

基础研究

大鼠脊髓损伤后不同时期移植人脐带间充质干细胞的修复效果观察

王 颖,冯世庆,赵 鹏,焦新旭,魏志坚,韩明远

(天津医科大学总医院骨科 300052 天津市)

【摘要】目的:观察大鼠脊髓损伤后不同时期局部移植人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)修复脊髓损伤的效果,探讨 hUCMSCs 局部移植治疗脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的最佳移植时机。方法:雌性 Wistar 大鼠 80 只,随机均分为 A、B、C、D 组,以 Impactor Model-II 打击器制备脊髓胸 10(T10)损伤模型。A 组为单纯损伤组,B 组损伤后 3d 移植 hUCMSCs,C 组损伤后 1w 移植 hUCMSCs,D 组损伤后 3w 移植 hUCMSCs,分别于造模后 24h、移植前 1d 及移植后 8w(A 组与 D 组损伤后相应时间点相同)每周对大鼠后肢功能进行行为学评分(BBB 评分);移植后 8 周免疫组化染色观察移植细胞的存活、分化和血管再生情况,10 周时用生物素葡聚糖胺(biotin dextran amine, BDA)示踪皮质脊髓束(corticospinal tract, CST)观察轴突的再生情况。结果:SCI 后 24h 各组大鼠 BBB 评分无显著性差异($P>0.05$),D 组在移植前和移植后 1 周与 A 组相应时间点的 BBB 评分无显著性差异($P>0.05$),移植后 2w 起各时间点评分均明显高于 A 组相应时间点,差异有统计学意义($P<0.05$);A 组在 SCI 后 9w 时到达平台期,与实验结束时相比差异无统计学意义($P>0.05$)。移植各组移植后 BBB 评分逐渐上升,后一个时间点与同组前一时间点比较差异有显著性意义($P<0.05$),移植后 6w 开始 C 组明显高于 B、D 组($P<0.05$)。免疫组化染色 A 组脊髓中未见 Brdu 阳性细胞,损伤区血管形态欠完整,未见新生血管;损伤周围星形胶质细胞大量增生,细胞肥大、突起增多、排列不规则,形成胶质瘢痕;未见 BDA 标记的皮质脊髓束通过损伤区。B、C、D 组脊髓中均有 Brdu 阳性标记的细胞存活,C、D 组中细胞数量明显多于 B 组,但三组中均未见到移植细胞向神经元或神经胶质样细胞分化;B、D 组损伤周围的星形胶质细胞较 A 组减少,但排列仍欠规则;C 组损伤周围星形胶质细胞形态趋于正常,排列规则,且有大量星形胶质细胞通过损伤区,血管再生数目及通过损伤区的皮质脊髓束神经纤维也明显多于 B、D 组。结论:大鼠 SCI 后局部移植的 hUCMSCs 能长期存活,抑制胶质瘢痕形成,改善后肢运动功能;SCI 后 1w 移植的效果优于 SCI 后 3d 和 3w 时移植的效果。

【关键词】脊髓损伤;脐带间充质干细胞;细胞移植;大鼠

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2010.11.09

中图分类号:R683.2, Q813 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2010)-11-0918-08

Repairing effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation at different time points after spinal cord injury in adult rats/WANG Ying, FENG Shiqing, ZHAO Peng, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(11): 918-925

【Abstract】Objective: To observe the therapeutic effect of the human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) transplantation at different time points after spinal cord injury in Wistar rats, and to explore the optimal time point of hUCMSCs transplantation for repairing spinal cord injury. Method: Eighty female Wistar rats were randomly divided into control group (group A), hUCMSCs transplantation 3d after injury (group B), hUCMSCs transplantation 1w after injury (group C) and hUCMSCs transplantation 3w after injury (group D). The SCI animal model were induced by Impactor Model-II at T10. Behavioral testing was performed 24 hours after injury, 1 day pre-transplantation and post-transplantation weekly for 2 months according to Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) open-field locomotor Rating Scale. Spinal cord tissues were subjected to immunohisto-

基金项目:国家自然科学基金(30872603)、天津市卫生局科技重点基金(07KG2)、天津市卫生局科研基金(09KZ104)

第一作者简介:男(1985-),硕士研究生,研究方向:脊柱脊髓损伤

电话:(022)60363936 E-mail:weky1985@yahoo.com.cn

通讯作者:冯世庆 E-mail:fengsq@hotmail.com

chemical staining to detect the vascular regeneration and survival, and differentiation and migration of hUCMSCs. **Result:** BBB scores were no significant difference among all four groups 24 hours after SCI ($P > 0.05$). Before transplantation and 1 week after transplantation, there was also no significant difference between group D and group A, but group D had significantly higher score than group A at each time points from 2 weeks after transplantation ($P < 0.05$). The score of group A reached to a plateau at 9 weeks after SCI, which showed no statistical significance ($P > 0.05$) compared with that at the end of experiment. BBB scores of group B, C and D increased gradually after transplantation, with significance noted between the consecutive time points in any group ($P < 0.05$), and the score of group C was significantly higher than that of group B and D 6 weeks after transplantation ($P < 0.05$). Immunohistochemistry results showed absence of Brdu positive cell, abnormality of vascular shape, absence of newborn vascular in group A; proliferation of glial cells with the characteristics of hypertrophy, disorder and scar formation around lesion site was evidenced. No BDA marked corticospinal tract was seen across the lesion site. Brdu positive cells were noted in group B, C and D, with the number of cells in group C and D more than that of group B. However, no differentiation to glial cell was evidenced in 3 groups. Group B and D had less and more disordered glial cells around lesion site than group A; the glial cells around lesion site in group C was ordered and normal, with more regenerated vascular crossing corticospinal tract than that of group B and D. **Conclusion:** hUCMSCs transplantation after SCI can survive at least 2 months, which can inhibit glial scars formation, improve microcirculation of lesion site, and finally promote axonal regeneration as well as improving functional recovery. One week after SCI was the optimal time point.

【Key words】 Umbilical cord mesenchymal stem cells; Spinal cord injury; Cell transplantation; Rat

【Author's address】 Department of Orthopaedics, General Hospital, Affiliated to the Tianjin Medical University, Tianjin, 300052, China

研究表明人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs) 能在特定条件下转化为神经元样细胞, 并且能像神经干细胞一样在中枢神经组织(脑、脊髓)里迁移、整合, 参与神经损伤修复, 在脊髓损伤(SCI)修复和细胞治疗等方面具有明显优势^[1-5]。但 SCI 后损伤局部会发生一系列的改变, 如局部出血、水肿, 大量神经元丢失, 轴突崩解, 多种轴突再生抑制因子产生, 胶质瘢痕形成等, 以及微循环改变导致的损伤区缺血、缺氧, 钙离子超载, 氧自由基损伤, 一氧化氮的神经毒性作用等, 不仅会加重脊髓自身的继发性损伤^[6], 对外源植入的干细胞同样具有损伤作用, 进而影响细胞移植治疗脊髓损伤的效果。由此可见把握细胞移植的时机至关重要。本研究在大鼠脊髓损伤后不同时期局部移植 hUCMSCs, 观察移植的细胞在大鼠脊髓内的存活、分化、迁移情况及对神经功能恢复的影响, 探讨细胞移植的有利时机。

1 材料和方法

1.1 实验动物和器械

健康成年雌性 Wistar 大鼠 80 只, 8 周龄, 体重 200 ± 20 g (协和医科大学放射医学研究所实验

中心提供); hUCMSCs (天津协和干细胞基因工程有限公司提供); Impactor Model II 打击器和超净工作台 (天津医药设备厂); CO₂ 培养箱 (NAPCO 5410, USA); 荧光倒置显微镜 (OLYMPUS BX-60, Japan); 恒温冰冻切片机和石蜡切片机 (LEICER, USA); 10 μ l 汉密尔顿 (Hamilton) 微量注射器 (上海精密仪器厂); 生物素标记的葡聚糖胺 (biotin dextran amine, BDA, Vector, USA); Brdu (invitrogen, USA); 小鼠抗 Brdu 抗体 (Millipore, USA), 兔抗人胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 多克隆抗体、兔抗人神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 多克隆抗体、小鼠抗大鼠血管性血友病因子 (vWF) 多克隆抗体 (武汉博士德生物工程有限公司); 山羊抗小鼠异硫氰酸荧光素 (FITC) 荧光二抗、山羊抗兔四甲基罗丹明异硫氰酸 (TRITC) 荧光二抗 (北京中衫金桥生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 80 只大鼠随机分为 4 组, 每组 20 只, A 组为单纯损伤组; B 组损伤后 3d 移植 hUCMSCs; C 组损伤后 1w 移植 hUCMSCs; D 组损伤后 3w 移植 hUCMSCs。

1.2.2 移植物的标记 hUCMSCs 在体外培养至约 50% 融合时, 吸去培养基, 加入 Brdu (终浓度为

10 μ g/ml), 继续培养 72h。移植前 30min 用 0.25% 胰蛋白酶消化、离心, 充分洗涤后, 用培养基将细胞稀释成浓度为 1×10^5 个/ μ l 的悬液, 4 $^{\circ}$ C 下储存备用。

1.2.3 SCI 动物模型的制备 用 10% 水合氯醛腹腔麻醉 (0.33ml/100g) 大鼠, 取俯卧位, 常规去皮、消毒, 以 T10 为中心纵行切开背部皮肤及皮下组织, 剥离两侧椎旁肌, 暴露并咬除 T10 棘突及椎板, 显露硬膜。应用 Impactor Model II 脊髓打击器, 从 25mm 高度、10g 重量自由落体打击, 大鼠立即出现一过性鼠尾摆动和后肢痉挛视为造模成功。逐层缝合肌肉、筋膜和皮肤。术后每日排尿 2 次, 直至建立正常的排尿反射; 从移植前 3d 开始直至实验结束, 每天皮下注射环孢素 A (10mg/kg, 杭州中美华东制药有限公司)。

1.2.4 hUCMSCs 植入 造模成功后, 分别将制备好的 hUCMSCs 悬液按实验分组分别在损伤后 3d、1w 和 3w 时按以下步骤进行细胞移植手术: 手术入路同动物模型制作, 显露硬膜, 用 Hamilton 单细胞注射器将 hUCMSCs 缓慢多点注射到脊髓损伤的头尾侧两个区域, 每个区域注射 5 μ l, 细胞总数共计 1×10^6 个, 注射后留针 3min, 然后缓慢退出, 术毕逐层缝合, 复苏清醒后专人喂养。

1.3 疗效评定

1.3.1 BBB 评分 由 2 位不知情者分别对实验动物按照 BBB 评分标准对大鼠后肢功能进行评定, 包括关节运动、行走能力、协调性和肢体稳定性。移植组分别于脊髓损伤后 24h、细胞移植前 1d 及移植后 8 周每周进行评分, 对照组评分时间点与 D 组一致。

1.3.2 组织学检查 移植后 8 周 BBB 评分后每组留 2 只动物, 其余大鼠再次麻醉, 用生理盐水和 4% 中性多聚甲醛磷酸盐缓冲液 (PBS) 行心脏灌注。原入路显露 T10 脊髓, 取出 T4~L1 段脊髓, 标

记损伤中心及头尾端, 一半标本连续 5 μ m 石蜡纵切片, HE 染色观察损伤区情况; 一半标本连续 5 μ m 石蜡横切片, 每组每个标本取 5 张切片进行免疫组化染色。首先用小鼠抗 Brdu 单克隆抗体和兔抗人 GFAP 或 NSE 多克隆抗体处理, 经上述处理后先加 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗, 然后加 TRITC 标记山羊抗兔 IgG 二抗, 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 复染细胞核, 并设立 PBS 替代的阴性对照, 用荧光倒置显微镜观察移植细胞分化情况。用小鼠抗大鼠 vWF 和 GFAP 多克隆抗体分别处理切片后分别加入 FITC 和 TRITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗, 荧光显微镜下观察损伤区血管再生和星形胶质细胞增生情况。

1.3.4 BDA 顺行神经示踪检查 移植后 8 周, 每组取 2 只大鼠, 向大脑两侧的感觉运动区皮质内注射质量浓度为 10% 的 BDA。2 周后再次麻醉动物, 尽快暴露并取出 T4~L1 节段脊髓, 标记损伤中心及头尾、腹背侧, 于 -20 $^{\circ}$ C 下 OCT 包埋后做 40 μ m 厚横断面及冠状面冰冻切片, 荧光倒置显微镜下直接观察 BDA 显色情况。

1.4 统计学分析

数据处理采用 SPSS 13.0 软件, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, BBB 评分采用 *t* 检验和方差分析 (ANOVA), SNK-*q* 进行组间的两两比较, $P < 0.05$ 即为有统计学意义。

2 结果

选取的实验动物健康, 行动敏捷, 造模前双后肢 BBB 评分均为 21 分。B 组和 C 组各有 1 只造模失败被排除, D 组 2 只术后 3d 死于肠梗阻, 其余动物均存活至实验结束。hUCMSCs 在体外 95% 以上可被 Brdu 标记, 在荧光显微镜下胞核发出绿色荧光, 经 DAPI 复染后胞核呈蓝色 (图 1)。

各组大鼠不同时间点的 BBB 评分见表 1。造

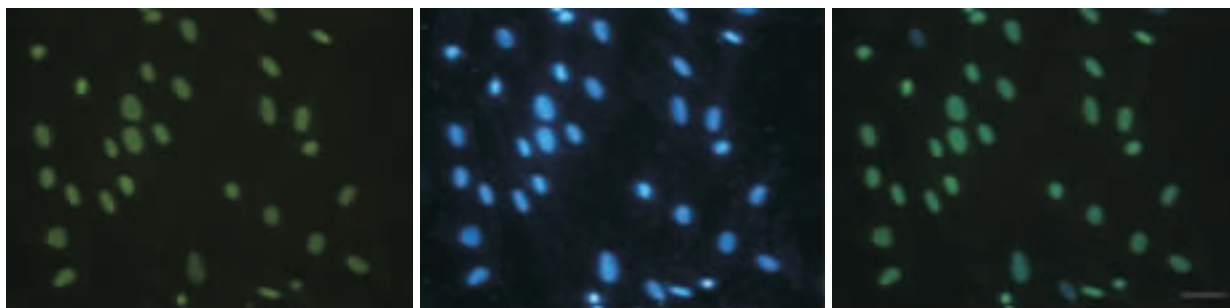


图 1 hUCMSCs 体外 Brdu 标记情况, 细胞核发出绿色荧光, 经 DAPI 复染后胞核呈蓝色, 标记率达 95% ($\times 200$)

模术后所有动物均呈现双后肢瘫痪, 24h 时各组大鼠后肢功能 BBB 评分无明显差异 ($P>0.05$)。D 组在移植前 1d 和移植后 1 周与 A 组相应时间点的 BBB 评分无显著性差异 ($P>0.05$), 移植后 2w 起各时间点评分均明显高于 A 组相应时间点, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); A 组在 SCI 后 9w 时到达平台期, 与实验结束时相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。移植各组移植后 BBB 评分逐渐上升, 后一个时间点与同组前一时间点比较差异有显著性意义 ($P<0.05$), 移植后 6w 开始 C 组明显高于 B、D 组 ($P<0.05$)。

移植后 8 周, A 组肉眼可见损伤区域脊髓明显变细, 表面未见新生血管形成; HE 染色光镜下见损伤区有较大空洞, 交界区有大量炎性细胞及胶质细胞浸润和结缔组织增生, 仅有少许神经纤维存在, 且多呈卷曲状, 走向不一。B、C、D 组肉眼可见损伤区均有不同程度的恢复, 表面有新生血

管形成; HE 染色光镜下见损伤区空洞较 A 组均有所减小, 炎性细胞及胶质细胞数量也明显减少, 再生神经纤维增多, 以 C 组改善最为显著, 不仅神经纤维明显增多, 且走行方向多与脊髓神经纤维方向一致, 较好地填充了损伤处的空洞 (图 2)。

A 组中未见 Brdu 阳性标记的细胞, 细胞移植组均可见到呈绿色荧光的移植细胞, 且多在注射部位聚集, 少量向损伤区迁移, C、D 组存活细胞数明显多于 B 组 (图 3)。A 组损伤区周围 GFAP 阳性标记的星形胶质细胞大量增生、肥大、突起增多, 且排列不规则, 形成明显的胶质瘢痕, 损伤中心也未见星形胶质细胞长入; B、C、D 组脊髓损伤区周围星形胶质细胞增生明显减少, C 组损伤周围的星形胶质细胞形态良好, 排列规则, 且有较多长入损伤中心, 较好地填充了损伤区的空洞 (图 4)。血管内皮细胞特异性染色在 A 组损伤区未发现新生小血管, 残存的血管形态也欠规整; 移植组

表 1 术后不同时间各组 BBB 评分比较

($\bar{x} \pm s$, 分)

	<i>n</i>	术后 1d	移植前 1d	移植后							
				1周	2周	3周	4周	5周	6周	7周	8周
A组	20	0.13±0.25	3.16±0.71 ^①	5.02±0.44 ^①	6.21±0.53 ^①	7.10±0.72 ^①	7.73±0.67 ^①	8.09±0.49 ^①	9.43±0.47 ^①	9.50±0.70 ^{①②}	9.63±0.64 ^{①②}
B组	19	0.06±0.18	0.68±0.48 ^①	1.47±0.59 ^①	3.54±0.63 ^①	6.64±0.83 ^①	8.89±0.53 ^①	9.44±0.60 ^①	10.56±0.46 ^①	10.52±0.90 ^①	11.78±0.61 ^①
C组	19	0.19±0.35	1.56±0.51 ^①	3.26±0.70 ^①	5.26±0.74 ^①	7.54±0.96 ^①	10.52±0.76 ^①	11.50±0.70 ^①	12.31±0.60 ^{①③}	13.95±0.85 ^{①③}	14.47±0.95 ^{①③}
D组	18	0.15±0.44	3.22±0.51 ^①	5.10±0.71 ^①	7.39±0.99 ^{①④}	8.42±0.79 ^{①④}	9.17±0.97 ^{①④}	9.39±0.70 ^{①④}	10.88±0.76 ^{①④}	11.00±0.85 ^{①④}	11.51±0.58 ^{①④}

注: 与同组前一时间点比较^① $P<0.05$, ^② $P<0.05$; ^③与 B、D 组同时时间点比较 $P<0.05$; ^④与 A 组相应时间点比较 $P<0.05$

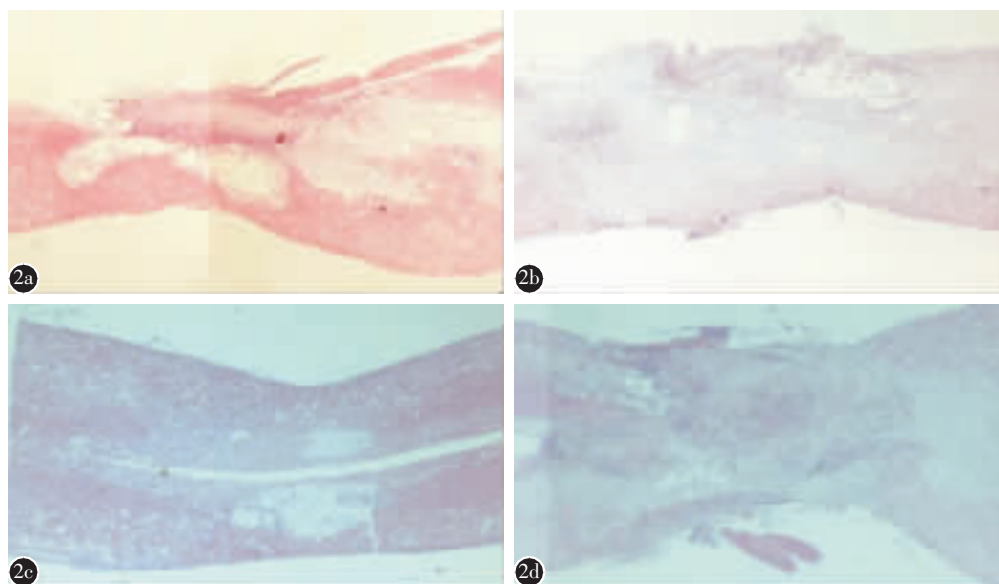


图 2 移植后 8 周各组大鼠损伤区域脊髓组织 HE 染色情况, 损伤组 (A 组) 脊髓空洞面积大, 神经纤维稀疏, 大量炎性细胞和星型胶质细胞聚集 (a), 损伤后 3d 细胞移植组 (B 组) (b)、损伤后 1w 细胞移植组 (C 组) (c) 和损伤后 3w 细胞移植组 (D 组) (d) 脊髓空洞均有不同程度的缩小, 其中 C 组损伤脊髓周围炎症细胞和胶质细胞明显减少, 且有更多的神经纤维通过损伤区 ($\times 16$)

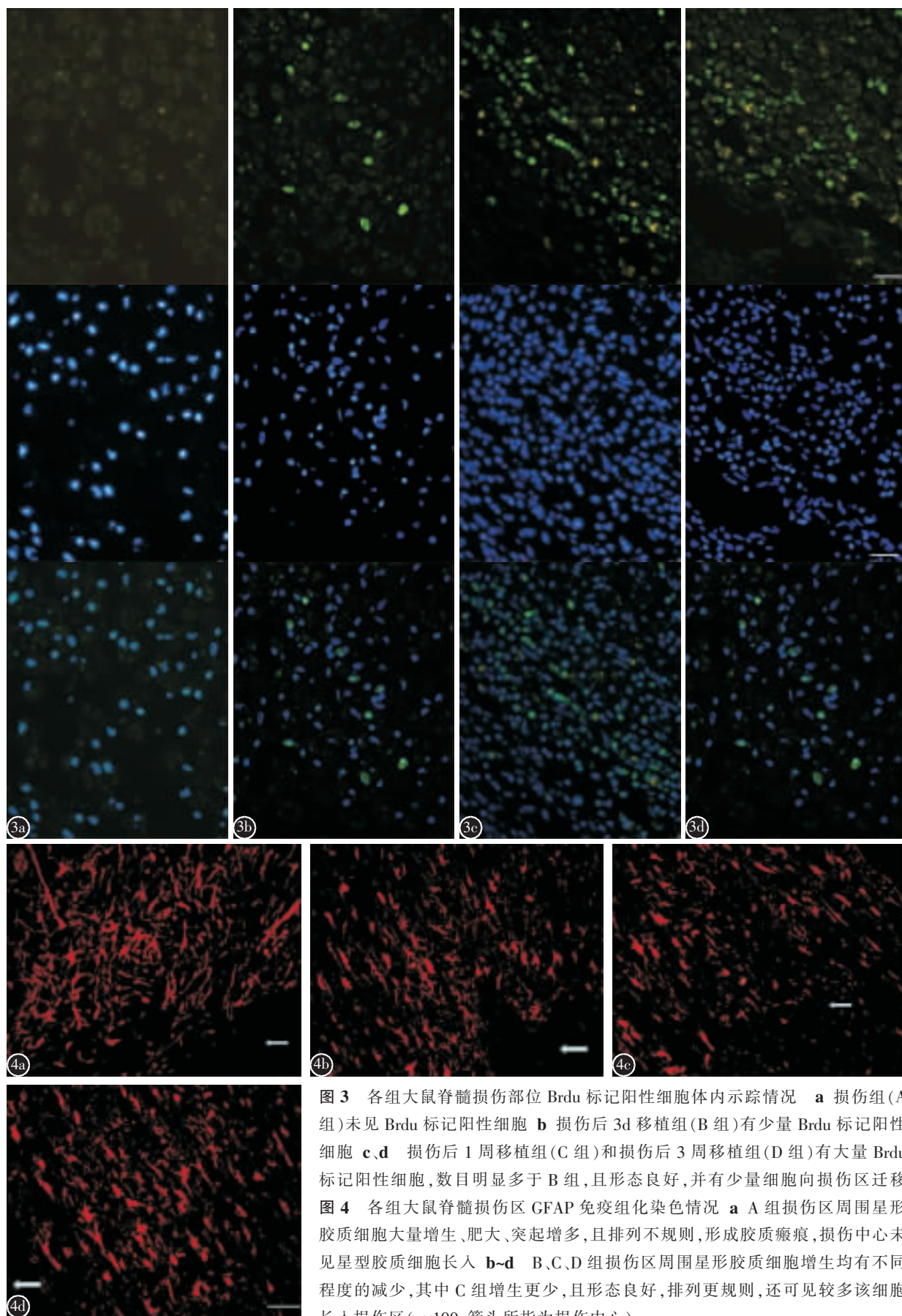


图 3 各组大鼠脊髓损伤部位 Brdu 标记阳性细胞体内示踪情况 **a** 损伤组(A 组)未见 Brdu 标记阳性细胞 **b** 损伤后 3d 移植组(B 组)有少量 Brdu 标记阳性细胞 **c、d** 损伤后 1 周移植组(C 组)和损伤后 3 周移植组(D 组)有大量 Brdu 标记阳性细胞,数目明显多于 B 组,且形态良好,并有少量细胞向损伤区迁移
图 4 各组大鼠脊髓损伤区 GFAP 免疫组化染色情况 **a** A 组损伤区周围星形胶质细胞大量增生、肥大、突起增多,且排列不规则,形成胶质瘢痕,损伤中心未见星型胶质细胞长入 **b~d** B、C、D 组损伤区周围星形胶质细胞增生均有不同程度的减少,其中 C 组增生更少,且形态良好,排列更规则,还可见较多该细胞长入损伤区(×100,箭头所指为损伤中心)。

均可见新生小血管,其中 C 组损伤区血管形态规整,可见更多的新生小血管(图 5)。经免疫双重荧光染色法检测,各实验组中均未观察到移植的 Brdu 阳性标记细胞向神经元样(NSE 阳性)或神经胶质样细胞(GFAP 阳性)分化。

细胞移植后 10 周,荧光显微镜下观察 A 组未见 BDA 标记的皮质脊髓束(corticospinal tract, CST)神经纤维通过损伤部位,各移植组均可见到皮质脊髓束中呈绿色荧光的再生神经纤维穿过损伤部位到达损伤区以远,其中 C 组通过损伤区到达损伤以远的神经纤维较 B、D 组明显更多,且能

一直延伸至 L1 水平(图 6)。

3 讨论

2003 年 Romanov 首次利用脐静脉灌注和密度梯度离心法获得了 MSCs, 并进行了鉴定和多向分化的研究^[7]。Mitchell 等^[8]对 UCMSCs 进行体外诱导后发现其形态向神经细胞方向转化, 并表达神经标记物, 如神经元特异性烯醇化酶(NSE)、酪氨酸羟化酶 (TH)、生长相关蛋白 43(GAP43) 等, 表明其可分化为成熟的神经细胞。hUCMSCs 以其来源广泛、易于获取、免疫源性低、不存在伦

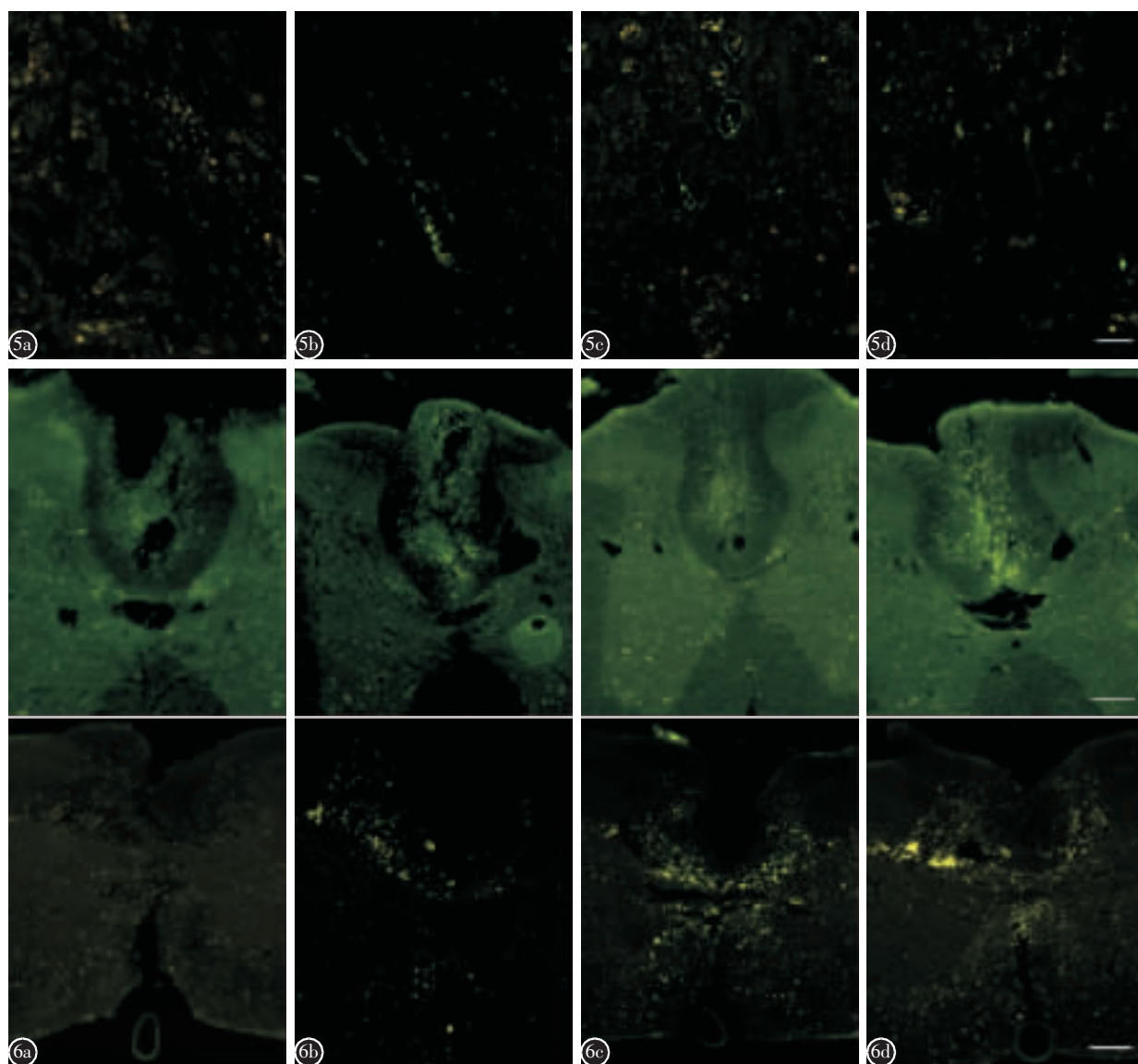


图 5 各组损伤区 vWF 免疫组化染色情况 a A 组未见新生血管 b~d B、C、D 组均可见新生的小血管,以 C 组中数目为最多($\times 100$) 图 6 各组损伤区头尾两端 BDA 顺行示踪 a A 组几乎未见再生的神经纤维通过损伤区 b~d B、C、D 组均可见 BDA 标记阳性的皮质脊髓束通过损伤区,与 B、D 组相比,C 组可见更多标记阳性的神经纤维通过损伤区到达远端($\times 100$)

理问题和具有多向分化潜能而备受关注。Yang 等^[9]将 hUCMSCs 移植入大鼠全横断脊髓,发现移植的细胞可以长期存活,并改善实验动物的后肢功能。朱玉海等^[10]将未处理的 UCMSCs 移植至大鼠中度挫伤的 SCI 部位后,同样发现移植的细胞能在损伤局部长期存活,并促进轴突再生。但以上实验均未提出明确的移植时间。陈少强等^[11]认为 SCI 后 3d 是静脉移植 MSCs 治疗大鼠 SCI 的最佳移植时间窗。我们的前期实验证实损伤局部移植 hUCMSCs 治疗 SCI 效果优于静脉移植^[12]。本研究在大鼠 SCI 后的不同时期进行 hUCMSCs 局部移植,观察细胞存活、分化情况及神经再生情况,旨在探讨 SCI 后局部移植 hUCMSCs 的最佳时机。

王红星等^[13]认为不完全性 SCI 大鼠后肢运动功能存在一个自然恢复的过程,但在损伤后 2w 时就达到了平台期。说明大鼠脊髓损伤后自然恢复的能力有限。本研究结果发现,SCI 后对照组大鼠后肢功能 BBB 评分逐渐增加,直至损伤后 9 周。说明大鼠 SCI 后有一个自然恢复的过程。移植后 2w 时起 D 组 BBB 评分明显高于 A 组相应时间点,差异有统计学意义($P < 0.01$)。说明植入的细胞在 2w 时已发挥出了神经修复的作用,神经功能明显优于自然恢复的过程。移植后 4w 时起 B、C、D 组三组间有统计学差异,C 组明显高于 B、D 组($P < 0.01$)。说明 hUCMSCs 移植能更好地改善 SCI 后大鼠神经功能,且 1w 时移植的效果优于 3d 和 3w 时移植的效果。

免疫组化染色结果显示对照组中未见 Brdu 阳性标记的细胞,而各实验组移植后 8 周脊髓内均可见呈绿色荧光的移植细胞,其中 C、D 组中细胞数量明显高于 B 组,且细胞多聚集于损伤组织周围。有人认为这种趋化性可能与损伤组织炎症反应释放的趋化因子吸引植入细胞有关^[14],但 SCI 后急性期过度的免疫炎症反应会对移植的 hUCMSCs 产生毒性作用,从而不利于移植细胞的存活,这也可以较好地说明为何 B 组存活细胞较少。王革生等^[15]的研究也发现局部移植的 hUCMSCs 可长期存活,并向神经元样和星形胶质细胞分化。但本研究并未发现移植的细胞向神经细胞方向分化,与 Yaung 等^[9]的研究结果相似。植入后存活的 hUCMSCs 可能通过以下途径修复损伤脊髓:充填神经组织的缺失,分泌具有保护作用的营养因子,提供神经通路重建的原料和营养,增

加突触联系等^[16]。

SCI 后早期和延迟的血管反应,包括实质内的出血、炎症、血脊髓屏障的破坏和血管生成,这些和血管相关的变化不仅影响了继发组织伤害的演化,而且决定了长期损伤的脊髓中促进神经可塑性的环境。Yaung 等^[9]认为局部移植 hUCMSCs 能上调多种细胞因子如神经营养因子 3(NT-3),血管内皮生长因子受体 3(VEGF R3)和碱性成纤维生长因子(bFGF)等的表达,而这些细胞因子在血管再生中具有重要作用。本实验通过 vWF 特异性标记血管内皮发现细胞移植后 8 周实验组中脊髓损伤处均有新生的血管形成,尤其 C、D 组中不仅有更多的新生血管,且残存大血管形态也较 B 组完整,而对照组中则未见新生的血管,残存血管形态也欠完整,或许与存活的 hUCMSCs 的数量及其分泌上述因子有关。这些新生的血管有效改善了损伤局部的微循环,不仅有利于移植细胞的存活,还能通过增加有效的营养运输促进轴突再生,进而促进神经功能的恢复。

免疫组化结果显示 C、D 组脊髓损伤处存活细胞和新生血管虽都明显增多,但 D 组损伤周围星形胶质细胞增生较 C 组多,且细胞肥大、突起增多并相互交联,形成瘢痕样组织,而 C 组中的胶质细胞不仅数量更少,且排列规则,形态趋于正常,并有大量的星形胶质细胞长入损伤区。在正常情况下,星形胶质细胞是中枢神经系统的主要胶质细胞,对神经细胞起保护、支持及参与代谢的作用^[17]。脊髓损伤后,星形胶质细胞出现明显的功能活跃及胶质化。有文献^[18]指出星形胶质细胞功能的持续活跃在损伤后期表现为胶质细胞过度增生,形成胶质瘢痕,对神经纤维生长及神经再通起着机械性和化学性的阻碍作用。陈少强等^[11]认为 SCI 后 7d 脊髓的免疫炎症反应就会恢复到正常水平,但损伤区已经有胶质细胞增生的出现。本研究中 D 组的细胞移植是在 SCI 后 3w,此时星形胶质细胞已过度活跃增生,考虑胶质瘢痕已经形成,移植的 hUCMSCs 对其抑制作用已经不大。我们用 BDA 顺行示踪皮质脊髓束,进一步观察发现各移植组虽均有再生的神经纤维通过脊髓损伤区,但 B、D 组中再生的神经纤维多被阻止于损伤区近端,而 C 组则有较多的神经纤维通过损伤区到达其远端,且最远可延伸至 L1 水平,提示 SCI 后星形胶质细胞的过度增生可阻止再生轴突通过损

伤区,不利于神经功能的恢复。

综上所述,大鼠 SCI 后运动功能的自然恢复具有自限性,SCI 后局部移植 hUCMSCs 能更好地改善大鼠的后肢运动功能。移植的细胞不仅能长期存活,还能促进损伤区血管再生,改善微循环,显著减少损伤局部星形胶质细胞的过度增生,抑制胶质瘢痕的形成,进而促进轴突再生。SCI 后 1w 局部移植 hUCMSCs 的效果优于 SCI 后 3d 和 3w 移植的效果。

4 参考文献

1. Wright KT, Masri WE, Osman A, et al. The cell culture expansion of bone marrow stromal cells from humans with spinal cord injury: implications for future cell transplantation therapy [J]. Spinal Cord, 2008, 46(12): 811-817.
2. Cao FJ, Feng SQ. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and the treatment of spinal cord injury [J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(2): 225-231.
3. Cho JS, Park HW, Park SK, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells enhances axonal outgrowth and cell survival in an organotypic spinal cord slice culture [J]. Neurosci Lett, 2009, 454(1): 43-48.
4. Rooney GE, Moran C, McMahon SS, et al. Gene-modified mesenchymal stem cells express functionally active nerve growth factor on an engineered poly lactic glycolic acid (PLGA) substrate [J]. Tissue Eng Part A, 2008, 14(5): 681-690.
5. Alexanian AR, Maiman DJ, Kurpad SN, et al. In vitro and in vivo characterization of neurally modified mesenchymal stem cells induced by epigenetic modifiers and neural stem cell environment [J]. Stem Cells Dev, 2008, 17(6): 1123-1130.
6. Anderberg L, Aldskogius H, Hohz A. Spinal cord injury—scientific challenges for the unknown future [J]. Ups J Med Sci, 2007, 112(3): 259-288.
7. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smimov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord [J]. Stem Cells, 2003, 21(1): 105-110.
8. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia [J]. Stem Cells, 2003, 21(1): 50-60.
9. Yang CC, Shih YH, Ko MH, et al. Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord [J]. PLoS ONE, 2008, 3(10): e3336.
10. 朱玉海, 冯世庆, 王雪. 大鼠脐带华通胶来源 MSCs 修复脊髓损伤的实验研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2009, 23(12): 1491-1496.
11. 陈少强, 林建华. 不同移植时间窗对静脉移植骨髓间充质干细胞在大鼠损伤脊髓内存活和迁移的影响 [J]. 解剖学杂志, 2009, 32(2): 190-194.
12. 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]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(19): 3483-3489.
13. 王红星, 徐冬晨, 姚莉. 脊髓损伤大鼠运动及神经功能自然恢复规律的探讨 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2008, 30(7): 433-436.
14. Levenberg S, Burdick JA, Kraehenbuehl T, et al. Neurotrophin-induced differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymeric scaffolds [J]. Tissue Eng, 2005, 11(3-4): 506-512.
15. 王革生, 张庆俊, 韩忠朝. 人脐血间充质干细胞移植对大鼠脊髓损伤神经功能恢复的评价 [J]. 中华神经外科杂志, 2006, 22(1): 18-21.
16. Fan CG, Zhang QJ, Tang FW, et al. Human umbilical cord blood cells express neurotrophic factors [J]. Neuroscience Letters, 2005, 380(3): 322-325.
17. Li Y, Oskouian RI, Day YJ, et al. Optimization of a mouse locomotor rating system to evaluate compression-induced spinal cord injury: correlation of locomotor and morphological injury indices [J]. J Neurosurg Spine, 2006, 4(2): 165-173.
18. Baldwin SA, Broderick R, Blades DA, et al. Alterations in temporal/spatial distribution of GFAP and vimentin-positive astrocyte after spinal cord contusion with the new york university spinal cord injury device [J]. J Neurotrauma, 1998, 15(12): 1015-1026.

(收稿日期: 2010-06-07 修回日期: 2010-08-03)

(英文编审 蒋欣/刘思麒)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

欢迎访问《中国脊柱脊髓杂志》网站

《中国脊柱脊髓杂志》网站(www.cspine.org.cn)已建成,其中网络采编系统已开始应用,投稿、审稿及编辑部工作流程均在此采编系统上进行。作者可通过此系统投稿,并可实时查询稿件处理情况。登录网站可浏览本刊出版的最新一期杂志目录并查询过刊所有文章的摘要及部分全文。由于本网站才建成试运行,且仍在不断更新改进中,使用中可能会出现一些不如意的地方,请各位读者、作者、审者对出现的问题及时告知编辑部(电话:010-64284923, E-mail: cspine@263.net.cn),以便于及时修改解决,更好地为大家服务!