**分类号：R651.2 学校代码：10392**

**学科专业代码：100210** **学** 号：**200802008**

**福 建 医 科 大 学**

**博 士 研 究 生 毕 业 论 文**

**The effect of transplantation of peripheral nerve with neural stem cell plus lithium chloride injection**

**in the treatment of rat spinal cord injury**

**学 位 类 型： 医学博士**

**所** 在 学 **院：** **第一临床医学院 研** 究 **生：** **张立群**

**学 科 、 专 业 ：** **外科学（骨外） 导** **师：** 林建华 **教授**

**研 究 起 止 日 期 ：** **2010 年 01 月至 2012 年 12 月答** 辩 **日 期** ： **2013 年 06 月 06 日**

**二○一三年六月**

目 录

[英文缩略语表](#_Toc686878296) 2

[中文摘要](#_Toc686878297) 5

[第一部分 绿色荧光蛋白转基因大鼠胚胎脊髓来源神经干细胞的分离、培养和鉴定](#_Toc686878298) 5

[第二部分 氯化锂对体外培养的神经干细胞的影响目的：研究氯化锂对体外培养的神经干细胞的增殖和分化的影响。](#_Toc686878299) 6

[第三部分 氯化锂对移植到周围神经内神经干细胞的影响](#_Toc686878300) 6

[英文摘要](#_Toc686878301) 6

**[Abstract](#_Toc686878302)** 6

[前 言](#_Toc686878303) 7

[第一部分 绿色荧光蛋白转基因大鼠胚胎来源神经干细胞的分离、培养和鉴定](#_Toc686878304) 7

[一 材料与方法](#_Toc686878305) 7

[二 结果](#_Toc686878306) 10

[三 讨论](#_Toc686878307) 10

[四 小结](#_Toc686878308) 11

[第二部分 氯化锂对体外培养的神经干细胞的影响](#_Toc686878309) 11

[一 材料与方法](#_Toc686878310) 11

[二 结果](#_Toc686878311) 12

[三 讨论](#_Toc686878312) 13

[四 小结](#_Toc686878313) 14

[第三部分 氯化锂对移植到周围神经内神经干细胞的影响](#_Toc686878314) 14

[一 材料与方法](#_Toc686878315) 14

[二 结果](#_Toc686878316) 19

[三 讨论](#_Toc686878317) 21

[四 小结](#_Toc686878318) 21

[第四部分 含神经干细胞的胫神经移植联合氯化锂治疗大鼠脊髓损伤的研究](#_Toc686878319) 21

[一 材料与方法](#_Toc686878320) 21

[二 结果](#_Toc686878321) 23

[三 讨论](#_Toc686878322) 25

[四 小结](#_Toc686878323) 26

[全文总结](#_Toc686878324) 26

[参考文献](#_Toc686878325) 26

[文献综述](#_Toc686878326) 29

[参考文献](#_Toc686878327) 31

# 英文缩略语表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文全称** | **中文名称** |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma 2 protein | B 细胞淋巴瘤蛋白-2 |
| BDNF | Brain derived neurotrophic factor | 脑源性神经营养因子 |
| bFGF | Fibroblast growth factor-basic | 碱性成纤维细胞生长因子 |
| BrdU | Bromodeoxyuridine | 溴脱氧尿苷 |
| BSA | Bovine serum albumin | 牛血清白蛋白 |
| ChABC | Chondroitinase ABC | 软骨素酶ABC |
| ChAT | Cholin acetyltransferase | 胆碱乙酰转移酶 |
| CNS | Central nervous system | 中枢神经系统 |
| CNTF | Ciliary neurotrophic factor | 睫状神经营养因子 |
| CO2 | Carbon dioxide | 二氧化碳 |
| CSPG | Chondroitin sulfate proteoglycans | 硫酸软骨素蛋白聚糖 |
| DMEM  EGF | Dulbecco's modified Eagle's Medium  Epidermal Growth Factor | 达尔伯克（氏）改良伊格尔（氏）  培养基  表皮生长因子 |
| ERK | Extracellular-signal regulated kinases | 胞外信号调节激酶 |
| FBS | Fetal bovine serum | 胎牛血清 |
| GDNF | Glial cell line-derived neurotrophic factor | 胶质细胞源性神经营养因子 |
| GFAP | Glial fibrillary acidic protein | 胶质纤维酸性蛋白 |
| GFP | Green fluorescent protein | 绿色荧光蛋白 |
| GGF | Glial growth factor | 胶质细胞生长因子 |
| GSK-3 | Glycogen synthase kinase-3 | 糖原合酶激酶-3 |
| HBSS | Hank's balanced salt solution | 汉克斯平衡盐液 |
| HCl | Hydrochloric Acid | 盐酸 |
| IL | Interleukin | 白介素 |
| Li | Lithium | 氯化锂 |
| LiCl | Lithium chloride | 氯化锂 |
| LIF | Leukocyte inhibitory factor | 白细胞抑制因子 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| LPS | Lypopolysaccharide | 脂多糖 |
| MBP | Myelin basic protein | 髓磷脂碱蛋白 |
| MEK | Mitogen-activated protein kinase | 有丝分裂原激活蛋白激酶 |
| NaOH | Sodium Hydroxide | 氢氧化钠 |
| NeuN | Neuronal nuclei | 神经元核蛋白 |
| NF200 | Neurofilament 200kDa | 神经纤丝蛋白 200 |
| NGF | Nerve growth factor | 神经生长因子 |
| NSC | Neural stem cell | 神经干细胞 |
| NT-3 | Neurotrophin type 3 | 3 型神经营养蛋白 |
| NT-4 | Neurotrophin type 4 | 4 型神经营养蛋白 |
| PBS | Phosphate buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |
| PI3K | Phosphatidylinositol 3-kinase | 磷脂酰肌醇 3-激酶 |
| PMSF | Phenylmethylsulfonyl fluoride | 苯甲磷酰氟化物 |
| PSA-NCAM Polysialylated neural cell adhesion 聚唾液酸神经细胞粘附分子 | | |
| SCI | Spinal cord injury | 脊髓损伤 |
| SFM | Serum free medium | 无血清培养液 |

molecule

STAT3 Signal transducer and activator of tra nscription 3

抑制信号传导子及转录激活子 3

TN Tibial nerve 胫神经

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| TNF | Tumor necrosis | factor | 肿瘤坏死因子 |
| TrkB | Tyrosine kinase | Receptor type B | B 型酪氨酸激酶受体 |

**带神经干细胞的周围神经移植联合氯化锂治疗大鼠脊髓损伤的研究**

# 中文摘要

# 第一部分 绿色荧光蛋白转基因大鼠胚胎脊髓来源神经干细胞的分离、培养和鉴定

**目的：**大鼠胚胎脊髓来源的神经干细胞（Neural stem cell, NSC）的体外培养和鉴定。

**方法：**采用酶消化和机械分离法结合从孕13.5天的携带绿色荧光蛋白（Green fluorescent protein, GFP）的转基因大鼠胚胎脊髓中分离、培养神经干细胞，采用免疫荧光染色方法检测培养细胞的巢蛋白（Nestin）、溴脱氧尿 苷

（Bromodeoxyuridine, BrdU）、神经元核蛋白（Neuronal nuclei, NeuN）和胶质纤维酸性蛋白（Glial fibrillary acidic protein, GFAP）的表达情况，对培养细胞进行鉴定。

**结果：**GFP转基因大鼠胚胎脊髓来源的神经干细胞在体外培养环境下生长良好，表达GFP和特异性蛋白Nestin, BrdU染色阳性，在添加血清后能表达NeuN 和

GFAP蛋白。

**结论：**从GFP转基因大鼠胚胎脊髓中分离培养的细胞能表达神经干细胞特异性蛋白，具有自我更新能力和一定条件下的多向分化能力，证实是神经干细胞。**关键词：**神经干细胞；脊髓；绿色荧光蛋白

# 第二部分 氯化锂对体外培养的神经干细胞的影响目的：研究氯化锂对体外培养的神经干细胞的增殖和分化的影响。

**方法：**在神经干细胞培养液内添加氯化锂，观察不同浓度的氯化锂对神经干细胞生长状态的影响；用免疫荧光方法检测神经干细胞BrdU、NeuN、GFAP的表达情况。

**结果：添加**1mM氯化锂的神经干细胞的生长良好，3mM的氯化锂会抑制神经干细胞的生长，6mM的氯化锂会造成神经干细胞死亡。在保留或去除表皮生长因

子（Epidermal Growth Factor, EGF）和碱性成纤维细胞生长因子（Fibroblast growth factor-basic, bFGF）的情况下，1mM的氯化锂均能明显增加神经干细胞的BrdU表达；与对照组比较，氯化锂处理组神经干细胞的NeuN阳性神经元比例明显增加，GFAP阳性胶质细胞的比例明显减少。

**结论：**1mM浓度的氯化锂对神经干细胞的生长没有毒性作用，能促进神经干细胞的增殖，促进神经干细胞向神经元方向分化，抑制神经干细胞向胶质细胞方向分化。

**关键词：**神经干细胞；氯化锂；增殖；分化

# 第三部分 氯化锂对移植到周围神经内神经干细胞的影响

**目的：**研究氯化锂对移植到胫神经内的神经干细胞的存活、分化的影响；研究神经干细胞移植和氯化锂处理对宿主神经轴突溃变、炎症细胞浸润及神经营养因子表达的影响。

**方法：**结扎成年大鼠右侧胫神经，将培养的神经干细胞移植到胫神经远端，腹腔注射氯化锂或生理盐水，一周后用免疫荧光染色方法检测神经干细胞的Nestin、

NeuN、胆碱乙酰转移酶（Cholin acetyltransferase, ChAT）、GFAP、神经纤丝蛋白200（Neurofilament 200kDa, NF200）、巨噬细胞抗原（ED1）的表达情况；用免疫印迹法（Western bloting, WB）检测坐骨神经内脑源性神经营养因子（Brain derived neurotrophic factor, BDNF）的表达。

**结果：**移植到胫神经内的神经干细胞存活良好，并沿神经轴索间隙向周围扩散。移植后的神经干细胞未见明显Nestin阳性表达，大部分移植细胞呈GFAP阳性表达，无明显NeuN或ChAT阳性表达。腹腔注射氯化锂能显著减少移植细胞的

GFAP阳性表达比例。胫神经结扎后，神经内轴突溃变明显。与未移植NSC的两组比较，NSC移植组胫神经内NF200阳性表达明显增多，联合应用氯化锂能进一步增加NF200的表达。应用氯化锂显著减少NSC移植后胫神经内的ED1表达。单纯神经干细胞移植组和单纯氯化锂组的宿主坐骨神经的BDNF表达明显上调，两者联用时BDNF表达上调更明显。

**结论：**胫神经内移植的神经干细胞存活良好，大部分分化为GFAP阳性的胶质细胞；氯化锂处理能减少移植后的神经干细胞向胶质细胞方向的分化，神经干细胞

移植联合应用氯化锂可以减少宿主神经轴突的溃变程度，抑制神经干细胞移植后的巨噬细胞浸润；上调宿主胫神经内BDNF的表达。

**关键词：**神经干细胞；氯化锂；胫神经；移植；脑源性神经营养因子

**第四部分 含神经干细胞的胫神经移植联合氯化锂治疗大鼠脊髓损伤的研究目的：**研究含有神经干细胞的胫神经移植联合氯化锂对脊髓损伤的治疗作用。**方法：**在大鼠胫神经内移植神经干细胞一周后，建立胸段脊髓右侧半切损伤模型，将单纯胫神经或预先移植有神经干细胞的胫神经段植入脊髓缺损区，腹腔注射氯化锂或生理盐水，术后2周、4周分别测定大鼠下肢运动功能恢复情况。术后4周用免疫荧光染色方法检测移植后神经干细胞的存活和分化情况，宿主脊髓运动神经元存活情况，移植神经段的轴突再生情况，观察宿主脊髓损伤修复和巨噬细胞浸润情况。

**结果：**脊髓半切损伤移植胫神经后2周及4周，移植神经干细胞或采用氯化锂治疗的大鼠下肢运动恢复较好，神经干细胞移植联合应用氯化锂对脊髓损伤大鼠下肢功能恢复的促进作用更明显。移植的胫神经段与宿主脊髓整合良好，移植到胫神经内的神经干细胞存活良好。氯化锂促进移植的NSC发出轴突长入宿主脊髓，促进神经干细胞分化为NF200阳性的神经元。与单纯胫神经移植比较，神经干细胞移植和氯化锂治疗组损伤侧宿主脊髓神经元数量明显增多，移植神经段内NF200阳性神经纤维明显增多，移植部位GFAP胶质瘢痕范围较小，ED1表达也明显减少。神经干细胞移植联合氯化锂治疗组的上述各指标均高于其他各组。**结论：**在脊髓半切损伤后移植含有神经干细胞的胫神经或氯化锂治疗能显著促进实验大鼠下肢功能的恢复，显著减少宿主脊髓运动神经元死亡，促进轴突再生，抑制炎症反应，缩小胶质瘢痕的范围。神经干细胞移植联合联合氯化锂治疗能取得更好的治疗效果。

**关键词：**脊髓损伤；神经干细胞；氯化锂；胫神经；移植；神经元

# 英文摘要

**The effect of transplantation of peripheral nerve with neural stem cell plus lithium chloride injection**

**In the treatment of rat spinal cord injury**

**Abstract**

**Part I Isolation, culture and identification of neural stem cell from rat embryonic spinal cord**

**Objectives:** To obtain neural stem cells (NSC) from rat embryonic spinal cord, culture in vitro and identify cells.

**Methods:** The spinal cord was dissected out from green fluorescent protein (GFP) transgenic E14 rat embryo, and single cells were dissociated using enzymatic digestion and mechanical separation, then cultured in serum free medium. The expression of nestin, BrdU, NeuN, and GFAP of cultured cells were detected using immunofluorescence technique to identify the properties of these cells.

**Results:** Neural cells derived from the spinal cord of GFP transgenic rat embryo growth well in vitro, expressing GFP protein. The expression of nestin was observed in most of these cultured cells. When fetal bovine serum was added into culture medium, the expression of NeuN and GFAP were detected among these cells.

**Conclusions:** Neural cells derived from GFP transgenic rat embryo expressed specific protein of NSC, and had the properties of self-renewal and multiple differentiation potency, which confirmed that the cultured cells were neural stem cells.

**Key words:** Neural stem cell; Spinal cord; Green fluorescent protein

**Part II The effect of different concentration of lithium chloride on the proliferation and differentiation of cultured NSC**

**Objectives:** To investigate the effect of lithium chloride on the proliferation and

Differentiation of cultured NSC.

**Methods:** Lithium chloride was added into culture media in different concentrations to observe the growth of cultured NSC. The expressions of BrdU, NeuN, and GFAP were investigated when 1mM lithium chloride were add into culture media.

**Results:** Lithium chloride at 1mM did not affect the growth of cultured NSCs, while LiCl at 3mM significant suppressed the growth of cultured NSCs, and addition of 6mM of LiCl resulted in a lot of NSC death. Lithium chloride at 1mM significantly promoted the proliferation of NSCs with or without the present of EGF and bFGF. Compared with the control group, the addition of lithium chloride at 1mM resulted in a higher percentage of NeuN positive cells, and a lower percentage of GFAP positive cells among cultured neural stem cells.

**Conclusions:** Lithium chloride at 1mM is good for the growth of cultured NSCs. Lithium chloride promoted the proliferation and neural differentiation of NSCs, while inhibited the glial differentiation of cultured stem cells.

**Key words:** Neural stem cell; Lithium chloride; Proliferation; Differentiation

**Part III The effect of lithium chloride on NSC and tibial nerve after transplantation of NSC into tibial nerve**

**Objectives:** To investigate the effect of lithium chloride on the survival and differentiation of NSC after transplanted into rat tibial nerve, and the effect of transplanted NSC with lithium treatment on host tibial nerve.

**Methods:** The right tibial nerve of adult rat was ligated, and dissociated NSCs were transplanted into distal dump of tibial nerve, followed intraperitoneal injection of either lithium or normal saline for one week. After that, the expression of nestin, NeuN, ChAT, GFAP in transplanted NSCs, the expression of NF200, ED1, and BDNF in host tibial nerve were investigated.

**Results:** One week after transplantation, transplanted NSCs survived well, migrated from injection site to surrounding tissue through axon interspace. There was no obvious expression of nestin, NeuN, and ChAT was found in transplanted NSCs. Most of the NSCs expressed GFAP protein. After tibial nerve ligation, most of the

Axons degenerated. Compared to control group without NSC transplantation, animal received NSC transplantation had more NF200 positive residual axons; and lithium injection result in more residual axons. Lithium also reduced ED1 expression in tibial nerve after NSC transplantation. The expression of BDNF increased in tibial nerve with NSC transplantation, or lithium injection without NSC transplantation. The combination of NSC transplantation and lithium injection up regulated more BDNF expression than other groups.

**Conclusions:** Transplanted NSCs survived well in tibial nerve, and most of the NSCs differentiated into GFAP positive glia. Lithium injection reduced the GFAP differentiation of transplanted NSCs and inhibited macrophage infiltration after NSC transplantation. NSC transplantation plus lithium treatment reduced host axons degeneration, and improve BDNF expression,

**Key words:** Neural stem cell; Lithium chloride; Tibial nerve; Transplantation; BNDF

**Part IV The therapeutic effect of transplantation of tibial nerve implanted with NSC plus lithium chloride injection in the treatment of rat spinal cord injury Objectives:** To investigate the effect of transplantation of NSCs in tibial nerve with

Lithium chloride injection in the treatment of spinal cord injury.

**Methods:** One week after transplanted NSCs into tibial nerve, the rat right spinal cord hemisection injury was created and a portion of spinal cord was removed. Tibial nerve with or without implanted NSCs was then transplanted into the removed area of spinal cord, followed with intraperitoneal injection of lithium chloride or natural saline for 4 weeks. The locomotor function of right hind limb was evaluated at 2 and 4 weeks after surgery. The survival and differentiation of transplanted NSCs, the number of host motoneurons, the expression of NF200 in regenerated axons, the glial scar formation and macrophage infiltration were investigated 4 weeks after surgery.

**Results:** Two and four weeks after surgery, tibial nerve transplantation with implanted NSC or tibial nerve alone with lithium injection had better functional recovery compared to tibial nerve alone, while tibial nerve with implanted NSCs plus lithium injection had best functional recovery. Transplanted tibial nerve well

Integrated into host spinal cord. NSCs inside tibial nerve survived well after second transplantation. Lithium promoted transplanted NSC extent neurites into host spinal cord, and promoted NSCs differentiated into NF200 positive neurons. Compared to tibial nerve alone, transplantation of NSCs and lithium injection resulted in more host motoneurons survived in the injured side of spinal cord, more regenerated axons in tibial nerve, reduced glial scar area and ED1 expression. Combination of NSC transplantation and lithium injection had better results than other groups in all aspects mentioned above.

**Conclusions:** Tibial nerve transplantation with implanted NSC or lithium treatment alone significantly improved functional recovery after spinal cord hemi-section injury, reduced host neuron death, decreased glial scar formation and macrophage infiltration. Combination of NSC transplantation and lithium injection had better effect in the treatment of spinal cord injury.

**KEy words:** Spinal cord injury; Neural stem cell; Lithium chloride; Tibial nerve; Transplantation; Neuron

前 言

随着交通事故、高处坠落伤等高能量损伤的增多，脊髓损伤的发病率逐渐增加。美国脊髓损伤发病率约40例/百万人，每年约有12000个新增病例，维持治疗所需的费用给患者、家庭及社会造成沉重的负担[[1]](#_bookmark26)。脊髓损伤导致的神经结构破坏往往造成永久性的神经功能障碍。理论上来说，可以通过刺激内源性神经干细胞产生新的细胞和组织来实现组织的修复，但由于成年哺乳动物中枢神经系统

（central nervous system, CNS）的再生能力非常有限，无法修复原始损伤和继发损伤造成的组织退变和缺损，因此脊髓损伤的修复和功能恢复依然是研究的热点和难题。影响脊髓损伤后神经再生和功能恢复的原因主要是：原发性和继发性损伤造成的组织破坏，空洞形成和胶质瘢痕形成使再生轴突无法通过；损伤后的中枢神经系统存在轴突再生抑制物，包括髓鞘相关抑制分子和细胞外基质抑制分子。目前脊髓损伤修复研究主要采用的策略包括[[2]](#_bookmark27)：（1）使用分子、细胞或合成支架来填充和桥接损伤形成的空腔，（2）使用神经营养因子保护和激活受损脊髓，（3）使用各种方法调节神经元来激活内在基因程序和蛋白以恢复活跃的生长状态，（4）中和髓鞘或胞外基质的相关抑制分子。因此，以细胞移植为主的多种方法联合治疗是脊髓损伤治疗的主要方向。目前应用于中枢神经系统移植治疗研究的细胞包括分化成熟的组织细胞如雪旺细胞、嗅鞘细胞，以及具有多种分化潜能的干细胞，如胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞、神经干细胞等。理想的细胞移植物应该具备以下几个功能[[3]](#_bookmark28)：（1）为轴突再生提供合适的底物或支架，

（2）能重新形成髓鞘，（3）可以替代损伤死亡的神经元，或起到接力的作用来重建轴突联系，（4）可以分泌生长因子以支持轴突再生和髓鞘形成。根据这些原则，目前最有潜力的是神经干细胞。

神经干细胞（Neural stem cell, NSC）最早在1992年由Reynolds和Weiss从小鼠纹状体中成功分离[[4]](#_bookmark29)。近年来发现在成年动物的中枢神经系统内也存在神经干细胞[[5,](#_bookmark30) [6]](#_bookmark31)。在适当的条件下，神经干细胞可以分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞，迁移到退变或损伤的区域，替代老化或死亡的细胞。由于神经干细胞的生物学特性，使其成为中枢神经系统疾病或损伤时细胞替代治疗的重要组成部分。目前的研究发现神经干细胞在多发性硬化、肌萎缩侧索硬化症、中风

等疾病中都有神经保护作用[[7-9]](#_bookmark32)。由于神经干细胞具有多项分化潜能，在脊髓损伤的治疗研究中可以发挥以下作用[[10]](#_bookmark33)：替代损伤的神经元和胶质细胞，形成新的髓鞘，恢复神经元的传导功能，填充损伤造成的空洞，分泌神经营养因子、抗炎因子以及其他因子来促进组织修复和血管形成。由于脊髓损伤后局部环境不适宜神经干细胞生存，需要采用合适的方法保护神经干细胞，增加移植后神经干细胞的存活率，提高治疗效果。目前周围神经内移植神经干细胞用于治疗周围神经损伤已取得较好的效果，而且周围神经移植也较早就开始应用于治疗脊髓损伤的研究。将神经干细胞移植到周围神经内，以周围神经为载体让神经干细胞在周围神经内生长、增殖，然后把富含神经干细胞的周围神经再移植到损伤脊髓区域，周围神经在损伤脊髓处既可以填充组织缺损，又可以承担桥接作用，而丰富的神经干细胞在脊髓损伤中可发挥修复作用，该方法可以为脊髓损伤的治疗提供新思路。

锂盐在临床上治疗双向情感障碍已经有60多年的历史。近来发现锂盐除了可以治疗情感障碍，在中枢神经系统其他疾病的治疗中也发挥作用，如阿尔茨海默病、帕金森氏病、亨廷顿氏病、中风等[[11]](#_bookmark34)。随着研究的深入，发现锂可以上调神经营养因子的表达，促进中枢神经系统的神经发生，抑制促凋亡基因的表达，在缺血性和创伤性脑损伤中发挥保护作用[[12,](#_bookmark35) [13]](#_bookmark36)，提示锂在脊髓损伤后也可能具有类似的保护作用。近年来的研究证实锂对神经干细胞也有显著的影响。锂能促进神经干细胞的增殖、向神经元方向分化、合成分泌脑源性神经营养因子等[[14]](#_bookmark37)。锂对神经干细胞的作用提示在脊髓损伤后移植神经干细胞联合氯化锂治疗，可能对脊髓损伤的恢复有促进作用。然而在脊髓损伤的研究中，联合应用神经干细胞移植和氯化锂治疗的研究较少。

基于上述研究背景，本研究假设携带神经干细胞的周围神经联合氯化锂治疗能促进大鼠脊髓损伤的恢复。为此，本研究培养GFP转基因大鼠胚胎脊髓来源的神经干细胞，并将神经干细胞移植到胫神经内，在体内外观察氯化锂对神经干细胞增殖、分化和表达神经营养因子的影响；进一步将移植有神经干细胞的胫神经移植到脊髓半切损伤部位，联合氯化锂治疗，研究以胫神经为载体的神经干细胞移植和氯化锂治疗在脊髓损伤后功能恢复及轴突再生中的作用。

# 第一部分 绿色荧光蛋白转基因大鼠胚胎来源神经干细胞的分离、培养和鉴定

神经干细胞是神经系统内的未分化细胞，具有自我更新能力和多向分化潜能，在特定条件下可以诱导分化产生构成中枢神经系统的三种主要细胞，即神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞[[5,](#_bookmark30) [6]](#_bookmark31)。神经干细胞来源较为广泛，除了胚胎神经系统，在成年动物的大脑和脊髓中也存在神经干细胞[[4,](#_bookmark29) [15]](#_bookmark38)。神经干细胞分化为特定神经细胞的特性，以及神经干细胞的低免疫源性[[16]](#_bookmark39)，使其成为各种神经系统疾患移植治疗研究的理想细胞来源。

本部分实验选择绿色荧光蛋白（Green fluorescent protein, GFP）转基因大鼠胚胎脊髓作为神经干细胞的来源，分离、培养神经干细胞，并对其进行鉴定，为进一步研究神经干细胞移植在大鼠脊髓损伤治疗中的作用奠定基础。

## 一 材料与方法

### 1 实验材料

1.1实验动物

GFP转基因雄性SD大鼠由香港大学医学院吴武田教授赠送，健康雌性SD大鼠，体质量300±20g，由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供，许可证号SCXK（沪）2007-0005。

1.2 主要试剂

DMEM/F12培养液 美国Invitrogen公司

B-27 美国Invitrogen公司

N-2 美国Invitrogen公司

胎牛血清（FBS）美国Invitrogen公司

牛血清白蛋白（BSA）美国Sigma公司

碱性成纤维细胞生长因子（bFGF） 美国 PeproTech 公司表皮生长因子（EGF） 美国 PeproTech 公司

青、链霉素美国Invitrogen公司

HBSS 美国 Hyclon 公司

多聚赖氨酸 美国 Sigma 公司

层粘连蛋白 美国 Sigma 公司

Accutase消化酶美国Invitrogen公司

5-溴脱氧尿苷（BrdU）美国Sigma公司

小鼠抗巢蛋白（Nestin）抗体美国Millipore公司

小鼠抗 BrdU 抗体 美国 Sigma 公司 小鼠抗神经元核蛋白（NeuN）抗体 美国 Millipore 公司小鼠抗胶质纤维酸性蛋白（GFAP）抗体 美国 Sigma 公司

Alexa568 ft羊抗小鼠荧光二抗 美国 Invitrogen 公司烟酸己可碱（Hoechst） 美国 Sigma 公司

中性封片剂北京中杉金桥公司

其余试剂为国产分析纯。

1.3 主要仪器

细胞培养箱美国Thermo公司

LDZ5-2型自动平衡离心机北京医用离心机厂

HH-4数显恒温水浴箱常州国华电器有限公司

解剖显微镜（SZ61 型） 日本 Olympus 公司荧光解剖显微镜（MVX10 型） 日本 Olympus 公司荧光倒置相差显微镜（IX70 型） 日本 Olympus 公司数码相机（DP72 型） 日本 Olympus 公司

12mm 盖玻片 美国 Fisher 公司

手术剪、血管钳、显微剪、显微镊上海医疗器械有限公司

眼科剪、眼科镊苏州六六视觉科技有限公司其他细胞培养耗材均购自美国Corning公司。

1.4主要试剂的配制

（1）无血清培养液（Serum free medium, SFM）DMEM/F12培养液470 ml

B-27 10 ml

N-2 5 ml

10% BSA 5 ml

青、链霉素5 ml

（2）10% BSA (100mg/ml)

BSA 1.0 g

无菌蒸馏水10 ml

混匀后充分溶解，用0.22μm针式滤器过滤，4℃保存备用

（3）多聚赖氨酸（20μg/ml）

多聚赖氨酸1 mg

无菌蒸馏水50 ml

混匀后用0.22μm针式滤器过滤，4℃保存备用

（4）层粘连蛋白（20μl/ml）

层粘连蛋白40μg

无菌蒸馏水2 ml

混匀后充分溶解，用0.22μm针式滤器过滤，4℃保存备用

（5）BrdU(1mM, 100×)

BrdU 3.07 mg

双蒸水10 ml

混匀后充分溶解，用0.22μm针式滤器过滤，4℃保存备用

（6）1N盐酸

浓盐酸4.15 ml

蒸馏水45.85 ml

### 2 实验方法

2.1 GFP转基因大鼠的交配

在清洁饲养环境下，将GFP转基因雄性SD大鼠与普通雌性SD大鼠同笼饲养，根据雌鼠阴道分泌物检测到精子，确定雌鼠怀孕后，将雌鼠分笼饲养，到怀孕13.5天时取胚胎进行实验。

2.2 GFP转基因大鼠胚胎脊髓来源NSC的获取和原代培养

（1）用10%水合氯醛（0.4ml/100g）腹腔注射麻醉怀孕13.5天的SD孕鼠，浓碘伏消毒腹部，在无菌条件下用手术剪依次切开腹部皮肤、腹壁肌层和腹

膜，显露含有胚胎的子宫，用血管钳提起子宫，剪断子宫颈及子宫周围的韧带和血管，将子宫放入含有DMEM/F12培养液的培养皿中。

（2）更换无菌器械，用眼科剪剪开子宫壁和胎膜，取出胚胎，在荧光解剖显微镜下挑选携带GFP基因的胚胎（荧光显微镜下呈绿色，图1-1）。

（3）将携带有荧光的胚胎移入另一个含DMEM/F12培养液的培养皿中，在解剖显微镜下剪开椎管，取出胚胎脊髓，用显微镊小心剥除胚胎脊髓的脊膜和神经根，用显微剪将胚胎脊髓剪成约1mm2大小，放入无菌15ml离心管中。

（4）于离心管内加入1ml Accutase消化酶，37℃消化15分钟，加入1ml培养液，用1ml枪头小心吹打10-15次。静置1-2分钟让组织块沉降，将含有单细胞的上清移到另一个无菌离心管。

（5）在未消化的组织块内再加入1ml Accutase消化酶，37℃消化15分钟。加入1ml培养液中止消化，小心吹打第二次消化的组织块，使其基本分解成单细胞悬液。

（6）将两次消化的细胞合在一起，1000转离心5分钟，吸除上清，加入1ml培养液，吹打混匀，将细胞均匀植入用多聚赖氨酸（20μg/ml）包被的60mm培养皿（一根脊髓/60mm培养皿），加入bFGF和EGF，放入37℃含5%

CO2的培养箱内静置培养，每2天换液一次，此为原代细胞。

2.3 GFP转基因神经干细胞的传代培养

（1）当原代神经干细胞生长到80%汇合时，吸除培养液，用不含钙镁的HBSS

漂洗2次，加入2ml Accutase消化酶，37℃消化10分钟，使细胞脱壁。

（2）将细胞悬液移入15ml离心管，加入2ml SFM中止消化，小心吹打混匀，使细胞团分解成单细胞悬液，1000转离心5分钟。

（3）吸除上清液，加入200ul SFM，小心吹打30-50次，打散细胞团；再加入

1.8ml SFM，吹打混匀，1000转离心5分钟。

（4）吸除上清液，加入200ul SFM，小心吹打30-50次，使细胞团分解成单细胞悬液；再加入1.8ml SFM，吹打混匀，取20µl细胞悬液进行细胞计数，剩余细胞1000转离心5分钟。

（5）吸除上清液，根据计算的细胞数加入适量培养液，调整细胞浓度为

10×10 4/ml。将事先用多聚赖氨酸和层粘连蛋白（20μg/ml）包被的12mm

圆形盖玻片放入24孔板中，再将细胞混悬液植入24孔板，细胞种植密度

为5×10 4/孔。将24孔板移入37℃含5% CO2的培养箱内静置培养，每 2

天换液一次并添加bFGF和EGF。传代后的细胞为P1代细胞。

2.4 GFP转基因神经干细胞增殖和分化能力的鉴定

2.4.1神经干细胞的Nestin蛋白表达

神经干细胞传代培养3 天后，采用细胞免疫荧光染色方法对神经干细胞的

Nestin蛋白表达进行鉴定，具体步骤如下：

（1）吸除细胞培养液，加入4%多聚甲醛固定20分钟

（2）用0.01M PBS（pH 7.4）漂洗细胞3次，每次10分钟

（3）用0.3% Triton X-100/0.01M PBS漂洗3次，每次10分钟

（4）加入含10%ft羊血清和0.3% TritonX-100的0.01M PBS，室温下作用 1

小时

（5）加入小鼠抗Nestin抗体（1:100），用含10%ft羊血清和0.3% TritonX-100

的0.01M PBS稀释，4度过夜

（6）第二天用0.01M PBS（pH 7.4）漂洗标本5次，每次5分钟

（7）加入Alexa568 ft羊抗小鼠的荧光二抗（1:100），用含10% ft羊血清和0.3% Triton X-100（聚乙二醇辛基苯基醚）的0.01M PBS稀释，室温下作用1小时，避光操作

（8）用0.01M PBS（pH 7.4）漂洗标本5次，每次5分钟，避光操作

（9）用封片剂封片，置荧光倒置显微镜下观察拍照。

2.4.2神经干细胞增殖能力的鉴定：细胞传代培养3天后，在固定前4小时加入

BrdU（10μmol/L），而后采用细胞免疫荧光染色方法检测神经干细胞的

BrdU表达，具体步骤如下：

（1）吸除细胞培养液，加入4%多聚甲醛固定20分钟

（2）用0.01M PBS（pH 7.4）漂洗细胞3次，每次10分钟

（3）加入1N HCl，放入37℃培养箱中处理40分钟

（4）用0.01M PBS（pH 7.4）漂洗细胞4次，每次5分钟

（5）用含0.3% Triton X-100的0.01M PBS漂洗3次，每次10分钟

（6）加入含10%ft羊血清和0.3% Triton X-100的0.01M PBS，室温下作用 1

小时

（7）加入小鼠抗BrdU抗体（1:100），用含10%ft羊血清和0.3% TritonX-100

的0.01M PBS稀释，4度过夜

（8）第二天用0.01M PBS（pH 7.4）漂洗标本5次，每次5分钟

（9）加入Alexa568 ft羊抗小鼠荧光二抗（1:100）和Hoechst33342（1:400），用含10% ft羊血清和0.3% TritonX-100的0.01M PBS稀释，室温下作用1小时，避光操作

（10）用0.01M PBS（pH 7.4）漂洗标本5次，每次5分钟，避光操作

（11）用封片剂封片，置荧光倒置显微镜下观察。

2.4.3神经干细胞分化能力的鉴定：细胞传代后，次日全量换液，去除bFGF 和

EGF，添加5%胎牛血清继续培养。3天后采用细胞免疫荧光染色方法检测神经干细胞的NeuN和GFAP蛋白的表达，采用小鼠抗NeuN抗体（1: 100）和兔抗GFAP抗体（1:100）作为一抗进行检测，染色方法同2.4.1。

## 二 结果

1 GFP转基因大鼠胚胎脊髓来源神经干细胞的体外生长情况观察

神经干细胞悬液接种后数分钟，绝大多数细胞沉降，均匀分布，24小时后，细胞在多聚赖氨酸包被的培养皿上呈单层贴壁生长。培养液内有较多的死细胞和细胞碎片，存活的贴壁细胞呈形态均一的类圆形细胞，胞体较大，有长短不一的突起自胞体发出（图1-2 A）。培养第2-3天，细胞密度逐渐增加，可见从胞体

发出的轴突进一步延长（图1-2 B）。培养第4-5天时细胞密度进一步增加，神

经干细胞发出的轴突相互交织呈网状（图1-2 C），在倒置荧光显微镜下观察，可见所有的细胞都呈绿色，说明培养的细胞均携带有GFP基因（图1-2 D）。传代接种后，神经干细胞的生长情况与原代相似。



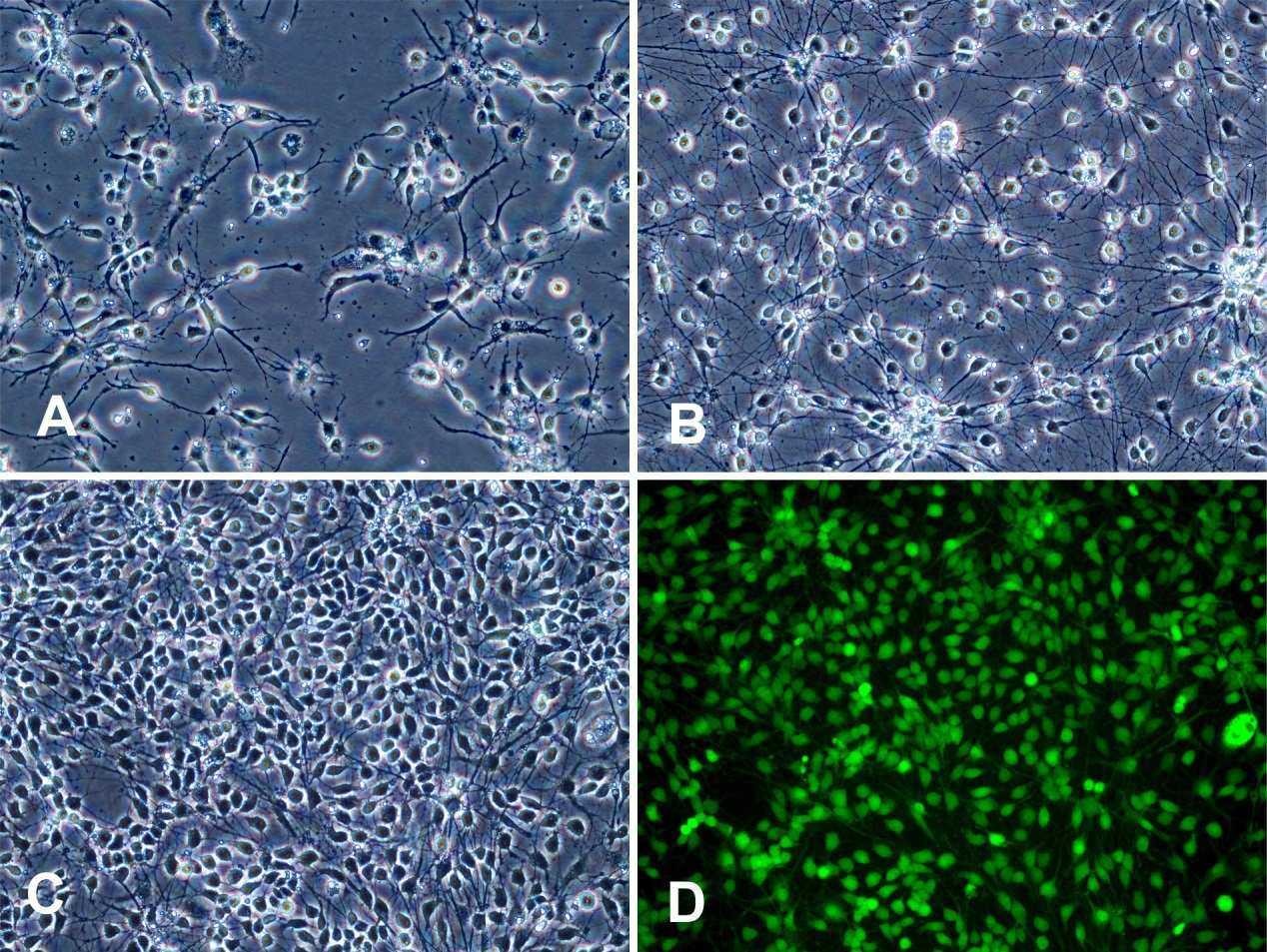


图1-1 携带GFP基因的大鼠胚胎

图1-2 神经干细胞的体外培养情况。A：接种后24小时，细胞贴壁生长，

可见有长短不一的突起自胞体发出；B：培养第2-3天，可见发自胞体的轴突逐

渐延长；C：培养第4-5天，细胞密度进一步增加；D：倒置荧光显微镜下观察见所有的细胞都呈绿色。

2体外培养的GFP转基因大鼠胚胎脊髓来源神经干细胞鉴定

2.1培养的神经干细胞Nestin蛋白鉴定

携带GFP基因的细胞显示为绿色（图1-3 A），经过免疫荧光染色，表达Nestin蛋白的细胞在荧光显微镜下显示为红色（图1-3 B），经过图片融合处理后，可见绝大多数细胞呈黄色，说明培养的细胞里面绝大多数是神经干细胞（图1-3 C）。经过计数，Nestin阳性细胞的比例是81.0%±9.8%（图1-4）。

图1-3神经干细胞的鉴定。A：携带GFP基因的神经干细胞在荧光显微镜下显示为绿色。B：经过Nestin染色后，Nestin阳性的细胞呈红色；C：图片融合后可见绝大多数的细胞呈黄色。





图1-4 培养的神经干细胞Nestin阳性率

2.2培养的神经干细胞增殖能力的鉴定

P1代的神经干细胞培养3天后进行溴脱氧尿苷（Bromodeoxyuridine, BrdU）染色，可见部分细胞BrdU染色阳性，说明这些标记的神经干细胞处于增殖状态

（图1-5），证实培养的神经干细胞具有增殖更新能力。



图1-5培养的神经干细胞增殖能力的鉴定。A: Hoechst标记的细胞核；B：增殖的神经干细胞BrdU染色为红色；C：图片融合后可见同时表达BrdU和Hoechst的神经干细胞呈紫色。

2.3培养的神经干细胞分化能力的鉴定

传代的神经干细胞在去除bFGF/EGF后，添加胎牛血清培养3天，经过染色，部分神经干细胞呈NeuN阳性染色（图1-6 A-C），大多数的细胞呈GFAP阳性染色（图1-6 D-F）。说明培养的神经干细胞在一定条件下具有分化为NeuN阳性神经元和GFAP阳性胶质细胞的能力。



图1-6培养的神经干细胞分化能力的鉴定。A-C：部分神经干细胞分化为NeuN阳性的神经元。D-F：经过胎牛血清处理后，大多数神经干细胞分化为GFAP阳性的胶质细胞

## 三 讨论

1神经干细胞的来源及分离

神经干细胞是中枢神经系统内具有分化为神经元、星形胶质细胞及少突胶质

细胞潜能的原始母细胞，最早由Reynolds和Weiss从胚胎[[17]](#_bookmark40)和成年小鼠纹状体

[[4]](#_bookmark29)中成功分离出能分化为神经元和星形细胞的神经干细胞。随后，神经干细胞也

从成年小鼠脊髓[[15]](#_bookmark38)和胚胎大鼠脊髓[[18]](#_bookmark41)中分离出来。目前认为，神经干细胞的发生区主要位于大脑齿状回的颗粒下层和嗅球的室管膜下区[[19]](#_bookmark42)，以及脊髓中央管周围，尤其在腰骶段脊髓内神经干细胞的含量最高[[15]](#_bookmark38)。

本实验以大鼠胚胎脊髓作为神经干细胞的来源，采用酶消化法和机械分离法相结合[[20]](#_bookmark43)，获得纯度高、数量多的神经干细胞。以大鼠胚胎脊髓作为神经干细胞的来源具有解剖方便的优点。孕13.5天的大鼠胚胎发育较成熟，胚胎脊髓要比孕期更小的胚胎更容易解剖和分离，可以减少解剖过程中造成的脊髓损伤；同时硬脊膜和后根神经节也易于清除，可以减少胶质细胞等其他细胞的数量，提高神经干细胞纯度。此外，酶消化法和机械分离法相结合可以在将脊髓分解为单细胞的过程中最大限度地减少细胞损伤，提高细胞活力。从本实验的培养结果来看，胚胎脊髓可以作为获取神经干细胞的稳定来源。

2神经干细胞生长方式

虽然从神经干细胞的发现开始，很多研究中培养的神经干细胞是以神经球的形式在培养液中悬浮生长，但神经球并不是神经干细胞生长的唯一方式，神经干细胞也可以贴壁方式生长。Palmer发现在bFGF存在的情况下，成年大鼠海马来源的神经干细胞呈单层贴壁生长[[21]](#_bookmark44)。其他学者培养胚胎大鼠脊髓来源的神经干细胞也是呈典型的贴壁生长状态[[14,](#_bookmark37) [18,](#_bookmark41) [22]](#_bookmark45)。在本实验中，神经干细胞以贴壁形式生长，并表达nestin蛋白，符合神经干细胞的基本特征。此外，单层贴壁生长的神经干细胞也有利于观察细胞的生长状态，有利于对细胞表达的各种蛋白进行检测和鉴定。

3神经干细胞的鉴定

神经干细胞的鉴定方法比较多，最基本的是根据神经干细胞的生物学特性来进行鉴定，即通过神经干细胞具有的自我更新能力和分化为其他神经系统细胞的能力来鉴定培养的细胞是否为神经干细胞。

BrdU（bromodeoxyuridine，溴脱氧尿苷）是胸腺嘧啶的类似物，可以在细胞周期的S期替代胸腺嘧啶掺合到细胞DNA中。在培养液内添加BrdU，处于分裂增殖状态的细胞就会摄取BrdU并整合到细胞DNA内，通过染色，可以识别

处于增殖状态的细胞。因此BrdU也常用来标记具有明显增殖能力的细胞[[23]](#_bookmark46)。本实验中，部分传代培养的神经干细胞呈BrdU阳性染色，说明这部分神经干细胞处于增殖状态，反映出神经干细胞具有自我更新能力。

NeuN（Neuronal nuclei，神经元核蛋白）蛋白广泛存在与脊椎动物神经系统神经元中[[24]](#_bookmark47)，是脊椎动物神经元特异性核蛋白，广泛应用于神经元的鉴定。通过检测NeuN的表达，可以鉴定培养的细胞是否为神经元。GFAP（Glial fibrillary acidic protein, 胶质纤维酸性蛋白）是一种中间丝蛋白，直径介于微管（25μm）和微丝（6μm）之间，是构成细胞骨架的主要成分，主要存在于星形胶质细胞内，是星形胶质细胞的特征性标志蛋白，通常用来检测鉴定星形胶质细胞。本实验中，培养的神经干细胞在添加血清后分别表达NeuN和GFAP，说明神经干细胞在一定条件下可以分化为神经元和星形胶质细胞。综上，可以证实本实验培养的细胞具有自我更新能力和多向分化能力。

除了通过生物学特性鉴定外，还可以通过特异性抗原的表达来鉴定神经干细胞。目前最常用来鉴定神经干细胞的蛋白是巢蛋白（Nestin）。Nestin是是中间丝蛋白家族第六族的成员之一，在胚胎早期的神经上皮干细胞中大量表达，是神经干细胞的特征性标记蛋白[[25]](#_bookmark48)。随着神经干细胞的分化，Nestin的表达逐渐降低，被分化细胞特有的标记蛋白所替代，如神经元的神经丝蛋白（Neurofilament, NF）和星形胶质细胞的GFAP蛋白[[26]](#_bookmark49)。虽然中枢神经系统的神经干细胞并不能全部被Nestin标记[[27]](#_bookmark50)，但目前Nestin还是鉴定神经干细胞最主要的标志物。本实验中超过80%的培养细胞呈Nestin阳性表达，同时具有自我更新能力和多向分化能力，证实培养的细胞是神经干细胞。

近年来，除了Nestin，还发现神经干细胞表达一些其他蛋白，如Musashi1[[28]](#_bookmark51)，

Sox1[[29]](#_bookmark52)，聚唾液酸神经细胞粘附分子（Polysialylated neural cell adhesion molecule, PSA-NCAM）[[26]](#_bookmark49)等，也可以用来识别神经干细胞。但这些蛋白的表达不仅仅见于神经干细胞，同时在多能祖细胞、胚胎干细胞上也有表达。此外，还可以根据神经干细胞表面的一些其他蛋白的不同表达状态，如CD133、CD15、CD24、

A2B5等，通过流式细胞仪技术来检测筛选神经干细胞[[30]](#_bookmark53)。其中，CD133和CD15

的表达在神经前体细胞较高，而在多能神经干细胞内的表达较低。

4神经干细胞在脊髓损伤治疗中的应用

脊髓损伤往往造成大量的神经元和胶质细胞死亡，后期形成空洞和胶质瘢痕，阻碍轴突再生和功能恢复，造成严重的神经功能障碍。由于成年动物中枢神经系统的自我修复能力很弱，单纯依赖中枢神经系统自身来修复组织损伤几乎不可能。在脊髓损伤的细胞移植修复治疗时，需要移植的细胞或组织能够充填脊髓损伤形成的空洞，可以分化为神经元或胶质细胞来替代损伤死亡的细胞，能分泌神经营养因子促进轴突再生和损伤的修复。神经干细胞能分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的特性，加上神经干细胞能分泌神经营养因子以及极低的自身免疫性[[16]](#_bookmark39)，没有胚胎干细胞的伦理问题和成瘤风险[[31]](#_bookmark54)，使其成为脊髓损伤修复治疗研究中的理想细胞。

在众多采用细胞移植进行治疗的研究中，识别移植后的细胞有各种方法，最常用的是采用细胞自身特异性标志物来识别移植细胞。但如果移植部位有同类的内源性细胞，或带有相同标志物的细胞，通过特异性抗体识别移植的细胞就有困难。为了便于和内源性细胞鉴别，许多研究采用BrdU标记移植细胞[[32,](#_bookmark55) [33]](#_bookmark56)，或通过转基因的方法使移植的细胞携带特异性抗原或蛋白而得以识别。但这些方法都需要一个标记细胞的过程，存在不能标记所有细胞的情况，而且采用病毒转染的方法有可能造成部分细胞死亡，增加了实验的难度。本实验培养的神经干细胞来源于转染有绿色荧光蛋白基因（GFP）的大鼠胚胎，使培养的神经干细胞从一开始就携带绿色荧光蛋白，可以在荧光显微镜下直接观察识别细胞。同其他标记细胞的方法比较，具有更高的细胞标记率，由于省略了标记的步骤，也减少了标记过程造成的细胞死亡，更有利于在细胞移植后对细胞进行直接的定位识别和检测。

## 四 小结

1. 从GFP转基因大鼠胚胎脊髓可以成功分离、培养出纯度较高的神经细胞。

2. 分离出的细胞具有自我更新和多向分化能力，并表达特异性蛋白Nestin，证明分离培养的细胞是神经干细胞。

3. 培养的神经干细胞携带GFP绿色荧光蛋白，为进一步的体内外实验提供方便。

# 第二部分 氯化锂对体外培养的神经干细胞的影响

锂盐是治疗双向情感障碍的经典药物，已在临床上应用超过60年。近年来发现锂盐除了可以治疗情感障碍，在中枢神经系统损伤和退变性疾病中也能发挥治疗作用，如中风、脑和脊髓损伤、阿尔茨海默病、帕金森氏病、亨廷顿氏病等

[[11]](#_bookmark34). 神经干细胞是未分化细胞，在合适的诱导条件下，可以向神经元、星形细胞

和少突胶质细胞分化。

本实验在成功培养神经干细胞的基础上，研究氯化锂对体外培养的神经干细胞的增殖和分化的影响，为下一步研究氯化锂对体内移植神经干细胞的影响奠定基础。

## 一 材料与方法

1实验材料

1.1实验动物

健康雌性SD大鼠，体质量250±20g，由上海斯莱克实验动物有限责任公司中心提供，许可证号：SCXK（沪）2007-0005。

1.2主要试剂

氯化锂（Lithium, Li）美国Sigma公司其余试剂详见第一部分

1.3主要仪器

详见第一部分

1.4主要试剂的配制

（1） 氯化锂

无水氯化锂212 mg

双蒸水50 ml

混匀后充分溶解，用0.22μm针式滤器过滤，4℃保存备用其他详见第一部分

2实验方法

2.1 GFP转基因大鼠胚胎脊髓来源NSC的获取和培养：同第一部分

2.2神经干细胞的传代种植

按上述方法消化贴壁培养的神经干细胞，计算收获的细胞数，调整细胞浓度为10×10 4/ml，将用多聚赖氨酸和层粘连蛋白包被好的12mm圆形盖玻片放入24孔板中，再将细胞混悬液植入24孔板，添加bFGF和EGF，细胞种植浓度为5×10 4/孔。将细胞移入37℃含5% CO2的培养箱内静置培养，48小时后换液，添加氯化锂。在加入氯化锂后72小时固定细胞，进行免疫荧光染色。

2.3实验分组

2.3.1不同浓度的氯化锂对神经干细胞生长的影响

实验分为下列4组，每组6个标本，不添加bFGF和EGF。

（1）无氯化锂组：用培养液培养细胞，不添加氯化锂

（2）1mM联合组：在培养液中添加1mM的氯化锂

（3）3mM联合组：在培养液中添加3mM的氯化锂

（4）6mM联合组：在培养液中添加6mM的氯化锂

2.3.2氯化锂对神经干细胞增殖的影响

实验分为下列4组，每组6个标本。在固定前4小时加入BrdU（10μmol/L），而后用小鼠抗BrdU抗体（1:100）作为一抗检测神经干细胞增殖情况，免疫荧光染色步骤同第一部分。

（1）单纯对照组：用培养液培养细胞，不添加氯化锂和bFGF/EGF

（2）单纯氯化锂组：在培养液中添加1mM的氯化锂，不添加bFGF/EGF

（3）添加bFGF/EGF的对照组：在培养液中添加bFGF/EGF，不添加氯化锂

（4）添加bFGF/EGF的氯化锂组：在培养液中1mM的氯化锂和bFGF/EGF

2.3.3氯化锂对神经干细胞分化的影响

实验分为下列2组，每组6个标本，不添加bFGF和EGF。采用小鼠抗NeuN抗体（1:100）和兔抗GFAP抗体（1:100）作为一抗检测神经干细胞分化情况，免疫荧光染色步骤同第一部分。

（1）对照组：用培养液培养细胞，不添加氯化锂

（2）氯化锂组：在培养液中添加1mM的氯化锂

2.4神经干细胞增殖率的计算

在20倍物镜下每个标本随机拍摄5个视野，计算视野中Hoechst33342标记

的细胞数目（代表细胞总数）和BrdU染色阳性的细胞数目（代表增殖状态的细胞数目），将增殖状态的细胞数除以细胞总数，即为神经干细胞增殖率。

BrdU染色阳性的细胞数目

神经干细胞增殖率 =

Hoechst33342标记的细胞数目

2.5神经干细胞分化率的计算

每例标本选取5 张切片，每张切片随机选取5 个视野，计算视野中

Hoechst33342标记的细胞核数目（代表细胞总数）和NeuN或GFAP染色阳性的细胞数目（代表分化状态的细胞数目），将NeuN或GFAP染色阳性的细胞数除以细胞总数，即为神经干细胞的分化率。

NeuN或GFAP染色阳性的细胞数目

神经干细胞分化率 =

Hoechst33342标记的细胞核数目

3统计学处理

用GraphPad Prism 5.0统计分析软件进行数据统计处理。所有的数据以均数

±标准差±S）表示，两组间比较采用t检验进行统计学分析，以P<0.05表示差异有统计学意义。

## 二 结果

1不同浓度的氯化锂对神经干细胞生长的影响

在培养液内添加不同浓度的氯化锂72小时之后，可见无氯化锂组和1mM氯化锂组神经干细胞生长状态良好，细胞密度高，形态、大小正常，有大量的轴突从胞体长出，并相互交错成网状，培养液内死细胞较少（图2-1 A, B）。3mM氯化锂组的神经干细胞密度减小，形态基本正常，轴突变短，培养液内有较多死细胞（图2-1 C）。6mM氯化锂组细胞数量明显减少，培养液中可见大量细胞碎片，存活的神经干细胞皱缩，轴突明显减少（图2-1 D）。说明培养液中添加1mM浓度的氯化锂对神经干细胞生长的影响最小。



图2-1不同氯化锂浓度下的神经干细胞生长状态。A：单纯培养液组；B：

含1mM氯化锂组；C：含3mM氯化锂组；D：含6mM氯化锂组。

2氯化锂对神经干细胞增殖的影响

2.1培养液中不含bFGF/EGF时神经干细胞的增殖情况

1mM氯化锂处理3天后，经过染色，单纯对照组（图2-2 A-C）和氯化锂组

（图2-2 D-F）均有部分神经干细胞被BrdU标记。BrdU阳性染色位于细胞核内，标记处于增殖状态的神经干细胞。单纯对照组和氯化锂组的BrdU标记阳性率分别为12.1%±3.1%和17.4%±3.5%。氯化锂组的BrdU阳性率明显高于单纯对照组，有显著的统计学差异（P<0.01, 图2-3）。



图2-2培养液中不含bFGF/EGF时神经干细胞的增殖情况。A-C：对照组，D-E：氯化锂组。A，D: Hoechst标记的细胞核；B，E：增殖的神经干细胞BrdU染色呈红色，经过氯化锂处理后的神经干细胞BrdU阳性细胞数量明显多于单纯对照组（E）；C，F：图片融合后可见同时表达BrdU和Hoechst的神经干细胞呈紫色。



图2-3 培养液中不含bFGF/EGF时氯化锂对神经干细胞增殖的影响

\*：与对照组比较，P<0.01

2.2培养液中含有bFGF/EGF时神经干细胞的增殖情况

在培养液中含有bFGF/EGF时，氯化锂处理3天后，经过染色，对照组（图2-4 A-C）和氯化锂组（图2-4 D-F）均可见大量BrdU标记的神经干细胞，均明显多于培养液中不含bFGF/EGF时的BrdU标记数目（图2-4 B, E）。对照组和氯

化锂组的BrdU 标记阳性率分别为35.3%±6.1%和47.9%±6.3%。氯化锂组的

BrdU阳性率明显高于单纯对照组，有显著的统计学差异（P<0.01, 图2-5）



图2-4培养液中含有bFGF/EGF时神经干细胞的增殖情况。A-C：对照组，D-E：氯化锂组。A，D: Hoechst标记的细胞核；B，E：增殖的神经干细胞有BrdU红色标记，可见氯化锂组BrdU阳性细胞数量明显增多（E）；C，F：图片融合后可见同时表达BrdU和Hoechst的神经干细胞呈紫色。



图2-5 培养液中含有bFGF/EGF时氯化锂对神经干细胞增殖的影响

\*：与对照组比较，P<0.01

3氯化锂对神经干细胞分化的影响

3.1氯化锂对神经干细胞分化为NeuN阳性神经元样细胞的影响

经过免疫荧光染色，氯化锂处理组和对照组均有部分细胞表达NeuN（图

2-6）。NeuN阳性表达主要见于胞体和轴突，表明神经干细胞分化为神经元样细胞。对照组中NeuN表达阳性的细胞较少（图2-6 B），NeuN神经元阳性率是31.9%±5.0%；而氯化锂组NeuN表达阳性的神经元数量增多（图2-6 E），NeuN神经元阳性率是37.4%±7.3%，二者差别有统计学意义（P<0.05, 图2-7），说明氯化锂对神经干细胞分化为神经元样细胞有促进作用。

图2-6神经干细胞分化为NeuN阳性神经元情况。A-C：对照组，D-E：氯化锂组。A，D：表达GFP蛋白的神经干细胞；B，E: NeuN染色阳性的神经干细胞，可见经过氯化锂处理后，NeuN染色阳性的神经干细胞（红色）数量明显增多（E）；C，F：图片融合后可见同时表达NeuN和GFP蛋白的神经干细胞呈黄色。





图2-7 氯化锂对神经干细胞分化为NeuN阳性神经元的影响

\*：与对照组比较，P<0.05

3.2氯化锂对神经干细胞分化为胶质细胞的影响

经过免疫荧光染色，氯化锂处理组和对照组均有部分细胞表达GFAP. GFAP阳性表达见于胞体和轴突，GFAP阳性表达的细胞发出较多的突起（图2-8）。对照组有超过半数的细胞GFAP表达阳性（图2-8 A-C），GFAP阳性细胞比例是52.2%±6.4%；氯化锂组GFAP表达阳性的细胞数量略少（图2-8 D-F），GFAP阳性细胞比例是46.7%±6.5%，低于对照组，两组之间GFAP细胞阳性率有差异

（P<0.05, 图2-9），说明氯化锂对神经干细胞分化为GFAP阳性细胞有抑制作用。

图2-8神经干细胞分化为GFAP阳性细胞情况。A-C：对照组，D-E：氯化锂组。A，D：表达GFP蛋白的神经干细胞；B，E: GFAP染色阳性的神经干细胞，经过氯化锂处理后，GFAP染色阳性的神经干细胞数量减少；C，F：图片融合后可见同时表达GFAP和GFP蛋白的神经干细胞呈黄色。





图2-9 氯化锂对神经干细胞分化为GFAP阳性细胞的影响

\*：与对照组比较，P<0.05

## 三 讨论

1氯化锂的使用浓度

临床上，氯化锂治疗的适用浓度范围很窄，治疗应用氯化锂的合适血清浓度是0.6-1.2mM，血清浓度在1.2mM-2.0mM会出现毒性作用，但症状较轻；超过

2mM可能出现急性锂中毒的表现[[34]](#_bookmark57)。在实验研究中，多数的研究采用1-3mM的氯化锂[[14,](#_bookmark37) [22,](#_bookmark45) [35-37]](#_bookmark58)。本实验在培养液内加入1mM的氯化锂，培养的细胞未见异常，而且1mM的氯化锂对培养的神经干细胞的增殖和神经元分化有明显的促进作用。当氯化锂浓度增加之后，培养细胞的生长就受到抑制，当氯化锂浓度达到

6mM时，出现部分细胞死亡，说明应用1mM的氯化锂浓度是合适的。

2氯化锂对神经干细胞增殖的影响及可能机制

本实验结果显示氯化锂能促进神经干细胞的增殖。其他学者的研究显示氯化锂可以促进大鼠小脑颗粒细胞和大脑皮层来源神经干细胞的增殖[[38]](#_bookmark60)，促进海马神经前体细胞的增殖[[39]](#_bookmark61)，对脊髓来源神经干细胞的增殖也有促进作用[[22]](#_bookmark45)，与本研究结果相吻合。

文献报道锂促进神经干细胞增殖的作用主要与抑制糖原合酶激酶-3β

（glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β）有关[[40,](#_bookmark62) [41]](#_bookmark63)。研究表明GSK-3β的激活会抑制细胞增殖[[42,](#_bookmark64) [43]](#_bookmark65)，氯化锂可以直接抑制GSK-3β的激活[[44](#_bookmark66)]，并间接通过激活磷

脂酰肌醇3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K）/Akt（即蛋白激酶B）和有丝分裂原激活蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MEK）/胞外信号调节激酶（extracellular-signal regulated kinases, ERK）通路发挥抑制GSK-3β的作用[[45]](#_bookmark67)，从而激活WNT/β-连环蛋白（β-catenin）途径来促进神经干细胞的增殖[[46]](#_bookmark68)。

此外，长期的氯化锂治疗可以增加大脑内BDNF及其受体B型酪氨酸激酶受体（tyrosine kinase receptor type B, TrkB）的表达[[47-49]](#_bookmark69)，同时氯化锂能促进神经干细胞合成、分泌BDNF [[14]](#_bookmark37)，而且BDNF对细胞增殖有显著的促进作用[[50,](#_bookmark70) [51]](#_bookmark71)。因此，BDNF途径在氯化锂促进神经干细胞增殖中也发挥作用。

3神经干细胞分化的调控机制

神经干细胞在外界因素作用下，可以向不同的方向分化。添加不同的神经营养因子或药物，可以改变神经干细胞的分化趋势，或影响神经元分化的调控机制。本实验结果显示氯化锂可以促进神经干细胞分化为神经元，相对抑制其向胶质细胞方向的分化。文献报道氯化锂可以促进海马神经前体细胞分化为钙结合蛋白阳性神经元[[39]](#_bookmark61)，促进脊髓来源的神经干细胞分化为Tublin阳性的神经元，而对其分化为胶质细胞和少突胶质细胞没有影响[[22]](#_bookmark45)。影响神经干细胞分化的调控机制非常复杂，目前仍未完全阐明。影响神经干细胞分化的因素主要包括以下几个方面

[[19,](#_bookmark42) [52]](#_bookmark72)：成形素（Morphogens）、生长因子、周围环境细胞的影响、转录因子的

调节等。

神经营养因子是影响神经干细胞分化的重要因素之一。在培养液中单纯添加

EGF，神经干细胞倾向于分化为胶质细胞，而同时添加bFGF可以使神经干细胞保持更长时间的未分化状态[[15,](#_bookmark38) [52]](#_bookmark72)。在胚胎大脑皮层干细胞的培养液中加入血小板源性生长因子，可以促进细胞向神经元分化[[53]](#_bookmark73)，而睫状神经营养因子和白血病抑制因子却可以促进细胞向星形胶质细胞发现分化[[54]](#_bookmark74)。研究表明，BDNF可以显著促进体外培养的神经干细胞分化为神经元[[14,](#_bookmark37) [55]](#_bookmark75)，可以促进移植到纹状体的神经干细胞分化为NeuN阳性神经元[[56]](#_bookmark76)。同时，氯化锂对神经干细胞合成、分泌BDNF有促进作用[[14]](#_bookmark37)。由此，在本实验条件下，氯化锂可以通过上调神经干细胞的

BDNF表达来促进神经干细胞向神经元方向分化。

本实验也观察到氯化锂抑制神经干细胞向胶质细胞方向分化。目前锂抑制神经干细胞向胶质细胞分化的机制还不明确。有研究报道锂能显著减少海马齿状

回、杏仁核、胼胝体内NG2细胞的增殖[[57](#_bookmark77)]，抑制培养的神经干细胞分化为GFAP阳性的胶质细胞[[39]](#_bookmark61)。此外，有研究发现核受体辅助抑制物（nuclear receptor co-repressor, N-CoR）可通过直接抑制GFAP启动子在细胞核内的转录来抑制小鼠皮层神经干细胞分化为星形胶质细胞[[58]](#_bookmark78)。Zhu的研究发现锂通过抑制信号传导子及转录激活子3（signal transducer and activator of transcription 3, STAT3）的激活来抑制神经干细胞向胶质细胞方向分化[[36]](#_bookmark59)，而该抑制作用与锂抑制GSK-3无直接关系，说明锂通过非GSK途径抑制神经干细胞分化为胶质细胞。锂促进神经干细胞分化为神经元，抑制其分化为星形胶质细胞的作用将有助于移植到体内的神经干细胞发挥治疗效用。

## 四 小结

1. 1mM浓度的氯化锂对神经干细胞的生长没有毒性作用。

2. 在培养液内添加1mM的氯化锂对神经干细胞的增殖有促进作用。

3. 在培养液内添加1mM的氯化锂可以促进神经干细胞向神经元方向分化，抑制神经干细胞向胶质细胞方向分化。为进一步研究氯化锂对移植到体内的神经干细胞的影响奠定基础。

# 第三部分 氯化锂对移植到周围神经内神经干细胞的影响

在周围神经内移植神经干细胞已应用于周围神经损伤的研究，并取得较好的治疗效果[[59-61]](#_bookmark79)。本研究的体外实验结果表明氯化锂能促进神经干细胞的增殖和向神经元方向分化，但氯化锂对移植到周围神经内的神经干细胞的影响如何尚不明确。本实验将神经干细胞移植到结扎后的胫神经内，观察移植后神经干细胞的存活、分化情况，进一步研究氯化锂对神经干细胞分化、分泌BDNF的影响，为下一步将携带有神经干细胞的胫神经移植治疗脊髓损伤打下基础。

## 一 材料与方法

1实验材料

1.1实验动物

健康雌性SD大鼠48只，体质量250±20g，由上海斯莱克实验动物有限责任公司中心提供，许可证号：SCXK（沪）2007-0005。

1.2 主要试剂

小鼠抗 BDNF 抗体 美国 Millipore 公司小鼠抗胆碱乙酰转移酶（ChAT）抗体 美国 Millipore 公司

ft羊抗兔 β-肌动蛋白（β-actin）抗体 美国 Santa cruz 公司多聚甲醛 美国 Sigma 公司

冰冻切片包埋剂德国Leica公司

RIPA裂解液、PMSF杭州碧云天生物有限公司

BCA蛋白浓度测定试剂盒美国HyClone公司

丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺美国Ameresco公司

Tris、SDS美国Ameresco公司

PVDF 膜 美国 Bio Rad 公司

NC 膜 美国 Hybond 公司

ECL Plus试剂盒美国Amersham公司

X 线胶片 美国 Kodak 公司

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 其余试剂详见第一部分 |  |
| 1.3 | 主要仪器 |
|  | 微量注射器 | 上海高鸽工贸有限公司 |
|  | 微量移液器 | 北京大龙公司 |
|  | 冰冻切片机（HM525 型）  超速冷冻离心机（Allegra 64R 型） 酶标仪（Stat FAX-2100 型）  稳压稳流电泳仪（DYY-III-6B 型） | 美国 Thermo 公司美国 Beckman 公司美国 Awarness 公司北京六一仪器厂 |
|  | 垂直电泳槽 | 北京六一仪器厂 |
|  | 蛋白转膜仪  紫外凝胶成像分析系统  电子天平（AR1140Adventurer 型） | 美国 Bio Rad 公司  英国 UVItec 公司美国 OHAUS 公司 |
|  | 超净工作台 | 苏净集团安泰公司 |
|  | 解剖显微镜（SZ61 型） | 日本 Olympus 公司 |
|  | 手术剪、血管钳、显微剪、显微镊 | 上海医疗器械有限公司 |
|  | 眼科剪、眼科镊 | 苏州六六视觉科技有限公司 |
|  | 其余仪器参见第一、二部分。 |  |
| 1.4 | 主要试剂的配制 |  |

1.4.1 Western blot所需溶液配制

1.4.1.1配制蛋白电泳所需溶液

（1）30%丙烯酰胺贮液

丙烯酰胺4.55 g

甲叉双丙烯酰胺0.45 g

双蒸水20 ml

混匀，溶液澄清透明后，再用双蒸水稀释到50 ml，棕色瓶4℃保存。

（2）2×上样缓冲液

1 M Tris-HCl(pH 6.8) 10 ml

巯基乙醇 3.1 g

溴酚兰 0.2 g

甘油20 ml

SDS 4 g

最后用双蒸水定容到100 ml，4℃保存。

（3）分离胶缓冲液（1.5 M Tris-HCl）Tris 45.43 g

双蒸水200 ml

浓盐酸调至pH 8.8，定容至250 ml，室温保存。

（4）浓缩胶缓冲液（1M Tris-HCl pH 6.8）Tris 30.29 g

双蒸水200 ml

浓盐酸调至pH 6.8，定容至250 ml，室温保存。

（5）10% SDS

SDS 2.5 g

双蒸水20 ml

50℃水浴溶解，定容到25 ml，室温保存。

（6）10%过硫酸铵

过硫酸铵0.1 g

双蒸水1 ml

混匀，充分溶解，4℃保存1～2周。

（7）10×TBS

Tris 24.2 g

NaCl 80 g

加双蒸水到950 ml，调整pH值到7.6，定容至1000 ml。

（8）20% Tween

Tween 20 ml

双蒸水100 ml

混匀，4℃保存。

（9）PBST溶液

1×PBS溶液100 ml

20% Tween 0.5 ml

现配现用。

（10）5×电泳缓冲液

Tris 3.75 g

甘氨酸 18 g

SDS 1.25 g

去离子水 200 ml

混匀，定容到250 ml，调整pH值到8.3，4℃保存，临用前稀释5倍。

（11）1×转移缓冲液

Tris 3.03 g

甘氨酸14.40 g

甲醇200 ml

用双蒸水定容至800 ml，室温条件下备用。

（12）封闭液

脱脂奶粉 5 g

TBS-T 100 ml

1.4.1.2配制分离胶和浓缩胶

（1）10%分离胶 10 ml

双蒸水 4 ml

30%丙烯酰胺3.3 ml

分离胶缓冲液 2.5 ml

10% SDS 0.1 ml

10%过硫酸铵0.1 ml

TEMED 0.004 ml

（2）5%浓缩胶 5 ml

双蒸水 3.4 ml

30%丙烯酰胺0.83 ml

浓缩胶缓冲液 0.63 ml

10% SDS 0.05 ml

10%过硫酸铵0.05 ml

TEMED 0.004 ml

1.4.1.3其他试剂

（1）氯化锂溶液（4.24mg/ml，腹腔注射用）无水氯化锂848 mg

无菌蒸馏水200 ml

在蒸馏水中加入称量好的无水氯化锂，充分溶解，高压灭菌后常温保存。使用时，按2ml/100g腹腔注射。

（2）BrdU（10mg/ml，腹腔注射用） BrdU 500 mg

无菌蒸馏水 50 ml

（3）4%多聚甲醛的配制

多聚甲醛 80 g

0.01M PBS 粉剂 1 包

蒸馏水 2000 ml

在1000ml蒸馏水中加入80g多聚甲醛，加热至80˚C，充分搅拌，待多聚甲醛完全溶解后，冷却至室温，加入PBS粉剂搅拌溶解，定容至2000ml。用试纸测定pH值，用1N NaOH溶液调节pH值至达7.4。最后将多聚甲醛溶液用滤纸过滤后放在棕色瓶中4℃保存。

（4）1N NaOH

NaOH粉剂4 g

蒸馏水100 ml

在100ml蒸馏水中加入40g NaOH，搅拌溶解，室温保存。

（5）2N HCL(MW 36.46, W/V)

浓盐酸 8.36 ml

蒸馏水 41.64 ml

（6）30%蔗糖（W/V）

蔗糖 150 g

蒸馏水 500 ml

在400ml蒸馏水中加入150g蔗糖，充分搅拌至完全溶解，定容至500ml。高压灭菌后4℃保存。

2实验方法

2.1实验动物的分组

在胫神经结扎后，将实验动物随机分为以下4组：

（1）单纯生理盐水注射组（NS组）

（2）单纯氯化锂注射组（Li组）

（3）神经干细胞移植+生理盐水注射组（NSC+NS组）

（4）神经干细胞移植+氯化锂注射组（NSC+Li组）

每组12 只实验动物。氯化锂注射组于手术次日开始腹腔注射氯化锂

（85mg/kg），生理盐水注射组于手术次日开始腹腔注射生理盐水（2ml/100g），持续一周。每组有4只大鼠用于Western blot检测，在注射一周后直接取材，其余大鼠在灌注固定后取材。

2.2 GFP转基因大鼠胚胎脊髓来源NSC的准备

当P1代神经干细胞生长到80%汇合时，按前述方法消化细胞，计算收获的细胞数目，根据细胞数加入适量培养液，调整细胞浓度为1×10 5个/ml备用。

2.3胫神经结扎及胫神经内移植神经干细胞

将实验大鼠称重，用10%水合氯醛（0.3-0.4 ml/100g）腹腔注射麻醉大鼠。右侧臀部及大腿后侧皮肤剃毛备皮，碘伏消毒。将大鼠置于手术台上，沿右侧臀部及大腿后侧作2.5cm长斜切口，切开皮肤、皮下组织，自动拉钩牵开。沿大腿后侧肌肉间隙分离，显露坐骨神经，在手术显微镜下将胫神经和腓总神经分离。在坐骨神经分叉部位稍下方，用显微镊垂直于胫神经干压榨胫神经10秒钟，在手术显微镜下见胫神经轴索完全中断，仅保留一层完整透明的神经外膜，压榨处用11-0显微缝线结扎。在胫神经结扎处远端约7mm，将显微注射器针头逆行刺入胫神经约4mm，缓慢注入NSC 1μl，留针2分钟，再缓慢注入NSC 1μl，留针

2分钟，将针头缓缓退出，针眼再压迫2分钟，再用11-0显微缝线缝合神经穿刺口，以免移植的细胞流失。术后逐层缝合关闭切口。

2.4胫神经标本的固定和取材

神经干细胞移植后一周，将大鼠用10%水合氯醛（0.5ml/100g）深度麻醉，置于灌注台上。剪断肋骨打开胸腔，显露心脏。自心尖部向主动脉方向插入灌注针头达升主动脉，灌注150ml 0.01M PBS后再灌注250-300ml 4%多聚甲醛。灌

注完毕后，在解剖显微镜下将移植有神经干细胞的坐骨神经取出，放入多聚甲醛再固定24小时，然后移入30%蔗糖溶液保存。

2.5胫神经标本的包埋和冰冻切片

每组取1例标本，以注射部位为中心取3mm长的胫神经段垂直放在衬有包埋剂的样品托上，冰冻切片包埋剂包埋后冷冻，按20µm的厚度进行连续横断切片，将切下的组织切片按顺序贴在载玻片上。

每组剩余5例标本，以注射部位为中心取6mm长的胫神经段横放在衬有包埋剂的样品托上，冰冻切片包埋剂包埋后冷冻，按20µm的厚度沿胫神经长轴进行连续纵行切片，将切下的组织切片按顺序贴在载玻片上。

2.5 Western blot检测坐骨神经内BDNF蛋白表达

2.5.1组织蛋白提取

（1）大鼠麻醉后打开右侧臀部原切口，显露坐骨神经，将右侧坐骨神经完整取出，放入液氮冷冻；

（2）将液氮冰冻的坐骨神经研磨成粉末，待液氮挥发干以后，移至1.5 ml离心管中；

（3）取适当量充分溶解的RIPA裂解液，在使用前数分钟内加入PMSF，调整

PMSF的浓度为1 mM；

（4）加入0.5 ml新鲜配置细胞裂解液，使组织细胞充分裂解；

（5）将组织混悬液放入100℃水浴中加热10分钟，12000 rpm离心10分钟，将上清液移入另一EP管中，-20℃保存备用。

2.5.2蛋白浓度测定

根据BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书进行测定。

（1）取1.2 ml蛋白标准配制液加入到一管蛋白标准（30 mg BSA）中，充分溶解，配制成25 mg/ml的蛋白标准溶液；

（2）取适量25 mg/ml蛋白标准溶液，稀释到0.5 mg/ml；

（3）根据样品数量，按50体积BCA试剂A加1体积BCA试剂B（50:1）配制适量BCA工作液，充分混匀；

（4）取96孔板一块，每孔加入20μl不同样品的蛋白裂解液，再加入200μl BCA

工作液，用加样枪轻柔吹打混匀，37℃放置60分钟；

（5）将样品冷却至室温，用酶标仪测定A562的吸光度；

（6）吸光度的大小和每个样品裂解液中蛋白质的浓度成正比。根据吸光度的大小，用RIPA蛋白裂解液稀释各组样品的裂解液，使得各组裂解液中蛋白质的浓度达到一致；

（7）调整浓度后的各组样品裂解液用于后续电泳实验。

2.5.3 SDS-PAGE电泳

（1）等量60μg蛋白，加入2×上样缓冲液，混匀后，置100℃水浴中加热3分钟，12000 rpm离心5分钟，取上清；用注射器将配制好的10%分离胶缓慢加入到装配好的板中至凝胶高度为6cm左右，预留1.5cm高度。每板凝胶溶液上覆盖双蒸水，放置1小时左右至聚合完全；

（2）使用Whatman 3mm滤纸吸去分离胶上层覆盖的所有溶液，用5ml注射器将5%浓缩胶加入板中至顶端，小心插入梳子，避免产生气泡，凝胶聚合约40分钟；

（3）上样：凝胶凝固好后，拔去梳子，电泳缓冲液清洗上样孔，将准备好的样品上样；

（4）电泳：稳压80V电泳40分钟后稳压120V电泳至溴酚蓝到底边上0.5cm；

（5）转膜（湿转）：准备好转移电泳装置，凝胶用1×转移缓冲液稍微清洗；

（6）用去离子水浸湿硝酸纤维膜Hybond-C后和电泳胶转移到转移缓冲液中平衡15分钟；裁4张与电泳胶同样大小的Whatman 3mm滤纸，放入转移缓冲液中平衡；按负极-2层滤纸-电泳胶-硝酸纤维膜-2层滤纸-正极的顺序装好，稳压30V转膜40分钟；

（7）封闭：NC膜取下以后用去离子水漂洗2次，加封闭液室温封闭2小时；

（8）一抗结合：用封闭液稀释一抗（1:500），4℃反应过夜；

（9）洗膜：用PBST洗涤3次，每次10分钟；

（10）二抗结合：用封闭液稀释二抗（1:10000），室温反应30分钟，用PBST

洗涤3次，每次10分钟；

（11）ECL显色：NC膜沥干PBST后加ECL Plus试剂，反应1分钟后，于暗室中压X光片，置自动洗片机中显影定影。

2.5.4半定量分析

用Quantity One软件对反应条带进行半定量分析，记录所测的灰度值。以

BDNF与同组β-actin 的灰度值比值表示BDNF蛋白的相对表达量。

2.6胫神经内神经干细胞分化的检测

标本取材切片后，采用小鼠抗Nestin抗体（1:100）、小鼠抗NeuN抗体（1:100）、小鼠抗胆碱乙酰转移酶（Cholin acetyltransferase, ChAT）抗体（1:100）和兔抗

GFAP（1:100）抗体作为一抗检测神经干细胞分化情况，免疫荧光染色步骤如下：

2.6.1 Nestin、NeuN、GFAP免疫荧光染色方法

（1）将切片用0.01M PBS（pH 7.4）漂洗3次，每次10分钟

（2）用0.3% TritonX-100/0.01M PBS漂洗3次，每次10分钟

（3）加入含10%ft羊血清和0.3% TritonX-100的0.01M PBS，室温下作用 1

小时

（4）加入一抗，用含10%ft羊血清和0.3% TritonX-100的0.01M PBS稀释，4度过夜

（5）第二天用0.01M PBS（pH 7.4）漂洗标本5次，每次5分钟

（6）加入Alexa568 ft羊抗小鼠荧光二抗（1:400）或Alexa568 ft羊抗兔荧光二抗（1:400）和Hoechst33342（1:400），用含10% ft羊血清和0.3% TritonX-100的0.01M PBS稀释，室温下作用1小时，避光操作

（7）用0.01M PBS（pH 7.4）漂洗标本5次，每次5分钟，避光操作

（8）用封片剂封片，置荧光显微镜下观察。

2.6.2胆碱乙酰转移酶（ChAT）免疫荧光染色方法

（1）将切片用0.1M TBS（pH 7.3）漂洗3次，每次10分钟

（2）加入含5%ft羊血清0.1M TBS，室温下作用1小时

（3）加入小鼠抗ChAT抗体（1:100），用0.1M TBS稀释，在室温下作用2小时后，移入4度冰箱继续作用18小时

（4）第二天用0.1M TBS（pH 7.3）漂洗切片5次，每次5分钟

（5）加入Alexa568 ft羊抗小鼠荧光二抗（1:400）和Hoechst33342（1:400），用0.1M TBS稀释，室温下作用1小时，避光操作

（6）用0.1M TBS（pH 7.3）漂洗切片5次，每次5分钟，避光操作

（7）用封片剂封片，置荧光显微镜下观察。

2.7胫神经轴突溃变和炎症细胞浸润的检测

标本取材切片后，用小鼠抗NF200抗体（1:100）作为一抗检测神经轴突，用小鼠ED-1抗体（1:100）作为一抗检测巨噬细胞浸润情况，免疫荧光染色方法同2.6.1。

2.8染色面积的计算

GFP、GFAP、NF200、ED1染色后，在荧光显微镜下拍摄各组染色照片。拍摄时，每例标本选取5张切片，每张切片随机选取5个视野，设定相同的曝光时间。后期用ImageJ图像处理软件调整荧光照片的亮度和对比度，所有图像的调整值相同，用ImageJ软件测量每幅图像内的各组染色面积，其中GFAP和ED1染色只测量GFP阳性染色范围内的面积。分别计算NF200染色面积占整个视野面积的比例，计算GFAP和ED1染色范围占GFP染色范围的比例。

3统计学处理

用GraphPad Prism 5.0统计分析软件进行数据统计处理。所有的数据以均数

±标准差±S）表示，两组间比较采用t检验，多组间比较采用单因素方差分析，多组间两两比较采用q检验进行统计学分析，以P<0.05表示差异有统计学意义。

## 二 结果

1胫神经内移植的神经干细胞的存活和迁移情况

胫神经内注射一周后，携带GFP绿色荧光蛋白的神经干细胞可以在胫神经内存活，在荧光显微镜下显示为绿色（图3-1）。在胫神经纵切片上，神经干细胞沿注射方向在胫神经内纵行排列，并沿着轴突间隙向两端扩散（图3-1 A, C）。在横切片上，神经干细胞在注射部位聚集成团，部分细胞沿轴索间隙向周围呈蟹爪样扩散蔓延（图3-1 B, D）。从横切片和纵切片的形态上观察，对照组（图3-1

A，B）和氯化锂组（图3-1 C, D）移植的神经干细胞在胫神经内均存活良好。



图3-1移植到胫神经内的神经干细胞的存活情况。A，B：对照组胫神经纵向和横断切片，C，D：氯化锂组胫神经纵向和横断切片，可见移植的神经干细胞在胫神经内存活良好。

2胫神经内移植的神经干细胞的分化情况

2.1胫神经内神经干细胞的Nestin表达情况

神经干细胞移植到胫神经内一周后，移植的细胞有明显的GFP阳性表达，但对照组和氯化锂组均未见明显的Nestin阳性染色（图3-2），说明移植后的神经干细胞已经分化。

图3-2胫神经内移植的神经干细胞Nestin表达情况。移植的神经干细胞未见明显的Nestin阳性染色。



2.2胫神经内神经干细胞分化为神经元样细胞的情况

神经干细胞移植到胫神经内一周后，移植的细胞GFP阳性表达明显，但对照组和氯化锂组均未见明显的NeuN（图3-3 A-C）或ChAT（图3-3 D-F）阳性染色，说明移植后的神经干细胞没有分化为NeuN或ChAT阳性的神经元。



图3-3胫神经内移植的神经干细胞NeuN和ChAT表达情况。移植的神经干细胞未见明显的NeuN和ChAT阳性染色。

2.3胫神经内神经干细胞分化为胶质细胞的情况

移植神经干细胞到胫神经内一周后，经过GFAP染色，可见对照组和氯化锂处理组有大量的GFAP阳性染色。GFAP阳性染色区域基本在GFP着色范围内。在对照组，绝大多数的GFAP染色区域与GFP染色区域重叠（图3-4 A-C），在氯化锂处理组，GFAP阳性表达区域范围较小，与GFP染色区域重叠部分也较少（图3-4 D-F）。

分别测量GFAP和GFP染色区域的面积，计算GFAP染色面积占GFP染色面积的比例，对照组和氯化锂组分别为86.7%±13.8%和69.8%±8.2%。经过统计学检验，氯化锂组GFAP阳性面积比例小于对照组（P<0.05, 图3-5）。



图3-4胫神经内移植的神经干细胞NeuN和ChAT表达情况。A-C：对照组，D-E：氯化锂组。A，D：表达GFP蛋白的神经干细胞；B，E: GFAP染色阳性的神经干细胞，可见氯化锂组GFAP阳性染色面积较小（E）；C，F：图片融合后可见对照组GFAP阳性区域与GFP阳性区域大部分重叠。箭头显示GFAP阴性区域。



图3-5 胫神经内移植的神经干细胞GFAP阳性染色区域比例

\*：与对照组比较，氯化锂组GFAP阳性面积比例减少，P<0.05

3各组坐骨神经BDNF蛋白的表达情况

胫神经结扎后一周，各组均有不同程度的BDNF蛋白表达（图3-6）。NS组和Li组仅有少量的BDNF表达；NSC+NS组的BDNF表达增加，明显高于前两组；而NSC+Li组的BDNF表达量最高（图3-6）。各组BDNF表达的相对灰度值分别是NS 组：12.1%±1.73%, Li 组：11.67%±2.01%，NSC+NS 组：

24.94%±1.98%，NSC+Li组：33.48%±5.08%. NS组和Li组的BDNF表达无明

显差异（P> 0.05, 图3-7）；NSC+NS组的BDNF表达高于前面两组，低于NSC+Li组（P<0.01, 图3-7）；NSC+Li组的BDNF表达显著高于其他各组（P<0.01, 图3-7）。



图3-6 实验一周后各实验组BDNF蛋白的表达

1: NS组，2：Li组，3：NSC+NS组，4：NSC+Li 组



图3-7 实验一周后各实验组BDNF蛋白表达情况

\*: 与NS组、Li组、NSC+Li组比较，P<0.01

#：与其他各组比较，P<0.01

4各实验组胫神经轴突溃变情况

胫神经结扎后1周，各实验组均有明显的轴突溃变。单纯胫神经结扎NF200染色阳性的残留轴突呈颗粒状，散在分布（图3-8 A）；胫神经结扎+氯化锂处理组残留轴突情况与前者相似（图3-8 B）；胫神经结扎+NSC移植+NS处理组的残留轴突呈颗粒状或短棒状，数量较多（图3-8 C-E）；胫神经结扎+NSC移植+氯化锂处理组的残留轴突数量最多（图3-8 F-H）。

用ImageJ软件测量NF 200阳性染色占每个拍照视野的比例，各组的NF200阳性染色的覆盖率分别为：NS组：2.46%±0.60%，Li组：2.64%±0.85%，NSC+NS组：3.94%±0.79%，NSC+Li组：5.83%±0.95%。经过统计学分析，NS组和Li组的NF200覆盖率无明显差异，NSC+NS组的NF200阳性覆盖率高于前两组

（P<0.05, 图3-9），NSC+Li组的残留轴突覆盖率明显高于上述各组（P<0.05, 图3-9）。

而在胫神经不结扎的情况下，胫神经内移植NSC后腹腔注射NS或氯化锂一周，可见NSC+NS组胫神经内有大量NF200阳性染色的神经纤维，沿神经长轴平行分布（图3-10 A-C）。而NSC移植后联合应用氯化锂，胫神经内NF200阳性神经纤维数量更多，排列更紧密（图3-10 D-F），对照组和氯化锂组NF200阳性染色的覆盖率分别为：11.01%±3.63%和15.52%±2.47%，氯化锂组高于对照组（P<0.05, 图3-11）。



图3-8 胫神经结扎后一周各组轴突溃变情况。A：单纯胫神经结扎组（NS

组），残留轴突呈颗粒状，散在分布；B：胫神经结扎+氯化锂处理组（Li组），残留轴突情况与前者相似；C-E: NSC +NS组，残留轴突数量增多；F-H: NSC+Li组，残留轴突数量最多。



图3-9 各组NF200阳性染色覆盖率的比较

\*: 与NS组、Li组组比较，P<0.01

#: 与NSC+NS组比较，P<0.05



图3-10在完整的胫神经内移植神经干细胞，一周后各组NF200表达情况。A-C：对照组胫神经内可见大量NF200阳性神经纤维，平行排列；D-F：氯化锂处理组，NF200阳性神经纤维数量更多，排列更紧密。



图3-11 胫神经内移植NSC后NF200染色覆盖率比较

\*：与对照组比较，氯化锂组的NF200阳性染色覆盖率增加，P<0.05

5各实验组胫神经内炎症细胞浸润情况

实验一周后，NS组和氯化锂组均可见到ED1阳性染色的巨噬细胞浸润（图3-12）。巨噬细胞浸润范围除了见于移植的神经干细胞周围外，也见于胫神经内的其他部位。NSC+NS组和NSC+Li组单位视野内平均ED1阳性表达面积分别是8.97%±4.07%和6.31%±2.78%，NSC+NS组巨噬细胞浸润明显多于NSC+Li组，两者差别有统计学意义（P<0.01, 图3-13），说明氯化锂对神经干细胞移植

引起的炎症反应有抑制作用。



图3-12氯化锂对移植后神经干细胞的胫神经内ED1表达的影响。A-C：对照组，D-E：氯化锂组。A，D: GFP标记的神经干细胞；B，E：胫神经内ED1的表达情况，可见氯化锂组ED1阳性细胞数少于对照组；C，F：图片融合后可见巨噬细胞沿移植的神经干细胞分布。



图3-13 胫神经内ED1的表达情况

\*：与对照组比较，P<0.05

## 三 讨论

1神经干细胞移植后细胞在胫神经内的存活、迁移和分化情况

在周围神经损伤后移植神经干细胞，能不同程度地促进损伤神经的再生。

Heine在胫神经切断后6个月，在远端神经移植转染GDNF的NSC，4个月后移植的NSC能促进新生轴突的形成，抑制硫酸软骨素蛋白聚糖（chondroitin sulfate

proteoglycans，CSPG）表达[[60]](#_bookmark80)。Lin将转染有NT-3的神经干细胞移植到成年大鼠胫神经内，结果显示转染的细胞存活时间更长，并可以分化为胆碱能神经元[[62]](#_bookmark81)。

Su的研究发现，在臂丛神经根性损伤后，在肌皮神经内移植神经干细胞，12周后，移植的神经干细胞可以分化为神经元，表达NF200和ChAT，而且NF200阳性的神经元胞体明显增大，可达40μm，类似于运动神经元，并能发出轴突与肌肉形成有功能的突触联系[[63]](#_bookmark82)。本实验中，移植到胫神经内的神经干细胞存活良好，并能沿着神经轴索间隙向注射部位两端及周围迁移扩散。移植一周后的神经干细胞nestin表达阴性，未见分化为NF200、NeuN或ChAT阳性的神经元，而大多数的神经干细胞分化为GFAP阳性的胶质细胞，还有一部分GFAP阴性的细胞，与上述作者的结果不完全一致。

造成这种结果的原因可能是：（1）周围神经内的环境更倾向于促进神经干细胞向胶质细胞方向分化。周围神经损伤后，神经远端出现Wallerian变性，轴突溃变，髓鞘崩解，大量雪旺细胞增殖[[64]](#_bookmark83)。雪旺细胞分泌大量的神经营养因子以促进损伤神经的修复，包括NGF，NT-3，BDNF，GDNF，CNTF，GGF，LIF等[[65]](#_bookmark84)。虽然BDNF对神经干细胞向神经元方向分化有促进作用，但周围神经损伤后，损伤神经内还有大量其他细胞以及各种因子对神经干细胞的作用尚不明确，有可能影响神经干细胞向胶质细胞方向分化。（2）本实验中氯化锂干预的时间较短，对促进神经干细胞向神经元方向分化的影响可能受到时间的限制，而上述实验在均在移植后数月观察结果。在本实验条件下，短时间内局部环境下

BDNF含量的提高可能尚不足以扭转其他细胞或因子对神经干细胞的影响，如果延长氯化锂的干预时间，局部微环境进一步改善，氯化锂有可能促进神经干细胞向神经元分化。此外，NeuN、ChAT都是成熟神经元表达的蛋白，本实验中还有一部分GFAP阴性的细胞，可能有分化为神经元的倾向，表达一些其他早期神经元标志物。（3）移植的NSC可能分化为其他细胞。Sekiguchi发现将神经干细胞移植到损伤的坐骨神经损伤内，发现雌激素可以促进神经干细胞分化为内皮细胞[[66]](#_bookmark85)。而NSC和肌细胞共培养时，可分化为肌细胞，表达肌球蛋白[[67]](#_bookmark86)。本实验中未GFAP阴性的细胞有可能分化为其他细胞。目前神经干细胞在周围神经内

的分化情况及其机制仍不明确，需要进一步研究。

2氯化锂对BDNF表达的影响

本实验结果显示胫神经结扎后单纯应用氯化锂对BDNF表达无影响，说明氯化锂对周围神经损伤后雪旺细胞合成分泌BDNF无明显作用。神经干细胞移植后神经内的BDNF蛋白表达增加，联合氯化锂注射后BDNF蛋白表达进一步增加，说明移植到胫神经内的神经干细胞能分泌BDNF，而且氯化锂可能通过促进神经干细胞增殖，并进一步促进神经干细胞合成表达BDNF。最近的研究显示锂通过选择性激活神经元内的BDNF的启动子IV [[68]](#_bookmark87)，从而在体内外促进BDNF表达的上调[[47,](#_bookmark69) [69]](#_bookmark88)。氯化锂对神经干细胞增殖和分泌BDNF的促进作用，为进一步在脊髓损伤后采用神经干细胞移植联合氯化锂治疗奠定了基础。

3氯化锂对胫神经损伤后轴突溃变和ED1表达的影响

在周围神经损伤后，神经远端出现Wallerian变性，轴突溃变，髓鞘崩解，大量巨噬细胞进入神经内，清除髓鞘和轴突碎片，为神经再生提供条件。本实验中，未移植神经干细胞的胫神经远端明显溃变，残留轴突呈颗粒状，氯化锂组和

NS组的轴突溃变情况没有差别。说明在胫神经损伤后一周，轴突溃变基本完成，应用氯化锂不影响巨噬细胞清除髓鞘和轴突碎片的作用。在损伤的周围神经内移植NSC以及NSC移植联合应用氯化锂组残留的轴突呈短棒状或颗粒状，明显多于未移植NSC对照组；在未结扎的胫神经内注射NSC，氯化锂组的轴突数量多于生理盐水对照组，说明NSC移植对胫神经损伤有明显的保护修复作用，联合应用氯化锂后保护作用更明显。研究显示NSC可以抑制轴突溃变后产生的硫酸软骨素蛋白聚糖（CSPG）[[60]](#_bookmark80)，锂也可以通过抑制GSK-3间接抑制CSPG发挥轴突保护作用[[70]](#_bookmark89)。

此外，氯化锂减轻轴突损伤的作用可能与抑制炎症反应有关。本实验中，

NSC+Li组的ED1表达量少于NSC+NS组，提示NSC移植和氯化锂对神经损伤后的炎症反应有抑制作用。研究表明锂可以通过抑制GSK-3减轻实验性自身免疫性脑脊髓炎表现[[71]](#_bookmark90)。锂通过抑制脂多糖（lypopolysaccharide, LPS）或肌醇单磷酸酶对巨噬细胞产生抑制作用[[72,](#_bookmark91) [73]](#_bookmark92)。Ben-Hur发现大脑内移植的NPC可以通过抑制T细胞而减轻化学物质引起的急慢性脑脊髓炎[[74]](#_bookmark93)。Busch也发现多能干细胞能显著减少巨噬细胞分泌基质金属蛋白酶-9，将巨噬细胞由致炎状态转化为抗

炎状态来抑制炎症反应，减少轴突顶端坏死[[75]](#_bookmark94)。NSC和氯化锂减轻神经损伤后炎症反应有利于损伤神经的修复。

## 四 小结

1. 损伤的胫神经内移植神经干细胞存活良好，并向邻近神经轴索间隙扩散。

2. 移植后的神经干细胞大部分分化为GFAP阳性的胶质细胞，但未观察到神经干细胞分化为NeuN或ChAT阳性的神经元。

3. 联合应用氯化锂能减少移植后的神经干细胞向胶质细胞方向分化，减少轴突的溃变程度，抑制神经干细胞移植后的巨噬细胞浸润。

4. 神经干细胞移植能上调移植神经内的BDNF表达，联合应用氯化锂对BDNF

表达的上调作用更明显。

# 第四部分 含神经干细胞的胫神经移植联合氯化锂治疗大鼠脊髓损伤的研究

脊髓损伤会造成严重的组织缺损，为了促进损伤脊髓结构和功能的恢复，应用组织或细胞移植是最有效的修复方法，但单一方法治疗脊髓损伤的效果较差，采用多种方法联合治疗是脊髓损伤治疗的方向。在脊髓损伤的治疗中，理想的细胞移植物应具备以下功能[[3]](#_bookmark28)：（1）为轴突再生提供合适的底物或支架，（2）能重新形成髓鞘，（3）可以替代损伤死亡的神经元，或起到接力的作用来重建轴突联系，（4）可以分泌生长因子以支持轴突再生和髓鞘形成。基于前一部分的实验结果，移植到胫神经内的神经干细胞存活良好，联合应用氯化锂能减少神经干细胞分化为胶质细胞，增加胫神经内BDNF的表达，减少炎症细胞浸润。本实验将移植有神经干细胞的胫神经移植到脊髓半切损伤部位，联合氯化锂治疗，研究以胫神经为载体的神经干细胞移植联合氯化锂治疗对脊髓损伤后轴突再生和功能恢复的作用。

## 一 材料与方法

1实验材料

1.1实验动物

健康雌性SD大鼠，体质量200±20g，由上海斯莱克实验动物有限责任公司中心提供，许可证号：SCXK（沪）2011-0005。

1.2主要试剂：详见第三部分

1.3主要仪器：详见第三部分

1.4主要试剂的配制：详见第三部分

2实验方法

2.1 GFP转基因大鼠胚胎脊髓来源NSC的获取和培养：同第一部分

2.2胫神经结扎后移植神经干细胞：同第三部分

2.3实验动物的分组

将实验动物随机分为以下4组，脊髓损伤后移植时不再另行分组：

（1）单纯胫神经移植（tibial nerve, TN）+生理盐水组（TN+NS组）

（2）单纯胫神经移植+氯化锂组（TN+Li组）

（3）含神经干细胞的胫神经移植+生理盐水组（TN+NSC+NS组）

（4）含神经干细胞的胫神经移植+氯化锂组（TN+NSC+Li组）

每组12只实验动物。其中氯化锂组在单纯胫神经结扎或胫神经内移植神经

干细胞后次日开始腹腔注射氯化锂（85mg/kg），持续1周，在胫神经移植到损

伤脊髓后继续腹腔注射相同剂量的氯化锂，持续4周。生理盐水组在初次胫神经结扎术后次日开始腹腔注射生理盐水（2ml/100g）一周，在胫神经移植到损伤脊髓后继续注射等量的生理盐水4周。扣除术后饲养过程中死亡的大鼠，到实验结

束时每组各有7-8只大鼠。

2.4大鼠脊髓半切损伤模型的建立

胫神经结扎后移植或不移植NSC后一周，将实验大鼠称重，用10%水合氯醛（0.3-0.4ml/100g）腹腔注射。大鼠麻醉后，背部皮肤剃毛备皮，碘伏消毒。于大鼠右侧臀部肌肉内注射庆大霉素（0.05ml/200g），右侧腰背部皮下注射生理盐水5ml。以T10棘突为中心作2厘米长切口，切开皮肤、皮下组织，剪开深筋膜，切断肌肉在棘突上的附着点，在肌肉深面作骨膜下剥离。牵开肌肉，显露T8-T11双侧椎板。切除T10椎板及T9椎板下半部分，形成约5mm×3mm大小的骨窗，暴露脊髓。沿中线纵行剪开硬膜并向右侧牵开，剪断右侧神经根。用显微剪在脊髓右侧半作相距2.5-2.8mm的两个横行切口，横行剪断脊髓右侧半，再于脊髓中央纵形剪断，连接上下两个横切口，使切断的右侧半脊髓完全分离。小心移除切断的脊髓，同时剪断残留的神经根，在脊髓右侧半形成约2.8mm×1.2mm大小的缺损区，将明胶海绵填入缺损区压迫止血。

2.5大鼠脊髓半切损伤后移植胫神经

2.5.1单纯胫神经移植

于同一大鼠右侧臀部原切口切开，切开皮肤、皮下组织，自动拉钩牵开。沿肌肉间隙分离，显露坐骨神经，找到胫神经结扎部位。在胫神经结扎部位远侧

5mm处，切下3mm长的胫神经段植入脊髓缺损区，移植的胫神经段两端用11-0

尼龙线与软脑膜缝合固定，胫神经供区不予处理。缝合硬膜，逐层缝合关闭背部

和臀部切口。再于皮下注射生理盐水5 ml。实验后大鼠分笼饲养，术后第一周每天按摩膀胱，帮助排尿。

2.5.2含有神经干细胞的胫神经移植

胫神经内移植神经干细胞的方法同第三部分。在移植后一周，于同一大鼠右侧臀部原切口切开，切开皮肤、皮下组织，自动拉钩牵开。沿肌间隙分离，显露坐骨神经，找到胫神经结扎部位和移植神经干细胞时穿刺部位的标识线头。在结扎部位和穿刺部位的中间，切下3mm长的胫神经段移植入脊髓缺损区。其余步骤同上。

2.6大鼠下肢运动功能评分

在移植术后2周、4周采用BBB评分法[[76]](#_bookmark95)分别对大鼠下肢运动功能状态进行评分。在进行运动功能测定时，让实验动物在直径约1.5 m的光滑平整场地内自由活动，用摄像机拍摄大鼠的下肢活动情况，再由2位熟悉BBB评分标准的非本实验组人员对大鼠下肢功能进行评分。

BBB评分标准如下：

0分：无可见后肢运动

1分：一或两个关节轻微运动，通常为髋和/或膝关节

2分：一个关节大幅度活动；或一个关节大幅度活动且有另一关节轻微活动

3分：两个关节大幅度活动

4分：后肢全部三个关节可轻微活动

5分：两个关节轻微活动，第三个关节大幅活动

6分：两个关节大幅活动，第三个关节可轻微活动

7分：后肢全部三个关节可大幅活动

8分：非负重情况下可以足底着地或拖动

9分：只在静止时足底着地负重；或偶尔/频繁/持续以足背负重行走，无足底负重行走

10分：偶见足底负重行走；无前后肢协调运动

11分：频繁到持续足底负重行走，但无前后肢协调运动

12分：频繁到持续足底负重行走，偶见前后肢协调运动

13分：频繁到持续足底负重行走，前后肢频繁协调运动

14分：持续性足底负重行走，持续性前后肢协调运动；且优势爪的位置在触地和提起时是旋转的（内旋或外旋）；或频繁的足底行走，伴持续性前后肢协调运动，偶有用足背行走

15分：持续性足底负重行走和持续性前后肢协调运动，且前肢前进过程中未见或偶见足趾离地；触地时优势爪位置与身体平行

16分：行走时可见持续性足底负重行走和持续性前后肢协调运动，且前肢前进过程中频繁足趾离地；触地时优势爪位置与身体平行，抬起时旋转

17分：行走时可见持续性足底负重行走和持续性前后肢协调运动，且前肢前进过程中频繁足趾离地；优势爪在触地及抬起时均与身体平行

18分：行走时可见持续性足底负重行走和持续性前后肢协调运动，且前肢前进过程中持续足趾离地；优势爪在触地时均与身体平行，抬起时旋转

19分：行走时可见持续性足底负重行走和持续性前后肢协调运动，且前肢前进过程中持续足趾离地；优势爪在触地及抬起时均与身体平行；尾部有时或总是下垂

20分：持续性足底负重行走，持续性协调步态，持续性足趾离地，优势爪在触地及抬起时均与身体平行，尾部持续翘起，躯干不稳定

21分：持续性足底负重行走，持续性协调步态，持续性足趾离地，优势爪位置始终与身体平行，躯干持续稳定，尾部持续翘起

2.7脊髓标本的固定和取材

胫神经移植术后4周，将大鼠用10%水合氯醛（0.5ml/100g）深度麻醉，置于灌注台上。剪断双侧肋骨，打开胸腔，显露心脏。自心尖部向主动脉方向插入灌注针头达升主动脉，灌注150ml 0.01M PBS后再灌注250-300ml的4%多聚甲醛。灌注完毕后，在解剖显微镜下将大鼠含有胫神经移植段的胸腰段脊髓取出，放入多聚甲醛再固定24小时，然后移入30%蔗糖溶液保存。

2.8脊髓标本的包埋和冰冻切片

以移植部位为中心取1cm长的脊髓节段横放在衬有包埋剂的样品托上，腹侧朝下，冰冻切片包埋剂包埋后冷冻，按20µm的厚度沿脊髓长轴进行连续纵行切片，将切下的脊髓切片按顺序贴在载玻片上。

2.9脊髓切片免疫荧光染色方法：同第三部分

2.10染色结果的观察

2.10.1 NF200阳性染色覆盖面积的测量

每例标本在10倍物镜下拍照，选取NF200染色面积最大的3张切片，用

ImageJ软件将非测量区域涂黑，去除非特异性染色的干扰，测量每个拍照视野内NF200阳性染色所覆盖的面积和整个视野的面积，计算各组NF200阳性染色覆盖面积的比例，即NF200阳性染色覆盖率。

2.10.2脊髓损伤反应区面积的测量

每例标本沿脊髓长轴纵行切片，在GFAP染色后选取脊髓宽度最大的3张切片，将GFAP阳性胶质瘢痕包绕区域作为脊髓损伤反应区（如图4-7 C），用ImageJ软件测量反应区面积。

2.10.3 ED1阳性染色覆盖面积的测量

每例标本在10倍物镜下拍照，选取ED1染色面积最大的3张切片，用ImageJ

软件去除非特异性染色，测量每个拍照视野内ED1阳性染色所覆盖的面积。

3统计学处理

用GraphPad Prism 5.0统计分析软件进行数据统计处理。所有的数据以均数

±标准差±S）表示，多组间比较采用单因素方差分析，多组间两两比较采用

q检验进行统计学分析，以P <0.05表示差异有统计学意义。

## 二 结果

1大鼠下肢运动功能评分结果

移植术后2周，各组实验动物的右下肢功能有部分恢复，其中TN+NSC+Li组恢复稍好，TN+NSC+NS组和TN+Li组较差，TN+NS最差。各组BBB评分见表1。TN+NSC+Li组的BBB评分高于其他各组（P<0.01），TN+NSC+NS组的BBB评分略高于TN+Li组，但二者无显著差异，均高于TN+NS组，差别有统计学意义（P<0.05, 表4-1、图4-1）。

移植术后4周，各组实验动物的右下肢功能进一步改善，其中TN+NSC+Li组恢复最明显，大多数动物可以用足跟负重行走，前后肢协调运动也有不同程度的恢复。TN+NSC+NS组和TN+Li组恢复较好，部分动物在静止状态下可以用足跟负重，但行走时右下肢呈拖动状态，足跟没有负重。TN+NS组恢复最差，

非负重情况下仅偶见足底着地。各组的BBB评分分别为：TN+NS组：6.17±1.60，

TN+Li组：8.33±1.03，TN+NSC+NS组：8.67±1.75，TN+NSC+Li组：12.17±1.72.

经过统计学分析，移植术后4周，TN+NSC+Li组的BBB评分明显高于其他各组，差异有显著意义（P<0.01）；TN+NSC+ NS组和TN+Li组的BBB评分无显著差异，均高于单纯胫神经移植组（P<0.05, 表4-1、图4-1）。

表 4-1 各组大鼠术后不同时间下肢运动功能BBB评分±S）

| 组别 | 移植后 2 周 | 移植后 4 周 |
| --- | --- | --- |
| TN+NS 组 | 2.83±1.17 | 6.17±1.60 |
| TN+Li 组 | 4.33±1.03\* | 8.33±1.03\* |
| TN+NSC+NS 组 | 4.50±1.05\* | 8.67±1.75\* |
| TN+NSC+Li 组 | 6.17±0.75\*\* | 12.17±1.72\*\* |



TN+NS组

TN+Li组TN+NSC+NS组

TN+NSC+Li组

\*\*

\*

\*

\*\*

\* \*

**20**

**15**

**BBB评分**

**10**

**5**

**0**

**移植后2w移植后4w**

图4-1 各组大鼠术后不同时间下肢运动功能BBB评分

\*: 与TN+NS组比较，P<0.05

\*\*：与其他各组比较，P<0.01

2移植后胫神经内神经干细胞的存活和分化情况

2.1胫神经移植后神经干细胞的存活生长情况

含有神经干细胞的胫神经移植到脊髓后4周，移植神经段内神经干细胞存活，表达GFP蛋白，荧光显微镜下呈绿色（图4-2 A-C）。氯化锂组移植的神经干细胞可以发出较多细长的轴突，并长入宿主的脊髓实质内（图4-2 D-F）。经



过测量，神经干细胞发出的轴突最长可长入宿主脊髓约0.4mm（图4-2 F箭头）。而生理盐水组的神经干细胞未发出明显的轴突。

图4-2胫神经移植后神经干细胞的存活和生长情况。A-C：移植后的神经干细胞；D：氯化锂组GFP阳性的神经干细胞发出较多细长的轴突（箭头）长入宿主脊髓实质内；E：宿主脊髓实质内NeuN染色阳性的神经元（空箭头）；F：融合图片。

2.2胫神经移植后神经干细胞的分化情况

含有神经干细胞的胫神经移植到脊髓后4周，移植的细胞未见Nestin阳性表达。氯化锂组神经干细胞可以分化为NF200阳性神经元，并发出轴突（图4-3），未观察到神经干细胞分化为NeuN或ChAT阳性神经元的情况。对照组未见神经干细胞分化为上述蛋白阳性的神经元。

图4-3移植后氯化锂组神经干细胞分化为NF200阳性神经元。A：表达GFP的神经干细胞；B: NF200染色阳性的神经元和轴突；C：图像融合后分化为NF200阳性神经元的细胞呈黄色（箭头）。



3各实验组移植后脊髓运动神经元存活情况

移植术后4周，在损伤区胶质瘢痕之外，各组非手术侧脊髓原有的神经元数目接近正常。在TN+NS组，手术侧损伤区两端NeuN阳性神经元明显减少（图4-4 A）；在TN+Li治疗组，手术侧损伤区两端NeuN阳性神经元减少（图4-4 B）；在TN+NSC+NS组，手术侧损伤区两端NeuN阳性神经元也有减少，与前者相似

（图4-4 C）；在TN+NSC+Li组，手术侧损伤区两端NeuN阳性神经元数目稍减少（图4-4 D）。

在脊髓冠状面切片上统计损伤区两端1mm范围内手术侧和对侧的NeuN阳性神经元数目，计算手术侧NeuN阳性神经元占对侧的比例。经过计算，上述各组手术侧NeuN阳性神经元占对侧的比例分别为：TN+NS组：47.8%±8.6%，

TN+Li组：62.9%±7.3%，TN+NSC+NS组：61.0%±9.3%，TN+NSC+Li 组：

74.1%±6.1%。经过统计学分析，TN+NS组手术侧NeuN阳性神经元占对侧的比例显著低于其余各组（P<0.01, 图4-5），TN+Li组和TN+NSC+NS组的NeuN阳性神经元比例无明显差异（P> 0.05, 图4-5），TN+NSC+Li组的手术侧NeuN阳性神经元比例明显高于上述各组（图4-5，与TN+NS组比较P<0.01；与其余两组比较P<0.05）。



图4-4不同移植组损伤区周围神经元存活情况（右侧为损伤区，下方为手术侧）。A: TN+NS组；B: TN+Li组；C: TN+NSC+NS组；D: TN+NSC+Li

组。



图4-5不同移植组手术侧与对侧NeuN阳性神经元的比例

\*: 与TN+NS组比较，P<0.05

\*\*: 与TN+NS组比较，P<0.01

#: 与TN+Li组、TN+NSC+NS组比较，P<0.05

4各实验组移植后轴突再生情况

移植术后4周，各组的移植神经段均能较好地整合到宿主脊髓，在移植的神经段内可见到不同程度的NF200表达阳性的轴突生长。在TN+NS组，NF200阳性的神经纤维较少，呈点状分布，宿主脊髓内再生的神经纤维也较少（图4-6 A）；在TN+Li组（图4-6 B）、TN+NSC+NS组（图4-6 C）、TN+NSC+Li组（图4-6

D），可见宿主脊髓内有较多的NF200阳性的神经纤维，移植的神经段内也有较多NF200阳性的神经纤维再生，主要分布在移植神经段两端靠近宿主脊髓处，再生的神经纤维在神经段内平行排列。其中TN+NSC+Li组再生的神经纤维最为密集（图4-6 D）。

用ImageJ软件测量每个拍照视野内NF200阳性染色所覆盖的面积和整个视野的面积，计算各组NF200阳性染色的覆盖率。上述各组的NF200阳性染色覆盖率分别为TN+NS组：4.87%±1.21%，TN+Li组：8.36%±2.27%，TN+NSC+NS组：13.47%±2.85%，TN+NSC+Li组：17.93%±2.59%。经过统计学分析，TN+NS

组的NF200阳性染色覆盖率显著低于其他各组；TN+Li组的NF200阳性染色覆盖率高于TN+NS组（P<0.05），但低于TN+NSC+NS组（P<0.05）和TN+NSC+Li

组（P<0.01）；TN+NSC+NS组的NF200阳性染色覆盖率高于前面两组，低于

TN+NSC+Li组（P<0.05）；TN+NSC+Li组的NF200阳性染色覆盖率最高，显著高于上述各组（图4-7，与TN+NSC+NS组比较P<0.01，与其余两组比较P<0.05）。



图4-6移植后4周，各组移植神经段NF200表达情况。A: TN+NS组，移植的神经段和宿主脊髓内NF200阳性的神经纤维最少，呈点状分布；B: TN+Li组，C: TN+NSC+NS组，宿主脊髓内可见较多NF200阳性的神经纤维再生，移植神经内可见部分平行排列的NF200阳性神经纤维，但较为稀疏；D: TN+NSC

+Li组，宿主脊髓和移植的神经段内可见大量的NF200阳性神经纤维，移植神经内的再生神经纤维平行分布，排列紧密，在神经段与宿主脊髓交接处，再生的神经纤维更为密集。

星号代表移植的神经段，白色虚线代表移植神经段和宿主脊髓的交界面。



图4-7 移植后4周，各移植组NF200阳性染色的覆盖率

: 与TN+NS组、TN+NSC+NS组比较，P<0.05

†: 与TN+NSC+Li组比较，P<0.01

##: 与TN+NS组比较，P<0.01

#: 与TN+Li组、TN+NSC+NS组比较，P<0.05

\*\*: 与TN+NS组、TN+Li组比较，P<0.01

\*: 与TN+NSC+NS组比较，P<0.05

5各实验组损伤脊髓内GFAP表达及组织反应情况

各组胫神经段移植到脊髓内4周后，大鼠损伤脊髓均有明显的GFAP阳性表达。GFAP阳性表达见于损伤反应区周围的胶质瘢痕，在脊髓内形成大小不等的反应区。在TN+NS组，GFAP染色明显，脊髓损伤反应区范围最大（图4-8 A）；在TN+Li组和TN+NSC+NS组，GFAP阳性胶质瘢痕包绕的反应区范围缩小（图4-8 B, C）；在TN+NSC+Li组，GFAP阳性胶质瘢痕包绕的反应区范围明显小于上述各组（图4-8 D）。

在脊髓冠状面切片上测量损伤区GFAP阳性胶质瘢痕包绕反应区的面积，上述各组分别为：TN+NS组：9.46 mm2±1.03 mm2, TN+Li组：7.22 mm2±1.16 mm2，

TN+NSC+NS组：6.56 mm2±1.25 mm2, TN+NSC+Li组：4.97 mm2±1.03 mm2.

经过统计学分析，TN+NS组GFAP阳性胶质瘢痕包绕的反应区面积最大（P<0.01, 图4-9），TN+Li组和TN+NSC+NS组的反应区面积小于TN+NS组，但两者间无明显差异，而TN+NSC+Li组的反应区面积明显小于上述各组（P<0.05, 图4-9）。









图4-8 移植后4周，各实验组GFAP阳性胶质瘢痕包绕的反应区大小。A：

TN+NS组；B: TN+Li组；C: TN+NSC+NS；D: TN+NSC+Li组。



图4-9 各实验组GFAP阳性胶质瘢痕包绕的反应区面积比较

#: 与TN+NS组比较，P<0.01

\*: 与TN+Li组、TN+NSC+NS组比较，P<0.05

6各实验组损伤脊髓内ED1表达情况

移植术后4周，各组大鼠损伤脊髓内均有明显的ED1阳性表达主要见于损伤反应区及周围邻近的脊髓内。在TN+NS组，反应区内及周围脊髓组织内有大量ED1阳性的巨噬细胞浸润（图4-10 A）；在TN+Li组，ED1阳性的巨噬细胞浸润见于反应区内，周围脊髓组织内浸润较前者明显缩小（图4-10 B）；在

TN+NSC+NS组，ED1阳性的巨噬细胞浸润见于反应区及周围脊髓组织内，但浸润范围较TN+NS组缩小（图4-10 C）；在TN+NSC+Li组，ED1阳性的巨噬细胞浸润范围明显缩小，主要见于反应区内，而周围脊髓组织内浸润较少（图4-10

D）。

在脊髓冠状面切片上测量ED1阳性染色覆盖的面积，上述各组分别为：TN+

NS组：3.93 mm2±0.96 mm2, TN+Li组：2.77 mm2±1.14 mm2, TN+NSC+NS

组：2.46 mm2±0.71 mm2, TN+NSC+Li组：1.81 mm2±0.61 mm2. 经过统计学分析，TN+NS组的ED1阳性染色覆盖面积最大（图4-11, \*\*: P<0.01, \*: P<0.05）；TN+NSC+Li组ED1阳性染色覆盖面积虽然较低，但统计学检验与TN+Li组和

TN+NSC+NS组ED1阳性染色覆盖面积无明显差异（P> 0.05, 图4-11）。

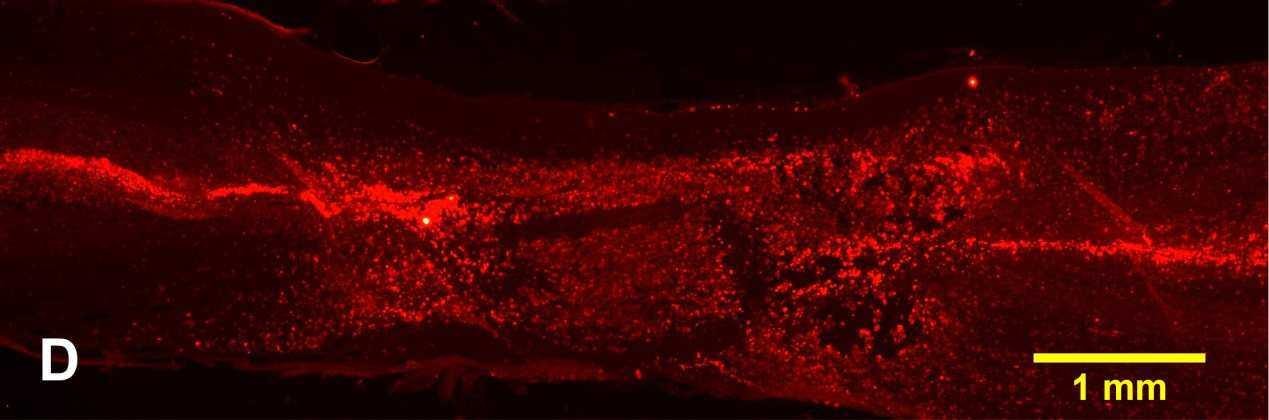


图4-10各实验组的ED1表达情况。A: TN+NS组，反应区内及周围脊髓组织内有大量ED1阳性的巨噬细胞浸润。B: TN+Li组，ED1阳性的巨噬细胞浸润见于反应区内，周围脊髓组织内浸润较前者明显缩小。C: TN+NSC+NS组，ED1阳性的巨噬细胞浸润见于反应区及周围脊髓组织内，但浸润范围较单纯胫神经段移植组缩小。D: TN+NSC+Li组，ED1阳性的巨噬细胞浸润明显缩小，主要见

于反应区内，而周围脊髓组织内浸润较少。



图4-11 各实验组的ED1阳性染色覆盖面积比较

\*: 与TN+NS组比较，P<0.05

#: 与TN+NS组比较，P<0.01

## 三 讨论

1神经干细胞移植方法的选择

急性脊髓损伤后，脊髓中央管、灰质、白质出现出血灶，随时间延长，出血灶中心部位开始凝固坏死，进一步液化形成小囊腔。脊髓损伤后48小时-1周，脊髓大部分坏死，4-6周后坏死组织被神经胶质瘢痕取代。严重脊髓损伤后数小时，神经细胞开始肿胀，神经原纤维断裂，细胞破裂。损伤后6小时，神经细胞开始减少，24小时后神经细胞基本消失。严重损伤后，神经轴索肿胀，髓鞘破裂，轴突和髓鞘逐渐退变形成空泡，并被胶原纤维组织取代。在神经细胞与神经纤维退变坏死的同时，炎症细胞浸润，清理坏死组织，形成局部软化灶或坏死腔。胶质细胞在损伤后出现肿胀，而后转为增生，填充囊腔或坏死灶[[77]](#_bookmark96)。

由于成年哺乳动物中枢神经系统的再生能力非常有限，单纯依靠神经系统自身无法完成对损伤的修复和功能的恢复。损伤造成的神经结构的破坏往往造成永久性的神经功能障碍，脊髓损伤的主要治疗目标就是要重新建立由于损伤而中断的神经支配。中枢神经系统损伤的修复包括以下几个方面[[78](#_bookmark97)]：（1）受损神经轴突的修复，（2）损伤死亡细胞的替代，这些是中枢神经系统功能恢复的必要条

件。

Sandner认为脊髓损伤后理想的细胞移植物需要具备以下几个功能[[3]](#_bookmark28)：1）为轴突再生提供合适的底物或支架，2）能重新形成髓鞘，3）可以替代损伤死亡的神经元，或起到接力的作用来重建轴突联系，4）可以分泌生长因子以支持轴突再生和髓鞘形成。本实验以胫神经为载体，先将神经干细胞移植到胫神经内，再将携带有神经干细胞的胫神经移植到脊髓损伤部位。移植的胫神经经过预退变处理，虽然损伤后神经内的轴突和髓鞘崩解，但基膜仍然保留，能为神经的再生提供支架；胫神经内的雪旺细胞具有形成髓鞘的能力；胫神经内移植的NSC可以分化成NF200阳性的神经元，并有部分神经元发出轴突长入宿主脊髓，对神经的再生可以起到接力的作用；此外，前面的实验结果表明移植有NSC的胫神经

BDNF表达量明显增加，而且氯化锂既可以促进NSC的增殖，有对NSC表达

BDNF有促进作用，这样携带NSC的移植神经就提供了一个富含神经营养因子的环境，有利于脊髓损伤后神经再生。

在脊髓损伤后采用周围神经移植治疗已经有较长的历史[[79-84]](#_bookmark98)。大多数研究使用的神经是坐骨神经或其分支（胫神经或腓总神经）。由于坐骨神经或胫神经较为粗大，在脊髓完全横切后，并排放置2个胫神经段也足以充填损伤脊髓的断面缺损[[80]](#_bookmark99)。也有学者使用更细的神经，如肋间神经，但要使用多组神经移植，并用纤维蛋白胶固定[[81]](#_bookmark100)。在本实验中，我们在脊髓半切后移植单根胫神经，从术中情况看，移植的胫神经可以占据80%以上的脊髓半截面，可以为损伤脊髓和移植神经提供足够的接触面以满足损伤修复的需要。而且，采用自体神经移植可以避免异体神经移植所需的长期免疫抑制治疗。在人体上，如果采用自体神经移植，尤其是用运动神经移植，必然会造成供区神经功能的丧失，若采用皮神经移植，如腓肠神经，就可以最大限度地减少采用自体神经移植造成的功能丧失。

周围神经损伤后，损伤部位远端神经内的神经营养因子，如BDNF、NT-4的表达显著增加[[85,](#_bookmark102) [86]](#_bookmark103)。将神经切断后留在原位7-10天，再行移植，经过这样预退变处理的神经内会含有更多的神经营养因子。在CNS损伤后，移植预退变的周围神经能显著促进轴突的再生。Cote在猫C7半切损伤后移植预退变处理的胫神经，数月后可见大量轴突长入移植的神经段内[[79]](#_bookmark98)。Tom在脊髓损伤后移植预先结扎切断的胫神经，联合GDNF、软骨素酶ABC（Chondroitinase ABC, ChABC）

治疗，能促进再生轴突长入移植神经段，并重新长入远端脊髓，与宿主神经元形成突触连接[[82]](#_bookmark101)。

根据这个原理，本实验将神经干细胞先期移植到结扎的胫神经内，一周后再将移植有神经干细胞的胫神经段移植到大鼠胸段脊髓右侧半缺损区内。为移植的神经干细胞提供一个合适的生存环境，为移植后促进轴突再生和神经功能恢复奠定基础。

2氯化锂对移植后神经干细胞及自体神经元的影响

脊髓损伤后的炎症反应、免疫排斥、自由基、代谢改变、局部缺血等因素使损伤局部环境不适于移植的神经干细胞存活，会导致大量移植细胞死亡。本实验以胫神经为载体，先将神经干细胞移植到胫神经内，再移植修复脊髓损伤。结果显示移植后神经干细胞存活良好，而联合应用氯化锂后神经干细胞可发出较多细长的轴突长入宿主脊髓实质内，部分细胞分化为NF200阳性的神经元样细胞。既往的研究显示在脊髓损伤后移植的神经干细胞可以分化为神经元[[87]](#_bookmark104)，并促进脊髓功能的恢复。Lee在成年大鼠脊髓完全横断后9天移植人胚胎大脑来源的神经干细胞，结果显示神经干细胞可以分化为NF阳性的神经元细胞和GFAP阳性的胶质细胞[[88]](#_bookmark105)。Webber在成年大鼠脊髓压榨伤后移植胚胎脊髓来源的神经干细胞，发现移植细胞主要分布在移植部位，40%分化为胶质细胞形态，8%分化为神经元形态[[89]](#_bookmark106)。Kim的研究证实氯化锂能促进培养的海马神经前体细胞分化为钙结合蛋白阳性的神经元[[39]](#_bookmark61)。Su的研究显示氯化锂可以促进移植到正常脊髓内的神经干细胞分化为NeuN阳性的神经元[[22]](#_bookmark45)。本研究的结果与上述作者报告的情况相吻合，说明氯化锂能促进移植后神经干细胞的存活和向神经元方向分化。此外，本研究结果显示术后4周，与单纯胫神经移植组比较，其他三组手术侧损伤区两端NeuN阳性神经元数目均有增加，其中NSC+Li组的NeuN阳性神经元数目最多。说明移植神经干细胞和应用氯化锂对脊髓损伤后宿主自身的运动神经元也有保护作用，神经干细胞移植联合氯化锂对神经元的保护作用更明显。

氯化锂保护神经元、促进神经干细胞存活和分化的可能机制是：（1）氯化锂可以直接磷酸化GSK-3来抑制GSK-3[[44]](#_bookmark66)，或通过激活PI3K和Akt-1间接移植GSK-3，从而激活β-连环蛋白通路[[11]](#_bookmark34)，发挥保护神经元和促进神经干细胞向神经元方向分化的作用；（2）通过促进神经干细胞分泌BDNF进一步促进移植的神

经干细胞的存活和向神经元方向分化[[56]](#_bookmark76)；（3）通过B细胞淋巴瘤蛋白-2（B-cell lymphoma 2 protein, Bcl-2）途径促进细胞存活。在中枢神经系统损伤后，Bcl-2能保护神经元免于凋亡，锂能显著上调Bcl-2的表达[[90,](#_bookmark107) [91]](#_bookmark108)。氯化锂可以通过上述途径发挥神经元保护、促进NSC存活和分化的作用。

3氯化锂和NSC对损伤脊髓的组织保护和抑制炎症的作用

研究显示锂在中枢神经系统损伤和退变性疾病中有神经保护作用。Yu[[92]](#_bookmark109)在一侧脑损伤后使用氯化锂治疗，损伤后3天至3周，实验组脑损伤面积明显小于对照组。Hwang在脊髓损伤后移植转染有Olig2基因的神经干细胞，能更有效地保留白质组织，减少空洞形成[[93]](#_bookmark110)。

在本实验中，胫神经移植+氯化锂处理以及神经干细胞移植后脊髓损伤反应区面积均小于单纯胫神经移植组，NSC联合氯化锂处理组的反应区面积最小。说明移植的神经干细胞和氯化锂都有组织保护作用，与上述作者报道的情况一致。其机制可能与以下方面有关：首先，锂能促进GSK-3β磷酸化，抑制GSK-3的活性而发挥组织保护作用。其次，氯化锂对星形胶质细胞的生长有抑制作用。

Gilad的研究显示氯化锂通过抑制鸟氨酸脱羧酶来促进体外培养神经元的存活，抑制星形胶质细胞的生长，并促进星形细胞从上皮样细胞转化为突起较多的星形细胞[[94]](#_bookmark111)。结合本实验的结果，推测氯化锂对体内的星形胶质细胞也有一定的抑制作用，从而缩小胶质瘢痕的范围。第三，氯化锂具有抑制炎症的作用，能减轻脊髓损伤后的组织破坏，减少神经元死亡，缩小组织损伤面积。

在脊髓损伤后，大量炎症细胞浸润，大量炎症因子包括TNF-α、IL-1a、IL-1β、IL-1的表达显著升高[[95]](#_bookmark112)，这些炎症因子的细胞毒性能导致神经元和少突胶质细胞凋亡。在脊髓损伤急性期损伤区的巨噬细胞和淋巴细胞分泌产生肿瘤坏死因子

（tumor necrosis factor, TNF-a）等神经毒性因子，导致脱髓鞘和轴突退变[[96]](#_bookmark113)。星形细胞和小胶质细胞可通过GSK-3途径促进合成多种致炎因子（IL-6, TNF）、炎症趋化因子及一氧化氮，抑制抗炎因子IL-10的表达[[97]](#_bookmark114)。IL-6的表达增加，可作用于内源性神经干细胞，导致其分化为反应性星形胶质细胞，并表达CSPG[[98]](#_bookmark115)，抑制轴突的再生[[99]](#_bookmark116)。在本实验中，移植术后4周，移植局部还是有明显的巨噬细胞浸润。与单纯胫神经移植组比较，其他三组脊髓内巨噬细胞浸润范围均缩小，其中NSC+氯化锂处理组的ED1影响面积最小。提示NSC和氯化锂对移植后的

炎症反应有抑制作用。锂是GSK-3的直接抑制剂，通过磷酸化丝氨酸端来抑制

GSK活性来发挥抑制炎症的作用[[100,](#_bookmark117) [101]](#_bookmark118)。同时锂能减少炎症导致的神经毒性作用

[[102]](#_bookmark119)，减轻损伤后缺血导致的神经损伤。此外，研究显示长期应用锂可以使巨噬细胞p105含量减少，抑制脂多糖介导的NF-kappaB激活，诱导巨噬细胞凋亡[[73]](#_bookmark92)。De Meyer的研究发现治疗剂量的氯化锂通过抑制肌醇单磷酸酶，使培养的巨噬细胞凋亡[[72]](#_bookmark91)。此外，锂促进BDNF的表达上调，也可以间接控制GSK活性而发挥抑制炎症的作用[[103]](#_bookmark120)。锂对炎症反应和巨噬细胞的抑制作用，以及锂促进NSC合成分泌BDNF，加上NSC自身有一定的抑制炎症的能力[[74]](#_bookmark93)，二者联合能抑制脊髓损伤后的产生的炎症反应，有利于组织修复和轴突再生。

4氯化锂和NSC对脊髓损伤后轴突再生和运动功能恢复的影响

脊髓损伤后会造成大量的轴突损伤和肢体功能障碍。成年CNS损伤后内在的抑制因素是轴突再生的主要障碍。CNS抑制物包括：轴突导向分子家族成员、髓磷脂相关抑制物、硫酸软骨素蛋白聚糖（CSPG）等[[2,](#_bookmark27) [104]](#_bookmark121)。而促进再生的胞外基质分子，细胞粘附分子，神经营养因子等可以促进轴突的再生和发芽。

本实验中，术后2 周及4 周大鼠下肢运动功能测定显示：TN+Li 组以及

TN+NSC移植组BBB评分均高于单纯胫神经移植组，TN+NSC+Li组的BBB评分在术后2个时间点均高于其他各组。术后4周，其他三组NF200阳性染色面积所反映的再生轴突数量均高于单纯胫神经移植组，其中TN+NSC+Li组的再生轴突数量最多，再生轴突的数量和功能恢复的程度相匹配。说明在脊髓损伤后，移植以胫神经为载体的神经干细胞，或单纯胫神经移植后联合氯化锂治疗，均能不同程度的促进轴突再生，促进损伤大鼠下肢功能的恢复；而联合神经干细胞移植和氯化锂治疗，对轴突再生和功能恢复有更明显的促进作用。研究显示在脊髓损伤后移植神经干细胞可以促进轴突的再生[[105]](#_bookmark122)，联合BDNF治疗对轴突再生的促进作用更明显[[106]](#_bookmark123)。CNS损伤后产生的CSPG能激活GSK-3信号通路，抑制轴突再生[[70]](#_bookmark89)。氯化锂可以通过增加GSK-3磷酸化，抑制GSK-3的功能而促进轴突生长[[107]](#_bookmark124)。因此，在本实验中，氯化锂可以通过抑制GSK-3发挥促进轴突再生的作用，同时通过促进移植的神经干细胞合成分泌BDNF，提高损伤部位局部的

BDNF含量，促进轴突再生。此外，神经干细胞移植和氯化锂治疗减少了宿主自身运动神经元的死亡，抑制损伤后胶质细胞的反应，减少损伤组织反应区的面积

和巨噬细胞的浸润，都有助于再生轴突长入胫神经移植段内，从而促进运动功能的恢复。

## 四 小结

1. 在胸段脊髓右侧半切损伤后移植胫神经或预先移植有神经干细胞的胫神经段，并联合氯化锂治疗。移植的神经干细胞和氯化锂治疗对脊髓损伤大鼠的下肢功能恢复有明显的促进作用，神经干细胞移植联合应用氯化锂对脊髓损伤大鼠下肢功能恢复的促进作用更明显。

2. 移植的胫神经段与宿主脊髓整合良好，移植胫神经内的神经干细胞存活良好；氯化锂能促进移植的神经干细胞发出轴突长入宿主脊髓，促进神经干细胞分化为NF200阳性的神经元。

3. 神经干细胞移植和氯化锂治疗可以减少损伤后脊髓内神经元的死亡，促进移植神经段内的轴突再生，神经干细胞移植联合应用氯化锂对神经元保护和促进轴突再生的作用更明显。

4. 神经干细胞移植和氯化锂治疗可以减轻损伤部位的炎症反应，减少组织损伤，缩小胶质瘢痕的范围。

# 全文总结

本研究以GFP转基因大鼠胚胎脊髓为来源进行神经干细胞的分离、培养和扩增，获得了纯度较高的神经干细胞。通过特异性蛋白Nestin的表达和自我更新能力、多向分化能力等生物学特性的鉴定，证实培养的细胞是神经干细胞。在培养的神经干细胞内添加氯化锂，结果显示1mM浓度的氯化锂对神经干细胞的生长没有毒性作用；1mM的氯化锂对体外培养的神经干细胞的增殖有促进作用，同时可以促进神经干细胞向神经元方向分化，抑制神经干细胞向胶质细胞方向分化。

进一步研究将神经干细胞移植到胫神经内，观察氯化锂对神经干细胞的影响。结果显示移植到胫神经内的神经干细胞可以存活，并向邻近神经轴索间隙扩散。移植后的神经干细胞大部分分化为GFAP阳性的胶质细胞，未观察到神经干细胞分化为NeuN或ChAT阳性的神经元。联合应用氯化锂能减少移植后的神经干细胞向胶质细胞方向的分化，减少轴突的溃变程度，抑制神经干细胞移植后的巨噬细胞浸润。神经干细胞移植和氯化锂治疗能上调移植神经的BDNF表达，两者联合应用对BDNF表达的上调作用更明显。

在胸段脊髓右侧半切损伤后移植胫神经或携带有神经干细胞的胫神经段，并联合氯化锂治疗，移植的神经干细胞和氯化锂治疗对脊髓损伤大鼠的下肢功能恢复有明显的促进作用；移植的胫神经段与宿主脊髓整合良好，移植胫神经内的神经干细胞存活良好，氯化锂促进移植的神经干细胞发出轴突长入宿主脊髓，促进神经干细胞分化为NF200阳性的神经元。神经干细胞移植和氯化锂治疗可以减少损伤后脊髓神经元的死亡，促进移植神经段内的轴突再生，减轻移植部位的炎症反应，减少组织损伤，缩小胶质瘢痕的范围。

本研究结果表明神经干细胞移植联合氯化锂治疗对脊髓损伤的修复和功能恢复具有较好地促进作用，为进一步在脊髓损伤后应用神经干细胞移植联合氯化锂治疗提供理论基础和实验依据。

参考文献

[1] Rosner, J., P. Avalos, F. Acosta, et al. The potential for cellular therapy combined with growth factors in spinal cord injury [J]. Stem Cells Int, 2012, 2012: 1-11.

[2] Lu, P. &M. H. Tuszynski. Growth factors and combinatorial therapies for CNS regeneration [J]. Exp Neurol, 2008, 209(2): 313-320.

[3] Sandner, B., P. Prang, F. J. Rivera, et al. Neural stem cells for spinal cord repair [J]. Cell Tissue Res, 2012, 349(1): 349-362.

[4] Reynolds, B. A. &S. Weiss. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system [J]. Science, 1992, 255(5052): 1707-1710.

[5] Okano, H. Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application [J]. Keio J Med, 2002, 51(3): 115-128.

[6] Okano, H. Stem cell biology of the central nervous system [J]. J Neurosci Res, 2002, 69: 698-707.

[7] Liu, Y. P., H. Seckin, Y. Izci, et al. Neuroprotective effects of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells in transient focal cerebral ischemia in rats [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(4): 780-791.

[8] Clement, A. M., M. D. Nguyen, E. A. Roberts, et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice [J]. Science, 2003, 302(5642): 113-117.

[9] Pluchino, S., A. Quattrini, E. Brambilla, et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis [J]. Nature, 2003, 422(6933): 688-694.

[10] Mothe, A. J. &C. H. Tator. Advances in stem cell therapy for spinal cord injury [J]. J Clin Invest, 2012, 122(11): 3824-3834.

[11] Young, W. Review of lithium effects on brain and blood [J]. Cell Transplant, 2009, 18(9): 951-975.

[12] Zhu, Z. F., Q. G. Wang, B. J. Han, et al. Neuroprotective effect and cognitive outcome of chronic lithium on traumatic brain injury in mice [J]. Brain Res Bull, 2010, 83(5): 272-277.

[13] Bian, Q., T. Shi, D. M. Chuang, et al. Lithium reduces ischemia-induced hippocampal CA1 damage and behavioral deficits in gerbils [J]. Brain Res, 2007, 1184: 270-276.

[14] Su, H., W. Zhang, J. Guo, et al. Lithium enhances the neuronal differentiation of neural progenitor cells in vitro and after transplantation into the avulsed ventral horn of adult rats through the secretion of brain-derived neurotrophic factor [J]. J Neurochem, 2009, 108(6): 1385-1398.

[15] Weiss, S., C. Dunne, J. Hewson, et al. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis [J]. Journal of Neuroscience, 1996, 16(23): 7599-7609.

[16] Hori, J., T. F. Ng, M. Shatos, et al. Neural progenitor cells lack immunogenicity and resist destruction as allografts [J]. Stem Cells, 2003, 21(4): 405-416.

[17] Reynolds, B. A., W. Tetzlaff, S. Weiss. A multipotent EGF-responsive striatal

Embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes [J]. Journal of Neuroscience, 1992, 12(11): 4565-4574.

[18] Kalyani, A., K. Hobson, M. S. Rao. Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: isolation, characterization, and clonal analysis [J]. Dev Biol, 1997, 186(2): 202-223.

[19] Yao, J., Y. Mu, F. H. Gage. Neural stem cells: mechanisms and modeling [J]. Protein Cell, 2012, 3(4): 251-261.

[20] Jiang, X. Y., S. L. Fu, B. M. Nie, et al. Methods for isolating highly-enriched embryonic spinal cord neurons: a comparison between enzymatic and mechanical dissociations [J]. Journal of Neuroscience Methods, 2006, 158(1): 13-18.

[21] Palmer, T. D., J. Ray, F. H. Gage. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain [J]. Mol Cell Neurosci, 1995, 6(5): 474-486.

[22] Su, H., T. H. Chu, W. Wu. Lithium enhances proliferation and neuronal differentiation of neural progenitor cells in vitro and after transplantation into the adult rat spinal cord [J]. Exp Neurol, 2007, 206(2): 296-307.

[23] Eisch, A. J. & C. D. Mandyam. Adult neurogenesis: can analysis of cell cycle proteins move us" Beyond BrdU"[J]. CurrPharmBiotechnol, 2007, 8(3): 147-165.

[24] Mullen, R. J., C. R. Buck, A. M. Smith. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates [J]. Development, 1992, 116(1): 201-211.

[25] Lendahl, U., L. B. Zimmerman, R. D. McKay. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein [J]. Cell, 1990, 60(4): 585-595.

[26] Bazan, E., F. J. Alonso, C. Redondo, et al. In vitro and in vivo characterization of neural stem cells [J]. Histology and Histopathology, 2004, 19(4): 1261-1275.

[27] Lobo, M. V., F. J. Alonso, C. Redondo, et al. Cellular characterization of epidermal growth factor-expanded free-floating neurospheres [J]. J Histochem Cytochem, 2003, 51(1): 89-103.

[28] Sakakibara, S., T. Imai, K. Hamaguchi, et al. Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell [J]. Dev Biol, 1996, 176(2): 230-242.

[29] Venere, M., Y. G. Han, R. Bell, et al. Sox1 marks an activated neural stem/progenitor cell in the hippocampus [J]. Development, 2012, 139(21): 3938-3949.

[30] Panchision, D. M., H. L. Chen, F. Pistollato, et al. Optimized flow cytometric analysis of central nervous system tissue reveals novel functional relationships among cells expressing CD133, CD15, and CD24 [J]. Stem Cells, 2007, 25(6): 1560-1570.

[31] Nussbaum, J., E. Minami, M. A. Laflamme, et al. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response [J]. FASEB J, 2007, 21(7): 1345-1357.

[32] Zhu, W. Z., X. Li, J. P. Qi, et al. Experimental study of cell migration and functional differentiation of transplanted neural stem cells co-labeled with superparamagnetic iron oxide and BrdU in an ischemic rat model [J]. Biomed Environ Sci, 2008, 21(5): 420-424.

[33] Cao, Q. L., Y. P. Zhang, R. M. Howard, et al. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage [J]. Exp Neurol,

2001, 167(1): 48-58.

[34] Sproule, B. Lithium in bipolar disorder: can drug concentrations predict therapeutic effect[J]. ClinPharmacokinet, 2002, 41(9): 639-660.

[35] Jeerage, K. M., T. L. Oreskovic, S. L. Hume. Neurite outgrowth and differentiation of rat cortex progenitor cells are sensitive to lithium chloride at non-cytotoxic exposures [J]. Neurotoxicology, 2012, 33(5): 1170-1179.

[36] Zhu, Z., P. Kremer, I. Tadmori, et al. Lithium suppresses astrogliogenesis by neural stem and progenitor cells by inhibiting STAT3 pathway independently of glycogen synthase kinase 3 beta [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e23341.

[37] Souza Ade, A., G. S. da Silva, B. S. Velez, et al. Glycogen synthesis in brain and astrocytes is inhibited by chronic lithium treatment [J]. Neurosci Lett, 2010, 482(2): 128-132.

[38] Hashimoto, R., V. Senatorov, H. Kanai, et al. Lithium stimulates progenitor proliferation in cultured brain neurons [J]. Neuroscience, 2003, 117(1): 55-61.

[39] Kim, J. S., M. Y. Chang, I. T. Yu, et al. Lithium selectively increases neuronal differentiation of hippocampal neural progenitor cells both in vitro and in vivo [J]. J Neurochem, 2004, 89(2): 324-336.

[40] Gould, T. D. &H. K. Manji. Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs [J]. Neuropsychopharmacology, 2005, 30(7): 1223-1237.

[41] Meijer, L., M. Flajolet, P. Greengard. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3 [J]. Trends Pharmacol Sci, 2004, 25(9): 471-480.

[42] Cui, H., Y. Meng, R. F. Bulleit. Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta activity regulates proliferation of cultured cerebellar granule cells [J]. Brain Res Dev Brain Res, 1998, 111(2): 177-188.

[43] Ohteki, T., M. Parsons, A. Zakarian, et al. Negative regulation of T cell proliferation and interleukin 2 production by the serine threonine kinase GSK-3 [J]. J Exp Med, 2000, 192(1): 99-104.

[44] Klein, P. S. &D. A. Melton. A molecular mechanism for the effect of lithium on development [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(16): 8455-8459.

[45]] Chalecka-Franaszek, E. &D. M. Chuang. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(15): 8745-8750.

[46] Kumar, D. U. &H. Devaraj. Expression of Wnt 3a, beta-catenin, cyclin D1 and PCNA in mouse dentate gyrus subgranular zone (SGZ): a possible role of Wnt pathway in SGZ neural stem cell proliferation [J]. Folia Biol (Praha), 2012, 58(3): 115-120.

[4] 7] Hashimoto, R., N. Takei, K. Shimazu, et al. Lithium induces brain-derived neurotrophic factor and activates TrkB in rodent cortical neurons: an essential step for neuroprotection against glutamate excitotoxicity [J]. Neuropharmacology, 2002, 43(7): 1173-1179.

[48] Rantamaki, T., J. E. Knuuttila, M. E. Hokkanen, et al. The effects of acute and long-term lithium treatments on trkB neurotrophin receptor activation in the mouse hippocampus and anterior cingulate cortex [J]. Neuropharmacology, 2006, 50(4): 421-427.

[49] Jornada, L. K., M. Moretti, S. S. Valvassori, et al. Effects of mood stabilizers on

Hippocampus and amygdala BDNF levels in an animal model of mania induced by ouabain [J]. J Psychiatr Res, 2010, 44(8): 506-510.

[50]] Lu, J., Y. Wu, N. Sousa, et al. SMAD pathway mediation of BDNF and TGF beta 2 regulation of proliferation and differentiation of hippocampal granule neurons [J]. Development, 2005, 132(14): 3231-3242.

[51] Tucker, K. L., M. Meyer, Y. A. Barde. Neurotrophins are required for nerve growth during development [J]. Nat Neurosci, 2001, 4(1): 29-37.

[5] 2] Kornblum, H. I. Introduction to neural stem cells [J]. Stroke, 2007, 38(2 Suppl): 810-816.

[53] Williams, B. P., J. K. Park, J. A. Alberta, et al. A PDGF-regulated immediate early gene response initiates neuronal differentiation in ventricular zone progenitor cells [J]. Neuron, 1997, 18(4): 553-562.

[54] Galli, R., S. F. Pagano, A. Gritti, et al. Regulation of neuronal differentiation in human CNS stem cell progeny by leukemia inhibitory factor [J]. Dev Neurosci, 2000, 22(1-2): 86-95.

[55] Wang, S. H., Y. J. Guo, Y. Yuan, et al. PPARgamma-mediated advanced glycation end products regulate neural stem cell proliferation but not neural differentiation through the BDNF-CREB pathway [J]. Toxicol Lett, 2011, 206(3): 339-346.

[56] Chen, K., R. A. Henry, S. M. Hughes, et al. Creating a neurogenic environment: the role of BDNF and FGF2 [J]. Mol Cell Neurosci, 2007, 36(1): 108-120.

[57] Orre, K., M. Wennstrom, A. Tingstrom. Chronic lithium treatment decreases NG2 cell proliferation in rat dentate hilus, amygdala and corpus callosum [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2009, 33(3): 503-510.

[58] Hermanson, O., K. Jepsen, M. G. Rosenfeld. N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes [J]. Nature, 2002, 419(6910): 934-939.

[59] Cheng, L. N., X. H. Duan, X. M. Zhong, et al. Transplanted neural stem cells promote nerve regeneration in acute peripheral nerve traction injury: assessment using MRI [J]. AJR. American Journal of Roentgenology, 2011, 196(6): 1381-1387.

[60] Heine, W., K. Conant, J. W. Griffin, et al. Transplanted neural stem cells promote axonal regeneration through chronically denervated peripheral nerves [J]. Exp Neurol, 2004, 189(2): 231-240.

[61] Dong, M. M. &T. H. Yi. Stem cell and peripheral nerve injury and repair [J]. Facial Plastic Surgery, 2010, 26(5): 421-427.

[62] Lin, S., Y. Wang, C. Zhang, et al. Modification of the neurotrophin-3 gene promotes cholinergic neuronal differentiation and survival of neural stem cells derived from rat embryonic spinal cord in vitro and in vivo [J]. J Int Med Res, 2012, 40(4): 1449-1458.

[63] Su, H., W. Zhang, X. Yang, et al. Neural progenitor cells generate motoneuron-like cells to form functional connections with target muscles after transplantation into the musculocutaneous nerve [J]. Cell Transplant, 2012, 21(12): 2651-2663.

[64] Gaudet, A. D., P. G. Popovich, M. S. Ramer. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury [J]. J Neuroinflammation, 2011, 8: 110.

[65] Terenghi, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors [J]. Journal of

Anatomy, 1999, 194 ( Pt 1): 1-14.

[66] Sekiguchi, H., M. Ii, K. Jujo, et al. Estradiol promotes neural stem cell differentiation into endothelial lineage and angiogenesis in injured peripheral nerve [J]. Angiogenesis, 2013, 16(1): 45-58.

[67] Rietze, R. L., H. Valcanis, G. F. Brooker, et al. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain [J]. Nature, 2001, 412(6848): 736-739.

[68] Yasuda, S., M. H. Liang, Z. Marinova, et al. The mood stabilizers lithium and valproate selectively activate the promoter IV of brain-derived neurotrophic factor in neurons [J]. Mol Psychiatry, 2009, 14(1): 51-59.

[69] Fukumoto, T., S. Morinobu, Y. Okamoto, et al. Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain [J]. Psychopharmacology (Berl), 2001, 158(1): 100-106.

[70] Dill, J., H. Wang, F. Zhou, et al. Inactivation of glycogen synthase kinase 3 promotes axonal growth and recovery in the CNS [J]. J Neurosci, 2008, 28(36): 8914-8928.

[71] De Sarno, P., R. C. Axtell, C. Raman, et al. Lithium prevents and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Immunol, 2008, 181(1): 338-345.

[72] De Meyer, I., W. Martinet, C. E. Van Hove, et al. Inhibition of inositol monophosphatase by lithium chloride induces selective macrophage apoptosis in atherosclerotic plaques [J]. Br J Pharmacol, 2011, 162(6): 1410-1423.

[73] Zhang, M., W. Jin, X. Zhou, et al. Deregulation of Tpl2 and NF-kappaB signaling and induction of macrophage apoptosis by the anti-depressant drug lithium [J]. Cell Signal, 2009, 21(4): 559-566.

[74] Ben-Hur, T. Immunomodulation by neural stem cells [J]. Journal of the Neurological Sciences, 2008, 265(1-2): 102-104.

[75] Busch, S. A., J. A. Hamilton, K. P. Horn, et al. Multipotent adult progenitor cells prevent macrophage-mediated axonal dieback and promote regrowth after spinal cord injury [J]. J Neurosci, 2011, 31(3): 944-953.

[76] Basso, D. M., M. S. Beattie, J. C. Bresnahan. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1-21.

[77] Hulsebosch, C. E. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury [J]. Adv Physiol Educ, 2002, 26(1-4): 238-255.

[78] Okano, H. Neural stem cells and strategies for the regeneration of the central nervous system [J]. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2010, 86(4): 438-450.

[79] Cote, M. P., A. Hanna, M. A. Lemay, et al. Peripheral nerve grafts after cervical spinal cord injury in adult cats [J]. Exp Neurol, 2010, 225(1): 173-182.

[80] Cote, M. P., A. A. Amin, V. J. Tom, et al. Peripheral nerve grafts support regeneration after spinal cord injury [J]. Neurotherapeutics, 2011, 8(2): 294-303.

[81] Lee, Y. S., S. Zdunowski, V. R. Edgerton, et al. Improvement of gait patterns in step-trained, complete spinal cord-transected rats treated with a peripheral nerve graft and acidic fibroblast growth factor [J]. Exp Neurol, 2010, 224(2): 429-437.

[82] Tom, V. J., H. R. Sandrow-Feinberg, K. Miller, et al. Combining peripheral nerve grafts and chondroitinase promotes functional axonal regeneration in the chronically injured spinal cord [J]. J Neurosci, 2009, 29(47): 14881-14890.

[83] Houle, J. D., A. Amin, M. P. Cote, et al. Combining peripheral nerve grafting and

Matrix modulation to repair the injured rat spinal cord [J]. J Vis Exp, 2009, (33)

[84] David, S. &A. J. Aguayo. Axonal elongation into peripheral nervous system" bridges" after central nervous system injury in adult rats [J]. Science, 1981, 214(4523): 931-933.

[85] Funakoshi, H., J. Frisen, G. Barbany, et al. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve [J]. J Cell Biol, 1993, 123(2): 455-465.

[86] Taniuchi, M., H. B. Clark, J. B. Schweitzer, et al. Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties [J]. J Neurosci, 1988, 8(2): 664-681.

[87] Cummings, B. J., N. Uchida, S. J. Tamaki, et al. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(39): 14069-14074.

[88] Lee, K. B., J. H. Choi, K. Byun, et al. Recovery of CNS pathway innervating the sciatic nerve following transplantation of human neural stem cells in rat spinal cord injury [J]. Cell Mol Neurobiol, 2012, 32(1): 149-157.

[89] Webber, D. J., E. J. Bradbury, S. B. McMahon, et al. Transplanted neural progenitor cells survive and differentiate but achieve limited functional recovery in the lesioned adult rat spinal cord [J]. Regen Med, 2007, 2(6): 929-945.

[90] Bush, A. L. &R. L. Hyson. Lithium increases bcl-2 expression in chick cochlear nucleus and protects against deafferentation-induced cell death [J]. Neuroscience, 2006, 138(4): 1341-1349.

[91] Schuettauf, F., R. Rejdak, S. Thaler, et al. Citicoline and lithium rescue retinal ganglion cells following partial optic nerve crush in the rat [J]. Exp Eye Res, 2006, 83(5): 1128-1134.

[92] Yu, F., Z. Wang, F. Tchantchou, et al. Lithium ameliorates neurodegeneration, suppresses neuroinflammation, and improves behavioral performance in a mouse model of traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2012, 29(2): 362-374.

[93] Hwang, D. H., B. G. Kim, E. J. Kim, et al. Transplantation of human neural stem cells transduced with Olig2 transcription factor improves locomotor recovery and enhances myelination in the white matter of rat spinal cord following contusive injury [J]. BMC Neurosci, 2009, 10: 117.

[94] Gilad, G. M. &V. H. Gilad. Astroglia growth retardation and increased microglia proliferation by lithium and ornithine decarboxylase inhibitor in rat cerebellar cultures: Cytotoxicity by combined lithium and polyamine inhibition [J]. J Neurosci Res, 2007, 85(3): 594-601.

[95] Nakamura, M., R. A. Houghtling, L. MacArthur, et al. Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord [J]. Exp Neurol, 2003, 184(1): 313-325.

[96] Emmetsberger, J. &S. E. Tsirka. Microglial inhibitory factor (MIF/TKP) mitigates secondary damage following spinal cord injury [J]. Neurobiol Dis, 2012, 47(3): 295-309.

[97] Huang, W. C., Y. S. Lin, C. Y. Wang, et al. Glycogen synthase kinase-3 negatively

Regulates anti-inflammatory interleukin-10 for lipopolysaccharide-induced iNOS/NO biosynthesis and RANTES production in microglial cells [J]. Immunology, 2009, 128(1 Suppl): e275-286.

[98] Okano, H., S. Okada, M. Nakamura, et al. Neural stem cells and regeneration of injured spinal cord [J]. Kidney International, 2005, 68(5): 1927-1931.

[99] Morgenstern, D. A., R. A. Asher, J. W. Fawcett. Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response [J]. Prog Brain Res, 2002, 137: 313-332.

[100] Jope, R. S. Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium [J]. Mol Psychiatry, 1999, 4(2): 117-128.

[101] Beurel, E., S. M. Michalek, R. S. Jope. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3) [J]. Trends Immunol, 2010, 31(1): 24-31.

[102] Yuskaitis, C. J. &R. S. Jope. Glycogen synthase kinase-3 regulates microglial migration, inflammation, and inflammation-induced neurotoxicity [J]. Cell Signal, 2009, 21(2): 264-273.

[103] Phiel, C. J. &P. S. Klein. Molecular targets of lithium action [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001, 41: 789-813.

[104] Giger, R. J., E. R. Hollis, 2nd, M. H. Tuszynski. Guidance molecules in axon regeneration [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010, 2(7): a001867.

[105] Lu, P., Y. Wang, L. Graham, et al. Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury [J]. Cell, 2012, 150(6): 1264-1273.

[106] Bonner, J. F., A. Blesch, B. Neuhuber, et al. Promoting directional axon growth from neural progenitors grafted into the injured spinal cord [J]. Journal of Neuroscience Research, 2010, 88(6): 1182-1192.

[107] Wang, Y., Q. Gu, Y. Dong, et al. Inhibition of gecko GSK-3beta promotes elongation of neurites and oligodendrocyte processes but decreases the proliferation of blastemal cells [J]. J Cell Biochem, 2012, 113(6): 1842-1851.

致谢

衷心感谢我的导师林建华教授在我选题、实验设计和撰写论文的整个过程中给予的精心指导和悉心关怀。导师严谨求实的科研作风和精益求精的治学态度永远是我学习的榜样，在此表示衷心的感谢和崇高的敬意！

衷心感谢张文明副主任在本课题的选题和实施等各方面给予的指导和帮助，张主任严谨的科研思路让我受益无穷，其谦逊的胸怀、热情的帮助，我将铭记在心！

感谢福建医科大学附属第一医院中心实验室傅冷西、陈瑞庆、邱立林老师，高血压研究所许昌声等老师在本人实验过程中给予的热情帮助和耐心指导。

感谢吴朝阳、林文平、刘蔚楠、蓝文彬、陈飞等师兄弟们在实验过程中给予我的帮助。

感谢许卫红主任、朱维钦主任、陈宣维副主任、王长昇副主任医师和骨科其他医护人员在临床工作期间给予我的指导和帮助。

感谢我的家人这几年来给予我理解、支持和鼓励！

感谢各位评审专家在百忙之中审阅论文并提出宝贵意见！

# 文献综述

**神经干细胞在脊髓损伤研究中的应用**

脊髓损伤大多源于交通伤、坠落伤、暴力或运动伤等。脊髓损伤的发生率随着各种创伤发生率的增高而日益增多，患者多数为健康的青壮年，损伤后常出现损伤平面以下感觉、运动功能完全丧失和大小便失禁，给个人、家庭、社会带来巨大负担。

脊髓损伤后，脊髓运动神经元、各种中间神经元以及轴突大量死亡，随后炎症细胞进入损伤区域，清除坏死组织，形成空洞；此外，胶质细胞反应性增殖，填补空腔，在损伤区域形成胶质瘢痕。脊髓损伤后的神经元大量丧失，组织损伤修复形成的空洞和胶质瘢痕是治疗脊髓损伤、促进脊髓功能恢复的最棘手问题。

目前脊髓损伤后的修复治疗研究取得了许多进展，其中比较有希望的治疗方法是细胞移植治疗。希望通过细胞移植来增加脊髓神经细胞数量、减少胶质瘢痕和空洞的形成，并使移植的细胞分泌神经营养因子来保护神经元、促进轴突再生。大量动物实验研究表明，在脊髓损伤后移植雪旺细胞、嗅鞘细胞能显著地减少损伤后的空洞形成，并能促进损伤后轴突再生和髓鞘形成，同时脊髓功能也有不同程度的恢复。近年来，随着神经生物学的发展，发现成年哺乳动物脑组织内广泛存在着具有自我复制和多向分化潜能的神经干细胞，能产生新的神经元代替死亡的神经元。因此神经干细胞移植成为治疗脊髓损伤的一个新方向。本文就目前神经干细胞在脊髓损伤研究中的应用做一概述。

一、神经干细胞的生物学特性

1. 神经干细胞的分布和来源

神经干细胞是指存在于中枢神经系统内具有分化为神经元、星形胶质细胞及少突胶质细胞潜能的原始母细胞。神经干细胞属于多能干细胞，最先是Reynolds和Weiss[1]从成年小鼠纹状体中分离成功的。之后，神经干细胞的研究在十几年中取得了许多令人瞩目的成果，迄今为止，在哺乳类动物的胚胎和成年的很多脑区都成功分离出神经干细胞。人们相继从哺乳动物胚胎期大脑皮层、海马、纹状体、嗅球、脑室部位，间脑、中脑、小脑、脊髓、视网膜中分离得到干细胞[2-4]。

在成年动物的大脑皮层、海马、齿状回、室管膜下层、纹状体、脊髓中央管室管膜区和嗅球中也有神经干细胞存在[5-7]。

目前神经干细胞的主要来源有：（1）由胚胎干细胞诱导分化得到神经干细胞。Eglitis等[8]发现，从造血干细胞、骨骼肌干细胞、骨髓间充质干细胞、脂肪干细胞也可分离得到神经外胚层细胞。（2）源于肿瘤组织或转基因永生化的神经干细胞；最常用的方法是通过反转录病毒将编码癌基因蛋白克隆到胚胎神经干细胞中，改变细胞的表型，使部分细胞获得永生化。（3）由胚胎或成年哺乳动物中枢神经系统分离得到神经干细胞。目前已从人胚胎、胎儿和成人脑组织的不同部位分离出神经干细胞[7, 9, 10]。

2. 神经干细胞的生物学特性

2000年Gage[5]概括神经干细胞的特性为：（1）可生成神经组织或来源于神经系统；（2）具有自我更新能力；（3）通过不对称分裂产生除自身以外的其它细胞；（4）具有迁移能力，能到达损伤或疾病的部位并产生新的神经细胞。

神经干细胞可通过两种方式生长：一是对称性分裂，形成两个相同的神经干细胞或两个祖细胞；二是不对称性分裂，由于细胞质中调节分化蛋白不均匀性分配，使得一个子细胞成为祖细胞，并在外界因子刺激下不可逆地向多个细胞系终末期分化，另一个子细胞则保留神经干细胞亲代的特征。在含有表皮生长因子

（epidermal growth factor, EGF）、碱性成纤维生长因子（fibroblast growth factor basic, bFGF）等有丝分裂原的体外培养环境中，更多的神经干细胞通过对称性分裂方式生长，从而得到大量扩增[11]。在体外，神经干细胞在含有EGF和/或bFGF的无血清培养基中能保持不断增殖状态，在传40-50多代后仍保持干细胞的特性。神经干细胞在一定诱导因素的作用下具有分化成星形胶质细胞、少突胶质细胞和神经元的潜能，在不含有EGF和/或bFGF的含血清培养基中可分化为神经元或星形胶质细胞或少突胶质细胞[11]；在维甲酸作用下可向神经元亚型分化[12]。

二、神经干细胞移植治疗脊髓损伤的实验研究

1. 移植时间的选择

移植首先要选择移植的时间，合适的时间选择将会提高神经干细胞的存活率并促进其向神经元分化。脊髓损伤后早期损伤处产生急性炎症反应，大量自由基、兴奋性氨基酸和炎症因子（如IL-6、TNF等）聚集，如此时移植神经干细胞，将

导致移植的神经干细胞死亡或分化为胶质细胞；如在损伤后较长时间移植，损伤区域胶质瘢痕已经形成，神经纤维再生很难通过胶质瘢痕，因此Okano提出移植的最佳时机应该是损伤后1周～2周[13]，此时损伤处急性炎症已经消退，微环境进入修复阶段，有营养因子表达、微血管形成和神经生长，局部微环境有利于神经干细胞的存活。这样既可避开急性损伤期的不利环境，又可及时为组织修复和神经干细胞的再生创造良好的微环境。

2. 神经干细胞的移植途径

1）直接原位移植

在目前进行的实验中，多数学者采用显微移植技术，将体外培养扩增的神经干细胞直接移植入脊髓的损伤部位。这是目前比较常用的移植方法。

2）通过侧脑室注射移植

也有学者将神经干细胞悬液通过立体定向技术注射到侧脑室中。Wu等[14]把从大鼠胚胎（E16）海马中分离出含有神经干细胞的神经球注入第四脑室中，通过脑脊液转运，在损伤脊髓处的软脊膜形成细胞群，并扩散至脊髓、神经根。阮奕文等[15]将神经干细胞注射到脑梗死大鼠侧脑室内，发现移植细胞可以穿过室管膜上皮，并迁移到梗死灶周围。

3）通过静脉移植

许祖远等[16]将标记的神经干细胞通过尾静脉注射移植到大鼠体内，观察到移植的神经干细胞能到达脊髓损伤处，且移植神经干细胞的大鼠有不同程度的功能恢复。Chu等[17]把体外培养的人神经干细胞通过尾静脉移植到大鼠脑缺血模型，发现移植细胞能够通过血液循环和血脑屏障到达损伤病灶处存活、分化，使动物缺血的症状得到一定的改善。但无论是静脉或是侧脑室细胞移植法，都依赖于神经干细胞向病变部位的迁移，所以报道虽认为有效，还没有可靠的、定量的研究证实大多数细胞能最终到达病灶而发挥作用。

3. 移植方式的选择

1）单纯神经干细胞移植

单纯的神经干细胞移植是早期干细胞移植的常用方式。Ogawa等[18]将从大鼠脊髓组织分离的脊髓神经干细胞移植入成年大鼠脊髓损伤模型中，2个月后证实有新生神经元产生，电镜观察发现神经元之间有新的突触建立。Vroemen等[19]

在神经干细胞移植治疗急性脊髓损伤的研究中发现，移植的神经干细胞在宿主体内存活并发生分化，能沿触突通路发生整合，部分改善了运动功能。但是Cao等

[20]的研究发现，从胚胎或成年大鼠大脑来源的神经干细胞，经体外扩增、标记后

移植到成年大鼠重物打击脊髓损伤模型中，移植2个月后大部分移植细胞分化为胶质纤维酸性蛋白（GFAP）阳性的星形胶质细胞，或仍为Nestin阳性的干细胞，未检测到神经元和少突胶质细胞。因此有必要采用更为有效的方法来鉴定移植后的神经干细胞。

2）基因修饰的神经干细胞移植

转基因修饰的雪旺细胞、成纤维细胞、骨髓基质干细胞移植治疗脊髓损伤，均能促进实验动物的轴突再生和肢体运动功能改善。通过转基因技术将表达神经营养因子的基因片段导入神经干细胞，移植基因修饰的神经干细胞治疗脊髓损伤，不仅能替代坏死、凋亡的神经细胞，而且能在损伤的脊髓局部分泌大量神经生长因子，改善局部微环境，促进局部神经通路的重建、新生神经元的生存和增殖。因此，移植携带外源基因的神经干细胞修复脊髓损伤具有广阔的前景。目前常用的转基因修饰有以下几种。

a. 神经营养素-3（neurotrophin-3, NT-3）基因修饰

NT-3是在脊髓中作用最强的神经营养因子，它能促进神经干细胞生存、迁移和分化，并能促进脊髓损伤后皮质脊髓束的生长。Liu Y等[21]将NT-3基因修饰的神经干细胞植入大鼠脊髓，发现移植的细胞NT-3高表达，可分化成神经元和胶质细胞，并可迁移较长的距离。其他研究将NT-3基因修饰的神经干细胞移植到大鼠脊髓损伤部位，发现NT-3基因修饰的细胞移植能防止脊髓损伤后的神经元萎缩，促进神经干细胞向神经元分化[22-25]，并促进受损伤的上行和下行轴突再生[26]。

b. BDNF基因修饰

BDNF的基本功能是促进神经元的存活和突起的再生，对多种感觉神经元、胆碱能神经元、多巴胺能神经元及氨基丁酸能神经元的发育分化与生长再生具有维持和促进作用。文献报道BDNF基因修饰细胞移植治疗脊髓损伤的细胞多为成纤维细胞、雪旺细胞、成肌细胞等，均观察到移植物有较高水平的BDNF分泌，并促进轴突再生和肢体运动功能改善。李巍等[27]用BDNF腺病毒感染神经干细

胞，经传代培养l2代后仍具有干细胞特性。燕景锋等[28]的研究显示移植BDNF基因修饰的神经干细胞能明显促进脊髓损伤后bcl-2的表达，抑制bax的表达，从而降低了神经细胞的凋亡率，促进损伤神经的功能恢复。

c. 神经生长因子（nerve growth factor, NGF）基因修饰

NGF主要对脊髓中感觉、交感神经元起作用，也对前角部分运动神经元有一定作用。将NGF基因修饰的雪旺细胞和成纤维细胞移植到脊髓损伤部位能在体内稳定表达NGF，并促进轴突再生[29-31]. NGF基因修饰的神经干细胞用于脊髓损伤修复的文献报道较少，Carpenter等[32]将人NGF基因导入神经干细胞后植入大鼠脊髓，建立了人NGF修饰的神经干细胞系，检测到了人NGF的分泌。

3）神经干细胞和其他细胞联合移植

除了单纯神经干细胞移植，目前研究也将神经干细胞与其他细胞混合移植来治疗脊髓损伤，以期提高神经干细胞在体内的成活率及促进干细胞向神经元转化。

a. 神经干细胞与嗅鞘细胞（Olfactory ensheathing cells, OECs）联合移植

OECs是起源于嗅球基底膜的一种特殊类型的胶质细胞，伴随嗅束进入中枢神经系统。OECs可分泌大量不同种类的神经营养和支持因子，有效支持脊髓神经元的再生和神经元间突触结构的生成，有利于轴突的再生性修复。尹国栋等[33]将人胚胎OECs与神经干细胞联合移植到大鼠脊髓横断处，发现联合移植组具有更多的成熟神经突触，BBB评分发现大鼠肢体运动功能明显改善。

b. 神经干细胞与雪旺细胞（Schwann Cells, SCs）联合移植

雪旺细胞是周围神经系统的胶质细胞，在周围神经的再生中起重要作用，在脊髓损伤后移植SCs也能明显促进轴突再生和髓鞘形成。Ding等[34]将SCs和神经干细胞联合移植到大鼠脊髓损伤半横断处，结果显示SCs可促进移植的神经干细胞存活、迁移和向神经元样细胞分化。Li等[35]的研究也证实神经干细胞与SCs共培养可促进神经干细胞向神经元方向分化，促进神经干细胞的成熟，更好的改善脊髓损伤后的运动功能障碍。

c. 联合生物材料的神经干细胞移植

脊髓损伤后，脊髓组织坏死形成空洞及瘢痕组织，导致神经通路中断，阻碍了轴突的再生。因此，在损伤的脊髓中植入“支架”（scaffold），同时在支架内填

入神经干细胞，可以桥接损伤平面上下的脊髓组织，促进和引导神经轴突的再生和延伸，重建神经通路。在治疗脊髓损伤中应用的支架材料主要是生物材料，包括天然聚合物、合成生物可降解材料、合成生物非降解聚合物、可降解材料复合物、非降解材料复合物导管等。

目前设计应用的生物材料的主要成分多为多聚水凝胶，这些材料具有良好的组织相容性，能够减轻损伤局部的疤痕形成和减少继发性的神经损伤。Teng等[36]将神经干细胞填入聚乳酸和聚羟基乙酸及聚赖氨酸的共聚物制成的支架，再植入切断的脊髓中，发现移植组的疼痛反射、后肢感觉和运动功能均有部分恢复。

Prang等[37]将以依藻酸盐为载体的成体神经干细胞植入急性颈部损伤的成鼠脊髓，发现移植物能减轻损伤局部的炎症反应，促进脊髓功能的恢复以及神经轴突的再生，并促使神经干细胞向神经元分化。这些研究表明，联合生物材料的神经干细胞移植是治疗脊髓损伤的可行策略。

三、移植治疗脊髓损伤的可能机制

多项研究表明脊髓损伤后采用神经干细胞移植治疗，损伤导致的神经功能缺失症状能得以明显改善。利用神经干细胞修复脊髓损伤的机制有以下几种可能。

1. 补充替代作用神经干细胞具有多分化潜能，能分化为神经元和胶质细胞，补充替代外伤后缺失的神经元和胶质细胞。多项实验研究[18, 19, 21]发现神经干细胞移植人大鼠损伤的脊髓中可观察到外源性神经元产生．且可与大鼠神经系统相整合，并形成新的神经突触。

2. 营养作用神经营养因子是神经系统中重要的调节蛋白，可调节神经元的存活、轴突生长、突触可塑性和神经递质的产生。Lu等[26]的研究显示神经干细胞分化后产生的神经元和胶质细胞可以分泌脑源性神经营养因子、神经生长因子、血管内皮生长因子、肝细胞生长因子和白介素等营养因子，改善脊髓局部微环境并启动再生相关基因的顺序表达，促进损伤后轴突再生。

3. 桥接作用神经干细胞分化为神经元和胶质细胞桥接损伤区域，重新建立传导通路，形成功能性突触。重建神经元回路，并在损伤部位远近两端起连接中断的作用。将神经干细胞移植入损伤的脊髓后不仅可存活、整合入宿主组织中，并能分化出神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞，同时产生多种细胞外基质，填充因损伤造成的空洞[38, 39]；而且分化的神经元能和宿主细胞之间可形成突触样

结构，使损伤区域受损的神经环路部分得以修复[40, 41]。

4. 神经干细胞分化后产生的胶质细胞可以使使残存脱髓鞘的神经纤维和新生的神经纤维形成新的髓鞘，促进神经纤维功能的恢复[42]。

四、移植治疗存在的免疫排斥反应问题

免疫排斥反应是干细胞用于异体移植治疗面临的一个重要问题，神经干细胞用于移植治疗脊髓损伤有较好的应用前景，其原因之一是与其较低的免疫抗原性有关。Reynolds[1]的研究表明神经干细胞不表达成熟细胞抗原，具有低免疫源性，在体内较少甚至不会诱导免疫排斥反应，也未见形成肿瘤，因此适合用于移植治疗。Chu等[17]通过尾静脉将人神经干细胞移植到脑缺血大鼠模型，除损伤病灶外，在动物的肾脏、肺、脾脏内也发现移植的细胞，组织学检查并未发现组织破坏和新生物形成。由此可见神经干细胞具有极低的免疫原性，几乎不引起宿主的排斥反应。

五、展望

目前，随着对神经干细胞研究的不断深入，应用神经干细胞治疗脊髓损伤的研究也取得了迅猛的发展，但仍然有许多问题需要解决：如移植后神经干细胞的分化情况，功能状态及移植后如何迁移；神经干细胞定向分化的诱导信号通路及其相关作用机制；如何进一步提高神经干细胞在体内的存活率并向特定细胞分化，均有待进一步研究。相信随着研究的不断深入，上述问题会得到逐步解决，使脊髓损伤的治疗实现突破。

参考文献

[1]. Reynolds B A, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science, 1992, 255: 1707-1710.

[2]. Kintner C. Neurogenesis in embryos and in adult neural stem cells. J Neurosci, 2002, 22: 639-643.

[3]. Kay J N, Blum M. Differential response of ventral midbrain and striatal progenitor cells to lesions of the nigrostriatal dopaminergic projection. Dev Neurosci, 2000, 22: 56-67.

[4]. Martens D J, Tropepe V, van Der Kooy D. Separate proliferation kinetics of fibroblast growth factor-responsive and epidermal growth factor-responsive neural stem cells within the embryonic forebrain germinal zone. J Neurosci, 2000, 20: 1085-1095.

[5]. Gage F H. Mammalian neural stem cells. Science, 2000, 287: 1433-1438.

[6]. Maslov A Y, Barone T A, Plunkett R J, et al. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. J Neurosci, 2004, 24: 1726-1733.

[7]. Roy N S, Wang S, Jiang L, et al. In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. Nat Med, 2000, 6: 271-277.

[8]. Eglitis M A, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94: 4080-4085.

[9]. Kim H T, Kim I S, Lee I S, et al. Human neurospheres derived from the fetal central nervous system are regionally and temporally specified but are not committed. Exp Neurol, 2006, 199: 222-235.

[10]. Liu X, Zhu Y, Gao W. Isolation of neural stem cells from the spinal cords of low temperature preserved abortuses. J Neurosci Methods, 2006, 157: 64-70.

[11]. Kornblum H I. Introduction to neural stem cells. Stroke, 2007, 38: 810-816.

[12]. Daadi M M. In vitro assays for neural stem cell differentiation. Methods Mol Biol, 2002, 198: 149-155.

[13]. Okano H, Ogawa Y, Nakamura M, et al. Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury. Semin Cell Dev Biol., 2003, 14: 191-198.

[14]. Wu S, Suzuki Y, Noda T, et al. Immunohistochemical and electron microscopic study of invasion and differentiation in spinal cord lesion of neural stem cells grafted through cerebrospinal fluid in rat. J Neurosci Res, 2002, 69: 940-945.

[15]. 阮奕文, 袁群芳, 王传恩, 等. NGF/GDNF基因修饰神经干细胞移植对AD模型鼠前脑胆碱能神经元的保护作用. 解剖学报, 2002, 33: 126-130.

[16]. 许祖远, 方煌, 罗永湘. 神经干细胞静脉移植治疗脊髓损伤的实验研究. 中国矫形外科杂志, 2007, 15: 459-462.

[17]. Chu K, Kim M, Jeong S W, et al. Human neural stem cells can migrate, differentiate, and integrate after intravenous transplantation in adult rats with transient forebrain ischemia. Neurosci Lett, 2003, 343: 129-133.

[18]. 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.

[19]. Vroemen M, Aigner L, Winkler J, et al. Adult neural progenitor cell grafts survive after acute spinal cord injury and integrate along axonal pathways. Eur J Neurosci, 2003, 18: 743-751.

[20]. Cao Q, Benton R L, Whittemore S R. Stem cell repair of central nervous system injury. J Neurosci Res, 2002, 68: 501-510.

[21]. Liu Y, Himes B T, Solowska J, et al. Intraspinal delivery of neurotrophin-3 using neural stem cells genetically modified by recombinant retrovirus. Exp Neurol, 1999, 158: 9-26.

[22]. Blesch A, Lu P, Tuszynski M H. Neurotrophic factors, gene therapy, and neural stem cells for spinal cord repair. Brain Res Bull, 2002, 57: 833-838.

[23]. Himes B T, Liu Y, Solowska J M, et al. Transplants of cells genetically modified to express neurotrophin-3 rescue axotomized Clarke's nucleus neurons after spinal cord hemisection in adult rats. J Neurosci Res, 2001, 65: 549-564.

[24]. Vicario-Abejon C, Collin C, Tsoulfas P, et al. Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons. Eur J Neurosci, 2000, 12: 677-688.

[25]. Grill R, Murai K, Blesch A, et al. Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury. J Neurosci, 1997, 17: 5560-5572.

[26]. Lu P, Jones L L, Snyder E Y, et al. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. Exp Neurol, 2003, 181: 115-129.

[27]. 李巍, 蔡文琴, 姚忠祥. 大鼠基因工程化神经干细胞的建立. 四川解剖学杂志, 2001, 9: 32-33.

[28]. 燕景锋, 岳长波. BDNF基因修饰神经干细胞移植治疗脊髓损伤的实验研究. 中国临床神经外科杂志, 2006, 11: 547-550.

[29]. Grill R J, Blesch A, Tuszynski M H. Robust growth of chronically injured spinal cord axons induced by grafts of genetically modified NGF-secreting cells. Exp Neurol, 1997, 148: 444-452.

[30]. Nakahara Y, Gage F H, Tuszynski M H. Grafts of fibroblasts genetically modified to secrete NGF, BDNF, NT-3, or basic FGF elicit differential responses in the adult spinal cord. Cell Transplant, 1996, 5: 191-204.

[31]. Tuszynski M H, Gabriel K, Gage F H, et al. Nerve growth factor delivery by gene transfer induces differential outgrowth of sensory, motor, and noradrenergic neurites after adult spinal cord injury. Exp Neurol, 1996, 137: 157-173.

[32]. Carpenter M K, Winkler C, Fricker R, et al. Generation and transplantation of EGF-responsive neural stem cells derived from GFAP-hNGF transgenic mice. Exp Neurol, 1997, 148: 187-204.

[33]. 尹国栋, 汤逊, 林月秋, 等. 人胚胎嗅鞘细胞与神经干细胞联合移植修复大鼠脊髓全横断损伤的研究. 中国康复医学杂志, 2006, 21: 680-682.

[34]. 丁英, 曾园ft, 吴立志, 等. 施万细胞对植入大鼠脊髓损伤区内的神经干细胞存活和分化的影响. 解剖学报, 2003, 34: 589-593.

[35]. Li J, Sun C R, Zhang H, et al. Induction of functional recovery by co-transplantation of neural stem cells and Schwann cells in a rat spinal cord contusion injury model.

Biomed Environ Sci, 2007, 20: 242-249.

[36]. Teng Y D, Lavik E B, Qu X, et al. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99: 3024-3029.

[37]. Prang P, Muller R, Eljaouhari A, et al. The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels. Biomaterials, 2006, 27: 3560-3569.

[38]. Lundberg C, Martinez-Serrano A, Cattaneo E, et al. Survival, integration, and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum. Exp Neurol, 1997, 145: 342-360.

[39]. Nishida A, Takahashi M, Tanihara H, et al. Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41: 4268-4274.

[40]. Englund U, Fricker-Gates R A, Lundberg C, et al. Transplantation of human neural progenitor cells into the neonatal rat brain: extensive migration and differentiation with long-distance axonal projections. Exp Neurol, 2002, 173: 1-21.

[41]. Horiguchi S, Takahashi J, Kishi Y, et al. Neural precursor cells derived from human embryonic brain retain regional specificity. J Neurosci Res, 2004, 75: 817-824.

[42]. Pluchino S, Zanotti L, Deleidi M, et al. Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders. Brain Res Brain Res Rev, 2005, 48: 211-219.

[**带神经干细胞的周围神经移植联合氯化锂治疗大鼠脊髓损伤的研究**](http://d.wanfangdata.com.cn/Thesis_D438133.aspx)****

作者：[张立群](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?q=Creator%3a%22%e5%bc%a0%e7%ab%8b%e7%be%a4%22%2BDBID%3aWF_XW)

学位授予单位：[福建医科大学](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?q=School%3a%22%e7%a6%8f%e5%bb%ba%e5%8c%bb%e7%a7%91%e5%a4%a7%e5%ad%a6%22%2BDBID%3aWF_XW)

引用本文格式：[张立群](http://s.wanfangdata.com.cn/Paper.aspx?q=Creator%3a%22%e5%bc%a0%e7%ab%8b%e7%be%a4%22%2BDBID%3aWF_XW)[带神经干细胞的周围神经移植联合氯化锂治疗大鼠脊髓损伤的研究](http://d.wanfangdata.com.cn/Thesis_D438133.aspx)[学位论文]博士2013