

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.01.012 [http://www.crter.org]

张瑞平¹, 李健丁¹, 刘 强², 双卫兵², 解 军³. 蛛网膜下腔移植磁标骨髓间充质干细胞治疗脊髓损伤[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(1):74-78.

蛛网膜下腔移植磁标骨髓间充质干细胞治疗脊髓损伤**☆

张瑞平¹, 李健丁¹, 刘 强², 双卫兵², 解 军³

1 山西医科大学第一医院放射科, 山西省太原市 030001

2 山西医科大学第一医院骨科, 山西省太原市 030001

3 山西医科大学分子生物教研室, 山西省太原市 030001

文章亮点:

- 1 既往实验证明, 骨髓间充质干细胞移植可以促进损伤脊髓功能的恢复, 但其作用机制尚不明确。
- 2 经蛛网膜下腔移植超顺磁性氧化铁标记的骨髓间充质干细胞, 随着时间的延长, 被标记的骨髓间充质干细胞会定向迁移到脊髓损伤区域。
- 3 实验结果证实, 移植的细胞能促进脊髓损伤神经功能恢复, 标记组与未标记组比较差异无显著性意义, 此结果为下一步活体细胞活体示踪提供了实验基础。

关键词:

干细胞; 干细胞移植; 超顺磁性氧化铁; 骨髓间充质干细胞; 脊髓损伤; 细胞移植; 蛛网膜下腔; 省级基金; 干细胞图片文章

摘要

背景: 干细胞移植可以重建中枢神经系统的结构和功能, 近年来引起了广泛的关注。

目的: 探讨超顺磁性氧化铁标记骨髓间充质干细胞对兔脊髓损伤神经功能恢复的作用。

方法: 采用密度梯度离心法和贴壁法体外分离培养兔骨髓间充质干细胞。制作兔脊髓损伤模型, 并在蛛网膜下腔置管以备移植。将实验白兔随机分为 3 组: 标记组移植超顺磁性氧化铁标记细胞; 未标记组移植未标记细胞; 对照组不移植细胞只注射 PBS 液。

结果与结论: 两移植组在细胞移植 14 d 后运动功能 BBB 评分高于对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 但两组间差异无显著性意义($P > 0.05$)。细胞移植后 1, 7, 14, 21, 28, 35 d, 脊髓损伤区域局部组织上出现大量含蓝色铁颗粒的细胞。经蛛网膜下腔移植标记骨髓间充质干细胞可定向迁移到脊髓损伤区域, 并能促进脊髓损伤神经功能恢复。

张瑞平☆, 男, 1975年生, 山西省太原市人, 汉族, 山西医科大学毕业, 博士后, 副教授, 主要从事分子影像学方面的研究。
zrp_7142@163.com

通讯作者: 解军, 教授, 山西医科大学分子生物实验室, 山西省太原市 030001
xiejunty@yahoo.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2013)01-00074-05

收稿日期: 2012-02-19
修回日期: 2012-04-29
(20120219016/D·S)

Subarachnoid space transplantation of superparamagnetic iron oxide-labeled bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of spinal cord injury

Zhang Rui-ping¹, Li Jian-ding¹, Liu Qiang², Shuang Wei-bing², Xie Jun³

1 Department of Radiology, First Hospital, Shanxi Medical University, Shanxi 030001, Taiyuan Province, China

2 Department of Orthopedics, First Hospital, Shanxi Medical University, Shanxi 030001, Taiyuan Province, China

3 Department of Molecular Biology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Zhang Rui-ping☆, M.D.,
Associate professor,
Department of Radiology, First
Hospital, Shanxi Medical
University, Shanxi 030001,
Taiyuan Province, China
zrp_7142@163.com

Corresponding author: Xie Jun,
Professor, Department of
Molecular Biology, Shanxi
Medical University, Taiyuan
030001, Shanxi Province,
China
xiejunty@yahoo.com

Supported by: Shanxi Province
Youth Science and Technology
Research Foundation, No.
2010021038-2*, Science and
Technology Foundation of
Shanxi Provincial Health
Department, No. 2011017*

Received: 2012-02-19

Accepted: 2012-04-29

Abstract

BACKGROUND: Transplantation of stem cells can rebuild the structure and function of injured central nervous system, and has attracted wide attention in recent years.

OBJECTIVE: To explore the effects of bone marrow mesenchymal stem cells labeled by superparamagnetic iron oxide on the recovery of neurological function in rabbits with spinal cord injury.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells were isolated from rabbits, and cultivated *in vitro* using the density gradient centrifugation and the adherence *in vitro* separation. Passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells were labeled with superparamagnetic iron oxide at 24 hours before use. Rabbit spinal cord injury models were made and the micro tubes were inserted into subarachnoid space. Rabbits were randomly divided into three groups. Rabbits from the group A were injected with superparamagnetic iron oxide labeled bone marrow mesenchymal stem cells *via* subarachnoid spaces. Rabbits from the group B received transplantation of unlabeled bone marrow mesenchymal stem cells. Rabbits from the group C were injected with PBS and served as controls. At 1, 7, 14, 21, 28 and 35 days after cell transplantation, the recovery of neurological function was calculated by BBB scoring in all groups and the pathological tissue slices of spinal cord injury was examined.

RESULTS AND CONCLUSION: The BBB scores in the groups A and V were significantly higher than those in the group C ($P < 0.05$), but there was no statistical difference between groups A and B ($P > 0.05$). At 1, 7, 14, 21, 28 and 35 days following cell transplantation, Prussian blue staining of tissue sections showed cells containing blue iron particles in the area of spinal cord injury. Bone marrow mesenchymal stem cells transplanted *via* subarachnoid space could migrate to the area of spinal cord injury, which thereby improved neurological function.

Key Words: stem cells; stem cell transplantation; superparamagnetic iron oxide; bone marrow mesenchymal stem cells; spinal cord injury; cell transplantation; subarachnoid space; provincial grants-supported paper; stem cell photographs-containing paper

Zhang RP, Li JD, Liu Q, Shuang WB, Xie J. Subarachnoid space transplantation of superparamagnetic iron oxide-labeled bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of spinal cord injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(1):74-78.

0 引言

脊髓损伤是一种致残率非常高的疾病, 目前对脊髓损伤的治疗仍缺乏有效的手段。近年来, 有骨髓间充质干细胞移植治疗脊髓损伤的实验研究^[1-2], 认为骨髓间充质干细胞可以在宿主脊髓中存活、生长、分化, 靶向迁徙于脊髓损伤区, 并能促进神经功能恢复, 为治疗脊髓损伤提供了一种新的思路和手段。

骨髓间充质干细胞可在特定条件下可分化为多种细胞^[3], 包括成骨细胞、脂肪细胞、神经细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞等, 是良好的组织工程的载体细胞, 而且具有取材方便, 易分离、扩增, 自体移植克服了伦理学争议, 无免疫排斥反应等优点。因此, 通过移植骨髓间充质干细胞于体内, 用于组织损伤的修复与重建, 具有广阔的临床应用前景^[4]。

但是, 骨髓间充质干细胞移植后在活体内示踪成为随之而来的研究难点^[5], 近年来, 随着超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxid, SPIO)纳米颗粒标记细胞技术的成熟, 磁共振(magnetic resonance, MR)活体示踪超顺磁性氧化铁标记细胞成为热点^[6]。本实验拟采用超顺磁性氧化铁标记兔骨髓间充质干细胞移植入脊髓损伤兔模型, 观察其疗效, 为磁共振活体示踪移植细胞提供基础。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2009年10月至2010年12月在山西医科大学第一医院放射科和山西医科大学分子生物实验室完成。

材料:

实验动物: 健康新西兰大白兔33只, 雌雄不拘, 体质量600-700 g, 由山西医科大学实验

动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK(晋) 2009-0001。实验动物在二级清洁动物房饲养, 实验过程中对动物处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

主要试剂和仪器: 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司); DMEM培养基(美国Hyclone公司); 多聚左旋赖氨酸(poly-L-lysine, PLL)(美国Sigma公司); SPIO纳米颗粒(德国Schering公司); CO₂培养箱(SIM, 西盟国际); 倒置相差显微镜(Olympus-IX70, 日本)。

方法:

骨髓间充质干细胞的体外分离、培养、传代和鉴定: 随机取1只新西兰大白兔, 在兔髌骨抽取骨髓2 mL, 加PBS, 2 000 r/min离心15 min, 吸弃上清及脂肪层, 缓慢加到含4 mL密度为1.077 g/L Percoll淋巴细胞分离液的无菌离心管中。离心15 min, 可见离心管内液体分为3层, 收集中间层骨髓间充质干细胞, 离心, 弃去上清, 取细胞沉淀。细胞沉淀中加入含体积分数20%胎牛血清的L-DMEM培养基, 接种于25 cm²细胞培养瓶, 在37 °C, 体积分数5%CO₂的细胞培养箱中培养, 待贴壁细胞约90%时, 用0.25%的胰蛋白酶消化, 按1:2传代后继续培养。

磁标记骨髓间充质干细胞和普鲁士蓝染色: 多聚左旋赖氨酸与超顺磁性氧化铁混悬于培养液中(多聚左旋赖氨酸和超顺磁性氧化铁的终浓度分别为1.5 mg/L和250 mg/L), 将超顺磁性氧化铁-多聚左旋赖氨酸复合物分别以1:9与培养基混合, 使铁的终浓度分别为25 mg/L, 加入到第3代骨髓间充质干细胞培养液中进行标记。细胞固定后用Perls溶液孵育30 min, 1%核固红复染30 min, 以未标记细胞作为对照。

建立脊髓损伤模型和蛛网膜下腔置管: 随机取30只白兔俯卧位固定于实验台上, 显露L₁-L₃棘突和椎板, 咬除L₂棘突和椎板, 将骨窗修剪成圆形, 显露脊髓硬膜, 在硬膜表面垫与硬膜囊直径一致的塑料片, 应用自行研制的脊髓损伤模型实验台装置^[7], 致伤能量为60 g·cm, 制作脊髓损伤模型。制作脊髓损伤模型同时, 行L₄₋₅节段椎板切除术, 暴露硬脊膜, 插入PE微管, 看到脑脊液流出视为置管成功。造模过程中脱失的白兔给予补充。

分组干预: 制造脊髓损伤模型成功的30只白兔随机数字表法均分为3组。分别在脊髓损伤造模后第7天, 向每只模型兔中蛛网膜下腔注入细胞悬液或PBS。标记组: 移植含1×10⁶个超顺磁性氧化铁标记的骨髓间充质干细胞悬液50 μL; 未标记组: 同标记组方法和剂量移植未标记骨髓间充质干细胞; 对照组: 注入50 μL PBS作为对照。

行为学评价(BBB分级法)^[8]: 对各组脊髓损伤模型行为评分, 评价标记的骨髓间充质干细胞和未标记骨髓间充质干细胞对脊髓损伤兔神经功能恢复的作用。在移植后第1, 7, 14, 21, 28, 35天, 由2名熟悉BBB评分标准的非实验人员独立观察记录, 最后取平均值。每组每只动物双侧后肢分别评分, 取其平均分并记录。

损伤组织病理学改变: 随机抽取各组脊髓损伤模型大白兔1只, 于细胞移植后1, 7, 14, 21, 28, 35 d处死, 取脊髓损伤部位组织。将脊髓组织块置入40 g/L多聚甲醛溶液中浸泡、固定、包埋、切片, 行苏木精-伊红染色和普鲁士蓝染色。

主要观察指标: 观察骨髓间充质干细胞的细胞形态、生长周期、磁标记情况和细胞移植后BBB评分, 以及移植细胞在脊髓损伤模型活体内不同时间段的分布情况。

统计学分析: 由第一作者完成, 采用SPSS 11.5统计软件进行处理, 统计方法选用两因素析因设计方差分析, 统计学软件由山西医科大学统计教研室购买。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入动物数量为33只, 1只进行骨髓间充质干细胞培养, 30只进行造模, 造模成功率为93.3%, 2只兔死亡, 1只为麻药过量, 1只为造模后感染死亡, 死亡后均给予补充。共30兔进入结果分析。

2.2 普鲁士蓝染色结果 磁标记细胞经细胞涂片, 行普鲁士蓝染色, 显微镜下见标记细胞的胞质内出现蓝染铁颗粒, 见图1; 而未磁标的骨髓间充质干细胞普鲁士蓝染色未见到蓝染铁颗粒。

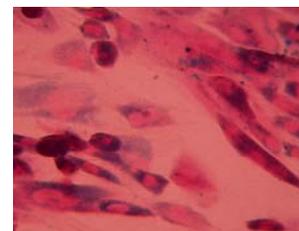


图1 超顺磁性氧化铁标记骨髓间充质干细胞行普鲁士染色见细胞内含蓝染铁颗粒(×40)

Figure 1 Superparamagnetic iron oxide-labeled bone marrow mesenchymal stem cells containing blue iron particles as shown by Prussian blue staining (×40)

2.3 骨髓间充质干细胞促进脊髓损伤兔的功能恢复 见图2。

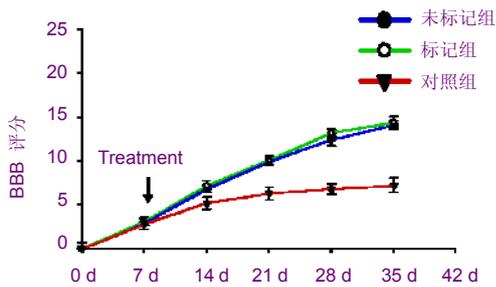


图2 脊髓损伤后不同时间点各组兔模型 BBB 评分曲线

Figure 2 Curves of Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) rating scale scores in rabbits from each group at varying time points after spinal cord injury

从细胞移植后14 d开始, 两移植组BBB评分都高于PBS对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。两移植组间的BBB评分差异无显著性意义($P > 0.05$)。这说明骨髓间充质干细胞能够改善脊髓损伤兔的运动功能, 超顺磁性氧化铁标记不影响骨髓间充质干细胞的治疗效果。

2.4 脊髓损伤区组织病理学改变 标记组在细胞移植后1 d, 脊髓损伤区未见蓝染铁颗粒的细胞(超顺磁性氧化铁标记的骨髓间充质干细胞); 标记组在细胞移植后7 d, 脊髓损伤区出现了少量的胞浆内含蓝染铁颗粒的细胞, 见图3。

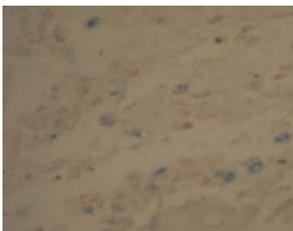


图3 细胞移植后7 d 脊髓损伤区见散在的超顺磁性氧化铁标记的骨髓间充质干细胞($\times 100$)

Figure 3 At 7 d after cell transplantation, cells containing blue iron particles in the area of spinal cord injury could be seen in tissue sections ($\times 100$)

标记组在细胞移植后14 d, 脊髓损伤区可见胞浆内含蓝染铁颗粒的细胞明显增多, 且细胞主要集中在损伤较严重区, 见图4; 细胞移植后21, 28, 35 d, 脊髓损伤区含蓝染铁颗粒的细胞较移植14 d的数量越来越多, 但21, 28, 35 d细胞内的蓝染程度却逐渐下降, 考虑是由于细胞分裂、增殖而引起细胞内铁颗粒的数量减少所致。在细胞移植的21, 28, 35 d后, 两移植组的脊髓损伤区水肿程度和空泡样变性减轻, 囊变空洞减少, 神经

细胞形态和结构排列也有所改善。

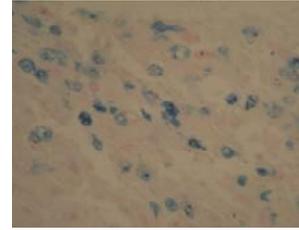


图4 细胞移植后14 d 脊髓损伤区见超顺磁性氧化铁标记的骨髓间充质干细胞增多($\times 100$)

Figure 4 At 14 d after cell transplantation, more and more cells containing blue iron particles in the area of spinal cord injury could be seen in tissue sections ($\times 100$)

3 讨论

本实验联合密度梯度离心法和贴壁培养法分离干细胞, 具有操作简便, 快速, 实用等优点, 是一种比较理想的分离培养方法。为提高干细胞的磁标记率, 需利用阳离子转染剂, 在阳离子转染试剂介导的胞吞作用下, 超顺磁性氧化铁可以有效标记骨髓间充质干细胞。常用的阳离子转染试剂有多聚左旋赖氨酸、硫酸鱼精蛋白等, 根据前期实验, 作者利用多聚左旋赖氨酸介导的转染技术, 使超顺磁性氧化铁有效的标记了骨髓间充质干细胞, 且该方法安全、有效, 对细胞活性无影响^[9-10]。

目前, 移植骨髓间充质干细胞治疗脊髓损伤已经成为研究的热点, 主要的移植方法有3种: ①原位移植: 此方法会造成难以避免的二次损伤, 在很大程度上影响了骨髓间充质干细胞移植治疗的效果。②静脉移植: 虽然静脉移植方便、无创, 但是经过循环系统, 细胞大量分布于肝、脾、肺等器官, 真正到达损伤区存活和发挥功能的细胞数目较少, 功能恢复的评分也较低^[11]。③蛛网膜下腔移植: Paul等^[12]全面比较了蛛网膜下腔注射、静脉移植和原位移植骨髓间充质干细胞对大鼠脊髓损伤的修复作用, 认为蛛网膜下腔注射与静脉移植相比, 损伤区存活的移植细胞更多, 脊髓组织保护更好, 尼氏染色显示有更多的神经元存活, 免疫排斥反应更小, 功能恢复也更好。并且蛛网膜下腔穿刺是临床上常用的检查和治疗手段, 它创伤小, 可反复给药, 是一种更具临床应用前景的细胞移植治疗方式。实验通过蛛网膜下腔置管移植超顺磁性氧化铁标记的骨髓间充质干细胞到脊髓损伤模型, 发现在细胞移植后的7, 14, 21, 28, 35 d, 脊髓损伤区随着时间的延长, 骨髓间充质干细胞出现的

数量越来越多, 并且主要分布在损伤较重的组织区域, 而未损伤区脊髓组织几乎未见到骨髓间充质干细胞, 说明骨髓间充质干细胞经蛛网膜腔移植, 可定向迁移到脊髓损伤组织区域, 可能参与损伤组织的修复。通过蛛网膜下腔移植骨髓间充质干细胞在受损脊髓中存活、聚集和定向迁移的机制尚不清楚, 但这些结果证明受损的组织能产生强烈的化学信号而引起移植骨髓间充质干细胞的定向迁移。认为这可能是脊髓组织受到损伤后分泌的某种或某些趋化因子的吸引作用引起的。

作者的实验利用骨髓间充质干细胞移植来治疗兔脊髓损伤, 从细胞移植脊髓损伤模型后14 d开始, 细胞移植组的BBB评分与PBS对照组的评分相比显著增高($P < 0.05$), 两组骨髓间充质干细胞移植组的兔脊髓损伤模型有明显的神经功能恢复; 另外, 移植超顺磁性氧化铁标记骨髓间充质干细胞的兔和移植未标记骨髓间充质干细胞的兔的BBB评分差异没有显著性意义($P > 0.05$), 这说明骨髓间充质干细胞能够改善脊髓损伤兔的运动功能, 且超顺磁性氧化铁的标记不影响骨髓间充质干细胞的治疗作用。实验观察到骨髓间充质干细胞在脊髓损伤组织的囊变空洞区分布较多; 在细胞移植21, 28, 35 d后, 细胞移植组同对照组比较发现: 细胞移植组的脊髓损伤区水肿程度和空泡样变性减轻, 囊变空洞减少, 神经细胞形态和结构排列也有所改善。该结果提示, 骨髓间充质干细胞能够在脊髓损伤后的兔脊髓内存活, 可定向迁徙到损伤组织区, 填充和聚集, 弥合了损伤脊髓的空洞区, 有效的阻止了损伤区囊性空洞的形成, 保持了脊髓的立体结构, 为轴突的再生提供了依附的基质和微环境, 神经功能得以恢复。

实验通过蛛网膜下腔移植磁标骨髓间充质干细胞到兔脊髓损伤模型, 经普鲁士蓝染色结果证实移植的骨髓间充质干细胞可以靶向迁移到脊髓损伤区, 对脊髓损伤区有一定的修复作用, 改善了脊髓损伤的神经功能。

基金资助: 山西省青年科技研究基金(2010021038-2); 山西省卫生厅科技攻关项目(2011017)。

作者贡献: 第一、二、三作者进行实验设计, 第二、三作者审核, 第一、四作者进行实施, 第五作者进行实验评估, 资料收集为第一、四作者, 第一作者成文, 第一作者对文章负责。

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2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品, 内容真实, 文责自负; 数据准确, 文章内容不涉及泄密, 已由单位审核; 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。

4 参考文献

- [1] Ban DX, Ning GZ, Feng SQ, et al. Combination of activated Schwann cells with bone mesenchymal stem cells: the best cell strategy for repair after spinal cord injury in rats. *Regen Med.* 2011;6(6):707-720.
- [2] Shi CY, Ruan LQ, Feng YH, et al. Marrow mesenchymal stem cell transplantation with sodium alginate gel for repair of spinal cord injury in mice. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2011;40(4):354-359.
- [3] Wang K, Li JD, Zhang RP, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(19):3436-3439.
王凯, 李健丁, 张瑞平, 等. 超顺磁性氧化铁标记骨髓间充质干细胞诱导分化为神经细胞的体外实验[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(19):3436-3439.
- [4] Nakamura S, Yamada Y, Baba S. Culture medium study of human mesenchymal stem cells for practical use of tissue engineering and regenerative medicine. *Biomed Mater Eng.* 2008;18(3):129-136.
- [5] Chickera S, Willert C, Mallet C, et al. Cellular MRI as a suitable, sensitive non-invasive modality for correlating in vivo migratory efficiencies of different dendritic cell populations with subsequent immunological outcomes. *Int Immunol.* 2012; 24(1):29-41.
- [6] Willenbrock S, Knippenberg S, Meier M, et al. In vivo MRI of intraspinally injected SPIO-labelled human CD34+ cells in a transgenic mouse model of ALS. *In Vivo.* 2012; 26(1):31-38.
- [7] Ren Z, Wang J, Zou C, et al. Labeling of cynomolgus monkey bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell tracking by multimodality imaging. *Sci China Life Sci.* 2011; 54(11):981-987.
- [8] Shuang WB, Liu Q. Zhonghua Shiyian Waike Zazhi. 2010; 27(7):1006.
双卫兵, 刘强. 一种用于制备标准化脊髓损伤动物模型的实验装置[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(7):1006.
- [9] Martinez M, Brezun JM, Bonnier L, et al. A new rating scale for open-field evaluation of behavioral recovery after cervical spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma.* 2009; 26(7):1043-1053.
- [10] Zhang RP, Liu Q, Li J, et al. Zhongguo Yixue Yingxiangxue Zazhi. 2009;17(7):257-261.
张瑞平, 刘强, 李晶, 等. 超顺磁性氧化铁标记鼠骨髓间充质干细胞的体外MR成像研究[J]. 中国医学影像学杂志, 2009, 17(7): 257-261.
- [11] Zhang RP, Li Q, Li JD, et al. Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi. 2009;23(7):851-855.
张瑞平, 刘强, 李健丁, 等. 超顺磁性氧化铁标记兔BMSCs生物学特性及MRI成像研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2009, 23(7): 851-855.
- [12] Paul C, Samdani AF, Betz RR, et al. Grafting of human bone marrow stromal cells into spinal cord injury: a comparison of delivery methods. *Spine.* 2009;34(4):328-334.