

组织工程化干细胞移植治疗大鼠 急性脊髓损伤的研究*

张军军¹ 陈 先¹ 刘兰泽¹ 任龙喜² 张立明³ 王立功¹ 卢占斌¹ 孙来卿¹ 安 义¹

摘要 目的:探讨自体骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植对脊髓损伤(SCI)大鼠功能恢复的影响。方法:54只成年Wistar大鼠随机分成实验组(干细胞移植组)、DMEM组、空白对照组。用按Bregman方法制作脊髓损伤模型。7d后干细胞移植组注入经体外传代培养诱导的骨髓间充质干细胞悬液,DMEM组在脊髓损伤处注入DMEM培养液,空白对照组只做损伤模型不做任何处理。处理后第1、4、8、12周分别对两组大鼠进行动物BBB评分、斜板试验、后肢运动功能检测和运动诱发电位(MEP)检测。动物处死后做组织学观察。结果:处理后1周时,两组动物脊髓神经功能均无明显恢复;第4、8、12周时移植组大鼠运动诱发电位潜伏期和波幅明显恢复,斜板试验角度和BBB评分及后肢运动功能检测评分均高于对照组大鼠($P<0.01$);DMEM组与对照组间 $P>0.05$ 。与前一时间点比较,运动诱发电位潜伏期和波幅均有明显恢复, ($P<0.01$);斜板试验角度和BBB评分以及后肢运动功能检测评分在第8周与第12周间无显著差异($P>0.05$)。结论:BMSCs移植可以促进大鼠损伤脊髓功能的恢复。

关键词 脊髓损伤;骨髓间充质干细胞;移植;运动诱发电位

中图分类号:R651.2 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-04-0335-03

Experimental study on transplantation of tissue engineering stem cells for rat acute spinal cord injury models/ ZHANG Junjun, CHEN Xian, LIU Lanze, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(4): 335—337

Abstract Objective: To investigate curative effects of bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) transplantation on rat models with acute spinal cord injury (ASCI). **Method:** BMSCs were cultured in vitro. Animal SCI at T₁₀ level model was executed by Bregman method. Fifty-four adult Wistar rats models were allocated randomly into 3 groups, stem cells transplantation group, DMEM group and blank control group (BC). Seven days after SCI, BMSCs suspension cultured and induced in vitro and DMEM culture solution were injected into around the site of semisection of spinal cord of models respectively as transplantation group and DMEM group. No treatment was used in BC group after SCI model was made. Animal ethology was investigated. MEP was used to assess the therapeutic outcome at the 1st, 4th, 8th, 12th weeks respectively after transplantation. **Result:** There was no sign of functional recovery in each group one week after transplantation. An obvious statistically significant improvement in neurological function outcome were noted in rats with BMSCs transplantation groups 4 weeks after surgery, by means of BBB scale, slope test and hind limb motor functional detection, as well as MEP amplitude and latency time ($P<0.01$); There was no statistically significant difference between BC group and DMEM group ($P>0.05$). Compared with the former time point, an obvious statistically significant improvement could be seen in MEP amplitude and MEP latency time. However there was no statistically significant difference in BBB scores, the angles of slope test and hind limb motor functional detection between the 8th and 12th week ($P>0.05$). **Conclusion:** BMSCs cultured in vitro transplantation had better effects in treating ASCI model rats compared with that in control group.

Author's address 2nd Hospital of Tangshan City, Tangshan, 063000, China

Key words spinal cord injury; bone marrow mesenchymal stem cells; transplantation; motor evoked potential

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是骨科的常见外伤,是严重危害人民生命健康的一类疾病。据统计在美国每年约有11000例的脊髓损伤患者^[1],日本的年发生率为百万分之四十点二^[2]。SCI使脊髓神经元大量丧失,导致了脊髓修复能力如促进修复因素(如神经营养因素)的缺乏。同时神经元坏死后形成的胶

* 基金项目:唐山市指导计划项目(081302286)

1 唐山市第二医院脊柱脊髓损伤科,唐山,063000

2 北京垂杨柳医院骨科

3 武警河北总队医院骨科

作者简介:张军军,男,主治医师,硕士

收稿日期:2008-08-12

质瘢痕和空洞阻碍了轴突的生长,这些不可逆的病理过程是治疗SCI中最棘手的问题^[3]。近年来神经组织的脊髓内移植,已积累了大量资料,取得了丰硕的成果。由于骨髓基质干细胞具有多潜能性,可以向三个胚层的多种组织分化,因此可作为神经细胞移植的来源,具有广阔的应用前景^[4]。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2—3月龄的雌性Wistar大鼠54只,体重分别为 $210\pm 10\text{g}$,清洁级(SPF),中国药物检定所动物中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 MSCs的培养传代:BMSCs的培养传代:主要采用Sanchez-Ramos的方法并加以改进^[4]。10—14d后形成克隆,约3周出现致密贴壁(图1,见彩色插页)。

1.2.2 BMSCs向神经细胞分化:将第2代的BMSCs采用胰酶消化,传第3代细胞至已预先放入无菌盖玻片的24孔培养板中,制备细胞爬片,至细胞长成80%融合时,去除培养液,加入诱导培养基(neuronal induction media, NIM)同时加入 $400\mu\text{M}$ GM1(单唾液酸四己糖神经节苷脂)。NIM的配制:BHA(butylated hydroxyanisole 3-叔丁基-4-羟基茴香醚) $200\mu\text{M}$ 、KCl 5mmol、丙戊酸钠 2mM、forskolin(福斯高林) $10\mu\text{M}$ 、氢化可的松 $1\mu\text{M}$ 、胰岛素 5mg,其中BHA先用50ml酒精溶解后,分别与上述试剂加入Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)培养基中,定容至1L,蔡氏滤器过滤后,分装, -20°C 保存。分别于诱导培养后1h、8h、24h用倒置相差显微镜下观察细胞生长情况和形态变化,照相记录(图2,见彩色插页)。

1.2.3 神经细胞特异性标志的检测:于诱导培养后1h、8h、24h采用免疫组化法检测神经前体细胞的特异性标志Nestin(图3,见彩色插页),神经细胞的特异性标志NSE(图4,见彩色插页)。

1.2.4 对诱导分化后的细胞进行HE染色(图5,见彩色插页)和尼氏染色(图6,见彩色插页)。

1.2.5 MSCs移植治疗脊髓损伤大鼠模型:54只Wistar大鼠随机分为3组:①干细胞移植组18只;②DMEM组18只;③空白对照组18只。按Bregman法^[5]制作脊髓损伤大鼠模型,建模成功1周后进行移植。干细胞移植组动物沿原切口再次暴露损伤节段脊髓,在立体定向仪的辅助下分别于损伤脊髓中线两侧旁0.5mm处以微量注射器沿与水平

成 45° 角进针(距脊髓表面约0.7mm)。每点 $10\mu\text{l}$ 注入经体外培养诱导的BMSCs,总细胞数为 1×10^5 。依同样方法DMEM组注射等量DMEM培养液,空白组不做任何处理。采用盲法由熟悉该评分标准的两名检查者在移植前及移植后的不同时间点采用BBB评分^[6]、斜板试验^[7]及后肢运动功能检测^[8]对动物进行行为学检查。后肢运动功能检测评分标准分为7级:0级:后肢无活动,完全瘫痪;1级:无自主运动,但对后肢刺激(捏、挟)有反应;2级:有自主运动,但不能站立;3级:能够持重,但不能行走;4级:能够行走(有或无痉挛);5级:能够行走,且能够在高25cm,宽1.8cm的木架上保持平衡;6级:能够在木架上行走。

1.2.6 大鼠的饲养及护理:术后大鼠的饲养及护理常规方法笼内饲养,术后3—7d内视情况给予青霉素 $250\text{U}/100\text{g}$ 体重,腹腔注射,每日8点、16点各挤尿一次,夜间不喂水。

1.3 统计学分析

计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,通过SPSS13.0统计分析软件分析3组比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 动物行为观察

大鼠脊髓损伤后均出现了典型的截瘫综合征,表现为两后肢瘫痪,肌张力低,肌力0级,尿潴留等症状。伤后24—48h开始爬行。处理后1周,3组动物之间无明显差别。术后8周干细胞移植组后肢大鼠后肢活动均较空白对照组及DMEM组明显有力,足掌可以着地,爬行活动较灵活。而后两组恢复不明显,只有反射的不自主活动。至第12周,干细胞移植组大鼠大部分可以用后肢负重站立有频发后肢连续动作,动作前后肢较协调,但撑地不连续,后爪起落时有明显的内外旋。而后两组大鼠均不能用后肢负重站立。

2.2 后肢运动功能检测结果

术后1周3组动物后肢运动无明显恢复,功能评分无显著性差异($P>0.05$)。1周后3组动物后肢运动功能评分随时间的延长均有不同程度的升高,但在4、8、12周MSCs移植组明显好于空白对照组($P<0.01$);与前一时间点比较在1、4周及4、8周间差异显著($P<0.01$),而8、12周间差异不明显($P>0.05$)。在各个时间点空白对照组与DMEM组间评分无差异($P>0.05$),见表1。

2.3 斜板试验检测结果

术后第1、4、8、12周,3组斜板倾斜度数随时间

的延长而逐渐增大, 但于第 4、8、12 周时干细胞移植组明显高于空白对照组及 DMEM 组 ($P<0.01$)。而后两对照组间比较, 术后各个时间点倾斜度数无明显差异 ($P>0.05$), 见表 2。

2.4 BBB 评分检测结果

与斜板实验结果略同。见表 3。

2.5 运动诱发电位检查结果

对 MEP 结果进行分析, 记录其波幅、潜伏期。所有大鼠受伤前均获得正常 MEP 信号, 提示波幅高, 潜伏期短。脊髓损伤后 MEP 表现低平, 随之出现潜伏期延长、波幅降低且延绵长久的波形, 随着时间延续, 实验组潜伏期开始缩短, 波幅开始升高, 并逐渐趋向正常。在同一时间点与对照组比较差异显著 ($P<0.01$), 与前一时间点比较亦有显著差异 ($P<0.01$), 见表 4—5。

表 1 后肢运动功能评分 ($\bar{x}\pm s$, $n=18$)

组别	1 周	4 周	8 周	12 周
空白对照组	0.51±0.16 ^①	1.45±0.52 ^②	2.59±0.34 ^②	2.36±0.16 ^②
DMEM 组	0.52±0.17 ^①	2.17±0.36 ^②	2.50±0.27 ^②	2.34±0.23 ^②
干细胞移植组	1.02±0.10 ^{①③}	3.41±1.63 ^{②③}	4.67±0.14 ^{②③}	4.68±0.24 ^②

注: ①1 周后 3 组动物后肢运动功能评分比较 $P>0.05$ 。②4、8、12 周干细胞移植组明显好于 DMEM 组及空白对照组 ($P<0.01$)。③与前一时间点比较在 1、4 周及 4、8 周间差异显著 ($P<0.01$), 而 8、12 周间差异不明显 ($P>0.05$)。

表 2 斜板试验 ($\bar{x}\pm s$, $n=18$, °)

组别	第 1 周	第 4 周	第 8 周	第 12 周
空白对照组	30.77±2.44 ^①	38.00±2.17 ^②	45.11±2.14 ^②	45.77±2.13 ^②
DMEM 组	31.83±2.96 ^①	37.11±2.56 ^②	46.50±1.86 ^②	46.17±2.31 ^②
干细胞移植组	31.22±2.02 ^{①③}	41.00±2.45 ^{②③}	53.28±2.65 ^{②③}	54.11±2.35 ^②

① $P>0.05$; ② $P<0.01$; ③ $P<0.01$

表 3 BBB 评分 ($\bar{x}\pm s$, $n=18$, 分)

组别	第 1 周	第 4 周	第 8 周	第 12 周
空白对照组	4.82±0.28 ^①	6.49±0.46 ^②	7.91±0.34 ^②	8.15±0.39 ^②
DMEM 组	4.88±0.21 ^①	6.46±0.32 ^②	7.76±0.51 ^②	8.22±0.32 ^②
干细胞移植组	4.85±0.29 ^{①③}	10.72±0.48 ^{②③}	15.88±0.60 ^{②③}	16.03±0.61 ^②

①第 1 周 3 组动物后肢 BBB 评分差异无显著性意义 ($P>0.05$)。②第 4、8、12 周干细胞移植组明显好于 DMEM 组及空白对照组 ($P<0.01$)。③与前一时间点比较在第 1、4 周及第 4、8 周间差异显著 ($P<0.01$), 而第 8、12 周间差异不明显 ($P>0.05$)。各个时间点空白对照组与 DMEM 组间评分差异无显著性意义 ($P>0.05$)。

表 4 运动诱发电位波幅 ($\bar{x}\pm s$, $n=18$, %)

组别	第 1 周	第 4 周	第 8 周	第 12 周
空白对照组	44.98±1.65 ^①	53.61±3.18 ^②	69.33±3.97 ^②	70.22±3.04 ^②
DMEM 组	44.47±1.82 ^①	54.50±2.94 ^②	70.22±3.69 ^②	69.27±4.62 ^②
干细胞移植组	45.22±2.37 ^{①③}	68.22±3.66 ^{②③}	85.83±3.24 ^{②③}	89.05±3.40 ^{②③}

注: ①1 周后 3 组动物后肢运动功能评分差异无显著性意义 ($P>0.05$)。②4、8、12 周干细胞移植组明显好于 DMEM 组及空白对照组 ($P<0.01$)。③与前一时间点比较在各个时间点均有显著差异 ($P<0.01$)。

表 5 运动诱发电位潜伏期 ($\bar{x}\pm s$, $n=18$, ms)

组别	第 1 周	第 4 周	第 8 周	第 12 周
空白对照组	14.30±2.12 ^①	11.43±1.19 ^②	11.87±0.94 ^②	10.75±0.74 ^②
DMEM 组	14.59±2.09 ^①	12.37±1.70 ^②	11.59±1.45 ^②	10.63±1.01 ^②
干细胞移植组	14.94±2.01 ^{①③}	10.13±0.95 ^{②③}	9.07±0.62 ^{②③}	7.94±0.68 ^{②③}

① $P>0.05$; ② $P<0.01$; ③ $P<0.01$

3 讨论

现代工农业及高速交通所致脊柱脊髓损伤后, 无论是既往所认为的神经元、胶质细胞坏死, 还是近来国内外研究所发现的细胞凋亡均可导致神经功能的不可逆损伤^[9]。多年来人们致力于 SCI 的治疗积累了诸多经验与方法, 近年来干细胞工程的研究为脊髓功能的恢复提供了新的途径。

目前应用的脐血干细胞、胚胎组织、神经干细胞, 如嗅鞘细胞存在取材和体外培养增殖困难组织配型等问题。而且还受到法律、伦理的制约。BMSCs 取材方便, 易于培养, 在体外能长期保持未分化状态, 遗传背景稳定, 易于外源基因的导入和表达, 体内植入排斥反应弱。上述优点使之有望成为一种新的细胞治疗和基因治疗的靶细胞用于中枢神经系统疾病的治疗^[10-11]。

Chopp 等^[12]第一次将 BMSCs 移植于大鼠挫伤的脊髓, 观察到显著的运动功能恢复; 形态学分析发现骨髓基质细胞表达了神经元和少突胶质细胞的蛋白标记物; 骨髓基质细胞也表现了较强的游走能力。Hofstetter^[13]将 BMSCs 植入动物损伤的脊髓内, 5 周后组织学显示 BMSCs 已与纵行的未成熟星形胶质细胞紧密联结, 并在损伤区形成成束的桥联结, 在移植区和瘢痕组织区之间可见到健全神经纤维和 5-羟色胺阳性神经纤维束, 说明 BMSCs 在脊髓损伤的修复治疗中具有巨大的潜力。

本实验结果显示 BMSCs 移植治疗大鼠脊髓损伤 4 周后脊髓的神经功能有明显改善。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。有可能是移植后的 BMSCs 充填和聚集在脊髓损伤部位逐渐适应脊髓微环境。BMSCs 来源的神经细胞和星形胶质细胞形成树突, 通过整合作用与周围健康的神经细胞建立广泛的传入和传出联系甚至重建神经通路, 髓鞘再生等机制发挥神经功能恢复作用^[14]。植入的 BMSCs 与定居部位神经组织间相互作用, 可产生某些细胞因子, 不仅可以促进神经功能的修复, 也可以保障植入的 BMSCs 存活、增殖, 并诱导神经细胞向受损部位迁移。体外试验研究已明确证明 BMSCs 可以分泌 BDNF、GDNF、NGF 等多种因子^[15-16]。第 8、12 周时脊髓功能恢复较第 4 周更为明显。说明植入细胞能长期存活而且基本适应机体环境, 并能继续促进损伤脊髓功能的恢复。后肢运动功能评分, 斜板试验角度及 BBB 评分在第 8、12 周间比较差异不明显。可能在此期间运动功能恢复进入一个类似平台期的时期, 或者是某种相关因

(下转 352 页)