥钠

(40 mg/kg 体重)腹腔麻醉后开胸,经升主动脉插管,先用 150 ml 生理盐水冲去血液,继而灌注含 4% 多聚甲醛的磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 值 7.4) 350 ml,灌注后立即取脊髓固定 4 h,再置于 20% 蔗糖溶液中至组织块沉底。冰冻连续切片,片厚 25 μm,隔 4 片取 1 片采用免疫荧光法进行检测。

2. 检测巢蛋白的表达:取组织切片,用 0.5% H₂O₂-甲醇液处理 30 min,1% 牛血清白蛋白-0.3% Triton X-100 于 37℃ 下处理 30 min;加入兔抗鼠巢蛋白一抗(1:50),37℃ 孵育 30 min 后置入 4℃ 的冰箱中 24 h;取出后用磷酸盐缓冲液冲洗,加入羊抗兔 FITC 二抗(1:100),37℃ 下处理 30 min;甘油封片,荧光显微镜下记录每张切片的阳性细胞数。

3. 巢蛋白/MAP2/DAPI 免疫荧光三重标记:取组织切片,用 0.5% H₂O₂-甲醇液处理 30 min,微波提呈抗原 8 min 后,用 1% 牛血清白蛋白-0.3% Triton X-100 于 37℃ 下处理 30 min;分别加入一抗(巢蛋白 1:50 和 MAP2 1:100),于 37℃ 下孵育 30 min 后置入 4℃ 的冰箱中 24 h;用磷酸盐缓冲液冲洗,分别加羊抗兔 FITC 和羊抗鼠罗丹明(1:100),于 37℃ 下处理 30 min,用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液充分冲洗;最后加入 DAPI 保温 30 min,甘油封片,于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

六、图像分析

将切片光镜图像(统一放大 400 倍)输入图像分析系统,设置相等的检测窗口面积,随机选取 10 个视野,计数巢蛋白/MAP2 双标阳性细胞,所得数据输入计算机进行统计处理。

七、统计学分析

用 SPSS 10.0 版统计软件进行分析,采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、大鼠行为学观察

造模后 24 h,治疗组和对照组大鼠都表现为后肢瘫痪($P > 0.05$),第 1,4,8 周,治疗组大鼠功能改善明显,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。正常组评分均为满分 21 分。见表 1。

表 1 各组大鼠 BBB 评分均值表(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	第 24 小时	第 1 周	第 4 周	第 8 周
正常组	6	21	21	21	21
对照组	20	0.84 ± 0.99	8.90 ± 1.05	14.80 ± 1.44	16.70 ± 2.12
治疗组	20	0.92 ± 0.57	11.95 ± 2.72 ^a	17.50 ± 0.85 ^a	19.90 ± 1.32 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$

二、组织免疫荧光检测结果

1. 巢蛋白的表达:巢蛋白在阳性细胞胞浆中有表

达。正常组仅见少许巢蛋白阳性细胞(2.1 ± 0.6);在 SCI 后第 24 小时,治疗组巢蛋白阳性细胞数明显增加(图 1),第 1 周达高峰(图 2),直至第 8 周,仍可见到巢蛋白阳性反应细胞。巢蛋白阳性反应细胞主要位于脊髓中央管室管膜、脊髓背侧出血坏死区,此外在脊髓白质、脉管周围、软膜下也可见到。治疗组在软膜下与脉管周围的巢蛋白阳性反应更加明显。图像分析显示,治疗组第 1、4 和 8 周巢蛋白阳性细胞数多于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

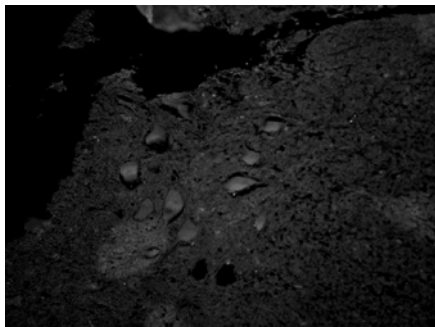


图 1 治疗组造模后第 24 小时巢蛋白在脊髓组织中的表达($\times 200$)

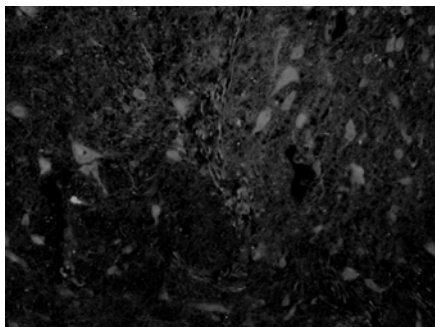


图 2 治疗组造模后第 1 周脊髓内巢蛋白阳性表达($\times 200$)

表 2 各组大鼠巢蛋白阳性细胞数比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	第 24 小时	第 1 周	第 4 周	第 8 周
正常组	6	2.10 ± 0.60	2.10 ± 0.60	2.10 ± 0.60	2.10 ± 0.60
对照组	20	18.87 ± 2.45	21.48 ± 7.83	19.13 ± 3.47	9.18 ± 3.26
治疗组	20	19.01 ± 2.35	35.24 ± 6.83^a	29.69 ± 6.16^a	17.30 ± 6.61^a

注:与对照组比较, $^a P < 0.05$

2. 巢蛋白/MAP2/DAPI 免疫荧光三重标记结果:正常组巢蛋白/MAP2/DAPI 阳性细胞少见。在激光共聚焦扫描显微镜下可见 MAP2/巢蛋白/DAPI 三重标记阳性细胞(图 3),这类细胞大多分布在 SCI 区、室管膜区、脉管周围、软膜下区(图 4)。图像分析显示,治疗组第 1 和 4 周的 MAP2/巢蛋白双标阳性细胞数较对照组多($P < 0.05$),见表 3。

表 3 各组大鼠 MAP2/巢蛋白双标阳性细胞数比较(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	第 24 小时	第 1 周	第 4 周	第 8 周
正常组	6	0.80 ± 0.40	0.80 ± 0.40	0.80 ± 0.40	0.80 ± 0.40
对照组	20	5.27 ± 1.25	6.33 ± 2.56	5.73 ± 2.41	2.98 ± 2.89
治疗组	20	5.61 ± 2.10	9.02 ± 3.21^a	8.19 ± 3.56^a	3.31 ± 2.32

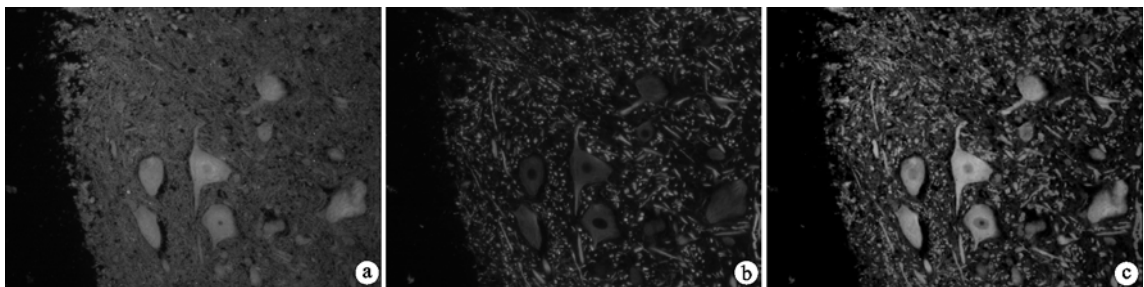
注:与对照组比较, $^a P < 0.05$

讨 论

一、磁刺激对 SCI 后内源性 NSCs 的增殖作用

巢蛋白是一种新近发现的中间丝蛋白,只在多潜能的神外胚层细胞中表达,随着神经上皮的分化成熟逐渐消失^[4]。但在少数保持神经发生功能的部位仍有表达,如大脑室管膜下区和海马齿状回^[5]。脊髓中央管室管膜层也存在着大量未分化细胞^[6]。有研究证实,SCI 后脊髓中央管周围的巢蛋白阳性细胞有向损伤部位发生迁移的现象,提示中枢神经系统损伤后,室管膜下区的 NSCs 是损伤灶周围反应性胶质细胞的源泉^[7]。

本实验的发现与 Frisen 等^[8]的研究结果类似,在 SCI 后 24 ~ 48 h 内,无论是损伤灶还是退化纤维束中的反应性星形细胞,均表达巢蛋白,而且这种表达至少可持续 13 个月。杜少辉等^[9]研究报道,NSCs 再塑能力随时间延长而降低,所以促使巢蛋白表达增强和表达时间延长的治疗措施,将有利于中枢神经系统损伤的再生和修复。这些措施包括各种外在刺激因素,如外源性信号分子、针灸、中药、高压氧等^[10],磁刺激对中枢神经系统的作用,就是利用交变磁场诱发组织内产生感应电流刺激细胞所致。在本实验中,治疗组第



注:a. 巢蛋白阳性, FITC 绿色荧光;b. MAP2 阳性, 罗丹明红色荧光;c. MAP2/巢蛋白双标阳性, 呈黄色, DAPI 核染色, 呈蓝色

图 3 激光共聚焦扫描显微镜下治疗组 MAP2/巢蛋白/DAPI 三重标记阳性细胞($\times 400$)



图 4 治疗组 MAP2/巢蛋白双标阳性细胞(黄染)在 SCI 区、室管膜区、脉管周围、软膜下区的分布(×100)

1, 4 和 8 周脊髓组织巢蛋白表达强度明显大于对照组,且巢蛋白表达升高与大鼠患肢功能恢复同步,提示磁刺激对内源性 NSCs 有激活和促进增殖的作用。

二、磁刺激对 SCI 后内源性 NSCs 分化的作用

由于脊髓内也包含 NSCs,并且这些干细胞能因应 SCI 而增殖、迁移,这就为利用内源性 NSCs 修复损伤的脊髓提供了可能。但是有研究发现,这些增殖、迁移的 NSCs 主要分化成星型胶质细胞,参与胶质瘢痕的形成^[1]。这可能是脊髓的抑制环境所致,因为其在体外能分化出神经元和少突胶质细胞。因此,要使这些内源性 NSCs 真正参与损伤脊髓的修复,分化为所需要的细胞类型,必须进行人为的干预。

Johansson 等^[11]报道,原位 NSCs 在 SCI 后,无一例外地增殖和分化成为胶质细胞,而不是神经元细胞。这一现象自然让我们对 SCI 后 NSCs 在原位的治疗作用产生了怀疑。Okano^[12]证实,内源性 NSCs(或神经前体细胞)能在成年哺乳动物的新皮质内原位诱导分化成皮质投射神经元,而这一区域通常不存在神经发生。这些结果证实,在中枢神经系统损伤或神经退行性疾病中,原位操控内源性 NSCs 是可行的。Ogawa 等^[13]研究提出,NSCs 在脊髓内并不是都不能形成神经元细胞,而是存在一个狭窄的“时间窗”,急性期的微环境产生许多炎性细胞因子如白细胞介素-1、白细胞介素-6 及肿瘤坏死因子,它们具有神经毒性,并可诱导胶质细胞,所以不利于 NSCs 的神经元向分化。在本实验中,治疗组和对照组均可见到少量 MAP2/巢蛋白双标阳性细胞,提示 NSCs 在脊髓内有

可能分化成神经元细胞,尽管数量有限,治疗组仍较对照组多。

总之,本研究结果提示:磁刺激作为一种体外无创性的干预措施,有可能促进内源性 NSCs 定向诱导分化,该作用是否在神经再生方面具有实质性意义值得进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 许涛,郭风劲,郭铁成,等. 磁刺激对大鼠离体神经干细胞生长和分化的影响. 中华物理医学与康复杂志,2005,27:129-132.
- [2] Anderson TE. A controlled pneumatic technique for experimental spinal cord contusion. J Neurosci Methods, 1992,6:327-333.
- [3] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. J Neurotrauma, 1995,12:1-12.
- [4] 边玮,杨靖,唐珂,等. 巢蛋白在 P19 神经元分化过程中的表达. 卫生学报,1999,51:246-252.
- [5] Li Y, Chopp M. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat. Brain Res, 1999,838:1-10.
- [6] Hauke C, Ackermann I, Korr H. Cell proliferation in the subependymal layer of the adult mouse in vivo and vitro. Cell Prolif, 1995,28:595-607.
- [7] 徐曦,刘勇. 中枢神经系统损伤后 NSCs 及 nestin 蛋白的变化. 解剖科学进展,2002,8:343-345.
- [8] Frisen J, Johansson CB, Torok C, et al. Rapid widespread and long lasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. J Cell Biol, 1995,131:453-464.
- [9] 杜少辉,张悦,黄洁,等. 牛珀至宝微丸对局灶性脑缺血再灌注后 Nestin 表达的影响. 中国中医基础医学杂志,2002,8:737-741.
- [10] 许宏武,庄明华. 内源性神经干细胞修复脊髓损伤的研究与进展. 国际医药卫生导报,2007,13:121-124.
- [11] Johansson CB, Momba S, Clarke DL, et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell, 1999,96:25-34.
- [12] Okano H. Stem cell biology of the central nervous system. J Neurosci Res, 2002,69:698-707.
- [13] Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, et al. Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. J Neurosci Res, 2002,69:925-933.

(收稿日期:2009-05-20)

(本文编辑:吴 倩)