

· 基础研究 ·

嗅鞘细胞移植结合步行训练对脊髓挫伤大鼠神经功能的影响

叶超群 孙天胜 张立仁 刘彦 岳峰 蔡艳华

【摘要】目的 探讨嗅鞘细胞移植结合步行训练对脊髓挫伤大鼠神经功能的影响。**方法** (75±1)d 雌性 SD 大鼠 40 只分为 A、B、C、D 4 组,制作脊髓挫伤模型后,A 组行嗅鞘细胞移植结合步行训练,B 组行嗅鞘细胞移植,C 组行步行训练结合改良 Eagle 培养基(DMEM)注射,D 组行 DMEM 注射。细胞移植和 DMEM 注射在造模后 2 周进行,步行训练利用大鼠活动平板进行,自伤后 1 周开始,每周 5 d,每天 1 次,每次 15~30 min,共训练 10 周。造模后每周利用 BBB 评分观察大鼠后肢运动功能,移植后 9 周取材,取脊髓行相关指标的免疫化学染色。**结果** ①与 D 组比较,A 组和 C 组大鼠后肢 BBB 评分自伤后第 4 周始出现明显改善,B 组仅在伤后第 5~8 周出现明显改善;伤后第 11 周末时,A、B、C、D 组大鼠后肢 BBB 评分分别为(13.14±0.24)、(11.64±0.56)、(12.29±0.64)和(11.07±0.84),A 组较其它三组明显增高。②各组腰段脊髓切片 TH 阳性神经元计数差异无统计学意义($P>0.05$),但 A 组和 C 组横切片上 VII~IX 层可见胞体较大和较小、轮廓清楚的两种 TH 阳性神经元,而 B 组和 D 组则仅出现胞体较小的神经元。**结论** 嗅鞘细胞移植结合步行训练可明显改善脊髓挫伤大鼠神经功能。

【关键词】 脊髓挫伤; 嗅鞘细胞移植; 步行训练; 神经功能; 酪氨酸羟化酶

The effect of olfactory ensheathing cell transplantation combined with walking training on neurofunction recovery in rats after spinal cord contusion YE Chao-qun*, SUN Tian-sheng, ZHANG Li-ren, LIU Yan, YUE Feng, CAI Yan-hua. * Orthopaedic Department, The Beijing Army General Hospital, Beijing 100700, China

Corresponding author: SUN Tian-sheng, Email: Suntiasheng - @163.com

【Abstract】Objective To explore the effect of olfactory ensheathing cell (OEC) transplantation combined with walking training on neurofunction recovery in rats after spinal cord contusion. **Methods** Forty adult female rats aged (75±1) days were subjected to experimental spinal cord contusion at the T₁₀ level using a New York University impactor at a height of 25 mm. They were then divided into 4 groups: (1) an OEC transplantation combined with walking training (OEC-walking training) group, (2) an OEC transplantation (OEC) group, (3) a walking training combined with Dulbecco's modified Eagle medium injection (DMEM) (walking training-DMEM) group, and (4) a DMEM injection (SCI-DMEM) group. The OEC transplants and DMEM injections were performed 2 weeks post-injury. Walking training began at the 7th day post-injury and consisted of daily sessions (once daily, 5 days a week for 10 weeks) of quadrupedal treadmill training, starting from 15 min and gradually increasing to 30 min daily, at speeds starting from 3 m/min and gradually increasing in accordance to the condition of the rats. Locomotor function recovery of the rats' hindlimbs was evaluated weekly using the Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) locomotor rating scale. The expression of tyrosine hydroxylase (TH) was detected in the injured region of the lumbar spinal cord. **Results** The BBB scores of rats in the OEC-walking training group and the walking training-DMEM group improved significantly from the 4th week post-injury compared to the SCI-DMEM injection group. Rats in the OEC transplantation group had a significant improvement in BBB scores at the 5th to 8th weeks post-injury. At the end of the 11th week post-injury, the average BBB scores were 13.14±0.24 in the OEC-walking training group, 11.64±0.56 in the OEC transplantation group, 12.29±0.64 in the walking training-DMEM group and 11.07±0.84 in the SCI-DMEM group. The OEC-walking training group scored significantly higher than the other 3 groups. Although the number of TH-positive neurons in the lumbar spinal cord was not significantly different among the groups, the morphology of TH-positive

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.12.003

基金项目:北京市教委科技计划面上项目(km200710029003)、国家自然科学基金项目(30872604)和北京市虹天济神经科学研究院科研基金

作者单位:100700 北京,北京军区总医院骨科(叶超群、孙天胜、张立仁);首都体育学院(叶超群、岳峰、蔡艳华);北京市虹天济神经科学研究院(刘彦)

通信作者:孙天胜,Email:Suntiasheng - @163.com

neurons in the OEC-walking training group and the walking training-DMEM group was different from those in the OEC transplantation group and the SCI-DMEM group. **Conclusions** OEC transplantation combined with walking training can effectively promote the functional recovery of the hindlimb. The plasticity of the descending TH system and of motoneurons of the ventral horn of the lumbar spinal cord might mediate the changes.

【Key words】 Spinal cord contusion; Olfactory ensheathing cells transplantation; Walking training; Neurofunction; Tyrosine hydroxylase

增强脊髓的可塑性是脊髓损伤修复的策略之一。将再生策略与康复措施相结合能进一步增强脊髓可塑性,可能是最具前景的脊髓损伤修复方法^[1]。我们的前期研究显示,混合移植的嗅鞘细胞和雪旺氏细胞虽然可促进脊髓损伤部位周围组织神经丝(neurofilament, NF)和生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)的表达,但大鼠后肢运动功能仅出现暂时性改善^[2]。本研究在此基础上,探讨细胞移植结合步行训练对脊髓挫伤大鼠神经功能的影响,为进一步研究及临床应用提供参考。

材料与方法

一、实验材料

(75 ± 1) 日龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF) 二级雌性 Sprague Dawley (SD) 大鼠 40 只(微通利华实验动物中心), 打击器(Impactor II, 美国新泽西大学神经科学合作中心提供), 恒温冷冻切片机, 立体定位仪, 微量显微注射器, 环孢霉素注射液, 共聚焦显微镜, 荧光显微镜, 来源于 7 日龄绿荧光 SD 大鼠的嗅鞘细胞(由北京西山医院神经外科研究室提供), 鼠源抗髓磷脂相关蛋白(myelin basic protein, MBP) 单克隆抗体(SMI-199, Covance), 鼠源抗 NF 单克隆抗体(N0142, Sigma), 鼠源抗 GAP-43 多克隆抗体(北京博菲康生物技术公司), 兔源抗酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase, TH) 多克隆抗体(Molecular), 二抗包括羊抗大鼠 633(goat-anti-rat 633)、羊抗小鼠 488(goat-anti-mouse 488) 和羊抗大鼠 488(goat-anti-rat 488), 二抗均为分子探针公司(Molecular) 产品。

二、实验方法

(一) 模型制作

依据 Gruner 方法^[3] 利用 Impactor II 打击器制作脊髓挫伤模型: 0.4% 戊巴比妥钠[(35 ± 5) mg/kg 体重]腹腔注射麻醉, 以 T₁₀ 棘突为中心常规备皮、消毒、铺巾, 以 T₁₀ 棘突为中点作长约 1 cm 的纵行切口, 逐层剪开皮肤、筋膜、钝性分离椎旁软组织, 暴露 T_{8~10} 棘突和椎板, 游离 T₁₀ 椎板上下缘, 咬去 T₁₀ 椎板和 T₉ 椎板的下半部分, 暴露硬膜, 固定 T₈ 和 T₁₁ 棘突并使大鼠悬空, 接通打击器电路, 调节打击高度为 25 mm 并进行打击, 大鼠立即出现一过性鼠尾摆动和后肢痉挛。逐层缝合肌肉、筋膜和皮肤。术后 1 周内每日给予青霉

素 20 万单位肌注 2 次, 1 个月内每日排尿 1 次, 常规饲养。

(二) 动物分组、细胞移植及步行训练

1. 动物分组: 将 40 只大鼠分为 A、B、C、D 4 组, 每组 10 只, A 组行嗅鞘细胞移植结合步行训练、B 组行嗅鞘细胞移植, C 组行步行训练结合改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modification of Eagle's medium, DMEM) 注射, D 组 DMEM 注射。大鼠在造模后 1 周开始步行训练, 造模后 2 周进行嗅鞘细胞移植或在细胞移植部位注射等量 DMEM。

2. 细胞移植方法: 移植前 30 min 开始消化、洗涤细胞, 用不含血清的 DMEM 将细胞稀释成浓度为 1 × 10⁵ 个/μl 的悬液; 注射于距损伤中心 0.5 mm 处的头侧、尾侧脊髓中线上, 每个部位注射 4 个点, 深度分别为 1.75 mm、1.25 mm、1 mm 和 0.5 mm; 每点注射 0.5 μl (含嗅鞘细胞 0.5 × 10⁵ 个); 注射速度为 0.1 μl/min, 每点注射完毕后留针 5 min, 然后缓慢退出; 术毕逐层缝合筋膜、皮肤。移植后每日给予青霉素 20 万单位肌注 2 次, 共 5 d; 自移植前一天开始每天给予环孢霉素(10 mg/kg 体重) 皮下注射, 直至取材。

3. 步行训练: 利用大鼠活动平板进行步行训练, 每周 5 d, 每天 1 次, 每次 15 ~ 30 min (刚开始 15 min, 逐步过渡到 30 min), 开始步行速度为 3 m/min, 以后根据大鼠步行情况逐渐增加, 共训练 10 周。

(三) 观察指标及方法

1. 后肢运动功能: 采用 BBB (Basso-Beattie-Bresnahan) 评分^[4], 双盲法评定, 每只大鼠按要求观察 4 min, 伤后每周 1 次。

2. 免疫荧光染色: 伤后 11 周取材, 4% 多聚甲醛心脏灌注固定, 迅速取出脊髓后, 将脊髓分为以损伤部位为中心长 10 mm、其头侧 10 mm 长、10 mm 长的腰段及其尾侧 2 mm 脊髓段, 恒冷箱冰冻切片机上分别行冠状和横切片, 片厚 10 μm, 每隔 8 张取 1 张, 直接贴在预先用 0.1% 明胶处理过的载玻片上(每张载玻片贴 6 张切片), -80 ℃ 保存。1 个月内分别完成免疫荧光染色。

每组随机抽取 3 只大鼠损伤部位切片分别进行神经丝 NF/GAP-43(每组均取第 2 套切片)、MBP(每组均取第 3 套切片) 及 NF(每组均取第 4 套切片) 免疫荧光化学染色, 以观察移植细胞在脊髓内的迁移及功

能。每组每只大鼠均取腰段脊髓第 3 套冠状切片和横切片行 TH 染色。

免疫荧光染色主要步骤:从 -80°C 冰箱内取出切片复温后用 0.01 mol/L 磷酸缓冲盐 (phosphate buffer saline, PBS) 漂洗 $10\text{ min} \times 3$ 次,含 10% 山羊血清的 0.1% Triton X-100 的 PBS (0.1% PBST) 常温封闭 2 h ,加入相应滴度的一抗 (NF/GAP-43 免疫荧光双染,滴度分别为: NF $1:400$, GAP-43 $1:200$, MBP $1:200$, TH $1:500$), 4°C 湿盒过夜, 0.01 mol/L PBS 漂洗 $10\text{ min} \times 3$ 次,相应荧光二抗 ($1:400$) 常温孵育 2 h ,漂洗、晾干后封片。

TH 阳性神经元计数方法:荧光显微镜下 (200 倍) 计数每只大鼠第 3 套横切片左侧灰质第 VII ~ IX 层 TH 阳性运动神经元数量,每组计数 5 只大鼠,每只大鼠计数 1 套切片 (6 张,取平均值)。

三、统计学分析

采用 SPSS 13.0 版软件,各时间点组间 BBB 评分比较采用单因素方差分析,各组腰骶部 TH 阳性神经元计数的比较采用多个独立样本的秩和检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

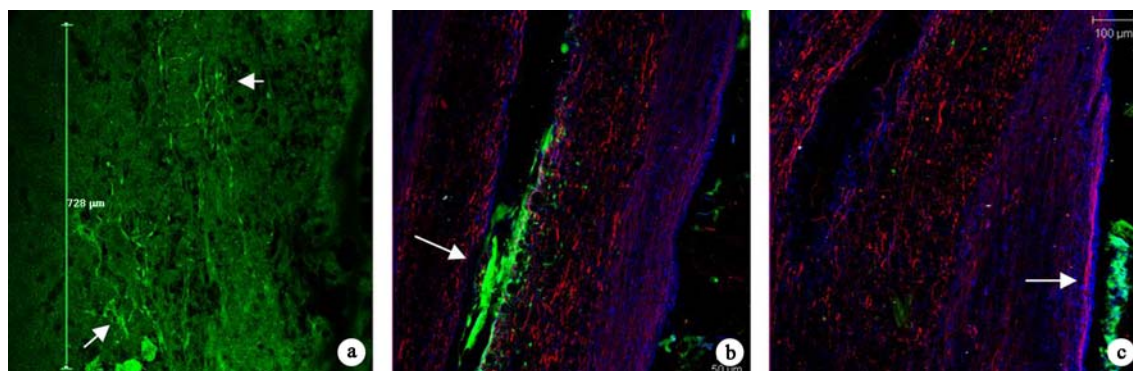
40 只大鼠均制作脊髓损伤模型, C 组 1 只大鼠因循环衰竭在伤后 5 周时死亡, A 组 1 只大鼠因自噬被剔出, 各组最终纳入统计 BBB 评分的大鼠均为 9 只, 进行 TH 阳性神经元计数为每组 5 只。

一、移植嗅鞘细胞在损伤脊髓内的迁移

移植后 8 周时,可见嗅鞘细胞沿 3 条途径迁移:主要沿脊髓纵轴方向在白质和灰质内迁移 (图 1a), 还有一部分在中央管 (图 1b) 和蛛网膜下腔 (图 1c) 迁移。

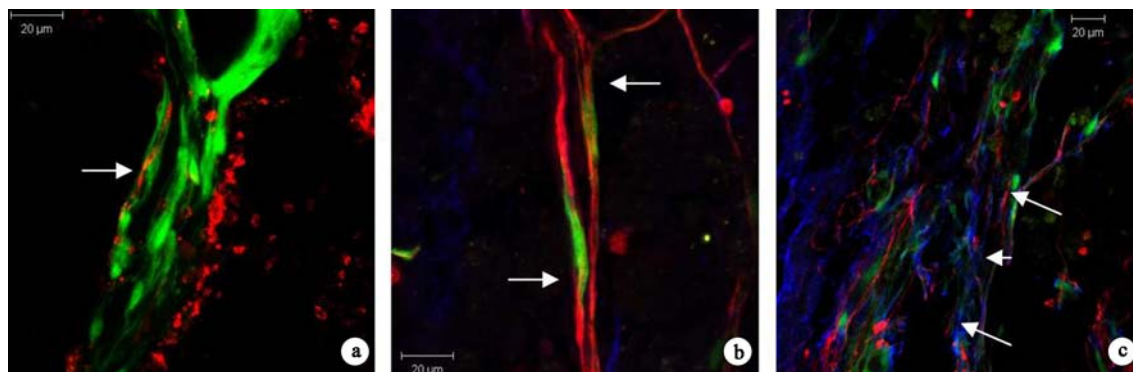
二、移植嗅鞘细胞促进 MBP、NF 和 GAP-43 表达

移植后 8 周时,脊髓损伤部位切片上可见红色的 MBP (图 2a) 和 NF (图 2b) 阳性纤维伴随嗅鞘细胞的迁移而延伸, NF/GAP-43 双染示部分红色的 GAP-43 阳性纤维和蓝色的 NF 阳性纤维分别伴随绿荧光细胞的迁移延伸的同时,部分伴随细胞延伸的 NF 和 GAP-43 阳性纤维出现共染 (图 2c), 说明移植的嗅鞘细胞可以促进髓鞘形成、轴突再生并为轴突延伸提供“支架”。



注: a. 主要沿白质和灰质迁移; b. 在中央管内迁移; c. 在蛛网膜下腔迁移

图 1 嗅鞘细胞在脊髓内的迁移 (共聚焦照相)



注: a. 部分迁移的绿荧光细胞周围可见红色的 MBP 表达; b. 红色的 NF⁺ 纤维伴随绿荧光细胞延伸; c. 绿荧光细胞周围可见大量蓝色的 NF⁺ 和红色的 GAP-43⁺ 纤维, 部分绿荧光细胞与 NF 和 GAP-43 共染

图 2 移植的嗅鞘细胞与 MBP、NF、NF/GAP-43 的免疫荧光染色 (共聚焦照相)

三、腰段脊髓 TH 表达

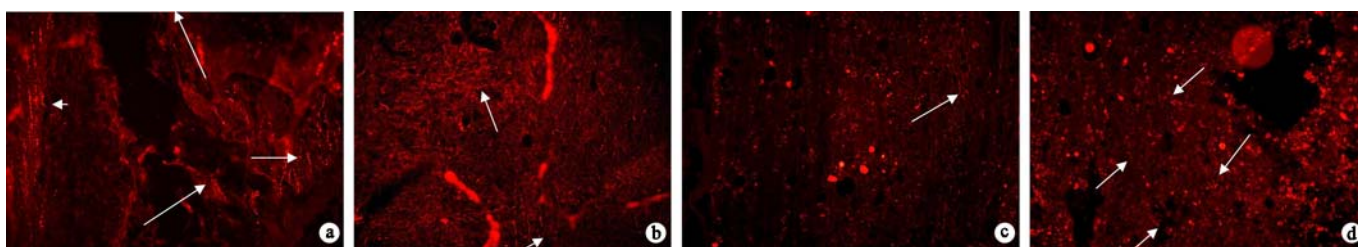
1. 冠状切片上 TH 阳性纤维染色:腰段脊髓冠状切片上 TH 阳性纤维主要分布于中央管周围的灰质。A 组既可见沿脊髓纵轴走向排列规则的 TH 阳性纤维,也可见排列不规则的 TH 阳性纤维(图 3a);B 组 TH 阳性纤维排列不规则,纵横交错(图 3b);C 组(图 3c)和 D 组(图 3d)TH 阳性纤维染色较浅,数量少,排列不规则。

2. 横切片上神经元的 TH 染色:各组横切片上可见神经元表达 TH 和 TH 阳性纤维,TH 阳性神经元主要位于脊髓的 VII ~ IX 层,部分 TH 阳性神经元周边出现 TH 阳性纤维。TH 阳性神经元计数显示各组间差异无统计学意义($P > 0.05$),但从形态和大小上看,A 组(图 4a)和 C 组(图 4c) VII ~ IX 层包括胞体较大和较小、轮廓清楚的两种 TH 阳性神经元,而 B 组(图 4b)和 D

组(图 4d)则仅出现胞体较小的神经元,尤其是 B 组,TH 阳性神经元胞体不清楚且主要集中于前角,其周围出现较多的 TH 阳性纤维。

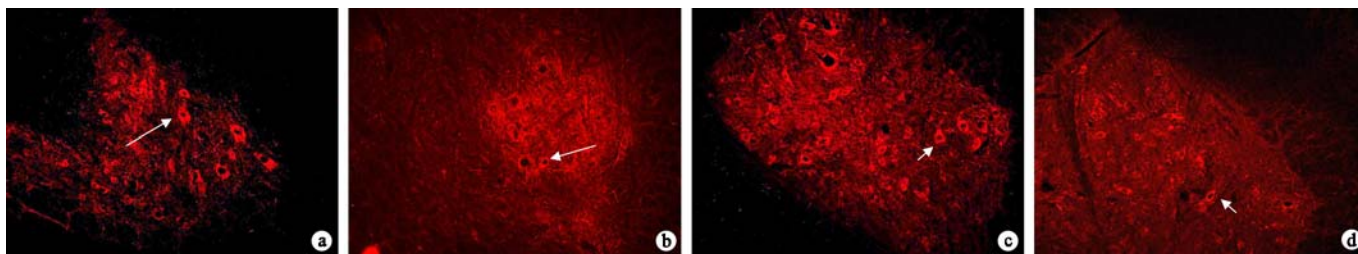
四、各组大鼠后肢运动功能评分

各组大鼠后肢功能在伤后 1 周即出现细微恢复征象,在 2 ~ 4 周恢复最明显,D 组在伤后 4 ~ 6 周达稳定状态(平台期),各实验组则在伤后 6 ~ 10 周出现较稳定的平台期。单因素方差分析显示,BBB 评分自伤后 4 周始组间出现明显差异($P < 0.0001$),各组均值多重比较显示,A 组和 C 组 BBB 评分自伤后 4 周始一直较 D 组明显改善,B 组仅在伤后 5 ~ 8 周较 D 组出现明显改善;A 组分别在伤后 8 ~ 9 周较 B 组和 C 组出现明显改善,C 组较 B 组仅在伤后第 10 周时出现明显改善。见表 1。



注:a. A 组可见沿脊髓纵轴走向排列规则的红色 TH 阳性纤维;b. B 组 TH 阳性纤维排列不规则,纵横交错;c. C 组 TH 阳性纤维较排列;d. D 组 TH 阳性纤维不连续、染色浅、数量较少、无规则排列

图 3 腰段脊髓冠状切片 TH 免疫荧光染色(荧光显微照相, $\times 200$)



注:a. A 组在 VII ~ IX 层可见散在分布的胞体较大和较小、轮廓清楚的 2 种 TH 阳性神经元;b. B 组 TH 阳性神经元胞体较小,轮廓不清楚,其周围可见较多的 TH 阳性纤维;c. C 组 TH 阳性神经元散在分布,少数 TH 阳性神经元胞体较大;d. D 组 TH 阳性神经元体积较小,散在分布

图 4 腰段脊髓横切片 TH 免疫荧光染色(荧光显微照相, $\times 200$)

表 1 各组大鼠伤后后肢运动功能评分(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	伤后时间					
		1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周
A 组	10	1.86 ± 0.38	3.93 ± 1.24	6.00 ± 1.00	9.71 ± 0.64 ^b	10.71 ± 0.76 ^c	11.64 ± 0.56 ^c
B 组	10	2.15 ± 0.75	4.21 ± 1.52	6.07 ± 1.02	9.00 ± 0.50	10.43 ± 0.79 ^c	11.07 ± 0.79 ^b
C 组	10	2.07 ± 0.98	4.07 ± 0.53	7.07 ± 1.39	9.43 ± 0.19 ^a	10.64 ± 0.48 ^c	11.43 ± 0.35 ^c
D 组	10	2.29 ± 0.90	4.29 ± 1.03	6.00 ± 1.04	8.14 ± 0.69	8.86 ± 0.69	9.86 ± 0.80

组别	只数	伤后时间				
		7 周	8 周	9 周	10 周	11 周
A 组	10	11.79 ± 0.39 ^e	12.29 ± 0.81 ^{ce}	13.07 ± 0.53 ^{ceh}	13.00 ± 0.50 ^{ceh}	13.14 ± 0.24 ^{cef}
B 组	10	11.43 ± 0.45 ^c	11.29 ± 0.49 ^a	11.29 ± 0.49	11.36 ± 0.38	11.64 ± 0.56 ^j
C 组	10	11.64 ± 0.48 ^c	11.71 ± 0.49 ^b	11.79 ± 0.49 ^b	12.00 ± 0.56 ^c	12.29 ± 0.64
D 组	10	10.36 ± 0.48	10.57 ± 0.45	10.29 ± 0.39	10.93 ± 0.35	11.07 ± 0.84

注:与 D 组同期比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.001$;与 B 组同期比较,^d $P < 0.05$,^e $P < 0.001$,^f $P < 0.001$;与 C 组同期比较,^g $P < 0.05$,^h $P < 0.01$,ⁱ $P < 0.05$

讨 论

将再生治疗、康复训练等多种措施有机结合,进一步增强脊髓可塑性是目前脊髓损伤修复研究领域的热点。本研究通过在伤后 1 周进行步行训练、伤后 2 周进行嗅鞘细胞移植的综合措施干预脊髓挫伤模型大鼠,发现细胞移植结合步行训练组和步行训练结合改良 Eagle 培养基注射组大鼠后肢功能均自伤后 4 周开始出现明显改善,自伤后 8、9 周间分别较 A 组出现明显改善,说明 3 种干预方案中,细胞移植结合步行训练在促进脊髓挫伤大鼠后肢功能恢复中最为有效。3 种方案对腰段脊髓表达 TH 的运动神经元数量虽然没有影响,但细胞移植和步行训练以不同的方式影响脊髓 TH 能系统可塑性。

本研究结果显示,嗅鞘细胞虽可在脊髓内迁移,并促进脊髓表达 MBP、NF 和 GAP-43,但 B 组大鼠后肢 BBB 评分仅在伤后 5~8 周较 D 组出现改善,以后 2 组无明显差异,说明嗅鞘细胞可促进髓鞘形成、轴突再生,并为轴突延伸提供支架,但仅能使脊髓挫伤大鼠后肢运动功能出现暂时改善。此结果与 Guest 等^[5]的研究结果一致。Guest 等^[5]的研究显示,利用灵长类嗅鞘细胞移植入 T₉ 横断大鼠脊髓内,发现伤后 8 周实验组 BBB 评分较对照组出现明显改善,12 周达高峰,以后逐步降低,18 周后 2 组无明显区别。我们认为, BBB 评分在短暂的改善后出现降低可能与细胞死亡有关。与 Guest 等^[5]的研究结果不同的是,本研究中嗅鞘细胞移植大鼠功能改善出现较早而持续时间较短,我们推测可能与以下因素有关:①二者动物模型不同。本研究采用的是适度挫伤模型,残留的白质纤维较全横断模型为动物功能恢复和移植的嗅鞘细胞发挥功能提供了更好的基础。②移植时间不同。Guest 等在伤后即刻进行细胞移植;本研究考虑到损伤后即刻(急性期)进行细胞移植不适合临床,慢性期(造模 4 周后)移植由于胶质瘢痕的形成不利于移植细胞的迁移,故选择伤后 2 周(亚急性期)进行细胞移植。Lopez-Vales 等^[6]分别在伤后即刻和 1 周时对 T₈ 全横切大鼠进行嗅鞘细胞移植,发现伤后即刻移植的大鼠在伤后 2~3 个月后肢运动功能出现改善,平均达到(4.2±0.7)分;而伤后 1 周移植者在伤后 3~4 个月才开始出现改善,平均分为(3.7±0.4)分;Steward 等^[7]的研究则显示,在 T₁₀ 脊髓横切大鼠,伤后 30 d 将嗅鞘细胞植入脊髓后,虽然移植细胞可促进 5-HT 再生,但移植后 9 周内大鼠后肢运动功能无任何变化。此外,细胞来源不同也可能是导致而这些结果差异的重要原因。已有研究显示,细胞来源、细胞培养程序、细胞移植的时间和部位等均是影响移植嗅鞘细胞发挥功能的常见因素^[8]。

嗅鞘细胞使脊髓损伤大鼠后肢运动功能改善的机制主要包括:分泌神经营养因子和血管源性因子,促进局部残存轴突芽生及传播能力^[9];促进血管的发生、髓鞘的形成、轴突的生长^[10];抑制胶质瘢痕,使再生的轴突通过损伤的区域^[11]。然而, Guest 等^[5]的研究显示,移植嗅鞘细胞并未能促进皮质脊髓束再生,但却能促进 5-HT 能纤维再生,最长的 5-HT 纤维甚至可达距损伤部位 6.2 mm 的尾侧,但是当再次横断大鼠脊髓后,大鼠后肢运动功能并不改变,说明其与长距离的纤维再生无关。

步行训练是脊髓损伤的常规康复措施,可明显促进脊髓损伤模型动物和临床患者的神经功能改善。本研究结果显示, A 组和 C 组自伤后 4 周起,大鼠后肢运动功能开始较 D 组出现明显改善,直到实验结束。Kubasak 等^[12]的研究则显示: T₉ 段脊髓全横断大鼠在伤后即刻进行嗅鞘细胞移植和/或伤后 2 周开始步行训练,单独进行嗅鞘细胞移植大鼠在伤后 7 个月时出现 2 步以上的足掌着地步态,单独的步行训练则对步态和步行能力无任何影响;嗅鞘 A 组步行能力在 4~7 月出现明显改善。虽然二者研究中单独的细胞移植和步行训练结果不同,但均证实嗅鞘细胞结合步行训练能明显改善脊髓损伤大鼠后肢运动功能恢复。

Kubasak 等^[12]的研究还显示,在 T₉ 段脊髓全横断大鼠,移植嗅鞘细胞可促进损伤部位组织赦免、促进去甲肾上腺素能纤维再生并越过损伤部位到达尾侧,结合步行训练时能通过增强脊髓的任务依赖性可塑性进一步促进大鼠后肢运动功能改善;而 B 组损伤部位尾侧 5-HT 纤维数量和偶尔出现的神经元数量与 D 组相似。我们的研究中,由于采用的是挫伤模型,考虑到残留纤维的影响以及 TH 阳性纤维排列不规则,未对损伤部位尾侧 TH 阳性纤维的数量和的长度进行统计,且细胞移植、步行训练、A 组腰段脊髓 VII~IX 层 TH 阳性运动神经元数量较 D 组无明显改变,但在 C 组和 A 组脊髓横切片上,可见较多轮廓清楚体积较大的神经元,而 D 组和 B 组则仅见胞体较小的神经元, B 组则出现较多的 TH 阳性纤维, B 组脊髓纵切片上除可见与脊髓纵轴方向一致的 TH 阳性纤维,还出现了横向或无规则排列的 TH 阳性纤维,提示细胞移植可能主要通过促进 TH 阳性纤维的发芽、步行训练则主要影响神经元的可塑性来促进大鼠功能改善。由于在脊髓 VII~IX 层主要包括胞体较小的中间神经元和胞体较大的前角运动神经元,我们推测,步行训练可能增强了脊髓中间神经元和前角运动神经元的可塑性,使之表达 TH,促进脊髓中枢模式发生器(central pattern generator, CPG)重组,从而使动物功能出现改善。已有研究证实,谷氨酸盐能、多巴胺和去甲肾上腺素能、5-HT 能这 3 条网状脊

髓运动传导途径是中脑运动区的运动指令到 CPG 的传递者^[13],在脊髓损伤后,可通过中间神经元的作用参与 CPG 的重新激活进而促进脊髓损伤动物后肢运动功能改善^[14]。酪氨酸羟化酶是儿茶酚胺生物合成的限速酶,在中枢神经系统主要分布位于脑干的多巴胺能和去甲肾上腺素能神经元,其轴突在脊髓内广泛分布,并与脊髓中间神经元发生联系,通过调节多巴胺和去甲肾上腺素的合成参与机体的运动调节。我们的结果虽然提示脊髓 TH 系统和前角运动神经元可塑性可能在介导步行训练促进脊髓损伤大鼠后肢运动功能恢复中起重要作用,但步行训练到底是增强了多巴胺能系统还是去甲肾上腺素能系统可塑性亦或二者兼而有之?有待进一步研究。

总之,本研究结果显示,嗅鞘细胞移植结合步行训练可明显改善脊髓挫伤大鼠后肢运动功能,机制可能与 TH 下行系统和腰段脊髓前角运动神经元可塑性有关。

致谢 本课题进行过程中,得到了北京市虹天济神经科学研究院神经再生研究室全体同志的大力帮助,在此表示衷心感谢

参 考 文 献

- [1] Schwab ME. Repairing the injured spinal cord. *Science*, 2002, 295: 1029-1031.
- [2] 叶超群,孙天胜,蔡艳华,等. 嗅鞘细胞和雪旺氏细胞混合移植促进大鼠脊髓损伤修复. *中国脊柱脊髓杂志*, 2009, 19: 676-681.
- [3] Gruner JA. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma*, 1992, 9: 123-126.
- [4] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*, 1995, 12: 1-21.
- [5] Guest JD, Herrera L, Margitich I, et al. Xenografts of expanded pre-mate olfactory ensheathing glia support transient behavioral recovery that is independent of serotonergic or corticospinal axonal regeneration in nude rats following spinal cord transection. *Exp Neurol*, 2008, 212: 261-274.
- [6] López-Vales R, Forés J, Verdú E, et al. Acute and delayed transplantation of olfactory ensheathing cells promote partial recovery after complete transection of spinal cord. *Neurobiol Dis*, 2006, 21: 57-68.
- [7] Steward O, Sharp K, Selvan G, et al. A re-assessment of the consequences of delayed transplantation of olfactory lamina propria following complete spinal cord transection in rats. *Exp Neurol*, 2006, 198: 483-499.
- [8] Richter MW, Roskam AJ. Olfactory ensheathing cell transplantation following spinal cord injury: hype or hope? *Exp Neurol*, 2008, 209: 353-367.
- [9] Barnett SC, Riddell JS. Olfactory ensheathing cell transplantation as a strategy for spinal cord repair-what can it achieve? *Nat Clin Pract Neurol*, 2007, 3: 152-161.
- [10] Fransse EH, de Bree FM, Verhaagen J. Olfactory ensheathing glia: Their contribution to primary olfactory nervous system regeneration and their regenerative potential following transplantation into the injured spinal cord. *Brain Res Rev*, 2007, 56: 236-258.
- [11] Raisman G, Li Y. Repair of neural pathways by olfactory ensheathing cells. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8: 312-319.
- [12] Kubasak MD, Jindrich DL, Zhong H, et al. OEG implantation and step training enhance hindlimb-stepping ability in adult spinal transected rats. *Brain*, 2008, 131: 264-276.
- [13] Falgariolle M, de Seze M, Juvin L, et al. Coordinated network functioning in the spinal cord: an evolutionary perspective. *J Physiol Paris*, 2006, 100: 304-316.
- [14] Jordan LM, Liu J, Hedlund PB, et al. Descending command systems for the initiation of locomotion in mammals (5-6). *Brain Res Rev*, 2008, 57: 183-191.

(修回日期:2010-02-20)

(本文编辑:松 明)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

关于作者修改稿件的提示

编辑部收到稿件后通常会经过编辑初审以及 2 位同行专家评审,然后综合各方意见决定稿件初步的处理情况。如果作者收到退修意见,说明稿件被接受的可能性大,但必需重视稿件的修改。强烈建议作者参照退修清单意见和文中批注逐条认真修改和补充,修改结束后在文后附一详细的修改说明,阐述对相关问题是否进行了修改和补充或者无法修改的原因。

编辑部收到修改稿后会再次经过编辑核对和同行专家复审或者定稿,最终确定稿件能否刊用或是否需要再次修改,因此一份恰当的修改说明将有利于作者、编者与审稿者的沟通,有助于稿件被顺利采纳。