

· 基础研究 ·

脂肪源性干细胞移植对颅脑损伤大鼠神经功能评分和神经细胞凋亡的影响

高 伟¹ 雷 鹏^{2,4} 周 杰³ 刘 奇³

摘要

目的: 观察从大鼠脂肪组织中分离出的脂肪干细胞(ADSCs), 研究 ADSCs 移植对颅脑损伤大鼠神经功能及细胞凋亡的影响。

方法: 采用 Feeney 法制成大鼠颅脑损伤模型, 健康雌性 Wistar 大鼠 60 只用随机数字法分成移植实验组、培养基对照组、假手术组, 每组 20 只。5-溴脱氧尿核苷(5-Brdu)标记 ADSCs。对实验组大鼠进行损伤区域细胞移植, 培养基对照组移植等量氨基酸葡萄糖培养基(DMEM/F12), 假手术组仅开骨窗处理。在移植后第 1、3、10、21 天采用神经功能评分(NSS)方法分别对各组实验大鼠进行评分。取损伤部位脑组织用直接免疫荧光法检测标记细胞体内存活增殖情况, 原位末端凋亡法(Tunel)观察细胞凋亡。

结果: 移植后 ADSCs 在大鼠体内存活良好分布于损伤区域。移植组在移植后第 3、10、21 天神经功能评分均低于对照组($P<0.05$), 在各时间点移植组细胞凋亡明显少于对照组($P<0.05$)。

结论: ADSCs 移植后可以减少颅脑损伤大鼠神经细胞凋亡, 有助于神经功能恢复。

关键词 创伤性颅脑损伤; 脂肪干细胞; 凋亡; 神经功能评分

中图分类号: R651.15 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2010)-11-1040-04

The influences of transplantation of adipose-derived stem cells on neurological severity score and neurocyte apoptosis of the rats with craniocerebral injury/GAO Wei, LEI Peng, ZHOU Jie, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(11): 1040—1043

Abstract

Objective: To observe the influences of adipose-derived stem cells (ADSCs) transplantation on neurological severity score and neurocyte apoptosis of the rats with traumatic brain injury to provide the evidence at treating traumatic brain injury with ADSCs transplantation.

Method: The model of rat with craniocerebral injury was made with Feeney's free falling body method. Sixty healthy female Wistar rats were divided by digital way at random into transplantation experimental group, cultivation control group and sham operation group, 20 rats in each group. Brdu was used to mark the ADSCs. ADSCs were transplanted in injury areas of rats in transplantation experimental group; in cultivation control group DMEM/F12 culture medium of equal volume were transplanted; and in sham operation group only craniotomy was executed without transplantation. After transplantation the rats in each group were evaluated with NSS at the 1st, 3rd, 10th, 21st d respectively. Brain tissue of the injured area were taken off and survival and proliferation of cells in the injured area were examined and marked through direct immunofluorescence. TUNEL was employed to observe the cell apoptosis.

Result: After transplantation, ADSCs distributed in injury area survived well. At the 3rd, 10th, 21st d the NSS scores in transplantation experimental group were less than that in cultivation control group ($P<0.05$). At each time

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.11.005

1 第四军医大学西京医院, 西安, 710032; 2 兰州军区总医院; 3 兰州军区总医院神经外科; 4 通讯作者

作者简介: 高伟, 男, 住院医师; 收稿日期: 2010-05-08



point, the cell apoptosis in transplantation experimental group was evidently less than that in cultivation control group($P<0.05$).

Conclusion: After ADSCs transplantation, the cell apoptosis of rats with craniocerebral injury decrease, and it is helpful for the recovery of neurological function.

Author's address Xijing Hospital Affiliated to the Fourth Military Medical University, 710032

Key words traumatic brain injury; adipose-derived stem cells; apoptosis; neurological severity score

干细胞的发现及广泛研究应用为颅脑损伤的治疗带来新的希望^[1]。干细胞是一类具有自我更新复制能力,通过自己细胞分裂分化成各种不同类型细胞的细胞群。干细胞具有两个主要的特点:一是自我更新能够经过无数次的细胞分裂,同时保持未分化状态;二是能分化成特定细胞类型,干细胞移植疗法研究的细胞来源主要是脐带造血干细胞、骨髓基质干细胞、神经干细胞、胚胎干细胞等^[2-5],取得了一定的成果。脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)在人和动物体内量相对较多,且取材和体外培养相对容易、无伦理争议,有着独特的优势。本实验观察 ADSCs 移植后颅脑损伤大鼠神经功能及细胞凋亡的改变,为 ADSCs 移植治疗创伤性颅脑损伤提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物来源与分组

选取健康雌性 Wistar 大鼠,体重 200—220g,随机数字法分成移植实验组、培养基对照组、假手术组,每组各 20 只。每组大鼠以 4 个不同时间点再次分为 4 个亚组,每组 5 只,由兰州大学医学院动物实验中心提供。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

1.2 主要试剂

DMEM/F12 (GIBCO 公司);优级胎牛血清(FBS) (四季青公司);异硫氰酸荧光素(FITC)标记溴脱氧尿苷抗体 IgG(北京博奥森生物技术公司);TUNEL 检测试剂盒 (北京博奥森生物技术公司);5-溴脱氧尿核苷(BrdU)(Sigma 公司)。

1.3 方法

1.3.1 颅脑损伤模型的制作^[6]:采用 Feeney 法。体重 200—220g 雌性 Wistar 大鼠用 10%水合氯醛 0.4ml/100g 腹腔注射麻醉,中线左旁开 5mm 切开头皮,剥离骨膜,暴露左顶骨,用直径 4mm 钻在左顶部大鼠

左眼至左耳连线中内 1/3 处钻一骨窗。将直径 3 mm 的撞杆置于硬膜上,用 20g 砝码于 30cm 高处沿导管坠落,打击深度 3mm,致左顶叶中度脑挫裂伤,硬膜外置明胶海绵止血。

1.3.2 ADSCs 的分离培养^[7]:体重 200—220g 雌性 Wistar 大鼠,腹腔过量麻醉处死,75%的酒精浸泡 10min,无菌条件下取双侧腹股沟脂肪组织,磷酸盐缓冲液(PBS)反复冲洗。将碎脂肪组织剪切成碎末,0.1%胶原酶 II 37℃消化 40min,200 目筛网过滤,1000 转/min 离心 5min。弃上清,用含有 10% FBS 的 DMEM/F12-L 培养基吹打细胞。调整细胞密度,置于 37℃,5%CO₂ 培养箱,24h 首次换液,以后每 72h 换液一次。待细胞生长 80%融合后用胰蛋白酶消化约 2min,在镜下观察到细胞出现皱缩时用含有 10% FBS DMEM/F12 培养基终止消化反应。1000 转/min 离心 5min 后弃上清,用 10% FBS DMEM/F12 将细胞吹打均匀,按 1:2 倍传至培养瓶中。待细胞再次铺满培养瓶底 80%时再次传代,用上述方法进行细胞传代扩增培养。

1.3.3 颅脑损伤后大鼠进行 ADSCs 移植处理及神经功能评分(neurological severity score,NSS):按照上述的细胞分离和培养传代方法将用 BrdU(10μmol/L)孵育 48h 的 ADSCs 再次消化、吹打后制成细胞悬液,取部分悬液分装微量离心管中。用微量加样器在动物骨窗边缘分 3 点加入细胞悬液,每点加入 2μl,进针深度 3mm,缝合头皮。对照组移植等量 DMEM/F12。假手术组仅开骨窗后缝合头皮。实验辅助测评人员盲法在移植后第 1、3、10、21 天分别对各组实验大鼠进行 NSS 评定^[8]。运动测试 6 分,感觉测试 2 分,直杠平衡测试 6 分,反射缺失或者异常活动 4 分,最高分数 18 分,最低分数 0 分,分数越高神经功能损伤越严重。评分方法简单易行无需培训。

1.3.4 细胞存活的观察:按时间点麻醉后处死大鼠,立即取出大脑,快速剥离损伤附近脑组织,用直接免

疫荧光法检测标记细胞体内存活增殖情况。PBS 覆盖待检标本片上使标本保持一定湿度。滴加 1:50 倍稀释的 FITC 荧光素标记溴脱氧尿苷抗体 IgG 溶液覆盖标本,置于暗室内,37℃ 30min。取出玻片 PBS 冲洗,加一滴缓冲甘油,盖玻片覆盖,荧光显微镜观察。观察标本的特异性荧光强度,同时设置自发荧光对照特异性对照以排除某些非特异性荧光染色的干扰。

1.3.5 细胞凋亡的观察:按时间点麻醉后处死大鼠,快速进行心脏灌注生理盐水。断头取脑,用 4%多聚甲醛固定 2h,然后以损伤皮质为中心,冠状切片,制作成石蜡包埋切片。石蜡切片用 TUNEL 法检测脑损伤灶附近神经细胞凋亡情况。石蜡组织切片二甲苯浸洗依次用乙醇梯度脱水,3% H₂O₂ 作用 15min;蛋白酶消化 30 min;0.1% Triton X-100 破膜后加 TUNEL 反应液 50μl 于孵育盒中 37℃,60min。PBS 冲洗晾干后加 50μl 的碱性磷酸酶抗体,37℃孵育 30min,PBS 冲洗晾干后加 2—3 滴碱性磷酸酶显色剂(BCIP/NBT)显色,孵育 20min。暗处显色至阳性对照显色良好时终止呈色反应;缓冲甘油封片。光镜观察,400 倍光镜下取每个视野的凋亡阳性细胞数,细胞核蓝紫色为阳性。每张切片随机取 5 个视野,取平均值。

表 1 各组大鼠不同时间点神经功能评分 (n=5, $\bar{x}\pm s$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 10 天	第 21 天
移植实验组	12.00±0.71 ^①	7.00±0.71 ^②	3.20±0.44 ^②	1.40±0.54 ^②
培养基对照组	12.20±0.84	8.20±0.84	4.60±0.54	2.60±0.54
假手术组	3.00±0.71 ^{②③}	1.60±0.54 ^{②③}	0.40±0.54 ^{②③}	0

与对照组比:①P>0.05;②P<0.05;③P<0.01

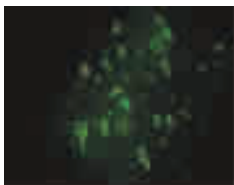
图 1 原代 ADSCs 贴壁第 3 天 (×400)



图 2 原代 ADSCs 生长融合 (×400)



图 3 Brdu 标记移植细胞 (×400)



3 讨论

关于大鼠颅脑损伤模型,Feeney 等 1981 年在改进脊髓损伤的模型的基础上创造了以固定高度自由落体方法打击大鼠的颅脑损伤模型。因为其操作简单,可控性好,能定量且基本符合临床创伤性脑

1.4 统计学分析

所得数据以均数±标准差表示,采用 SPSS13.0 统计软件处理,完全随机设计的单因素 ANOVA 多个样本均数间的两两比较,当方差齐时采用 LSD 检验,方差不齐时 Dunnett-t 检验,以 P<0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

细胞经接种后 24h 贴壁,起初呈团簇样生长,3d 后呈现为梭形或多角形(图 1),培养至一周后融合铺满培养皿(图 2)。多次传代后红细胞及其他细胞不贴壁从而起到纯化的作用。

直接免疫荧光法观察移植后第 21 天 ADSCs 在大鼠体内存活良好分布于损伤皮质区域。自发光与特异性对照均为阴性(图 3)。

大鼠损伤模型制作中有 2 只在造模第 2 天死亡,未纳入实验。假手术组大鼠各时间点评分均与对照组有显著差异(P<0.01),表明颅脑损伤模型建立成功。实验组在第 3、10、21 天神经功能评分均低于对照组(P<0.05),而第 1 天无明显差异(P>0.05)(表 1)。

倒置显微镜下观察见各时间点实验组凋亡阳性细胞数均低于对照组,且差异均有显著性意义(P<0.05)。假手术组有少量阳性细胞表达(表 2、图 4)。

表 2 各组大鼠颅脑损伤后不同时间点皮质凋亡阳性细胞数 (n=5, $\bar{x}\pm s$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 10 天	第 21 天
移植实验组	23.60±1.14 ^②	33.2±1.92 ^②	25.00±2.23 ^②	20.60±1.20 ^①
培养基对照组	32.00±1.87	49.60±2.07	33.00±3.67	25.20±2.38
假手术组	9.40±1.67	9.60±1.51	6.60±1.67	7.80±1.48

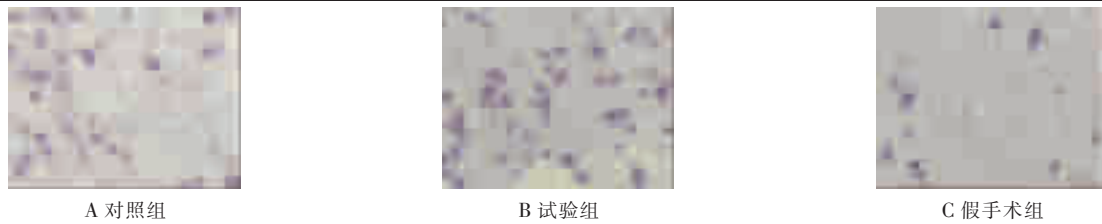
与对照组相比:①P<0.05;②P<0.01

损伤的病理学改变与病理生理特点^[9],一直被研究人员采用至今。

ADSCs 能够促进神经功能恢复的具体机制尚未完全清楚,到目前为止还没有研究证明移植细胞可以替代受损伤的脑组织,也没有发现移植细胞产

图4 大鼠细胞凋亡 BCIP/NBT 显色

(×400)



生新的神经网络系统。而有研究表明 ADSCs 进入脑组织后可以释放一系列细胞因子从而帮助神经系统恢复。Chen 等^[10]认为,ADSCs 进入体内后激活了各种信号传导通路,而脑组织收到这种信号时便会激发损伤脑组织再生,因此开始不断释放一系列的神经营养因子,如脑源性神经营养因子,他是神经修复过程中起重要作用的神经细胞因子,有利于脑损伤的修复,对神经元起保护作用^[11];Ehman 等^[12]发现 ADSCs 可以分泌血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝细胞生长因子、转化生长因子等促进血管新生和抗细胞凋亡,将 ADSCs 注射到缺血部位后采用旁分泌的方式促进血管新生以及保护缺氧细胞抗凋亡。Harrigan 等^[13-14]认为 VEGF 增加了微血管通透性,新生毛细血管形成,刺激内皮细胞增殖,并产生纤维蛋白溶酶原激活剂和胶原酶,改善组织缺血缺氧等可以减轻脑水肿以及抑制凋亡。因此考虑在 ADSCs 移植后引起的一系列信号传导使脑组织分泌各种神经营养因子,抑制神经细胞的凋亡,促进新生血管从而起到保护损伤脑组织的作用,对颅脑损伤大鼠后可以减少损伤皮质区神经细胞凋亡,有助于神经功能恢复。

干细胞不但移植进入体内可以激发损伤脑组织再生,释放一系列神经生长因子可以来保护脑组织,而且在体外向神经细胞方向诱导分化已经被证实。ADSCs 经体外诱导后具有类似神经元的形态及一些主要功能,所以文献中将其称为“神经样细胞”,和真正意义上的神经细胞有区别。而采用不同的诱导方式,ADSCs 在体外分化为神经细胞的比例各不相同,且分化后的细胞存活时间短^[15],诱导分化机制尚不明确,分化后的细胞功能也尚未完全明确。寻找合适的诱导剂、诱导剂量及诱导后向神经细胞方向分化的机制还需要进一步探索研究,相信在寻找到合适诱导手段及适当诱导剂后,ADSCs 在神经损伤修

复领域会有新的突破。

参考文献

- [1] Singec I, Jandial R, Crain A, et al. The leading edge of stem cell therapeutics[J]. *Annu Rev Med*, 2007, 58:313—328.
- [2] Gahrton G, Björkstrand B. Progress in haematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma[J]. *J Intern Med*, 2000, 248(3):185—201.
- [3] 董锋, 林建华, 吴朝阳. 骨髓间质干细胞经静脉注射移植对大鼠脊髓损伤后 BDNF、NGF mRNA 表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(5):416—419.
- [4] 孙艳, 张涇, 何冬梅. 小鼠胎肝间充质干细胞移植治疗缺血性脑损伤的实验研究[J]. *中国康复医学杂志*, 2009, 24(2):142—145.
- [5] 窦慧慧, 于丽, 郭文君. 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[J]. *中国康复医学杂志*, 2010, 25(2):104—108.
- [6] 雷鹏, 彭龙峰, 张兴超. 重组人促红细胞生成素对大鼠颅脑损伤后 Survivin 表达的影响[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2007, 12(6):350—353.
- [7] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies[J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(2): 211—228.
- [8] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(4):1005—1011.
- [9] 张荣军, 游潮, 蔡博文, 等. Feeney 法建立大鼠闭合性脑损伤模型及评估[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19(12):1015—1017.
- [10] Chen X, Li Y, Wang L, et al. Calcium promotes secretion of growth factors from human bone marrow stromal cells (hBMSCs) and tube formation of human brain microvessel endothelial cells[J]. *Stroke*, 2002, 33:401.
- [11] Almeida RD, Manadas BJ, Melo CV, et al. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3 kinase pathways[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2005, 12(10):1329—1343.
- [12] Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells [J]. *Circulation*, 2004, 109(10):1292—1298.
- [13] Harrigan MR, Ennis SR, Masada T, et al. Intraventricular infusion of vascular endothelial growth factor promotes cerebral angiogenesis with minimal brain edema [J]. *Neurosurgery*, 2002, 50(3):589—595.
- [14] Senger DR, Van de Water L, Brown LF, et al. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1993, 12(3-4):303—324.
- [15] 毛峰, 叶飞, 韩林, 等. 脂肪干细胞向神经元诱导分化的研究[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2009, 12(12):96—98.