

· 论 著 ·

BDNF 基因修饰真皮多能干细胞移植对脊髓损伤的修复作用*

宗兆文¹, 张连阳¹, 沈岳¹, 郭庆山¹, 任永川¹, 冉新泽², 史春梦², 程天民²

(1. 第三军医大学大坪医院/野战外科研究所全军战创伤中心创伤科, 重庆 400042;

2. 第三军医大学全军复合伤研究所国家创伤、烧伤与复合伤重点实验室复合伤分室, 重庆 400038)

摘要:目的 观察脑源性神经营养因子(BDNF)基因修饰的真皮多能干细胞(dMSCs)移植后对损伤脊髓的修复作用。方法 将 72 只大鼠采用改良 Allen 重物打击法制备脊髓损伤模型, 将其随机均分为 A 组[接受 BDNF 腺病毒表达载体(Adv-BDNF)感染的 dMSCs 移植]、B 组(接受未感染 Adv-BDNF 的 dMSCs 移植)、C 组(单纯 Adv-BDNF 注射)和 D 组(单纯脊髓损伤)。免疫荧光组织化学检测脊髓损伤局部 BDNF 的表达, 流式细胞仪检测损伤脊髓局部细胞凋亡情况, BBB(Basso, Beattie and Bresnahan locomotor rating scale)神经行为学评分法评价受伤大鼠神经功能恢复情况。结果 A 组和 C 组大鼠损伤脊髓局部 BDNF 表达高于 B 组和 D 组; 与 B、C、D 组比较, A 组脊髓损伤部位的细胞凋亡率最低, 神经功能恢复最好。结论 BDNF 与 dMSCs 移植可协同促进损伤脊髓功能的恢复。

关键词: 脊髓损伤; 脑源性神经营养因子; 干细胞移植; 大鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.29.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)29-2913-02

Role of transplantation of BDNF gene-modified dermal multipotent stem cells in repairment of spinal cord injury*Zong Zhaowen¹, Zhang Lianyang¹, Shen Yue¹, Guo Qingshan¹, Ren Yongchuan¹, Ran Xinze², Shi Chunmeng², Chen Tianming²

(1. Department of Traumatology, Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Combined Injury Branch, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury of PLA, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the repair effects of transplantation of dermal multipotent stem cells (dMSCs) modified by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene on spinal cord injury. **Methods** 72 rats was used to establish spinal cord injury models with improved Allen's falling strike method, and then they were randomly divided into 4 groups: group A [accepted transplantation of dMSCs infected by adenovirus vector of BDNF (Adv-BDNF)], group B (accepted transplantation of dMSCs not infected by Adv-BDNF), group C (injection with only Adv-BDNF) and group D (only spinal cord injury). Immunofluorescence histochemistry and flow cytometry were employed to detect the expression of BDNF and apoptosis of cells in the site of spinal cord injury, respectively. BBB neurological behavior score method was used to assess neurofunctional recovery of injured rats. **Results** Expression of BDNF in the site of spinal cord injury in group A and C were higher than those in group B and D; Compared with group B, C, D group, group A showed the lowest percentage of apoptotic cells in the site of spinal cord injury and the best neurofunctional recovery. **Conclusion** BDNF and dMSCs transplantation can synergistically promote the functional recovery of injured spinal cord.

Key words: spinal cord injuries; brain-derived neurotrophic factor; stem cell transplantation; rats

脊髓损伤 (spinal cord injury) 后的功能恢复是医学研究的难点之一, 其修复的主要策略包括减少脊髓损伤后的继发性损伤, 采用组织或细胞移植促进中枢神经系统的可塑性变化以及应用刺激神经生长的因子和 (或) 阻断抑制轴突生长的物质以促进受损轴突的再生等^[1-2]。脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 是研究最为广泛的神经营养因子之一, 在神经系统中的作用广泛而强大。大量的实验证实, BDNF 可以保护脊髓运动神经元, 并可促进红核脊髓束和皮质脊髓束轴突再生或出芽^[3-4]。而干细胞移植被认为是修复脊髓功能损伤最有前景的方法之一, 本课题前期实验发现真皮多能干细胞 (dermal multipotent stem cell, dMSCs) 可在体外被诱导为神经元和胶质细胞^[5-7], 其他学者也证实 dMSCs 移植后可促进脊髓损伤后的功能恢复^[8]。为了同时发挥 dMSCs 和 BDNF 的修复效果, 本研究观察了 BDNF 腺病毒表达载体 (adenovirus vector of BDNF, Adv-BDNF) 感染的 dMSCs 移植后对脊髓损伤的修复效果, 报道如下。

1 材料与方**1.1 动物和主要试剂** Wistar 大鼠购自第三军医大学大坪医

院动物所。Adv-BDNF 由本实验室张正丰博士构建并馈赠。兔抗鼠 BDNF 多克隆抗体和异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 结合的第二抗体购自 Sigma-Aldrich 公司。免疫组化试剂盒购自 Boster 公司。细胞培养用培养瓶、培养基及血清等购自 Hyclone 公司。

1.2 dMSCs 的分离培养与转染 参照本研究所建立的早期贴壁法进行 dMSCs 的分离培养和鉴定^[9]。方法简述如下: 新生 1 d Wistar 大鼠, 引颈处死, 乙醇消毒, 剪取皮肤置于 0.25% 胰酶消化过夜; 次日, 用磷酸缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 清洗, 去除表皮和皮下组织, 将真皮组织剪成细胞碎片并吹打成细胞悬液, 过滤并接种于培养瓶中; 6 h 后, 弃培养液和悬浮细胞, 继续培养早期贴壁细胞; 反复传代至有集落样细胞群体产生, 按常规方法接种和选取细胞克隆, 传代备用; dMSCs 移植前 4 h 向其培养基中加入 0.2 mL 第 3 代 Adv-BDNF 病毒原液 (病毒滴度约为 1.5×10^{10} PFU/mL, PFU 为 plaque-forming unit, 即空斑形成单位); 继续培养 4 h 后收集 dMSCs, 制成浓度为 1×10^7 /mL 的细胞悬液, 备用。

1.3 建模、细胞移植与分组 成年 Wistar 大鼠 72 只采用改

* 基金项目: 创伤烧伤与复合伤国家重点实验室自主课题 (SKLZZ 200817); 重庆市自然科学基金重点项目 (CSTC, 2009BA5017)。

良 Allen 重物打击法制作脊髓损伤模型^[10],方法简述如下:将麻醉后的大鼠俯卧位固定,显露 T10 节段脊髓,用质量 20 g、打击头直径 2.5 mm 的打击器自 2.5 cm 高处自由落下,造成 T10 节段脊髓打击伤。受伤大鼠随机分为 A、B、C、D 四组:A 组接受 Adv-BDNF 感染的 dMSCs 移植($n=18$),将 100 μL 感染 Adv-BDNF 的 dMSCs 悬液缓慢用微量注射器注入损伤脊髓处,注射完毕留针 5 min 以防细胞渗漏。B 组接受未感染 Adv-BDNF 的 dMSCs 移植($n=18$)。C 组接受单纯 Adv-BDNF 注射($n=18$)。D 组为单纯脊髓损伤($n=18$)。其中,B、C 组的注射方式、部位、细胞密度及液体用量与 A 组相同。为防止膀胱感染,术后人工挤压膀胱排尿,2 次/天。

1.4 免疫荧光组织化学检测 细胞移植后 3 d 和 7 d,每组取 6 只大鼠颈动脉处死后取材,95%乙醇固定,常规制备 5 μm 厚的脊髓石蜡切片,PBS 漂洗 3 次,血清封闭后加兔抗鼠 BDNF 多克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS 漂洗 3 次后加荧光第二抗体,室温孵育 1 h。荧光显微镜观察。

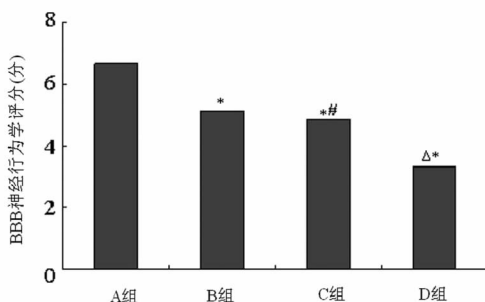
1.5 损伤脊髓局部凋亡细胞检测 取伤后 3 d 大鼠脊髓,每组 6 只,常规消化、离心,冷 PBS 洗细胞 2 次,加入预冷 70%乙醇,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。离心收集细胞,以 1 mL 的 PBS 洗涤细胞 1 次,加入 500 μL 含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溴化乙锭、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNA 酶 A、0.2% Triton X-100 的 PBS,采用流式细胞仪检测凋亡细胞的百分比。

1.6 行为学检测 伤后 7 d 采用 BBB(Basso, Beattie and Bresnahan locomotor rating scale)神经行为学评分法评定大鼠的功能恢复情况^[11-12],功能评价完毕,取材进行上述 1.4 步骤的免疫组织化学检测。

1.7 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, t 检验进行组间分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脊髓损伤后大鼠脊髓中 BDNF 的表达 BDNF 阳性细胞呈绿色荧光。A 组大鼠损伤的脊髓中有大量较强的绿色荧光,为 BDNF 阳性细胞,大部分呈长梭状,少数为神经元样细胞(封 2 图 1 A),提示大部分 BDNF 阳性细胞为 dMSCs,其余可能为少数 dMSCs 坏死崩解后释放病毒感染脊髓损伤局部的神经元或脊髓损伤引起局部反应而出现神经元 BDNF 的阳性表达。C 组大鼠局部可见大量 BDNF 阳性细胞,多为神经元形状(封 2 图 1 C),提示 Adv-BDNF 局部注射可有效地感染脊髓损伤局部的神经细胞。B 组和 D 组脊髓损伤局部 BDNF 阳性细胞数量明显稀少(封 2 图 1 B、D)。伤后 7 d,A 组和 C 组大鼠脊髓损伤局部 BDNF 阳性细胞数量无明显减少,B 组和 D 组阳性细胞数量也无明显变化。



*: $P<0.05$,与 A 组比较; Δ : $P<0.05$,与 B、C 组比较;#: $P>0.05$,与 B 组比较。

图 2 脊髓损伤 7 d 大鼠的 BBB 神经行为学评分

2.2 脊髓损伤后大鼠脊髓中细胞的凋亡 脊髓损伤急性期

(1~3 d)为局部细胞凋亡的高峰期,因此,本研究观察脊髓损伤 3 d 时细胞的凋亡情况。结果显示 A 组大鼠脊髓损伤局部细胞的凋亡率为 $(4.7\pm 0.4)\%$,略低于 C 组 $(4.9\pm 0.3)\%$,差异无统计学意义($P>0.05$),但其明显低于 B 组 $[(6.2\pm 0.4)\%]$ ($P<0.05$)和 D 组 $[(6.7\pm 0.5)\%]$ ($P<0.05$)。

2.3 BBB 神经行为学评分法对大鼠神经功能的评价 伤后 7 d A 组大鼠神经功能恢复最好,明显优于其他各组($P<0.05$);B 组和 C 组大鼠功能恢复相当,差异无统计学意义($P>0.05$),但二者均高于 D 组($P<0.05$)。见图 2。

3 讨论

干细胞移植被认为是修复脊髓损伤最有前景的方法之一。相对于神经干细胞和胚胎干细胞,皮肤来源的干细胞移植具有取材方便、来源丰富、可进行自体移植等诸多优点。目前,已经从真皮中分离到包括 dMSCs、皮肤源性前体细胞等多种干细胞,均可在适当的条件下被诱导为神经元或胶质细胞,移植后可促进损伤的脊髓神经功能恢复^[8,13-14]。本研究的前期实验显示,dMSCs 在体外可被诱导为神经元和胶质细胞,提示 dMSCs 可作为修复脊髓损伤的合适选择。

使用神经营养素是修复脊髓损伤的另一策略。BDNF 是目前被证实的作用最强的神经营养因子,可促进神经元的存活以及受损红核脊髓束和皮质脊髓束轴突的再生或出芽^[3-4],在脊髓损伤的修复中具有重要作用。为了同时发挥 BDNF 和 dMSCs 的作用,本研究采用腺病毒感染的方法用 BDNF 基因修饰 dMSCs,然后将其移植到脊髓损伤局部,结果表明较单纯 dMSCs 移植和单纯 BDNF 基因修饰,接受 Adv-BDNF 感染的 dMSCs 移植能更好地促进神经功能的恢复。

本研究初步探讨了 BDNF 基因修饰 dMSCs 的移植对脊髓损伤的修复作用。结果表明 BDNF 基因修饰可减少脊髓损伤局部细胞的凋亡,对脊髓损伤后的二次损伤具有一定的预防作用。而 dMSCs 的作用可能不是通过减少局部细胞的凋亡来实现,因为单纯 dMSCs 移植组脊髓损伤局部细胞的凋亡率高于单纯 BDNF 修饰组,但两组大鼠的神经功能恢复并无显著差异,提示 dMSCs 对损伤脊髓功能恢复的促进还可能还存在其他机制,如 dMSCs 在脊髓损伤局部分化为神经元和胶质细胞而参与损伤修复。BDNF 基因修饰 dMSCs 移植还可能通过保护大脑皮层的投射神经元(如皮质脊髓束),使其免于细胞凋亡以及促进损伤轴突的再生^[15],从而达到修复损伤的目的。这些可能机制还需进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] 刘涛,付碧琼,姚志慧,等.细胞移植治疗脊髓损伤的研究进展[J].重庆医学,2010,39(1):109-111.
- [2] 王晓红,邵彬,王琴,等.高压氧治疗对脊髓损伤后大鼠神经细胞凋亡及行为学评分的影响[J].重庆医学,2010,39(8):935-936.
- [3] Hiebert GW, Khodarahmi K, McGraw J, et al. Brain-derived neurotrophic factor applied to the motor cortex promotes sprouting of corticospinal fibers but not regeneration into a peripheral nerve transplant[J]. J Neurosci Res, 2002, 69(2):160-168.
- [4] Jin Y, Fischer I, Tessler A, et al. Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote axonal regeneration from supraspinal neurons following chronic spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2002, 177(1): 265-275.

(下转第 2917 页)

- inflammatory response after traumatic brain injury: Implications for cellular therapy[J]. *Surgery*, 2008, 144(5): 803-813.
- [4] Jin W, Wang H, Yan W, et al. Disruption of Nrf2 enhances upregulation of nuclear factor-kappaB activity, proinflammatory cytokines, and intercellular adhesion molecule-1 in the brain after traumatic brain injury[J]. *Mediators Inflamm*, 2008, 2008: 725174.
- [5] Briassoulis G, Papassotiropoulos I, Mavrikiou M, et al. Longitudinal course and clinical significance of TGF-beta1, sL- and sE-Selectins and sICAM-1 levels during severe acute stress in children[J]. *Clin Biochem*, 2007, 40(5/6): 299-304.
- [6] Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K. Adhesion and migration of polymorphonuclear leukocytes across human brain microvessel endothelial cells are differentially regulated by endothelial cell adhesion molecules and modulate monolayer permeability[J]. *J Neuroimmunol*, 2007, 184(1/2): 136-148.
- [7] Gong Y, Xi G, Wan S, et al. Effects of aging on complement activation and neutrophil infiltration after intracerebral hemorrhage[J]. *Acta Neurochir (Suppl)*, 2008, 105: 67-70.
- [8] Ambrosini A, Louin G, Croci N, et al. Characterization of a rat model to study acute neuroinflammation on histopathological, biochemical and functional outcomes[J]. *J Neurosci Methods*, 2005, 144(2): 183-191.
- [9] Kebir DE, Jozsef L, Pan W, et al. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation[J]. *Circ Res*, 2008, 103(4): 352-359.
- [10] Breckwoldt MO, Chen JW, Stangenberg L, et al. Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme myeloperoxidase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(47): 18584-18589.
- [11] Royo NC, Wahl F, Stutzmann JM. Kinetics of polymorphonuclear neutrophil infiltration after a traumatic brain injury in rat[J]. *Neuroreport*, 1999, 10(6): 1363-1367.
- [12] Furuichi Y, Noto T, Li JY, et al. Multiple modes of action of tacrolimus (FK 506) for neuroprotective action on ischemic damage after transient focal cerebral ischemia in rats[J]. *Brain Res*, 2004, 1014(1/2): 120-130.
- [13] Clausen F, Lorant T, Lewén A, et al. T lymphocyte trafficking: a novel target for neuroprotection in traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2007, 24(8): 1295-1307.
- [14] Titova E, Ostrowski RP, Kevil CG, et al. Reduced brain injury in CD18-deficient mice after experimental intracerebral hemorrhage[J]. *J Neurosci Res*, 2008, 86(14): 3240-3245.
- [15] Jiang N, Chopp M, Chahwala S. Neutrophil inhibitory factor treatment of focal cerebral ischemia in the rat[J]. *Brain Res*, 1998, 788(1/2): 25-34.
- [16] Fleming JC, Norenberg MD, Ramsay DA, et al. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury[J]. *Brain*, 2006, 129(Pt 12): 3249-3269.

(收稿日期: 2011-04-22 修回日期: 2011-06-04)

(上接第 2914 页)

- [5] Martinez M, Brezun JM, Bonnier L, et al. A new rating scale for open-field evaluation of behavioral recovery after cervical spinal cord injury in rats[J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(7): 1043-1053.
- [6] McMahon SS, Albermann S, Rooney GE, et al. Effect of cyclosporin A on functional recovery in the spinal cord following contusion injury[J]. *J Anat*, 2009, 215(3): 267-279.
- [7] Shi C, Cheng T. Effects of acute wound environment on neonatal rat dermal multipotent cells[J]. *Cells Tissues Organs*, 2003, 175(4): 177-185.
- [8] Gorio A, Torrente Y, Madaschi L, et al. Fate of autologous dermal stem cells transplanted into the spinal cord after traumatic injury(TSCI)[J]. *Neuroscience*, 2004, 125(1): 179-189.
- [9] Zong ZW, Cheng TM, Su YP, et al. Recruitment of transplanted dermal multipotent stem cells to sites of injury in rats with combined radiation and wound injury by interaction of SDF-1 and CXCR4[J]. *Radiat Res*, 2008, 170(4): 444-450.
- [10] McMahon SS, Albermann S, Rooney GE, et al. Engraftment, migration and differentiation of neural stem cells in the rat spinal cord following contusion injury[J]. *Cytotherapy*, 2010, 12(3): 313-325.
- [11] Swartz KR, Scheff NN, Roberts KN, et al. Exacerbation of spinal cord injury due to static compression occurring early after onset[J]. *J Neurosurg Spine*, 2009, 11(5): 570-574.
- [12] Sandrow-Feinberg HR, Izzi J, Shumsky JS, et al. Forced exercise as a rehabilitation strategy after unilateral cervical spinal cord contusion injury[J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(5): 721-731.
- [13] Biernaskie J, Sparling JS, Liu J, et al. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(36): 9545-9559.
- [14] McKenzie IA, Biernaskie J, Toma JG, et al. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(24): 6651-6660.
- [15] 宗兆文, 邵阳, 伍亚民, 等. 腺病毒介导的人心肌营养素对颈脊髓损伤大鼠功能恢复的作用[J]. *实用医学杂志*, 2006, 22(20): 2038-2341.

(收稿日期: 2011-04-24 修回日期: 2011-05-20)