

神经损伤分为中枢性和周围性损伤,疾病预后较差,常留下程度不等的后遗症,不仅对个人和家庭,甚至对社会都造成了巨大的压力,严重的危害着人类健康。众所周知,传统观念认为神经损伤后不可再生,这就导致治疗相当困难,而近年来提出神经干细胞的概念后,对传统观念造成了巨大的冲击,也为神经损伤的治疗带来了新的曙光。骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)因其易获取,免疫原性低等多项优点被广泛应用^[1],但目前的研究报道多涉及干细胞移植干预相关模型,再采用形态学或者行为学评分来评估疗效^[2-5],并未探讨干细胞是否成功迁移至损伤部位,随后能否存活并进行分化。因此本研究旨在神经细胞标志物微管相关蛋白(MAP-2)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)方面着手,通过骨髓源神经干细胞移植治疗 SCSG 损毁兔,不同时间点观察兔瞳孔直径恢复情况,观察受损部位 MAP-2 和 GFAP 含量的变化,来探讨 NSCs 修复神经功能的可能作用及机制。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂 健康成年的新西兰雄性白兔 32 只,2 000~2 500 g,由南华大学实验动物部提供;bFGF、CNTF 购自美国 Peprotech 公司;CD34、CD44 和 CD54 单克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;MAP-2、GFAP 抗体购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 动物模型制备 暴露颈部皮肤后逐层分离出颈上交感神经节,用直持针钳压榨交感神经节约 10 s,压下一个齿,并且保持持针钳长轴方向与交感神经节长轴方向一致,神经节与钳头完全咬合,从而保证颈上交感神经节变形超过 50%。

1.3 模型成功标准 模型兔出现 Horner 三联征,瞳孔缩小、眼球凹陷、睑裂变小。瞳孔直径:可通过数码相机拍摄,然后 Image J 软件处理测得瞳孔直径数据,随后进行统计分析。对于模型判定睑裂及眼球凹陷则采用直接图片比较分析。

1.4 动物分组 将 32 只实验兔均分为 4 组,每组 8 只。正常组:不予任何处理。模型组:造模成功后第 7 天注射 1 mL 生理盐水;培养液组:造模成功后第 7 天注射 1 mL 培养液;干细胞组:造模成功后第 7 天注射 1 mL 含 2×10^6 个神经干细胞的培养液。

1.5 细胞培养、诱导分化及鉴定 提取的兔骨髓细

胞,经全骨髓培养法和密度梯度离心法培养 3~5 代后,进行细胞表型鉴定,CD34 阴性,CD44 及 CD54 阳性提示细胞为 BMSCs。采用 Nestin 单克隆抗体鉴定,经 bFGF 预诱导,CNTF 诱导后 BMSCs 分化为神经干细胞。

1.6 HE 染色 移植后第 21 天处死兔,取颈上交感神经节置入甲醛中固定 24 h 后石蜡包埋,4 μ m 切片,切片常规用二甲苯脱蜡;经各级乙醇脱水;蒸馏水水洗 2 min;苏木素染色 5 min;自来水冲洗;盐酸乙醇分化 30 s;自来水浸泡 15 min;置伊红液 2 min;常规脱水,透明,树胶封片,镜检。

1.7 MAP-2 及 GFAP 免疫组化染色 具体操作按照免疫组化试剂盒说明书进行,石蜡切片 70 $^{\circ}$ C 烤片 10 min;二甲苯 I II 各 30 min;再按无水乙醇到 75%乙醇中逐级脱水;去离子水 5 min;柠檬酸盐缓冲液抗原热修复 15 min;PBS 每次 5 min,洗 3 次;过氧化氢 15 min;再次 PBS 洗 3 次;血清封闭 1 h;去除血清,加一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;PBS 洗 3 次每次 5 min;二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;PBS 洗 3 次每次 5 min;DAB 显色,苏木素复染,树胶封片,镜检。

1.8 图像分析和统计学处理 统计分析和绘制采用 Graphpad Prism 软件,运用单因素方差分析以及 LSD 组间比较法,数据使用均数 $\pm$ 标准差表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 兔瞳孔测量结果 模型组与培养液组比较,各个时间点瞳孔直径差异均无显著性($P > 0.05$);干细胞组分别与模型组和培养液组对比,移植后第 1 天、7 天差异不明显($P > 0.05$),第 10 天、14 天、21 天干细胞组瞳孔直径均大于模型组和培养液组($P < 0.05$);干细胞组与正常组比较,细胞移植后第 1 天、7 天、10 天干细胞组瞳孔直径均小于正常组($P < 0.05$),第 14 天、21 天差异不明显($P > 0.05$)(表 1)。

2.2 HE 染色结果 切片制成后,进行 HE 染色,观察神经节内病理组织学改变,正常组与干细胞组可见细胞大小形态基本一致,分布均匀,排列整齐、紧密,少量间质增生,新生血管丰富,未见明显核固缩。模型组与培养液组可见细胞大小各异,分布不均,排列紊乱,可见炎性细胞浸润,细胞间质增生明显,可见核固缩(图 1)。

2.3 MAP-2、GFAP 免疫组化结果 MAP-2 和 GFAP 主要存在于胞浆中,若阳性表达则胞浆着棕