

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.45.006 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

贾全章, 李东君, 陈玉丙, 孙景海, 吴传真, 王风华, 徐爽, 刘丽萍, 姜大伟, 高德萱. 骨髓间充质干细胞向脊髓损伤区的迁徙[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(45):8390-8393.

## 骨髓间充质干细胞向脊髓损伤区的迁徙\*☆

贾全章<sup>1</sup>, 李东君<sup>2</sup>, 陈玉丙<sup>3</sup>, 孙景海<sup>1</sup>, 吴传真<sup>1</sup>, 王风华<sup>1</sup>, 徐爽<sup>1</sup>, 刘丽萍<sup>3</sup>, 姜大伟<sup>2</sup>, 高德萱<sup>2</sup>

<sup>1</sup>解放军第208医院, 吉林省长春市130062; <sup>2</sup>延边大学医学部, 吉林省延吉市133002; <sup>3</sup>吉林大学附属第二医院, 吉林省长春市130062

贾全章☆, 男, 1964年生, 山东省枣庄市人, 汉族, 2008年解放军第三军医大学毕业, 博士, 主任医师, 主要从事脊柱外科、脊髓损伤方面的研究。  
jqz208@sohu.com

中图分类号:R394.2  
文献标识码:A  
文章编号:2095-4344(2012)45-08390-04

收稿日期:2012-05-04  
修回日期:2012-09-23  
(20110504017/M·C)

**文章亮点:** Wistar大鼠脊髓损伤后, 经尾静脉注入 DAPI 标记的骨髓间充质干细胞, 其能透过血脊髓屏障, 向损伤脊髓组织迁徙, 移植 10 d 在损伤组织血管及其周围组织有标记的骨髓间充质干细胞弥散, 移植 15 d 在损伤组织内有荧光标记的骨髓间充质干细胞广泛弥散, 提示骨髓间充质干细胞能通过一定的机制迁徙到损伤脊髓组织区内并完成修复作用。

**关键词:** 脊髓损伤; 骨髓间充质干细胞; 迁徙; 冰冻切片; 激光共聚焦显微镜; Wistar 大鼠; DAPI 标记; 尾静脉移植; 血脊髓屏障

### 摘要

**背景:** 骨髓间充质干细胞移植到脊髓损伤区域后, 如何观察其在体内的生存和转归情况, 一直是让人困扰的问题。

**目的:** 观察骨髓间充质干细胞在大鼠脊髓损伤区内的迁徙情况。

**方法:** 36 只 Wistar 大鼠随机分为 2 组, 实验组制作脊髓损伤模型 1 周后, 经尾静脉移植用 DAPI 标记的骨髓间充质干细胞( $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ) 1 mL, 连续注射 2 d。对照组未行脊髓损伤, 与实验组同一时间同法行骨髓间充质干细胞移植。分别于移植后 5, 10, 15 d, 制作损伤脊髓冰冻切片, 在激光共聚焦显微镜下观察骨髓间充质干细胞的迁徙情况。

**结果与结论:** 实验组于移植后 5 d, 在脊髓损伤组织血管内出现少量荧光标记的骨髓间充质干细胞, 10 d 后有血管外弥散, 15 d 后有广泛弥散。对照组均未见 DAPI 标记的骨髓间充质干细胞。结果表明骨髓间充质干细胞经大鼠尾静脉移植后, 能透过血脊髓屏障向损伤脊髓组织迁徙。

## Bone marrow mesenchymal stem cells migrate to the zone of spinal cord injury

Jia Quan-zhang<sup>1</sup>, Li Dong-jun<sup>2</sup>, Chen Yu-bing<sup>3</sup>, Sun Jing-hai<sup>1</sup>, Wu Chuan-zhen<sup>1</sup>, Wang Feng-hua<sup>1</sup>, Xu Shuang<sup>1</sup>, Liu Li-ping<sup>3</sup>, Jiang Da-wei<sup>2</sup>, Gao De-xuan<sup>2</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** How to observe the survival and prognosis of bone marrow mesenchymal stem cells after migration to the spinal cord injury zone remains controversial.

**OBJECTIVE:** To observe the migration situation of bone marrow mesenchymal stem cells in the rat spinal cord injury zone.

**METHODS:** Thirty-six Wistar rats were randomly divided into two groups. In the experimental group, the rats were used to make the spinal cord injury model, and after 1 week, 1 mL DAPI labeled bone marrow mesenchymal stem cells ( $1 \times 10^9/\text{L}$ ) were daily transplanted into the rats through the tail vein for 2 days. The rats in the control group were not subjected to spinal cord injury induction, but they received bone marrow mesenchymal stem cells transplantation at the same time with the same method. The frozen sections of injured spinal cord were prepared at 5, 10 and 15 days after transplantation, and the migration of bone marrow mesenchymal stem cells was observed under the confocal laser scanning microscope.

**RESULTS AND CONCLUSION:** At 5 days after the transplantation in the experimental group, the fluorescence marked bone marrow mesenchymal stem cells were observed in the vessels of spinal cord injury tissue; 10 days after transplantation, bone marrow mesenchymal stem cells were dispersed in extravascular tissue; 15 days after transplantation, the fluorescence marked bone marrow mesenchymal stem cells were widely diffused in the injury tissue. While, the DAPI labeled bone marrow mesenchymal stem cells were not observed in the control group. Results show that bone marrow mesenchymal stem cells can migrate to the injured spinal tissue through spinal cord-blood barrier after transplantation through the tail vein.

Jia QZ, Li DJ, Chen YB, Sun JH, Wu CZ, Wang FH, Xu S, Liu LP, Jiang DW, Gao DX. Bone marrow mesenchymal stem cells migrate to the zone of spinal cord injury. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(45):8390-8393.

## 0 引言

骨髓间充质干细胞属于多能成体干细胞, 具有取材方便、扩增迅速、可自体移植和多向分化等特点。有研究表明移植的骨髓间充质干细胞可向脊髓损伤处迁移并长期存活, 促进神经功能的恢复<sup>[1-2]</sup>。本实验观察脊髓损伤后经静脉移植骨髓间充质干细胞的迁徙情况。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 实验于2009年3月至2010年3月在吉林大学公共卫生学院实验室完成。

**材料:**

**实验动物与分组:** 清洁级Wistar大鼠36只, 雌雄不限, 体质量(260±20) g, 随机分为实验组和对照组各18只。出生5 d的Wistar乳鼠5只, 体质量8.0–10.0 g, 均购自吉林大学实验动物中心。

**主要试剂与仪器:**

试剂与仪器	来源
兔抗鼠 CD34 荧光直标抗体	美国 BD 公司
0.25%胰蛋白酶	华美公司
胎牛血清	美国 Hyclone 公司
DMEM 培养基	美国 Gibco 公司
电热恒温水浴箱	上海医用恒温设备厂
IX-71 倒置显微镜、激光共聚焦显微镜	日本 OLYMPUS 公司
超净工作台	苏州净化集团安泰公司
MC017511F 型 CO <sub>2</sub> 培养箱	日本 SANYO

**实验方法:**

**Wistar大鼠骨髓间充质干细胞的提取、分离和培养<sup>[3]</sup>:** 选用出生5 d的Wistar乳鼠5只, 颈椎脱臼法处死, 碘伏消毒3次。无菌条件下取Wistar大鼠股骨和胫骨的骨髓, 采用贴壁筛选法结合差速贴壁法分离、纯化骨髓间充质干细胞, 贴壁培养法进行培养, 待贴壁细胞接近70%–80%融合后, 结束原代培养。按1:3比例传代培养至3代。每次传代后行形态学观察与鉴定。

**脊髓损伤模型的建立<sup>[4]</sup>:** 实验组大鼠采用改良的Allen's打击法建立大鼠脊髓损伤模型, 打击区以T<sub>12</sub>为中心, 大小为3.0 mm×4.0 mm, 连续

打击6次, 至出现双后肢抽动、甩尾, 随后完全松弛为标准。术后常规方法笼内饲养护理, 肌注青霉素20×10<sup>4</sup> U/kg, 1次/d, 连续4 d。每日8时、16时各挤尿1次, 夜间不喂水。

**骨髓间充质干细胞体外标记和静脉回输移植:**

**骨髓间充质干细胞体外标记:** 收集第3代的Wistar大鼠骨髓间充质干细胞, 用DMEM洗涤2次, 加入DAPI应用液10 mL/瓶, 置于37%、体积分数为5%CO<sub>2</sub>培养箱中, 1 h后, 弃去DAPI应用液, 用DMEM洗涤2次, 加入含体积分数为15%胎牛血清的DMEM, 继续培养。24 h后, 荧光显微镜下观察细胞, 确认标记成功后, 收集细胞, 调整细胞浓度为1×10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>。

**静脉回输移植:** 实验组于大鼠脊髓损伤后1周行骨髓间充质干细胞移植, 用0.3%戊巴妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉, 用1 mL一次性使用的无菌注射器作尾静脉穿刺, 缓推注骨髓间充质干细胞(1×10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>) 1 mL, 连续注射2 d。对照组未行脊髓损伤, 与实验组同一时间同法行骨髓间充质干细胞移植。

**组织形态学标本的制作及观察:** 于移植后5, 10, 15 d随机取各组大鼠6只处死, 取包含脊髓损伤区及其上下约0.5 cm组织制作标本, 将标本置于40 g/L多聚甲醛-磷酸缓冲固定液中固定, 脱水后行石蜡包埋, 每只大鼠于损伤区制作常规切片(片厚5 μm)1张。于激光共聚焦显微镜下观察, 每张切片测定6个视野, 比较5, 10, 15 d对照组与实验组DAPI阳性细胞分布情况。

**主要观察指标:** DAPI阳性细胞分布情况。

## 2 结果

**2.1 实验动物数量分析** 参加实验Wistar大鼠36只均进入结果分析。

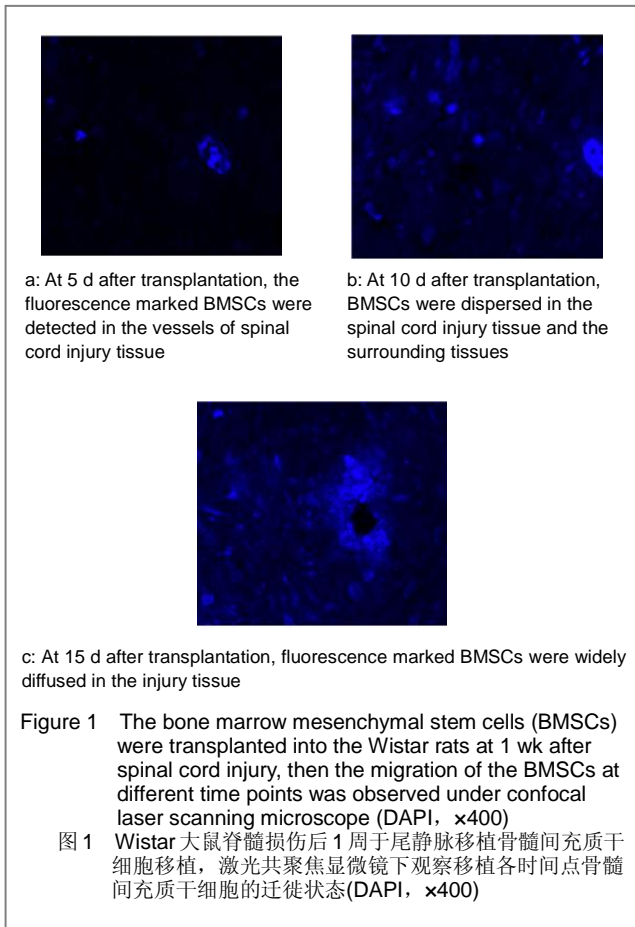
**2.2 骨髓间充质干细胞移植后迁徙情况** 实验组在移植5 d后, 脊髓损伤组织血管内出现荧光标记的骨髓间充质干细胞, 见图1a; 10 d在损伤组织血管及其周围组织有标记的骨髓间充质干细胞弥散, 见图1b; 15 d在损伤组织内有荧光标记的骨髓间充质干细胞广泛弥散, 见图1c。对照组在相应时间点未见DAPI标记的骨髓间充质干细胞。

<sup>1</sup>The 208 Hospital of People's Liberation Army, Changchun 130062, Jilin Province, China; <sup>2</sup>Department of Medicine, Yanbian University, Yanji 133002, Jilin Province, China; <sup>3</sup>the Second Affiliated Hospital of Jilin University, Changchun 130062, Jilin Province, China

Jia Quan-zhang☆, Doctor, Chief physician, the 208 Hospital of People's Liberation Army, Changchun 130062, Jilin Province, China  
jqz208@sohu.com

Supported by: Jilin Science and Technology Development Planning Program, No.20080446\*

Received: 2012-05-04  
Accepted: 2012-09-23



### 3 讨论

骨髓间充质干细胞移植后, 如何从宿主辨别移植的骨髓间充质干细胞, 并观察其在体内的生存和转归情况, 一直是让人困扰的问题。移植干细胞的示踪研究目前大都采用移植前体外预先标记培养的干细胞, 包括荧光染料标记(标记细胞核或细胞膜)、核素标记、Y染色体标记及报告基因转染等方法, 移植后在特定时间点切取组织, 检测特异性标记鉴别移植来源的干细胞。

本实验采用DAPI标记移植骨髓间充质干细胞的方法。DAPI荧光染料化学名称为4', 6-联脒-2-苯基吲哚(4, 6-diamidino-2-phenylindole Dihydro-chloride, DAPI), 能与A-T碱基对DNA专一结合从而标记细胞核, 紫外光激发下发出浅蓝色荧光。近年来, DAPI被人们用于骨髓间充质干细胞的体内移植示踪, 标记时间可长达3个月。DAPI标记优点<sup>[5]</sup>: ①荧光保持时间较长、专一性强、灵敏度高。②标记技术简单, 标记效率高。存在的问题是细胞分裂将导致DAPI标记强度降低, 灵敏度下降。

2004年Satake等<sup>[6]</sup>利用腺病毒载体将骨髓间充质

干细胞转染绿色荧光蛋白, 然后将细胞注入到脊髓损伤的大鼠脑脊液中, 定期检测绿色荧光蛋白阳性细胞的分布, 结果发现大部分移植细胞迁移到病变的周围。

Chapel等<sup>[7]</sup>自体来源的骨髓间充质干细胞用绿色免疫荧光标记, 连同自体造血细胞一同注入被 $\alpha$ 射线损伤的灵长类动物体内进行病例对照研究, 结果发现标记的骨髓间充质干细胞在损伤的肌肉、皮肤、脊髓、内脏中均有表达。2008年景元海等<sup>[8]</sup>用大鼠骨髓间充质干细胞治疗脊髓挫伤大鼠, 在研究中观察到体外荧光标记的骨髓间充质干细胞尾静脉注入后, 可向损伤组织趋化并定居。本项研究结果表明大鼠脊髓损伤后, 经DAPI标记的骨髓间充质干细胞经大鼠尾静脉注入后, 能透过血脊髓屏障, 向损伤脊髓组织迁徙, 并且于移植后15 d迁徙的骨髓间充质干细胞达到最大量化状态, 提示骨髓间充质干细胞能通过一定的机制迁徙到损伤脊髓组织区内并完成修复作用。

关于骨髓间充质干细胞迁徙到损伤脊髓组织区的机制尚不清楚, 有研究表明, 骨髓间充质干细胞向损伤部位定向迁移与损伤部位趋化因子的表达有关, 通过与细胞表面的特异性趋化因子受体结合后, 趋化因子可以诱导骨髓间充质干细胞向损伤部位迁移<sup>[9]</sup>。趋化因子是指具有趋化作用的细胞因子, 直接引导白细胞, 包括多种免疫活性细胞进行有方向性迁移, 在人体许多生理、病理过程中发挥着重要作用。近年来人们在用骨髓间充质干细胞修复骨折、心肌损伤、缺血性脑损伤及脊髓损伤的研究中均发现了骨髓间充质干细胞这种独特的趋向损伤或缺血部位的能力。Wang等<sup>[10]</sup>报道在对脑缺血动物模型的研究中发现, 大脑缺血组织所分泌的单核细胞趋化蛋白1、白细胞介素8及缺血脑组织提取液能诱导注入的骨髓间充质干细胞向创伤部位特异性迁移。Shake等<sup>[11]</sup>在向受伤的膝关节内注射骨髓间充质干细胞悬液的研究中发现, 骨髓间充质干细胞能特异性地向损伤的半月板与软骨迁移并修复创伤。

骨髓间充质干细胞透过血-脊髓屏障向脊髓损伤病灶定向迁移的可能机制: ①骨髓间充质干细胞表达的多种黏附分子与血-脊髓屏障内皮细胞的黏附分子相互作用, 促使骨髓间充质干细胞与血管内皮细胞、基膜发生特异性结合, 从而介导骨髓间充质干细胞的特异性迁移<sup>[12]</sup>。②通过血-脊髓屏障固有的薄弱环节(脉络丛、下丘脑正中隆起、垂体、松果体、脑室周围)参与骨髓间充质干细胞的迁移<sup>[13]</sup>。③外伤、缺血、缺氧等因素导致血-脊髓屏障固有结构破坏, 大量炎性递质和血管活性因子释放, 使血-脊髓屏障的通透性显著增加。④由于中枢神经系统

内的巨噬细胞、单核细胞、小胶质细胞,甚至星形胶质细胞可能都来源于骨髓,因此骨髓间充质干细胞循着相似的途径通过血-脊髓屏障,进入损伤灶<sup>[14]</sup>。⑤损伤局部表达的信号分子与骨髓间充质干细胞表面的受体、抗体、细胞因子相互作用,使骨髓间充质干细胞对脊髓损伤灶产生趋化作用,这既要求损伤局部高表达组织特异性细胞因子,骨髓间充质干细胞本身也要发生相应表型改变,表达特异性受体,两者缺一不可,目前认为,基质细胞衍生因子可能在介导骨髓间充质干细胞定向迁移中起着重要的作用<sup>[15]</sup>。⑥许多其他趋化效应轴协同介导移植骨髓间充质干细胞的趋化效应,如趋化性细胞因子(CXCL12-CXCR4)。⑦相关研究表明,其他一些因子可能在此过程中也起重要作用,如干细胞因子、肝细胞生长因子、集落刺激因子、间质金属蛋白酶等。

实验证实了体外DAPI标记的骨髓间充质干细胞尾静脉注入后,可能通过其迁徙、定居机制完成对损伤脊髓组织的修复作用。

#### 4 参考文献

- [1] Harvey RL, Chopp M. The therapeutic effects of cellular therapy for functional recovery after brain injury. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2003;14(1 Suppl):S143-S151.
- [2] Ankeny DP, McTigue DM, Jakeman LB. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. *Exp Neurol.* 2004;190(1):17-31.
- [3] Liu YL, Sun P, Li ZF, et al. *Binzhou Yixueyuan Xuebao.* 2010; 33(6):412.  
刘永良,孙培,李泽福,等. Wistar大鼠骨髓源性神经干细胞分离与培养及其鉴定[J]. *滨州医学院学报*, 2010, 33(6):412-415.
- [4] Li YF, Chen D, Zhang DW, et al. *Zhongguo Shiyan Zhenduanxue.* 2010;14(8):1169-1172.  
李一帆,陈东,张大威,等. 急性大鼠脊髓损伤Allen's法模型的改良及电生理评价[J]. *中国实验诊断学*, 2010, 14(8):1169-1172.
- [5] Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, et al. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000;120(5): 999-1005.
- [6] Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. *Spine (Phila Pa 1976).* 2004;29(18):1971-1979.
- [7] Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med.* 2003;5(12):1028-1038.
- [8] Jing YH, Chen YB, Nie CC, et al. *Zhongguo Laonianxue Zazhi.* 2008; 28(6):547-548.  
景元海,陈玉丙,聂长春,等. 骨髓间充质干细胞对脊髓损伤治疗作用及其机制的初步研究[J]. *中国老年学杂志*, 2008, 28(6):547-548.
- [9] Bhakta S, Hong P, Koc O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation. *Cardiovasc Revasc Med.* 2006;7(1):19-24.
- [10] Wang L, Li Y, Chen X, et al. MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology.* 2002;7(2):113-117.
- [11] Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg.* 2002; 73(6): 1919-1925.
- [12] Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy.* 2003;5(6):485-489.
- [13] Zhang W, Smith C, Howlett C, et al. Inflammatory activation of human brain endothelial cells by hypoxic astrocytes in vitro is mediated by IL-1beta. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20(6): 967-978.
- [14] Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(19):10711-10716.
- [15] Ji JF, He BP, Dheen ST, et al. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells.* 2004;22(3):415-427.

来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 吉林省科技发展规划项目(20080446)。

**作者贡献:** 实验设计为陈玉丙, 实验实施为李东君, 实验评估为陈玉丙, 资料收集李东君。李东君成文, 贾全章审校, 贾全章对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。