

# 皮肤源性前体细胞经不同方式移植后在大鼠损伤脊髓中存活情况及对功能恢复的影响\*

宗兆文<sup>1</sup> 任永川<sup>1</sup> 邓梦扬<sup>2</sup> 李楠<sup>2</sup> 张连阳<sup>1</sup> 沈岳<sup>1</sup> 陈辉<sup>1</sup> 唐颖<sup>1</sup> 华祥<sup>1</sup>

## 摘要

**目的:**观察皮肤源性前体细胞(SKPs)经不同方式移植在大鼠的损伤脊髓中的存活情况及对功能恢复的作用。

**方法:**分离雄性大鼠SKPs并检测其迁移能力。Allen法制备大鼠脊髓损伤模型后,将DAPI标记的SKPs经局部注射(A组)、尾静脉(B组)、脑脊液(C组)移植到雌性大鼠体内。伤后第3天和第7天取材Western Blot检测损伤局部趋化因子的表达,荧光显微镜观察和实时定量PCR法检测脊髓中SKPs含量。BBB法评价大鼠功能恢复情况。

**结果:**SKPs具有很强的迁移能力。损伤局部趋化因子的表达上调,移植后第7天B组和C组脊髓SKPs数量较第3天时增加,但均低于A组;而伤后第7天B组和C组大鼠的功能恢复好于A组。

**结论:**经静脉和脑脊液移植的SKPs可在损伤脊髓局部上调表达趋化因子的作用下迁移到损伤局部并存活,功能恢复优于局部注射法。

**关键词** 皮肤源性前体细胞;脊髓损伤;移植

中图分类号:R651.2, R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2011)-03-0221-05

**Survival of skin-derived precursors in rat's injured spinal cord and its effect on functional recovery after transplantation in different ways/ZONG Zhaowen, REN Yongchuan, DENG Mengyang, et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2011,26(3): 221—225**

## Abstract

**Objective:** To observe the survival characterization of skin-derived precursors (SKPs) in rat's injured spinal cord and its effect on functional recovery after transplantation in different ways.

**Method:** SKPs were isolated from male rats and its migration ability was assessed in vitro. After spinal cord injury model was introduced by Allen's method, DAPI-labeled SKPs were transplanted by local injection, tail vein injection and via cerebral spinal fluid to female rats. Three and seven days after injury, Western Blot was used to examine the expression of chemotactic factors in injured sites, and observation under fluorescent microscope and with real-time PCR were employed to examine the amount of SKPs in injured spinal cord. BBB method was used to assess the functional recovery of rats.

**Result:** SKPs showed potent migration ability. The expression of chemotactic factors was up-regulated in injured sites. At the 7th d after injury, the amount of SKPs in injured spinal cord of group B and C rats increased when compared with the 3th d, which was both lower than that in group A. However, the functional recoveries in group B and C were better than that in group A.

**Conclusion:** SKPs transplanted via vein and cerebral spinal fluid could migrate to injured sites under the effect of up-regulated chemotactic factors and survive, with better functional recovery than local injection.

**Author's address** Department of Trauma Surgery, Trauma Center of PLA, DaPing Hospital, Third Military

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.03.005

\*基金项目:创伤烧伤与复合伤国家重点实验室自主课题(SKLZZ 200817);重庆市自然科学基金重点项目(CSTC,2009BA5017)

1 第三军医大学大坪区全军创伤中心创伤科,重庆,400042; 2 第三军医大学新桥医院心内科

作者简介:宗兆文,男,副教授,副主任医师;收稿日期:2010-05-11

Medical University, Chongqing, 400042

**Key word** skin-derived precursors;spinal cord injury; transplantation

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后的功能恢复是医学的难点之一,干细胞移植被认为是修复SCI功能损伤最有前景的方法之一<sup>[1]</sup>。由于来源丰富、取材方便、可进行自体移植以及无伦理道德限制等优点,皮肤来源的干细胞移植用于治疗SCI具有神经干细胞和胚胎干细胞等不具备的优势。皮肤源性前体细胞(skin-derived precursors, SKPs)是从真皮中分离得到的一种神经嵴来源的多能干细胞,可被诱导分化为神经元和雪旺细胞,移植到损伤脊髓后可促进损伤的功能恢复,显示其在脊髓损伤修复中良好的应用前景<sup>[2-3]</sup>。移植方式是影响干细胞修复功能的重要因素之一,目前常用的移植方式有局部注射、经静脉或动脉输注和经脑脊液移植等<sup>[4-6]</sup>。SCI时,每种移植方式各具优点。本研究观察上述三种移植方式SKPs在损伤脊髓中的存活情况,及其对功能恢复的影响,为选择合适的移植方式提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物和主要试剂

Wistar大鼠购自第三军医大学大坪医院动物所。胰酶、Neurobasal培养基、胎牛血清、培养瓶等细胞培养用品购自美国Hyclone公司,碱性细胞生长因子-2、表皮细胞生长因子购自BD公司。一抗抗基质细胞源性细胞因子(stromal-derived factor-1, SDF-1)、CXCR4、单核细胞趋化因子-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)和PE或辣根过氧化物酶标记结合的二抗均购自Santa-Cruz公司。DAPI购自碧云天公司,免疫组化试剂盒购自Boster公司,组织DNA提取试剂盒购自Omega公司。针对大鼠Y染色体第一性别决定区,PCR上游引物为:

5'ATACTGGCTCTG CTCCTACCT 3',

下游引物为:

5'GCTGTT TGCTGCCTTTGA3',

Taqman探针序列为:

5'-TGCCAACACTCCCCTTGCTG TAATT-3'。

均由上海基康公司合成。Transwell小室培细

胞培养系统购自Costar公司。

### 1.2 SKPs的分离、培养、传代、标记

参照Toma等<sup>[2]</sup>的方法部分改进后进行SKPs的分离培养,简述如下:取新生1d雄性大鼠头部皮肤,碘伏消毒、磷酸缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)冲洗后,用组织剪将皮肤剪成大小约1—2mm<sup>3</sup>碎片,0.5%胰酶37° C消化4h。然后去除表皮层,吹打后过滤离心收集细胞,加入含40ng/ml FGF2和20ng/ml EGF的Neurobasal培养基进行培养。大约10—14d后,可有悬浮细胞球生长,进行常规的传代和扩增。在进行细胞移植前,以含10mg/L DAPI的培养基荧光标记20min后收集细胞备用。

### 1.3 SKPs迁移能力测定

常规荧光免疫组化检测SKPs是否表达SDF-1受体CXCR4,然后用Transwell小室观察SDF-1对SKPs的趋化作用<sup>[7]</sup>。操作步骤简述如下:取SKPs并制备成100 $\mu$ l单细胞悬液(密度10<sup>6</sup>/ml),接种于Transwell小室内。约1h后,向Transwell小室外添加含10mg/ml SDF-1的SKPs培养基,以不添加SDF-1的培养基作为对照。4h后,取出Transwell小室,磷酸盐缓冲液冲洗,用棉签轻轻擦去微孔膜上层的细胞,95%乙醇固定微孔膜下层细胞,苏木精染色后高倍镜下计数。取10个视野的均数作为该样本从微孔膜上层迁移至下层的细胞数。

### 1.4 动物模型和细胞移植

成年雌性大鼠36只随机分为局部注射组(A组)、经尾静脉移植组(B组)和经脑脊液移植组(C组)。采用改良Allen重物打击法制作脊髓损伤模型<sup>[8]</sup>,简述如下:将麻醉的大鼠俯卧位固定后显露T10节段的脊髓,用重20g、打击头直径为2.5mm的打击器自2.5cm高度自由落下,造成T10节段脊髓打击伤。收集DAPI标记的SKPs,将密度调整为1 $\times$ 10<sup>7</sup>/ml,A组大鼠使用Hamilton注射器于损伤脊髓处注射100 $\mu$ l SKPs(细胞密度为1 $\times$ 10<sup>7</sup>/ml);B组大鼠经尾静脉注射100 $\mu$ l SKPs;C组大鼠在颅骨背侧中线钻一个直径1mm的小孔,将100 $\mu$ l SKPs缓慢注入损伤鼠第四脑室中。为防止膀胱感染,术后每天行人工挤压膀胱排尿2次。

## 1.5 Western Blot 检测损伤局部 SDF-1 和 MCP-1 的表达

另取 8 只大鼠制备上述同样模型用以检测脊髓中 SDF-1 和 MCP-1 的表达情况,8 只正常大鼠作为对照。方法如下:伤后第 3 天和第 7 天,取损伤处脊髓,常规提取组织总蛋白后,加入蛋白电泳上样缓冲液于真空抽干机浓缩 5 倍,并于 15% SDS PAGE 凝胶中电泳。电印迹于 PVDF 膜,37℃ 封闭 2h, PBST 洗涤 3 次 × 5min, 加 SDF-1 和 MCP-1 一抗,4℃ 孵育过夜。次日, PBST 洗涤 3 次 × 5min, 加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 30min, PBST 洗涤 3 次 × 5min 后进行 DAB 染色。

## 1.6 损伤脊髓中 SKPs 含量测定

伤后第 3 天和第 7 天处死动物后取材,采用荧光显微镜观察和针对实时定量 PCR 两种方法检测脊髓中 SKPs 含量。

**1.6.1 荧光显微镜观察:**取材后立即将 T9—T11 节段的脊髓用恒冷箱冷冻切片机进行厚 20 μm 的连续纵切片。荧光显微镜下观察 DAPI 标记阳性 SKPs 数量(蓝色)。观察时,以发出蓝色荧光、呈椭圆形或圆形、大小较均一的细胞核作为存活 SKPs 的标准。

**1.6.2 实时定量 PCR 定量:**取 1 μl 从 10<sup>6</sup> 个 SKPs 提取的 DNA, 倍比稀释为 1:10<sup>1</sup>、1:10<sup>2</sup>、1:10<sup>3</sup>、1:10<sup>4</sup>、1:10<sup>5</sup> 和 1:10<sup>6</sup> n 个浓度。取各个浓度 DNA 1 μl, 加上阴性(无菌水)1 μl 和雌性肝组织基因组 DNA 1 μl, 进行 Real-time PCR, 制作标准曲线。然后取上述显微镜观察过的 0.1g 损伤脊髓组织, 提取 DNA, 适度稀释后取 1 μl 进行 Real-time PCR 反应结束后, 和标准曲线相比较, 以得出其内 SKPs 的细胞数, 乘上稀释倍数是为 0.1g 组织中含有的 SKPs 数量。

## 1.7 行为学检测

参照 BBB 法评定大鼠的功能恢复情况<sup>[9]</sup>, 总分 21 分, 分别于伤前和伤后 7d 进行评定。

## 1.8 统计学分析

试验结果均以平均值 ± 标准差表示, SPSS 统计软件中采用单因素方差分析进行组间和组内分析,  $P < 0.05$  表示差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 SKPs 的生物学特点

原代培养后的最初几天内, 原代细胞大多贴壁, 只有少量原代细胞悬浮。约 7d 后, 出现悬浮细胞组成的小球状细胞团块。第 12—14 天, 可见多量悬浮细胞团(图 1A)。此时, 进行常规的传代和扩增, 可见细胞球得以成功扩增。细胞荧光免疫组织化学显示 SKPs 表达 SDF-1 受体 CXCR4 (图 1B), 而 Transwell 小室测试显示 SKPs 可在 SDF-1 的趋化下大量地迁移到小室下层, 提示 SKPs 具有很强的迁移能力(图 1C、D)。

### 2.2 损伤脊髓中趋化因子的表达

SDF-1 和 MCP-1 是损伤局部组织中上调表达与趋化干细胞到损伤局部参与损伤修复最为重要的两种因子。Western Blot 检测结果显示, 伤后第 3 天(图 2)和第 7 天损伤脊髓局部的 SDF-1 和 MCP-1 的表达水平明显高于正常脊髓。

### 2.3 损伤脊髓中 SKPs 的含量

A 组大鼠可在脊髓中见到大量的 SKPs, 并可见到明显的注射形成的针道。B 组大鼠伤后第 3 天在脊髓中即可见到多量 SKPs, 伤后第 7 天可见 SKPs 数量明显增多。C 组大鼠伤后第 3 天在脊髓中也可见到多量 SKPs, 脊膜外可见大量 SKPs, 第 7 天可见损伤脊髓中 SKPs 进一步增加。

而实时定量 PCR 的结果显示, 伤后第 3 天和第 7 天, A 组大鼠损伤脊髓中 SKPs 的数量分别为  $(93 \pm 2.3) \times 10^4$  和  $(83 \pm 1.6) \times 10^4$ , 明显高于 B 组[(伤后第 3 天和第 7 天损伤脊髓中 SKPs 的数量分别为  $0.8 \pm 0.04) \times 10^4$  和  $(14 \pm 0.8) \times 10^4$ ] 和 C 组[伤后第 3 天和第 7 天损伤脊髓中 SKPs 的数量分别为  $(0.95 \pm 0.06) \times 10^4$  和  $(15.1 \pm 0.9) \times 10^4$ ]( $P < 0.01$ ) 大鼠损伤脊髓中 SKPs 的数量。同时, 和伤后第 3 天相比, B 组和 C 组大鼠损伤脊髓中 SKPs 含量在第 7 天均明显增加( $P < 0.01$ )。

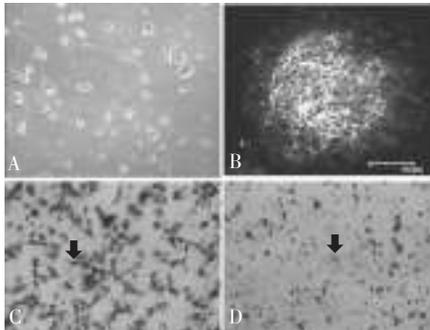
### 2.4 功能恢复情况

伤后 7d 评价 BBB 法评价各组大鼠功能恢复情况, 结果显示, B 组和 C 组大鼠评分分别为  $4.0 \pm 0.35$  和  $4.3 \pm 0.29$ , 好于 A 组大鼠  $3.2 \pm 0.27$  ( $P < 0.05$ )。

表 1 大鼠损伤脊髓中 SKPs 的数量 ( $\bar{x} \pm s$ )

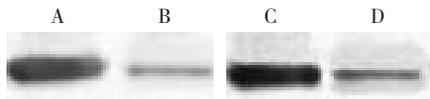
组别	A 组 ( $\times 10^4$ )	B 组 ( $\times 10^4$ )	C 组 ( $\times 10^4$ )
3d	$93 \pm 2.3$	$0.8 \pm 0.04$	$0.95 \pm 0.06$
7d	$83 \pm 1.6$	$14 \pm 0.8$	$15.1 \pm 0.9$

图1 SKPs的生物学特性



A: SKPs呈悬浮球状细胞生长( $\times 40$ )。B: SKPs表达CXCR4( $\times 200$ )。C和D:在有和无SDF-1的作用下,迁移到Transwell小室下层的SKPs( $\times 100$ )。

图2 Western Blot检测大鼠脊髓中趋化因子的表达



A和B为损伤和正常脊髓中SDF-1的表达情况;C和D为损伤和正常脊髓中MCP-1的表达情况。

### 3 讨论

#### 3.1 定向迁移的机制

干细胞移植后在体内的迁徙分布是发挥其生物学效应的第一个步骤,是影响其修复效果的重要因素。目前的研究结果显示,移植干细胞在体内的分布是移植干细胞和损伤局部微环境相互作用的结果,损伤组织局部上调表达的一些与趋化、黏附、迁移和定植相关的关键性细胞因子(如SDF-1、MCP-1、巨噬细胞炎性蛋白-1、血小板源性生长因子和血管细胞黏附分子-1等)在诱导移植干细胞向损伤局部的迁移分布中起到重要的作用<sup>[10-11]</sup>。本研究显示,脊髓损伤后,局部的SDF-1和MCP-1表达上调,可能诱导移植SKPs向伤部分布。

经静脉或脑脊液移植干细胞在神经组织内的迁移涉及的一个问题是干细胞是如何通过血-脑屏障到达损伤局部,一般认为,外伤引起局部炎症介质增加和血管活性因子释放,使血-脑屏障的通透性增加,使得移植的干细胞可以通过<sup>[5]</sup>。

#### 3.2 三种移植方式的比较

局部注射的优点是损伤局部SKPs的数量多,但注射时有可能造成脊髓组织的进一步损伤,反而不利

于功能恢复。如我们的报告,损伤移植后B组和C组SKPs含量均低于A组,但其功能恢复好于A组。有文献报告局部注射骨髓间充质干细胞对脊髓损伤的修复效果好于静脉注射者<sup>[12]</sup>,这可能与移植细胞种类、移植数量以及我们观察的时间较短等有关,同时,损伤后即刻和早期的微环境不利于SKPs向神经元和雪旺细胞分化,而B组和C组是逐渐迁移到损伤局部,此时脊髓损伤微环境已经得以改善,利于SKPs向神经元等修复细胞分化,因而功能恢复也优于局部注射者。

经静脉和经脑脊液移植具有可反复多次进行和不造成脊髓的附加损伤等优点,对于静脉移植而言,在针对多器官损伤(如复合损伤和多发损伤)、弥漫性疾病(如多发性硬化)以及一些远达器官组织(如骨髓)时更具优势。其弱点是到达损伤局部的干细胞数量低于局部注射。但如果能通过其他方法调控移植干细胞,可增加其向伤部的分布。我们的前期实验中,用CXCR4转染移植的干细胞,可在损伤局部的SDF-1的趋化下,更多地分布到上部,并伴有更好的功能恢复<sup>[13]</sup>。加上可以反复多次移植,可增加其在伤部的数量,所以静脉移植是一种实用价值很强的移植方式。

#### 3.3 SKPs促进功能恢复的作用机制

与骨髓间充质干细胞等移植后主要通过分泌各种生长因子促进神经功能恢复的机制不同,SKPs移植后在脊髓局部可能主要通过分化成雪旺细胞或神经元直接参与修复<sup>[3]</sup>。我们初步的观察表明,经静脉移植的SKPs可迁移到损伤脊髓局部,分化为神经元和雪旺细胞,并促进损伤的脊髓功能恢复。

### 参考文献

- [1] 杨建华,李长德,马杰,等. 胚胎干细胞移植在中枢神经系统损伤小鼠中的应用[J]. 中国康复医学杂志,2005, 20(8):569—571.
- [2] Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, et al. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin[J]. Stem Cells, 2005, 23(6): 727—737.
- [3] Biernaskie J, Sparling JS, Liu J, et al. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury[J]. J Neurosci, 2007, 27(36): 9545—9559.
- [4] 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

- 志,2008, 23 (5):416—419.
- [5] Inoue M, Honmou O, Oka S, et al. Comparative analysis of remyelinating potential of focal and intravenous administration of autologous bone marrow cells into the rat demyelinated spinal cord[J]. *Glia*, 2003, 44(2): 111—118.
- [6] Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue [J]. *Spine*, 2004, 29(18): 1971—1979.
- [7] 宗兆文,程天民,冉新泽,等.移植 dMSCs 向放射复合伤创面优势分布的机制研究[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2006, 26(4): 313—316.
- [8] Khan T, Havey RM, Sayers ST, et al. Animal models of spinal cord contusion injuries[J]. *Lab Anim Sci*, 1999, 49( 2) :161—172.
- [9] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study [J]. *Neurotrauma*, 1996, 13 (2) :343—354.
- [10] Baer PC, Geiger H. Mesenchymal stem cell interactions with growth factors on kidney repair [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2010, 19(1): 1—6.
- [11] Williams B, Nilsson SK. Investigating the interactions between haemopoietic stem cells and their niche: methods for the analysis of stem cell homing and distribution within the marrow following transplantation[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 482 (1): 93—107.
- [12] 景文莉, 闫凤霞, 左彦珍. 骨髓间充质干细胞不同移植途径治疗大鼠脊髓损伤的比较[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(51): 10045—10049.
- [13] Zong ZW, Xiang Q, Cheng TM, et al. CXCR4 gene transfer enhances the distribution of dermal multipotent stem cells to bone marrow in sublethally irradiated rats[J]. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2009, 50(3): 193—201.

## 第三届国际骨科康复学术会议 暨第三届现代关节外科康复学讲习班通知

由上海交通大学医学院附属第九人民医院、广东省康复医学会、上海交通大学康复医学工程研究所共同主办,上海市康复医学工程研究会、上海市康复医学会、中山市中医药学会、中国康复医学会康复治疗专业委员会物理治疗学组、广东省医学会物理医学与康复学分会康复治疗学组、世界华裔骨科学会、香港“站起来”计划共同合办,广东省中山市中医院承办的第三届国际骨科康复学术会议将于2011年5月21日至23日(5月20日报到)在广东省中山市中医院召开。

本届会议将聚焦“肩关节康复”,特邀美国、香港、台湾和大陆的专家开展专题指导讲座,力图从生物力学、手术、康复治疗、康复工程等多方位阐述肩关节常见伤病与功能障碍的基础理论与康复技术进展。在此基础上,将安排肩关节康复治疗实训(workshop)课程内容(限额60人),将邀请多位来自台湾、香港和美国的资深物理治疗师及手法名家针对肩关节物理检查、关节松动术、稳定性训练等进行现场教学与实训。参会者将授予国家级继续教育 I 类学分10分。

会议注册:网上注册800元/人(若参加workshop 1200元/人);现场注册1000元/人(若参加workshop 1500元/人);会议网址:<http://www.orpt.org/2011kf>;联系方式:上海交通大学医学院附属第九人民医院骨科(上海制造局路639号,邮编:200011);联系人:水汶、殷宁;电话/传真:021-63139920;电子邮箱: shrehab@163.com。