

神经干细胞移植到神经导管修复大鼠面神经缺损的研究*

施勇¹ 周梁¹ 田洁¹ 汪洋¹

[摘要] 目的:观察移植神经干细胞到可降解的聚乳酸/聚羟基乙酸(PLGA)神经导管修复大鼠面神经缺损的可行性。方法:20只SD大鼠随机分为2组,每组进行右侧面神经损伤手术,分别移植PLGA导管(A组)或含有神经干细胞的PLGA管(B组)。术后4、12周分别通过电生理检测、轴突形态学检测等方法来评估面神经的修复效果。结果:术后4周和12周,B组在神经动作电位的振幅分别为(27.53±7.48)、(141.23±21.18) μV ,轴突的面积为(10539.48±3605.35)、(30076.22±7614.05) μm^2 ,都高于A组[术后4周和12周,动作电位振幅为(13.03±11.38)、(118.50±22.70) μV ;轴突面积为(6633.20±3759.30)、(20772.53±10903.65) μm^2]($P < 0.05$)。结论:神经干细胞移植可能会促进面神经的再生。

[关键词] 神经再生;移植;干细胞;神经导管

[中图分类号] R745.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-1781(2012)22-1040-03

Transplanting neural stem cells in nerve conduit to promote rats facial nerve regeneration

SHI Yong ZHOU Liang TIAN Jie WANG Yang

(Department of Otolaryngology, Eye and ENT Hospital, Fudan University, Shanghai, 200031, China)

Corresponding author: ZHOU Liang, E-mail: zhoulent@126.com

Abstract Objective: To construct a biodegradable PLGA nerve conduit (NC) filled with NSCs in order to improve facial nerve regeneration. **Method:** SD rats were subjected to right facial nerve transection, and PLGA NCs filled with NSCs were used to bridge the nerve gap. Facial nerve regeneration was assessed 4 and 12 weeks after surgery, through electrophysiological testing, and morphometric analysis of axons. **Result:** Nerve action potential amplitude, and axonal area were significantly greater in the NSCs group than the empty NC group. **Conclusion:** NSCs transplantation may improve regeneration of the facial nerve.

Key words nerve regeneration; transplantation; stem cells; nerve conduit

目前,周围性面神经断伤后的修复仍是困扰耳鼻咽喉、口腔等学科的挑战性难题。应用神经组织工程学的方法来促进面神经的再生和修复已成为当今研究的新热点,神经干细胞(neural stem cell, NSC)的出现为研究提供了新的希望,因此,我们进行了将NSC移植到聚乳酸/聚羟基乙酸(polyglycolic/poly-lactic acid, PLGA)导管修复大鼠面神经缺损的实验。

1 材料与方法

1.1 材料

生物可降解材料PLGA共聚体是目前研究中使用最多的合成材料,购自上海天清生物公司,内径为0.8 mm,外径为1.2 mm。

受孕10 d左右的SD孕鼠及200~250 g雌性SD大鼠均由我校实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 NSC细胞培养及鉴定

孕10 d左右的SD

大鼠,2 ml/kg的氯胺酮加甲苯噻嗪腹腔麻醉后取出胚胎置入Dhanks液中,逐个分离出胚胎海马组织,剥离脑膜及血管,滴管反复吹打成单细胞悬液,取上清液,1500×g离心5 min,放入培养液中,置37℃培养箱中孵育,3~4 d半量换液,5~7 d传代。种植NSCs于涂有多聚赖氨酸的小玻片上,采用甲醛固定,血清封闭,分别加入相应抗体等步骤后在显微镜下观察染色情况。具体步骤见文献[1]。

1.2.2 细胞移植和面神经损伤模型的建立 细胞每次移植前先离心,去掉上清液,加入细胞外基质Matrigel约30 μl 混合后,种植入PLGA导管,在体外过夜后再植入体内。20只SD大鼠随机分成2组,分别移植空的PLGA(A组)或含有NSCs导管(B组)。移植模型具体步骤如下:氯胺酮加甲苯噻嗪腹腔麻醉后,无菌状态下打开皮肤、肌肉,暴露右侧面神经的上颊支,切断5 mm,让其自由回缩,1 cm PLGA导管修补缺损,神经两断端各塞入导管1 mm,10-0尼龙线缝合固定,4-0线封闭皮肤。

*基金项目:上海市卫生局青年基金项目(No:2009y013)

¹复旦大学附属眼耳鼻喉科医院耳鼻咽喉科(上海,200031)

通信作者:周梁,E-mail:zhoulent@126.com

1.2.3 大体观察和电生理检测 术后 4、12 周分别观察大鼠须动及导管降解与神经再生情况。在 2 个时间段每组取 4 只大鼠,按照手术步骤暴露神经导管,面神经电图仪检测,记录正常神经及再生神经的动作电位波幅,刺激强度为 0.5 mA,刺激时间为 0.1 ms,重复 10 次取平均值。

1.2.4 组织学检测 电生理检测完毕后取出神经导管($n=4$),在再生神经中段到距中段 4 mm 分别取 5 个任意部位横断切片,行苏木精-伊红染色,每个切片取 3 个部位,光镜下放大 400 倍后,在 Leica Qwin V3 应用软件下计算神经轴突面积,取部分组织进行透射电镜检查,观察再生神经髓鞘。

1.3 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行方差分析和 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

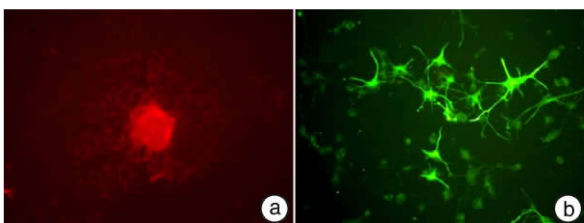
2 结果

2.1 细胞培养结果

培养 7 d 左右可见数十个乃至数百个细胞组成的神经球,细胞免疫化学结果示 Nestin 阳性(图 1),诱导分化可见大量形态各异的神经细胞,这些结果证实了所培养的细胞为 NSCs。

2.2 大体观察与电生理结果

B 组 1 只大鼠麻醉死亡, A 组 1 只大鼠导管丢失,其余大鼠伤口愈合良好,所有大鼠术后 4 周均发现右侧须动明显减弱,下唇胡须由直立偏向后方,12 周时各组动物的须动与正常侧相差不大。术后 12 周 2 组导管都已降解, B 组可在原导管处见一新生的神经(图 2)。电生理结果示: 4 周后各组均检测到电位, B 组检测电位值明显高于对照组,两者相比差异有统计学意义($P < 0.05$), 12 周后 B 组平均电位为 $(141.23 \pm 21.18) \mu V$, 但正常左侧面神经所检测到的平均电位为 $(280.12 \pm 24.50) \mu V$, 两者相比差距明显,说明完全的功能恢复需要更长的时间。2 组大鼠术后 4、12 周再生面神经 NAPs 振幅比较。4 周后, A 组、B 组分别为: (6633.20 ± 3759.30) 、 $(10539.48 \pm 3605.35) \mu m^2$; 12 周后, A 组、B 组分别为: (20772.53 ± 10903.65) 、 $(30076.22 \pm 7614.05) \mu m^2$ 。



a: Nestin 的鉴定 $\times 400$; b: GFAP 的鉴定 $\times 400$ 。

图 1 神经干细胞的免疫细胞化学鉴定

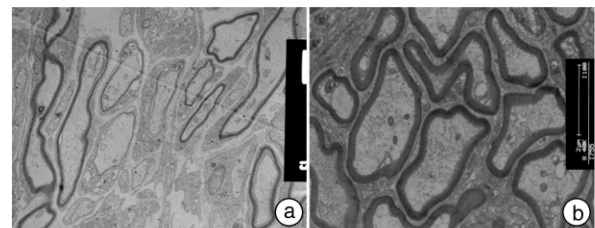


图 2 术后 12 周移植神经干细胞组可见一新生的神经(箭头所示)

2.3 组织学检查

苏木精-伊红染色可见随着时间的推移,各组再生神经纤维渐趋于成熟,尤以 B 组神经纤维增长速度较快,12 周 B 组的有髓神经纤维形态接近正常,2 组间差异有统计学意义。透射电镜结果同样显示 4 周时新生的神经髓鞘厚度较小,12 周后髓鞘化程度较高(图 3)。

2 组大鼠术后 4、12 周再生面神经轴突面积比较: 4 周后为 (13.03 ± 11.38) 、 $(27.53 \pm 7.48) \mu V$; 12 周后为 (118.50 ± 22.70) 、 $(141.23 \pm 21.18) \mu V$ 。



a: 4 周时 $\times 1000$; b: 12 周时 $\times 1000$ 。

图 3 神经干细胞组电镜检查

3 讨论

目前,面神经缺损后修复的方法多种多样,而有一点是共同的,那就是对于周围性面神经的修复,有效引导轴突生长的机械通道是至关重要的,在临床上多使用自体移植,但是可利用的移植神经长度有限且容易引起供区功能丧失。近年来组织工程修复神经缺损已越来越受到重视。神经导管已在临床及实验研究中多次使用,如 Mackinnon 等^[2-3]。我们在本次实验中使用了 PLGA 导管,发现在 A 组有不同程度的神经修复,术后 4 周可检测到神经电位,术后 12 周须动也基本恢复正常,但后者可归功于另一支颊神经的侧支循环加强所致,其神经再生的效果远没有达到目标。

另外修复神经还需要足够的营养支持,如各种神经营养因子(脑源性神经营养因子及胶质源性神经营养因子等),国外研究证实这些因子具有促进神经修复等作用^[4-5]。而 NSC 具有强大的增殖能力,能持续分泌各种神经营养因子,已有国内外学

者在神经系统疾病进行了初探^[6-7]。我们将来源于大鼠大脑的 NSC 应用于周围面神经的修复研究中,发现在实验组中面神经损伤后的修复效果明显,这结果与 NSC 分泌各种神经营养因子是密不可分的,进一步说明 NSC 具有促进周围性面神经再生修复的作用。但在神经受损早期神经修复较慢,可能是因为我们应用的 NSC 主要来源于中枢神经系统的海马中,大量促进轴突再生的基础研究显示,成体哺乳动物中枢神经系统损伤早期再生失败的主要原因是由于髓磷脂抑制物的存在,这些分子均能诱导生长锥塌陷,导致轴突生长抑制作用。有关研究表明,上述各种物质均通过一种糖基磷脂酰肌醇受体-Nogo 受体(NgR)起作用^[8],采用 RNA 干扰技术沉默 NgR 基因,是否能够消除髓磷脂抑制蛋白的抑制作用,从而促进神经轴突的再生是下一步要研究的重点。

总之,本研究显示了 NSC 具有促进周围性面神经再生修复的作用,但移植细胞的成活及再生的机制可能需更进一步研究。

参考文献

- [1] 施勇,周梁,田洁,等,携带大鼠胶质细胞源性神经营养因子基因慢病毒载体的构建及转染[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志,2008,9(5):283-285.
- [2] MACKINNON S E, DELLON A L. Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid

tube[J]. *Plast Reconstr Surg*, 1990,85: 419-424.

- [3] PIQUILLOUD G, CHRISTEN T, PFISTER L A, et al, Variations in glial cell line-derived neurotrophic factor release from biodegradable nerve conduits modify the rate of functional motor recovery after rat primary nerve repairs[J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 26: 1109-1117.
- [4] BOYD J G, GORDON T. Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo[J]. *Exp Neurol*, 2003, 183: 610-619.
- [5] BOYD J G, GORDON T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury[J]. *Mol Neurobiol*, 2003,27:277-324.
- [6] MURAKAMI T, FUJIMOTO Y, YASUNAGA Y, et al, Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair[J]. *Brain Res*, 2003,974: 17-24.
- [7] 郭宝凤,董明敏,任秀花.豚鼠神经干细胞修复兔面神经缺损观察[J]. 郑州大学学报(医学版),2006,41(3):445-448.
- [8] GRANDPRE T, LI S, STRITTMATTER S M. Nogo-66 receptor or antagonist peptide promotes axonal regeneration[J]. *Nature*, 2002,417: 547-551.

(收稿日期:2012-04-09)

读者·作者·编者

数字的用法(一)

1 阿拉伯数字的用法

凡可以使用阿拉伯数字且很得体的地方,均应使用阿拉伯数字。公历世纪、年、月、日和时刻必须使用阿拉伯数字。如 20 世纪 90 年代不能写成二十世纪九十年代。日期可采用全数字式写法,如 2011-07-21,年月日之间使用半字线“-”,起止日期用一字线“—”表示,例:2010-07-21—2011-07-21、2011-07-21—08-31、2011-07-21—31,分别表示 2010 年 7 月 21 日至 2011 年 7 月 21 日、2011 年 7 月 21 日至 8 月 31 日、2011 年 7 月 21 日至 31 日。当月、日是个位数时,在十位上加“0”。年份用 4 位数表示,如 2003 年不能简写为 03 年。日的时间表示,按 GB/T7408-94 规定的写法,该格式采用每日 24 小时计时制,时、分、秒的分隔符为冒号“:”如下午 3 时 9 分 38.5 秒应写作 15:09:38.5 或 150938.5;上午 4 时应写作 04:00:00。

计量和计数单位前的数字一律使用阿拉伯数字,如 15 kg,13 只等。

多位数的阿拉伯数字不能拆开转行。

小数点前或后超过 4 位数(含 4 位),应从小数点起向左或向右每 3 位空半个阿拉伯数字(1/4 汉字)的空隙,不用千分撇“,”分节法。如:48 363,1 285.41, 9.806 6 等。年份、部队代号、仪器型号等非计量数字不分节。

参考文献中的版次、卷号、期号、页码均应使用阿拉伯数字,如 2 版,36(11):68-70。