

人脐带间充质干细胞移植联合小剂量超短波对大鼠脊髓损伤星形胶质细胞形成的影响*

王 帅^{1,2} 董洪选³ 陈丹莹¹ 苏 浩¹ 孙 师¹ 赵丽娜¹ 高 健³ 张立新^{1,4}

摘要

目的:探讨人脐带间充质干细胞移植联合小剂量超短波治疗对大鼠脊髓损伤(SCI)星形胶质细胞形成的影响。

方法:将90只SD大鼠随机分成5组:假手术组(n=6)、对照组(n=21)、小剂量超短波(ultrashort wave, USW)治疗组(n=21)、人脐带间充质细胞移植组(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)(n=21)、USW治疗+hUCMSCs移植组(n=21)。hUCMSCs移植组、USW治疗+hUCMSCs移植组在损伤后立即使用微量注射器刺破硬脊膜垂直缓慢注入5 μ l含细胞密度为 $1\times 10^6/\mu$ l的细胞悬液;USW治疗组、USW治疗+hUCMSCs移植组大鼠在SCI后1d起采用对置法接受每天1次、每次7min的小剂量USW治疗。大鼠的运动功能用Basso Beattie Bresnahan评分(BBB评分)进行评定,SCI大鼠取材后分别对组织进行纵向切片行HE染色、免疫荧光染色,检测移植后hUCMSCs细胞存活及向星形胶质细胞分化,损伤区域附近内源性干细胞向星形胶质细胞分化及SCI后4周时纤维化形成的情况。

结果:①SCI大鼠造模后1—2周内损伤周围组织附近,由内源性干细胞分化的星形胶质细胞形成胶质屏障,发挥保护作用。②SCI14d,移入hUCMSCs细胞位于损伤区域内,部分移入的干细胞向星形胶质细胞去分化。损伤周围的星形胶质细胞多由内源性干细胞分化而来,人源干细胞特异性标记物MAB1281在此区域不表达。③USW+hUCMSCs移植组,USW协同hUCMSCs通过旁分泌作用改善损伤区域微环境,从而促进更多内源性干细胞聚集损伤处分化为星形胶质细胞,并阻碍坏死物质及炎症扩散($P<0.01$ vs 对照组、小剂量USW组、hUCMSCs移植组)。④USW+hUCMSCs移植抑制SCI后巨噬细胞等细胞产生的不利于轴突生长的纤维瘢痕,hUCMSCs移植在过程中扮演重要的作用($P<0.01$ vs 对照组、小剂量USW组)。⑤USW+hUCMSCs移植更好促进SCI后大鼠运动恢复($P<0.01$ vs 对照组、小剂量USW组、hUCMSCs移植组)。

结论:小剂量USW治疗协同急性期人脐带间充质干细胞移植通过旁分泌作用治疗脊髓损伤大鼠,使损伤周围聚集更多内源性干细胞并分化为星形胶质细胞形成屏障抑制坏死物质与炎症扩散,从而促进运动功能恢复。

关键词 脊髓损伤;内源性干细胞;脐带间充质细胞移植;小剂量超短波治疗

中图分类号:R651.2,R454.1,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2021)-06-0649-08

Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation combined with low dose ultrashort wave on the formation of astrocytes after spinal cord injury in rats/WANG Shuai,DONG Hongxuan,CHEN Danying,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2021,36(6): 649—656

Abstract

Objective: To explore the effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation combined with low dose ultrashort wave(USW) therapy on the formation of astrocytes after spinal cord injury in rats.

Method: Ninety SD rats were randomly divided into 5 groups: sham operation group (n=6), control group (n=

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2021.06.002

*基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(81101462);辽宁省自然科学基金项目(201602875);辽宁省公益科学基金项目(2016003001);中国医科大学学校培育学科建设经费资助项目(112-3110119071)

1 中国医科大学附属盛京医院康复科,辽宁省沈阳市,110134; 2 中山大学附属第一医院(南沙医院)康复医学科; 3 辽宁启福干细胞生物有限公司; 4 通讯作者

第一作者简介:王帅,男,医学硕士,初级技师; 收稿日期:2019-12-16

21), USW treatment group (n=21), human umbilical cord mesenchymal stem cells(hUCMSCs) transplantation group (n=21),and USW+hUCMSCs transplantation group (n=21). Spinal cord contusion was inflicted using modified Allen's method without any treatment. Cell transplantation group and USW + hUCMSCs transplantation group were punctured with a microinjector and 5ul cell suspension with cell density of $1 \times 10^6/L$ was injected vertically and slowly. The control group and the low-dose USW group were punctured with a microinjector and 5ul fresh cell culture fluid was injected vertically and slowly. In the sham operation group, only exposed the T10 spinal cord without contusion and injection. Rats in the USW treatment group and USW+hUCMSCs transplantation group were treated with USW treatment once a day and 7min each time one day after SCI. The motor function of the rats was evaluated using BBB score. After sacrificed, SCI rats were subjected to longitudinal sections for HE staining and IF staining to detect the survival and differentiation of hUCMSCs cells after transplantation, the differentiation of endogenous stem cells into astrocytes near the injury area, and the formation of fibrosis at 4w after SCI.

Result: ①Within 1-2w after modeling,the astrocytes differentiated by endogenous stem cells formed a glial barrier and played a protective role SCI rats around the injured area. ②SCI 14d, transplanted hUCMSCs cells located in the damaged area, and some transplanted stem cells differentiated into astrocytes. The astrocytes around the injury area were mostly differentiated from endogenous stem cells, and the specific marker MAB1281 of human stem cells was not expressed in this region. ③In the USW+hUCMSCs transplantation group, USW combined with hUCMSCs improved the microenvironment of the damaged area through paracrine, so as to promote more endogenous stem cell into damaged area and differentiate into astrocytes that hindered the accumulation of necrotic material and inflammation ($P < 0.01$ vs control group, low-dose USW group, and hUCMSCs transplantation group). ④After USW+hUCMSCs transplantation,the results showed the inhibition of macrophages and subsequent fibrous scar that was not conducive to axon growth. HUCMSCs transplantation played an important role in the process ($P < 0.01$ vs control group and low-dose USW group). ⑤USW + hUCMSCs transplantation could promote the motor recovery of rats after SCI ($P < 0.01$ vs control group, low-dose USW group, and hUCMSCs transplantation group).

Conclusion:The rats with spinal cord injury are treated by low-dose USW therapy in combination with acute human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation by paracrine, which results in more endogenous stem cells gathering around the damaged area and differentiating into astrocytes that form a barrier to inhibit the proliferation of necrotic substances and inflammation, thus promoting the recovery of motor function.

Author's address Shengjing Hospital Rehabilitation Centre,China Medical University,Shenyang,Liaoning Province,110134

Key word spinal cord injury; endogenous stem cell; umbilical cord mesenchymal cell transplantation; low-dose ultrashort wave therapy

随着中国经济和社会的不断发展,建筑业、交通业的繁荣为我们带来舒适和便利的同时,也增加了外伤性脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)的发生。SCI是这些意外后常见的伴发疾病,现阶段仍无有效手段恢复受损平面以下全部功能。SCI的病理过程与继发性炎症反应息息相关,星形胶质细胞作为神经系统的支持细胞在这个过程中发挥了重要作用^[1-2]。SCI后,损伤区域星型胶质细胞由静止期位于室管膜的内源性干细胞分化及周围迁移而来,并发挥重要作用:一方面,SCI后巨噬细胞过度激活分

泌IL-1 β 、TNF- α 等炎症反应,星形胶质细胞会向促进炎症的A1亚型去分化,加重炎症程度,加剧纤维化程度,影响运动功能恢复^[3-4];另一方面,聚集于损伤区域附近的星形胶质细胞形成胶质屏障,限制炎症细胞及因子浸润,发挥保护作用。抑制SCI后继发性炎症反应,会促进星形胶质细胞发挥有益的功能^[5]。过去的研究发现,SCI大鼠患处早期给予小剂量超短波(ultrashort wave,USW)持续干预,可以降低SCI介导的继发性炎症反应^[6-8]、抑制水肿^[9],并表现出较好的运动功能恢复^[6-9]。USW治疗联合间充

质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植治疗可以抑制炎症反应,并带来更好的运动功能恢复^[7-11],但相关机制尚不明确。本次研究采用小剂量USW治疗联合MSCs移植治疗,观察损伤区域星形胶质细胞的变化,拟为临床治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 人脐带间充质干细胞培养与鉴定

细胞移植所用的人脐带间充质细胞(human umbilical cord mesenchymal cells, hUCMSCs)由辽宁启福干细胞生物科技有限责任公司(辽宁,沈阳)惠赠。具体步骤如下:从新生儿脐带中取出废弃的脐带组织3—5cm,用75%乙醇消毒,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)清洗。从组织中剥离羊膜和血管,然后切成1—3mm³块。组织均匀分布于两个T75培养瓶中,加入15ml培养基(MSCBM, MSC11813, 中国,北京)。轻轻摇动烧瓶,使组织块均匀地落在瓶底。随后,这些组织在37℃、5% CO₂的培养箱中培养,细胞融合率达到80%—90%时进行传代。细胞移植前进行如下鉴定:①支原体、细胞成活率、洁净度检测;②流式细胞术干细胞特性检测(天津金域检测公司,沈阳);③细胞爬片光镜观察及荧光镜下人源细胞表面特异性抗原MAB1281染色鉴定。

1.2 实验动物分组

本次实验选用辽宁长生公司清洁级Sprague-Dawley雌性大鼠90只,体重230—250g。分为假手术组(n=6),对照组(n=21),USW治疗组(n=21),hMUMUSCs移植组(n=21),USW+hMUMUSCs移植组(n=21)。每组分别于SCI7d、SCI14d、28d进行安乐死并进行取材。为排除其他因素影响,除治疗、排尿以外的其他工作由盛京医院本溪基地SPF级实验室的工作人员完成,并在严格执行动物伦理(伦理审批号:2019PS461K)的要求下开展实验。

1.3 脊髓损伤挫压伤模型的建立与细胞移植

本次研究造模方式简述如下^[12]:①1%戊巴比妥溶液麻醉,找到胸10(T10)骨性标志点进行常规备皮消毒操作;②使用手术刀片沿脊柱逐层分离肌肉、筋膜,充分暴露以T10为中心的棘突和椎体;③采用改良Allen法制备SCI模型,以T10为中心,在距离冲击棒10mm距离使用10g砝码进行打击(打击距离

125g·mm),痉挛性后肢抽搐、摆尾,脊髓打击处出现硬脊膜下血肿,并不破坏硬脊膜视为造模成功。在实验过程中剔除三只硬脊膜受损的大鼠。造模后,生理盐水冲洗掉残留血液,细胞移植组、联合治疗组在外科显微镜的协助下将5μl含细胞密度为1×10⁶/μl的细胞悬液使用微量注射器刺破硬脊膜垂直缓慢(10min)注射于损伤脊髓中央;对照组、USW组在外科显微镜(SANQITD, 中国广东)的协助下将同体积细胞培养液(达科为, 中国)使用微量注射器刺破硬脊膜垂直注射于损伤脊髓中央;假手术组,除打击和微量注射外,其他操作与SCI干预组完全相同。显微注射操作后,在移植处放置止血海绵并进行按压止血,随后逐层进行缝合。麻醉苏醒后,给予SCI大鼠每天3次膀胱按摩,并预防性注射青霉素8万单位(鲁抗制药),直到其排尿功能逐步恢复。术后1d,在双盲的情况下,由两名固定的协助者进行BBB运动功能评分,并密切关注大鼠体重变化,若观察期间大鼠体重骤减超过20%,对其进行安乐死,避免其他因素对实验的影响。观察期间,无实验大鼠出现上述表现。

1.4 USW治疗

USW治疗组、USW治疗+hUCMSCs移植组大鼠SCI后1d给予每天1次,7min/次,每周5次的小剂量USW治疗,直到取材前。采用五官科USW治疗仪(上海,14W功率,7.37m波长,11W实际输出),对置法(采用2号电极片)以损伤处为中心进行治疗。

1.5 行为学评估

我们分别在大鼠SCI后造模前1d、SCI后1d、1周、2周、3周、4周对其进行(Basso Beattie Bresnahan, BBB)运动功能评分。BBB评分在0—21分之间移动,造模前大鼠运动功能处于无障碍评分21分,手术1d时所有SCI组大鼠后肢完全瘫痪或轻微运动,此时处于0—1分视为造模成功。观察时,我们将大鼠放置于半径1m的特质圆形观察台内,对其进行观察4min,随后两个人给出评分。评分前,由本人向两位行为学评估者介绍细则,并通过预实验使两位评判者对同一只SCI大鼠评价最终得分差别小于1分。正式实验时两位评估者分别对SCI大鼠进行观察,若两人评分相差低于1分,将得分平均即可。若二者评分相差太大,需要重新再次进行评分。

1.6 标本取材与制作

SCI后1周、2周每组取7只大鼠进行免疫荧光检测,取材方法:①足量麻醉药致大鼠心脏骤停、呼吸停止后,仰卧位沿膈肌斜向上将肋骨剪短,止血钳固定游离肋骨断端,充分暴露心耳、心尖;②左手持镊夹住心尖部,右手快速将连接装满4℃预冷磷酸盐缓冲液输液袋的20ml溶药器注射针头插入心尖处,随后使用眼科剪剪开右心耳;③4℃预冷的PBS进行心脏灌流冲出血液,液体滴注速度先快后慢,直至灌洗液无血色,随后将4%多聚甲醛采用先快速固定后缓慢固定的方法进行固定操作,此时灌流成功的标志是大鼠四肢伸展震颤、摆尾。4%多聚甲醛充分固定后将标本放入冰箱继续固定10min,以便更好的完整取出大鼠的脊髓组织;④T10作为中心区域去除骨性结构暴露损伤处,以T10为中心取下2cm的脊髓组织。随后采用PBS冲洗后,将组织转移至组织固定液(索莱宝,中国)中固定48h。随后将固定好的组织采用梯度沉糖法(15%—20%—30%)进行脱水,避免形成冰晶对实验结果的影响,最后用OCT包埋后进行切片。

1.7 HE染色与免疫荧光染色

每次染色前,需要将-80℃取出的切片放置于60℃温箱晾晒2h后,采用PBS在摇床上漂洗3次,每次10min,随后使用含有0.1%Triton的PBS溶液室温下孵育10min,随后PBS漂洗2次,每次5min。擦干片子上的水渍并用组化笔圈出组织,用商品化封闭血清(中杉金桥,中国)在37℃温箱内封闭1h,甩掉封闭抗体,用相同血清配置一抗。抗体使用如下:①GFAP是星形胶质细胞特异性标记(1:200, SANTA, 美国);②Nestin是内源性干细胞特性标志

物(1:100,碧云天,中国);③转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 1(1:100, Abcam, 美国)反映SCI后纤维化情况。④人源细胞特异性抗体MAB1281(1:100, 密理博, 美国)。一抗过夜后,采用PBS在摇床上漂洗3次,每次5min,随后采用相对应的二抗37℃温箱孵育。二抗孵育后用, PBS在摇床上放入避光洗片盒漂洗3次,随后再DAPI染液(索莱宝, 中国)染核5min,随后再PBS在摇床上放入避光洗片盒漂洗3次每次10min,随后用防淬灭封片剂(索莱宝, 中国)进行封片。HE染色片子在温箱中晾干后,使用全自动染片机进行HE染色,完成后使用中性树脂进行封片。

1.8 统计学分析

采用GraphPad Prism8.0完成单因素重复测量方差分析及图表制作,均数±标准差用以数据展示。两两比较采用Bonferroni检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

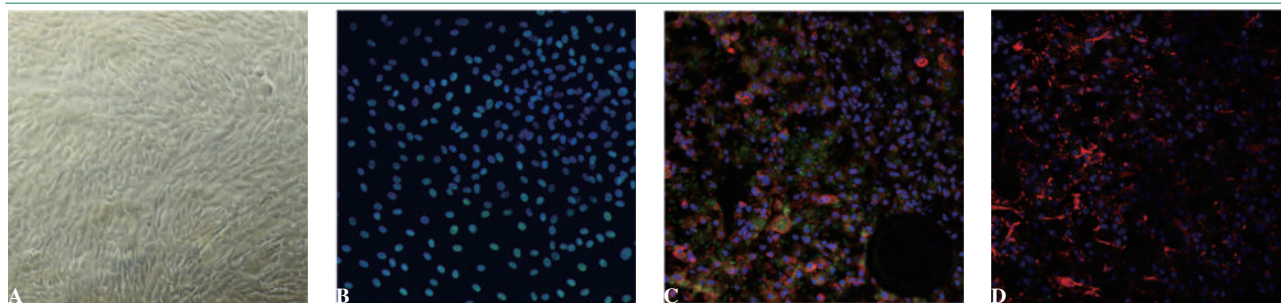
2 结果

2.1 移植所用干细胞符合干细胞特性

为了证明移植细胞具有干细胞特性,流式细胞术分析发现造血标记物CD19、CD11b、HLA-DR和CD45呈阴性,而对CD105、CD73和CD90呈阳性。这些结果显示了移入细胞具有干细胞特征。对细胞爬片进行免疫荧光后发现,使用人表面特异性标志物MAB1281与DAPI共染后发现,体外当中移入细胞与细胞核可以共染(图1)。在SCI后2周,对移入干细胞的大鼠取材发现,损伤区域存在大量干细胞(图1A),且存在移入干细胞向星形胶质细胞去转化。损伤侧周围区域不存在干细胞,星形胶质细胞

图1 脊髓损伤2周后干细胞鉴定与脊髓损伤后大鼠体内的表达情况

($\times 200$)



A. 光镜下干细胞的形态; B. 干细胞具有人细胞特性; C. 移植组损伤中心外源性干细胞向星形胶质细胞转化; D. 移植组中心附近外源性干细胞向星形胶质细胞转化; 红色: GFAP; 绿色: MAB1281; 蓝色: DAPI

聚集于此(图1D)。

2.2 SCI大鼠造模后1—2周内星形胶质细胞形成胶质屏障,发挥保护作用

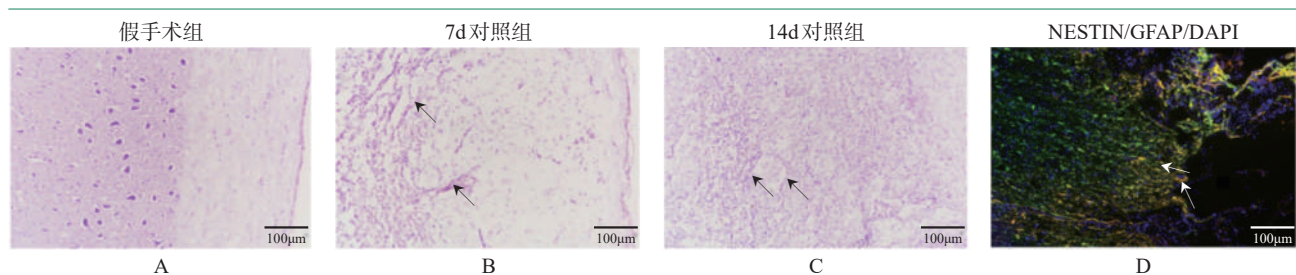
正常SD大鼠纵切标本,树突、轴突垂直向下走行,结构完整。SCI后,脊髓组织出血、结构紊乱。SCI1-3d,受损组织的出血量逐渐扩大;SCI后3—7d后出血量逐渐消散,受损周围出现吞噬红细胞的巨噬细胞,星形胶质细胞逐渐形成胶质瘢痕,包绕在炎症细胞周围;SCI14d时,包绕在炎症周围的星形胶质细胞屏障已经形成。NESTIN/GFAP阳性区域表示内源性干细胞分化为星形胶质细胞的区域,在SCI7d时高表达,内源性星形胶质细胞主要沿着损伤侧进行分化,损伤远侧相对表达量较低。见图2。

2.3 USW+hMUMUSCs移植联合治疗促进SCI大

鼠受损周围内源性干细胞向星形胶质细胞转化

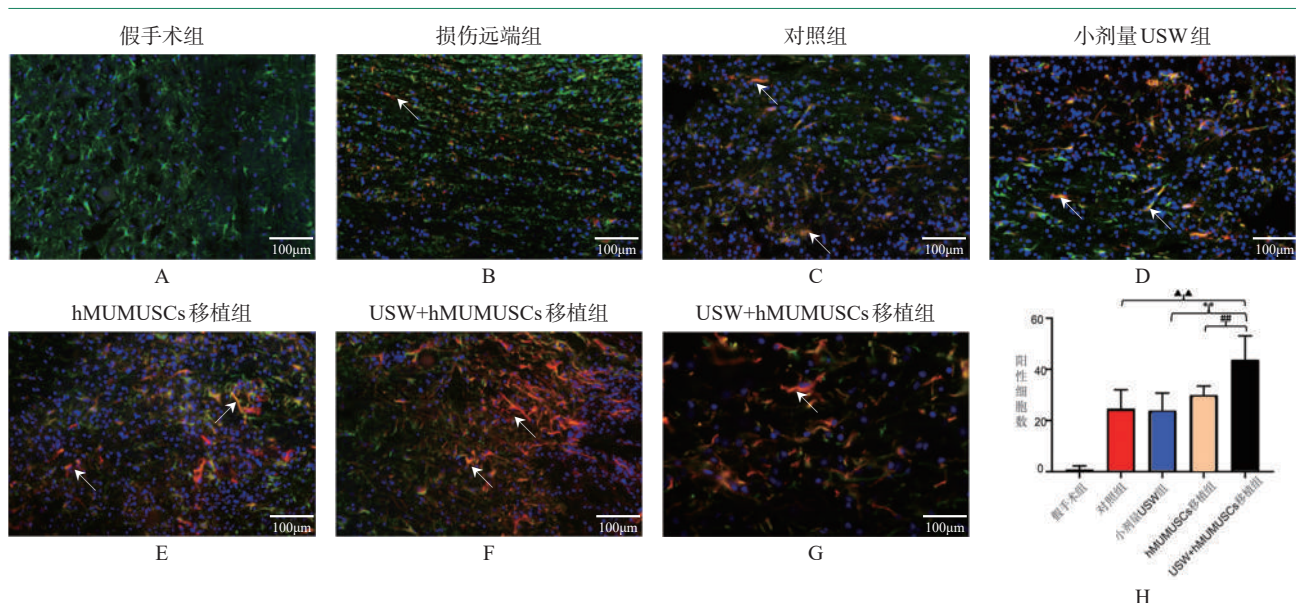
在假手术组中,未见内源性干细胞表达及向星形胶质细胞转化,这表明正常情况下除室管膜附近无内源性干细胞的聚集。与假手术组相比,SCI后星形胶质细胞数量开始逐渐增多,在以损伤侧为中心的2cm的区域内,无论是损伤区域还是非损伤区域均存在星形胶质细胞的增多。SCI后,内源性干细胞开始激活、分化、向损伤侧聚集。以损伤侧为中心,2cm的范围内的非损伤侧,有内源性干细胞向其星形胶质细胞转化,这表明SCI后损伤侧周围的星形胶质细胞由内源性干细胞分化而来。与对照组相比,USW治疗组对于聚集在损伤周围由内源性干细胞分化的星形胶质细胞无明显影响作用($P=0.176$);单纯hMUMUSCs治疗组虽然星形胶质细胞数量上

图2 SCI大鼠造模后1—2周内胶质细胞形成胶质屏障,发挥保护作用 (×100)



A—C大鼠脊髓纵HE染色图;D.SCI7d时,对照组内源性干细胞向星形胶质细胞分化的情况

图3 SCI后联合治疗组大鼠受损周围巢蛋白阳性星形胶质阳性细胞(NESTIN/GFAP)数量增多



(A)—(G)SCI大鼠受损周围NESTIN/GFAP阳性细胞数量(×200);(H)阳性细胞数统计学分析(与对照组相比,▲▲ $P<0.01$;与小剂量USW组相比,** $P<0.01$;与hMUMUSCs移植组相比,## $P<0.01$)

相比对照组略有增多,然而无显著性意义($P=0.087$);USW+hMUMUSCs 移植治疗组相比其他三组星形胶质细胞明显增高(均 $P<0.01$)。见图3。

2.4 USW+hUCMSCs 移植治疗协同抑制纤维化形成

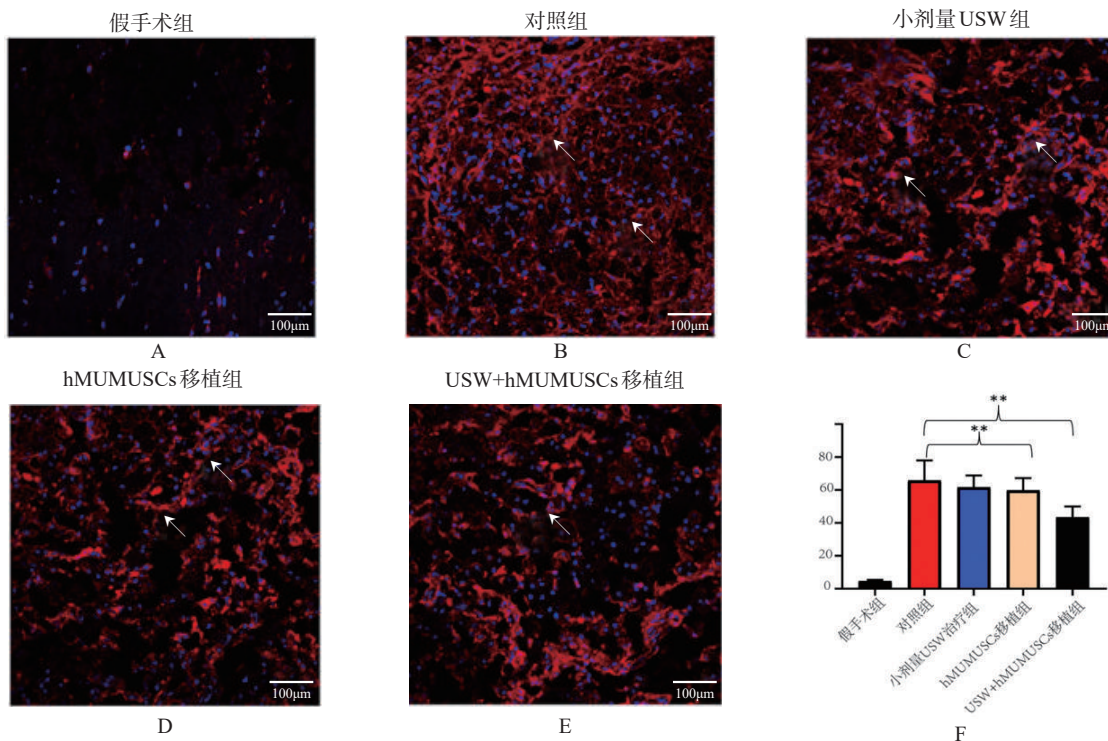
假手术组大鼠中散在分布转化生长因子- $\beta 1$ 阳性细胞;SCI后,随着时间的推移TGF- $\beta 1$ 阳性细胞数逐渐增多。SCI14d时,与对照组相比,USW 治疗组TGF- $\beta 1$ 阳性细胞数无显著差异($P=0.4192$),hMUMUSCs 移植组、USW+hMUMUSCs 移植组TGF- $\beta 1$ 阳性细胞数显著降低(均 $P<0.01$),见图4。

2.5 USW+hUCMSCs 移植组在SCI1个月时表现出更好的运动功能恢复

小剂量USW+hUCMSCs 移植治疗组在SCI1个月时表现出更好的运动功能恢复(表1)。

假手术组在SCI造模前后运动功能无改变,评分均为21分。SCI后1—7d各模型组间运动功能恢复差异较小,7—14d随着时间的推移各治疗组表现出更好的运动功能评分。SCI14d时,与对照组相比,除小剂量USW+hUCMSCs 移植治疗组,小剂量USW 治疗组($P=0.0564$)、hUCMSCs 细胞移植组($P=0.1686$)运动功能改善无明显差异;SCI21d时与对照

图4 小剂量USW+hUCMSCs 移植治疗抑制SCI大鼠造模后14d受损中心TGF- $\beta 1$ 的阳性细胞数



A—E SCI大鼠受损处TGF- $\beta 1$ 阳性细胞数量($\times 200$);F. 阳性细胞数统计学分析(与对照组相比, ** $P<0.01$)

组相比,小剂量USW 治疗组($P<0.01$)、小剂量USW+hUCMSCs 移植治疗($P<0.01$)运动功能显著改善,而hUCMSCs 细胞移植组无明显运动功能改善($P=0.0521$)。造模后28d时与对照组相比,小剂量USW 组、小剂量USW+hUCMSCs 移植组表现出更好的运动功能恢复($P<0.05$; $P<0.01$),hUCMSCs 移植治疗与对照组相比,无显著性差异($P=0.0521$)。与小剂量USW 治疗组相比,SCI后21d、28d,小剂量USW+

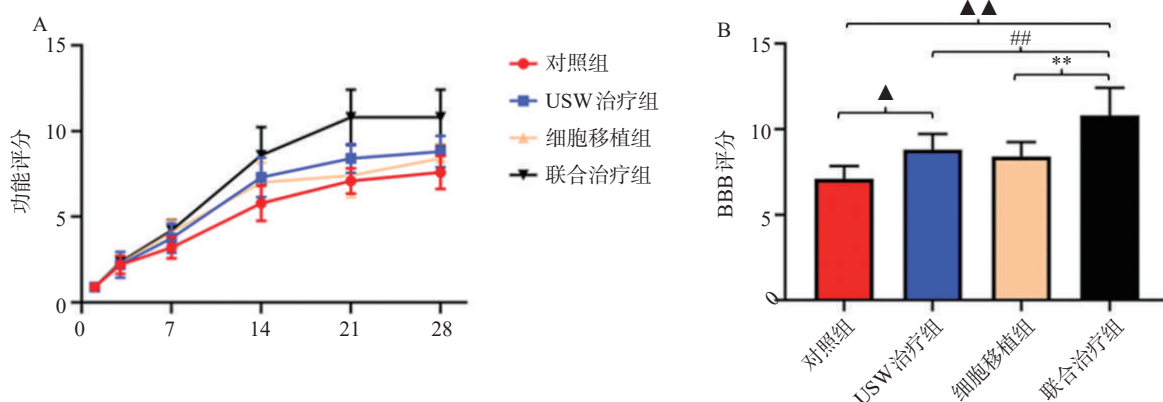
表1 SCI后各组不同时间BBB运动评分 ($\bar{x} \pm s$)

时间	假手术组	对照组	小剂量USW组	hUCMSCs移植组	USW+hUCMSCs移植组
造模前	21	21	21	21	21
SCI 1d	21	0.45±0.33	0.4±0.29	0.5±0.37	0.5±0.37
SCI 3d	21	2.2±0.49	2.2±0.68	2.3±0.23	2.35±0.22
SCI 7d	21	3.2±0.57	3.75±0.78	4.1±0.67	4.2±0.57
SCI 14d	21	5.8±0.93	7.3±1.04	7±1.04	8.6±1.49
SCI 21d	21	7.6±0.88	8.4±0.76	7.4±1.14	10.8±1.46
SCI 28d	21	7.1±0.6	8.8±0.83	8.4±0.73	10.8±1.46

hUCMSCs 移植组表现出更好的运动功能恢复 ($P < 0.01$); 与 hUCMSCs 移植治疗组相比, SCI 后 21d、

28d 小剂量 USW+hUCMSCs 移植组, 表现出更好的运动功能恢复 ($P < 0.01$), 见图 5。

图5 联合治疗在SCI 1个月时表现出更好的运动功能恢复



A. 各组运动功能 BBB 评分恢复情况; B. SCI 造模 1 个月时, 各组间 BBB 评分情况 (与对照组相比, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与小剂量 USW 组相比, ## $P < 0.01$; 与 hUCMSCs 移植组相比, ** $P < 0.01$)

3 讨论

随着 SCI 病程延长, 继发性炎症反应会持续激活, 炎性细胞与成纤维细胞共同促进纤维化产生, 最终影响了远期运动功能恢复, 星形胶质细胞在这个过程中发挥重要作用^[1]。SCI 后星形胶质细胞所形成的胶质屏障除可以限制炎症反应扩散, 其分泌以纤连蛋白 (fibronectin, FN) 为代表的营养物质与轴突再生息息相关, 胶质瘢痕消除后轴突无法再生^[3]。Cawsey T 等^[13]发现, NESTIN+ 阳性细胞的激活与中枢神经创伤密切相关, 意外所致人脊髓、脑组织发生创伤后会迅速激活、广泛分布, 在 1 周之内随着时间推移表达量逐渐增多。本次研究发现, SCI 损伤区域 1—2 周内星形胶质细胞形成胶质屏障、发挥保护作用, 这种保护作用与 NESTIN+ 阳性星形胶质细胞聚集相关; USW 治疗联合 hUCMSCs 移植可以促进 NESTIN+/GFAP+ 在损伤区域增殖, 发挥保护作用。

MAB1281 是人源干细胞抗体特异性鉴定标志物, 冯世庆等率先使用此鉴定了 SCI 12 周后大鼠 hUCMSCs 细胞移植在体分化的情况^[14]。本次研究发现, SCI 后移入细胞 2 周时, 损伤区域存在大量人源 hUCMSCs 细胞, 并有干细胞向星形胶质细胞去分化; hUCMSCs 细胞移植在这里发挥了旁分泌机制,

人源 hUCMSCs 细胞没有向星形胶质细胞去分化。

小剂量 USW 治疗在康复科常用于治疗运动系统疼痛、炎症、水肿等疾病, 效果显著, 价格便宜, 治疗过程无创、无痛。此外, 小剂量 USW 治疗与 MSCs 细胞移植治疗具有协同作用。MSCs+USW 联合治疗可以在急、慢期更好地抑制炎症反应、水肿, 分泌更多营养物质^[15-16]。慢性期的观察, MSCs+USW 联合治疗可以更好地填补组织缺损、并增加胫前肌肉湿重、有髓神经纤维数目、髓鞘厚度、轴突直径、神经传导速度和恢复率^[17-18]。综上所述, 联合治疗更好地抑制了炎症的释放, 从而促进内源性干细胞向星形胶质细胞去增殖、并形成屏障, 从而更好的限制炎症物质的流出。

TGF- β 1 与 SCI 后受损组织纤维化形成密切相关。本次研究发现, USW+hUCMSCs 联合治疗可以更好地抑制 SCI 后 14d 时大鼠 TGF- β 1 在损伤周围的表达情况, 从而抑制纤维化的产生。在这个过程中, 外源性细胞移植起到了重要的作用。相关研究证实, SCI 后人脐带间充质细胞及外泌体移植治疗可以抑制炎症细胞、炎症因子的浸润, 降低纤维化的产生, 并抑制 TGF- β 1 的产生^[10]。我们过去的研究发现, 单纯小剂量 USW 治疗无法在 SCI 后影响纤维化的数量变化, 但联合硫酸软骨素酶 ABC 酶治

疗,可以更好地抑制纤维瘢痕的形成,并带来更好的运动功能恢复^[19]。这主要的原因是,小剂量USW可以协同间充质细胞抑制SCI后小胶质细胞的数量,且会促进小胶质细胞向促进生长的M2型巨噬细胞去分化,而抑制其向促进纤维化的M1型小胶质细胞去分化^[6]。然而,单纯小剂量USW治疗无法清除残留的大量纤维瘢痕组织,这一情况严重影响其功能恢复的情况。结合本次研究情况,接下来我们将联合硫酸软骨素酶ABC酶治疗继续观察USW+hMU-MUSCs联合治疗对于SCI大鼠运动功能恢复的影响,以期更好的为SCI后干细胞移植疗法的临床转化奠定夯实的理论基础。

4 结论

小剂量USW治疗协同急性期人脐带间充质干细胞移植通过旁分泌作用治疗脊髓损伤大鼠,使损伤周围聚集更多内源性干细胞并分化为星形胶质细胞形成屏障抑制坏死物质与炎症扩散,从而促进运动功能恢复。

参考文献

- [1] 王帅,段家玉,张立新. 脊髓损伤后微环境改变与炎症通路研究进展[J]. 解剖科学进展, 2019, 25(5):608—612.
- [2] Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation [J]. Nat Rev Neurosci, 2015, 16(5):249—63.
- [3] Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia[J]. Nature, 2017, 541(7638):481—487.
- [4] Liu W, Wang Y, Gong F, et al. Exosomes derived from bone mesenchymal stem cells repair traumatic spinal cord injury by suppressing the activation of A1 neurotoxic reactive astrocytes[J]. J Neurotrauma, 2019, 36(3):469—484.
- [5] Anderson MA, Burda JE, Ren Y, et al. Astrocyte scar formation aids CNS axon regeneration[J]. Nature, 2016, 532(7598):195—200.
- [6] 高琳,冯智萍,代辰飞,等. 超短波促进巨噬细胞表型转化并抑制大鼠SCI后炎症反应的作用[J]. 中国康复理论与实践, 2018, 22(6):21—27.
- [7] 孙师,万峪岑,赵利娜,等. 骨髓间充质干细胞联合超短波对大鼠SCI后早期GFAP和ED-1的影响[J]. 中国医科大学学

- 报, 2016, 45(8):678—683.
- [8] Wang N, Feng Z, Zhao W, et al. Ultrashortwave radiation promotes the recovery of spinal cord injury by inhibiting inflammation via suppression of the MK2/TNF- α pathway[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(4):1909—1916.
- [9] 孙师,万峪岑,赵利娜,等. 骨髓间充质干细胞联合超短波对大鼠脊髓损伤后早期AQP-4和GAP-43的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2016, 6:625—631.
- [10] Khoshshirat S, Abbaszadeh HA, Ahrabi B, et al. Evaluation of the effect of BMSCs condition media and methylprednisolone in TGF- β expression and functional recovery after an acute spinal cord injury[J]. Bratislava Medical Journal, 2018, 119(11):684—691.
- [11] Yin YM, Lu Y, Zhang LX, et al. Bone marrow stromal cells transplantation combined with ultrashortwave therapy promotes functional recovery on spinal cord injury in rats [J]. Synapse, 2015, 69(3):139—47.
- [12] 陈丹莹. 两种损伤模型BBB评分比较及超短波对脊髓损伤后内源性神经干细胞存活和分化影响[D]. 沈阳:中国医科大学, 2018.
- [13] Cawsey T, Duflo J, Weickert CS, et al. Nestin-positive ependymal cells are increased in the human spinal cord after traumatic central nervous system injury[J]. J Neurotrauma, 2015, 32(18):1393—402.
- [14] 韩明远,冯世庆,李辉,等. 移植人脐带间充质干细胞修复大鼠脊髓损伤[J]. 中国组织工程学研究及临床康复, 2010, 14(19):3483—3489.
- [15] 孙师,万峪岑,赵利娜,等. 骨髓间充质干细胞联合超短波对大鼠脊髓损伤后早期AQP-4和GAP-43的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2016, 6:625—631.
- [16] 万峪岑,孙师,冯智萍,等. 小剂量超短波治疗对大鼠脊髓损伤后VEGF和BDNF的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2018, 8:891—895+909.
- [17] Zhang LX, Tong XJ, Sun XH, et al. Experimental study of low dose ultrashortwave promoting nerve regeneration after acellular nerve allografts repairing the sciatic nerve gap of rats[J]. Cell Mol Neurobiol, 2008, 28(4):501—9.
- [18] Pang CJ, Tong L, Ji LL, et al. Synergistic effects of ultrashort wave and bone marrow stromal cells on nerve regeneration with acellular nerve allografts[J]. Synapse, 2013, 67(10):637—47.
- [19] 王笑男,张志强,张立新. 硫酸软骨素酶ABC联合超短波治疗对脊髓损伤大鼠的功能恢复及胶质瘢痕形成的影响[J]. 中国康复, 2016, 31(6):426—429.