

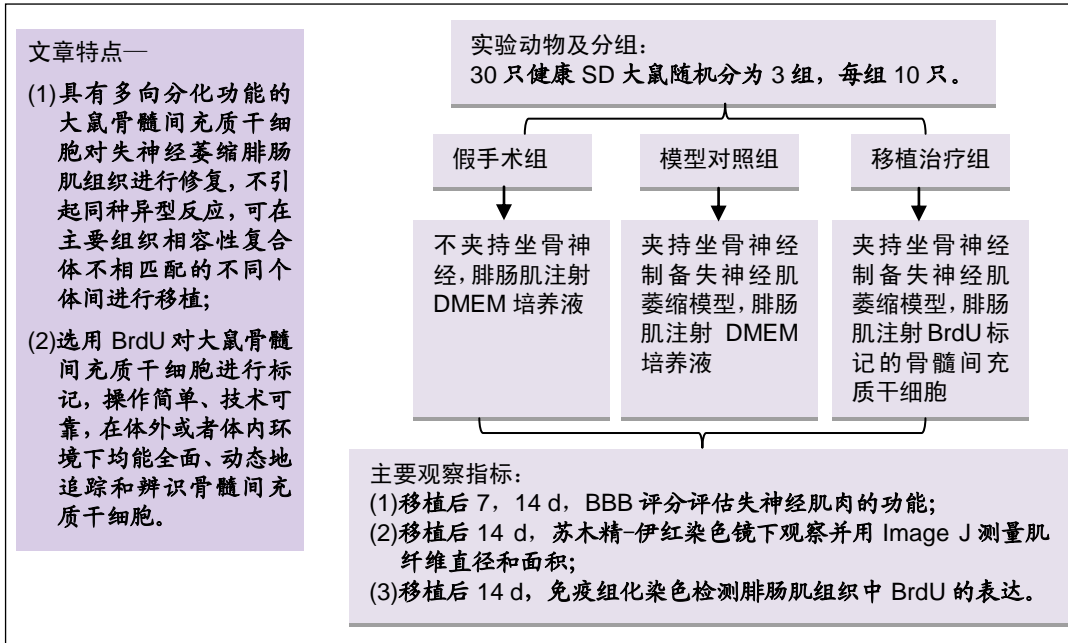
骨髓间充质干细胞移植治疗失神经肌萎缩

杨颖¹, 颜南², 田伟¹, 韩操³, 张笑妍¹, 郑昕¹, 刘士丹¹, 张硕¹, 王正东⁴ (沈阳医学院, ¹基础医学院, ²康复教研室, ⁴解剖学教研室, 辽宁省沈阳市 110034; ³沈阳医学院附属中心医院, 辽宁省沈阳市 110000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2094

ORCID: 0000-0002-5462-4455(王正东)

文章快速阅读:



杨颖, 女, 1995 年生, 重庆市人, 汉族, 2019 年沈阳医学院毕业, 主要从事周围神经损伤机制的研究。

通讯作者: 王正东, 博士, 副教授, 沈阳医学院解剖学教研室, 辽宁省沈阳市 110034

文献标识码: B

投稿日期: 2019-12-12

送审日期: 2019-12-14

采用日期: 2020-01-17

在线日期: 2020-03-25



文题释义:

失神经肌萎缩: 骨骼肌的发生、功能和结构的维持都受到运动神经的支配和调节, 神经一旦受损, 肌肉失去神经支配, 神经传导信号中断, 肌肉丧失收缩功能, 导致肌肉主动收缩活动障碍, 神经受损的同时骨骼肌失去神经的营养作用, 逐渐出现骨骼肌的质、量和形态改变, 肌肉体积减小, 肌纤维逐渐萎缩, 并逐渐被结缔组织替代, 肌细胞同时也发生一系列变化。

BrdU: 细胞增殖是细胞在周期调控因子的作用下, 通过 DNA 复制、RNA 转录和蛋白质合成等一系列复杂反应而进行的分裂过程, 是生物体生长、发育、繁殖和遗传的基础。BrdU 是 DNA 前体胸腺嘧啶核苷类似物, 可竞争性掺入 S 期细胞单链 DNA 核苷酸序列替代胸腺嘧啶, 混入到单链 DNA 中的 BrdU 可通过免疫组化染色抗 BrdU 单克隆抗体在细胞爬片或组织切片上显示, 从而对骨髓间充质干细胞进行识别和示踪。

摘要

背景: 外科显微镜手术和一些辅助治疗方法均无法通过修复损伤的神经细胞来有效延缓或治疗失神经肌萎缩。研究发现骨髓间充质干细胞具有定向分化潜能, 并且在一定环境因素下能对损伤的组织进行修复, 由此推测其可以对失神经萎缩肌肉起到一定的修复作用。

目的: 探讨移植骨髓间充质干细胞是否能够减轻和延缓失神经肌肉组织萎缩。

方法: 分离培养 SD 大鼠骨髓间充质干细胞, 取第 3 代骨髓间充质干细胞经 BrdU 标记后用于移植治疗。将 30 只 SD 大鼠分为 3 组, 每组 10 只, 对每只大鼠左后肢进行手术。假手术组只暴露坐骨神经主干, 不钳夹神经, 移植治疗组、模型对照组钳夹坐骨神经主干后, 向其支配的腓肠肌注射骨髓间充质干细胞悬液和不含胎牛血清的 DMEM 培养液。骨髓间充质干细胞移植后 1, 2 周, 采用 BBB 评分评价各组大鼠左后肢运动功能; 骨髓间充质干细胞移植后 14 d, 取腓肠肌组织进行苏木精-伊红染色和 BrdU 免疫组化染色。

结果与结论: 第 3 代骨髓间充质干细胞 BrdU 标记为阳性; 标记的骨髓间充质干细胞能在移植治疗组失神经损伤的肌肉组织中存活并起修复作用; 相对于模型对照组, 移植治疗组失神经肌纤维由相互融合重新恢复完整。结果表明移植骨髓间充质干细胞能够减轻和延缓失神经肌肉组织萎缩。

关键词:

周围神经损伤; 失神经肌萎缩; 骨髓间充质干细胞; 细胞移植; BrdU; 腓肠肌

中图分类号: R459.9; R394.2; R745

基金资助:

辽宁省大学生创新创业训练计划(201610164002), 项目负责人: 杨颖; 辽宁省科学技术计划项目(2017225059), 项目参与者: 王正东

Yang Ying, Basic Medical College, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, Liaoning Province, China

Corresponding author: Wang Zhengdong, MD, Associate professor, Anatomy Department, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, Liaoning Province, China

Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells for denervated muscular atrophy

Yang Ying¹, Yan Nan², Tian Wei¹, Han Cao³, Zhang Xiaoyan¹, Zheng Xin¹, Liu Shidan¹, Zhang Shuo¹, Wang Zhengdong⁴ (¹Basic Medical College, ²Rehabilitation Department, ⁴Anatomy Department, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, Liaoning Province, China; ³Central Affiliated Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110000, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Microscopic surgery or some adjuvant treatments can neither effectively delay nor treat denervated muscle atrophy by repairing damaged nerve cells. Studies have found that bone marrow mesenchymal stem cells have the potential for directional differentiation and repair damaged tissues under certain environmental factors. It is speculated that the cells can play a certain role in repairing denervated atrophic muscles.

OBJECTIVE: To investigate whether transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells can alleviate and retard atrophy of denervated muscles.

METHODS: Primary bone marrow mesenchymal stem cells were isolated from Sprague-Dawley rats, and passage 3 cells were labeled by BrdU for cell transplantation. Thirty Sprague-Dawley rats were divided into three groups, 10 rats in each group. In the sham operation group, only the main trunk of the sciatic nerve was exposed but not clamped. In the treatment group, the main trunk of the sciatic nerve was clamped and bone marrow mesenchymal stem cell suspension was injected into the gastrocnemius muscle. In the control group, after the sciatic nerve trunk was clamped, the gastrocnemius muscle innervated by the sciatic nerve was injected with DMEM medium of equal volume (without cells and fetal bovine serum). Basso, Beattie and Bresnahan scores were used to evaluate the motor function of the rat's left hindlimb at 1 and 2 weeks after cell transplantation. Changes in the gastrocnemius muscle fibers were observed by hematoxylin-eosin staining and BrdU immunohistochemical staining at 14 days after cell transplantation.

RESULTS AND CONCLUSION: The passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells were positive for BrdU. The labeled cells could survive in and repair the denervated muscle tissue in the treatment group. Compared with the model group, the denervated muscle fibers of the treatment group recovered from mutual fusion and re-arranged regularly. To conclude, transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells can alleviate and retard atrophy of denervated muscles.

Key words: peripheral nerve injury; denervated muscle atrophy; bone marrow mesenchymal stem cells; cell transplantation; BrdU; gastrocnemius muscle

Funding: College Student Innovation and Entrepreneurship Training Plan of Liaoning Province, No. 201610164002 (to YY); Liaoning Provincial Science and Technology Project, No. 2017225059 (to WZD [project participant])

0 引言 Introduction

周围神经损伤可造成感觉功能障碍和肌肉萎缩等一系列严重常见的临床症状^[1], 尤其肌肉萎缩引起的运动功能减弱或消失, 严重地影响了人们的生活质量^[2]。首选治疗方法为外科显微镜手术治疗, 而目前手术治疗方法也处于瓶颈期^[3-6], 一些辅助治疗方法的效果也差强人意^[7-10]。神经细胞是高度分化的成熟细胞, 一般无再生能力, 损伤之后不能再生修复, 其所属的神经纤维亦随之消失、缺损, 以至于只能通过周围的神经胶质细胞及其纤维填补而形成胶质瘢痕, 所以无法通过修复损伤的神经来有效延缓或治疗失神经肌萎缩^[11-12]。研究发现骨髓间充质干细胞具有定向分化潜能, 并且在一定环境因素下能对损伤的组织进行修复^[13-16], 作者猜想其可以对失神经萎缩肌肉起到一定的修复作用。目前已经证实间充质干细胞存在于机体的多种组织中, 包括脐带、骨髓、脂肪、外周血、骨骼肌等^[17-19]。大量的体外研究证实了骨髓间充质干细胞有着高度的自我更新能力和较强的多胚层分化潜能^[20-21], 预计有望延缓或治疗失神经肌萎缩。LI等^[22-24]也同样认为骨髓间充质干细胞所产生的神经因子将对失神经萎缩肌肉具有一定的修复能力。研究证实间充质干细胞主要通过直接和间接2种方式发挥治疗作用, 直接方式有归巢、促进外源干细胞植入患处、定向分化与多向分化等; 间接方式有双向调节免疫反应和炎症反应、抗氧化应激、抗纤维化、抗凋亡、造血支持作用、参与或促进血管再生、激活内源干细胞增殖分化等。间充质干细胞移植治疗的作用机制十分复杂, 迄今仍没有完全弄清楚, 还需要进行深入研究^[25]。因此进

行骨髓间充质干细胞移植对失神经肌萎缩作用效果的研究具有重要现实意义^[26-31]。该研究将骨髓间充质干细胞移植到失神经肌肉组织, 观察其对失神经肌萎缩的修复效果, 为骨髓间充质干细胞的临床应用提供理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学和动物模型实验。

1.2 时间及地点 2016年5月至2018年5月在沈阳医学院中心实验室和实验动物中心完成。

1.3 材料 健康初断乳的SD大鼠2只, 体质量50-60 g, 雌雄不限, 用于骨髓间充质干细胞的分离; 8周龄SD大鼠30只, 体质量 210-310 g, 雌雄不限, 用于构建模型。动物生产许可证SCXK(辽)2015-0001, 动物使用及处死均通过沈阳医学院实验动物福利伦理委员会的审批, 批准文号为SYYXY2016030301。

1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞的培养 全骨髓贴壁法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞。用颈椎脱臼法将初断乳的2只大鼠处死, 体积分数为75%乙醇浸泡3 min, 然后无菌条件下分离出双侧股骨、胫骨; 去除骨表面附着的软组织并用DMEM培养液浸泡清洗; 眼科剪切除两端骨骺, 暴露出大鼠股骨及胫骨的骨髓腔, 用5 mL注射器吸取DMEM培养液反复冲洗骨髓腔; 为确保将骨髓冲出, 需反复冲洗待骨髓腔变白后停止, 收集细胞冲洗液并过200目筛网制成单细胞悬液; 将悬液置于15 mL离心管中, 以1 000 r/min离心5 min; 去除上清液, 用5 mL新鲜含体积分数为10%胎牛

血清的DMEM完全培养液重悬, 轻轻吹打, 制成单细胞悬液, 吹打混匀后接种于25 cm²培养瓶中; 将培养瓶放入37 ℃、体积分数为5%CO₂培养箱中静止培养, 隔天全量换液; 每隔24 h光学显微镜下观察细胞形态及其贴壁状态, 待原代细胞生长至约铺满瓶底时进行传代, 吸除培养液, 用2.5 g/L胰蛋白酶和0.02%EDTA消化细胞, 显微镜下观察到绝大多数细胞皱缩变圆时加入DMEM完全培养液以终止消化; 将细胞悬液转移至离心管中以1 500 r/min离心10 min, 弃去上清液并添加DMEM完全培养液重悬细胞。

1.4.2 骨髓间充质干细胞的鉴定 待细胞长至70%融合后, 吸去培养液, PBS冲洗3次, 每次3 min, 加入40 g/L多聚甲醛固定30 min, 加入1% Triton X-100 30 μL室温孵育10 min, PBS冲洗3次, 每次5 min; 除去PBS, 用油笔圈定细胞范围; 加入内源性过氧化酶阻断剂1滴, 室温孵育10 min, PBS冲洗3次, 每次3 min; 加入非特异性阻断剂1滴, 室温孵育10 min; 加入1:200比例稀释的兔抗鼠CD29抗体, 置于湿盒中4 ℃过夜, 次日PBS洗涤3次, 每次3 min; 滴加生物素标记的羊抗兔IgG聚合物, 室温孵育1 h, PBS冲洗二抗; 滴加链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶, 室温孵育10 min, PBS冲洗3次, 每次3 min; 滴加DAB显色试剂, 显微镜下控制反应时间, 待细胞着浅棕色时, 吸去显色液, 用流水冲洗5 min; 苏木精复染细胞核, 1%盐酸乙醇分化几秒, 自来水冲洗返蓝, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封固。

吉姆萨染色: 另取第3代90%融合的细胞爬片, 多聚甲醛固定, 吉姆萨母液按1:10的倍数加入蒸馏水混合滴在染色片上染色20 min, 弃染色液, PBS漂洗干净, 系列乙醇脱水, 每次3 min, 二甲苯透明, 中性树脂封固。

骨髓间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	大鼠长骨骨髓
原代培养方法:	全骨髓贴壁培养法
基础培养基:	DMEM 培养基
添加材料:	体积分数为 10% 无菌胎牛血清
原代培养时间:	原代细胞培养 48 h 后全量换液, 每隔 24 h 半量换液
细胞传代:	细胞融合至约 85% 用胰蛋白酶消化传至下 1 代, 按 1:3 比例传代, 共传 3 代
细胞鉴定:	采用倒置相差显微镜、吉姆萨染色以及免疫组化染色鉴定
伦理学批准:	实验方案经沈阳医学院实验动物福利伦理委员会批准, 批准号为 SYYXY2016030301

1.4.3 骨髓间充质干细胞的BrdU标记 取培养的第3代骨髓间充质干细胞, 将细胞浓度调整为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 接种于预先放置细胞爬片的6孔板中, 在细胞生长至50%融合时加入10 μmol/L BrdU标记液, 孵育24 h^[13]。

1.4.4 失神经肌萎缩模型制备 将30只健康8周龄SD大鼠随机分成3组: 假手术组、模型对照组和移植治疗组, 每组10只。模型对照组和移植治疗组制备失神经肌萎缩模型, 采用10%水合氯醛按3 mL/kg的剂量腹腔注射麻醉, 在无菌

条件下进行手术。大鼠取俯卧位, 固定四肢, 在左侧后肢股骨体表投影区域剪毛, 碘伏消毒, 切开1 cm皮肤, 深入肌肉钝性分离, 可见大鼠坐骨神经主干, 用镊子夹持5 s, 逐层缝合, 造模手术完成。假手术组以上述相同的制作方法完成, 只是在寻找到左后肢坐骨神经主干后, 不用镊子夹持神经。

1.4.5 骨髓间充质干细胞的移植 造模后第14天, 在无菌条件下于移植治疗组大鼠后肢左侧腓肠肌内注射 $1.5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的骨髓间充质干细胞悬液0.2 mL, 向模型对照组和假手术组左后肢腓肠肌内注入同等剂量DMEM培养液(不含细胞及胎牛血清), 3 s内完成注射, 留针5 min。注射后大鼠常规分笼饲养, 以便对大鼠进行抗感染等护理。

1.4.6 行为学BBB评分 骨髓间充质干细胞移植后1, 2周, 采用BBB评分评价各组大鼠左后肢运动功能。BBB评分共22级。0分为后肢完全瘫痪, 21分为功能正常。由2名独立观察者按照BBB运动评定量表观察关节活动的次数和范围、运动负荷及范围、后肢的协调性, 采用双盲法对大鼠后肢运动功能进行评分和记录, 评分观察时间为4 min, 得分范围从0分(无肢体运动或体质量支持)到21分(正常运动), 取2名观察者评分的平均值进行统计学处理。

1.4.7 肌纤维横截面积测量 骨髓间充质干细胞移植后14 d, 大鼠常规处死, 腓肠肌标本放置于40 g/L多聚甲醛溶液固定24-48 h, 沉入30%蔗糖48 h, 常规制作冷冻切片。纵向垂直肌纤维的方向将腓肠肌标本制成5 μm切片, 进行苏木精-伊红染色, 在光学显微镜下观察。采用Image J图像分析系统对肌纤维横截面积及肌纤维直径进行测量^[32]。

1.4.8 腓肠肌免疫组化染色 制作失神经肌萎缩腓肠肌组织冰冻切片。①切片用PBS冲洗2次, 每次5 min; ②滴加体积分数为3%过氧化氢酶灭活内源性酶, 室温下孵育20-30 min, PBS洗3次, 每次5 min; ③用抗原修复液37 ℃修复抗原30 min, PBS洗3次, 每次5 min; ④滴加山羊血清封闭液20 min, PBS清洗3次, 每次5 min; ⑤滴加一抗, 即羊抗鼠BrdU单克隆抗体4 ℃过夜, PBS洗3次, 每次5 min; ⑥滴加二抗即偶联辣根过氧化酶的羊抗兔二抗, 37 ℃孵育60 min, PBS洗3次, 每次5 min; ⑦DAB显色液显色5 min, 显微镜观察至检测指标出现棕色; ⑧苏木精复染2 min, 自来水冲洗5 min, 蒸馏水洗涤, 系列乙醇脱水; ⑨二甲苯I与II各5 min, 使用中性树脂胶封固; ⑩应用显微镜观察BrdU阳性标记骨髓间充质干细胞在大鼠腓肠肌中的生长情况。

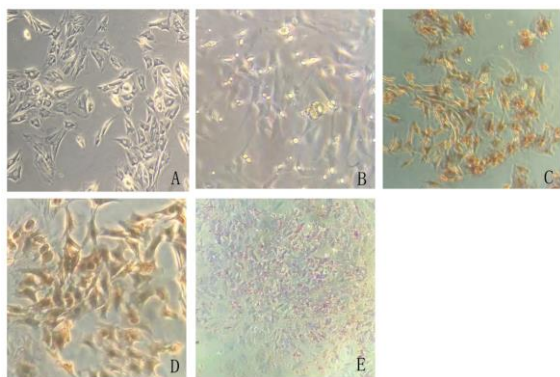
1.5 主要观察指标 ①BBB评分评估失神经肌肉的功能; ②苏木精-伊红染色镜下观察并用Image J测量肌纤维直径和面积; ③免疫组化染色检测腓肠肌组织中BrdU的表达。

1.6 统计学分析 实验数据采用SPSS 20.0统计软件进行单因素方差分析, SNK法进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 体外骨髓间充质干细胞培养及鉴定结果 采用全骨

髓贴壁法分离培养1 d后即可观察到有细胞贴壁, 2 d后可见许多梭形细胞贴壁生长, 见图1A; 在第3, 4天出现分散的细胞集落, 见图1B; 采用骨髓间充质干细胞表面CD29抗体鉴定培养第3, 4天的细胞, 可见95%以上的细胞CD29染色阳性, 见图1C, D。培养第5天时梭形细胞约可铺满瓶底, 在第6天时吉姆萨染色可见绝大多数细胞融合, 见图1E。传代细胞1 d之内基本贴壁铺展, 并且可以迅速进行增殖, 为典型的均一长梭形的骨髓间充质干细胞形态。



图注: 图中 A 为培养 3 d 的骨髓间充质干细胞($\times 100$); B 为培养 4 d 的骨髓间充质干细胞($\times 200$); C 为 CD29 免疫组化染色培养 3 d 的骨髓间充质干细胞($\times 100$); D 为 CD29 免疫组化染色培养 4 d 的骨髓间充质干细胞($\times 200$); E 为吉姆萨染色培养 6 d 的骨髓间充质干细胞($\times 100$)

图 1 SD 大鼠骨髓间充质干细胞培养及鉴定

Figure 1 Culture and identification of bone marrow mesenchymal stem cells of Sprague-Dawley rats

2.2 骨髓间充质干细胞的BrdU标记效果 BrdU是DNA前体胸腺嘧啶核苷类似物, 可竞争性掺入S期细胞单链DNA核苷酸序列替代胸腺嘧啶, 混入到单链DNA中的BrdU可通过免疫组化染色抗BrdU单克隆抗体在细胞爬片或组织切片上显示, 从而对骨髓间充质干细胞进行识别和示踪。免疫组化染色检测BrdU标记的优点是易于区分阳性和阴性, 检测的对比度和准确率较高, 而且在低倍镜中也可检测到, 见图2, 因此适合于快速检查BrdU。

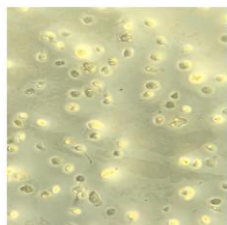


图 2 BrdU 标记阳性的骨髓间充质干细胞 ($\times 100$)

Figure 2 BrdU-positive bone marrow mesenchymal stem cells ($\times 100$)

2.3 实验动物数量分析 参加实验大鼠30只, 均进入结果分析, 中途无脱落。

2.4 大鼠后肢神经功能评分变化 骨髓间充质干细胞移植治疗后1, 2周采用BBB评分评价各组大鼠左后肢运动功能。实验成功造模后大鼠表现为左后肢立即瘫痪, BBB评分为0分。各组大鼠关节活动次数、运动负荷及范围、前后肢及尾巴的协调度均有不同程度恢复, 各组大鼠BBB评分均有不同程度提高, 移植治疗组在2个检测时间点BBB评分均较模型对照组明显提高且差异有显著性意义($P < 0.05$), 与假

手术组相比差异仍有显著性意义($P < 0.001$), 见表1。

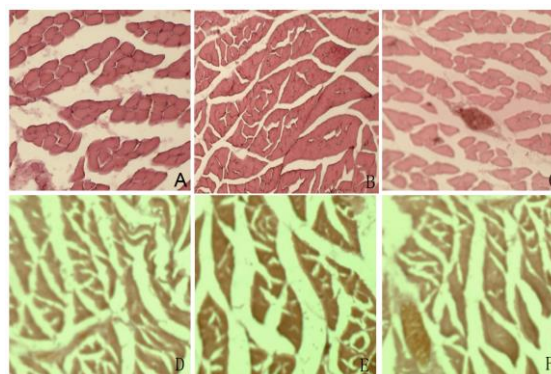
表 1 各组大鼠 BBB 评分 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Basso, Beattie and Bresnahan score of rats in each group

时间	假手术组	模型对照组	移植治疗组
移植后 1 周	20.61 \pm 0.49	15.25 \pm 0.89 ^a	16.75 \pm 0.90 ^{ab}
移植后 2 周	20.81 \pm 0.40	16.65 \pm 0.92 ^a	18.04 \pm 0.88 ^{ab}

表注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.001$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.05$

2.5 苏木精-伊红染色及免疫组织化学染色结果 失神经损伤的肌纤维已经发生退化, 具体表现为肌纤维肌膜慢慢消失, 肌纤维相互融合在一起, 融合的肌纤维很粗, 但肌纤维数量减少, 肌间隔变大, 见图3A, B。正常组织的肌纤维则表现为肌间隔规整。移植治疗组苏木精-伊红染色及免疫组织化学染色可见骨髓间充质干细胞进入肌纤维间隙, 并对肌纤维间隔进行修复, 肌纤维排列较为规整, 肌间隙与正常无异, 见图3C-F。



图注: 图中 A-C 为假手术组、模型对照组、移植治疗组大鼠肌纤维苏木精-伊红染色; D-F 为假手术组、模型对照组、移植治疗组大鼠肌纤维 BrdU 免疫组化染色

图 3 各组大鼠腓肠肌苏木精-伊红染色及免疫组织化学染色($\times 100$)

Figure 3 Hematoxylin-eosin staining and immunohistochemical staining of the gastrocnemius of rats in each group ($\times 100$)

2.6 肌纤维直径和肌纤维横截面积测量结果 采用 Image J 图像分析系统对肌纤维横截面积及肌纤维直径进行测量, 见表2。模型对照组融合的肌纤维横截面积增粗很明显, 但是纤维数量减少也很明显; 移植治疗组的肌纤维与假手术组没有差别。

表 2 各组大鼠腓肠肌肌纤维直径和横截面积 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Diameter and cross-sectional area of gastrocnemius muscle fibers in each group

组别	肌纤维直径(μm)	肌纤维横截面积(μm^2)
假手术组	2.30 \pm 0.28	3.85 \pm 0.78
模型对照组	4.23 \pm 0.55 ^a	8.96 \pm 1.81 ^b
移植治疗组	2.93 \pm 0.38	4.53 \pm 0.71

表注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.001$

3 讨论 Discussion

目前骨髓间充质干细胞的鉴定主要根据其形态学特征、表面抗原、超微结构以及多向分化能力等。现在很多研究报

道, 骨髓间充质干细胞的表面抗原标志具有非专一的特性, 主要包括CD106、CD29、CD34、CD36、CD71等, 但到目前为止还没有发现骨髓间充质干细胞的特异性表面抗原标志。它具有分化成多种中胚层和神经外胚层来源组织细胞的能力, 易于体外培养扩增以及外源基因的转染和表达, 其移植后的免疫排斥反应比较微弱, 是基因与细胞工程的理想载体。目前的细胞标记示踪技术除了BrdU免疫组织化学法, 还包括绿色荧光蛋白、染色体示踪、增强GRP报告基因的转染、激光捕获显微镜及 β 半乳糖苷酶基因转染细胞标记技术等。BrdU作为胸腺嘧啶的衍生物, 其可以替代新合成的DNA单链中的胸腺嘧啶, 可选择性地掺入到复制细胞中新合成DNA, 这种掺入可以随DNA复制进入子细胞, 所以可以稳定存在^[33-35]。骨髓间充质干细胞增殖及分化潜力随供体年龄增大而降低^[36], 因此实验选用初断乳大鼠进行全骨髓贴壁法分离培养骨髓间充质干细胞, 培养至第2代时, 观察骨髓间充质干细胞以单层贴壁集束样生长, 以梭形细胞为主, 呈漩涡状或花簇状, 骨髓间充质干细胞生长活跃, 增殖能力强, CD29免疫组化染色结果呈阳性, 初步判定培养细胞为骨髓间充质干细胞, 可继续用于BrdU标记和移植实验。由于BrdU的标记受多种因素影响, 例如细胞的增殖、分裂可能对BrdU有稀释作用, 移植细胞死亡后释放出来的BrdU被邻近细胞摄取等可导致假阳性, 如能用绿色荧光蛋白标记可能更为可靠, 但BrdU免疫组织化学法被认为是操作简单易行、技术可靠、结果可信, 便于检测的细胞标记示踪技术, 无论在体外或者在体内环境下, 均能全面、动态地追踪和辨识骨髓间充质干细胞^[37]。因此该实验选用BrdU免疫组织化学法鉴定和评估骨髓间充质干细胞移植后生长情况。为尽可能减少影响, 该研究在利用BrdU示踪技术时, 依照MEYER等^[38]的经验处理标本。

CUEVAS等^[39]取供体成年大鼠骨髓间充质干细胞, 用BrdU进行培养和预标记, 注入大鼠坐骨神经横断端, 对照组大鼠坐骨神经横断端注入培养液。与对照组相比, 骨髓间充质干细胞移植大鼠在第18天和第33天的行走轨迹测试有显著改善; 双重免疫荧光标记显示BrdU标记细胞在植入后至少33 d内存活在切断的坐骨神经注射区, 近5%的BrdU细胞表达许旺细胞样表型。由于骨髓间充质干细胞注入受损外周神经后能促进功能恢复, 可能成为神经系统疾病细胞治疗的重要来源。许旺细胞来自于神经脊细胞的胚胎时期, 作为周围神经的一种独特的神经胶质细胞, 对神经系统具有重要的影响, 尤其是神经再生。许旺细胞可以在神经损伤部位分泌表达一系列的活性物质, 如神经生长因子可以诱导髓鞘的形成和神经的再生^[40-43]。

研究发现, 在脊髓损伤后即有细胞凋亡, 伤后24 h为第1个高峰, 伤后7 d出现第2个高峰, 无论是神经细胞还是胶质细胞都有凋亡出现。因此造模7 d后腓肠肌已失去神经支配, 开始出现肌肉萎缩现象, 待造模14 d左右时失神经肌萎缩效果基本形成。因此该实验选择在造模14 d时进行骨髓间充质干细胞移植治疗。当机体发生失神经损伤时, 微循环被破坏, 毛细血管的退化比肌纤维的退化更加迅速,

从而导致肌纤维与毛细血管的数量较之前更少。随着失神经损伤的时间延长, 胶原纤维将变得更加明显, 而此时增生的胶原纤维也将阻断肌肉的血液供给。肌肉血供显著减少以及微循环改变是阻碍神经重新支配失神经损伤骨骼肌的重要原因。NAKAMURA等^[44]采用骨髓间充质干细胞来源的外泌体治疗心脏毒素损伤的大鼠胫骨前肌, 发现外泌体促进成肌分化与血管再生, 虽然成纤维细胞生长因子2、粒细胞集落刺激因子、血小板衍生因子等肌肉修复相关因子水平较低, 但却有大量与肌肉修复相关的miRNA产生, 进一步研究发现骨髓间充质干细胞来源外泌体促进成肌分化和血管再生的作用一部分是由miR-494介导的^[45]。

大量的研究表明肌肉在失神经后8个月左右, 有近4/5的毛细血管发生完全退变^[46]。研究发现体外培养的骨髓间充质干细胞可以产生干细胞因子、基质细胞衍生因子和白细胞介素7等可以改善神经再生的微环境, 与许旺细胞共同参与修复受损的神经细胞^[47]。

据有关文献报道, 骨髓间充质干细胞移植可抑制脊髓损伤后的神经炎症, 减少了炎症前细胞因子的产生, 从而促进了损伤的神经再生。然而由于炎症和不利的微环境, 这个促再生作用是有限的^[9-10]。在神经炎症中, 小胶质细胞和神经胶质细胞十分活跃, 释放促炎因子和细胞毒素(前列腺素E2、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β)来造成神经进一步损伤。此外, 小胶质细胞和星形胶质细胞在神经炎症过程中被激活, 导致病变部位有胶质瘢痕的形成。

骨骼肌的收缩是神经冲动在运动终板传至肌膜时, 肌膜发生去极化, 冲动传入肌纤维, 肌浆网内的钙离子释放, 钙离子与Thc结合, 经过一系列的传导引发骨骼肌收缩。肌卫星细胞是一类源于中胚层的干细胞, 主要存在于基底膜与肌膜之间。在失神经损伤后, 肌卫星细胞可以被激活, 从而进一步发生增殖。伴随年龄的增长, 肌卫星细胞的丰度减少, 肌源性的分化和自我更新潜能依旧可以保留, 但更新能力随之降低。因此, 推测出移植骨髓间充质干细胞通过改善微环境, 使纤维间隔变得规整, 肌原纤维完整, 从而减轻和延缓失神经肌肉组织萎缩。但是, 该实验中仍然存在不足, 如BrdU标记的时间不足(24 h), 观察时间较为短暂, 由于在移植2周后对大鼠进行了处死, 所以缺乏对大鼠后续运动功能的研究。

该研究的创新之处在于应用BrdU标记的骨髓间充质干细胞对失神经损伤肌肉进行修复, 移植治疗组大鼠BBB评分高于模型对照组, 但与假手术组仍有差距。肌纤维苏木精-伊红染色中可以看到移植治疗组肌纤维排列更规整、肌间隔更均匀, 肌纤维数量接近假手术组。因此作者推测骨髓间充质干细胞移植后改善了神经、肌肉、血管生长的微环境。骨髓间充质干细胞不仅可通过定向分化为腓肠肌细胞这种直接方式促进肌肉收缩和舒张能力的恢复, 还可以通过抑制炎症反应、促进神经细胞再生、促进血管再生等间接方式帮助失神经支配的骨骼肌功能恢复, 进而提高大鼠BBB运动功能评分, 为今后骨髓间充质干细胞的应用提供了一定的理论基础。

作者贡献: 实验设计为王正东和杨颖, 实验实施为杨颖、郑昕、刘士丹、张硕, 实验评估为颜南、田伟、韩操, 资料收集为张笑妍。

经费支持: 该文章接受了“辽宁省大学生创新创业训练计划(201610164002)”“辽宁省科学技术计划项目(2017225059)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经沈阳医学院实验动物福利伦理委员会批准, 批准号为 SYYXY2016030301。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过沈阳医学院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] SAMII A, CARVALHO GA, SAMII M. Brachial plexus injury: factors affecting functional outcome in spinal accessory nerve transfer for the restoration of elbow flexion. *J Neurosurg.* 2003;98(2):307-312.
- [2] 顾立强, 裴国献. 周围神经损伤基础与临床[J]. 北京: 人民军医出版社, 2001: 70, 157.
- [3] DASARI VR, VEERAVALLI KK, TSUNG AJ, et al. Neuronal apoptosis is inhibited by cord blood stem cells after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2009;26(11):2057-2069.
- [4] 吴佳佳, 徐建光, 马书杰. 失神经骨骼肌萎缩的机制及康复治疗[J]. 安徽医药, 2017, 21(11):1949-1953.
- [5] 贺菊芳, 余资江, 戈果, 等. 大鼠坐骨神经损伤手术时机选择的实验研究[J]. 贵州医科大学学报, 2016, 41(10):1122-1127.
- [6] 董英, 徐昂, 姜影, 等. 运动训练结合针刺对坐骨神经损伤大鼠肌力和神经纤维恢复的影响[J]. 滨州医学院学报, 2016, 39(5):327-329.
- [7] 马书杰, 严隽陶, 黄品贤, 等. 推拿手法防治失神经骨骼肌萎缩的实验研究[J]. 江苏中医药, 2014, 46(11):79-81.
- [8] 刘磊. 电刺激对失神经骨骼肌萎缩中核因子-KB、肌肉环状指蛋白-1 表达变化的影响[J]. 北方药学, 2013, 10(8):81.
- [9] 裴艳宏, 刘坤祥, 黄茂丹. 参联合对大鼠失神经骨骼肌萎缩的作用[J]. 中国医学工程, 2013, 21(9):5-6.
- [10] 付秀美, 王荣良, 杨海艳, 等. 脂肪源性干细胞对大鼠坐骨神经功能恢复的影响[J]. 承德医学院学报, 2016, 33(6):451-453.
- [11] 贺菊芳, 余资江. 神经干细胞移植治疗周围神经损伤的研究进展[J]. 贵州医科大学学报, 2016, 41(10):1117-1121.
- [12] 蔡学华, 吕艳丽. 坐骨神经损伤修复机制及治疗效果评价[J]. 双足与保健, 2017, 26(23):112, 114.
- [13] 方洪松, 周建林, 彭昊, 等. 不同来源间充质干细胞生物学特性差异[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(32):5243-5248.
- [14] 蒲超, 张珊珊, 李伟, 等. 犬骨髓间充质干细胞体外分离培养及分化鉴定[J]. 川北医学院学报, 2016, 31(6):782-785.
- [15] 杨俊丽, 韩霞, 孙明启, 等. 兔骨髓间充质干细胞的生物学特征及原代培养[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(50):8043-8047.
- [16] 李丹, 张金国. 大鼠骨髓间充质干细胞体外培养体系的建立[J]. 济宁医学院学报, 2015, 38(5):321-323.
- [17] 宋珂, 石琦, 青莹, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞分离培养及鉴定的相关研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2015, 31(9):531-536.
- [18] 易敏, 付必莽, 李志伟, 等. 兔骨髓间充质干细胞的培养及初步鉴定[J]. 昆明医科大学学报, 2015, 36(9):17-19.
- [19] 阮光萍, 刘菊芬, 王金祥, 等. 鸡卵清提取液促进 C57 小鼠骨髓间充质干细胞增殖的研究[J]. 西南国防医药, 2015, 25(8):826-828.
- [20] DOCHEVA D, POPOV C, MUTSCHLER W, et al. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J Cell Mol Med.* 2007;11(1):21-38.
- [21] ZAPPIA E, CASAZZA S, PEDEMONTE E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood.* 2005;106(5):1755-1761.
- [22] LI Y, CHEN J, CHEN XG, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology.* 2002; 59(4):514-523.
- [23] SASAKI M, RADTKE C, TAN AM, et al. BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2009;29(47):14932-14941.
- [24] CARONI P. Activity-sensitive signaling by muscle-derived insulin-like growth factors in the developing and regenerating neuromuscular system. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;692:209-222.
- [25] 王佃亮, 李燕妮. 间充质干细胞移植治疗作用机制[J]. 转化医学杂志, 2019, 8(5):257-261.
- [26] 黄华, Raynald, 安沂华, 等. 移植人骨髓间充质干细胞促进大鼠脊髓损伤后的神经功能恢复[J]. 武警后勤学院学报(医学版), 2016, 25(11):865-868.
- [27] 冯焯军, 陈明. 骨髓间充质干细胞在神经修复中的研究进展[J]. 神经损伤与功能重建, 2016, 11(5):426-428.
- [28] 刘晓光, 肖卫华, 赵淋淋, 等. 间充质干细胞移植治疗骨骼肌损伤的研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2015, 30(12):1313-1317.
- [29] 肖恒军, 转黎, 陈俊, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞体外定向诱导分化成平滑肌细胞[J]. 中国男科学杂志, 2015, 29(9):3-6.
- [30] 黄蓉, 梁瑜祯, 卢炳丰, 等. 自体骨髓间充质干细胞移植促进缺血下肢血管新生的实验研究[J]. 医学研究生学报, 2015, 28(7):706-710.
- [31] 刘青峰, 王威, 王亿龙. 骨髓间充质干细胞移植对放射性肠损伤大鼠的修复作用及对 JAK/STAT 通路的影响[J]. 中国药物与临床, 2018, 18(2):163-166.
- [32] 王灵斌, 王立群, 孟壮志, 等. 大鼠比目鱼肌肌纤维总数、横截面积及其内慢肌纤维和快肌纤维横截面积与年龄相关的变化[J]. 解剖学报, 2015, 46(5): 660-666.
- [33] 罗涛, 王彤敏, 李力燕. EdU 与 BrdU 在检测细胞增殖中的特点及应用进展[J]. 重庆医学, 2015, 44(32):4581-4583.
- [34] 高黎, 祝华, 张荣, 等. BrdU 标记人脐带间充质干细胞及对细胞生物学行为影响的体外研究[J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(11):1617-1621.
- [35] 许伟, 谢兴文, 赵永利, 等. BrdU 标记的 rBMSCs 在大鼠体内的迁移[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(4):409-414.
- [36] ZAIM M, KARAMAN S, CETIN G, et al. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann Hematol.* 2012;91(8):1175-1186.
- [37] 张明鸣, 贾贵清, 程惊秋, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的 BrdU 体外标记和体内示踪研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2012, 43(2):266-270.
- [38] MEYER JS, KOEHL SL, HUGHES JM, et al. Bromodeoxyuridine labeling for S-phase measurement in breast carcinoma. *Cancer.* 1993; 71(11):3531-3540.
- [39] CUEVAS P, CARCELLER F, DUJOVNY M, et al. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol Res.* 2002;24(7): 634-638.
- [40] 陈菁, 楚燕飞, 顾玉东, 等. 培养雪旺细胞 NGF、CNTF 和 GDNF 共表达和共定位实验研究[J]. 中华手外科杂志, 2005, 21(5):317-319.
- [41] 邱超, 郑亚妮, 许硕贵. 骨髓间充质干细胞移植对周围神经损伤后施旺细胞的影响[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2018, 14(1):28-30.
- [42] 田春艳, 潘月彩. 神经生长因子治疗周围神经损伤的临床价值分析[J]. 中国医药指南, 2016, 14(36):152-153.
- [43] 蔡明轩, 颜南, 王正东, 等. 神经细胞分泌因子促进骨骼肌细胞生长[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(42):6324-6329.
- [44] NAKAMURA Y, MIYAKI S, ISHITOBI H, et al. Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration. *FEBS Lett.* 2015;589(11):1257-1265.
- [45] 李鹏, 郭修田. 骨髓间充质干细胞成肌分化在骨骼肌再生中的应用[J]. 中华细胞与干细胞杂志, 2018, 8(3):187-191.
- [46] 侯晓亮, 李爱国, 杨林, 等. 骨髓间充质干细胞移植对失神经肌肉萎缩大鼠的影响[J]. 新乡医学院学报, 2015, 32(5):391-394.
- [47] KIM SS, YOO SW, PARK TS, et al. Neural induction with neurogenin1 increases the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in the ischemic brain. *Stem Cells.* 2008;26(9):2217-2228.