

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.49.016 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

贾全章, 李东君, 陈玉丙, 孙景海, 王风华, 徐爽, 刘丽萍, 高德萱, 姜大伟. 骨髓间充质干细胞修复 Wistar 大鼠的脊髓损伤[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(49):9209-9213.

骨髓间充质干细胞修复Wistar大鼠的脊髓损伤*☆

贾全章¹, 李东君², 陈玉丙³, 孙景海¹, 王风华¹, 徐爽¹, 刘丽萍³, 高德萱², 姜大伟²

文章亮点: 许多研究报道干细胞移植治疗脊髓损伤有确切的疗效。实验选用骨髓间充质干细胞通过静脉和局部注射移植方法治疗大鼠脊髓损伤, 以行为学评分和脊髓病理切片两指标进行对比统计分析, 旨在证明骨髓间充质干细胞修复脊髓损伤的作用。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 修复; 脊髓损伤; 细胞移植; 大鼠; 静脉移植; 局部注射; 细胞浓度; 干细胞; 运动功能

缩略语: 骨髓间充质干细胞: bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs

摘要

背景: 研究表明, 骨髓间充质干细胞移植治疗脊髓损伤已取得疗效。

目的: 观察骨髓间充质干细胞移植对脊髓损伤大鼠脊髓功能的影响。

方法: 120 只大鼠随机数字表法分为 4 组: 空白组不造模, 于脊髓损伤后当天损伤区局部注射生理盐水 10 μ L; 模型组采用改良的 Allen's 打击法造成脊髓损伤模型, 不做任何治疗; 低浓度治疗组行脊髓损伤后当天经尾静脉注射浓度为 1×10^9 L⁻¹ 骨髓间充质干细胞 1 mL; 高浓度治疗组行脊髓损伤后当天损伤区局部注射浓度为 4×10^{10} L⁻¹ 骨髓间充质干细胞 10 μ L。

结果与结论: 损伤后 1 d 模型组和两治疗组均无恢复迹象, 运动评分低于空白组 ($P < 0.01$); 损伤 7 d, 两治疗组运动功能有所恢复, 行为学评分均高于模型组, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 损伤 15, 30 d, 两治疗组行为学评分均明显高于模型组 ($P < 0.01$)。移植后 7, 15, 30 d 脊髓病理切片显示治疗组较模型组均有显著恢复。提示骨髓间充质干细胞对脊髓损伤模型大鼠的脊髓功能有修复作用。

¹解放军第 208 医院, 吉林省长春市 130062; ²延边大学医学部, 吉林省延吉市 133002; ³吉林医科大学附属第二医院, 吉林省长春市 130041

贾全章☆, 男, 1964 年生, 山东省枣庄市人, 汉族, 2005 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、脊髓损伤的研究。
jqz208@sohu.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2012)49-09209-05

收稿日期: 2012-05-04
修回日期: 2012-06-22
(20110504018/N · C)

Bone marrow mesenchymal stem cells repair Wistar rat spinal cord injury

Jia Quan-zhang¹, Li Dong-jun², Chen Yu-bing³, Sun Jing-hai¹, Wang Feng-hua¹, Xu Shuang¹, Liu Li-ping³, Gao De-xuan², Jiang Da-wei²

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that bone marrow mesenchymal stem cells transplantation has achieved therapeutic effects in the treatment of spinal cord injury.

OBJECTIVE: To investigate the effects of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on motor function of rats with spinal cord injury.

METHODS: 120 Wistar rats were randomly divided into four groups: (1) in the blank group, rats were not modeled but they were locally injected with 10 μ L normal saline at the day of spinal cord injury; (2) in the model group, spinal cord injury models were established by modified Allen's crack method without any treatment; (3) in the low dose treatment group, 1 mL bone marrow mesenchymal stem cells (1×10^9 /L) were injected through the tail vein at the day of spinal cord injury; in the high dose treatment group, rats were locally injected with 10 μ L bone marrow mesenchymal stem cells (4×10^9 /L) at the day of spinal cord injury.

RESULTS AND CONCLUSION: At 1 day after injury, there was no healing in the model group and two treatment groups, and the scores of motion function in the three groups were lower than those in the blank group ($P < 0.01$); at 7 days after injury, the scores of motion function in the two treatment groups were increased, and the behavior scores of the two treatment groups were higher than those of the model group, but there was no significant difference ($P > 0.05$); at 15 and 30 days after injury, the behavior scores of the two treatment groups were higher than those of the model group ($P < 0.01$). At 7, 15 and 30 days after transplantation, there was significant recovery in behaviors in the two treatment groups compared with the model group. It indicates that bone marrow mesenchymal stem cells have therapeutic effects on the spinal function of rats with spinal cord injury.

¹No.208 Hospital of Chinese Liberation Army, Changchun 130062, Jilin Province, China;
²Department of Medicine, Yanbian University, Yanji 133002, Jilin Province, China;
³The Second Affiliated Hospital of Jilin University, Changchun 130062, Jilin Province, China

Jia Quan-zhang☆, Doctor, Chief physician, No.208 Hospital of Chinese 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: 2012-06-22

Jia QZ, Li DJ, Chen YB, Sun JH, Wang FH, Xu S, Liu LP, Gao DX, Jiang DW. Bone marrow mesenchymal stem cells repair Wistar rat spinal cord injury. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(49):9209-9213.

0 引言

脊髓损伤的治疗目前仍然是世界性难题, 至今未有理想的疗法, 干细胞移植治疗是最有希望的方法之一。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)具有多向分化潜能, 取材容易、增殖迅速、排斥反应低等优点而受到关注。使用BMSCs移植治疗脊髓损伤取得疗效的实验研究也多有报道^[1], 且BMSCs可取自患者自体, 无免疫排斥。实验将大鼠BMSCs移植到大鼠脊髓损伤处, 通过行为学和组织学观察分析BMSCs移植对脊髓损伤的修复作用, 报道如下。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2008年6月至2009年10月在吉林大学附属公卫学院实验室完成。

材料:

实验动物: 清洁级Wistar大鼠120只, 雌雄不拘, 体质量(260±20) g; 出生5 d的Wistar乳鼠5只, 雌雄不拘, 体质量8.0-10.0 g, 动物均购自吉林大学实验动物中心。

骨髓间充质干细胞修复Wistar大鼠损伤脊髓实验用主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
胎牛血清	美国 Hyclone 公司
0.25%胰蛋白酶	华美公司
兔抗鼠 CD34 荧光直标抗体	美国 BD 公司
DMEM 培养基	美国 Gibco 公司
MC017511F 型 CO ₂ 培养箱	日本 SANYO
超净工作台	苏州净化集团安泰公司
IX-71 倒置显微镜	日本 OLYMPUS 公司

实验方法:

大鼠BMSCs的提取、分离和培养: 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乳鼠股骨和胫骨的骨髓细胞, 采用贴壁筛选法结合差速贴壁法分离、纯化BMSCs, 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。

改良的Allen's打击法建立大鼠脊髓损伤模型^[2]: 大鼠用0.3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉, 俯卧固定, 切口以T₁₂为中心, 长约3.0 cm, 切开皮肤和肌肉, 显露T₁₁-T₁₂棘突和椎板, 咬除T₁₂棘突和椎板, 以脊髓为中心显露大小为3.0 mm×4.0 mm的打击区。一手持打击垫, 使脊髓接触面垂直紧贴脊髓硬脊膜, 另一手将打击架置于其上方, 然后手持一重10 g的砝码线调整砝码与砝码接触面的高度为5.0 cm, 松开砝码线进行打击, 每只鼠连续打击6次, 至出现双后肢抽动、甩尾, 随后完全松弛, 肾上腺素庆大盐水清洗伤口, 缝合切口。术后常规方法笼内饲养护理, 肌注青霉素20×10⁴ 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。

干预分组: 120只大鼠随机数字表法分为4组, 每组30只: ①空白组不造模, 于脊髓损伤后当天损伤区局部注射生理盐水10 μL。②模型组制备脊髓损伤模型后不做任何治疗。③低浓度治疗组行脊髓损伤后当天经尾静脉注射浓度为1×10⁹ L⁻¹的BMSCs 1 mL。④高浓度治疗组行脊髓损伤后当天损伤区局部注射浓度为4×10¹⁰ L⁻¹的BMSCs 10 μL。

BMSCs的移植:

尾静脉穿刺移植: 低浓度治疗组大鼠在脊髓损伤后当天用0.3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉, 1 mL无菌注射器作尾静脉穿刺, 缓推注浓度为1×10⁹ L⁻¹的BMSCs 1 mL, 连续注射2 d。

脊髓损伤区注射移植: 高浓度治疗组大鼠于脊髓损伤模型建立后缝合前, 使用微量注射器约45°斜角(针头斜面向下)将BMSCs悬液延后中央沟缓慢注入到脊髓损伤区头侧和尾侧损伤临近区域的灰白质交界处(距脊髓表面约1 mm), 每点5 μL, 浓度为4×10¹⁰ L⁻¹, 每只鼠注入总细胞数为4×10⁵个, 留针5 min, 医用生物蛋白胶封闭注射孔。

行为学观察: 各组随机取大鼠12只, 分别于移植后1, 7, 15, 30 d进行改良Tarlov评分行为学评分。观察者为非本组实验人员, 不清楚动物分组, 但对评分标准十分熟悉。因大鼠昼夜活动差别较大, 评分均于上午9时进行, 观察

4 min, 用摄像机录制。移植前3 d每8 h按摩膀胱排尿。评价前所有动物应检查膀胱是否充盈, 避免因膀胱充盈而影响活动。

改良Tarlov评分标准分级^[3]:

评分	标准
0分	后肢无活动, 不能负重
1分	后肢可见活动但不能负重
2分	后肢活动频繁或有力, 不能负重
3分	后肢可支持体质量, 能走一两步
4分	可行走, 仅有轻度障碍
5分	行走正常

组织学观察: 于移植后7, 15, 30 d行为学观察后, 各组随机取6只处死, 待尸体僵硬, 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, 常规切片(片厚5 μm)。脊髓标本每例取损伤部位切片4张, 间隔约为距离2 mm。每只鼠取1张损伤区切片行苏木精-伊红染色, 余留作免疫组织化学染色用。

主要观察指标: 改良Tarlov功能评分, 损伤脊髓形态变化。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 13.0软件完成统计处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入Wistar大鼠120只, 其中8只大鼠因术后感染死亡, 并进行了补充, 在进入结果分析时无脱失。

2.2 各组大鼠脊髓损伤不同时间点行为学观察 见表1。

表1 骨髓间充质干细胞移植脊髓损伤 Wistar 大鼠后其运动功能恢复 Tarlov 评分变化
Table 1 Tarlov score of the recovery of Wistar rats, motor function after bone marrow mesenchymal stem cells transplantation ($\bar{x} \pm s, n=12$)

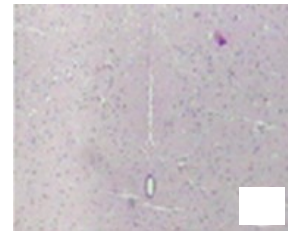
Time	Blank	Model	Low dose treatment	High dose treatment
1 d after transplantation	5±0	0±0	0±0	0±0
7 d after transplantation	5±0	1.25±0.87	2.00±0.60	1.33±0.65
15 d after transplantation	5±0	1.45±0.79	2.41±0.51 ^a	2.25±0.45 ^a
30 d after transplantation	5±0	1.91±1.00	2.41±0.90 ^a	2.75±0.75 ^a

注: 与不移植细胞的脊髓损伤模型组比较, ^a $P < 0.01$; 低浓度治疗组静脉注射 $1 \times 10^9 L^{-1}$ 骨髓间充质干细胞 1 mL, 高浓度治疗组损伤区局部注射 $4 \times 10^{10} L^{-1}$ 骨髓间充质干细胞 10 μL, 移植 15 d 起, 两组运动功能恢复强于模型组

损伤后1 d模型组和两治疗组均无恢复迹象, 运动评分低于空白组($P < 0.01$); 损伤7 d, 两治疗组运动功能有所恢复, 行为学评分均高于模型组, 但差异无显著性意义($P > 0.05$); 损伤15 d, 两治疗组行为学评分改良Tarlov分级均明显高于模型组, 差异有非常显著性意义($P < 0.01$); 损伤30 d, 两治疗组大鼠运动功能进一步恢复, 行为学分级明显高于模型组, 差异有显著性意义($P < 0.01$)。

2.3 病理观察各组损伤脊髓形态变化

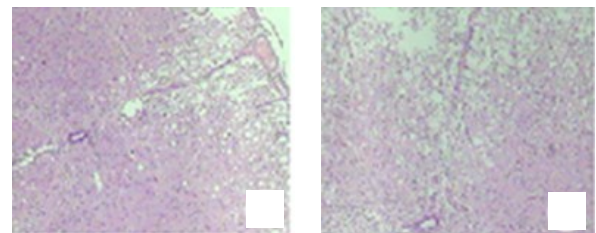
空白组: 大鼠脊髓灰、白质组织结构完整, 神经细胞在灰质中分布均匀、形态正常、尼氏体清晰及细胞膜完整, 白质内神经纤维排列整齐, 细胞间基质均匀, 见图1。



注: 未进行脊髓损伤造模的空白组大鼠脊髓形态正常

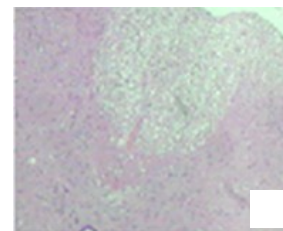
Figure 1 Histopathological changes of rat spinal tissue in the blank group (hematoxylin-eosin staining, ×40)
图1 空白组大鼠脊髓组织病理学变化(苏木精-伊红染色, ×40)

模型组: 见图2。



a: 7 d after injury

b: 15 d after injury



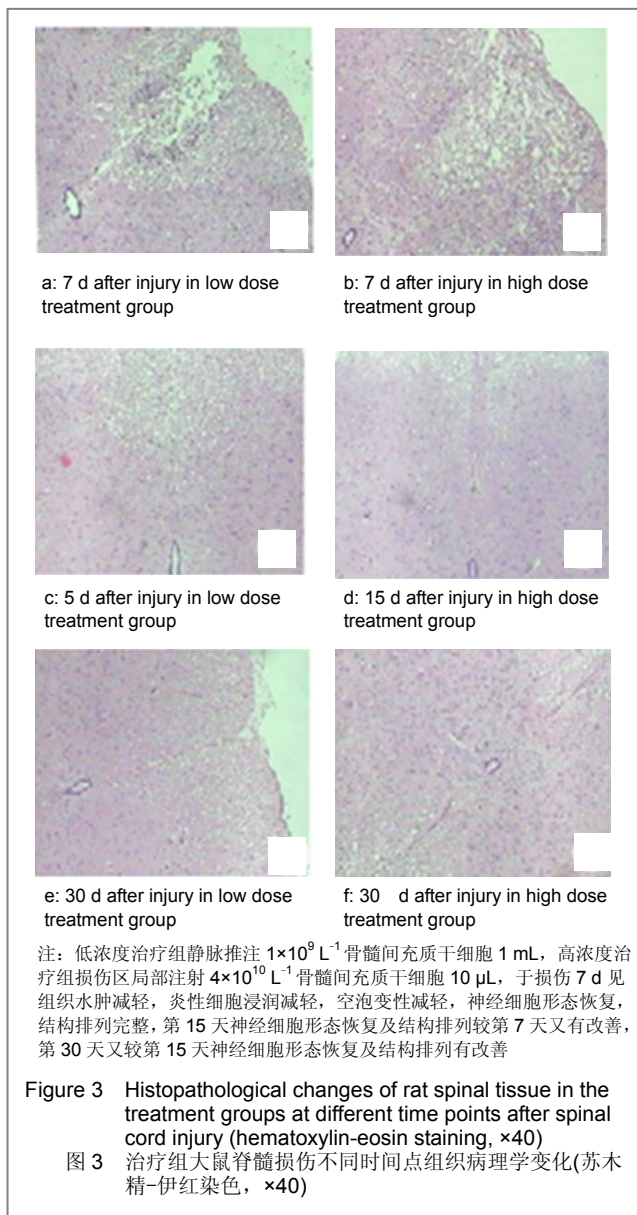
c: 30 d after injury

注: 模型组大鼠在脊髓损伤7 d可见脊髓损伤区及周围区炎性细胞浸润, 15 d病变处出现大片软化灶, 仍可见出血灶, 神经细胞消失, 30 d白质水肿较前减轻, 可见胶质细胞增生

Figure 2 Histopathological changes of rat spinal tissue in the model group at different time points after spinal cord injury (hematoxylin-eosin staining, ×40)
图2 模型组大鼠脊髓损伤不同时间点组织病理学变化(苏木精-伊红染色, ×40)

脊髓组织切片发现损伤区主要位于脊髓灰质, 在脊髓损伤7 d可见脊髓损伤区及周围区炎性细胞浸润, 有些损伤脊髓组织出现囊腔样变化, 见图2a; 15 d病变处出现大片软化灶, 仍可见出血灶, 神经细胞消失, 见图2b; 30 d白质水肿较前减轻, 可见胶质细胞增生, 见图2c。

低浓度治疗组和高浓度治疗组: 于损伤7 d见组织水肿减轻, 炎性细胞浸润减轻, 空泡变性减轻, 神经细胞形态恢复, 结构排列完整, 见图3a、b; 第15天神经细胞形态恢复及结构排列较第7天又有改善, 见图3c、d; 第30天又较第15天神经细胞形态恢复及结构排列有改善, 见图3e、f。



3 讨论

干细胞治疗脊髓损伤的实验研究国外开展的较早,

并发现许多干细胞都具有临床应用前景。神经干细胞可通过自身向神经细胞分化及分泌多种神经营养因子改善伤后脊髓微环境^[4]; 嗅鞘细胞能够穿过伤后及瘢痕形成的神经屏障, 目前自体嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤已经进入 I 期临床研究阶段^[5]; 许旺细胞在神经损伤后, 分裂、增殖, 引导轴突生长, 并能合成分泌多种许旺细胞源性神经营养因子, 引导和促进轴突再生以及促进髓鞘形成的作用^[6]; BMSCs避免了伦理方面的问题和免疫排斥反应, 加之取材、培养简单, 基因转染率较高^[7], 临床应用方便, 因此倍受关注。Chapel等^[8]应用自体来源的BMSCs用绿色免疫荧光标记, 连同自体造血细胞一同注入被 α 射线损伤的灵长类动物体内, 结果发现标记的BMSCs在损伤的脊髓、内脏、肌肉、皮肤中均有表达。Wright等^[9]在体外建立神经生长模型, 将BMSCs和一些神经生长抑制因子共培养, 结果证实, 随着时间的推移, 这些抑制因子的含量逐渐减少, BMSCs形成细胞桥引导轴突的再生。

Chopp等^[10]第1次将BMSCs移植于大鼠挫伤的脊髓, 观察到显著的运动功能恢复, 形态学分析发现BMSCs表达了神经元和少突胶质细胞的蛋白标记物, BMSCs也表现了较强的游走能力, 从而为BMSCs治疗脊髓损伤开辟了道路。Hofstetter等^[11]对动物的脊髓损伤模型进行BMSCs脊髓内移植, 1周后步态明显改善, 移植5周后发现移植区和瘢痕组织区之间可见到新生神经纤维束穿过, 进一步证实了BMSCs的修复能力。2004年Satake等^[12]利用腺病毒载体将BMSCs转染GFP, 然后将细胞注入到脊髓损伤大鼠的脑脊液中, 定期检测GFP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, 其中部分表达出神经元的标志蛋白, 同时大鼠的神经功能也得到改善。在上述实验基础上Zurita等^[13]将BMSCs移植于损伤3个月后的脊髓挫伤模型, 结果在移植后的4周观察到脊髓功能的恢复, 并且持续到1年之后, 而且移植的BMSCs在脊髓空洞内形成桥梁, 为再生的轴突提供支架, 并且表达星形胶质细胞及神经元的标志蛋白。

BMSCs修复脊髓损伤的机制还不完全清楚, 有报道认为以下几个方面: ①通过分泌神经营养因子来保护残存的神经元。Wright等^[14]在体外建立神经生长模型, 将BMSCs和一些神经生长抑制因子共培养, 如硫酸软骨素蛋白聚糖, 髓鞘相关蛋白, Nogo-A等, 结果证实, 随着时间推移, 这些抑制因子的含量逐渐减少, BMSCs形成细胞桥引导轴突的再生。②在脊髓特定环境下分化成神经元、少突胶质细胞以及星形胶质细胞, 增加了神

经元之间的联系, 促进轴突再生并帮助其髓鞘化。③改善脊髓损伤后的局部微环境。④移植植物与宿主细胞发生融合, 促使宿主细胞基因改变。有研究表明, BMSCs 在损伤区可以通过细胞融合的方式传递基因物质给浦肯野神经元, 增强突触间的传递^[15]。国内有报道认为可能的机制如下^[16]: ①桥接脊髓损伤断端, 形成功能性突触, 重建神经传导通路。②分泌多种神经营养因子改善脊髓局部微环境并启用再生相关基因的顺序表达, 从而促进轴突的再生。③使损伤的脱髓鞘轴索再髓鞘化, 恢复有髓神经电传导功能。

实验结果显示BMSCs移植治疗大鼠脊髓损伤, 2周后脊髓的运动功能有明显改善。组织学观察, 经BMSCs治疗后7 d, 组织水肿减轻, 炎性细胞浸润减轻, 空泡变性减轻, 神经细胞形态恢复, 结构排列完整; 第15天神细胞形态恢复及结构排列较第7天又有改善, 说明BMSCs植入大鼠脊髓损伤处可以促进损伤脊髓的修复和再生。因静脉移植和局部移植BMSCs的数量不同, 静脉移植后到达损伤脊髓区域的数量难以确定, 所以两种移植治疗方法间的效果无法对比。

4 参考文献

- [1] De Haro J, Zurita M, Avllon L, et al. Detection of 111 In-oxme-labeled bone marrow stromal cells after intravenous or intralesional administration in chronic paraplegic rats. *Neurosci Letters*. 2005;377(3):7.
- [2] Xu F, Chen JM, Zhang X. Chuangshang Waike Zahi. 2007; 9(1):91-93.
徐帆, 陈建敏, 张晓. 脊髓损伤动物模型的制备及神经功能评价[J]. 创伤外科杂志, 2007, 9(1):91-93.
- [3] Cheng H, Cao Yih ai, Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science*. 1996;273(7): 510-513.
- [4] Rietze RL, Reynolds BA. Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol*, 2006;41(9):3-23.
- [5] Marshall CT, Lu C, Winstead W, et al. The therapeutic potential of human olfactory-derived stem cells. *Histol Histopathol*. 2006;21(6):633-643.
- [6] Girard C, Bemelmans AP, Dufour N, et al. Grafts of brain derived neurotrophic factor and neurotrophin transduced primate Schwann cells lead to functional recovery of the demyelinated mouse spinal cord. *J Neurosci*. 2005;25(35):7924-7933.
- [7] Nandoe Tewarie RD, Hurtado A, Levi AD, et al. Bone marrow stromal cells for repair of the spinal cord: towards clinical application. *Cell Transplant*. 2006;15(7):563-577.
- [8] 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.
- [9] Neuhuber B, Himes BT, Shumsky JS, et al. Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations. *Brain Res*. 2005;1035(1):73.
- [10] Chopp M, Zhang XH, Li Y, et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuro Report*. 2000;11(11):3001.
- [11] Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, et al. Marrow stromal cells from guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(4):2199.
- [12] Statake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. *Spine*. 2004;29(18):71.
- [13] Zurita M, Vaquero J. Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: functional and morphological outcome one year after transplantation. *Neurosci Lett*. 2006; 402(1):51.
- [14] Wright B, Himes BT, Shumsky JS, et al. Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations. *Brain Res*. 2005;1035(1):73.
- [15] Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000;290:1779.
- [16] Liu CL, Wu Y. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(2):6051-6054.
刘长路, 吴岩. 干细胞移植治疗脊髓损伤的研究进展[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(32):6051-6054.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 吉林省科技发展计划项目(20080446)。

作者贡献: 实验设计为贾全章、陈玉丙、李东君、高德莹; 实施分别为李东君、高德莹、刘丽萍、姜大伟; 实验评估为贾全章、陈玉丙、李东君; 资料收集为李东君, 李东君成文, 贾全章审核, 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: 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》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。