

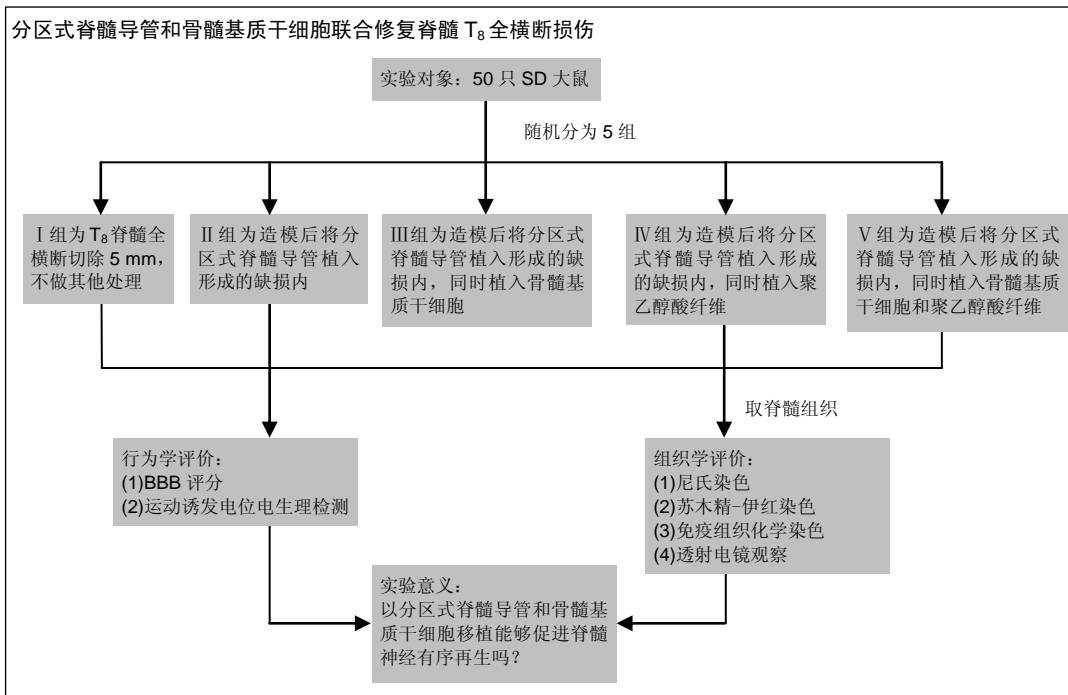
分区式脊髓导管联合骨髓基质干细胞修复脊髓横断损伤模型大鼠

赵锡武, 刘鑫, 于大鹏, 荣辉, 于兴胜, 杨长生, 刘通, 赵廷宝(解放军济南军区总医院脊髓修复科, 山东省济南市 250031)

引用本文: 赵锡武, 刘鑫, 于大鹏, 荣辉, 于兴胜, 杨长生, 刘通, 赵廷宝. 分区式脊髓导管联合骨髓基质干细胞修复脊髓横断损伤模型大鼠[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(1):42-48.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.01.008 ORCID: 0000-0002-6325-8581(赵锡武)

文章快速阅读:



赵锡武, 男, 1984 年生, 河南省台前县人, 汉族, 2010 年山东大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事脊柱外科、创伤骨科方面的研究。

通讯作者: 赵廷宝, 博士后, 主任医师, 教授, 博士生导师, 解放军济南军区总医院脊髓修复科, 山东省济南市 250031

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2016)01-00042-07

稿件接受: 2015-11-20

http://www.crter.org

文题释义:

分区式脊髓导管: 以壳聚糖作为主要原料制备分区式脊髓导管, 导管的管型和脊髓的解剖学结构相吻合, 与灰质白质分区、主要下行纤维束-红核脊髓束、皮质脊髓束分区相区配, 以促进再生神经纤维有序生长。

骨髓基质干细胞移植促神经修复: 骨髓基质干细胞移植后可以补充缺失的神经细胞, 促进再神经化, 并且成为上下神经元信号传递的中转站, 抑制瘢痕组织和胶质细胞的过度增生, 移植细胞可以通过自身分泌以及促进周围神经细胞分泌提供多种神经营养因子, 以促进神经损伤的修复。

摘要

背景: 脊髓损伤致残率高, 治疗上仅限于早期手术干预、药物治疗和后期功能锻炼等手段, 运动功能稍有改善, 但目前尚无有效治愈办法。

目的: 探讨分区式脊髓导管和骨髓基质干细胞联合对大鼠 T₈ 脊髓全横断损伤模型的修复效果。

方法: 根据数字表法将 50 只大鼠随机分为 5 组, 每组 10 只, I 组为 T₈ 脊髓全横断切除 5 mm, 不做其他处理; II 组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内; III 组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内, 同时植入骨髓基质干细胞; IV 组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内, 同时植入聚乙醇酸纤维; V 组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内, 同时植入骨髓基质干细胞和聚乙醇酸纤维。

结果与结论: ①术后 2 周和 12 周 III 组和 V 组的 BBB 评分明显高于 I 组、II 组和 IV 组, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。②术后 12 周 V 组损伤平面以下运动诱发电位的潜伏期明显少于 I 组、II 组、III 组和 IV 组, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。③免疫组化显示 III 组和 V 组在导管中间能找到染色阳性的再生神经纤维并生长有序, 无明显缠绕成团的现象。④透射电镜显示桥接各组都有一定数量的有髓神经纤维。⑤结果表明分区式壳聚糖脊髓导管联合骨髓基质干细胞植入可以较好的连接脊髓损伤缺损, 恢复一部分电生理特性, 加快轴突再生, 恢复运动功能, 为脊髓损伤的治疗提供了一个新的方向。

关键词:

干细胞; 移植; 分区式脊髓导管; 骨髓基质干细胞; 脊髓损伤; 运动诱发电位; 修复

主题词:

骨髓; 间质干细胞移植; 脊髓损伤; 诱发电位; 运动; 组织工程

Zhao Xi-wu, Liu Xin, Yu Da-peng, Rong Hui, Yu Xing-sheng, Yang Chang-sheng, Liu Tong, Zhao Ting-bao (Department of Spinal Cord Injury, General Hospital of Jinan Military Area Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China)

Zhao Xi-wu, Master,
Attending physician,
Department of Spinal Cord
Injury, General Hospital of
Jinan Military Area Command
of Chinese PLA, Jinan
250031, Shandong Province,
China

Corresponding author: Zhao
Ting-bao, M.D., Chief
physician, Professor,
Doctoral supervisor,
Department of Spinal Cord
Injury, General Hospital of
Jinan Military Area Command
of Chinese PLA, Jinan
250031, Shandong Province,
China

Subject headings: Bone
Marrow; Mesenchymal Stem
Cell Transplantation; Spinal
Cord Injuries; Evoked
Potentials, Motor; Tissue
Engineering

Partition-type spinal cord catheter combined with bone marrow stromal stem cells in the repair of spinal cord transection injury in rats

Abstract

BACKGROUND: There is a high morbidity after spinal cord injury, and the therapeutic strategy is limited to early surgical intervention, medication and post-treatment exercise that only can improve the motor function slightly. However, there is no effective cure method.

OBJECTIVE: To study the effect of partition-type spinal cord catheter combined with bone marrow stromal stem cells on T₈ spinal cord transection damage in rats.

METHODS: Fifty rats were randomized into five groups ($n=10$ per group): group I, T₈ spinal cord transection (5 mm) was made in rats with no treatment; group II, the partition-type tube was inserted into the injured site after modeling; group III, partition-type tube combined with bone marrow stromal stem cells was implanted into the injured site after modeling; group IV, partition-type tube combined with polyglycolic acid fibers was implanted into the injured site after modeling; group V, partition-type tube combined with bone marrow stromal stem cells and polyglycolic acid fibers was implanted into the injured site after modeling.

RESULTS AND CONCLUSION: At 2 and 12 weeks postoperatively, Basso, Beattie and Bresnahan scores were significantly higher in the groups III and IV than the groups I, II, IV ($P < 0.05$). At 12 weeks postoperatively, the latency of motor evoked potential below the injury plane was significantly decreased in group V compared with groups I, II, III, IV ($P < 0.05$). Immunohistochemical results displayed that in the groups III and V, regenerated nerve fibers grew positively and arranged orderly among the tubes, and there was no obvious winding phenomenon. Under transmission electron microscopy, a certain number of myelinated nerve fibers were found as bridges among groups. These findings indicate that the partition-type chitosan tube combined with bone marrow stromal stem cells has a good connection with the injured spinal cord a good connection to restore part of electrophysiological properties, accelerate the axon regeneration, recover the motor function, thereby providing a new direction for the treatment of spinal cord injury.

Cite this article: Zhao XW, Liu X, Yu DP, Rong H, Yu XS, Yang CS, Liu T, Zhao TB. Partition-type spinal cord catheter combined with bone marrow stromal stem cells in the repair of spinal cord transection injury in rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(1):42-48.

0 引言 Introduction

脊髓损伤的修复与再生属于世界性的医学难题, 目前临床上对脊髓损伤的治疗仅仅还在早期药物、手术及预后治疗上, 希望尽可能最大程度减轻瘫痪的程度^[1]。脊髓损伤导致的神经功能障碍由原发性脊髓损伤和继发性脊髓损伤引起, 原发性脊髓损伤导致的脊髓神经细胞死亡难以逆转, 只能采取有效的手段治疗继发性脊髓损伤功能的恢复, 从而改善患者的预后和提高生活质量^[2-4]。组织工程和再生医学的不断发展与进步, 给脊髓损伤的研究和治疗奠定了坚实的理论基础。虽然支架材料可以被制成各种形状, 但对于脊髓的结构来说, 这些孔或导管不能和脊髓的灰、白质组织学结构相吻合, 因此无法和白质中的上下行纤维束相对应^[5]。当采用这些支架材料进行修复时, 即使白质内分区分布的上下行纤维能够再生, 也不能向对应的区域延伸, 而是错位或无顺序生长, 这样导致上下行再生纤维相互缠绕, 造成其他纤维无法继续延伸或神经元无法生长, 进而影响修复效果^[6]。以往国内外的相关报道中, 仅发现有极少数的再生纤维通过, 却未见到脊髓灰质和白质的分区结构, 也没有发现再生组织的上下行纤维能有规律的排列, 所以并没有实现真正意义上的重建^[7]。下行传导束中影响运动的神经通路主要为皮质脊髓束和红核脊髓束两大类, 使用的人工支架必须要与脊髓灰质、白质以及白质下行纤维束相吻合, 这样才能解决根本问题^[8]。实验将分区式组织工程脊髓导管和骨髓基质干细胞进行联合, 再配合适量的聚乙醇酸纤维, 桥接到成年大鼠急性T₈脊髓完全横

断损伤模型中, 探讨此种方法治疗脊髓损伤的可能性。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2013年5月至2014年5月在解放军济南军区总医院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 4周龄雌性SD大鼠20只, 体质量180-200 g, 用于骨髓基质干细胞培养; 清洁级成年健康雌性SD大鼠50只, 体质量200-220 g, 均由解放军济南军区总医院实验动物中心提供。

1.3.2 试剂和仪器 壳聚糖、小鼠抗神经微丝蛋白单克隆抗体(Sigma公司), 生物素标记葡聚糖胺试剂盒(Molecular Probes公司), 乳酸盐林格溶液、IMEM培养基、胎牛血清、CD11b-PE抗体、CD45-TRITC抗体、CD90-FITC抗体(无锡华裕制药有限公司), 8-0缝合线(上海浦东金环医疗用品有限公司), MYTO肌电图仪、配数码相机Leica QWin图像分析系统(意大利ESAOTE公司), JEM-1230透射电子显微镜(JEOL公司)。

1.3.3 溶液配制 ①复合麻醉剂: 4.25 g水合氯醛, 2.12 g硫酸镁, 0.886 g戊巴比妥钠, 14.25 g无水乙醇, 33.80 g丙二醇, 双氧水配制至100 mL, 放入37 °C的温箱中, 待溶液澄清后可用。②磷酸盐缓冲液: 将Na₂HPO₄·12H₂O 71.64 g放入适量双氧水中加热溶解, 制成1 000 mL溶液A; 将NaH₂PO₄·2H₂O 31.20 g放入适量双氧水加热溶解, 制

成1 000 mL溶液B。溶液A与溶液B按81:19的比例混合, 得到0.2 mol/L的磷酸盐缓冲液, 将溶液调制到pH值在7.2-7.4间以备使用。③40 g/L多聚甲醛固定液: 将40 g多聚甲醛放入适量的0.1 mol磷酸盐缓冲液中加热溶解, 配制成1 000 mL溶液, 将溶液调制到pH值在7.2-7.4间得到40 g/L多聚甲醛固定液。固定液要即用即配, 如果要做成冰冻切片, 需要添加50 g蔗糖。④苏木精-伊红染色液: 2 g苏木精, 纯乙醇、甘油、双氧水各100 mL, 10 mL冰醋酸, 15 g钾明矾制成苏木精液, 在日光下暴露8周, 过滤备用。用1 g伊红, 75 mL双氧水, 体积分数为95%乙醇25 mL, 1滴或2滴冰醋酸共同制成伊红染色液, 过滤备用。

1.4 实验方法

1.4.1 壳聚糖导管制备 分区式组织工程脊髓导管由壳聚糖构成, 5 mm长、2.4 mm外横径(图1), 可以内置6根聚乙醇酸纤维, 进行⁶⁰Co照射消毒, 在实验开始前用无菌生理盐水浸泡1 h。

1.4.2 骨髓基质干细胞悬液的制备 将20只4周龄SD雌性大鼠用3.6%的水合氯醛(1 mL/kg)进行腹腔注射麻醉, 双下肢用碘酊和体积分数为75%乙醇消毒。无菌条件下取双侧下肢骨放入无菌容器中, 快速送入1:1 000级无菌层流干细胞培养室。采用密度梯度离心法获取骨髓基质干细胞, 将获取的细胞加2倍量PBS, 以1 000 r/min的速度离心5 min, 弃掉上清液, 以 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于50 mL培养瓶中, 加入完全培养基50 mL(含体积分数为10%胎牛血清); 原代培养48 h后全部换液, 去除悬浮细胞; 培养7 d后如果发现成片典型形态的细胞达到80%-90%融合, 即可消化传代。

传代2次后消化成单细胞悬液, 置于37 °C、体积分数为5% CO₂恒温培养箱中备用。

1.4.3 实验动物分组 根据数字表法将50只大鼠随机分为5组, 每组10只, I组为脊髓全横断切除5 mm, 不做其他处理; II组为脊髓全横断切除5 mm后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内; III组为脊髓全横断切除5 mm后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内, 同时植入骨髓基质干细胞; IV组为脊髓全横断切除5 mm后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内, 同时植入聚乙醇酸纤维; V组为脊髓全横断切除5 mm后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内, 同时植入骨髓基质干细胞和聚乙醇酸纤维。

1.4.4 动物模型制作和干预 给予腹腔注射复合麻醉剂麻醉SD大鼠, 俯卧位, 进行常规消毒后逐层切开正中切口; 咬除T₇₋₉棘突及相应椎板, 将T₇₋₉节段脊髓暴露出来, 将硬脊膜切开, 从T₈段脊髓向远端切除5 mm; 脊髓缺损处植入壳聚糖导管, 导管和脊髓两侧残端紧密吻合, 导管内注入骨髓基质干细胞悬液(细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$) 10 μL, 然后对切口进行逐层缝合。手术结束后将乳酸盐林格溶液10 mL皮下注射到腹股沟, 每天肌注 $10 \times 10^4 \text{ U/kg}$ 青霉素, 持续1周, 此外每天按摩膀胱四五次, 有助于排尿。

1.4.5 BBB评分 术后2, 12周采用BBB评分评估各组脊髓损伤大鼠的运动能力, 共20个级别(最低为0分, 最高为20分), 级别越高, 表示运动能力恢复越好。

1.4.6 电生理检查 术后12周各组随机抽取5只大鼠用MYTO肌电图仪进行运动诱发电位(MEP)电生理检测, 将刺激电极分别放到大脑皮质或损伤下段皮下, 记录电极放

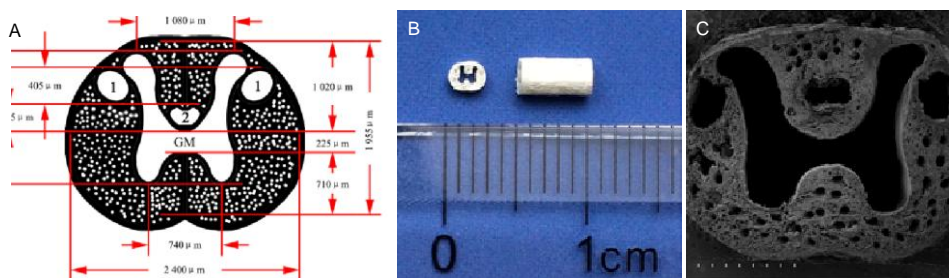


图1 分区式脊髓导管

Figure 1 Partition-type spinal cord catheter

图注: 图中A为横断面图; B为实物图; C为扫描电镜图。

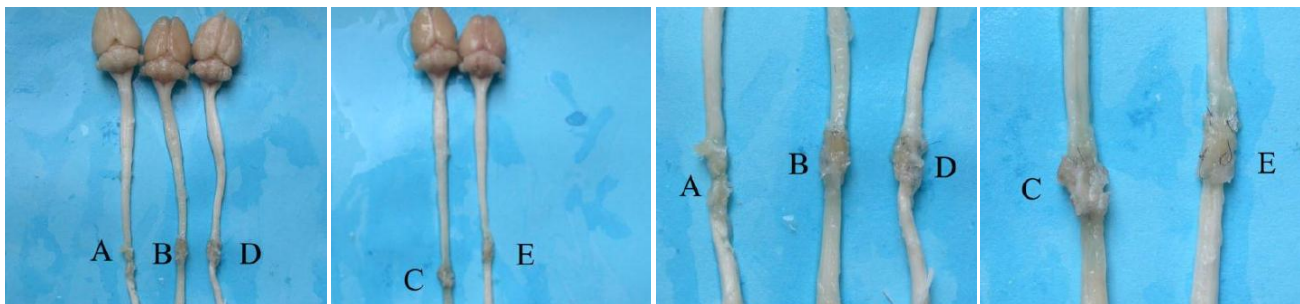


图2 各组术后12周损伤脊髓外观

Figure 2 The appearance of the injured spinal cord at 12 weeks after operation

图注: 图A为I组(模型组), B为II组(造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内), C为III组(造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内, 同时植入骨髓基质干细胞), D为IV组(造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内, 同时植入聚乙醇酸纤维), E为V组(造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内, 同时植入骨髓基质干细胞和聚乙醇酸纤维)。

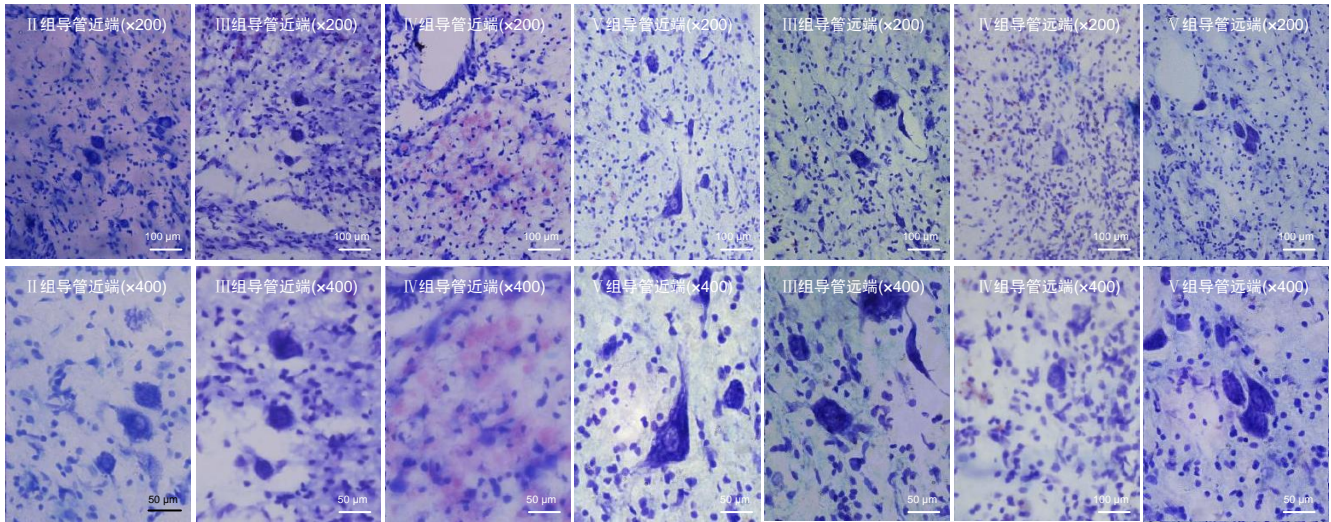


图3 术后12周各组大鼠脊髓组织尼氏染色

Figure 3 Nissl's staining of the rat spinal cord at 12 weeks after operation

图注: II组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内; III组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内,同时植入骨髓基质干细胞; IV组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内,同时植入聚乙醇酸纤维; V组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内,同时植入骨髓基质干细胞和聚乙醇酸纤维。

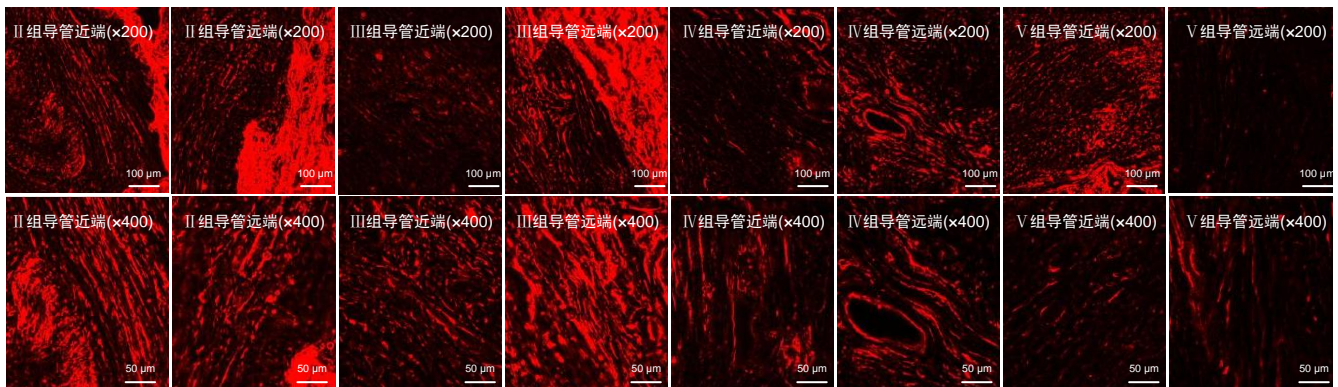


图4 术后12周各组大鼠脊髓组织NF免疫组织化学染色

Figure 4 Nuclear factor immunohistochemical staining of the rat spinal cord at 12 weeks after operation

图注: II组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内; III组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内,同时植入骨髓基质干细胞; IV组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内,同时植入聚乙醇酸纤维; V组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内,同时植入骨髓基质干细胞和聚乙醇酸纤维。

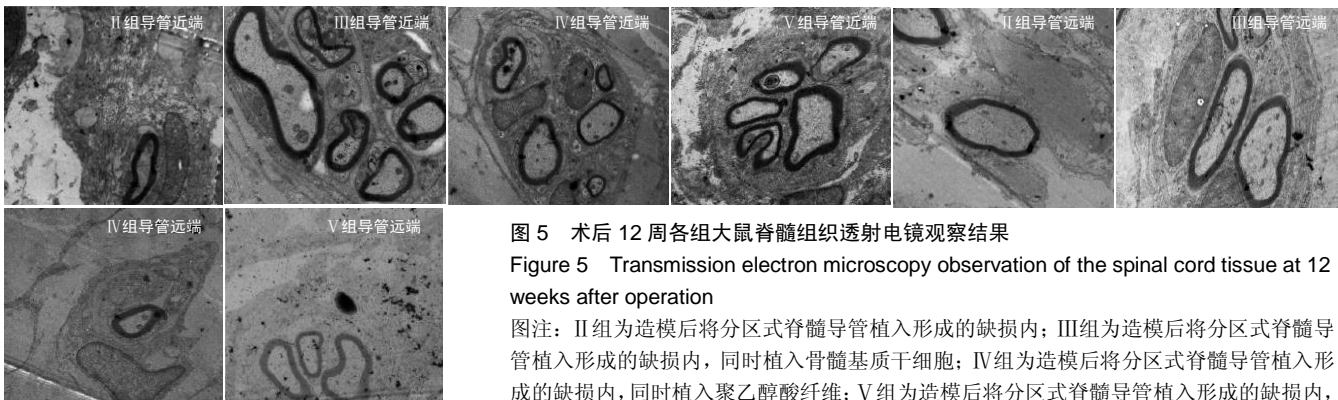


图5 术后12周各组大鼠脊髓组织透射电镜观察结果

Figure 5 Transmission electron microscopy observation of the spinal cord tissue at 12 weeks after operation

图注: II组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内; III组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内,同时植入骨髓基质干细胞; IV组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内,同时植入聚乙醇酸纤维; V组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内,同时植入骨髓基质干细胞和聚乙醇酸纤维。

到腓肠肌表面, 进行刺激并记录点位, 扑捉电位潜伏期和振幅, 1个部分重复3次。

1.4.7 光镜标本制作 术后12周, 各组随机抽取2只大鼠进行腹腔麻醉, 40 g/L多聚甲醛灌注固定后取出脊髓组织, 固定24 h, 然后依次转入10%, 20%, 30%蔗糖溶液, 组织下沉后取T₇-T₁₁脊髓节段进行冰冻切片。

1.4.8 尼氏染色 冰冻切片放入氯仿中作用1 min, 纯乙醇、体积分数为95%乙醇和体积分数为70%乙醇各1 min, ddH₂O洗涤片刻; 置入焦油紫中进行染色, 然后ddH₂O洗涤直到切片周围基本无色为止。用体积分数为95%乙醇进行分色, 无水乙醇脱水, 二甲苯透明处理, 中性树脂胶封固后晾干待观察。

1.4.9 苏木精-伊红染色 将标本放入苏木精液中2 min, 然后用自来水冲洗30 s, 放入酸性分化液中20 s, 再用自来水进行蓝化20 s。放入稀氨水中30 s、蒸馏水中20 s、体积分数为70%乙醇和体积分数为80%乙醇各3 min, 最后放入伊红乙醇液中30 s, 常规脱水透明。

1.4.10 免疫组织化学染色 各组均随机抽取10张切片, 用0.01 mol/L的PBS洗片3次, 10 min/次; 在室温下用封闭液封闭1 h后吸弃, 然后用滤纸吸干载玻片。滴加一抗[小鼠来源的NF-200抗体(1:800)], 放入湿盒中, 4℃孵育过夜; 用相同浓度的PBS洗片3次, 10 min/次。滴加二抗[TRITC标记的山羊抗小鼠IgG(1:256)], 放入湿盒中, 在37℃下避光孵育2 h; 用相同浓度的PBS洗片3次, 10 min/次。用荧光封固液进行封固, 然后荧光显微镜下观察。空白对照组不加一抗, 进行甘油封固。

1.4.11 透射电镜观察 术后12周, 各组随机抽取1只大鼠取再生组织制作电镜标本, 进行戊二醛、1%锇酸的双重固定, 乙醇梯度脱水, 进行包埋、切片和复染, 放于透射电子显微镜下观察。

1.5 主要观察指标 ①各组大鼠术后2周和12周的BBB评分。②各组大鼠术后12周运动诱发电位潜伏期和振幅。③各组大鼠术后12周脊髓组织大体、光镜、免疫组化及透射电镜观察结果。

1.6 统计学分析 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用SPSS 17.0统计学软件进行单因素方差分析, 如果有显著性意义, 则进一步用最小有意义差异法进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 各组大鼠大体观察结果 所有大鼠在手术后2 h恢复清醒状态, 双下肢截瘫, 要依靠上肢的拖动来帮助身体移动。术后1周内活动少, 表现烦躁, 对外界刺激敏感, 饮食少, 发生尿滞留, 需要通过人工按摩下腹膀胱部来帮助排尿, 一部分大鼠出现血尿。所有大鼠1个月后逐步恢复自主排尿功能, 饮食和活动均有所增加。所有大鼠切口均良好愈合, 无感染发生, 缝线在1周内自行脱落。虽然每天按摩

15 min帮助后肢运动, 但肌肉仍不同程度的萎缩, 大鼠脊柱也有程度不同的弯曲和变形。

2.2 各组大鼠BBB评分差异 手术后24 h大鼠下肢均无运动, 表示脊髓完全损伤, BBB评分均为0分。1周后BBB评分开始回升。5组大鼠在术后12周进入稳定时期, I组、II组、IV组术后12周的BBB评分基本保持在8分左右, 大鼠后肢的3个关节能广泛活动, 在没有负重情况下脚掌能着地。III组和V组在术后的第2周开始, 活动功能恢复较好, 12周在负重条件下脚掌能够平稳着地或脚背站立, 脚掌不能站立, BBB评分均在9分以上。III组和V组大鼠术后2周和12周的BBB评分明显高于其他各组, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 而I组、II组和IV组大鼠术后2周和12周的BBB评分差异无显著性意义($P > 0.05$); III组和V组大鼠术后2周和12周的BBB评分差异也无显著性意义($P > 0.05$), 见表1。

表1 各组大鼠术后BBB评分差异 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$, 分)

Table 1 Postoperative Basso, Beattie and Bresnahan scores of rats in different groups

组别	术后2周	术后12周
I组	2.12±0.53	7.89±1.97
II组	2.35±0.59	8.22±2.06
III组	4.86±1.22 ^{abc}	9.23±2.31 ^{abc}
IV组	2.46±0.62	8.39±2.12
V组	4.52±1.13 ^{abc}	9.17±2.29 ^{abc}

表注: 与I组比较, ^a $P < 0.05$; 与II组比较, ^b $P < 0.05$; 与IV组比较, ^c $P < 0.05$ 。I组为模型组; II组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内; III组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内, 同时植入骨髓基质干细胞; IV组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内, 同时植入聚乙醇酸纤维; V组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内, 同时植入骨髓基质干细胞和聚乙醇酸纤维。

2.3 各组大鼠术后运动诱发电位潜伏期和振幅的差异 在损伤平面以下刺激时均不能记录到运动诱发电位; V组潜伏期明显短于其余4组, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 其余4组之间潜伏期相差不大($P > 0.05$); I-V组损伤下段运动诱发电位振幅无明显差异($P > 0.05$), 见表2。

表2 各组大鼠术后运动诱发电位潜伏期和振幅的差异 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 2 Latency and amplitude of motor evoked potential of rats in different groups after operation

组别	损伤下段运动诱发电位潜伏期(ms)	损伤下段运动诱发电位振幅(μV)
I组	3.49±0.87	87.29±21.82
II组	3.62±0.91	66.85±16.71
III组	3.87±0.97	64.32±16.08
IV组	3.78±0.95	92.31±23.08
V组	2.85±0.71 ^{abcd}	82.56±20.64

表注: 与I组比较, ^a $P < 0.05$; 与II组比较, ^b $P < 0.05$; 与III组比较, ^c $P < 0.05$; 与IV组比较, ^d $P < 0.05$ 。I组为模型组; II组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内; III组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内, 同时植入骨髓基质干细胞; IV组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内, 同时植入聚乙醇酸纤维; V组为造模后将分区式脊髓导管植入形成的缺损内, 同时植入骨髓基质干细胞和聚乙醇酸纤维。

2.4 损伤脊髓大体观察结果 I组大鼠脊髓两断端不连续, 残端萎缩明显, 呈暗黄色, 两断端距离在5 mm以上, 透明、柔韧组织将萎缩的两残端包裹, 有可能为残留的硬脊膜。术后12周大体观察II组-V组大鼠脊髓导管与脊髓两残端有不同程度的连续性, 导管部分出现不同程度的塌陷, 导管周围包裹不透明、增生的结缔组织。II组和IV组大鼠的脊髓两残端萎缩明显, 呈暗黄色; III组和V组的萎缩现象较轻, 色泽接近正常脊髓, 见图2。

2.5 尼氏染色结果 术后12周II组-V组植入的分区式组织工程脊髓导管发生不同程度的降解, 碎片散布在再生的组织之间, 缺损处导管的外周包裹结缔组织, 有血管再生和大量巨噬细胞侵入。II组导管的近端能找到尼氏染色阳性的神经元胞体; III组、IV组和V组导管近、远端均能找到尼氏染色阳性的神经元胞体, 并且要比正常脊髓尼氏染色的神经元胞体体积增大, 形状不规则。除了V组导管中间段显示少数尼氏染色阳性的神经元胞体外, 其余各组均未发现, 见图3。

2.6 免疫组化染色结果 术后12周, 除了模型组以外, 其他分区式组织工程脊髓导管三等分后, 进行纵切, 切片进行NF免疫组化染色, 神经纤维被抗NF标记显示为红色。免疫组化显示II组和IV组导管近端、远端和中间均能找到NF染色阳性的神经纤维。NF染色阳性的神经纤维排列比较整齐, 虽然部分有缠绕成团现象, 但比例相对较小, 见图4。

2.7 透射电镜观察结果 透射电镜观察显示II、IV组导管近、远端均找到少量有髓神经纤维, 而且III组和V组导管中间也能找到有髓神经纤维, 并可见突触形成。II、IV组导管远端有髓神经纤维数量少; III组和V组导管近、远端有髓神经纤维数量多, 髓鞘厚, 有髓神经纤维单个或成束生长, 结构清晰。III组和V组导管近端的有髓神经纤维髓鞘厚度均比II组和IV组要厚, 但III组和V组导管近端有髓神经纤维厚度之间没有明显的差异。III组和V组导管中间的有髓神经纤维厚度之间没有明显的差异, 见图5。

3 讨论 Discussion

脊髓损伤属于中枢神经系统损伤较重的一种疾病, 具有高致残率、预后较差的特点, 发病人群以青壮年居多, 给患者本人和家庭造成了严重的影响, 给社会带来了沉重的经济负担^[9-11]。细胞移植、人工支架材料移植等方法治疗脊髓损伤有一定进展, 其中支架材料的选择起到关键的作用, 支架材料给神经元的迁移和再生轴突延伸提供引导^[12-13]。支架材料必须同时具有以下性能: ①细胞和组织的生物相容性好^[14]。②细胞在材料表面可以较好地黏附和增殖^[15]。③材料能够让细胞根据事先设置好的形态生长^[16]。④生物的降解吸收性可以控制, 新组织成熟后, 材料可以降解为对人体无损害的小分子物质, 而且能够随代谢排出体外^[17]。⑤有三维立体结构并且孔隙度高^[18]。⑥具有可塑性和适宜的力学性能^[19]。目前常

用的生物可降解材料包括聚乙醇酸(PGA)、聚乳酸(PLA)、聚乳酸和聚羟基乙酸的共聚物(PLGA)等^[20]。天然可降解性高分子材料包括明胶、壳聚糖、层黏连蛋白, 纤维蛋白等^[21]。聚乙醇酸等常被制备成纤维块状, 壳聚糖等常被制备成单管或多管或多微孔的海绵状, 但对于脊髓结构来说, 这些孔或导管的位置没有和脊髓的灰、白质组织学结构相吻合, 也不能和白质中主要的上下行纤维束相对应, 因此, 使用这些支架材料时, 白质内上下行纤维束即使再生, 也不能有规律的延伸和生长, 影响了修复效果^[22]。实验采用分区式脊髓导管的模式, 用壳聚糖为材料制作与脊髓灰质和白质以及白质内主要上下行纤维束分区相匹配的组织工程脊髓导管, 分成5组对脊髓损伤大鼠进行研究, 得出了有价值的结论。

大鼠脊髓损伤模型的节段定位非常重要, 大鼠脊柱T₉₋₁₁脊椎棘突比较肥大并且距离较近, 而T₈椎板对应T₁₀节段, 沿脊柱滑行就能明显触摸到T₉₋₁₁脊椎棘突, 这样进行定位就会非常准确^[23]。骨髓基质干细胞来源于中胚层间充质细胞, 增殖能力迅速而且多向分化潜能较强。人工支架材料主要为神经元的迁移和再生轴突的延伸提供三维引导支架, 天然多糖中壳聚糖是惟一大量存在的碱基多糖, 有较低的毒性, 并且可以降解, 与骨髓基质干细胞有非常好的组织相容性^[24]。实验发现聚乙醇酸纤维的加入可以平衡pH值, 在体内降解为碱性的葡糖胺, 而聚乙醇酸纤维在体内被降解为酸性的羟乙酸, 使神经纤维再生有一个好的微环境。

大鼠在脊髓全横断损伤后双下肢运动及感觉功能会丧失, 通常采用BBB行为学评分来评估大鼠的运动功能^[25]。从实验结果看出, 将分区式脊髓导管和骨髓基质干细胞联合植入的III组和V组术后第2周和第12周的BBB评分明显高于其他3组。运动诱发电位对损伤非常敏感, 当组织学的破坏达到70%时, 剩余30%仍然可以保持正常的运动功能, 但运动诱发电位的信号却可以减少90%甚至更多, 而且不能恢复^[26-27]。因此, 可以作为判断脊髓损伤修复与再生的可靠指标^[28]。III组和V组大鼠刺激皮质后腓肠肌内均能记录到运动诱发电位, 说明这两组术后12周脊髓两残端间建立起下行传导通路, 恢复了部分电生理的特征, 其他组还未建立脊髓两断端之间下行的传导通路, V组振幅明显高于III组, 说明V组下行传导束的恢复程度比III组好^[29]。术后12周V组损伤平面以下运动诱发电位的潜伏期明显少于其他各组, 并且其余各组间的振幅差异无显著性意义, 因此可以得出V组运动功能的恢复好于其他各组。术后12周经大体观察发现, 除了没有经过任何处理外的I组, 其余各组大鼠脊髓导管与脊髓两残端有不同程度的连续性, 免疫组化显示II组和IV组导管近端、远端和中间均能找到NF染色阳性的神经纤维; 电镜显示II-IV组导管近、远端均找到少量有髓神经纤维, 而III组和V组导管中间也能找到有髓神经纤维, 并可见突触形成。这说明采用分区式壳聚糖脊髓导管联合骨髓基质干细胞注射可以对脊髓损伤造成的缺

损伤予较好的连接^[30]。

总之, 分区式壳聚糖脊髓导管联合骨髓基质干细胞注射可以对脊髓损伤造成的缺损给予较好的连接, 恢复一部分电生理特性, 加快轴突的再生功能, 为脊髓损伤的治疗提供了一个新的方向。但脊髓损伤机制及其修复的研究, 仍处在初步阶段, 还需要进一步深入研究。

作者贡献: 实验设计、实验实施、实验评估、资料收集均为本文作者。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] 王雪松, 陈雪, 李奕, 等. 分区式脊髓导管联合骨髓基质干细胞修复脊髓横断损伤[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(7): 1403, 1405.
- [2] Liu KJ, Xu J, Yang CY, et al. Analysis of olfactory ensheathing glia transplantation-induced repair of spinal cord injury by electrophysiological, behavioral, and histochemical methods in rats. *J Mol Neurosci.* 2010; 41(1): 25-29.
- [3] 段朝霞, 张洁元, 陈魁君, 等. 细胞移植治疗脊髓损伤的研究进展[J]. 中国医药导报, 2012, 36(12): 57-59.
- [4] 蒲渝, 郭庆山, 王爱民, 等. 改性胶原支架构建组织工程化神经复合物修复大鼠脊髓损伤[J]. 中华创伤杂志, 2013, 29(1): 67-72.
- [5] Haga KK, McClymont KL, Clarke S, et al. The effect of tight glycaemic control, during and after cardiac surgery, on patient mortality and morbidity: A systematic review and meta-analysis. *J Cardiothorac Surg.* 2011; 6: 3.
- [6] Banskota B, Bijukachhe B, Kazi S, et al. Neuroarthropathy of the hip following spinal cord injury. *Indian J Orthop.* 2011; 45(1): 87-90.
- [7] Rodríguez-Salceda I, Escortell-Mayor E, Rico-Blázquez M, et al. EDUCORE project: a clinical trial, randomised by clusters, to assess the effect of a visual learning method on blood pressure control in the primary healthcare setting. *BMC Public Health.* 2010; 10: 449.
- [8] Faresjö T, Faresjö A. To match or not to match in epidemiological studies--same outcome but less power. *Int J Environ Res Public Health.* 2010; 7(1): 325-332.
- [9] 喻皇飞, 方宁, 陈代雄, 等. 人羊膜间充质干细胞移植对大鼠脊髓损伤神经功能恢复的影响[J]. 中华神经外科杂志, 2012, 28(4): 412-415.
- [10] 吴月奎, 王尚武, 孙起军, 等. 脐血源神经干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤及其差异基因表达[J]. 中华神经医学杂志, 2014, 13(8): 772-777.
- [11] 吴立生, 吴仕峰, 高万里, 等. 嗅鞘细胞和骨髓基质干细胞联合培养修复大鼠脊髓损伤[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(7): 1217, 1220.
- [12] Choi JS, Leem JW, Lee KH, et al. Effects of human mesenchymal stem cell transplantation combined with polymer on functional recovery following spinal cord hemisection in rats. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2012; 16(6): 405-411.
- [13] 赵建罡, 马立学, 张伟东, 等. 不同靶点注射骨髓基质干细胞对大鼠脊髓损伤修复的影响[J]. 临床骨科杂志, 2013, 16(5): 581, 585.
- [14] 陈少强, 吴碧莲, 贾小力, 等. 骨髓基质干细胞旁分泌作用促进大鼠损伤脊髓的血管新生[J]. 中华创伤骨科杂志, 2015, 17(3): 257-262.
- [15] Hawryluk GW, Mothe A, Wang J, et al. An in vivo characterization of trophic factor production following neural precursor cell or bone marrow stromal cell transplantation for spinal cord injury. *Stem Cells Dev.* 2012; 21(12): 2222-2238.
- [16] 陈伟, 羊明智. 实验性脊髓损伤动物模型的制备及研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2014, 22(6): 520-523.
- [17] 杨国宏, 张春军, 赵富生, 等. 自体骨髓基质干细胞移植联合 EPO 治疗脊髓损伤的研究[J]. 中国医学创新, 2014, 11(32): 1-3.
- [18] 徐小林, 管雅琳, 张雪青, 等. 两种方式移植骨髓基质干细胞治疗大鼠脊髓损伤的电生理研究[J]. 中华创伤骨科杂志, 2012, 14(12): 1076-1081.
- [19] De Laporte L, des Rieux A, Tuinstra HM, et al. Vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor 2 delivery from spinal cord bridges to enhance angiogenesis following injury. *J Biomed Mater Res A.* 2011; 98(3): 372-382.
- [20] 陈少强, 林建华. 骨髓基质干细胞在损伤脊髓内向少突胶质细胞定向分化的分析[J]. 中华创伤骨科杂志, 2012, 14(9): 795-799.
- [21] 郭晓鹤, 步星耀, 闫兆月, 等. 自体骨髓基质干细胞动员联合神经生长因子及综合康复治疗脊髓损伤[J]. 中华神经医学杂志, 2013, 12(8): 833-837.
- [22] 王晶, 李超, 王业杨, 等. 骨髓基质干细胞生物学特性及其移植修复脊髓损伤进展[J]. 中华细胞与干细胞杂志: 电子版, 2013, 3(2): 99-102.
- [23] Ayatollahi M, Salmani MK, Geramizadeh B, et al. Conditions to improve expansion of human mesenchymal stem cells based on rat samples. *World J Stem Cells.* 2012; 4(1): 1-8.
- [24] 阮智, 黄慧, 孙建华, 等. 异体骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(36): 6729-6732.
- [25] Kang ES, Ha KY, Kim YH. Fate of transplanted bone marrow derived mesenchymal stem cells following spinal cord injury in rats by transplantation routes. *J Korean Med Sci.* 2012; 27(6): 586-593.
- [26] Ruff CA, Wilcox JT, Fehlings MG. Cell-based transplantation strategies to promote plasticity following spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2012; 235(1): 78-90.
- [27] 刘钦毅, 程兆华, 邵国喜, 等. 3.4 聚乳酸-聚三亚甲基碳酸酯/GDNF 导管对大鼠脊髓损伤区 GAP-43 蛋白表达的影响[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(8): 1219-1221.
- [28] 张秋娟. 自体骨髓基质干细胞移植治疗脊髓损伤[J]. 河北医药, 2014, 36(10): 1527-1528.
- [29] van den Brand R, Heutschi J, Barraud Q, et al. Restoring voluntary control of locomotion after paralyzing spinal cord injury. *Science.* 2012; 336(6085): 1182-1185.
- [30] 杨阳, 陈雪, 李奕, 等. 不同浓度 BMSCs 联合壳聚糖导管对大鼠全横断脊髓损伤修复作用的比较[J]. 中国生物医学工程学报, 2011, 30(6): 931-937.