

·基础研究·

骨髓间质干细胞经静脉注射移植对大鼠脊髓损伤后 BDNF、NGF mRNA 表达的影响*

董 锋¹ 林建华¹ 吴朝阳¹

摘要 目的: 研究大鼠骨髓间质干细胞 (rat mesenchymal stem cells, rMSCs) 静脉注射移植对脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 后脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 表达的影响, 并探讨骨髓间质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤的机制。**方法:** 运用改良 Allen 法制备大鼠 T10 脊髓外伤性截瘫模型, 假手术组 6 只, 损伤组 84 只随机分为对照组和 rMSCs 移植组。rMSCs 组、假手术组接受 rMSCs 单细胞悬液 1ml (1×10⁶ 个 rMSCs) 自大鼠尾静脉缓慢注射移植, 对照组静脉注射 PBS 1ml。移植后 3h、6h、12h、24h、3d、7d、14d, 应用 RT-PCR 方法检测损伤大鼠脊髓 BDNF、NGF mRNA 表达变化情况。**结果:** 对照组和 rMSCs 移植组损伤脊髓 BDNF、NGF mRNA 表达较假手术组有明显增加 ($P < 0.05$); rMSCs 移植组与对照组比较 BDNF、NGF mRNA 表达增加更为明显 ($P < 0.05$)。**结论:** 脊髓损伤后损伤脊髓局部的 BDNF、NGF 表达增加, rMSCs 静脉注射移植后能促进损伤脊髓局部的 BDNF、NGF 更进一步的表达, 这可能是促进大鼠神经结构及神经功能恢复的因素之一。

关键词 脊髓损伤; 骨髓间质干细胞; 脑源性神经营养因子; 神经生长因子; 静脉移植

中图分类号: R493, R 651.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2008)-05-0416-04

Influence of intravenous administration of bone marrow mesenchymal stem cells on expression of BDNF, NGF mRNA after spinal cord injury in rats/DONG Feng, LIN Jianhua, WU Zhaoyang//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(5): 416—419

Abstract Objective: To explore the Influence of intravenous administration of bone marrow mesenchymal stem cells on expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) mRNA after spinal cord injury in rats and to study possible mechanism of intravenous administration of bone marrow mesenchymal stem cells after spinal cord injury in adult rats. **Method:** Rats were subjected to a weight driven implant injury. There are 6 in the non-injured group and 84 rats in the injured group. Then the injured group was randomly divided into transplantation group and control group. There were 7 time points in each group, $n=6$ in each point. rMSCs or PBS were infused into tail vein at 10 minutes after injury. **Result:** Expression of BDNF, NGF mRNA in the rMSCs group and in the control group was higher than that in non-injured spinal cord sections ($P < 0.05$). Compared with the control group, expression of BDNF, NGF mRNA in the rMSC group was higher significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** After spinal cord injury in rats, expression of BDNF, NGF was improved and advanced improved via intravenous administration of bone marrow mesenchymal stem cells. Maybe it is one of the mechanism of promoting restoration of injured spinal cord and improving motor function.

Author's address Dept. of Orthopaedics, The First Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, 350005

Key words spinal cord injury; bone marrow mesenchymal stem cells; brain-derived neurotrophic factor; nerve growth factor; intravenous transplantation

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 后的再生修复一直是骨科及神经科领域的研究热点。近年来细胞移植及神经组织工程的发展为 SCI 的治疗开辟了一条新途径。大鼠骨髓间质干细胞 (rat mesenchymal stem cells, rMSCs) 自我复制能力和多向分化潜能等特点受到国内外学者的关注。MSCs 移植治疗脊髓损伤的实验研究国内外均有报道^[1-3], 并取得了较好的实验效果, 但其作用机理尚不完全清楚。本实验应用 RT-PCR 方法观察大鼠脊髓损伤后 rMSCs 移植对的脑源性神经营养因子表达的影响, 探讨 rMSCs 促进

脊髓修复的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和材料

* 基金项目: 教育部科学技术研究重点项目 (01058); 福建省科技厅重点项目 (2002Y014); 福州市科技局项目 (2002-14)

1 福建医科大学附属第一医院骨科, 福建省福州市台江区茶中路 20 号, 350005

作者简介: 董锋, 男, 硕士研究生, 住院医师

收稿日期: 2007-10-23

Trizol 总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒 (Promega 公司), 脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 及 β -actin 的引物 (厦门泰京生物技术有限公司), 引物序列分别为:

BDNF (产物 705bp):

上游引物 5'-AGCCTCCTCTGCTCTTTCTGCTGGA-3'

下游引物 5'-CTTTTGTCTATGCCCCTGCAGCCTT-3'

NGF (产物 467bp):

上游引物 5'-CTG CTG AAC CAA TAG CTG CCC G-3'

下游引物 5'-CGC CTT GAC AAA GGT GTG AGT CG-3'

β -actin (产物 607bp):

上游引物 5'-ATG CCA TCC TGC GTC TGG ACC TGG C-3'

下游引物 5'-AGC ATT TGC GGT GCA CGA TGG AGG G-3'

1.2 实验动物

2—3 月龄清洁级健康雄性 SD 大鼠由福建医科大学实验动物中心提供。

1.3 rMSCs 的培养及制备

取 2 月龄清洁级 SD 雄性大鼠 5 只, 氯胺酮 (60mg/kg) 腹腔注射麻醉。消毒, 取双侧四肢骨, 剪除干骺端, 暴露骨髓腔, 用 10ml 培养液 (含 1 万 U 肝素) 冲洗骨髓腔, 所获骨髓缓慢加入含有 Ficoll-Paque 分离液 3ml 的试管内梯度离心 (2000r/min, 30min), 吸取富含粒细胞层, 加 PBS 2ml 吹打均匀后 500r/min 离心 5min, 弃上清, 重复洗涤一次。弃去上清, 加入 aMEM 培养基/20%FBS 5ml, 用吸管反复吹打成单细胞悬液, 调节细胞密度 1×10^6 个/ml, 接种于含 20%FBS 的 aMEM 培养基中, 置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度孵育箱中孵育, 间隔 3 天更换培养液。细胞传 3 代, 移植时 PBS 洗涤细胞 3 次, 调整细胞浓度 1×10^6 /ml 备用。

1.4 脊髓损伤动物模型制作、分组及治疗方法

采用改良 Allen 重物打击法制作脊髓损伤模型^[4], 具体方法如下: 大鼠氯胺酮 (60mg/kg) 腹腔注射麻醉, 麻醉成功后, 将大鼠俯卧位固定于手术台上, 背部切口处剪毛, 消毒, 铺巾, 以 T10 为中心作一长约 3cm 的纵行皮肤切口, 依次切开皮下各层组织, 暴露 T10 棘突, 用微型咬骨钳咬除该棘突及椎板, 直至 T10 段脊髓完全暴露。采用改良的 Allen 装置, 打击装置整合于立体定位仪上, 将一打击面直径为 3mm 圆形薄铜垫片 (面积 7.075mm², 重量 0.1g) 置于 T10 脊髓表面, 以重 10g 的砝码自由坠落 5cm 打击该垫片, 致伤量为 50g.cm, 造成 T10 段脊髓的冲击

伤, 依次缝合肌肉、皮肤, 关闭切口。脊髓损伤模型成功的标志: 在 Allen 装置撞击脊髓的瞬间, 动物身体抖动, 双下肢迅速发生回缩及弹动动作, 尾巴翘起并迅速倒下, 打击局部脊髓表面迅速呈瘀紫色, 术后双下肢出现完全瘫痪。术后每天行人工挤压膀胱排尿 2 次, 直至大鼠恢复自主排尿。假手术组大鼠 6 只同法暴露 T10 段脊髓, 而不造成脊髓冲击伤。假手术组 6 只, 另将损伤的大鼠 84 只随机分为对照组和 rMSCs 移植组。动物模型建立后 10min, rMSCs 组、假手术组接受 rMSCs 单细胞悬液 1ml (1×10^6 个 rMSCs) 自大鼠尾静脉缓慢注射移植, 空白对照组静脉注射 PBS 1ml。

1.5 BDNF、NGF mRNA 的表达变化的 RT-PCR 法检测

每组分别在 3h、6h、12h、24h、3d、7d、14d 7 个时相点将大鼠腹腔麻醉, 严格无菌操作下, 对照组、rMSCs 组各时间点动物 (n=6) 切取以伤段为中心脊髓组织 20mg, 放入液氮中备用。首先抽提总 mRNA, 以逆转录 (RT 法) 先合成 cDNA, 再进行 PCR 扩增; BDNF、NGF 按 94℃ 变性 5min 后, 94℃ 60s、60℃ 60s、72℃ 60s, 34 次反复循环扩增, 最后 72℃ 延伸 10min。以 β -actin 为内参照同时进行 PCR。RT-PCR 产物经电泳后用计算机图像分析仪扫描, 经凝胶图像分析系统, 对产物的电泳条带进行光密度分析, 对 BDNF、NGF mRNA 的表达给予定量。

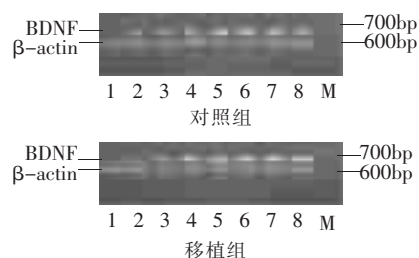
1.6 统计学分析

所有数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 用 SPSS10.0 统计软件进行 *t* 检验。P<0.05 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 BDNF mRNA 的 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

2.1.1 BDNF 扩增后各时间点均出现 750bp 左右特异性扩增带, 而 β -actin 出现 607bp 扩增带 (图 1)。



(M: Marker; 1-8: 正常脊髓、3h、6h、12h、24h、3d、7d、14d)

图 1 各组大鼠脊髓 BDNF mRNA RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

2.1.2 BDNF mRNA 转录的相对强度 (BDNF/ β -actin%): 各组 RT-PCR 产物电泳带扫描密度 (光密度值 integrated density value, IDV) 比值 (BDNF/ β -

actin)比较见表1。BDNFmRNA在假手术组中可见表达,对照组和rMSCs移植组伤后3h BDNFmRNA表达即见有增加($P<0.05$),以rMSCs移植组增加更为明显。随着受伤时间延长BDNFmRNA表达明显上升,至伤后14d仍保持在较高水平,但上升趋势趋于缓和。而rMSCs移植组与对照组比较,各时间点BDNFmRNA表达均高于相应时间点的对照组($P<0.05$)。

表1 各组大鼠脊髓 BDNF mRNA、RT-PCR 产物

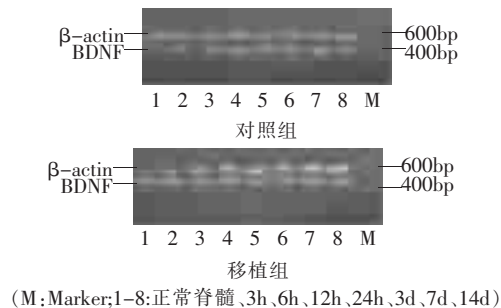
表达的半定量结果 (BDNF/ β -actin%)

时间(移植后)	对照组	rMSCs 移植组
3h	0.435 $\pm$ 0.065	0.458 $\pm$ 0.078
6h	0.617 $\pm$ 0.218	1.037 $\pm$ 0.189 ^{①②③}
12h	0.812 $\pm$ 0.229 ^②	1.510 $\pm$ 0.262 ^{①②③}
24h	1.167 $\pm$ 0.227 ^②	2.033 $\pm$ 0.286 ^{①②③}
3d	1.695 $\pm$ 0.289 ^{①②}	2.602 $\pm$ 0.735 ^{①②③}
7d	2.843 $\pm$ 0.673 ^{①②}	3.768 $\pm$ 0.719 ^{①②③}
14d	3.107 $\pm$ 0.425 ^②	4.080 $\pm$ 0.291 ^{②③}

假手术组脊髓组织 BDNFmRNA 相对灰度值为 0.320 $\pm$ 0.076。①与前一时间点同组比较 $P<0.05$;②与假手术组比较 $P<0.05$;③与同时时间点对照组比较 $P<0.05$ 。

2.2 NGFmRNA 的 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

2.2.1 NGF 扩增后各个时间点均出现 467bp 左右的特异性扩增带,而 β -actin 出现 607bp 扩增带(见图2)。



(M:Marker;1-8:正常脊髓,3h、6h、12h、24h、3d、7d、14d)

图2 各组大鼠脊髓 NGF mRNA RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

2.2.2 NGF mRNA 转录的相对强度 (NGF/ β -actin%):各组 RT-PCR 产物电泳带扫描密度 IDV 比值(NGF/ β -actin)比较见表2。NGFmRNA在假手术组中可见表达,对照组和rMSCs移植组于伤后3h

表2 各组大鼠脊髓 NGF mRNA、RT-PCR 产物

表达的半定量结果相对灰度 (BDNF/ β -actin%)

时间(移植后)	对照组	rMSCs 移植组
3h	0.860 $\pm$ 0.298	1.365 $\pm$ 0.335 ^{②③}
6h	1.112 $\pm$ 0.345 ^②	2.145 $\pm$ 0.274 ^{①②③}
12h	1.343 $\pm$ 0.333 ^②	2.660 $\pm$ 0.279 ^{①②③}
24h	1.808 $\pm$ 0.299 ^②	3.192 $\pm$ 0.278 ^{①②③}
3d	2.832 $\pm$ 0.364 ^{①②}	3.872 $\pm$ 0.485 ^{①②③}
7d	1.742 $\pm$ 0.236 ^{①②}	3.685 $\pm$ 0.291 ^{①②③}
14d	1.350 $\pm$ 0.174 ^{①②}	3.107 $\pm$ 0.333 ^{①②③}

假手术组脊髓组织 NGFmRNA 相对灰度值为 0.528 $\pm$ 0.017。①与前一时间点同组比较 $P<0.05$;②与假手术组比较 $P<0.05$;③与同时时间点对照组比较 $P<0.05$ 。

NGFmRNA 表达即见增加($P<0.05$),且 rMSCs 移植组较对照组增加更明显。伤后 3d 达高峰,随后对照组与 rMSCs 移植组 NGFmRNA 表达均呈下降趋势,对照组下降较快,但至伤后 2 周两组仍明显高于正常($P<0.05$);而 rMSCs 移植组与对照组比较,各时间点 NGFmRNA 表达均高于相应时间点的对照组 ($P<0.05$)。

3 讨论

Chopp 等^[7]第一次将 rMSCs 移植于大鼠挫伤的脊髓,观察到显著的运动功能恢复;形态学分析发现 rMSCs 表达了神经元和少突胶质细胞的蛋白标志物; rMSCs 也表现了较强的游走能力。Hofstetter 等^[8]将 rMSCs 移植于大鼠挫伤的脊髓,观察到 rMSCs 与纵向排列的非成熟星形细胞(损伤后来源于干细胞)紧密整合,形成丛桥接于损伤中心;在移植组织与瘢痕组织的界面处,发现 NF 阳性纤维和一些 5-HT 阳性纤维; rMSCs 表达了纤维蛋白连接素免疫活性和 NeuN 免疫活性;分析游走整合的 rMSCs 形成丛,提供界面引导再生的神经纤维通过损伤区并与 rMSCs 整合。而 rMSCs 向神经分化及神经修复作用机制目前尚不完全明确。有人认为 rMSCs 及其分化的神经胶质细胞含有可促进神经再生的营养因子及其受体,可促进神经组织修复,抑制瘢痕形成,也可能与向神经环路整合等有关^[9]。大量的实验表明^[8-9],损伤后的神经营养因子能够阻止损伤引起的神经元的退变,并在一定的条件下可促进未损伤的神经元生芽而重建被破坏的神经回路。

BDNF 对多种感觉神经元、胆碱能神经元、多巴胺能神经元以及 GABA 能神经元的发育分化与生长再生具有维持和促进作用。BDNF 对交感和睫状神经节不起作用,但能阻止坐骨神经横切后大量运动神经元的死亡,且能挽救脊髓半切伤后的红核神经元^[12]。Friedman 等^[13]利用 BDNF 和神经营养因子-3 (NT-3) 抗体,观察了大鼠脊髓横切后 BDNF 和 NT-3 样免疫反应分布,证实 BDNF 和 NT-3 的免疫反应都定位于灰质,尤其是前角的运动神经元及白质的一些轴索胶质细胞。并观察到 BDNF 在损伤后 3 周,运动神经元显示抗 BDNF 抗体弱阳性,损伤后 4 周,灰质中星状细胞显示抗 BDNF 抗体阳性,证明 BDNF 参与脊髓修复过程,提出利用 BDNF 挽救脊髓损伤中神经元很有潜力。本实验结果显示,BDNFmRNA 在正常成年大鼠脊髓表达甚微,脊髓损伤 6hBDNFmRNA 表达显著增加,72h 达到高峰,之后上升趋势较为缓和。可以推测,BDNF 对正常成年大

鼠脊髓的功能维持也发挥作用。脊髓损伤后 BDNFmRNA 表达增加, 是神经元自我保护作用的一种表现, 脊髓损伤后神经细胞的生理活动需要更多的 NGF 来维持。本实验结果还显示, 在不同时间点 rMSCs 移植组损伤脊髓组织的 BDNFmRNA 表达比假手术组高且均高于相应时间点的对照组, 可见脊髓损伤的大鼠移植 rMSCs 后可显著提高 BDNFmRNA 表达, 有助于促进损伤脊髓的修复。同时也表明, 脊髓损伤后 BDNF 分泌增加较为缓和, 提示其主要在脊髓损伤的晚期发挥作用。故而 BDNF 在挽救脊髓损伤中神经元具有很大潜力。

Tuszynski 等^[10]在成年鼠脊髓损伤后, 通过基因转移 NGF 的研究证实, NGF 能诱导感觉神经元和去甲肾上腺素能神经元纤维延伸, 使局部运动神经元纤维发芽。Fernandez 等^[11]在大白鼠横断性脊髓损伤局部注入 NGF, 发现实验组比对照组的皮质脊髓束轴突的密度显著增高。脊髓损伤后 NGF 表达明显增加。本实验结果显示, NGFmRNA 在正常成年大鼠脊髓仅轻微表达, 脊髓损伤 3hNGFmRNA 表达明显增加, 72h 达到高峰, 随后呈下降趋势, 但仍明显高于正常水平。可以推测, NGF 对正常成年大鼠脊髓的功能维持发挥一定作用。脊髓损伤后 NGFmRNA 表达增加, 是神经元自我保护作用的一种反应。进一步研究还显示, 不同时间点 rMSCs 移植组损伤脊髓组织的 NGFmRNA 表达比假手术组高且均高于相应时间点的对照组, 可见脊髓损伤的大鼠移植 rMSCs 后可显著提高 NGFmRNA 表达, 有助于促进损伤脊髓的修复。与 BDNFmRNA 表达相比较, 脊髓损伤后 NGFmRNA 表达上升得更快, 更早, 这提示了 BDNF 主要在脊髓损伤的早期发挥脊髓损伤修复的作用。

移植 rMSCs 在宿主体内可向损伤区脊髓迁移、存活并聚集, 但其机制尚不清楚, 可能与损伤部位趋化因子的产生和释放有关。rMSCs 移植治疗的可能作用有: ①rMSCs 向神经元和胶质细胞分化起到细胞替代作用, 通过与神经通路建立广泛的传入传出联系甚至重建神经环路和髓鞘再生等机制诱导神经保护作用。②迁移至局部 rMSCs 及其分化的神经细胞反应性分泌各种各样的生长因子, 产生神经保护

作用和促进局部微血管再生, 促进神经再生和重构, 抑制炎症因子表达, 减轻损伤局部的继发性炎症反应, 从而起到治疗脊髓损伤的作用。

参考文献

- [1] 林建华, 雷盛民, 康德智, 等. 静脉注射骨髓间质干细胞对脊髓损伤修复作用的实验研究[J]. 中华骨科杂志, 2005, 25(9): 556.
- [2] Wu S, Suzuki Y, Noda T, et al. Bone marrow stromal cells enhance differentiation of cocultured neurosphere cells and promote regeneration of injured spinal cord[J]. Neurosci Res, 2003, 72(3): 343.
- [3] Zurita M, Vaquero J. Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation [J]. Neuroreport, 2004, 15(7): 1105.
- [4] Khan T, Havey RM, Sayers ST, et al. Animal models of spinal cord contusion injuries[J]. Lab Anim Sci, 1999, 49(2): 161—172.
- [5] Lua LL, Jonesa MH, Tuszynski AB. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury[J]. Experimental Neurology, 2005, 191(2): 344—360.
- [6] Arthur B, Mary JR, Lynne CW. NGF message and protein distribution in the injured rat spinal cord[J]. Experimental Neurology, 2004, 188(1): 115—127.
- [7] Frank L. Protective effect of keratinocyte growth factor against lung abnormalities associated with hyperoxia in prematurely born rats[J]. Biol Neonate, 2003, 83(3): 263—272.
- [8] Warner B, Stuart L, Papes R, et al. Alterations in cellular proliferation and inflammatory mediators associated with chronic hyperoxia in neonatal mice[J]. Pediatr Res, 1997, 41(2): 272—278.
- [9] Horowitz S. Pathways to cell death in hyperoxia [J]. Chest, 1999, 116(1): 64—67.
- [10] Trszynski MH, Gabriel K, Gage FH, et al. Nerve growth factor delivery by gene transfer induces differential outgrowth of sensory, motor, and noradrenergic neurites after adult spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 1996, 137(8): 157—173.
- [11] Spenger C, Hyman C, Studer L, et al. Effects of BDNF on dopaminergic, serotonergic, and GABAergic neurons in cultures of human fetal ventral mesencephalon[J]. Exp Neurol, 1995, 133(1): 50—63.
- [12] Jakeman LB, Wei P, Guan Z, et al. Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury [J]. Experimental Neurology, 1998, 154(5): 170—184.
- [13] Friedman B, Kleinfeld D, IP NY, et al. BDNF and NT-4/5 exert neurotrophic influences on injured adult spinal motor neurons [J]. Neurosci, 1995, 15(2): 1044—1056.