

# 骨髓单核细胞移植对脊髓横断大鼠神经营养因子-3和突触素表达的影响

张富运<sup>1</sup>, 杨建华<sup>1</sup>, 王蕾<sup>2</sup>, 赵中男<sup>1</sup>, 热吉普<sup>1</sup>, 刘士臣<sup>1</sup>, 乔建民<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的:探讨骨髓单核细胞(BMMNCs)移植对脊髓横断(SCT)大鼠脊髓组织中神经营养因子-3(NT-3)和突触素(SYN)表达的影响。方法:146只Winstar大鼠(SPF级,雌雄不限)随机分为3组:SCT组49只,建立SCT模型;实验组49只,建立SCT模型,给予BMMNCs移植治疗;假手术组48只,切除对应的椎板不损伤脊髓;各组大鼠分别于术后5、7、14和21d行后肢功能BBB评分,RT-PCR和免疫组织化学技术检测受损脊髓组织中NT-3和SYN的表达。结果:术后5、7、14和21d各时间点各组大鼠后肢BBB评分比较,SCT组和实验组均低于假手术组( $P<0.05$ ),且SCT组更低于实验组( $P<0.05$ )。术后5、7、14和21d各时间点NT-3阳性细胞数及NT-3 mRNA比较,SCT组和实验组均高于假手术组( $P<0.05$ ),且SCT组更低于实验组( $P<0.05$ )。SYN阳性颗粒数及SYN mRNA比较,SCT组和实验组均低于假手术组( $P<0.05$ ),且SCT组更低于实验组( $P<0.05$ )。结论:BMMNCs能够上调局部损伤脊髓NT-3和SYN的表达。

**【关键词】** 骨髓单核细胞;脊髓横断;细胞移植;神经营养因子-3;突触素

**【中图分类号】** R49;R457.7 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2014.04.001

**Effects of bone marrow mononuclear cells transplantation on the expression of NT-3 and SYN in rats with spinal cord injury** ZHANG Fu-yun, YANG Jian-hua, WANG Lei, et al. Department of Orthopedic Surgery, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154007, China

**【Abstract】** Objective: To explore the effects of bone marrow mononuclear cells (BMMNCs) on the expression of neurotrophin-3 (NT-3) and synaptophysin (SYN) in the injured spinal cord of rats with complete transection of the spinal cord (SCT). Methods: The rat model of complete SCT was set up, and 146 rats were divided randomly into Sham group ( $n=48$ ), SCT model group ( $n=49$ ) and experimental group ( $n=49$ ). Sham group, removing the corresponding lamin and suturing muscle and skin separately; SCT model group, establishing SCT models; experimental group, given BMMNCs transplantation in the SCT models. On the postoperative day (POD) 5, 7, 14 and 21, the rat hindlimb was scored by the scale of Basso, Beattie and Bresnahan (BBB Grading), and the expression levels of NT-3 and SYN were detected by the immunohistochemistry and RT-PCR. Results: On the POD 5, 7, 14 and 21, BBB scores in experimental group and SCT model group were significantly lower than in Sham group ( $P<0.05$ ), and those in SCT model group were lower than in experimental group ( $P<0.05$ ). RT-PCR and immunohistochemistry revealed the expression levels of NT-3 mRNA and number of NT-3 positive cells in experimental group and SCT model group were significantly increased as compared with Sham group ( $P<0.05$ ), and those in SCT group were higher than in experimental group ( $P<0.05$ ). The positive particles of SYN and SYN mRNA in experimental group and SCT model group were significantly increased as compared with Sham group ( $P<0.05$ ), and those in SCT model group were increased as compared with those in experimental group ( $P<0.05$ ). Conclusions: BMMNCs can promote the expression of NT-3 and SYN in injured spinal cord tissues, which may be one of the mechanisms by which BMMNCs repair spinal cord injury.

基金项目:黑龙江省自然科学基金(D201160);黑龙江省教育基金(12511539);黑龙江省卫生厅基金(2010-521)

收稿日期:2014-04-10

作者单位:1.佳木斯大学第一附属医院骨外一科,黑龙江佳木斯154007;2.焦作市妇幼保健院儿内科,河南焦作454000

作者简介:张富运(1984-),男,硕士研究生,主要从事神经损伤治疗方面的研究。

通讯作者:杨建华, jinghua01@163.com

**【Key words】** bone marrow mononuclear cells; complete transection of spinal cord; cell transplantation; neurotrophin-3; synaptophysin

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是目前世界上公认的致残率最高的疾病之一。动物实验和临床学者都证实了骨髓单核细胞(bone marrow mononuclear cells, BMMNCs)在治疗 SCI 方面取得了可观的效果<sup>[1]</sup>,但其治疗机制仍不十分清楚。神经营养因子-3(neurotrophin-3, NT-3)被认为可通过提高受损神经元的存活、促进轴突的延伸,在中枢神经受损后修复过程中起重要的作用<sup>[2]</sup>,其突触素(synaptophysin, SYN)在神经元、神经内分泌细胞以及神经终末广泛存在,参与突触发生、神经递质释放及突触囊泡的再循环<sup>[3]</sup>,尤其在神经突分化、延伸的过程中有着特定的意义。BMMNCs 植入宿主神经损伤处能够存活,且向损伤周围聚集,促进轴突生长,亦或自身或激发宿主表达神经营养因子等而改善 SCI 后的微环境,促进神经修复并抑制胶质源瘢痕形成等,病变部位变小,被局限化,宿主运动和(或)感觉的功能得到改善,但其作用机制不明确<sup>[1]</sup>。本实验通过观察 BMMNCs 移植脊髓横断(spinal cord transaction, SCT)模型大鼠,对大鼠后肢功能及受损脊髓组织中 NT-3、SYN 表达的影响,揭示在 BMMNCs 移植后 NT-3、SYN 表达改变是脊髓功能恢复的机制之一。

## 1 材料与方法

1.1 材料 ①动物:健康 Wistar 大鼠 150 只, SPF 级,雌雄不限,体质量(180.0±20.0)g,由长春市亿斯实验动物技术有限责任公司提供[许可证号:SCXK(吉)-2011-0004]。实验中,对动物的处置符合我国相关伦理学规定。②试剂及仪器:兔抗鼠 NT-3 多克隆抗体、兔抗鼠 SYN 多克隆抗体、即用型 SABC-POD(兔 IgG)试剂盒、DAB 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);RNAiso Plus、RT-PCR 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司];淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司);德国 Leica 2016 切片机;德国 Leica DMS1000 显微镜。

1.2 方法 ①分组:150 只大鼠随机抽取 4 只用于 BMMNCs 的制备,余 146 只分为 3 组:SCT 组( $n=49$ )、实验组( $n=49$ )和假手术组( $n=48$ )。②SCT 模型:将实验组和 SCT 组动物用 10%水合氯醛腹腔注射(0.7ml/只)麻醉成功后固定于无菌工作台,术区常规处理,按肋骨确定椎体序列,并定位 T<sub>9</sub> 节段脊髓,行后正中长约 1.5cm 切口,完全暴露椎骨,咬除对应棘突与椎板,借助外科剪在 T<sub>9</sub> 节段剪开椎管,使脊髓后面及其两侧暴露完全,用弯头显微纤维镊子将脊髓轻轻撬起,用手术尖刀将脊髓迅速完全离断,生理盐水冲洗,逐层缝合关闭术区,常规消毒,成功制成 SCT 模

型。术后青霉素腹腔注射防感染,定时排便。③ BMMNCs 制备:取 4 只大鼠提取 BMMNCs。无菌条件下取大鼠双侧股骨和胫骨,用 1ml 注射器吸取无菌生理盐水(经抗凝处理)冲洗髓腔于离心管。用 Ficoll 密度梯度离心法分离出 BMMNCs<sup>[4]</sup>。借助显微镜用台盼蓝计数器计数,检测细胞活性为 93%;再加无菌 PBS 缓冲液制成 BMMNCs 悬液,配置浓度为  $6 \times 10^{11}$ /L 个的单核细胞悬液,4℃ 冰箱保存。④干预:SCT 组分别于椎管内脊髓离断面上上下两端注射 15 $\mu$ l PBS 缓冲液;实验组分别于椎管内脊髓离断面上上下两端注射 15 $\mu$ l 浓度为  $6 \times 10^{11}$ /L 的 BMMNCs 悬液。98 只大鼠造模成功后因感染脱失 2 只。假手术组切除对应的椎板不损伤脊髓,逐层缝合肌肉和皮肤。

1.3 评定标准 各组大鼠分别于术后 5、7、14 和 21d 进行指标观察。①动物行为学观察:采用 BBB 评分评价各组大鼠后肢功能<sup>[5]</sup>。评定前,戴无菌手套以大鼠腹中线为标志,拇指和示指从下腹两侧适度挤压大鼠膀胱,排空尿液。将动物置于一广口木质容器,其底部粗糙,不时地敲容器,使其爬行,观察并记录评分。② NT-3、SYN 蛋白表达及免疫组织化学技术检测:每组取 6 只大鼠行 BBB 评分测定后,用 10%水合氯醛腹腔注射麻醉。灌注后进行固定,于损伤脊髓离断面向头尾各 0.5cm 处取出完整的脊髓,放入 4%多聚甲醛 4℃ 冰箱保存。依据免疫组织化学试剂盒说明书,采用石蜡切片微波修复抗原免疫组化 SABC 法染色程序。3 $\mu$ m 厚石蜡切片于 60℃ 烤箱烤片 15min;切片于各级二甲苯脱蜡、0.3%甲醇-过氧化氢室温 10min 灭活内源性酶、乙醇脱水;将切片浸入 0.01mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),微波炉在 MEDLO 条件下热修复,每次 10min,共 2 次。室温冷却后用 0.1mol/L PBS 震荡洗涤 5min $\times$ 3 次,滴加抗原修复液,37℃ 孵育 20min,振荡洗涤后滴加 5% BSA 封闭液,孵育后滴加稀释的抗 NT-3 或抗 SYN (1:100),置于湿盒中 4℃ 冰箱过夜;滴加生物素化山羊抗兔 IgG,孵育和洗涤后滴加 SABC;室温下二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)显色并镜下控制反应时间,苏木素再染脱水后中性树胶封片;在目的区域随机取 5 个完整且不重叠的高倍镜视野(400 $\times$ ),求其阳性产物数量。③ NT-3、SYNmRNA 表达:引物设计由生工生物工程上海有限公司合成,见表 1。各组取 6 只大鼠,麻醉成功后,取出损伤的脊髓组织(包括损伤两侧各约 5mm 脊髓),分别按 RNAiso Plus、RNA PCR 试剂盒说明书提取总 RNA,然后其浓度用紫外分光光度仪测量。按照 RT-PCR 试剂盒说明书合成 cDNA,起始总 RNA 样品均取 4 $\mu$ g,行 RT-PCR 反应。PCR 反应条件:94℃

预变性 5min, 94℃ 变性 30s, 58℃ 复性 30s(NT-3) 或 60℃ 复性 30s(SYN), 72℃ 延伸 30s, 共 40 次循环, 72℃ 延伸 10min, 4℃ 中止。采用全自动数码凝胶图像分析系统采集和分析。以各样本基因 NT-3、SYN 的拷贝数和其基因 GAPDH 内参的拷贝数的比值进行数据统计。

表 1 引物及内参基本信息

基因	引物序列	产物长度(bp)
GAPDH	正义 5'-ACAGCAACAGGGTAGTGGAC-3'	252
	反义 5'-TTTGATGGTGCAGCGAACTT-3'	
NT-3	正义 5'-CAACAGACACAGTACTACTACGGC-3'	476
	反义 5'-GAAGTGTCTACTCGTATCCAGCG-3'	
SYN	正义 5'-TGGACGTAGTGAATCAGCTGG-3'	889
	反义 5'-TGTAGGCCATAGCCTTGCTGC-3'	

1.4 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计分析软件对实验数据进行统计学处理。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用方差分析或 q 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 动物行为学观察 术后 5、7、14 和 21d 各时间点各组大鼠后肢 BBB 评分比较, SCT 组和实验组均低于假手术组 ( $P < 0.05$ ), 且 SCT 组更低于实验组 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

2.2 免疫组化及 RT-PCR 检测结果 术后 5、7、14 和 21d 各时间点 NT-3 阳性细胞数及 NT-3 mRNA 比较, SCT 组和实验组均高于假手术组 ( $P < 0.05$ ), 且 SCT 组更低于实验组 ( $P < 0.05$ )。SYN 阳性颗粒数及 SYN mRNA 比较, SCT 组和实验组均低于假手术组 ( $P < 0.05$ ), 且 SCT 组更低于实验组 ( $P < 0.05$ )。见表 3、4, 图 1~3。

表 2 3 组大鼠术后 5、7、14 和 21d 后肢 BBB 评分比较 分,  $\bar{x} \pm s$

组别	n	5d	7d	14d	21d
假手术组	6	20.61±0.43	21.00±0.00	21.00±0.00	21.00±0.00
SCT 组	6	0.50±0.02 <sup>a</sup>	0.61±0.01 <sup>a</sup>	2.15±0.01 <sup>a</sup>	2.27±0.01 <sup>a</sup>
实验组	6	0.55±0.01 <sup>ab</sup>	0.97±0.01 <sup>ab</sup>	2.41±0.01 <sup>ab</sup>	2.97±0.01 <sup>ab</sup>

与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 SCT 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

表 3 3 组大鼠 NT-3 阳性细胞数和 SYN 阳性颗粒数后 5、7、14 和 21d 比较 个,  $\bar{x} \pm s$

组别	n	指标	5d	7d	14d	21d
假手术组	6	NT-3	6.57±0.15	7.15±0.13	6.53±0.16	6.69±0.15
SCT 组	6		9.34±0.22 <sup>a</sup>	8.66±0.13 <sup>a</sup>	7.39±0.34 <sup>a</sup>	6.31±0.15 <sup>a</sup>
实验组	6		10.46±0.30 <sup>ab</sup>	12.11±0.25 <sup>ab</sup>	8.05±0.11 <sup>ab</sup>	7.58±0.31 <sup>ab</sup>
假手术组	6	SYN	51.33±1.00	49.62±1.06	50.21±0.80	51.71±0.45
SCT 组	6		37.59±0.86 <sup>a</sup>	39.12±0.43 <sup>a</sup>	39.45±0.45 <sup>a</sup>	40.07±0.94 <sup>a</sup>
实验组	6		39.29±1.17 <sup>ab</sup>	41.14±1.24 <sup>ab</sup>	43.22±0.69 <sup>ab</sup>	45.17±0.47 <sup>ab</sup>

与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 SCT 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

表 4 3 组大鼠 NT-3 mRNA 及 SYN mRNA 的表达量术后 5、7、14 和 21d 比较  $\bar{x} \pm s$

组别	n	指标	5d	7d	14d	21d
假手术组	6	NT-3	1.04±0.02	1.01±0.01	1.03±0.01	1.07±0.01
SCT 组	6		1.12±0.04 <sup>a</sup>	1.06±0.01 <sup>a</sup>	1.05±0.01 <sup>a</sup>	0.93±0.04 <sup>a</sup>
实验组	6		1.45±0.16 <sup>ab</sup>	1.67±0.10 <sup>ab</sup>	1.51±0.13 <sup>ab</sup>	1.49±0.05 <sup>ab</sup>
假手术组	6	SYN	1.17±0.05	1.27±0.04	1.28±0.05	1.30±0.03
SCT 组	6		0.76±0.05 <sup>a</sup>	0.86±0.04 <sup>a</sup>	0.91±0.04 <sup>a</sup>	1.07±0.06 <sup>a</sup>
实验组	6		0.93±0.08 <sup>ab</sup>	1.02±0.05 <sup>ab</sup>	1.14±0.05 <sup>ab</sup>	1.23±0.04 <sup>ab</sup>

与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 SCT 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

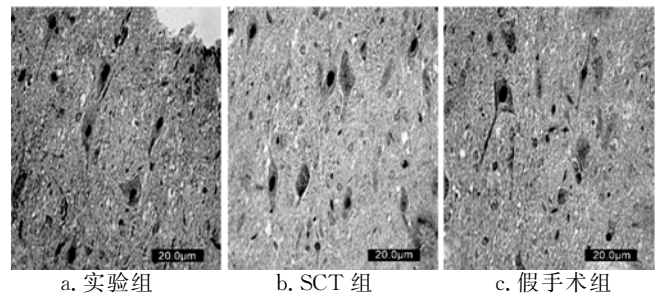


图 1 3 组大鼠术后 14d 脊髓灰质 NT-3 免疫组化检测(×400)

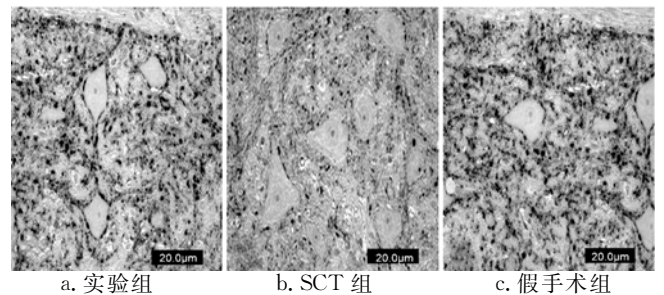


图 2 3 组大鼠术后 14d 脊髓灰质 SYN 免疫组化检测(×400)

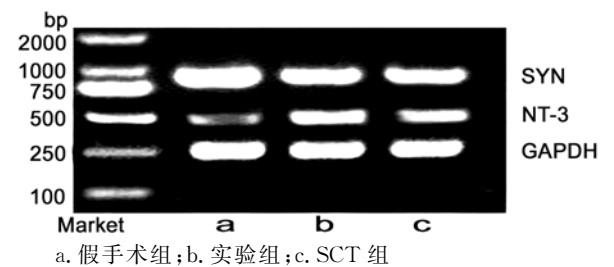


图 3 3 组大鼠术后 14d 脊髓组织中 NT-3 mRNA 及 SYN mRNA 的表达

## 3 讨论

传统观念中, 神经细胞被称作“永久性细胞”, 认为受损神经细胞及轴突很难再生, 其主要不利因素是损伤部位微环境缺乏营养物质及轴突再生诱导因子<sup>[6]</sup>。但众多研究提示, 受损神经在提供合适的条件(如有足够的神经营养因子)下仍具有再生的能力。NT-3 是神经营养素家族中重要的一员, 在维持神经元生长及轴突延伸中起重要作用<sup>[7]</sup>, 可以促进受损神经修复。

本实验中发现,动物术前行动敏捷,毛色有光泽,反应灵敏,无排便功能障碍,各组动物 BBB 测试 21 分;动物造模后 6h 完全清醒,实验组及 SCT 组损伤面以下感觉及运动功能障碍,假手术组动物无 SCI 症状,活动自如,精神状态也较好。SCT 组、实验组与假手术组比较,动物皮毛失去光泽,精神状况差,常出现尿滞留,腹部胀气,大便困难等。这与陈星星等<sup>[8]</sup>的研究是一致的,说明造模成功。

本实验通过 BBB 评分、免疫组织化学技术及 RT-PCR 结果显示大鼠脊髓功能的恢复与 NT-3、SYN 的调节密切相关,且免疫组织化学检测与 RT-PCR 检测结果的趋势基本一致。

研究表明,NT-3 其免疫阳性细胞主要存在于灰质,胞浆和胞核均可着色,胞核着色更强,以大运动神经元为主,呈棕褐色或棕色。实验发现,SCT 组与假手术组相比,术后 5、7、14d,NT-3 表达增多( $P < 0.05$ ),且 5d 时达峰值,以后逐渐减少。21d 时表达量较假手术组少,这可能与脊髓损伤后期神经元死亡、退变等致 NT-3 来源减少有关。通过 BBB 评分显示,SCT 组大鼠后肢功能随时间推移且逐渐改善,提示 NT-3mRNA 的上调可能与 SCI 大鼠后肢功能好转有直接关系<sup>[9]</sup>。实验组与 SCT 组相比,NT-3mRNA 的表达量明显较高,大鼠后肢功能恢复也较好,提示 BMMNCs 可改善 SCI 后的大鼠后肢功能且可能与 NT-3mRNA 的表达上调有关。通过免疫组化技术、BBB 评分及 RT-PCR 检测表明:实验组大鼠脊髓功能恢复与受损脊髓组织中 NT-3mRNA 的表达趋势基本一致,提示实验组大鼠后肢功能的改善可能与 BMMNCs 移植后提高 NT-3mRNA 的表达有关。

另外,SYN 其免疫阳性物质呈棕褐色或棕色,且多存在于灰质,见于神经细胞突起,点状分布,颗粒状。随时间推移,实验组与 SCT 组 SYN 表达逐渐增多,并于术后 21d 达到高峰。SCT 组与假手术组相比,术后各时间点 SYN 的表达较少,这可能与 SCI 后神经元和轴突的死亡、退变、突触破坏等致 SYN 来源减少有关。BBB 评分显示,SCT 组大鼠后肢功能逐渐改善,提示 SYNmRNA 的上调与 SCT 大鼠后肢功能好转可能有关联,这与 Pereno 等<sup>[10]</sup>的研究发现类似。研究中发现 SYN 不仅参与突触的发生、囊泡再循环,也可促进神经细胞的生长发育,在神经修复过程中也发挥了关键的治疗作用。免疫组化、BBB 评分及 RT-PCR 检测表明,实验组大鼠后肢功能恢复与受损脊髓组织中 SYNmRNA 的表达密切相关,提示实验组大鼠后肢功能的改善可能与 BMMNCs 移植上调 SYNmRNA 有关。

据上所述,BMMNCs 能够上调局部损伤脊髓 NT-3 和 SYN 的表达。这可能是 BMMNCs 治疗脊髓损伤和改善促进 SCI 后的功能恢复的机制之一。但 SCI 恢复过程是复杂的,多因素作用的结果,受损脊髓组织中 NT-3 和 SYN 的表达上调是否是 BMMNCs 改善 SCI 大鼠脊髓功能的主要机制尚需进一步探索。

#### 【参考文献】

- [1] Guo X, Bu X, Li Z, et al. Comparison of autologous bone marrow mononuclear cells transplantation and mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in experimental spinal injury[J]. *Int J Neurosci*, 2012, 122(12):723-733.
- [2] Wang X, Li Y, Gao Y, et al. Combined use of spinal cord-mimicking partition type scaffold architecture and neurotrophin-3 for surgical repair of completely transected spinal cord in rats[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2013, 24(8):927-939.
- [3] Pyeon HJ, Lee YI. Differential expression levels of synaptophysin through developmental stages in hippocampal region of mouse brain[J]. *Anat Cell Biol*, 2012, 45(2):97-102.
- [4] Al Battah F, Kock J, Ramboer E, et al. Evaluation of the multipotent character of human adipose tissue-derived stem cells isolated by Ficoll gradient centrifugation and red blood cell lysis treatment[J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(6):1224-1230.
- [5] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. *Neurotrauma*, 1995, 12(1):1-21.
- [6] Weider N, Grill RJ, Tuszynski MH. Elimination of basal lamina and the collagen "scar" after spinal cord injury fails to augment cortico spinal tract regeneration[J]. *Exp Neurol*, 1999, 160(1):40-50.
- [7] Hou S, Nicholson L, Niekerk E, et al. Dependence of regenerated sensory axons on continuous neurotrophin-3 delivery[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(38):13206-13220.
- [8] 陈星星,晏丹,袁修学,等.高压氧对大鼠脊髓损伤后移植神经干细胞增殖分化的影响[J]. *中国康复*, 2013, 28(2):83-86.
- [9] Chung CY, Yang JT, Kuo YC. Polybutylcyanoacrylate nanoparticle-mediated neurotrophin-3 gene delivery for differentiating iPS cells into neurons[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(22):5562-5570.
- [10] Pereno GL, Beltramino CA. Timed changes of synaptic zinc, synaptophysin and MAP2 in medial extended amygdala of epileptic animals are suggestive of reactive neuroplasticity[J]. *Brain Res*, 2010, 1328(30):130-138.