

· 基础研究 ·

人脐血单个核细胞和脐带间充质干细胞移植用于大鼠脊髓损伤的实验研究*

窦慧慧¹ 于 丽² 郭文君^{1,3}

摘要

目的:探讨人脐血单个核细胞和脐带间充质干细胞(MSCs)移植对脊髓损伤功能恢复的影响,寻找一种更适合治疗脊髓损伤的细胞源。

方法:采集新鲜人脐带血和脐带,分离培养单个核细胞和 MSCs。将脊髓损伤模型随机分成 3 组:单个核细胞移植组、MSCs 移植组 and 低糖必需培养基(L-DMEM)培养组。采用免疫组化和免疫荧光检测细胞移植后 1—4 周细胞在脊髓内的存活情况和迁移情况,使用 BBB 行为学评分评估大鼠脊髓功能恢复情况。

结果:L-DMEM 培养液组在术后各时间点观察评分无明显差异,而细胞移植组脊髓功能处于逐渐恢复过程,与 L-DMEM 培养液比较,差异有显著性意义。单个核细胞移植组对损伤脊髓功能的修复作用较 MSCs 移植组显著,且差异有显著性意义。

结论:与 MSCs 相比较,人脐血单个核细胞更适合作为治疗脊髓损伤的细胞源。

关键词 人脐血单个核细胞;人脐带间充质干细胞 s;移植;脊髓损伤

中图分类号:R651.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-02-0104-05

The study of human umbilical cord blood mononuclear cells and human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation in the treatment of spinal cord injury/DOU Huihui,YU Li,GUO Wenjun//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2010,25(2):104—108

Abstract

Objective: To explore the effect of human umbilical cord mononuclear cells and human umbilical cord mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation on injured spinal cord function and to find a better source of cells for the treatment of spinal cord injury(SCI).

Method: Human umbilical cord blood and human umbilical cords were collected, and mononuclear cells and MSCs were derived. The rat SCI models were divided into 3 groups: SCI model plus mononuclear cells transplantation group, SCI model plus mesenchymal stem cells transplantation group and SCI model plus L-DMEM group. Immunohistochemistry and immunofluorescence were used to determine the survival and migration of implanted cells in spinal cord 1—4 weeks after transplantation. Basso-Beattie-Brasnahan (BBB) scale system was applied to assess the function recovery of spinal cord.

Result: There was no significant difference in postoperative score at each time point in SCI model plus DMEM group. The function of spinal cord became better in SCI model plus cells transplantation groups, and there were significant differences compared with SCI model plus DMEM group. The function of spinal cord in SCI model plus mononuclear cells transplantation group was better than that in SCI model plus MSC transplantation group, and the difference was prominently.

Conclusion: Compared with MSCs, human umbilical cord blood mononuclear cells were more suitable as a source of cells for the treatment of SCI.

* 基金项目:山东省自然科学基金(Y2008c26);山东省教育厅基金资助项目(J07YD01); 1 潍坊医学院病理学教研室,261042; 2 潍坊医学院组织胚胎学教研室; 3 通讯作者

作者简介:窦慧慧,女,硕士;收稿日期:2009-10-29



Author's address Department of Pathology, Weifang Medical College, Shandong Province, 261042

Key words human umbilical cord blood mononuclear cell; human umbilical cord mesenchymal stem cells; transplantation; spinal cord injury

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)给患者带来诸多不便,同时也给家庭和社会带来沉重负担。虽然我们可以通过神经移植来治疗脊髓损伤,恢复脊髓的功能,但是目前即使应用显微外科技术也很难使受伤的脊髓恢复如初。如何能最大限度地恢复受损脊髓的功能已成为研究的热点。细胞移植治疗脊髓损伤已在动物实验中取得一定的成效,尤其是单个核细胞和间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植。本实验通过比较人脐血单个核细胞和脐带 MSCs 对损伤脊髓的修复作用,来寻求一种更适合治疗 SCI 的细胞源。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜的人脐带血和足月产脐带(采自潍坊市人民医院,经得产妇同意并排除传染性疾病及各种家族遗传病),脊髓横断损伤大鼠模型(由本实验室建立,SD大鼠,雌雄不限,体重200g左右)。

1.2 主要试剂

人淋巴细胞分离液;L-DMEM;胰蛋白酶;Mesencult TM培养基;溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)抗体;巢蛋白(nestin)抗体;神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)抗体;Cy3标记羊抗小鼠IgG。

1.3 方法

1.3.1 人脐血单个核细胞的分离培养及 BrdU 标记:D-Hank's 平衡盐溶液等比稀释脐血,缓慢将稀释脐血叠加到淋巴细胞分离液上(勿扰乱液面),稀释脐血与淋巴细胞分离液的高度比例为2:1。以2000转/min离心20min,小心吸取界面层白色云雾状单个核细胞,PBS平衡盐溶液1000转/min离心10min,加入培养基中,制成单细胞悬液,细胞计数调整细胞密度为 $5 \times 10^6/\text{ml}$,同时加入终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的BrdU,置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、饱和湿度培养箱培养72h。

1.3.2 人脐带 MSCs 的分离培养及 BrdU 标记:健康足月剖宫产胎儿的新鲜脐带经D-Hank's液冲洗后剪成约 1mm^3 的小块,采用组织平铺法^[1]分离培养细

胞,即将 1mm^3 的组织块接种到T25塑料培养瓶中,使其在培养瓶中平铺成一层。置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、饱和湿度培养箱培养。待培养液颜色变化后首次全量换液。待细胞长至80%融合时,0.25%胰酶消化传代,传3代后用BrdU标记72h。

1.3.3 细胞移植:SCI模型建立后3d,将经BrdU标记的脐血单个核细胞和脐带 MSCs 用0.25%的胰酶消化,用不含胎牛血清的L-DMEM培养基洗涤,制成单细胞悬液,细胞计数调整细胞密度为 $5 \times 10^6/\text{ml}$,经大鼠尾静脉缓慢注入含有细胞($5 \times 10^6/\text{ml}$)培养液1ml,对照组注入不含细胞的L-DMEM培养液1ml。

1.3.4 行为学评分:3组大鼠分别在处理1—4周进行Basso-Beattie-Brasnahan(BBB)运动评分。BBB运动评分是将动物放入一固定场地。观察动物的髻、膝、踝关节、行走步态、躯干运动及其协调情况,根据BBB评分法标准^[2],由熟悉该评分标准的实验人员进行盲评。

1.3.5 组织学观察:大鼠分别在细胞移植后第7、14、21、28天腹腔注射麻醉剂麻醉,4%多聚甲醛(PFA)经总动脉灌注固定,取出损伤节段脊髓,4%PFA固定进行HE染色。

1.3.6 免疫组化染色:组织切片常规脱蜡入水;0.01MPBS缓冲液冲洗;抗原修复; $3\%\text{H}_2\text{O}_2$ 37°C 孵育30min,0.01MPBS冲洗;正常羊血清封闭, 37°C 孵育30min;倾去多余血清滴加一抗, 4°C 过夜,0.01MPBS;滴加生物素化的二抗, 37°C 孵育30min,0.01MPBS冲洗;滴加辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素, 37°C 孵育30min,0.01MPBS冲洗;DAB显色,0.01MPBS终止显色;梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。对照组以PBS代替一抗,其余步骤相同。

1.3.7 免疫荧光染色:组织切片常规脱蜡入水;0.01MPBS缓冲液冲洗3次,每次5min;抗原修复,0.01MPBS冲洗5min,3次;正常羊血清封闭, 37°C 孵育30min;倾去多余血清滴加一抗, 4°C 过夜,0.01MPBS冲洗5min,3次;滴加荧光二抗,避光条件下, 37°C 孵育1h,0.01MPBS冲洗5min,3次;滴加终浓度为 $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的hoechst33258,避光条件下, 37°C

孵育 30min,0.01MPBS 冲洗 5min,3 次;防淬灭剂封片,荧光显微镜观察拍照。对照组以 PBS 代替一抗,其余步骤相同。

1.4 统计学分析

采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,实验数据采用均数±标准差表示,两组采用独立样本 *t* 检验, $P<0.05$ 为有显著性意义。

2 结果

2.1 动物行为学观察

所有模型鼠均出现典型的后肢肢体瘫痪、尿潴

留等。在细胞移植组中,受损脊髓的功能都有明显的恢复,特别是在人脐血单个核细胞移植组中,约一半模型鼠在细胞移植 3d 后受损的脊髓功能有明显恢复。1 周后所有的细胞移植组模型鼠的 BBB 评分都有明显提高,4 周后 BBB 评分均在 10 分以上,瘫痪的后肢已能承重,模型鼠后肢的运动情况已接近正常鼠。而培养液组的模型鼠脊髓功能的恢复情况欠佳,甚至在 4 周以后,大部分 SCI 鼠的 BBB 评分很低。人脐血单个核细胞移植组、人脐带 MSCs 移植组和 DMEM 培养液组各时间点的行为学检测见表 1。

DMEM 培养液组脊髓功能无明显改善。而细胞

表 1 移植后不同时间点大鼠运动 BBB 评分平均值

($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
DMEM 组	0	0	0.7±0.483	1.3±0.483	1.7±0.483
单个核细胞移植组	1.3±0.438	2.9±1.197 ^①	6.8±2.150 ^①	10.1±1.792 ^①	11.5±1.434 ^①
MSCs 移植组	0.9±0.738	2.2±1.135	4±1.490	6.8±1.687	8.7±1.636

① $P<0.05$

移植组在第 1、2、3 和 4 周,处于逐渐恢复的过程,与 DMEM 培养液组比较有显著性差异($P<0.05$)。单个核细胞移植组和 MSCs 移植组在第 3 天没有显著性差异($P>0.05$)。而在第 1、2、3 和 4 周单个核细胞移植组脊髓功能的恢复较间充质干细胞移植组显著,且差异有显著性意义($P<0.05$)。

2.2 组织学观察

HE 染色中发现脊髓白质的损伤情况较灰质严重,损伤的脊髓组织间质疏松水肿,神经细胞肿胀变性,尼氏体消失,胶质细胞增生,可有嗜神经现象出现(图 1)。细胞移植组的 HE 染色显示细胞移植 1 周时间质疏松水肿,神经元水肿变性,部分神经元尼氏体消失,胶质细胞增生(图 2—3)在损伤区域有新生血管生成。细胞移植 4 周后可在灰质中查见大量的神经元,在高倍镜下可查见尼氏体,损伤的脊髓已接近正常的脊髓结构(图 4—5)。单个核细胞移植组的这种变化较 MSCs 移植组明显。而 DMEM 培养液组组织损伤后未见明显改善(图 6)。

2.3 免疫组化和免疫荧光观察

免疫荧光染色发现细胞移植组在组织损伤区域均有 BrdU 标记的细胞(图 7)。Nestin 标记结果显示在单个核细胞移植组和 MSCs 移植组中均在损伤区域见神经元胞浆着色,而 DMEM 组中未见神经元着

色。GFAP 标记结果显示胶质细胞胞浆着色。

3 讨论

近年来研究表明,细胞移植对治疗 SCI 有显著疗效。董峰等^[3]发现骨髓 MSCs 移植后实验动物的神经功能有不同程度的改善。崔中等^[4]利用脐血来源的神经干细胞治疗 SCI 取得较好的效果。而从脐血中分离培养干细胞大都先从脐血中分离出单个核细胞,再进行 MSCs 的培养。本实验室目前已经掌握了脐带 MSCs 的分离培养技术。而且与骨髓源性的单个核细胞和 MSCs 相比,脐血单个核细胞和脐带 MSCs 的采集更加方便,不会给供者造成任何的伤害。所以,本实验采用脐血单个核细胞和脐带 MSCs 作为治疗 SCI 的移植细胞源。

张军军等^[5]发现在骨髓 MSCs 移植到 SCI 模型 4 周后,模型鼠的肢体功能较对照组有明显提高。本实验的结果显示在细胞移植组中,受损脊髓的功能都有明显的恢复,4 周后 BBB 评分均在 10 分以上,瘫痪的后肢已能承重,模型鼠后肢的运动情况已接近正常鼠。但培养液组中的模型鼠 4 周以后 BBB 评分仍很低。细胞培养液有多种营养成分,从理论上讲,能为受损的脊髓提供一定的营养,使受损脊髓的功能在一定程度上得到恢复,但实验结果显示培养液



图 1 损伤脊髓组织

(×400)



图 2 单个核细胞移植 1 周

(×400)

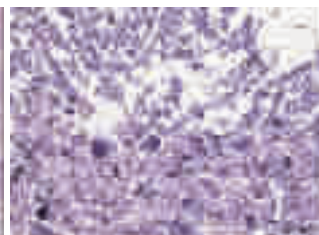


图 3 MSCs 移植 1 周

(×400)



图 4 单个核细胞移植 4 周

(×400)



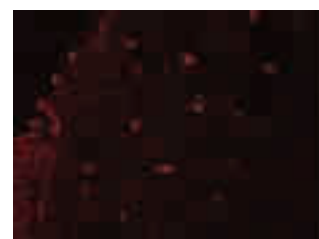
图 5 MSCs 移植 4 周 (×400)



图 6 DMEM 组 4 周 (×400)



图 7 单个核细胞移植组 (×400)



对脊髓的修复作用不明显,从而排除了损伤脊髓自我修复因素的影响。而单个核细胞移植组模型鼠的脊髓恢复情况好于 MSCs 移植组。其原因可能是脐血单个核细胞成分复杂,其中可能含有造血干细胞、内皮祖细胞、神经干细胞、神经原样细胞和 MSCs^[6],这为损伤的脊髓提供了丰富的细胞,从而达到修复脊髓的目的。

Hofstetter 等^[7]发现将异体骨髓 MSCs 移植到 SCI 模型鼠内,细胞向损伤部位迁移、存活,并观察到这部分细胞表现弱的 NeuN 阳性,这说明移植的细胞可能分化为神经细胞或胶质细胞。陈秉耀等^[8]研究发现移植的异体骨髓基质干细胞移植到 SCI 模型鼠后仍能存活并向损伤区域迁移,并有少数细胞分化为神经细胞。本实验采用人的脐血单个核细胞和脐带 MSCs 作为细胞源进行移植,发现移植的细胞也能存活并向损伤区域迁移,这与 Hofstetter 的研究结果相符合,其原因可能是脐血单个核细胞和 MSCs 属于比较原始的细胞,其表面缺乏主要组织相容性抗原,故虽未异体细胞移植,但不会产生免疫抑制排斥反应。本实验研究发现仅有少数细胞的 Nestin 呈弱阳性,在损伤区域的白质中的移植细胞 GFAP 染色阳性,故推测移植的细胞具有向胶质细胞和神经细胞分化的能力。许多体外实验研究发现脐血单个

核细胞和脐带 MSCs 都可诱导分化为神经细胞^[9-12]。本实验的研究结果显示脐血单个核细胞和脐带 MSCs 在体内同样可以诱导分化为神经细胞,这与体外实验结果相符合。

目前通过细胞移植治疗 SCI 的机制还不是很清楚,根据本实验和其他类似实验结果推测其可能的机制为:①组织损伤后往往会代偿机制,这就会促进血管的形成。SCI 后血管会增生,而脐血单个核细胞中含有造血干细胞和内皮祖细胞,这为血管的形成提供了条件。②MSCs 具有多向分化潜能,SCI 后释放某些因子促使 MSCs 向神经细胞转化,从而可以替代损伤的神经元,达到修复脊髓的作用。

综上所述,细胞移植有利于受损脊髓的恢复。与 MSCs 相比较,脐血单个核细胞有更明显的神经保护作用,更有利于受损脊髓的功能恢复,更适合作为治疗 SCI 的细胞源。

参考文献

- [1] 袁源,杨树源,韩忠朝,等.人脐带 MSCs 分离纯化及基本生物学特性研究[J].中华实验外科杂志,2006,23(1):118.
- [2] Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2002,123(6):1132—1139.

- [3] 董峰,林建华,吴朝阳.骨髓间充质干细胞经静脉注射移植对大鼠脊髓损伤后 BDNF、NGFmRNA 表达的影响[J].中国康复医学杂志,2008,23(5):416—419.
- [4] 崔中平,王小艳,杨波,等.脐带血来源神经干细胞移植治疗脊髓损伤 33 例[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(29):5751—5754.
- [5] 张军军,陈先,刘兰泽,等.组织工程化干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤的研究[J].中国康复医学杂志,2009,24(4):335—337.
- [6] 刘计荣,王建枝.人脐血来源神经样细胞的分离与培养[J].解剖学报,2005,36(1):52—56.
- [7] Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2002,99:2199—2204.
- [8] 陈秉耀,赵旭红,侯树勋,等.大鼠损伤脊髓内异体骨髓基质干细胞移植后的存活、迁移及分化[J].中华创伤骨科杂志,2008,10(10):951—954.
- [9] Zwart I, Hill AJ, Girdlestone J, et al. Analysis of neural potential of human umbilical cord blood-derived multipotent mesenchymal stem cells in response to a range of neurogenic stimuli[J]. J Neurosci Res,2008,86(9):1902—1915.
- [10] Walczak P, Chen N, Eve D, et al. Long-term cultured human umbilical cord neural-like cells transplanted into the striatum of NOD SCID mice[J]. Brain Res Bull,2007,74(13):155—163.
- [11] EI-Badri NS, Hakki A, Saporta S, et al. Cord blood mesenchymal stem cells:Potential use in neurological disorders[J]. Stem Cells Dev,2006,15(4):497—506.
- [12] Jeong JA, Gang EJ, Hong SH, et al. Rapid neural differentiation of human cord blood-derived mesenchymal stem cells[J]. Neuroreport,2004,15(11):1731—1734.

2010 年康复医学新技术与新进展国际研讨班招生通知

随着科学技术的进步,神经生理学、神经生物学、功能神经影像学、计算机学、生物工程学等学科的发展,极大地推动了康复医学的快速前进,特别是各种新技术的应用给康复医学带来了新的气息。在传统治疗的基础上,各种康复新技术的应用有助于提高康复治疗效果,带来良好的经济效益和社会效益。推广先进的康复治疗技术是康复医学发展的需要。由首都医科大学宣武医院、中国医师协会康复医师分会、北京康复医学会举办的“2010 年康复医学新技术与新进展国际研讨班”于 2010 年 5 月在北京举行,届时将邀请美国约翰·霍普金斯大学康复系 Zorowitz 教授、德国科隆体育大学康复医院 PT 长 Eibo Schwitters 教授等国内外知名康复专家介绍最新的康复治疗技术和新进展,具有很高的临床应用价值。

授课主要内容: 1、卒中康复治疗的新进展; 2、脑损伤植物状态促醒研究的新进展; 3、经颅磁刺激(TMS)在康复医学中的应用; 4、功能性电刺激(FES)在康复医学中的应用; 5、心肺康复研究的新进展; 6、骨科康复治疗的临床原则实例:下腰背疼痛的康复、前十字交叉韧带重建术后的康复、肩痛的康复; 7、平衡功能障碍的康复治疗方法; 8、康复治疗技术的新动态; 9、失语症心理语言评价; 10、临床各种康复治疗新技术实习。

1、培训对象: 康复科医师、治疗师、神经科医师、骨科医师以及相关临床、科研及治疗人员; **2、报到时间:** 2010 年 5 月 20 日; **3、报到地点:** 大府宾馆(北京市宣武区长椿街 45 号); **4、培训地点:** 首都医科大学宣武医院(大府宾馆斜对面); **5、培训时间:** 2010 年 5 月 21—23 日; **6、收费标准:** 培训费 1000 元(包括学费和资料费),住宿费、膳食费、差旅费及往返车船机票自理。培训结束后,将授予国家级继续教育 I 类学分及培训合格证书。

届时符合条件人员可以现场办理中国医师协会康复医师分会会员证(会员费 100 元)。

请于 2010 年 4 月 20 日前将报名回执寄到:地址:北京市宣武区长椿街 45 号宣武医院康复医学科 张艳明 收,邮编:100053;欢迎电话报名和电子邮件报名,咨询电话:010-83198326,手机:13641026802;传真:010-83156838,联系人:张艳明 电子信箱:kfysfh@yahoo.cn

首都医科大学宣武医院 中国医师协会康复医师分会 北京康复医学会