

·基础研究·

人脂肪间充质干细胞移植结合跑台训练对脊髓损伤大鼠运动功能的影响及机制*

张 鑫¹ 陈银海^{2,3}

摘要

目的:探讨人脂肪间充质干细胞(hADSCs)结合跑台训练对脊髓损伤(SCI)大鼠运动功能的影响。

方法:成年雄性SD大鼠60只,采用改良Allen打击法制作T10不完全SCI模型。术后随机分为损伤组(模型组,未行处理)、细胞移植组(细胞组,行细胞移植)、跑台训练组(训练组,行跑台训练)和跑台训练结合细胞移植组(联合组,行跑台训练及细胞移植)。术前及术后采用BBB评分和Tarlov评分行运动功能评定,术后1、2、4周取脊髓行免疫荧光染色检测细胞存活,炎症反应相关细胞(ED1阳性巨噬细胞),胶质瘢痕[胶质纤维酸性蛋白,GFAP及神经丝蛋白(NF-200),5-羟色胺(5-HT)]。

结果:治疗组行为学评分及荧光定量检测均优于模型组($P < 0.05$);但联合组最明显,训练组和细胞组间无明显区别($P > 0.05$)。

结论:hADSCs移植联合跑台训练对不完全性SCI大鼠运动功能恢复具有协同功效,治疗机制可能与进一步减轻伤后炎症反应,减少损伤面积,促进轴突再生有关。

关键词 脊髓损伤;人脂肪间充质干细胞;跑台训练;运动功能;脊髓可塑性

中图分类号:R681.5,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2014)-06-0504-07

Effects of combination of human adipose-derived mesenchymal stem cells transplantation and treadmill training on locomotor functional recovery after incomplete spinal cord injury in rats/ZHANG Xin, CHEN Yin Hai//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(6): 504—510

Abstract

Objective: To investigate the effects of combination of human adipose-derived mesenchymal stem cells(hADSCs) transplantation and treadmill training on locomotor function recovery after incomplete spinal cord injury (SCI) in rats.

Method: Sixty male adult SD rats were included to make incomplete SCI at T10 level by using modified Allen's method. They were divided randomly into control group, cell group (cell transplantation), exercise group (treadmill training), and combination group (cell plus exercise). Before and after SCI, locomotor function was evaluated by using Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) scale and Tarlov scale, the cell survival and expressions of ED-1+, GFAP, NF-200 and 5-HT were detected by immunofluorescence at 1, 2, 4 weeks post SCI.

Result: In treatment groups both BBB scores, Tarlov scores and immunofluorescence detection were better than those of control group, but combination group had the best effects ($P < 0.05$), there was no significant difference between the cell and exercise groups ($P > 0.05$).

Conclusion: The combination of hADSCs and treadmill training can yield synergic locomotor functional improvement after incomplete SCI. It maybe related to alleviating inflammatory reaction, reducing damage area,

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.06.002

*基金项目:广东省科技计划项目(2010B080701020)

1 南方医科大学珠江医院康复医学科,广州,510282; 2 南方医科大学珠江医院门诊部; 3 通讯作者

作者简介:张鑫,女,硕士研究生; 收稿日期:2013-09-26

and promoting axon regeneration.

Author's address Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, 510282

Key word spinal cord injury; human adipose-derived mesenchymal stem cells; treadmill training; locomotor function; spinal cord plasticity

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一类严重的致残性疾病,其治疗、干预是目前临床以及科研的一大难点和热点。长期以来,人们致力于寻找和研发治疗脊髓损伤的药物和方法,但由于神经系统再生的限制以及脊髓损伤后复杂的病理生理变化,目前仍无一种有效的治疗手段。很多研究考虑采用联合治疗,从多方面出发来提高治疗脊髓损伤的效果,但目前结果颇有争议性。为进一步研究联合治疗的效果,本研究采用人脂肪间充质干细胞(human adipose-derived mesenchymal stem cells, hADSCs)移植联合跑台训练对不完全SCI大鼠进行治疗,旨在探讨有效的联合治疗方案。

1 材料与方法

1.1 实验主要试剂仪器

主要实验试剂:胎牛血清(购自美国Gibco公司);I型胶原酶(购自美国Sigma公司);大鼠神经丝蛋白(neurofilament 200, NF200)单抗;4,6-二脒基-二苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(购自美国Sigma公司);大鼠胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acid protein, GFAP)单抗、ED1+巨噬细胞(ED1-positive macrophages)单抗(购自Millipore公司);抗人核(human nuclear protein, hNU)(购自Millipore公司);大鼠5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)单抗(购自ImmunoStar公司);主要仪器:自制跑步训练器,改良Allen打击器,CO₂孵箱(日本Sanyo)。

1.2 hADSCs的收集和培养

取人全髌置换术脂肪组织,用含3%双抗的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后剪碎,加入0.1% I型胶原酶在37℃水浴箱中振荡消化60min,2000r/min离心15min,弃其上清,沉淀用含10%胎牛血清的DMEM(培养基,Dulbecco's modified eagle medium)培养基重悬细胞。以 $1 \times 10^6/L$ 的密度接种,置于5% CO₂、饱和湿度为37℃培养箱中培养,72h后全量换液,弃掉未贴壁的细胞及杂质细胞,以后每3天换液

1次,通过倒置显微镜观察细胞增殖情况,待细胞铺满瓶底达80%后,用含0.02%乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)的0.25%胰蛋白酶消化,按1:3比例进行传代培养,72h后换液,至约80%融合时以1:3的比例传代,2—3d换半量培养液。取第4—5代细胞为实验对象。经流式细胞学鉴定其为hADSCs。

1.3 流式细胞仪鉴定细胞表面标志

取第4代分离培养的hADSCs,重新调整细胞浓度至 $1 \times 10^7/ml$ 。分别与CD₃₄、CD₄₄、CD₄₅、CD₁₀₅、CD₉₀、HLA-DR的抗体作用20min, PBS洗3次,再用200μl PBS重悬细胞,流式细胞仪上进行检测。

1.4 模型制作与分组

1.4.1 SCI模型制作:所有大鼠(清洁级)在术前1天给予10mg/kg的环孢素进行腹腔注射,术前采用3.6%水合氯醛(1ml/100g体重)腹腔注射麻醉大鼠后,切除T10椎板,暴露脊髓,采用改良Allen撞击法(致伤能量为2.5g×10cm)制作不完全性SCI模型,然后逐层缝合切口。每只实验动物给予20万U青霉素腹腔注射,以预防感染,连续7d;实验期间各组大鼠均给予自然光照,自由进食及饮水,每日按摩膀胱两次直至其排尿反射恢复为止。制模成功判定标准如下:在Allen装置撞击脊髓瞬间,大鼠身体抖动,随后双后肢反复弹动、剧烈摆尾,被打击局部脊髓表面迅速呈瘀紫色,术后双后肢僵硬,并出现完全瘫痪。

1.4.2 分组及详细处理方法:将造模成功的60只SD大鼠随机分成:脊髓损伤组(模型组)、细胞移植组(细胞组)、跑台训练组(训练组)和跑台训练结合细胞移植组(简称联合组,术后给予跑台训练及细胞移植)。

联合治疗组及训练组大鼠在造模后第2天即给予跑台训练,具体训练内容包括:跑台训练参考文献^[1-2]及本文作者预实验情况,根据大鼠恢复情况设定跑台速度从6—15m/min,每天训练30min,分两次进行,每次15min,间隔5min,每周5次。

联合治疗组及细胞组大鼠于制模后立即将体外

培养成功的hADSCs轻轻吹打成单细胞悬液,调整细胞浓度为 $2 \times 10^5/\mu\text{l}$,采用Hamilton微量注射器将10 μl 细胞液缓慢注入受损脊髓中,在距损伤中心上下2mm处进针1.2mm,分头尾端两点注射,每次注射时间持续5min,注射完毕后针头停留5min,以免倒流。

1.5 大鼠运动功能评定

分别于术前和术后每周,在光滑平整的地面上由两人在双盲条件下采用BBB评分^[3]和Tarlov评分法^[4]对各组大鼠后肢运动功能情况进行评定,每次评定持续5min。每次评定结果取两人所得平均分,每次评定前先排空膀胱。

1.6 标本制备与检测指标

于术后第1、2、4周每组各取5只大鼠进行麻醉,用150ml的生理盐水快速心脏灌注冲洗,然后4%的多聚甲醛500ml灌注,取损伤中心头尾端2cm的脊髓,以及第4周时的腰膨大,放入多甲中继续固定24h,然后到30%的蔗糖中脱水2—3d。取出,采用OCT包埋剂(OCT-compound)包埋,在冰冻恒温切片机上切片:损伤中心段—矢状位;腰膨大段—冠状位(片厚18 μm)。切片后各时间点隔6张取1张片检测细胞存活,最大空洞处向两边各取两张检测ED1情况(第1周);最大空洞处向两边取两张检测ED1及神经胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)情况,同时最大空洞处检测神经丝蛋白-200(neurofilament-200, NF-200)情况(4周);腰膨大:每间隔5张取1张检测5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)情况。切片在室温下复温10min, PBS冲洗3次,山羊血清封闭1h,然后分组滴加一抗,4℃过夜, PBS冲洗3次,二抗(594或者488),37℃孵育1h, PBS冲洗3次, DAPI封片。荧光显微镜下观察:在100倍视野下,细胞存活(取损伤中心上下1cm脊髓,计数hNU阳性细胞数,采用公式:存活率=阳性细胞 $\times 6/2000 \ 000 \times 100\%$);在400倍视野下, GFAP、ED1与NF-200(取最大空洞中心上下1cm脊髓,计算ED1+、GFAP+、NF-200+面积);在100倍视野下, 5-HT(取腰膨大处,计算5-HT阳性面积)。

1.7 统计学分析

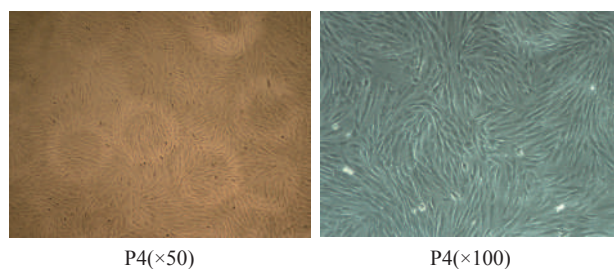
所得计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,选用SPSS 17.0版统计学软件包进行数据分析,组间比较采用单因素方差分析,两组间采用独立样本 t 检验分析。

2 结果

2.1 hADSCs原代培养及鉴定

原代hADSCs接种后约2—4h即开始贴壁,贴壁细胞呈圆形,24h后可见小胞质突起;72h后首次换液弃掉未贴壁细胞后,可见贴壁细胞大量增殖,其形态也多趋向于成纤维样细胞,胞质丰富,细胞呈平行排列生长或漩涡状生长。一般原代培养7d左右即能达到80%—90%融合,此时用0.25%胰蛋白酶消化传代。传代后的细胞生长旺盛,约3d后可再次传代,且形态愈趋向长梭形(图1)。hADSCs的表面标志鉴定:高表达间充质干细胞表面标志CD₄₄、CD₉₀、CD₁₀₅,阳性率都在97%—99%;低表达造血干细胞表面标志CD₃₄、CD₄₅,阳性率都在1%—3%;同时HLA-DR呈阴性。

图1 体外培养hADSCs



2.2 运动功能评定

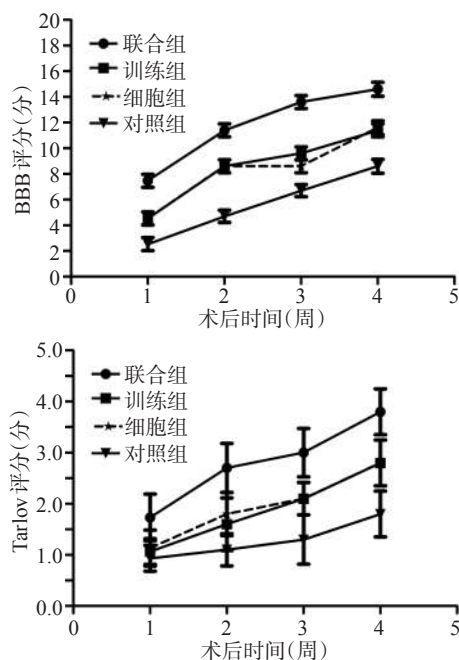
BBB评分:在术后各组大鼠均呈现迟缓性瘫痪,得分都在0—1分左右,随着时间的推移,运动功能均出现不同程度的恢复,其中联合组在各时间点的得分都显著高于其他各组($P < 0.05$),在第4周时,平均可以达到(14.70 $\pm$ 0.44)分;细胞组和训练组也高于对照组($P < 0.05$),但两组之间并无显著性差异($P > 0.05$),在第4周时,平均达到(12.00 $\pm$ 0.05)分(图2);而对照组在实验结束时(8.33 $\pm$ 0.50)分。

Tarlov评分:术后随着时间的推移,各组大鼠均出现不同程度的恢复,其中联合组恢复最好,到第4周时达3.5—4.0分($P < 0.05$),而训练组与细胞组之间却无显著性差异,到第4周时达2.0—2.5分($P > 0.05$);而对照组到实验结束时,只有1.0—1.5分。

2.3 免疫荧光

细胞存活:术后第1、2、4周,在细胞组和联合组脊髓内都发现有存活的hADSCs沿着损伤中心分布,在第1、2周时,联合组存活细胞量都明显高于细

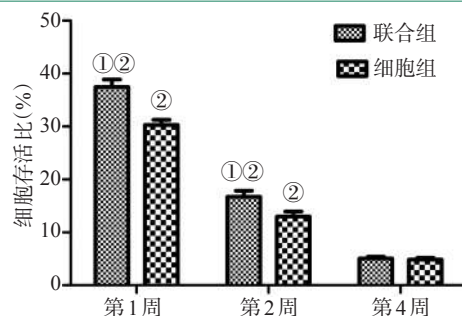
图2 各组不同时间点运动功能评定



胞组 ($P < 0.05$), 在第4周时, 两组之间的细胞存活量无明显差异 ($P > 0.05$), 见图3。

炎症反应与胶质瘢痕面积: 各组在术后第1周时间都有明显的炎症反应, 随着时间的推移炎症反

图3 细胞存活率(n=5)



与细胞组相比: ① $P < 0.05$; 与同组下一时间点相比: ② $P < 0.05$

应逐渐减轻, 但不管是在第1周还是第4周时间, 联合组的炎症反应相较于其他组都明显减轻 ($P < 0.05$), 同时细胞组和训练组相较于对照组也明显减轻 ($P < 0.05$), 但两组间无明显差别 ($P > 0.05$); 在第4周时, 联合组的胶质瘢痕面积最小, 然后是细胞组和训练组, 最后是对照组 (图4—5)。

NF-200 与 5-HT: 各组在术后第4周时 NF-200 与 5-HT 的情况, 相比之下, 联合组的阳性比例都最高, 有更多的神经纤维 (NF-200) 通过损伤部位, 以及在腰膨大处有更多再生的 5-HT ($P < 0.05$), 次之是训练组, 然后是细胞组, 最后是对照组 (图6)。

图4a 炎症反应(ED1)

($\times 100$)

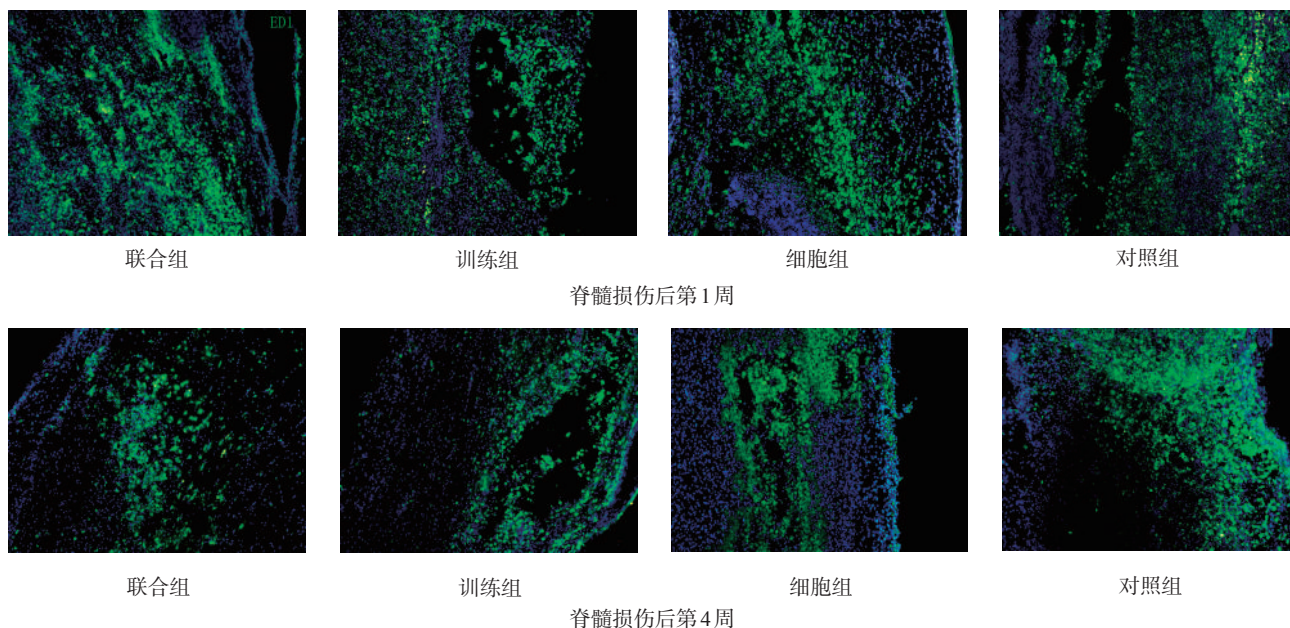


图4b 胶质瘢痕面积GFAP

($\times 100$)

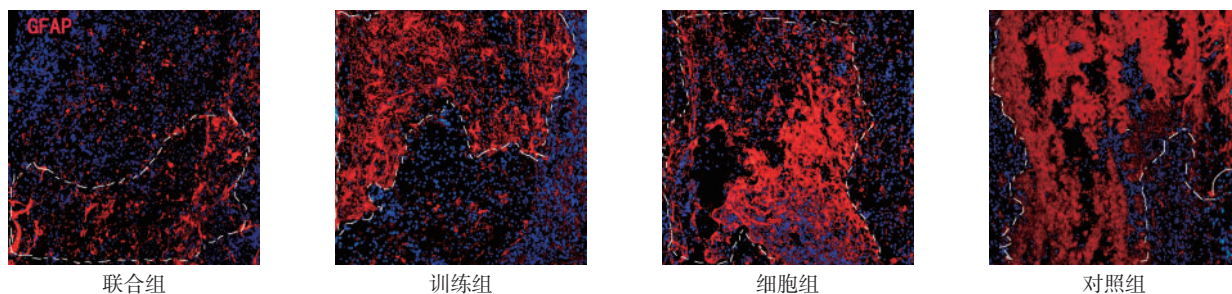


图5 炎症及胶质瘢痕面积(定量分析)(n=5)

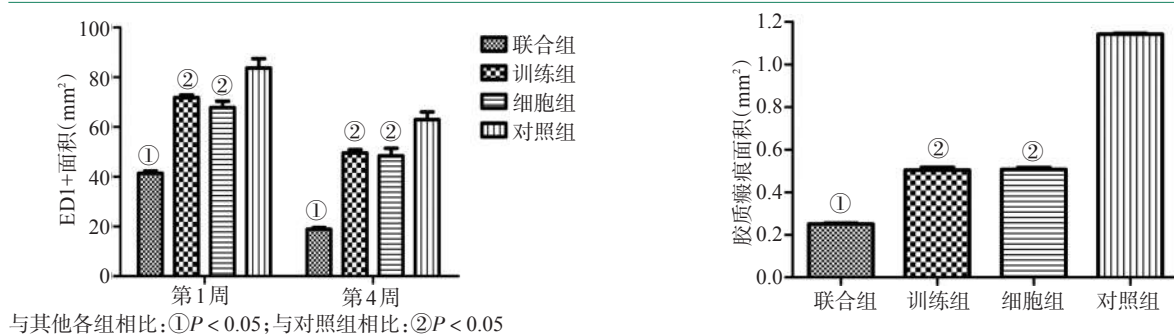


图6a NF-200与5-HT荧光

($\times 100$)

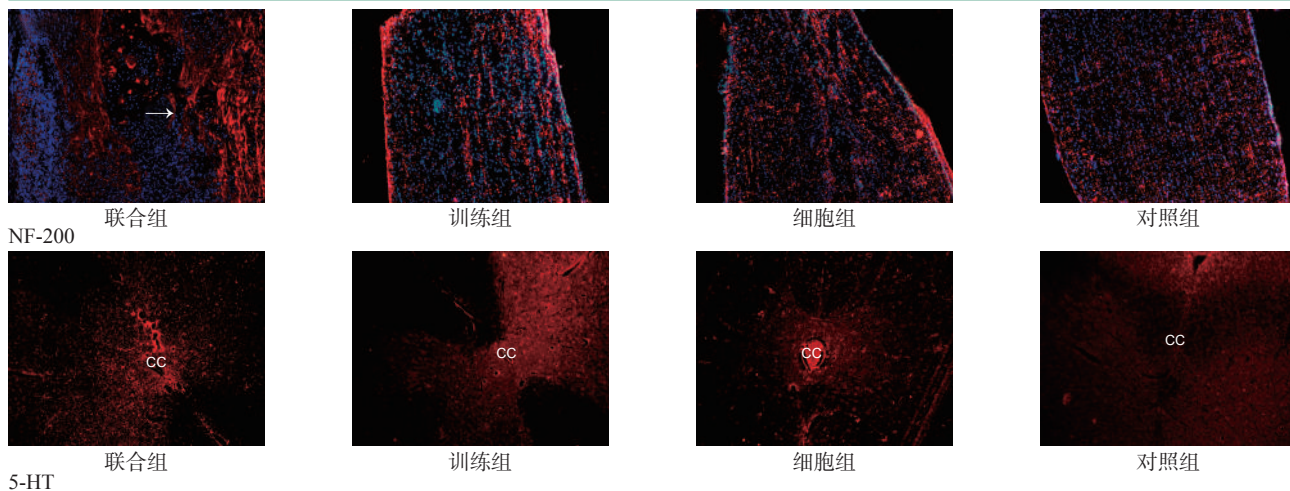
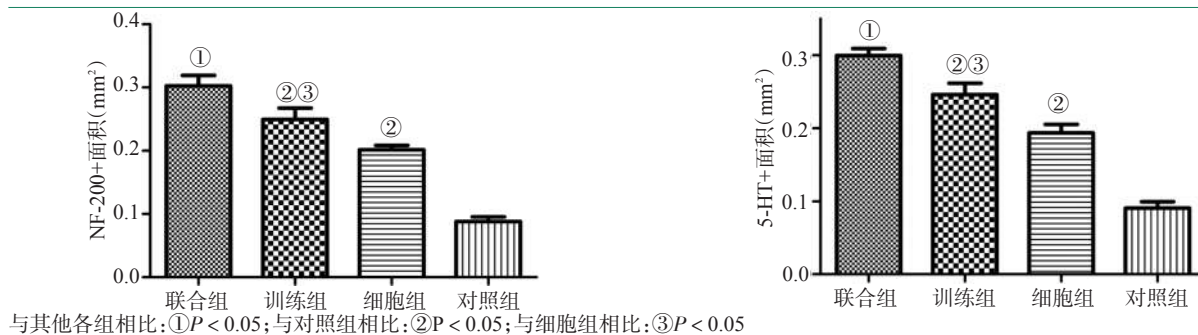


图6b NF-200与5-HT(计量分析)(n=5)



3 讨论

干细胞移植一直是治疗脊髓损伤的一种有效方法,目前由于脂肪间充质干细胞的来源广泛、性质稳定且有向各种细胞分化的潜能等优点,成为细胞治疗的热点^[5-7]。同时人们将脂肪间充质干细胞移植治疗脊髓损伤也取得明显疗效^[8-9],但是为了进一步提高疗效,有人对干细胞进行基因修饰或者辅助药物等联合治疗后发现,比单纯干细胞治疗效果更明显^[10-11]。运动训练一直是脊髓损伤后重要的治疗手段,它对进一步改善患者的运动功能效果明显,目前有研究发现,脊髓损伤后早期给予适当强度的运动训练,能改善损伤后脊髓局部的血液循环、减轻炎症反应、促进营养因子的分泌、减少胶质瘢痕的形成及其抑制性因子的分泌、促进轴突的再生和联系,对运动功能恢复效果显著^[12-14]。

有研究发现,脊髓损伤后几个小时内,炎症细胞就开始大量募集,它们虽然能吞噬损伤崩解的细胞碎片,但也会分泌很多有毒物质,进一步损害周围的正常细胞,使得损伤面积进一步扩大,这也是早期移植细胞存活率低,严重影响治疗效果的一个重要原因^[15]。本研究结果证实,在伤后急性期内(1周)各组都有明显的炎症反应(ED1+细胞),但是各种干预治疗都明显减轻了这种炎症反应(其中联合治疗的效果最明显);正因为联合组的炎症反应明显减轻,使得移植入体内的细胞有更高的存活率(相较于单纯的细胞组),能分泌更多的营养因子等,进一步改善伤后局部的微环境等,为轴突等的再生提供有利条件。同时炎症反应,使得细胞崩解,分泌大量因子及有毒物质,刺激星形胶质细胞反应,生成大量胶质瘢痕,而胶质瘢痕会产生并分泌轴突再生抑制因子:硫酸软骨素糖蛋白(chondroitin sulphate proteoglycan, CSPGs)等,使得损伤头端及周围的轴突(NF-200)很难再生通过损伤中心,而NF-200是神经元特异性骨架蛋白,参与神经元形态结构的形成及维持,与蛋白质在胞体及突起之间的双向运输功能密切相关,并与膜蛋白相互作用,对脊髓损伤后运动功能的恢复至关重要^[16-18];在本实验中我们发现:治疗组在早期使得炎症反应减轻的同时,也使得胶质瘢痕的面积(GFAP+面积)相较于对照组也明显较少,其中联合治疗的作用最明显,而这种胶质瘢痕的减轻,也

使得联合治疗组有最多的神经轴突(NF-200)再生并通过损伤中心。

研究发现,在脊髓单胺类神经递质中,5-HT对运动功能的调节最为重要,运动神经元产生持续大量的内向电流的能力需要在5-HT的存在下才能被维持。大鼠脊髓内5-HT纤维主要由延髓水平中缝核群发出,主要投射至脊髓侧角中间带区与前角运动神经元,参与自主神经功能及运动功能调节^[19]。在本实验中,我们发现,SCI后早期给予运动训练能明显促进腰膨大处5-HT的表达,而联合细胞移植及运动训练能强化这种促进作用,使得联合组的腰膨大处大量表达5-HT。

由于治疗的干预作用,使损伤后呈自然缓慢恢复状态的运动功能出现更大幅度的恢复。可以看出各组大鼠在伤后都呈现弛缓性瘫痪状态(0—1分),无特殊干预的情况下,对照组到第4周时(BBB评分自然恢复到8分左右:即可以节律性的伸展髋、膝、踝关节,并拖动下肢行走;Tarlov恢复到1—1.5分),而细胞组及训练组(BBB评分:达12分:即能出现频繁的负重步行,且前后肢有一定的协调能力;Tarlov恢复到2—2.5分),联合组(BBB评分达14—15分:即有持续协调的足底步行,同时前后肢有明显的协调能力;Tarlov恢复到3.5—4分)。说明干预治疗,特别是联合治疗使得损伤大鼠恢复了一定的步行能力且具有一定的协调性,而步行能力对脊髓损伤后的功能恢复来讲是至关重要的。

综上所述,脂肪间充质干细胞及跑台训练联合应用,两者从损伤后炎症反应、胶质瘢痕生成、轴突再生等多方面出发,协同促进SCI后大鼠的运动功能恢复。

参考文献

- [1] Andrade MS, Mendonça LM, Chadi G. Treadmill running protects spinal cord contusion from secondary degeneration [J]. Brain Res, 2010, (1346):266—278.
- [2] Multon S, Franzen R, Poirrier AL, et al. The effect of treadmill training on motor recovery after a partial spinal cord compression-injury in the adult rat[J]. J Neurotrauma, 2003, 20(8):699—706.
- [3] Park SS, Lee YJ, Lee SH, et al. Functional recovery after spinal cord injury in dogs treated with a combination of

- Matrigel and neural-induced adipose-derived mesenchymal Stem cells[J]. Cytotherapy, 2012, 14(5):584—597.
- [4] 张强,徐江,熊颖,等.康复训练对比格犬脊髓损伤后轴突再生微环境及运动功能的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2011,33(10):721—724.
- [5] Chung CS, Fujita N, Kawahara N, et al. A comparison of neurosphere differentiation potential of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells[J]. J Vet Med Sci, 2013, 75(7):879—886.
- [6] Harasymiak-Krzyżanowska I, Niedojadło A, Karwat J, et al. Adipose tissue-derived stem cells show considerable promise for regenerative medicine applications[J]. Cell Mol Biol Lett, 2013, 18(4):479—493.
- [7] Tobita M, Mizuno H. Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma: the keys to functional periodontal tissue engineering[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2013, 8(5):400—406.
- [8] 乔晓俊,杨波,关方霞,等.人脂肪间充质干细胞静脉移植修复脊髓损伤:相关因子及行为学评价[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,40(14):7458—7461.
- [9] 张天祥,杨波,关方霞,等.静脉移植人脂肪间充质干细胞治疗大鼠颅脑损伤[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(14):2551—2556.
- [10] 熊敏,曾云,刘志刚,等.脑源性神经营养因子基因修饰脂肪间充质干细胞治疗大鼠急性脊髓损伤[J].中华实验外科杂志,2012, 29(11):2271—2273.
- [11] 刘志刚,熊敏,曾云,等.脑源性神经营养因子基因修饰脂肪间充质干细胞移植对急性脊髓损伤大鼠运动功能的恢复作用[J].湖北医药学院学报,2012,31(5):351—354.
- [12] Ying Z, Roy RR, Edgerton VR, et al. Exercise restores levels of neurotrophins and synaptic plasticity following spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2005, 193(2):411—419.
- [13] Joseph MS, Tillakaratne NJ, de Leon RD. Treadmill training stimulates brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in motor neurons of the lumbar spinal cord in spinal transected rats[J]. Neuroscience, 2012, (224):135—144.
- [14] Knikou M. Plasticity of corticospinal neural control after locomotor training in human spinal cord injury[J]. Neural Plast, 2012, (2012):254948—254961.
- [15] Ritfeld GJ, Nandoe Tewarie RD, Rahiem ST, et al. Reducing macrophages to improve bone marrow stromal cell survival in the contused spinal cord[J]. Neuroreport, 2010, 21(3):221—226.
- [16] Wang X, Hasan O, Arzeno A, et al. Axonal regeneration induced by blockade of glial inhibitors coupled with activation of intrinsic neuronal growth pathways[J]. Exp Neurol, 2012, 237(1):55—69.
- [17] Sharma K, Selzer ME, Li S. Scar-mediated inhibition and CSPG receptors in the CNS[J]. Exp Neurol, 2012, 237(2):370—378.
- [18] Starkey ML, Bartus K, Barritt AW, et al. Chondroitinase ABC promotes compensatory sprouting of the intact corticospinal tract and recovery of forelimb function following unilateral pyramidotomy in adult mice[J]. Eur J Neurosci, 2012, 36(12):3665—3678.
- [19] Jacobs BL, Martín-Cora FJ, Fornal CA. Activity of medullary serotonergic neurons in freely moving animals[J]. Brain Res Brain Res Rev, 2002, 40(1—3):45—52.