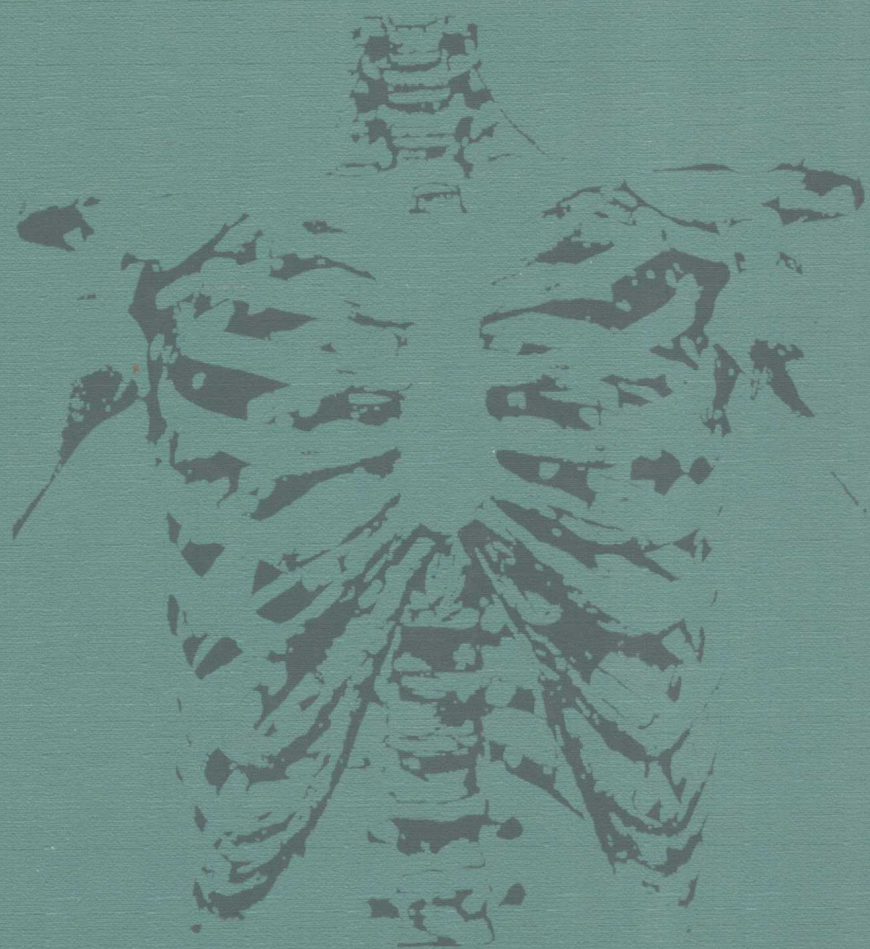


GUKE JIBING YANJIU

骨科疾病研究

主 编 / 唐 勇 马元琛 杨志华



广西民族出版社

骨科疾病研究

主 编 / 唐 勇 马元琛 杨志华

广西民族出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

骨科疾病研究/唐勇主编. —南宁: 广西民族出版社, 2008. 5

ISBN 978-7-5363-5467-8

I. 骨… II. 唐… III. 骨科疾病—研究 IV. R68

中国版本图书馆CIP数据核字 (2008) 第054239号

骨科疾病研究

主编 / 唐 勇 马元琛 杨志华

出版发行	广西民族出版社 (地址: 南宁市桂春路3号	邮政编码: 530028)
发行电话	(0771) 5523216 5523226	传真: (0771) 5523246
E - m a i l	CR@gxmzbook. cn	
责任编辑	凌华	
装帧设计	林武圣	
责任校对	陈少毅	
责任印制	黄绍红	
印 刷	南宁市福青印务有限责任公司	
规 格	889毫米×1194毫米 1/16	
印 张	17	
字 数	340千字	
版 次	2008年9月第1版	
印 次	2008年9月第1次印刷	

ISBN 978-7-5363-5467-8/R • 213

定价: 66.00元

如发现印装质量问题, 影响阅读, 请与出版社联系调换。

电话: (0771) 5523216

主编简介

ZHUBIAN JIANJIE

唐 勇

讲师、医学硕士。作为主要研究人员在国内首先进行嗅鞘细胞移植修复脊髓损伤的基础研究；国内外首先采用深低温保存的方法保存人胚嗅鞘细胞，既降低了免疫原性，又为将来急诊病人的细胞移植治疗奠定了基础；对嗅鞘细胞的免疫原性以及迁移功能进行研究，并对其作用机理进行了有益的探讨。目前参与承担国家自然科学基金、省自然科学基金、省科技厅重点攻关项目及市科委重大项目等8项研究，参与建设中国脊髓损伤网络广东工作点。参与主编专著1部，发表SCI收录文章2篇，国内核心期刊40篇。

编写人员

BIANXIE RENYUAN

主 审 沈慧勇（中山大学附属第二医院）

主 编 唐 勇（中山大学附属第二医院）

马元琛（广东省人民医院）

杨志华（广州医学院附属第一医院）

副主编 吴燕峰（中山大学附属第二医院）

杨 为（暨南大学附属第一医院）

参加编写人员（按拼音排序）

韩国伟（中山大学附属第一医院）

黄 霖（中山大学附属第二医院）

黄民锋（广西中医学院附属瑞康医院）

梁 敏（中山大学附属第二医院）

马立泰（四川大学华西临床医学院华西医院）

谭佑光（广东省平州人民医院）

王 鹏（中山大学干细胞与组织工程研究中心）

韦 勇（广西中医学院附属瑞康医院）

吴卓鹏（广东省开平人民医院）

杨 睿（中山大学附属第二医院）

曾采采（中山大学附属第二医院）

曾宪尚（中山大学附属第一医院）

目 录

CONTENTS

【第一篇 基础研究】

第一节	建立适用于细胞移植的人嗅鞘细胞培养方法	3
第二节	人嗅鞘细胞的免疫学特性研究	6
第三节	嗅鞘细胞移植后在脊髓中迁移特性的研究	9
第四节	嗅鞘细胞移植促进大鼠横断脊髓轴突再生的研究	12
第五节	延迟植入嗅神经鞘细胞对成鼠胸髓损伤修复的研究	14
第六节	神经营养因子及其作用	17

【第二篇 关节、创伤】

第一节	DHS内固定治疗骨质疏松性股骨转子间骨折的临床研究	59
第二节	半髓置换治疗高龄股骨转子间骨折	62
第三节	股骨转子间骨折发病与季节关系的临床研究	65
第四节	非扩髓型髓内钉在胫骨开放性骨折急诊手术中的应用	68
第五节	髓内固定与钉板系统治疗股骨转子间骨折中远期疗效 的比较研究	71
第六节	骨折内固定松动与运动方式关系的生物力学评价	75
第七节	老年骨盆骨折的治疗体会	80
第八节	后路减压内固定治疗胸腰椎骨折合并脊髓损伤	82
第九节	双头和单头螺纹中空加压螺钉治疗齿突骨折的生物力学 比较研究	86

CONTENTS

第十节 早期前后联合入路治疗下颈椎骨折脱位并脊髓损伤.....	89
第十一节 DTI在胸椎无骨折脱位型脊髓损伤诊断中的应用	92
第十二节 脊髓损伤的治疗药物	95
第十三节 C型臂引导下小切口全髋关节置换术的疗效观察	116

【第三篇 脊柱疾病研究】

第一节 一种用于决定青少年特发性脊柱侧凸脊柱融合范围的新的 分类方法	121
第二节 采用新分类法对青少年特发性脊柱侧凸的统计分析	135
第三节 多个外科医生评价青少年特发性脊柱侧凸的外科决策	146
第四节 青少年特发性脊柱侧凸分型在自身观察和观察者间可靠 性的研究	155
第五节 前路单棒系统治疗胸腰椎特发性脊柱侧凸可保持腰椎前曲	166
第六节 前路和后路手术治疗腰段和胸腰段特发性脊柱侧凸的疗效 比较	176
第七节 528例脊柱侧凸矫形手术并发症分析及对策	180
第八节 后路半椎体切除、器械矫正内固定治疗先天性脊柱侧凸	184
第九节 脊柱侧凸前路手术治疗的远期疗效	188
第十节 脊椎侧凸手术625例的回顾	192
第十一节 恩再适治疗腰椎间盘突出引起的神经根性疼痛的临床观察	194

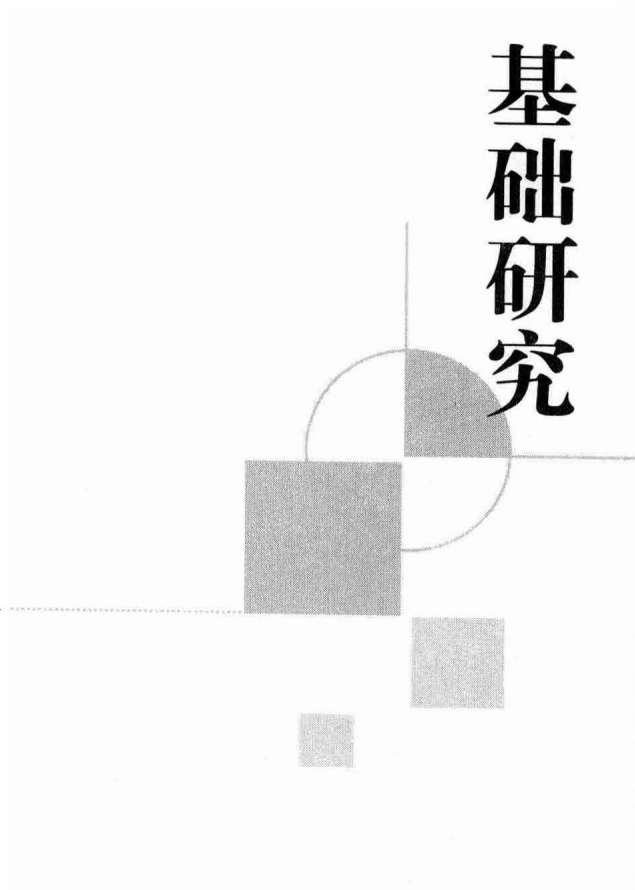
CONTENTS

第十二节	膨胀式椎体成形器在经皮后凸成形术中的应用	197
第十三节	微创小切口在胸腰椎前柱重建的应用	200
第十四节	腰椎滑脱手术治疗探讨	204
第十五节	腰椎间盘突出并椎体后缘离断症的手术治疗	206
第十六节	椎间盘源性腰痛治疗进展	210
第十七节	后路减压植骨融合3D脊柱内固定系统治疗腰椎滑脱症	215
第十八节	自由基清除剂在脊髓型颈椎病围手术期的应用	219

【第四篇 骨科康复、护理】

第一节	关节活动技术	225
第二节	增强肌力技术	232
第三节	牵引、悬吊与减重步行训练	244
第四节	手术治疗脊柱结核的整体护理	253
第五节	关节镜下冰冻保存的同种异体韧带重建膝关节 交叉韧带的康复训练与护理	255
第六节	俯卧位脊柱后路手术体位的术中护理	257

第一篇 基础研究



第一节 建立适用于细胞移植的人嗅鞘细胞培养方法

嗅神经系统是极少数可以再生的中枢神经系统之一,其再生能力与嗅球胶质的一种细胞——嗅鞘细胞(Olfactory ensheathing cells, OECs)密切相关,嗅神经再生的过程中,OECs不仅可诱导再生神经纤维长入中枢的嗅球,对其具有保护作用,而且可分泌多种生物活性物质。同时文献^[1,2]表明无论在体内或体外OECs都有促进中枢神经元轴突生长的作用,且强于雪旺细胞。OECs的这些神经生物学特性,引起了人们的极大兴趣,以修复、治疗神经系统损伤为目的的细胞移植研究已成为近期的研究热点,OECs则成为主要候选细胞之一。但由于OECs的特殊分布(分布于嗅球的嗅神经层及嗅神经),给其分离、培养及深入研究带来极大困难。我们在实验中经过长期摸索建立了一种较为简便易行、省时、经济的方法,适用于细胞移植的研究,现报道如下。

研究方法

OECs分离:选取自愿捐献孕5个月的流产胎儿,在无菌条件下取出其完整嗅球,置于盛有D-HanKs液的培养皿中,

在解剖显微镜(放大20倍)下,剔除软脑膜及毛细血管网,顺嗅球长轴方向夹碎嗅球,用眼科镊子直接将嗅球撕烂、挤压,将片状组织转移至离心管内,用D-HanKs液洗2次,用0.25%胰酶(Sigma)37℃消化20min。加入含20%胎牛血清(FCS)的DF12培养基5mL终止胰酶的消化反应。静置10min,然后将漂浮在培养液中的絮状组织小心吸出,在另一加有20% FCS的DF12培养基的离心管内用D-HanKs液漂洗3次。

OECs纯化:用20%FCS的DF12培养基将其制成单细胞悬液,以 1×10^5 cells/mL的密度接种于未涂胶的底面积为 25cm^2 的斜口塑料培养瓶中,于37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中进行培养。

OECs置于5%CO₂培养箱37℃培养12h,将培养上清连同未贴壁细胞转种于另一个未涂胶的塑料培养瓶,再培养12~18h,取上清调整细胞密度为 1×10^6 cells/mL,种植于经Poly-L-Lysine处理的24孔板内,继续进行培养。

OECs免疫细胞化学染色及纯度检测:将生长良好的P₃代细胞爬片,经4%多聚甲醛溶液常温下固定30min,PBS洗涤3遍×5min;用0.1%TritonX-100溶液常温下孵

育10min, PBS洗涤3遍 $\times$ 5min; 经正常山羊血清封闭液(即用型)37℃孵育30min, 甩干不洗, 再分别滴加小鼠抗人p75、兔抗人GFAP单克隆抗体200 μ L(1:100稀释), 4℃过夜, PBS洗涤3遍 $\times$ 5min; 然后滴加羊抗小鼠IgG-Cy3 100 μ L(1:100稀释)、羊抗兔IgG-FITC 100 μ L(1:16稀释), 湿盒内37℃孵育30min, PBS冲洗3遍 $\times$ 5min; 最后用甘油封片, 在荧光镜下观察、拍照并计算纯度。

结果

OECs的形态学观察

Olympus倒置相位差显微镜下观察, 接种12h可见小部分细胞开始贴壁, 细胞呈透亮圆形, 72h可见大量细长梭形细胞贴壁, 呈单个分散或成簇放射状, 细胞形态较均匀, 胞体折光性强, 随后贴壁细胞迅速增殖, 8~12d细胞达80%~90%融合, 细胞之间呈现一定的趋向性。传代后细胞贴壁较快, 12h完全贴壁, 大多数细胞呈现三角形、梭形, 有些细胞突起较长, 偶见成纤维细胞出现。随后细胞连成网络状, 4~5d后细胞可达90%融合, 通过传代OECs逐渐纯化。

免疫组化染色

OECs免疫组化结果显示: p75染色均匀分布于整个细胞和突起, 核区较为浅淡。GFAP荧光染色主要分布于胞浆。OECs阳性率为95.3%。

研究进展

现有资料已证明, OECs在嗅神经再生的过程中起着十分重要的作用, 它能诱

导保护嗅神经长入中枢。无论在体内或体外OECs都有促进中枢神经元轴突生长的作用。但是, OECs作为神经损伤修复的移植材料, 都需要大量、高纯度、活性好的OECs。寻找更好的分离、培养、纯化OECs的方法无疑成为当前亟待解决的问题之一。

含OECs丰富的嗅神经层非常薄, 即使在解剖显微镜下也无法与其他组织区别, 嗅神经更是难于找到, 分离效果很差, 我们在实验中应用直接挤压法将其分离。直接挤压法的特点是直接撕压嗅球, 操作简单易行、省时, 不需要特殊仪器设备, 损失的OECs较少, 产量高。OECs和雪旺氏细胞均对L1和p75、S-100抗体呈阳性免疫反应^[3,4], 但OECs表达中枢形式的GFAP, 雪旺氏细胞则不表达。本实验用p75、GFAP单克隆抗体进行鉴定, 证明所培养的细胞为OECs。

以OECs作为移植材料, 其需求量大, 要求细胞的纯度高、活性好。OECs的纯化方法较多^[5-7], 一般有差速贴壁法、化学药物法、免疫吸附纯化法与磁珠分离法。抗体吸附纯化法纯化效果最好, 其纯度可达99%以上, 是目前国外多家研究机构采用的方法, 但是此法步骤较为繁琐, 需要大量抗体, 因此对于需求量较大的细胞学实验研究因该方法费用昂贵而限制了其使用。而且纯化后的细胞接种后不易贴壁, 同时细胞经过反复清洗, 活性下降, 给下一步培养带来了一定的困难, 并且抗体的使用会干预随后的细胞标记以及细胞的正常功能, 例如: 膜受体的抗体可能改变膜受体的构象, 激活或封闭膜受体, 影响细胞内正常的信号通路, 不利于细胞信号通路的研究; 磁珠分离法细胞获得率高, 但是通过多次洗涤细胞及更换细胞培养液,

仍然可以观察到磁珠与细胞相连。目前,国内多采用化学药物法纯化OECs,抑制剂一般使用Ara-c, Ara-c不是特异的有丝分裂抑制剂,它在成纤维细胞生长高峰期将其杀死,但同时OECs的生长也有抑制作用。以上纯化方法均会影响细胞的功能,不适宜OECs体内功能方面的研究,本文应用的差速贴壁法的基本原理是利用从嗅球最外两层所得的细胞贴壁速度不同来纯化细胞^[8]。成纤维细胞接种到未涂胶的瓶中1h内开始贴壁,未贴壁的细胞大部分是星形胶质细胞及OECs。转种到另一未涂胶的瓶中培养12~18h,星形胶质细胞贴壁,而嗅鞘细胞需24~48h才能贴壁,因此,悬浮的细胞大部分是OECs。再转种到涂有Poly-L-Lysine的塑料24孔板中,即可得到纯度高、活性好的OECs。这种方法纯化的OECs,没有结合另外的分子和颗粒,花费相对少,操作简单,所得细胞数量多,纯度高。

我们按照国外采用两次差异贴壁纯化方法,在此基础上,在分离方法上改用直接挤压法,所培养的OECs纯度高、产量高,不影响细胞功能^[9],适宜细胞移植对功能恢复的研究。

参考文献

- [1] Imaizumi T, Lankford KL, Kocsis JD. Transplantation of olfactory ensheathing cells or Schwann cells restores rapid and secure conduction across the transected spinal cord. *Brain Res*, 2000,854(1-2): 70~8
- [2] 沈慧勇, 吴燕峰, 闵军, 等. 嗅神经髓鞘细胞移植促进大鼠横断脊髓轴突再生的研究. *中华实验外科杂志*, 2001,18(06):576~577
- [3] Franceschini IA, Barnett SC. Low-affinity NGF-receptor and E-N-CAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage. *Dev Biol*, 1996,173(1):327~43
- [4] Thompson RJ, Roberts B, Alexander CL, et al. Comparison of neuregulin-1 expression in olfactory ensheathing cells, Schwann cells and astrocytes. *J Neurosci Res*, 2000,61(2):172~85
- [5] Barnett SC, Hutchins AM, Noble M. Purification of olfactory nerve ensheathing cells from the olfactory bulb. *Dev Biol*, 1993,155(2):337~50
- [6] Ramon-Cueto A, Nieto-Sampedro M. Glial cells from adult rat olfactory bulb: immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells. *Neuroscience*, 1992,47(1):213~20
- [7] Ramon-Cueto A, Perez J, Nieto-Sampedro M. In vitro enfolding of olfactory neurites by p75 NGF receptor positive ensheathing cells from adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci*, 1993,5(9):1172~80
- [8] Nash HH, Borke RC, Anders JJ. New method of purification for establishing primary cultures of ensheathing cells from the adult olfactory bulb. *Glia*, 2001,34(2):81~7
- [9] 沈慧勇, 吴燕峰, 唐勇等. 人嗅鞘细胞的免疫学特性研究. *中华实验外科杂志*, 2005,22(09):1103~1104

(唐勇 吴燕峰)

第二节 人嗅鞘细胞的免疫学特性研究

嗅鞘细胞(OECs)对中枢神经的再生具有促进作用,被广泛应用于中枢神经系统损伤的研究中^[1]。嗅鞘细胞不但能诱导脊髓轴突再生,而且能促进再生轴突长入远端与靶器官形成新的功能性突触^[2]。我们在国内首先开展嗅鞘细胞分离、纯化的实验研究^[3],本实验采用流式细胞仪分析标记抗原、混合淋巴细胞反应的方法,对人嗅鞘细胞的免疫学特征进行初步研究,并与骨髓间充质干细胞(MSC)对比,为人嗅鞘细胞的移植提供研究基础。

研究方法

试剂:低糖的DMEM培养液(L-DMEM, Gibco BRL公司)、胎牛血清(Hyclone公司)、淋巴细胞分离液(Ficoll paque)、荧光标记小鼠抗人抗体(Ancell公司):CD14-PE、CD44-FITC、CD90-PE、CD105-FITC、CD166-FITC、CD34-PE、CD45-FITC、CD11a-FITC、CD80-FITC、CD86-FITC、CD33-FITC、CD29-PE、CD38-PE、CD59-PE、CD40、CD40L、CD117。

嗅鞘细胞的分离、培养与纯化:前颅肿瘤切除时收集嗅球及嗅束,无菌条件下

取出嗅球及嗅束,0.1%(w/w)胰蛋白酶37℃消化15min后,移至聚左旋赖氨酸处理过的培养皿中,在含10%(w/w)AB型血清的DMEM/F12(1:1)培养液中培养,2d后贴壁细胞为细长的多极细胞和少量的荷包蛋样细胞,继续传代培养至2周,最后仅余多极的OEC贴壁生长。采用人抗神经生长因子受体抗体免疫细胞化学染色鉴定。纯化后的人OEC放入超低温冰箱冻存。

MSC的纯化:骨髓用L2DMEM稀释,按常规分离方法用Ficoll梯度离心制备单个核细胞。细胞经洗涤后以 1×10^6 个/mL密度分别接种于25cm²的塑料培养瓶,加入含10%(w/w)胎牛血清的L2DMEM培养基和MSC专用培养基,培养条件为37℃,5%(v/v)CO₂。5d后全量换液,去除未贴壁细胞,以后每3d换液1次,待细胞融合达80%~90%,用0.25%(w/w)胰酶消化,按1:3的比例传代。每3d换液,并逐日观察细胞的生长情况,待基本融合后,再用胰酶消化。

应用FACSscan流式细胞仪分析两种细胞样本中 1×10^4 个细胞的相应标记抗原的阳性表达率,每个样本都用FITC或PE标记,同型IgG作为相应的阴性对照。

单向混合淋巴细胞反应:无菌条件取

手术切除脾脏组织,铜网研磨制备细胞悬液,以淋巴细胞分离液分离淋巴细胞并用尼龙毛柱去除B细胞,用完全培养液调整细胞数为 3×10^5 个/mL。混合淋巴细胞试验:分别将OEC、MSC细胞经30Gy辐照灭活,然后加入96孔U型板100 μ L/孔(3×10^5 个/mL),各设平行的6个复孔,对照组为培养液。过夜培养使其贴壁,次日每孔吸出上清50 μ L,然后补加等体积的培养液,最后加100 μ L新鲜分离的人脾淋巴细胞进行单向异种混合淋巴细胞培养,培养细胞置37℃、5%(v/v) CO₂孵箱培养6d。收样前18h每孔加1 μ Ci的³H-TdR,自动收集仪收集细胞于玻璃纤维膜上,液闪仪测cpm值。

统计学方法:OECs、MSC及对照组的cpm值比较采用t检验。

结果

嗅神经鞘细胞的分离、纯化与鉴定:嗅球、嗅束及部分嗅神经分离后,经过一次传代,附壁细胞为细长的多极细胞及荷包蛋样细胞,后者在体外难以长期生长,在2周后培养瓶中多极细胞占95%以上。利用OECs表达神经生长因子受体(NGFR)的特性,采用免疫细胞化学方法进行鉴定,多极细胞均呈阳性染色,证明多极细胞即是OECs。

MSC的分离、纯化与鉴定,成人骨髓单核细胞接种于塑料培养瓶后,2~3d开始出现贴壁细胞。将贴壁细胞培养2周后可得到大量的细胞集落,细胞形态均一。流式细胞仪检测间充质干细胞表面标志:CD29、CD44、CD59、CD90、CD105、CD166为阳性,而造血细胞表面标志:CD11a、CD14、CD33、CD34、CD28、

CD45、CD117表达均为阴性。

人OECs与MSC免疫原性检测人OEC与MSC表面与移植免疫排斥发生密切相关的标志:HLA2DR、B721(CD80)、B722(CD86)、CD40和CD40L均为阴性。

单向混合淋巴细胞反应的cpm值:OECs组的cpm值为 18684.67 ± 212.232 ,MSC组的cpm值为 18679.33 ± 290.180 ,对照组的cpm值为 18599.67 ± 33.262 。各组之间的cpm值进行t检验,P值均大于0.05,显示OECs、MSC均对混合淋巴细胞反应无明显的刺激作用。

研究进展

OECs兼具星形胶质细胞和雪旺细胞的特性,但与雪旺细胞最大的不同点是伴随嗅神经的轴突通向属于中枢神经的嗅球,而后者只见于周围神经。发育成熟的嗅上皮双极细胞连续不断地更新换代,新长出的轴突持续生长,在嗅神经鞘细胞的支持、引导下直至嗅球并完成新的功能性连接。OECs通常并不产生髓磷脂,但不论在体内还是在体外,均可使脱髓鞘的轴突重新获得髓鞘^[4]。作者曾将人OECs与中枢神经元混合培养,发现OECs不但有成髓鞘作用,而且对神经元的轴突生长有趋向诱导作用。

本实验对人OECs的免疫学特征进行初步研究,并与MSC进行比较,为人OECs的移植、细胞联合移植提供实验室研究的依据。我们检测了人OECs、MSC表面与免疫排斥发生密切相关的标志,发现HLA-DR、CD80、CD86、CD40和CD40L均为阴性。目前的研究表明,HLA-DR位点是异基因移植时免疫排斥反应发生的主要位

点; CD80 和CD86 是免疫排斥反应发生的最重要共刺激通路B7/ CD28 的信号分子; 近年来对CD40/CD40L 共刺激通路的研究表明, 该通路的阻断可明显降低免疫排斥反应的发生率。结果提示人OECs与MSC 一样, 可能是一种免疫缺陷细胞。混合淋巴细胞反应是体外模拟细胞免疫反应比较简单、可靠的方法, 由于供、受体主要组织相容性抗原的差异, 受体淋巴细胞识别供体细胞导致细胞活化伴有增殖, MLC 反映供、受者的组织相容性及淋巴细胞对异体抗原的反应能力, 所以MLC 很早就被用于测定供、受者的组织相容性和测定免疫耐受性^[5], 混合淋巴细胞反应程度与两个个体组织不相容程度成正比。有研究本实验结果显示, OECs与MSC类似, 对同种异体淋巴细胞反应均无明显的刺激作用, 实验结果与OECs、MSC表面抗原标志检测一致。提示OECs、MSC在体外有诱导细胞移植免疫耐受性的作用。

参考文献

[1] Li Y,Field PM,Raisman G. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. Science ,1997 ,277 :2000~2002

[2] Ramon-Cueto , Isabel C , Fernando F. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. Neuron , 2000 ,25 : 425~438.

[3] 沈慧勇,吴燕峰,闵 军等. 嗅神经鞘细胞移植促进大鼠脊髓轴突再生的实验研究. 中华实验外科杂志,2001 ,18 :576~577

[4] Franklin RJ . Remyelination by transplanted olfactory ensheathing cells. Anat Rec,2003 ,271 :71~76

[5]Bach FH ,Bach ML ,Sondel PM ,et al. Differential function of major histocompatibility complex antigens in T2lymphocyte activation. Nature ,1976 ,259 :237

[6] Di Nicola M ,Carlo2Stella C ,Magni M ,et al. Human bone marrow stromal cells wuppress T2lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli,Blood,2002,99 : 3838~3843

(吴燕峰 唐 勇)

第三节 嗅鞘细胞移植后在脊髓中 迁移特性的研究

传统观点认为,发育成熟的哺乳动物中枢神经损伤后,由于神经元自身再生能力差和胶质微环境的抑制,损伤神经是不能再生的。嗅鞘细胞(Olfactory ensheathing cells, OECs)是目前所知唯一能够诱导支持周围神经长入中枢神经的胶质细胞,移植入脊髓后不但能诱导神经再生,还能促进损伤脊髓的功能恢复。Li等^[1]于1997年报道了应用OECs移植治疗脊髓损伤,此后大量的研究证明,OECs移植修复CNS的损伤具有广阔的应用前景^[2]。本实验将OECs移植在大鼠横断的脊髓中,观察其在脊髓中的生存、迁徙行为,了解其在移植后的生物学特性,进一步探讨其促进CNS再生的作用机理。

研究方法

嗅神经鞘细胞的分离与培养

2个月的SD大鼠2只,断头后咬骨钳咬开颅骨,无菌条件下取出完整嗅球和部分嗅神经。用质量浓度0.1%胰蛋白酶消化分离原代培养组织,在聚左旋赖氨酸处理过的培养皿中培养。2d后主要有3种细胞:多极细胞、荷包蛋样细胞及梭形细胞,前两

种细胞附壁生长,后者利用悬浮生长的特性去除。多极细胞及荷包蛋样细胞继续在玻璃培养皿培养,前者仍附壁生长而后者悬浮生长。用质量浓度为0.25%的胰蛋白酶处理附壁的多极细胞,继续培养2周,经抗神经生长因子受体抗体染色,证实90%以上为嗅神经鞘细胞(记数300个细胞)。

标记

将DMEM放入恒温水槽中预热,保持温度在37℃,把嗅鞘细胞培养加入DMEM摇匀,加入DNA荧光染料双苯亚甲胺(Sigma)至终浓度为5 μg/mL。37℃水浴90min,存放于4℃。

脊髓横断损伤模型建立与细胞移植2个月龄SD雄性大鼠36只,体重(350g±20g),随机分3组,每组12只。10%水合氯醛(300mg/kg)腹腔麻醉后,背部正中切口,显露T10并行全椎板切除(必要时切除部分T9及T11部分椎板),A、B组用显微外科剪将T10水平脊髓半横断,建立脊髓损伤模型。A组用显微注射法,于术中注入2 μL嗅鞘细胞悬液(1×10⁷个/mL)至脊髓横断近端0.5mm处;B组于术中注入2 μL