

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.23.011 [http://www.crter.org]

高平, 孙占胜, 王伯珉, 李连欣, 王甫, 牟乐明. 骨髓间充质干细胞诱导成神经元样细胞移植治疗脊髓损伤[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(23):4256-4263.

骨髓间充质干细胞诱导成神经元样细胞移植治疗脊髓损伤*★

高平^{1,2}, 孙占胜¹, 王伯珉¹, 李连欣¹, 王甫¹, 牟乐明¹

1 山东大学附属省立医院创伤骨科, 山东省济南市 250021

2 山东大学医学院, 山东省济南市 250012

文章亮点:

- 1 在不同的诱导方法下获得的神经元样细胞移植治疗脊髓损伤的疗效是否有差异, 目前尚无可靠的报道。
- 2 课题分别采用了化学和生物两种诱导方法中比较公认的诱导剂, 将骨髓间充质干细胞诱导成为神经元样细胞后移植入大鼠模型的脊髓损伤部位, 通过对脊髓损伤大鼠模型的行为学观察和比较脊髓的组织学变化, 最终确定了两种方法诱导所获得的神经元样细胞在治疗脊髓损伤疗效上的优劣。
- 3 实验数据再次证实: 骨髓间充质干细胞采用生物诱导分化为神经元样细胞治疗脊髓损伤有效, 且相对于化学诱导剂, 生物诱导剂无毒无害, 增加了细胞移植的安全性。

关键词:

干细胞; 干细胞移植; 脊髓损伤; 细胞移植; 诱导分化; 生物诱导; 化学诱导; 省级基金; 干细胞图片文章

摘要

背景: 骨髓间充质干细胞诱导成为神经元样细胞移植治疗脊髓损伤已被证实有效, 但不同诱导方法之间的差别尚无报道。

目的: 通过对脊髓损伤模型大鼠的行为对比及生化指标的检测, 观察采用不同诱导方法将骨髓间充质干细胞诱导分化为神经元样细胞后移植对脊髓损伤疗效的差别。

方法: 取4周龄雄性Wistar大鼠骨髓分离培养骨髓间充质干细胞, 对第3代骨髓间充质干细胞分别进行化学诱导和生物因子诱导后, 收集备用。8周龄雄性Wistar大鼠48只, 采用脊髓半横切法建立大鼠的脊髓损伤模型, 随机分为4组: 1周后骨髓间充质干细胞组损伤部位局部注射第3代骨髓间充质干细胞, 化学诱导组局部注射化学诱导成的神经元样细胞, 生物诱导组局部注射生物诱导成的神经元样细胞, DMEM培养液组局部注射细胞培养液。对48只大鼠脊髓损伤模型分别于伤后1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12周进行BBB评分, 并于第12周末对损伤部位进行取材做组织切片, 观察脊髓损伤的修复情况。

结果与结论: 模型建立后12周, 骨髓间充质干细胞组、化学诱导组和生物诱导组大鼠后肢功能恢复明显优于DMEM培养液组($P < 0.05$), 骨髓间充质干细胞组和化学诱导组功能恢复无明显差别($P = 0.4363$), 生物诱导组恢复效果好于前2组($P < 0.05$)。生物诱导组大鼠运动功能持续恢复显著好于其他3组。脊髓组织切片苏木精-伊红染色显示骨髓间充质干细胞组和化学诱导组近似, 脊髓胶质细胞增生, 神经元样细胞崩解、空洞形成少于DMEM培养液组, 生物诱导组神经损伤修复效果最佳。提示化学诱导后的骨髓间充质干细胞与未经过诱导的骨髓间充质干细胞在修复神经损伤的效果上没有明显差别; 而经过生物诱导的骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞后移植治疗脊髓损伤的疗效明显优于未经诱导和化学诱导的骨髓间充质干细胞移植的疗效。

高平★, 男, 1987年生, 山东省高密市人, 汉族, 山东大学医学院骨外科在读硕士, 主要从事骨髓间充质干细胞治疗脊髓损伤的研究。

Gaopinggp125@163.com

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2013)23-04256-08

收稿日期:2012-11-07

修回日期:2013-01-22

(20121107005/W-S)

Transplantation of neuron-like cells from bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of spinal cord injury

Gao Ping^{1,2}, Sun Zhan-sheng¹, Wang Bo-min¹, Li Lian-xin¹, Wang Fu¹, Mu Le-ming¹

1 Department of Traumatic Orthopedics, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China

Gao Ping★, Studying for master's degree, Department of Traumatic Orthopedics, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China; Medical College of Shandong University, Jinan 250012, Shandong Province, China
Gaopingp125@163.com

Supported by: Key Scientific and Technological Project of Shandong Province, No. 2006GG3202046*

Received: 2012-11-07
Accepted: 2013-01-22

2 Medical College of Shandong University, Jinan 250012, Shandong Province, China

Abstract

BACKGROUND: The therapeutic effects of transplantation of neuron-like cells from bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injury have been confirmed. However, the efficiency differences among different methods of inducing neuron-like cell differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells remain poorly understood.

OBJECTIVE: After behavioral observation and biochemical index measurements of spinal cord injury rat models, the curative effects of transplantation of neuron-like cells induced by different methods from bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injury were investigated.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells were isolated from 4-week-old male Wistar rats. Passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells were induced by chemical methods and biological factors for later use. Spinal cord injury was induced in 48 male Wistar rats aged 8 weeks by spinal cord hemisection method. Then the rats were randomly divided into four groups: bone marrow mesenchymal stem cells, chemically-induced, biological factor-induced and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) groups, in which, passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells, chemically-induced or biological factor-induced, or DMEM-treated bone marrow mesenchymal stem cells were injected into the injury region 1 week later, respectively. All 48 spinal cord injury rats were scored by the Basso, Beattie and Bresnahan locomotor rating scale at various time points (1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 weeks after injury). At the end of 12 weeks after injury, tissue sections from the injury region were prepared for observation of repair of spinal cord injury.

RESULTS AND CONCLUSION: At 12 weeks after spinal cord injury induction, recovery of hindlimb motor functions was superior in the bone marrow mesenchymal stem cells, chemically-induced, biological factor-induced groups to that in the DMEM group ($P < 0.05$). There was no obvious difference in recovery of hindlimb motor function between bone marrow mesenchymal stem cells group and chemically-induced group ($P = 0.4363$), and the hindlimb motor function recovery was better in the biological factor-induced group than that in the bone marrow mesenchymal stem cells group and chemically-induced group ($P < 0.05$). The motor function recovery was superior in the biological factor-induced group to that in the other three groups. Hematoxylin-eosin staining results demonstrated that bone marrow mesenchymal stem cells group and chemically-induced group showed similar outcomes: glial cells proliferation, neuron-like cell disruption and cavitation. The biological factor-induced group yielded best recovery of hindlimb motor function. These findings indicate that in the treatment of spinal cord injury by cell transplantation, chemically-induced and non-induced bone marrow mesenchymal stem cells have no obvious difference, while biological factor-induced bone marrow mesenchymal stem cells exhibit better therapeutic effects than non-induced and chemically-induced bone marrow mesenchymal stem cells.

Key Words: stem cells; stem cell transplantation; spinal cord injury; cell transplantation; induced differentiation; biological induction; chemical induction; provincial grants-supported paper; stem cell photographs-containing paper

Gao P, Sun ZS, Wang BM, Li LX, Wang F, Mu LM. Transplantation of neuron-like cells from bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of spinal cord injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(23): 4256-4263.

0 引言

骨髓间充质干细胞是具有多向分化潜能的干细胞, 研究证实, 骨髓间充质干细胞移植用于治疗脊髓损伤是可行的方法, 但单纯的骨髓间充质干细胞移植治疗脊髓损伤疗效有限^[1], 因此骨髓间充质干细胞定向诱导分化为神经元样细胞后移植治疗脊髓损伤有重要研究价值。诱导方法有多种, 但不同诱导剂定向诱导的骨髓间充质干细胞移植后, 对脊髓损伤的疗效有何差异尚无报道。以此为该课题立项依据, 设计大鼠脊髓损伤模型, 研究不同诱导剂对骨髓间充质干细胞诱导分化为神经元样细胞移植治疗脊髓损伤的效果, 为临床治疗脊髓损伤提供理论依据。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2011年11月至2012年7月在山东大学附属省立医院中心实验室完成, 实验室生物安全防护水平BSL-3, 为省部级重点实验室。

材料:

实验动物: 4周龄雄性Wistar大鼠6只, 平均体质量110 g, 用于提取骨髓间充质干细胞。8周龄雄性Wistar大鼠48只, 平均体质量314 g, 用于构建脊髓损伤的动物模型。实验动物由山东大学试验动物中心提供, 动物许可证号SCXK(鲁)20090001, 等级SPF。实验中对动物的处理符合动物伦理学要求。

骨髓间充质干细胞诱导成神经元样细胞后移植治疗大鼠脊髓损伤所需试剂:

Main experimental reagents:

试剂	来源
DMEM 低糖培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、二甲基亚砜、BHA(butylated hydroxyanisole)、BME(β -mercaptoethanol)	Gibco 公司, 美国
表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、神经生长因子	武汉海特生物制药有限公司, 中国
免疫细胞化学试剂盒、 β -actin	中衫金桥生物公司, 中国
兔抗大鼠神经元特异性烯醇化酶、胶质纤维酸性蛋白、神经丝蛋白	武汉博士德生物公司, 中国
superRTcDNA KIT 试剂盒(CW0741)、2xTAP MASTERMIX 试剂盒(CW0716)	康为世纪生物公司, 中国
Trizol 试剂	大连宝生物公司, 中国
神经胶质细胞	山东大学附属省立医院中心实验室

实验方法:

骨髓间充质干细胞的分离培养: 根据文献[2]提取骨髓间充质干细胞, 以 $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种于培养瓶, 每个培养瓶加全培养液5 mL, 于 37°C , 体积分数5% CO_2 的恒温培养箱中静置3 d, 首次半量换液, 以后每3 d换液1次。12–14 d细胞铺满80%瓶底后以1:3比例传代。每天用倒置显微镜观察细胞生长情况。

骨髓间充质干细胞的鉴定: 收集第3代骨髓间充质干细胞, 采用免疫细胞化学法进行表型CD34和CD44的鉴定: 以 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种于带有多聚赖氨酸预处理的玻片的六孔板中, 每孔全培养液4 mL, 置于 37°C , 体积分数5% CO_2 的恒温培养箱中培养; 3 d后, 将贴附有细胞的玻片用PBS冲洗, 体积分数95%乙醇固定, 体积分数3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶活性, 山羊血清封闭15 min, 一抗(CD34和CD44抗体) 4°C 孵育过夜, PBS冲洗, 生物素标记二抗孵育15 min, PBS冲洗,

辣根过氧化物酶链霉卵白素工作液 37°C 孵育30 min, PBS冲洗, DAB显色, 苏木精复染, 乙醇梯度脱水, 中性树脂封固, 镜下观察。

骨髓间充质干细胞定向诱导成神经元样细胞: 收集第3代骨髓间充质干细胞用普通培养液混悬, 以 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 接种于培养瓶中, 约48 h后细胞覆盖瓶底接近70%时, 更换诱导培养液。化学诱导剂组培养液组成^[3]: 80%DMEM (dulbecco's modified eagle medium)、体积分数20%胎牛血清、1 mmol/L BME(β -mercaptoethanol)进行预诱导, 24 h后更换诱导培养液, 组成为含2%二甲基亚砜、200 $\mu\text{mol/L}$ BHA(butylated hydroxyanisole)的 DMEM 培养液, 诱导24 h。生物诱导剂组培养液组成为^[4]: 体积分数10%胎牛血清、90%DMEM、表皮生长因子20 $\mu\text{g/L}$ 、碱性成纤维细胞生长因子20 $\mu\text{g/L}$ 、神经生长因子20 $\mu\text{g/L}$, 诱导时间为9 d^[5]。

诱导成的神经元样细胞的鉴定: 诱导过程中, 倒置相差显微镜观察细胞形态的变化。诱导完成后, 采用细胞免疫化学法(步骤同骨髓间充质干细胞的鉴定)和PCR法鉴定诱导成的神经元样细胞。PCR法步骤: 收集经过诱导的细胞和培养的神经胶质细胞(作为对照)提取总RNA, 吸除培养液, PBS清洗2次, 加入4 mL的RNAiso Reagent, 静置5 min, 加入1/5体积的氯仿, 混匀后500 r/min离心15 min, 上清液中加入等体积的异丙醇, 室温静置10 min, 500 r/min离心10 min, 离心半径138 mm, 体积分数75%的乙醇洗涤沉淀, 溶于适量的DEPC处理水。严格按照试剂盒说明书添加试剂, 94°C 预温5 min, 94°C 30 s、 52°C 30 s、 72°C 1 min共30个循环。对PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳分析, 每个加样孔分别加5 μL DL500的Marker, 神经元特异性烯醇化酶、胶质纤维酸性蛋白、神经丝蛋白和 β -actin的PCR产物。实验所有引物均由Primer3程序设计, 由BLAST(PubMed)鉴定确认, 最后由上海生工生物有限公司合成。

脊髓损伤动物模型的建立及分组: 选择8周龄雄性Wistar大鼠48只, 实验室饲养1周后, 建立大鼠脊髓损伤模型^[6]。用体积分数10%水合氯醛300 mg/kg腹腔注射麻醉; 俯卧位固定在手术台上, 常规备皮、消毒; 在 T_{10} 棘突处标记皮肤, 沿后正中中线切开背部皮肤及皮下组织, 切口长约3.0 cm, 剥离椎旁肌并向两侧牵开, 显露 T_9 – T_{10} 棘突及椎板, 用大鼠椎板钳咬除 T_9 棘突、 T_{10} 棘突及椎板, 显露硬膜; 剪开硬膜, 用磨尖的虹膜刀迅速切断右半侧脊髓; 青庆大霉素盐水冲洗伤口, 逐层缝合组织。以右后肢及尾无活动、针刺皮肤无反应为造模成功标准。期间死亡3只, 立即补充。早晚各挤尿1次, 直至恢复自主排尿。

细胞移植: 将动物模型随机分为4组, 每组各12只。损伤1周后分别再次手术^[7], 显露出脊髓损伤区域, 骨髓间充质干细胞组用微量注射器自损伤处中心上下1 mm分别缓慢注入10 μL ($1 \times 10^{13} \text{ L}^{-1}$)的第3代骨髓间充质干细胞悬液^[8], 化学诱导组注入10 μL ($1 \times 10^{13} \text{ L}^{-1}$)经化学诱导分化的细胞悬液, 生物诱导组注入10 μL ($1 \times 10^{13} \text{ L}^{-1}$)经生物诱导分化的细胞悬液, DMEM培养液组注入10 μL DMEM培养液。3 min内注射完毕, 留针5 min, 逐层缝合伤口。各组动物术后均置于普通鼠笼喂养。观察到自主排尿, 不必人工挤尿。

动物模型行为学评分: 采用Basso-Beattie-Bresnahan (BBB)运动功能评分法^[9], 于造模后1周(细胞移植后)、2, 3, 4, 6, 8, 10及12周对各大鼠模型右后肢及尾进行盲法评分。

组织切片与染色: 细胞移植后12周, 将4组大鼠全部处死, 取损伤处脊髓组织, 40 g/L多聚甲醛固定, 常规脱水, 石蜡包埋后5 μm 连续切片, 进行苏木精-伊红染色观察。

主要观察指标: 观察脊髓组织的白质灰质结构分界清晰与否及存在的空洞情况, 神经元细胞及胶质细胞形态。

统计学分析: 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 由第一作者采用SPSS 17.0统计学软件进行数据分析, 多组间均数差异比较采用单因素方差分析, 两组间均数比较采用LSD-*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 实验选用Wistar大鼠48只, 分为4组, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 骨髓间充质干细胞的鉴定 见图1。



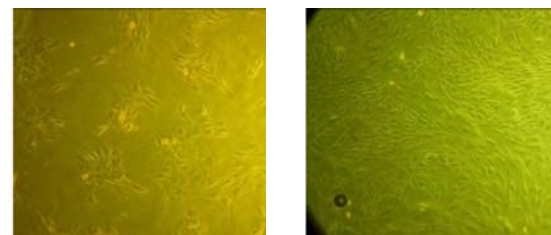
注: 培养的第3代骨髓间充质干细胞符合干细胞增殖规律。

图1 培养纯化的第3代大鼠骨髓间充质干细胞的生长曲线图

Figure 1 Growth curves of passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells after culture and purification

培养纯化的第3代骨髓间充质干细胞以 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种, 在第1, 3, 5, 7, 9天分别测得MTT实验的平均值为0.153 3, 0.218 1, 0.330 4, 0.493 5, 0.650 8。绘制成细胞生长曲线, 符合干细胞增殖规律。

在倒置相差显微镜下, 逐日观察骨髓间充质干细胞, 开始细胞呈散在集落, 第7天时可见呈簇状分布的梭形细胞聚集, 第12天时可见梭形细胞呈旋涡状铺满瓶底。见图2。

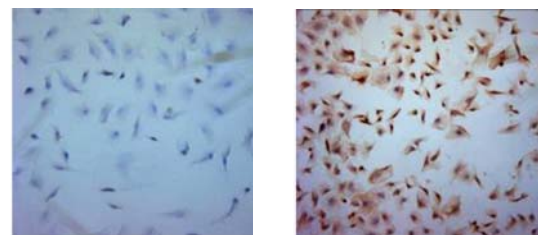


A: 第7天时可见呈簇状分布的梭形细胞聚集 B: 第12天时可见梭形细胞呈旋涡状铺满瓶底

图2 倒置相差显微镜下观察大鼠骨髓间充质干细胞增殖情况($\times 100$)

Figure 2 Rat bone marrow mesenchymal stem cell proliferation under inverted phrase microscope ($\times 100$)

细胞免疫化学染色在显微镜下可以见到CD44呈阳性反应, 整个细胞呈棕黄色; 而CD34呈阴性反应, 细胞没有着色。符合骨髓间充质干细胞表面特异性标志的特点^[10]。见图3。



A: CD34 呈阴性反应 B: CD44 呈阳性反应

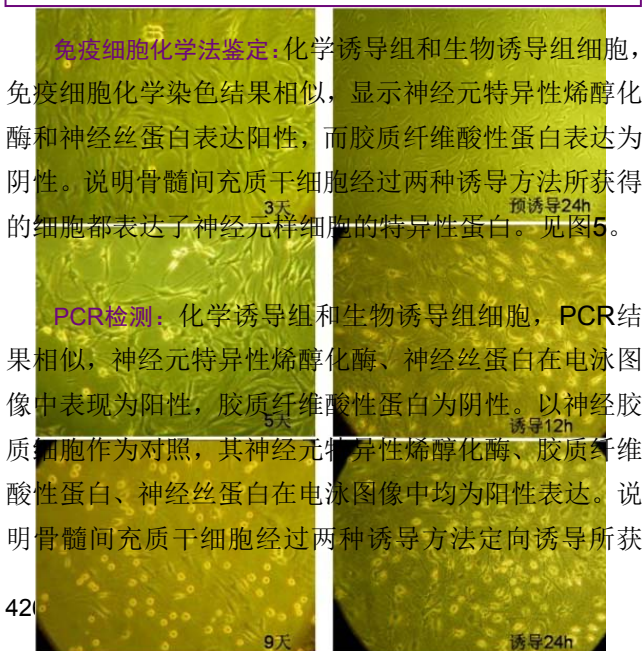
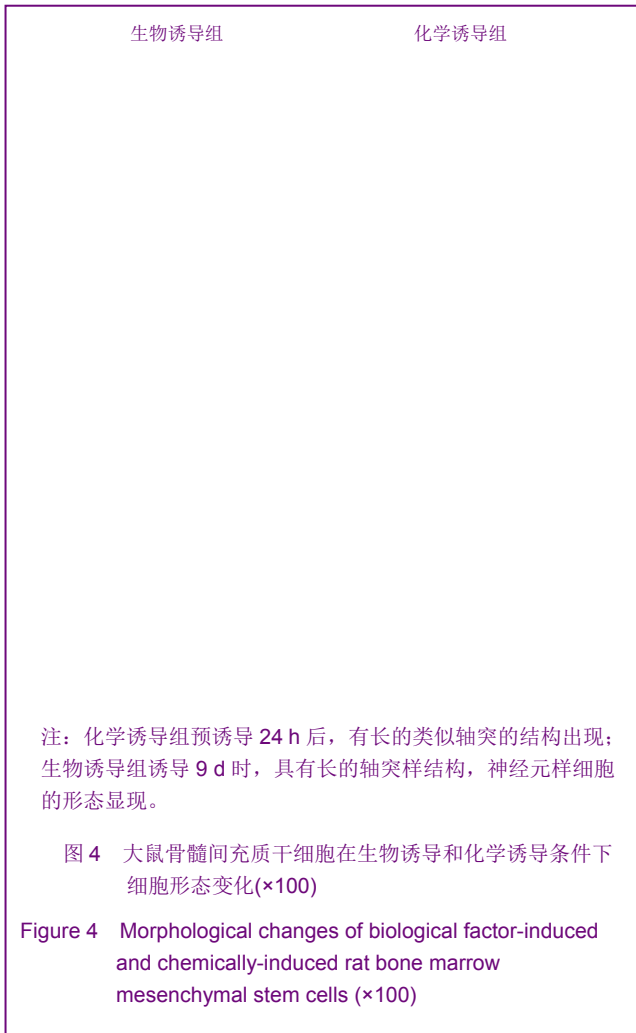
图3 第3代大鼠骨髓间充质干细胞免疫细胞化学染色CD34、CD44表达($\times 100$)

Figure 3 CD34, CD44 expression in passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells as detected by immunocytochemical staining ($\times 100$)

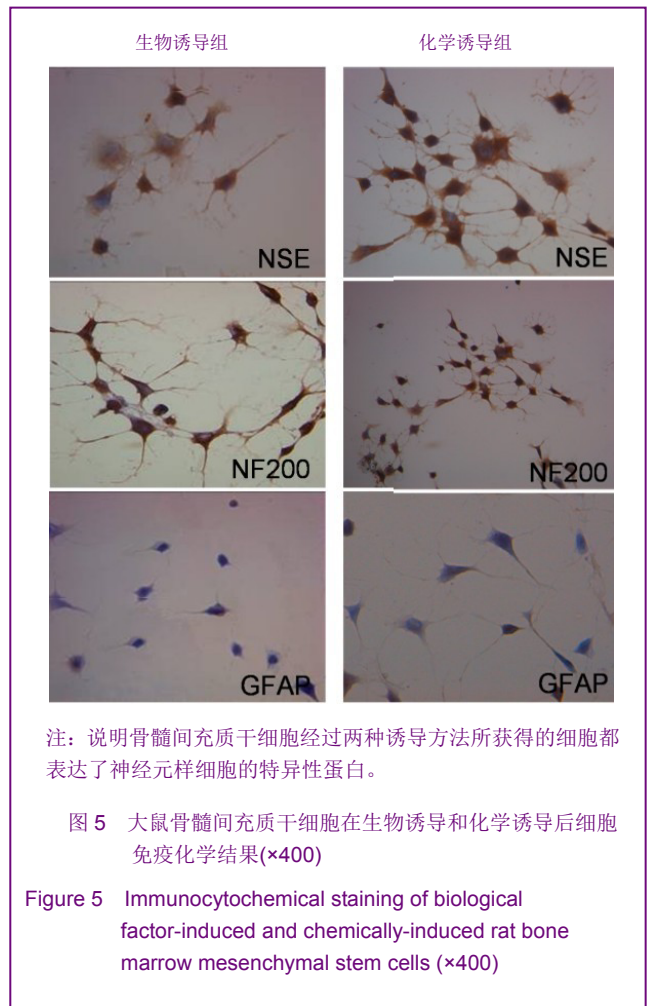
2.3 骨髓间充质干细胞来源的神经元样细胞的鉴定

细胞形态学观察: 在诱导培养基条件下, 持续镜下观察细胞形态的变化。化学诱导组: 预诱导24 h后, 细胞形态改变不明显; 正式诱导12 h后, 细胞形态发生明显

改变, 胞体变圆、变小, 折光性增强, 多个突起产生, 24 h后, 有长的类似轴突的结构出现。生物诱导组: 开始诱导后3 d, 细胞由原来的长梭形逐渐变为三角形、多边形; 5 d后, 大部分细胞胞体收缩, 折光性增强, 有多个长的突起形成; 9 d时, 细胞胞体变圆, 有数个突起, 具有长的轴突样结构, 交织成网状, 神经元样细胞的形态显现。见图4。



得的细胞在基因水平上表现了神经元样细胞的特异性。见图6。



2.4 动物模型行为学评分 造模前, 各大鼠活动正常, BBB评分21分^[9, 11]。造模后表现右后肢及尾无活动, 针刺皮肤无反应, 排尿障碍, 排便未观察到明显异常。伤

后1-12周BBB评分见表1。

表1 脊髓损伤模型建立后, 根据 BBB 评分系统记录各组大鼠 BBB 评分

Table 1 The Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) locomotor rating scale results after spinal cord injury induction in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

伤后	骨髓间充质干细胞组	化学诱导组	生物诱导组	DMEM 培养液组
1 周	0.42±0.51	0.42±0.51	0.42±0.51	0.42±0.51
2 周	1.17±0.39	1.18±0.33	1.25±0.45	1.17±0.39
3 周	2.25±0.45	2.33±0.24	2.67±0.49	2.00±0.43
4 周	5.75±0.45	5.83±0.33	6.25±0.62	3.92±0.51
6 周	8.08±0.51	8.00±0.18	10.853±0.71	4.17±0.15
8 周	8.25±0.20	8.33±0.24	13.92±0.27	4.17±0.15
10 周	8.42±0.27	8.50±0.27	14.67±0.42	4.17±0.15
12 周	8.42±0.27 ^a	8.58±0.27 ^a	14.67±0.42 ^{abc}	4.17±0.15

与 DMEM 培养液组比较, ^a $P < 0.05$; 与髓间充质干细胞组、化学诱导组比较, ^b $P < 0.05$; 与伤后 6 周比较, ^c $P < 0.05$ 。

注: 生物诱导组大鼠运动功能持续恢复至 10 周, 显著好于其他 3 组; DMEM 培养液组大鼠运动功能恢复最差。

伤后1-4周: 伤后1周, 针刺右后肢皮肤有回缩反应, 伤后2周偶见髌关节活动, 伤后3周髌膝关节皆有活动。伤后4周, 骨髓间充质干细胞组和化学诱导组可见到后肢三关节活动, 而DMEM培养液组踝关节未见活动。

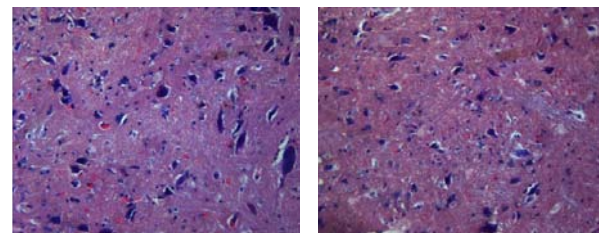
伤后6周: 骨髓间充质干细胞组和化学诱导组见掌面非承重着地, 生物诱导组掌面承重着地, 但后肢活动不协调, DMEM培养液组较前恢复不明显。

伤后8周: 骨髓间充质干细胞组和化学诱导组见掌面承重着地, 但活动不协调, 生物诱导组有持续性掌面承重移动和前后肢协调动作, 常见掌面移动, 持续型前后肢协调动作, 偶有爪背侧移动, DMEM培养液组无继续恢复。

伤后10周: 骨髓间充质干细胞组、化学诱导组、生物诱导组3组较前略有恢复但不明显, DMEM培养液组无继续恢复。伤后12周, 4组均无继续恢复, 骨髓间充质干细胞组、化学诱导组与DMEM培养液组比较差异有显著性意义($t=22.81/23.70$, $P < 0.05$); 生物诱导组与骨髓间充质干细胞组、化学诱导组比较差异有显著性意义($t=26.08/25.38$, $P < 0.05$); 化学诱导组与骨髓间充质干细胞组比较差异无显著意义($t=0.792$, $P=0.436$)。

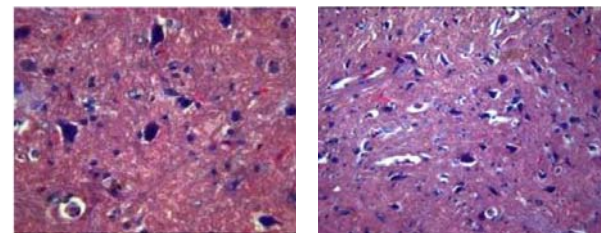
在伤后的前4-6周, 随着损伤部位水肿和炎症的消退及周围轻度受损神经元的恢复, 部分神经传导重新建立, 模型动物的运动功能也部分恢复。6周后, DMEM培养液组功能再无继续恢复; 骨髓间充质干细胞组和化学诱导组继续恢复但不明显, 伤后12周与伤后6周比较差异无显著性意义($t=1.586/3.023$, $P=0.127$ 1/0.063 0); 生物诱导组继续恢复至10周, 且恢复明显, 伤后12周与伤后6周比较差异有显著意义($t=13.70$, $P < 0.05$)。见表1。

脊髓切片苏木精-伊红染色: 见图7。



A: 骨髓间充质干细胞组

B: 化学诱导组



C: 生物诱导组

D: DMEM 培养液组

注: 说明生物诱导组脊髓损伤后, 较快的进入恢复期, 且神经恢复程度高于骨髓间充质干细胞组、化学诱导组和 DMEM 培养液组。

图7 脊髓损伤 12 周骨髓间充质干细胞组、化学诱导组、生物诱导组及 DMEM 培养液组损伤部位切片观察(苏木精-伊红染色, $\times 400$)

Figure 7 Hematoxylin-eosin staining results of spinal cord injury sections harvested from bone marrow mesenchymal stem cells, chemically-induced, biological factor-induced and Dulbecco's modified Eagle's medium groups at 12 wk after spinal cord injury ($\times 400$)

损伤12周后损伤部位脊髓切片苏木精-伊红染色显示DMEM培养液组脊髓灰质与白质分界不清, 结构混乱, 且有较大坏死空洞存在, 神经元样细胞崩解广泛, 胶质细胞增生不明显。骨髓间充质干细胞组与化学诱导组相似, 灰质与白质分界清楚, 坏死空洞较DMEM培养液组小且少, 神经元样细胞崩解较DMEM培养液组轻, 胶质细胞增生。说明骨髓间充质干细胞组和化学诱

导组功能恢复较DMEM培养液组好。生物诱导组脊髓结构清晰, 坏死空洞较其他3组都少, 胶质细胞增生明显, 神经元样细胞崩解少。说明生物诱导组脊髓损伤后, 较快的进入恢复期, 且神经恢复程度高于骨髓间充质干细胞组、化学诱导组和DMEM培养液组。

3 讨论

3.1 不同诱导剂对骨髓间充质干细胞的诱导 骨髓间充质干细胞最早由Pittenger等^[12]于1999年从骨髓中分离培养出来, 是一种具有多向分化潜能的成体干细胞。此后, 大量的试验充分证明骨髓间充质干细胞在体外向结缔组织包括骨^[13]、软骨^[14]、骨骼肌^[15]、脂肪^[16]、韧带等方面的分化能力^[17]。同年, Kopen等^[18]首次报道注入新生鼠侧脑室的骨髓间充质干细胞可以分化为神经胶质细胞。此后, 骨髓间充质干细胞修复脊髓损伤成为研究热点。Abouelfetouh等^[19]将骨髓间充质干细胞在体外与海马组织薄片共培养, 分化成为神经元样细胞。有研究等通过表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、神经生长因子等各种生长因子对骨髓间充质干细胞进行诱导, 也获得了神经元样细胞, 并被广泛证实^[20-22]。骨髓间充质干细胞诱导成神经元样细胞后, 通过分泌抗炎因子、神经营养因子, 包括脑源性神经营养因子、神经生长因子、血管内皮生长因子等^[23-24], 改善中枢神经受损区域的微环境, 促进轴突延长、微血管生成、髓鞘再生、减少细胞凋亡, 起到神经保护及营养支持的作用^[25-28]。此外, 还能引导轴突生长穿过受损区域^[7], 同时分泌层粘连蛋白、纤维连接蛋白和胶原, 以减少脊髓空泡形成^[8, 29]。Woodbury等^[3]将骨髓间充质干细胞采用化学诱导剂(二甲基亚砜、BME、BHA等)处理后, 检测到神经元样细胞特异性标志的表达。生物诱导是通过模拟人体内环境, 促使骨髓间充质干细胞向神经元样细胞方向分化, 而化学诱导, 主要是通过氧化还原作用, 影响相关酶的活性, 使骨髓间充质干细胞能够表达神经元样细胞特异性蛋白^[30]。但是, 对于化学诱导方法所获得的细胞, 是否真正具有神经元样细胞的功能(如电位传导等), 大量文献报道不尽相同^[30], 无法得到统一的意见。

实验避开这一争论, 采用两种方法, 对骨髓间充质干细胞分别进行诱导, 成功获得能表达神经元样细胞特异性蛋白的类神经元样细胞, 并将其移植治疗大鼠脊髓损伤。通过实验结果来看, 生物诱导法诱导的骨髓间充质干细胞移植治疗脊髓损伤效果明显优于单纯骨髓间

充质干细胞移植; 而化学诱导过的骨髓间充质干细胞与单纯骨髓间充质干细胞相比, 在修复脊髓损伤方面没有特殊意义。作者认为, 这可能是移植的细胞脱离化学诱导环境后, 神经特异性蛋白表达终止, 失去了神经细胞的功能, 该推测有待进一步实验证实。

3.2 生物诱导骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞治疗脊髓损伤的前景 细胞移植治疗脊髓损伤是目前研究的热点, 可供移植的细胞有神经干细胞^[31-32]、骨髓间充质干细胞^[33-34]、成纤维细胞、嗅鞘细胞^[35]、巨噬细胞等。该实验数据再次证实骨髓间充质干细胞采用生物诱导分化为神经元样细胞治疗脊髓损伤有效, 且相对于化学诱导剂, 生物诱导剂无毒无害, 增加了细胞移植的安全性。这次实验的成功为临床上应用骨髓间充质干细胞移植治疗脊髓损伤患者提供了有力的理论依据与实验支持, 为治疗脊髓损伤开拓了广阔的前景。作者相信, 随着细胞生物学等基础性研究的发展, 骨髓间充质干细胞向为神经元样细胞方向的诱导分化方法将更加有效, 分化的理论研究将更加深入, 细胞移植有望成为临床治疗脊髓损伤的有效手段。

基金资助: 山东省科技攻关计划项目(2006GG3202046)。

作者贡献: 实验由第二作者设计, 第一作者实施并撰写论文, 第三、四作者负责动物实验部分的盲法评估。其余作者负责试验数据及图片整理、统计学分析。

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, 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。

4 参考文献

- [1] Wright KT, Masri W, Osman A, et al. Concise Review: Bone Marrow for the Treatment of Spinal Cord Injury: Mechanisms and Clinical Applications. *J Stem Cells*. 2011; 29(2):169-178.
- [2] Huang Y, Jia X, Bai K, et al. Effect of fluid shear stress on cardiomyogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *J Arch Med Res*. 2010; 41(7):497-505.
- [3] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000; 61:364-370.

- [4] Radtke C, Schmitz B, Spies M, et al. Peripheral glial cell differentiation from neurospheres derived from adipose mesenchymal stem cells. *Int J Devl Neuroscience*. 2009; 27(8):817-823.
- [5] Wislet-Gendebien S, Laudet E, Neirinckx V, et al. Adult Bone Marrow: Which Stem Cells for Cellular Therapy Protocols in Neurodegenerative Disorders? *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012:601560.
- [6] Mrówczyński W, Celichowski J, Krutki P, et al. Changes of the force-frequency relationship in the rat medial gastrocnemius muscle after total transection and hemisection of the spinal cord. *J Neurophysiol*. 2011; 105(6):2943-2950.
- [7] Hofstetter CP, Sehwarz 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):2199-2204.
- [8] Ankeny DP, McTigue DM, Jakeman LB, et al. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axon after contusive spinal cord injury in rats. *J Exp Neurol*. 2004; 190(1):17-31.
- [9] Scheff SW, Saucier DA, Cain ME. A statistical method for analyzing rating scale data: the BBB locomotor score. *J Neurotrauma*. 2002; 19(10):1251-1260.
- [10] Mafi P, Hindocha S, Mafi R, et al. Adult Mesenchymal Stem Cells and Cell Surface Characterization - A Systematic Review of the Literature. *J Open ORTHOP J*. 2011; 5(Suppl 2): 253-260.
- [11] Basso DM, Beattie MS and Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995; 12(1):1-21.
- [12] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *J Science*. 1999; 284(5411):143-147.
- [13] Arinzeh TL. Mesenchymal stem cells for bone repair: preclinical studies and potential orthopedic applications. *J Foot Ankle Clin*. 2005; 10(4):651-665.
- [14] Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007; 213(2):341-347.
- [15] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *J Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36(4):568-584.
- [16] Helder MN, Knippenberg M, Klein-Nulend J, et al. Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine. *Tissue Engineering*. 2007; 13(8): 1799-1808.
- [17] Trubiani O, Orsini G, Caputi S, et al. Adult mesenchymal stem cells in dental research: a new approach for tissue engineering. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2006; 19(3):451-460.
- [18] 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. *J Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(19):10711-10716.
- [19] Abouelfetouh A, Kondoh T, Ehara K, et al. Morphological differentiation of bone marrow stromal cells into neuron-like cells after co-culture with hippocampal slice. *J Brain Res*. 2004; 1029(1):114-119.
- [20] Jin K, Mao XO, Bateur S, et al. Induction of neuronal markers in bone marrow cells: differential effects of growth factors and patterns of intracellular expression. *Exp Neurol*. 2003; 184: 78-89.
- [21] Zhou J, Tian GP, Wang JE, et al. In vitro differentiation of adipose-derived stem cells and bone marrow-derived stromal stem cells into neuronal-like cells. *Neural Regen Res*. 2011; 6(19):1467-1472.
- [22] Li Q, Geng YJ, Lu L, et al. Platelet-rich fibrin-induced bone marrow mesenchymal stem cell differentiation into osteoblast-like cells and neural cells. *Neural Regen Res*. 2011; 6(31):2419-2423.
- [23] 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. *J Brain Res*. 2005; 1035:73-85.
- [24] Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, et al. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp Neurol*. 2006; 198:54-64.
- [25] Poll D, Parekkadan B, Borel Rinkes IHM, et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Protection and Repair of Injured Vital Organs. *Cellular and Molecular Bioengineering*. 2008; 1:42-50.
- [26] Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, et al. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *J Best Pract Res Clin Haematol*. 2011; 24:59-64.
- [27] da Silva Meirelles L, Fontes AM, Covas DT, et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *J Cytokine Growth Factor Rev*. 2009; 20:419-427.
- [28] Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006; 98:1076-1084.
- [29] Wu S, Suzuki Y, Ejiri Y, et al. Bone marrow stromal cells enhance differentiation of co-cultured neurosphere cells and promote regeneration of the injured spinal cord. *J Neurosci Res*. 2003; 72:343-351.
- [30] Barnabé GF, Schwindt TT, Calcagnotto ME, et al. Chemically-Induced RAT Mesenchymal Stem Cells Adopt Molecular Properties of Neuronal-Like Cells but Do Not Have Basic Neuronal Functional Properties. *PLoS ONE*. 2009; 4(4): e5222.
- [31] Tarasenko YI, Gao J, Nie L, Johnson KM, et al. Human fetal neural stem cells grafted into contusion-injured rat spinal cords improve behavior. *J Neurosci Res*. 2007; 85:47-57.
- [32] Cai PQ, Sun GY, Cai PS, et al. Survival of transplanted neurotrophin-3 expressing human neural stem cells and motor function in a rat model of spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 2009; 4(7):485-491.
- [33] Osaka M, Honmou O, Murakami T, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *J Brain Res*. 2010; 1343:226-235.
- [34] Li L, Lü G, Wang YF, et al. Glial cell-derived neurotrophic factor mRNA expression in a rat model of spinal cord injury following bone marrow stromal cell transplantation. *Neural Regen Res* 2008; 3(10):1056-1059.
- [35] Li BC, Li Y, Chen LF, et al. Olfactory ensheathing cells can reduce the tissue loss but not the cavity formation in contused spinal cord of rats. *J Neurol Sci*. 2011; 303:67-74.