

本文引用:张召宇,李梦欣,李慧堂,等. 神经干细胞联合神经营养因子-3 基因修饰的嗅鞘细胞移植对创伤性脑损伤大鼠神经功能的影响及机制[J]. 新乡医学院学报,2023,40(6):501-506. DOI:10. 7683/xyxyxb. 2023. 06. 001.

【基础研究】

神经干细胞联合神经营养因子-3 基因修饰的嗅鞘细胞移植对创伤性脑损伤大鼠神经功能的影响及机制

张召宇¹, 李梦欣¹, 李慧堂¹, 李海明², 金保哲²
(1. 新乡医学院第一附属医院神经外科,河南 卫辉 453100;2. 河南省神经修复重点实验室,河南 卫辉 453100)

摘要: **目的** 探讨神经干细胞 (NSCs) 与神经营养因子-3 (NT-3) 基因修饰的嗅鞘细胞 (OECs) 联合移植对大鼠创伤性颅脑损伤 (TBI) 后神经功能的影响及机制。**方法** 将 100 只 Sprague Dawley 雄性大鼠按照随机数字表法分为假手术组、模型组、NSCs 组、OECs 组、联合治疗组,每组 20 只。模型组、NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠采用改良 Feeney 法构建 TBI 模型。造模 1 d 后,将不同的试剂注入各组大鼠损伤灶进行细胞移植,模型组大鼠注入 10 μ L 生理盐水,OECs 组大鼠注入 10 μ L NT-3 基因修饰的 OECs 悬液,NSCs 组大鼠注入 10 μ L NSCs 悬液,联合治疗组大鼠注入 5 μ L NT-3 基因修饰的 OECs 细胞悬液和 5 μ L NSCs 悬液,注射完成后继续常规饲养。分别于移植后 1、7、14、28 d,各组随机取 10 只大鼠,采用改良神经功能缺损评分 (mNSS) 评估各组大鼠的神经功能缺损程度。移植后 7 d,采用酶联免疫吸附试验法检测大鼠脑组织中白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β 及神经生长因子 (NGF) 水平。移植后 28 d,采用苏木精-伊红染色法观察大鼠脑组织病理学改变,采用免疫组织化学染色法检测大鼠脑组织中 NGF 表达。**结果** 移植后 1、7、14、28 d,模型组、NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠 mNSS 评分显著高于假手术组 ($P < 0.05$);移植后 7、14 d,NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠 mNSS 评分显著低于模型组 ($P < 0.05$);移植后 7、14 d,NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠 mNSS 评分比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);移植后 28 d,NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠 mNSS 评分显著低于模型组,联合治疗组大鼠 mNSS 评分显著低于 NSCs 组和 OECs 组 ($P < 0.05$);移植后 28 d,NSCs 组与 OECs 组大鼠 mNSS 评分比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。移植后 28 d,假手术组大鼠脑组织结构完整,核仁明显,细胞排列有序;模型组大鼠损伤灶周围脑组织形态不规则,细胞肿胀,排列紊乱,可见坏死细胞及细胞核固缩,存在炎症细胞浸润;相较于模型组,NSCs 组及 OECs 组大鼠脑组织细胞肿胀,排列紊乱,细胞核固缩、炎症浸润现象稍有改善;相较于模型组、NSCs 组及 OECs 组,联合治疗组大鼠脑组织细胞排列相对规整,细胞肿胀减轻,核仁清晰。模型组大鼠脑组织中 IL-6、IL-1 β 表达水平显著高于假手术组 ($P < 0.05$),联合治疗组大鼠 IL-6、IL-1 β 表达水平显著低于模型组、NSCs 组、OECs 组 ($P < 0.05$),NSCs 组、OECs 组大鼠脑组织中 IL-6、IL-1 β 水平显著低于模型组 ($P < 0.05$)。NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠脑组织中 NGF 阳性表达细胞数及 NGF 水平显著高于假手术组、模型组 ($P < 0.05$);假手术组与模型组大鼠脑组织中 NGF 阳性表达细胞数和 NGF 水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);联合治疗组大鼠脑组织中 NGF 阳性表达细胞数及 NGF 水平显著高于 NSCs 组、OECs 组 ($P < 0.05$);NSCs 组与 OECs 组大鼠脑组织中 NGF 阳性表达细胞数及 NGF 水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** NSCs 和 NT-3 基因修饰的 OECs 联合移植治疗可显著减轻 TBI 大鼠神经功能缺损程度,提高 NGF 表达水平,减轻炎症反应,从而起到神经保护作用。

关键词: 神经生长因子;神经干细胞;嗅鞘细胞;创伤性脑损伤
中图分类号: R651. 15 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2023)06-0501-06

Effect and mechanism of combined transplantation of neural stem cells and olfactory ensheathing cells modified by neurotrophin-3 gene on neural function of rats with traumatic brain injury

ZHANG Zhaoyu¹, LI Mengxin¹, LI Huitang¹, LI Haiming², JIN Baozhe²

(1. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China; 2. Henan Provincial Key Laboratory of Neural Repair, Weihui 453100, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect and mechanism of combined transplantation of neural stem cells (NSCs) and olfactory ensheathing cells (OECs) modified by neurotrophin-3 (NT-3) gene on neurological function after traumatic brain

DOI:10. 7683/xyxyxb. 2023. 06. 001
收稿日期:2022-03-21
基金项目:2018 年河南省医学科技攻关计划省部共建项目(编号:SBGJ2018057)。
作者简介:张召宇(1994-),男,河南南阳人,硕士研究生在读,住院医师,研究方向:神经损伤功能修复与保护。
通信作者:金保哲(1970-),男,河南南阳人,博士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:神经损伤功能修复与保护;E-mail: 13938765496@163. com。

injury (TBI) in rats. **Methods** A total of 100 male Sprague Dawley rats were randomly divided into sham operation group, model group, NSCs group, OECs group and combined treatment group using a random number table method, with 20 rats in each group. The rats in the model group, NSCs group, OECs group and combined treatment group were used to construct TBI models by using the improved Feeney method. After 1 d of modeling, different reagents were injected into the damaged lesion of rats in each group for cell transplantation, the rats in the model group injected with 10 μ L physiological saline, the rats in the OECs group injected with 10 μ L OECs modified by NT-3 gene suspension, the rats in the NSCs group rats injected with 10 μ L NSCs suspension, the rats in the combined treatment group injected with 5 μ L OECs modified by NT-3 gene cell suspension and 5 μ L NSCs suspension, routine feeding was performed after injection. On 1, 7, 14, 28 d after transplantation, 10 rats were randomly selected from each group and the degree of neurological impairment was evaluated by the modified neurological deficiency scale (mNSS). On 7 d after transplantation, the levels of interleukin (IL)-6, IL-1 β and nerve growth factor (NGF) in brain tissue of rat were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. On 28 d after transplantation, the histopathology changes in brain tissue of rats were detected by hematoxylin-eosin staining, and the expression of nerve growth factor (NGF) in brain tissue was detected by immunohistochemical staining. **Results** On 1, 7, 14, 28 d after transplantation, the mNSS scores of rats in the model group, NSCs group, OECs group and combined treatment group were significantly higher than those in the sham operation group ($P < 0.05$); on 7, 14 d after transplantation, the mNSS scores of rats in the NSCs group, OECs group and combined treatment group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$); on 7 and 14 d after transplantation, there was no significant difference in mNSS scores among the NSCs group, OECs group and combined treatment group ($P > 0.05$); on 28 d after transplantation, the mNSS scores of rats in the NSCs group, OECs group and combined treatment group were significantly lower than those in the model group, while the mNSS score of rats in the combined treatment group was significantly lower than that in the NSCs group and OECs group ($P < 0.05$); there was no significant difference in mNSS scores of rats between the NSCs group and the OECs group on 28 d after transplantation ($P > 0.05$). On 28 d after transplantation, the brain tissue structure of rats in the sham operation group was intact, with obvious nucleoli and orderly cell arrangement; the brain tissue around the lesion of rats in the model group had irregular morphology, swollen cells, disordered arrangement, visible necrotic cells and nuclear pyknosis, and infiltration of inflammatory cells; compared with the model group, the brain tissue around the lesion of rats in the NSCs group and OECs group showed slight improvement in cell swelling, disordered arrangement, nuclear pyknosis, and inflammatory infiltration; compared with the model group, NSCs group and OECs group, the brain tissue around the lesion of rats in the combined treatment group showed relatively regular cell arrangement, reduced cell swelling, and clear nucleoli. The expression levels of IL-6 and IL-1 β in the brain tissue of rats in the model group were significantly higher than those in the sham operation group ($P < 0.05$); the expression levels of IL-6 and IL-1 β in the brain tissue of rats in the combined treatment group were significantly lower than those in the model group, NSCs group and OECs group ($P < 0.05$); and the expressions of IL-6 and IL-1 β in the brain tissue of rats in the NSCs group and OECs group were significantly lower than those of the model group ($P < 0.05$). The number of NGF positive expression cells and NGF level in the brain tissue of rats in the NSCs group, OECs group and combined treatment group were significantly higher than those in the sham operation group and model group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the number of NGF positive expression cells and NGF level in the brain tissue of rats between the sham operation group and the model group ($P > 0.05$). The number of NGF positive expression cells and NGF level in the brain tissue of rats in the combined treatment group were significantly higher than those in the NSCs group and OECs group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the number of NGF positive expression cells and NGF levels in the brain tissue of rats between the NSCs group and OECs group ($P > 0.05$). **Conclusion** The combined transplantation of NSCs and OECs modified by NT-3 in TBI rats can significantly reduce the degree of neurological deficits, increase NGF expression levels, alleviate inflammatory reactions, and thus play a neuroprotective role.

Key words: nerve growth factor; neural stem cells; olfactory ensheathing cells; traumatic brain injury

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是成人致残和死亡的重要因素^[1]。TBI 发生后会出现神经细胞的破碎、坏死、炎症反应以及神经营养因子缺乏等, 进而导致患者出现不同程度的难治性神经功能障碍^[2]。目前, 临床对脑损伤后神经功能恢复有许多治疗方案, 但治疗效果往往并不理想。神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 是一种单能干细胞, 具有自我复制的能力, 可转化为成熟的神经元^[3]。有研究表明, 嗅鞘细胞 (olfactory ensheathing cells,

OECs) 可促进轴突再生, 调节免疫反应, 增加血管生成^[4]。GUÉROUT 等^[5] 研究发现, 大鼠切断喉返神经后, 在吻合部位移植 OECs 可促进 NSCs 向神经元转化, 增强损伤后神经系统功能的恢复和轴突再生能力。随着技术的发展, 细胞移植技术为改善脑损伤后神经功能障碍提供了新的治疗方案^[6]。基于此, 本研究旨在探讨 NSCs 与神经营养因子-3 (neurotrophin-3, NT-3) 基因修饰的 OECs 联合移植对大鼠脑损伤后神经功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 102 只健康清洁级雄性和 2 只健康清洁级雌性 Sprague Dawley 大鼠购自济南朋悦实验动物繁育有限公司(许可证号 SCXK 鲁 20190003),2 月龄,体质量(200 ± 20)g。随机取 2 只雌鼠与 2 只雄鼠分别合笼,每天观察大鼠情况,雌鼠产仔后 1 d,取出乳鼠进行后续实验。

1.2 主要试剂与仪器 胎牛血清购自杭州四季青公司,达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)/F12 购自美国 HyClone 公司,大鼠 NSCs 完全培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司,小鼠抗 p75 抗体、小鼠抗 Nestin 抗体、大鼠神经生长因子(nerve growth factor, NGF)抗体购自英国 Abcam 公司,酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自郑州远东生物科技公司,NT-3 基因慢病毒载体购自上海吉玛制药技术有限公司;显微镜购自日本 Nikon 公司,酶标仪购自上海科华生物工程股份有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 NSCs 和 OECs 悬液制备 取 1 日龄新生乳鼠,超净工作台中消毒、处死,取出脑组织,分离出海马体及嗅球组织,参考文献[7-8]中的方法分离培养 NSCs 和 OECs,将 2 种细胞置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 培养箱内培养,NSCs 使用 NSCs 完全培养基培养,OECs 使用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养。培养 7~10 d 后,取生长状态良好的细胞,消化、离心、重悬,制备细胞悬液,调整细胞密度为 $1 \times 10^8\text{ L}^{-1}$ 。

1.3.2 NT-3 基因修饰的 OECs 细胞悬液制备 取 2 mL 生长状态良好的 OECs 悬液,加入 6 孔板中铺板,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h。弃去 6 孔板中原培养基,加入 NT-3 基因慢病毒载体(病毒滴度为 10),置于细胞培养箱培养 24 h 后,弃慢病毒液,加入新鲜完全培养基。继续培养 48 h 后,取出生长状态良好的细胞,消化、离心、重悬,制备细胞悬液,调整细胞密度为 $1 \times 10^8\text{ L}^{-1}$ 。

1.3.3 动物分组及 TBI 模型构建 将 100 只雄性大鼠按照随机数字表法分为假手术组、模型组、NSCs 组、OECs 组、联合治疗组,每组 20 只。模型组、NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠采用改良 Feeney 法构建 TBI 模型^[9],具体操作如下:将大鼠麻醉后固定于打击器底座,暴露顶枕部皮肤,消毒后沿顶枕部中线切开头皮,分离周围组织,暴露颅骨,在矢状缝旁 3.0 mm、人字缝前 2.0 mm 处开一圆形骨窗(直径约 5 mm),保护硬脑膜完整,于高 20 cm 处使用 40 g 质量砝码自由下落打击骨窗,造成大鼠

TBI。假手术组大鼠切开头皮,暴露硬脑膜后缝合头皮,不予打击。造模 1 d 后,将不同的试剂注入各组大鼠损伤灶进行细胞移植,模型组大鼠注入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 生理盐水,OECs 组大鼠注入 $10\text{ }\mu\text{L}$ NT-3 基因修饰的 OECs 悬液,NSCs 组大鼠注入 $10\text{ }\mu\text{L}$ NSCs 细胞悬液,联合治疗组大鼠注入 $5\text{ }\mu\text{L}$ NT-3 基因修饰的 OECs 悬液和 $5\text{ }\mu\text{L}$ NSCs 悬液,注射完成后继续常规饲养。

1.3.4 各组大鼠神经功能缺损程度评估 分别于移植后 1、7、14、28 d,随机取各组 10 只大鼠,采用改良神经功能缺损评分(modified neurological severity scores, mNSS)^[10]评估各组大鼠的神经功能缺损程度,总分 3~18 分,分值越高表示神经功能缺损越严重。

1.3.5 ELISA 法检测大鼠脑组织中白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 β 及 NGF 水平 于移植后 7 d,随机取各组 3 只大鼠,水合氯醛麻醉,取损伤灶周围 2 mm 脑组织,加入生理盐水进行组织匀浆,经短暂超声处理,离心后取上清液,使用 IL-6、IL-1 β 、NGF ELISA 检测试剂盒和酶标仪检测上清液中 IL-6、IL-1 β 、NGF 水平,严格根据 ELISA 试剂盒说明书进行操作。以所测标准品的吸光度值为横坐标,标准品浓度为纵坐标绘制标准曲线,得到直线回归方程,将各组样品的吸光值代入直线回归方程,得出 IL-6、IL-1 β 、NGF 水平。

1.3.6 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色法观察大鼠脑组织病理学改变 移植后 28 d,随机取各组 3 只大鼠麻醉后处死,经心脏灌注甲醛后,断头取脑组织,石蜡包埋,切片。取脑组织切片,置于烤片机上 1 h,然后脱蜡(二甲苯 I、二甲苯 II 各浸泡 5 min)、梯度乙醇复水,滴加苏木精染液,1 min 后用自来水冲洗,然后滴加分化液,30 s 后,清水浸泡 15 min,加入伊红染液,10 s 后清水冲洗,晾干后封片,置于显微镜下观察大鼠脑组织病理学改变并拍照。

1.3.7 免疫组织化学染色法检测大鼠脑组织中 NGF 表达 取各组大鼠移植后 28 d 的脑组织切片,经脱蜡、水化后,将切片浸泡在枸橼酸钠抗原修复液中,并加热至沸腾,然后置于室温冷却,取出切片浸泡于磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中 3 min。向切片上滴加过氧化氢封闭内源性过氧化物酶,室温静置 15 min,使用 PBS 冲洗,然后滴加 Triton X,室温静置 10 min 后,使用 PBS 反复冲洗。将切片置于湿盒中,加入山羊血清工作液室温封闭 1 h,甩干,然后向切片上滴加 $50\text{ }\mu\text{L}$ NGF 一抗工作液,置于冰箱中过夜,24 h 后取出切片,室温放置 30 min,加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 二抗,室温孵育 1 h, PBS 冲

洗;滴加 100 μ L 二氨基联苯胺显色,自来水冲洗,苏木精复染,自来水冲洗、常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封片,然后置于显微镜下观察。阳性细胞判定标准:细胞质被染为棕色,细胞核被染为蓝色。随机选 3 个视野($\times 200$),计数每个视野阳性细胞。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 21.0 软件进行数据统计与分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

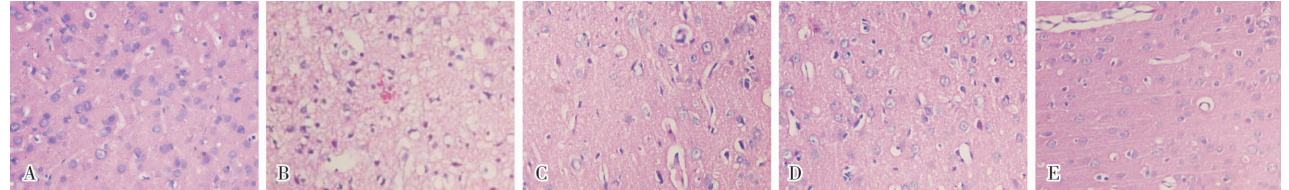
2.1 5 组大鼠神经功能缺损程度比较 结果见表 1。移植后 1、7、14、28 d,模型组、NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠 mNSS 评分显著高于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。移植后 1 d,模型组、NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠 mNSS 评分比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。移植后 7、14 d,NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠 mNSS 评分显著低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。移植后 7、14 d,NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠 mNSS 评分比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。移植后 28 d,NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠 mNSS 评分显著低于模型组,联合治疗组大鼠 mNSS 评分显著低于 NSCs 组和 OECs 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。移植后 28 d,NSCs 组与 OECs 组大鼠 mNSS 评分比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 5 组大鼠神经功能缺损程度比较

Tab.1 Comparison of the degree of neurological impairment of rats among the five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	mNSS 评分			
		移植后 1 d	移植后 7 d	移植后 14 d	移植后 28 d
假手术组	10	1.6 \pm 0.7	1.7 \pm 0.7	1.5 \pm 0.8	1.4 \pm 0.8
模型组	10	11.2 \pm 1.9 ^a	10.4 \pm 1.8 ^a	9.3 \pm 1.7 ^a	8.2 \pm 1.6 ^a
NSCs 组	10	11.0 \pm 2.0 ^a	8.6 \pm 1.7 ^{ab}	7.5 \pm 1.5 ^{ab}	5.9 \pm 1.3 ^{ab}
OECs 组	10	10.8 \pm 1.4 ^a	8.3 \pm 1.5 ^{ab}	7.3 \pm 1.8 ^{ab}	5.4 \pm 1.5 ^{ab}
联合治疗组	10	10.9 \pm 2.1 ^a	7.6 \pm 1.9 ^{ab}	6.4 \pm 1.3 ^{ab}	4.1 \pm 1.2 ^{abcd}

注:与假手术组比较^a $P < 0.05$;与模型组比较^b $P < 0.05$;与 NSCs 组比较^c $P < 0.05$;与 OECs 组比较^d $P < 0.05$ 。



A:假手术组;B:模型组;C:NSCs 组;D:OECs 组;E:联合治疗组。

图 1 5 组大鼠脑组织病理学形态(HE 染色, $\times 400$)

Fig.1 Brain histopathological morphology of rats in the five groups (HE staining, $\times 400$)

2.2 5 组大鼠脑组织中 IL-6、IL-1 β 、NGF 水平比较 结果见表 2。模型组、NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠脑组织中 IL-6、IL-1 β 水平显著高于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠脑组织中 IL-6、IL-1 β 水平显著低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。联合治疗组大鼠脑组织中 IL-6、IL-1 β 水平显著低于 NSCs 组、OECs 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。NSCs 组与 OECs 组大鼠脑组织中 IL-6、IL-1 β 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠脑组织中 NGF 水平显著高于假手术组、模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。假手术组与模型组大鼠脑组织中 NGF 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。联合治疗组大鼠脑组织中 NGF 水平显著高于 NSCs 组、OECs 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。NSCs 组与 OECs 组大鼠脑组织中 NGF 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 5 组大鼠脑组织中 IL-6、IL-1 β 、NGF 水平比较

Fig.2 Comparison of IL-6,IL-1 β and NGF levels in brain tissue of rats among the five groups ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}, \bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6	IL-1 β	NGF
假手术组	3	81.43 \pm 10.61	72.64 \pm 13.32	71.29 \pm 15.63
模型组	3	350.57 \pm 14.84 ^a	390.39 \pm 13.43 ^a	77.28 \pm 6.78
NSCs 组	3	297.36 \pm 6.76 ^{ab}	328.09 \pm 25.85 ^{ab}	235.17 \pm 15.56 ^{ab}
OECs 组	3	284.19 \pm 9.87 ^{ab}	302.37 \pm 16.97 ^{ab}	297.52 \pm 12.02 ^{ab}
联合治疗组	3	195.32 \pm 12.72 ^{abcd}	214.47 \pm 16.26 ^{abcd}	476.45 \pm 28.91 ^{abcd}

注:与假手术组比较^a $P < 0.05$;与模型组比较^b $P < 0.05$;与 NSCs 组比较^c $P < 0.05$;与 OECs 组比较^d $P < 0.05$ 。

2.3 5 组大鼠脑组织病理学改变 结果见图 1。假手术组大鼠脑组织结构完整,核仁明显,细胞排列有序。模型组大鼠损伤灶周围脑组织形态不规则,细胞肿胀,排列紊乱,可见坏死细胞及细胞核固缩,存在炎症细胞浸润。相较于模型组,NSCs 组及 OECs 组大鼠脑组织细胞肿胀,排列紊乱,细胞核固缩、炎症浸润现象稍有改善。相较于模型组、NSCs 组及 OECs 组,联合治疗组大鼠脑组织细胞排列相对规整,细胞肿胀减轻,核仁清晰。

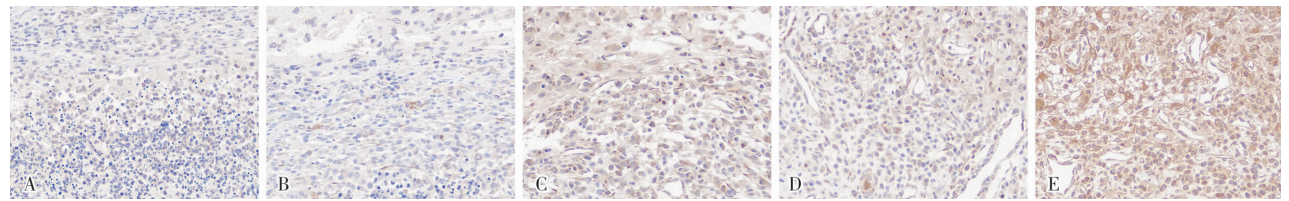
2.4 5 组大鼠脑组织中 NGF 蛋白表达比较 结果见表 3 和图 2。NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠脑组织中 NGF 阳性表达细胞数显著高于假手术组,模型组大鼠脑组织中 NGF 阳性表达细胞数显著低于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠脑组织中 NGF 阳性表达细胞数显著高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。联合治疗组大鼠脑组织中 NGF 阳性表达细胞数显著高于 NSCs 组、OECs 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。NSCs 组与 OECs 组大鼠脑组织中 NGF

阳性表达细胞数比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 5 组大鼠脑组织中 NGF 阳性表达细胞数比较
Tab.3 Comparison of the number of NGF positive expression cells in brain tissue of rats among the five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	NGF 阳性细胞数
假手术组	3	146.5 ± 65.1
模型组	3	61.4 ± 37.8 ^a
NSCs 组	3	276.3 ± 42.3 ^{ab}
OECs 组	3	249.0 ± 60.3 ^{ab}
联合治疗组	3	441.7 ± 57.3 ^{abcd}

注:与假手术组比较^a $P < 0.05$;与模型组比较^b $P < 0.05$;与 NSCs 组比较^c $P < 0.05$;与 OECs 组比较^d $P < 0.05$ 。



A:假手术组;B:模型组;C:NSCs 组;D:OECs 组;E:联合治疗组。
图 2 5 组大鼠脑组织中 NGF 表达情况(免疫组织化学染色, × 200)

Fig.2 Expression of NGF in brain tissue of rats in the five groups (immunohistochemical staining, × 200)

3 讨论

TBI 除了有外力直接打击造成的原发性损伤灶,还有继发性损伤,如炎症反应、细胞凋亡、脑水肿等^[11]。脑损伤后机体存在一定的自我修复功能,包括自发激活内源性 NSCs、分泌各种营养因子。NT-3 可维持神经元存活,在中枢神经系统发育过程中起调控作用,并能够影响神经细胞突触的活性。NGF 能够正向调节神经元的生长、发育以及分化,维护、修复神经系统功能。周围脑组织内环境的紊乱往往使 NSC 不能长时间生存、分化,各种营养因子不能稳定持久分泌,导致机体自我修复能力十分有限。

有研究表明,在动物模型中外源性的 NSCs 移植是促进神经细胞再生和恢复损伤部位微环境的有希望的治疗方式之一^[12]。然而,NSCs 的分化不受控制,分化的神经元比例有限,衍生的星形胶质细胞是细胞移植后胶质瘢痕的主要原因^[13]。有研究表明,移植 OECs 到中枢神经系统,不仅可以使脱髓鞘轴突再生并促进受损轴突的再生^[14],而且还可以调节免疫反应并促进血管生成^[15]。有研究发现,OECs 可以分泌多种神经营养因子,从而诱导 NSCs 向神经元的分化^[16-17]。研究发现,NT-3 基因修饰的 OECs 可更高水平地分泌 NT-3,提高 OECs 的神经修复作用^[18]。本研究结果显示,移植后 1、7、14、28 d,模型组大鼠 mNSS 评分显著高于假手术组,验证了 TBI 大鼠模型构建成功。本研究结果显示,移植后 7、14 d,NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠 mNSS 评分显著低于模型组,NSCs 组、OECs 组、联合治疗组

大鼠 mNSS 评分比较差异无统计学意义,说明移植后 7、14 d NSCs 和 NT-3 基因修饰的 OECs 单独或联合移植治疗均可改善大鼠神经功能缺损程度。本研究结果显示,移植后 28 d,NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠 mNSS 评分显著低于模型组,联合治疗组大鼠 mNSS 评分显著低于 NSCs 组和 OECs 组,NSCs 组与 OECs 组大鼠 mNSS 评分比较差异无统计学意义;说明移植后 28 d NSCs 和 NT-3 基因修饰的 OECs 单独或联合移植治疗均可改善大鼠神经功能缺损程度,且 NSCs 和 NT-3 基因修饰的 OECs 联合移植治疗对 TBI 大鼠的改善效果更好。此外,本研究 HE 染色结果显示,与模型组、NSCs 组和 OECs 组比较,联合治疗组大鼠,脑组织细胞排列相对规整,细胞肿胀减轻,核仁清晰,说明 NSCs 和 NT-3 基因修饰的 OECs 联合移植可明显改善 TBI 大鼠脑组织病理学改变。

TBI 在各种病理和生物化学反应下会导致损伤灶周围脑组织内环境紊乱。其中炎症反应发挥重要作用,其机制为细胞缺血、缺氧以及活化的炎症因子浸润神经组织,这些炎症因子又进一步增加了细胞的损伤程度,导致神经组织破坏,神经元变性、坏死,从而加重神经系统的损伤^[19]。胶质细胞分泌的炎症因子(如 IL-6、IL-1 β 等)在损伤部位广泛分布,是评价炎症反应的有效指标。本研究结果显示,模型组大鼠脑组织中 IL-6、IL-1 β 表达水平显著高于假手术组,这表明脑损伤后损伤灶周围炎症反应增加。此外,本研究结果显示,联合治疗组大鼠 IL-6、IL-1 β 表达水平显著低于模型组、NSCs 组、OECs 组,说明

NSCs 和 NT-3 基因修饰的 OECs 联合移植治疗可以显著降低大鼠脑损伤后神经系统的炎症反应。

NGF 是神经营养因子的一种,对表达 NGF 受体的细胞具有营养作用,并且在免疫和炎症反应中也起到一定作用。此外,NGF 可参与胶质细胞的增殖和分化,影响 NSCs 的潜在储备,调节 NSCs 的迁移和分化,并提供适合神经元存活的环境。因此,NGF 能促进脑损伤后神经功能的恢复^[20]。本研究结果显示,NSCs 组、OECs 组、联合治疗组大鼠脑组织中 NGF 阳性表达细胞数及 NGF 水平显著高于模型组,联合治疗组大鼠脑组织中 NGF 阳性表达细胞数及 NGF 水平显著高于 NSCs 组、OECs 组,NSCs 组与 OECs 组大鼠脑组织中 NGF 阳性表达细胞数及 NGF 水平比较差异无统计学意义;表明 NSCs 和 NT-3 基因修饰的 OECs 单独或联合移植治疗 TBI 大鼠均可提高脑组织中 NGF 表达水平,且联合移植治疗对 TBI 大鼠脑组织中 NGF 表达水平的提高更显著。

综上所述,NSCs 和 NT-3 基因修饰的 OECs 联合移植治疗 TBI 大鼠可显著减轻大鼠神经功能缺损程度,提高 NGF 表达水平,减轻炎症反应,从而起到神经保护作用。

参考文献:

[1] FEIGIN V L, BARKER-COLLO S, KRISHNAMURTHI R, *et al.* Epidemiology of ischaemic stroke and traumatic brain injury[J]. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2010, 24(4): 485-494.

[2] MUSTAFA A G, ALSHBOUL O A. Pathophysiology of traumatic brain injury[J]. *Neurosciences (Riyadh)*, 2013, 18(3): 222-234.

[3] GAGE F H. Mammalian neural stem cells[J]. *Science*, 2000, 287(5457): 1433-1438.

[4] FAIRLESS R, BARNETT S C. Olfactory ensheathing cells: their role in central nervous system repair[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(4): 693-699.

[5] GUÉROUT N, PAVIOT A, BON-MARDION N, *et al.* Co-transplantation of olfactory ensheathing cells from mucosa and bulb origin enhances functional recovery after peripheral nerve lesion[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e22816.

[6] DANG B, CHEN W, HE W, *et al.* Rehabilitation treatment and progress of traumatic brain injury dysfunction[J]. *Neural Plast*, 2017, 2017: 1582182.

[7] CHOJNACKI A, WEISS S. Production of neurons, astrocytes and oligodendrocytes from mammalian CNS stem cells[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 935-940.

[8] 迁荣军, 周迎春, 赵洪洋. 新生大鼠嗅鞘细胞的改良培养方法研究[J]. *神经解剖学杂志*, 2012, 28(3): 307-311.

QIAN R J, ZHOU Y C, ZHAO H X. The study of reformative culture method of olfactory ensheathing cells in neonatal rats[J]. *Chin J Neuroanat*, 2012, 28(3): 307-311.

[9] 张荣军, 游潮, 蔡博文, 等. Feeney 法建立大鼠闭合性脑损伤模

型及评估[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19(12): 1015-1018.

ZHANG R J, YOU C, CAI B W, *et al.* Establishment and evaluation of acute closed brain injury model in rats according to feeney's method[J]. *Chin J Reparat Reconstruct Surg*, 2005, 19(12): 1015-1018.

[10] 钟旺旺, 魏梁锋, 陈伟强, 等. 创伤性闭合性中型颅脑损伤动物模型的建立[J]. *中华神经创伤外科电子杂志*, 2019, 5(2): 106-109.

ZHONG W W, WEI L F, CHEN W Q, *et al.* Establishment of closed and moderate traumatic brain injury animal model[J]. *Chin J Neur Surgery*, 2019, 5(2): 106-109.

[11] NG S Y, LEE A Y W. Traumatic brain injuries: pathophysiology and potential therapeutic targets[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 528.

[12] CURTIS E, MARTIN J R, GABEL B, *et al.* A first-in-human, phase I study of neural stem cell transplantation for chronic spinal cord injury[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(6): 941-950. e6.

[13] HAN S S, KANG D Y, MUJTABA T, *et al.* Grafted lineage-restricted precursors differentiate exclusively into neurons in the adult spinal cord[J]. *Exp Neurol*, 2002, 177(2): 360-375.

[14] BARNETT S C, ALEXANDER C L, IWASHITA Y, *et al.* Identification of a human olfactory ensheathing cell that can effect transplant-mediated remyelination of demyelinated CNS axons[J]. *Brain*, 2000, 123 (Pt 8): 1581-1588.

[15] DEUMENS R, KOOPMANS G C, HONIG W M, *et al.* Olfactory ensheathing cells, olfactory nerve fibroblasts and biomatrices to promote long-distance axon regrowth and functional recovery in the dorsally hemisectioned adult rat spinal cord[J]. *Exp Neurol*, 2006, 200(1): 89-103.

[16] LIPSON A C, WIDENFALK J, LINDQVIST E, *et al.* Neurotrophic properties of olfactory ensheathing glia[J]. *Exp Neurol*, 2003, 180(2): 167-171.

[17] PELLITTERI R, SPATUZZA M, RUSSO A, *et al.* Olfactory ensheathing cell represent an optimal substrate for hippocampal neurons: an *in vitro* study[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2009, 27(5): 453-458.

[18] 郭守刚, 汪春娟, 董泗芹, 等. NT-3 基因修饰的嗅鞘细胞移植对自身免疫性脑脊髓炎大鼠神经修复及功能恢复的影响[J]. *中华医学杂志*, 2015, 95(27): 2219-2223.

GUO S G, WANG C J, DONG S Q, *et al.* Treatment of transplantation of NT-3 gene modified olfactory ensheathing cells on experimental autoimmune encephalomyelitis in rats[J]. *Natl Med J China*, 2015, 95(27): 2219-2223.

[19] 董菲菲, 潘宇政, 彭玲玲, 等. 甲状腺素对重型颅脑损伤大鼠神经细胞凋亡、NSE 及 IL-6 的影响[J]. *重庆医学*, 2017, 46(32): 4477-4480.

DONG F F, PAN Y Z, PENG L L, *et al.* Effect of thyroxine on neuronal apoptosis, serum NSE and IL-6 in rats with severe traumatic brain injury[J]. *Chongqing Med*, 2017, 46(32): 4477-4480.

[20] SUN Y, ZHU X, HOU J, *et al.* Effects of mouse nerve growth factor in treating cerebral injury in acute period caused by cerebral hemorrhage[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2020, 27(10): 2701-2705.

(本文编辑: 郭 潇)