

• 基础实验研究论著 •

人脐血间充质干细胞促进颅脑损伤大鼠修复的研究

吕 品, 单桂秋, 张雅妮

(中国人民解放军广州军区广州总医院输血科, 广州 510010)

摘要: 目的 通过建立大鼠颅脑创伤模型, 探讨移植人脐血间充质干细胞(MSCs)治疗颅脑损伤的可行性。方法 参考 Feeney 法制作大鼠颅脑损伤模型。实验分移植组、假手术组和对照组。采用盲法在移植后第 1、4、12、21 天分别对各组实验大鼠进行神经功能评分(NSS)。荧光免疫组化观察移植 MSCs 21 d 后神经细胞的特异标志分子神经元核抗原(NeuN)的分布情况。结果 成功培养人脐血 MSCs。假手术组 NSS 评分在各时间点均与对照组差异有统计学意义($P < 0.01$), 证明颅脑损伤模型建立成功。实验组大鼠 NSS 评分在第 4、12、21 天均显著低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。荧光免疫组化结果显示, 移植 MSCs 21 d 后, 移植组的神经细胞明显多于对照组。结论 在成功建立大鼠颅脑损伤模型的基础上, 显示通过移植人脐血 MSCs, 对大鼠的颅脑损伤有明显的修复促进作用。

关键词: 颅脑损伤; 间质干细胞; 移植; 大鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.12.005

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2012)12-1420-02

Study on human umbilical cord blood MSCs for repair of traumatic brain injury in rats

Lv Pin, Shan Guiqiu, Zhang Yani

(Department of Blood Transfusion, General Hospital of Guangzhou Military

Command of PLA, Guangzhou, Guangdong 510010, China)

Abstract: Objective To explore the feasibility of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells(MSCs) for the treatment of traumatic brain injury in rat model. **Methods** Traumatic brain injury rat models were constructed according to Feeney method. All rats were divided into transplant group, sham-operated group and control group. Neurological score(NSS) was evaluated in rats of all groups by blind method at 1, 4, 12 and 21 days after transplantation, respectively. 3 weeks after transplantation of MSCs, the distribution of neuron nucleoantigen(NeuN), specific for nerve cell, was detected by fluorescence immunohistochemistry. **Results** Human umbilical cord blood MSCs were successfully cultured. NSS scores of sham-operated group, detected at different time points, were significantly different with those of control group($P < 0.01$), which could indicated that the rat model of traumatic brain injury was successfully constructed. NSS scores of transplant group, detected at 4, 12 and 21 days after transplantation, were significantly lower than those of control group($P < 0.05$). Results of fluorescence immunohistochemistry demonstrated that, 3 weeks after transplantation of MSCs, amount of nerve cells in transplant group was obviously higher than that in control group. **Conclusion** In vivo experiment in rat model of traumatic brain injury could indicated that transplantation of human cord blood MSCs might be with promoting effects for the repairing of brain injury in rats.

Key words: craniocerebral injury; mesenchymal stem cells; transplanting; rat

世界各地的交通伤和各种打击伤导致的颅脑外伤(TBI)发生率呈不断上升趋势, TBI 可导致较高的伤残或死亡率^[1-2]。颅脑外科手术对 TBI 可进行有效救治, 但由于神经细胞再生困难, 导致了神经损伤修复极其困难, 术后的后遗症和并发症很难得到改善^[3-4]。干细胞疗法对中枢神经系统损伤的治疗是新近发展起来的治疗策略, 因为人脐血间充质干细胞(MSCs)具有丰富的来源和多向转化能力, 具有很好的临床应用前景^[5]。本研究分离纯化了人脐血 MSCs, 通过建立的大鼠严重颅脑撞击伤模型, 探讨人脐血 MSCs 对颅脑损伤的修复效应。

1 材料与方法

1.1 材料 体质量 200~220 g 的雌性 Wistar 大鼠 40 只。

1.2 方法

1.2.1 脐血 MSCs 的分离纯化 选取本院健康足月剖宫产或足月顺产且 HBV 检测阴性的孕妇, 征得孕妇及家属的同意后, 无菌条件下取脐血 50~80 mL, 用 D-Hank's 液等比稀释, 再以 1.5:1 比例将稀释脐血叠加于人淋巴细胞分离液上, 1 500 r/min 离心 25 min。小心吸取界面单个核细胞层, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤, 调整细胞浓度至 1×10^6 /mL, 接种于 MEM/F12(含 20% 胎牛血清)培养基中, 置 5% CO₂, 37 °C 培

养箱中培养。待细胞达 80%~90% 融合, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 然后按 2:1 比例传代培养。

1.2.2 动物模型制作 参考 Feeney 法制作动物模型^[6]。将 40 只大鼠用 10% 水合氯醛(100 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 颅中线左旁切开头皮 5 mm, 剥离骨膜。用小直径钻在左顶部, 即大鼠左眼至左耳连线中内 1/3 处钻一骨窗。使用直径 3 mm 的撞杆置于硬膜上, 用 20 g 砝码于 30 cm 高处沿导管自由落体, 打击深度为 3 mm, 打击力量为 20 g × 30 cm, 致左顶叶中度脑挫裂伤, 硬膜外置明胶海绵止血。

1.2.3 MSCs 移植及动物分组 实验分 3 组: 移植组、假手术组和对照组, 每组 10 只大鼠。大鼠制作成颅脑损伤模型后, 将第 3 代脐血 MSCs 吹打成细胞悬液, 用微量加样器在创面分 4 点加入细胞悬液, 进针深度为 3 mm, 每点注射 2 μL, 细胞浓度为 1×10^7 /mL, 缝合头皮。对照组点注射等量的 MSCs 的培养液 DMEM/F12, 假手术组仅开骨窗后缝合头皮。

1.2.4 移植后行为学评分 采用盲法在移植后第 1、4、12、21 天分别对各组大鼠进行神经功能评分(NSS)。其中直杠平衡测试 6 分, 反射缺失或者异常活动 4 分, 感觉测试 2 分, 运动测试 6 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。

1.2.5 荧光免疫组化观察 移植 MSCs 21 d 后移植组和对照组各随机取 3 只大鼠, 处死后取损伤脑部组织进行固定, 行连续冰冻切片, 片厚 $4\text{ }\mu\text{m}$, 进行荧光双标免疫组化实验观察神经细胞的特异标志分子神经元核抗原(NeuN)的分布情况。具体方法: 正常羊血清封闭 30 min, 倾去血清, 滴加大鼠抗大鼠 NeuN 抗体, 4 ℃过夜, PBS 充分洗涤后滴加罗丹明标记的羊抗大鼠二抗, 37 ℃放置 1 h, 防淬灭剂封片, 荧光显微镜下拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 软件进行统计分析, 数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为非常显著差异。

2 结 果

2.1 人脐血 MSCs 的培养 成功培养人脐血 MSCs, 脐血单个核细胞悬液接种于培养基 24 h 后, 可见部分细胞贴壁生长, 有短小突起伸出, 2 d 后逐渐有集落形成, 细胞呈纺锤形。8 d 后达 80%~90% 融合, 进行传代。传代后细胞生长加快并且分布均一, 呈典型 MSCs 的漩涡或平行排列式生长。进行流式细胞仪检测第 3 代脐血 MSCs 的表面分子, 结果显示, MSCs 的标志分子 CD29、CD73、CD90 和 CD106 为阳性表达, 而造血干细胞标志分子 CD34 则为阴性。

2.2 颅脑损伤大鼠 NSS 评分 假手术组大鼠的评分在各时间点均与对照组差异有统计学意义($P<0.01$), 证明颅脑损伤模型建立成功。移植组大鼠的评分在第 4、12、21 天均显著低于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见表 1。

表 1 颅脑损伤大鼠 NSS 评分

组别	第 1 天	第 4 天	第 12 天	第 21 天
移植组	12.75 \pm 0.79	7.73 \pm 0.82*	3.97 \pm 0.70*	2.03 \pm 0.35*
对照组	13.15 \pm 1.29	9.48 \pm 1.08	5.14 \pm 0.83	3.25 \pm 0.64
假手术组	4.03 \pm 0.55 [#]	2.57 \pm 0.41 [#]	0.21 \pm 0.37 [#]	0.00 \pm 0.00 [#]

*: $P<0.05$; #: $P<0.01$, 与对照组比较。

2.3 荧光免疫组化观察结果 手术 21 d 后移植 MSCs 的大鼠大脑损伤部位的神经细胞明显多于未移植 MSCs 的对照组。

3 讨 论

由于神经细胞损伤后极难再生, 导致了颅脑损伤患者后期康复中受损脑组织的生理功能难以恢复。近年干细胞疗法为这一医学难题带来了希望。干细胞移植已成为近来医学领域乃至整个生命科学领域研究的前沿及热点^[7-9]。对于中枢神经系统损伤的细胞治疗首选应该是神经干细胞, 但目前还没有可靠的方法得到充足的神经干细胞应用于这一疗法。人脐血 MSCs 具有来源丰富, 培养、扩增简单的特点, 且 MSCs 具有向神经细胞分化的可塑性, 因此笔者设想用人脐血 MSCs 移植来达到恢复受损脑组织生理功能的目的。

对颅脑损伤救治的研究, 必须有合适的动物模型。本实验中的动物模型采用的研究模型, 在改进脊髓损伤模型的基础上, 以固定高度和质量的重物自由落体方法打击大鼠的颅脑损伤模型, 该方法操作简单, 可控性好, 可定量且基本符合临床创伤性脑损伤的病理学改变与病理生理特点^[10]。本研究通过对颅脑损伤大鼠进行 NSS 评分, 结果显示假手术组大鼠的评分在各时间点均与对照组有非常显著的差异($P<0.01$), 证明颅脑损伤模型建立成功。NSS 评分结果还显示, 移植组大鼠的

评分在第 4、12、21 天均显著低于对照组($P<0.05$), 提示通过移植人脐血 MSCs, 可以有效促进颅脑损伤大鼠的神经行为和功能的恢复。

采用不同的诱导剂, MSCs 在体外是可以被诱导向神经细胞分化的, 但诱导分化的机制也尚不清楚, 且很多研究还停留在对表面现象的研究中, 而分化的细胞是否具有神经细胞的功能, 还研究很少。在体内微环境的诱导下, 人脐血 MSCs 可向神经细胞分化而促进神经系统的损伤修复, 可能是移植的 MSCs 在损伤部位激活了各种信号传导通路, 促进一系列神经营养因子的释放, 进而促进了脑损伤的修复。本研究不仅通过 NSS 评分证实移植人脐血 MSCs 可以促进大鼠颅脑损伤的修复, 还通过荧光免疫组化实验, 观察到手术 21 d 后移植 MSCs 的大鼠大脑损伤部位的神经细胞明显多于未移植 MSCs 的对照组。本研究为直接于创面移植人脐血 MSCs, 为颅脑创伤的临床救治提供了极为重要的基础理论依据, 其具体的机制值得进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Pastore V, Colombo K, Liscio M, et al. Efficacy of cognitive behavioural therapy for children and adolescents with traumatic brain injury[J]. Disabil Rehabil, 2011, 33(8): 675-683.
- [2] Hoffman JM, Bell KR, Powell JM, et al. A randomized controlled trial of exercise to improve mood after traumatic brain injury[J]. PMR, 2010, 2(10): 911-919.
- [3] Nowinski D, Di Rocco F, Roujeau T, et al. Complex pediatric orbital fractures combined with traumatic brain injury: treatment and follow-up[J]. J Craniofac Surg, 2010, 21(4): 1054-1059.
- [4] Catale C, Germain S, Meulemans T, et al. Exploration of perceptual and motor inhibition in children with traumatic brain injury[J]. Percept Mot Skills, 2011, 112(3): 667-679.
- [5] Hilfiker A, Kasper C, Hass R, et al. Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation? [J]. Langenbecks Arch Surg, 2011, 396(4): 489-497.
- [6] 雷鹏, 彭龙锋, 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] Armand P, Kim HT, Rhodes J, et al. Iron overload in patients with acute leukemia or MDS undergoing myeloablative stem cell transplantation[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2011, 17(6): 852-860.
- [8] Novitzky N, Thomas V, Toit C, et al. Is there a role for autologous stem cell transplantation for patients with acute myelogenous leukemia? A retrospective analysis[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2011, 17(6): 875-884.
- [9] Ertem M, Ileri T, Azik F, et al. Related donor hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi anemia without radiation: a single center experience in Turkey[J]. Pediatr Transplant, 2009, 13(1): 88-95.
- [10] 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.

(收稿日期: 2012-01-05)