

细胞外基质支架对大鼠嗅鞘细胞神经营养素表达的影响

蒋 锋, 胡萍萍, 沈丽萍, 吴晓红, 杨 平

[摘要]目的:构建一种复合型细胞外基质支架,并探讨其是否影响大鼠嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OEC)合成神经营养素。方法:将纤维蛋白原、层黏连蛋白和纤黏连蛋白按一定比例混合,在新鲜大鼠血浆促凝作用下,构建细胞外基质支架,在支架表面种植大鼠 OEC,观察其生长增殖情况和对神经营养因子表达能力的影响。结果:OEC 在复合支架上贴壁良好,增殖旺盛,伸出较长的突起。生长于复合支架上的 OEC 较玻璃片上的细胞合成更多的神经营养素。结论:细胞外基质支架能促进 OEC 增殖,同时促进 OEC 神经营养素分泌。

[关键词] 嗅鞘细胞;纤维蛋白原;层黏连蛋白;纤黏连蛋白;神经营养素;大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 338.3 **[文献标识码]** A

The influence of extra cellular matrix scaffold on the expression of neurotrophins in rat olfactory ensheathing cells

JIANG Feng, HU Ping-ping, SHEN Li-ping, WU Xiao-hong, YANG Ping

(Department of Medical Affairs, Zhenjiang Second People's Hospital, Zhenjiang Jiangsu 212001, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a kind of extracellular matrix scaffold and investigate whether it can influence the expression of neurotrophins in rat olfactory ensheathing cells. **Methods:** Mixed fibrinogen, laminin and fibronectin proportionally, then added fresh rat plasma to construct scaffold. Plated the rat olfactory ensheathing cells(OEC) on scaffold and then observed the influence of scaffold on proliferation and neurotrophin expression of OEC. **Results:** Rat OEC adhered to scaffold easily, proliferated quickly and extended long processes. Immunofluorescence and western blotting showed rat OEC on scaffold could produce more neurotrophins than those on glass. **Conclusions:** Extracellular matrix scaffold can promote proliferation of rat OEC and promote the production of neurotrophins.

[Key words] olfactory ensheathing cells; fibrinogen; laminin; fibronectin; neurotrophins; rat

脊髓损伤后神经再生困难,嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OEC)移植是治疗脊髓损伤的主要方法之一。OEC 不仅存在于嗅球中,而且存在于鼻腔嗅黏膜中,获取 OEC 较为方便。OEC 可以通过分泌神经营养因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养素-3(neurotrophin-3, NT-3)等在内的多种神经营养素来促进神经再生和修复^[1-2]。如何将 OEC 移植至损伤部位并保持细胞生长良好及功能对治疗效果有重要影响。以注射细胞悬液的方式移植简便,但 OEC 很容易从损伤部位流失。而应用组织工程支架移植 OEC 治疗脊髓损伤可能具有

良好的应用前景,但支架上生长的 OEC 是否仍然具有分泌神经营养素的能力目前尚不清楚。本实验利用 3 种细胞外基质(ECM)蛋白、纤维蛋白原(FG)、层黏连蛋白(LN)和纤黏连蛋白(FN)构建了一种复合支架,以圆玻片为对照,探讨这种复合支架对 OEC 中神经营养素表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 实验用 SD 雌性大鼠若干只,体重 250~300 g,由江苏大学实验动物中心提供;FG(F6755)、LN(L2020)和 FN(F7049)购自 Sigma 公司;新鲜鼠血浆为未加抗凝剂大鼠全血高速离心(4 000 r/min, 5 min)后的上清。DMEM、F12 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司;一抗:兔抗大鼠 NGF、BDNF、NT-3 等多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)

[收稿日期] 2009-06-22

[作者单位] 江苏省镇江市第二人民医院 医教科, 212001

[作者简介] 蒋 锋(1962-),男,硕士,研究员。

[参 考 文 献]

- Numaguchi Y, Okumura K, Harada M, et al. Catheter-based prostacyclin synthase gene transfer prevents in-stent restenosis in rabbit atherosclerotic arteries[J]. Cardiovasc Res, 2004, 61(1): 177-185.
- Pintucci G, Saunders PC, Gulkarov I, et al. Anti-proliferative and anti-inflammatory effects of topical MAPK inhibition in arterIALIZED vein grafts[J]. FASEB J, 2006, 20(2): 398-400.
- Saunders PC, Pintucci G, Bizakis CS, et al. Vein graft arterialization causes differential activation of mitogen-activated protein kinases[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004, 127(5): 1276-1284.
- Pintucci G, Mosecatelli D, Saponara F, et al. Lack of ERK activation and cell migration in FGF-2-deficient endothelial cells[J]. FASEB J, 2002, 16(6): 598-600.

标记的山羊抗兔 IgG 为 Santa Cruz 公司产品;分子成像系统为 Typhoon 9400 Variable Mode Imager, ECL plus 免疫印迹发光剂购自 Amersham Biosciences 公司;倒置显微镜为 Nikon 公司产品;荧光显微镜和图像分析软件为 Leica 公司产品;蛋白电泳仪、转印仪购于 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 OEC 的取材培养及纯化

成年 SD 大鼠经腹腔注射麻醉,无菌条件下取嗅黏膜,用无血清 DMEM/F12 混合培养基(含青霉素 200 u/ml 和链霉素 200 u/ml)漂洗数次,随后充分剪碎,离心后移入 0.25% 胰酶中消化,同时用吸管吹打,获得嗅黏膜混合细胞悬液,使用上述培养基洗涤,离心后使用完全培养基调整细胞密度至 1×10^6 /ml,接种于培养瓶内,置 CO₂ 培养箱内(37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度)培养。每 3 天换液 1 次,每日观察细胞生长状况并摄片。体外培养 14 天左右,原代培养细胞融合度可达 80% ~ 90%,此时进行传代培养。具体步骤包括:弃培养基,胰酶消化细胞,待细胞突起回缩,终止消化,再用完全培养基调整细胞密度至 1×10^6 /ml,重新接种于新的培养瓶,置培养箱培养。采用差速贴壁法纯化大鼠 OEC,传代后 8 h 左右,将培养瓶中悬浮细胞取出置于另一培养瓶内。由于 OEC 贴壁比成纤维细胞慢,悬浮细胞中主要是 OEC。将悬浮细胞再接种于新的培养瓶继续培养,用同样方法传代纯化 3 次后,小部分细胞接种于 24 孔板内圆盖玻璃片上用于 OEC 标记蛋白 NGFRp75、S100 和 GFAP 的免疫荧光染色鉴定,大部分接种于支架观察支架对 OEC 表达神经营养素的影响。

1.2.2 ECM 支架的制备及细胞接种

支架由 FG、LN 和 FN 3 种 ECM 蛋白构成。先将 LN 和 FN(终浓度均为 10 μg/ml)溶解于无血清 DMEM/F12(v/v = 1:1)混合培养基中,然后将 FG(终浓度为 100 mg/ml)溶于 LN/FN 混合液中。这 3 种 ECM 便混合成胶状物,将胶状混合物均匀涂抹于直径 1 cm 的无菌圆盖玻璃片上(预先置于 24 孔板内)。向胶状混合物中加入等体积新鲜大鼠血浆,置于培养箱内 37 °C, 1 h 左右便形成了 ECM 支架。将传过 4 代的纯化鼠 OEC 种植在 24 孔板内的支架表面,同时将来源于相同培养瓶的 OEC 种植在预先置于 24 孔板内的玻璃片表面作为对照,接种之前将细胞悬液密度调整至 1×10^6 /ml。同时以相同细胞密度种植于预铺支架和无支架的 6 孔板中,以便进行免疫印迹检测。每日观察摄片,每隔 3 天换液。

1.2.3 免疫荧光法检测 OEC 标记蛋白

细胞种植后培养至第 7 天弃去培养液,用 4% 多聚甲醛固定

细胞,PBS 清洗 3 次;0.25% Triton X-100 37 °C 孵育 30 min;正常山羊血清 37 °C 孵育 1 h;分别用小鼠抗 GFAP、S100β 和 p75 等单克隆抗体(稀释度均为 1:200)或兔抗 NGF、BDNF、NT-3 等多克隆抗体(均为 1:200 稀释度)4 °C 孵育 24 h,次日 37 °C 孵育 2 h;PBS 清洗 3 遍;Cy3 标记的山羊抗兔或小鼠 IgG(1:300 稀释度)37 °C 孵育 1 h;PBS 漂洗 3 遍;中性甘油封片,于荧光显微镜下观察及摄片。以 PBS 代替一抗或二抗作为阴性对照。

1.2.4 免疫印迹法检测 OEC NGF 表达

1.2.4.1 样品准备

将细胞种植于 6 孔培养板内(支架与对照各 3 孔),培养至第 7 天弃去培养液,用 PBS 清洗 3 次,将 6 孔板中的 OEC 及支架刮下,移至 1.5 ml Eppendorf 管中,快速离心弃上清,加入 200 μl 裂解液,细胞超声匀浆后置冰上裂解 1 h,4 °C,12 000 g 离心 15 min,取上清,加入上样缓冲液,煮沸 5 ~ 10 min,超低温冰箱冻存。

1.2.4.2 免疫印迹

配制 8% 分离胶和 5% 积层胶;上样后电泳,通过转印仪将凝胶中分离的蛋白转至聚偏氟乙稀(PVDF)膜上,用含 1% 吐温-20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBS-T)漂洗 1 次;5% 脱脂奶粉(TBS-T 稀释)室温封闭 1 h;用 NGF、BDNF 和 NT-3 等多克隆抗体(均为 1:200 稀释度)室温孵育 3 h;于摇床上 TBS-T 漂洗 30 min;HRP-山羊抗兔或小鼠 IgG(均为 1:10 000 稀释度,5% 脱脂奶粉配)室温孵育 1 h;于摇床上 TBS-T 漂洗 45 min;ECL-plus 发光剂室温孵育 5 min,于分子成像系统 Typhoon 9400 Variable Mode Imager 上扫描成像,选用三磷酸-甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参。该实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 OEC 标记蛋白的表达

体外培养的 OEC 形态有多种,包括双极、多极和多边形等,以双极和多极细胞为主。免疫荧光染色显示传代培养纯化后的 OEC 表达标记蛋白 NGFRp75、S100 和 GFAP(见图 1)。

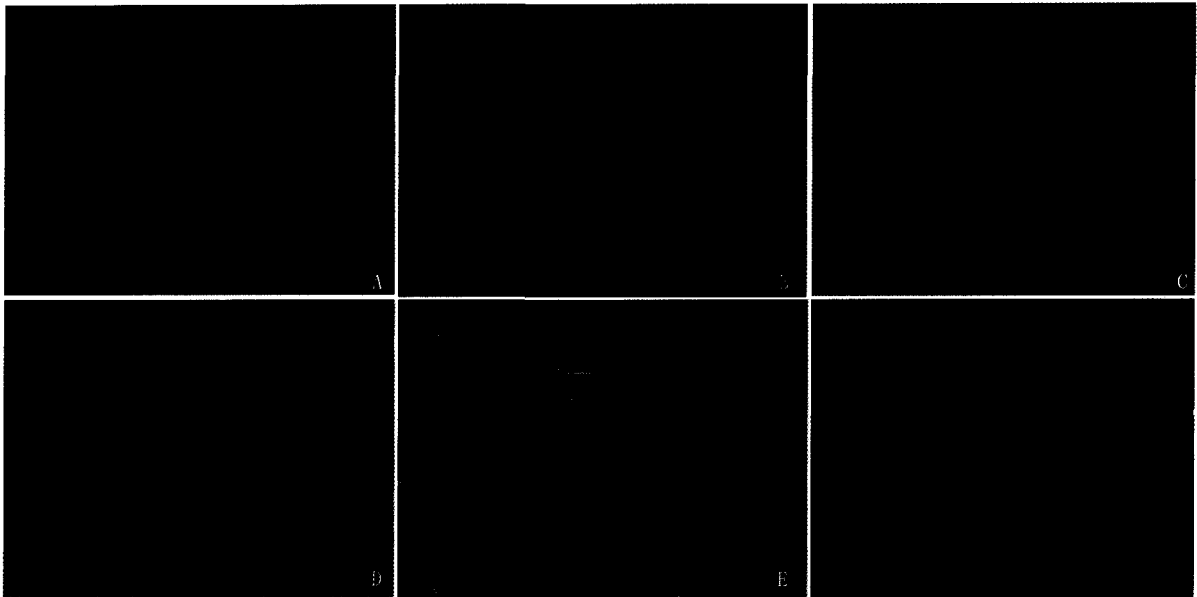
2.2 支架上 OEC 神经营养因子的表达

在培养过程中发现,与玻璃片相比,复合支架明显有利于 OEC 的贴壁。支架上的 OEC 排列较玻璃片上的细胞有序,伸出的突起更长;且细胞倍增时间较玻璃片上的细胞短,支架表面的细胞在种植后 7 天即达到增殖高峰,于该时间点用免疫荧光染色(见图 2)。

同时,支架表面培养的 OEC 细胞在种植 7 天达到增殖高峰时,取细胞提取蛋白进行免疫印迹(见



图 1 纯化后嗅鞘细胞形态及其 NGFRp75、S100 和 GFAP 的表达(A:NGFRp75;B:S100;C:GFAP)



A、C、E: 支架表面 OEC 中 NGF、BDNF、NT3 的表达;B、D、F: 玻片表面的 OEC 中 NGF、BDNF、NT3 的表达

图 2 免疫荧光染色显示 OEC 在支架和玻片中三种神经营养因子的表达

图 3), 检测 OEC NGF、NT3 和 BDNF 的表达水平。结果发现支架组 OEC 神经营养因子蛋白表达与 GAPDH(内参)蛋白条带光密度的比值均明显高于玻片组与 GAPDH 的蛋白条带光密度的比值($P < 0.01$)(见表 1)。

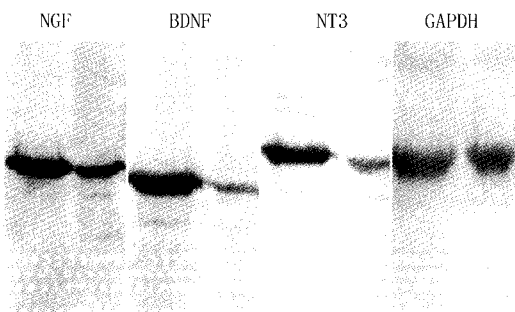


图 3 免疫印迹法检测 OEC 中因子 NGF、BDNF、NT3 在支架和玻片表达的比较(GAPDH 为内参)

表 1 支架上与玻片对照组中 NGF、NT3 和 BDNF 表达与内参的比值($n_i = 10; \bar{x} \pm s$)

分组	NGF/ GAPDH	BDNF/ GAPDH	NT3 /GAPDH
支架 OEC 与内参比值	4.115 ± 0.118	3.255 ± 0.105	1.496 ± 0.009
玻片 OEC 与内参比值	1.896 ± 0.091	0.371 ± 0.076	0.402 ± 0.036
<i>t</i>	47.09	70.36	93.23
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01

不仅能够包绕轴突形成髓鞘, 而且能够合成包括 NGF、BDNF 和 NT-3 在内的多种神经营养因子, 促进神经修复。因而 OEC 作为细胞移植疗法的种子细胞, 具有很广阔的应用前景, 不仅可以用于治疗脊髓损伤, 而且可以治疗其他的神经受损疾病, 如肌萎缩侧索硬化症、脊髓炎后遗症等。很多研究^[3-4]将 OEC 悬液注射到损伤部位进行细胞移植, 取得一定的效果, 但注射细胞悬液会导致 OEC 流失较多。有学者^[5]设计了一种新颖的复合支架, 主要由 3 种 ECM 蛋白组成, 包括 FG、FN 和 LN。3 种 ECM 成分

3 讨论

OEC 是一种神经胶质细胞, 移植到损伤部位

原液为可溶性,混合后加入的新鲜血浆可以促进 FG 转变为纤维蛋白,并与 FN 和 LN 共同形成网状的混合支架。选用这种混合支架具有诸多优点:(1)该支架的强度、稳定性、孔径和透明度与 FG 的浓度密切相关,可以通过调节 FG 的浓度来改变混合支架的物理性状,具有很强的可调节性;(2)未来临床应用该支架时,可以使用病人的血浆制作混合支架,降低应用血制品的危险性^[6]; (3)该支架的组织相容性优良,且在体内能够改建,并于一定时间后降解^[7]。虽然该支架的组分模拟 ECM,但是它对 OEC 生长的影响,特别是对 OEC 分泌神经营养因子的影响仍需进一步的实验来确定。

本实验将 OEC 种植于复合支架上,通过与种植在玻片上的 OEC 比较发现,支架上的细胞贴壁较快,增殖能力旺盛,且伸出较长的突起。纤维蛋白、FN 和 LN 上存在保守的 RGD 序列(Arg-Gly-Asp,即精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸序列),而大部分细胞的细胞膜表面均存在整合素分子。生理情况下,整合素分子能特异识别 ECM 中的 RGD 序列,介导细胞与 ECM 蛋白、细胞与细胞间的黏附,对细胞的迁移分化和生物学行为影响较大^[8]。

比如, FN 中的 RGD 所介导的细胞黏附对体内外周神经轴突延伸起着重要作用^[9]。我们所使用的支架表面富含 RGD 序列,故易使 OEC 贴壁,利于 OEC 增殖,能促进其突起的延伸。免疫荧光检测表明, OEC 种植到复合支架上经 7 天培养后高表达神经营养因子 NGF、BDNF 和 NT-3。免疫印迹能够半定量地检测细胞合成 NGF、BDNF 和 NT-3 明显高于生

长在玻片上细胞的表达水平。这可能与复合支架促进 OEC 增殖,使 OEC 合成功能增强有关。提示,用该组织工程支架移植修复脊髓损伤可促进神经纤维的再生。

[参 考 文 献]

- [1] 赵楠,冯忠堂,苏平,等. 嗅鞘细胞促进神经干细胞增殖的实验研究[J]. 解剖学报,2008,39(1):40-45.
- [2] Cao L, Zhu YL, Su Z, et al. Olfactory ensheathing cells promote migration of Schwann cells by secreted nerve growth factor[J]. *Glia*,2007,55(9):897-904.
- [3] 王国毓,贺西京,袁普卫,等. 嗅鞘细胞移植对脊髓损伤大鼠诱发电位的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(1):505-508.
- [4] 刘超,郑遵成,高瑞,等. 嗅鞘细胞移植术后脊髓损伤患者功能的评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(16):3037-3040.
- [5] 钱雷敏,张志坚,龚爱华,等. 嗅鞘细胞/细胞外基质夹层支架的制备和形态学观察[J]. 中国生物医学工程学报,2007,26(3):436-440.
- [6] Jockenhoevel S, Zund G, Hoerstrup SP, et al. Fibrin gel-advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*,2001,19(4):424-430.
- [7] Shaikh FM, Kavanagh EC, Burke PE, et al. Fibrin: a natural biodegradable scaffold in vascular tissue engineering[J]. *Cells Tissues Organs*,2008,188(4):333-346.
- [8] Villard V, Kalyuzhnyi O, Riccio O, et al. Synthetic RGD-containing alpha-helical coiled coil peptides promote integrin-dependent cell adhesion[J]. *J Pept Sci*,2006,12(3):206-212.
- [9] Liu WQ, Martinez JA, Durand J, et al. RGD-mediated adhesive interactions are important for peripheral axon outgrowth in vivo[J]. *Neurobiol Dis*,2009,34(1):11-22.

部分疾病名称的英文缩略语(二)

病名	英文缩略语	病名	英文缩略语
急性细菌性心内膜炎	ABE	左心室衰竭	LVF
腺样囊性癌	ACC	二尖瓣狭窄	MS
急性播散性脑脊髓膜炎	ADEM	二尖瓣狭窄(并)关闭不全	MST
心房纤颤	AF	进行性肌萎缩	PMP
急性出血性胰腺炎	AHP	呼吸困难综合征	RDS
急性呼吸窘迫征	ARDS	风湿热	RF
良性前列腺肥大	BPH	右心室肥大	RVH
充血性心力衰竭	CHF	蛛网膜下腔出血	SAH
慢性淋巴细胞性白血病	CLL	恶性贫血	PA
脑脊膜炎	CSM	结核性脑膜炎	TBM