

[文章编号] 1000- 4718(2005)06- 1056- 05

成人骨髓间质干细胞在脑梗塞模型鼠的迁移和分化*

姚晓黎¹, 张成^{1△}, 卢锡林¹, 冯善伟¹, 邓宇斌², 刘祖国³

(中山大学¹附属第一医院神经科, ²病理生理教研室, ³眼科中心, 广东广州 510080)

[摘要] 目的: 探讨成人骨髓间质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSC)在脑梗塞模型鼠脑内的迁移和分化, 是否影响模型大鼠的运动功能。方法: 体外扩增培养 hMSC, 建立左大脑中动脉梗塞模型(MACO)大鼠, 将标记 Hoeschst33342 的 hMSC, 经参芪液诱导 30 min 后注入模型鼠脑内, 观察 hMSC 在大鼠脑内的存活、迁移、分化, 以及能否改善模型鼠运动功能。结果: 第 5 代呈集落生长的 hMSC, 均一性好。hMSC 可在脑内存活 6 周以上; 随着时间的延长, hMSC 在脑内迁移的范围越来越大; 间接免疫荧光表明 hMSC 在大鼠脑内表达人神经元特异性烯醇化酶(NSE)、神经丝蛋白(NF)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP); 模型鼠的肢体运动功能有明显改善。结论: hMSC 可在大鼠脑内分化为神经细胞, 有望成为治疗脑梗塞的理想种子细胞。

[关键词] 骨髓间质干细胞; 脑梗塞; 细胞分化; 细胞运动; 参芪液

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Migration and differentiation of the human bone marrow mesenchymal stem cells in the cerebral infarct animal model

RAO Xiao-li¹, ZHANG Cheng¹, LU Xi-lin¹, FENG Shan-wei¹, DENG Yu-bin², LIU Zu-guo³

(¹Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, ²Department of Pathophysiology, ³Center of Ophthalmology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the survival, migration and differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells (hMSC) in the middle cerebral artery occlusion (MACO) model and to observe the influence on motor function in the animal model. **METHODS:** hMSC with Hoeschst 33342 were injected into the animal model of MACO after Shenqiye induced for half an hour and their survival, migration, differentiation and the behavior changes in MACO rats were examined. **RESULTS:** hMSC had good homogeneousness and immunological reaction after implantation. The results showed that hMSC survived in rat brain for a long time over six weeks. As time going, hMSC were found in much more areas in the rat brain. Immunofluorescence staining suggested that implanted hMSC expressed human neuron specific enolase, neurofilament, and glial fibrillary acid protein. At the same time, improvements in abnormal behavior of MACO rats were observed. **CONCLUSION:** hMSC differentiate into neurons in the brain of rats, which means that hMSC is an ideal seed cells for the therapy of cerebral infarction.

[KEY WORDS] Bone marrow mesenchymal stem cells; Cerebral infarction; Cell differentiation; Cell movement; Shenqiye

随着干细胞工程的兴起, 干细胞被认为是新的有效用于移植治疗的手段, 其中骨髓间质干细胞具有其独特的优点而备受关注。虽然骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是中胚层来源的细胞, 但是它具有很强的更新能力和多向分化潜能, 在特

定的条件下, 可分化为骨、软骨、脂肪、肌肉和神经细胞等^[1]。且拥有取材方便、可在体外长期培养、遗传背景稳定、免疫源性低下等特点。我们在体外成功诱导 hMSC 向神经细胞分化的基础上^[2], 拟将体外扩增并标记的 hMSC 注入脑梗塞大鼠脑内, 观察 hMSC

[收稿日期] 2004- 08- 21 [修回日期] 2004- 11- 15

* [基金项目] 卫生部临床学科重点项目(No. 2001321); 广东省科技计划项目(No. 2KM05501S); 广东省科技计划项目重大专项(No. 2003A3020106); 国家自然科学基金资助项目(No. 30270732)

△ 通讯作者 Tel: 020- 33064439; E- mail: yeyaoxiaoli@sohu.com

在大鼠脑内的存活、迁移、分化及脑梗塞大鼠在移植后的神经功能的改变。

材 料 和 方 法

1 材料及主要试剂

成人肋骨来源于非血液系统疾病的胸外科手术中摘取的肋骨。

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, 低糖, Gibco公司)、胎牛血清(FCS, Hyclone公司)、Ficoll-paque 分离液(Pharmacia公司)、小鼠抗人神经元烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE, Chemicon公司)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)单克隆抗体(即用型)(Maxim公司)、小鼠抗人神经丝蛋白单抗(neurofilament-H, NF, DAKO公司)、DAB显色试剂盒(DAKO公司)、SABC-Cy3免疫荧光检测试剂盒(Boster公司)、参芪液(250 mL含党参和黄芪生药各10 g)购自广东丽珠集团利民制药厂。

2 动物模型的建立

2.1 MCAO模型复制 选用体重350–400 g SD大鼠(选用广东省医用动物实验中心提供的封闭群雄性SD大鼠),复制左侧大脑中动脉梗塞(MCAO)模型。术前禁食,3%戊巴比妥钠(36 mg/kg)腹腔注射麻醉,取右侧卧位,在左眼外眦和左耳根连线中点做2 cm皮肤切口,手术显微镜下在左颞侧颧弓根前方开一直径为0.5 cm骨窗,暴露左侧大脑中动脉,在发出纹状体动脉之后的远端用双极电凝器凝闭,无菌明胶海绵填充骨窗,逐层缝合切口,术中保持体温于37℃,术后腹腔注射青霉素钠盐40 000 U,预防感染。假手术组不封闭大脑中动脉,其余处理同实验组。

3 实验动物分组

3.1 脑梗塞组 将复制成功的61只MCAO大鼠(标准为:右侧肢体的疼痛回缩迟钝或消失;提尾倒悬时右上肢不向前伸;爬行时向右偏倒或向右侧旋转。)随机选择36只作梗塞组(其余备用),并随机分成移植组和生理盐水对照治疗组各18只,分别在移植术后第2和6周每组随机抽取一半处死,取大脑制作冰冻、石蜡切片,用于荧光观察和免疫组织化学染色。

3.2 假手术对照组 对照组也分18只大鼠,分别与治疗组在相同时点处死,取大脑制作冰冻、石蜡切片,用于荧光观察和免疫组织化学染色。

4 hMSC移植治疗脑梗塞

4.1 hMSC的体外分离、纯化和培养 无菌条件下,

将骨髓混悬液经密度为 1.077×10^3 g/L的Ficoll-Paque分离液,2 500 r/min离心30 min,收集单核细胞层。按 1×10^9 cells/L密度接种,37℃5% CO₂饱和湿度下培养,5 d后更换培养液,弃去未贴壁细胞,3–4 d换液1次,接近融合的MSC用含0.1 mmol/L EDTA的0.025 g/L胰酶室温消化5–10 min,1 500 r/min离心20 min,弃上清,沉淀按1:3比例传代。

4.2 hMSC的体外标记 第5代hMSC在体外培养并融合成单层细胞后,移去培养上清液,经PBS液洗涤后,胰酶消化,含10% FBS的DMEM(10 mL)终止消化;加入10 μL Hoeschst33342(标记细胞核,在荧光显微镜下显示蓝光),终浓度为1 mg/L,在培养箱孵育30 min;1 000 r/min,离心5 min,用无血清DMEM清洗后,再离心,共3次。之后,加入0.4 g/L参芪液诱导30 min;细胞用DMEM重悬,计数,调整细胞浓度为 10^{11} /L。

4.3 hMSCs移植治疗脑梗塞 移植所有操作均在无菌条件下进行,随机选择皮层梗塞10 d后的大鼠,术前12 h禁食,3%戊巴比妥钠(36 mg/kg)腹腔注射麻醉,把大鼠头部固定于立体定位仪,将hMSCs植入脑梗塞周围的皮层。牙齿固定横杆设为0,以前囟为参考点,按照前囟尾侧3.0 mm;中线旁开1.5 mm;深度为1.2 mm;缓慢注入浓度为 10^{11} /L hMSC 5 μL,速度为1 μL/min,拔针前留置5 min,骨腊封闭颅骨,缝合头皮。对照治疗组则注入无细胞的DMEM,操作同前。

4.4 移植后的检测 手术后2周和6周检测大鼠的神经功能的变化,参照文献^[3,4]的方法,各组大鼠在移植术前及移植后第2、6周进行行为功能检查。采用横木行走试验:采用200 cm × 10 cm × 1 cm横木,距地面高40 cm,在1 cm窄面,以10°角度向下爬行,在制作梗塞模型前3 d训练,连续3次评分达9分方进入本试验。同时用含0.105%戊二醛的4%的多聚甲醛灌注取脑,再用4%的多聚甲醛后固定6–8 h,蔗糖梯度脱水后作冰冻切片,观察荧光细胞的存活和迁移;而后进行间接免疫荧光实验,检测小鼠抗人神经元烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、小鼠抗人神经丝蛋白单抗(neurofilament, NF),加入羊抗小鼠-CY3(荧光显微镜下显示红光)反应后,共聚焦荧光显微镜观察,摄影。

5 统计学处理

全部数据均采用SPSS 12.0统计软件包进行统计分析。采用“均数±标准差($\bar{x} \pm s$)”对数据进行统

计描述。采用重复测量资料的方差分析方法对不同组别、不同时间的平均水平的差别进行假设检验。

结 果

1 动物模型鼠的检测

制备左侧MCAO模型65只,术后麻醉清醒后,61只出现右侧肢体运动功能障碍,爬行时向右偏倒或向右侧旋转,提尾倒悬时右上肢不向前下伸。

2 hMSC的纯化、扩增和表面标记

经过贴壁筛选获得的纯化hMSC,呈梭形分布。随着hMSC的迅速增殖,约10d可见细胞的排列有一定的方向性,呈旋涡状。20d细胞接近融合,经胰酶消化后,可获得 $(5-6) \times 10^5$ 个hMSC。体外扩增15代,细胞数可达 $(3-4) \times 10^{12}$ 个,扩增约 10^6 倍。用流式细胞仪检测hMSC的表面标记显示细胞均一性好,纯度达95%以上。CD11a、CD14、CD34、CD38、CD45、CD80、CD86为阴性;而CD29、CD44、CD90、CD105与CD166则表达阳性,说明hMSC为非造血类细胞。

3 hMSC在大鼠脑内存活、迁移和分化

荧光显微镜下可见hMSC几乎完全标上Hoeschst33342,细胞核呈蓝色。将这些细胞注入脑梗塞大鼠脑内,2周后开始心脏灌注,取脑作冰冻切片观察有荧光的细胞。结果发现hMSC位于皮层下,沿着胼胝体迁移。随后4周、6周检测结果表明,随着时间的延长,hMSC的迁移范围越来越大。其一向大脑中线迁移,另一向皮层梗塞部位迁移。hMSC多位于梗塞灶与正常大脑组织交界处,或者位于病灶内,见图1-3。

4 移植后hMSC在模型大鼠脑内的免疫荧光检测

移植后部分hMSC出现神经细胞的表型,表达神经元、神经胶质细胞的表面标志物。图4-6为间接免疫荧光双标法显示输注的hMSC在移植后6周NF、NSE、GFAP的表达。使用CY3荧光染料作为神经细胞标记,可见带有蓝色荧光细胞(输注的hMSC)中散在红色荧光表达,即神经细胞标记物的表达。hMSC移植后,已经开始向神经细胞转化,在冰冻切片上可见有神经元标志NF和NSE,星形胶质细胞标志GFAP的表达,而对照组未进行hMSC的输注,冰冻切片上未见人源性神经元抗原的表达。此免疫组化阳性细胞主要在移植区域如进针部位或沿着迁移途径上。尽管这些细胞表达神经细胞的特异性标志,但是仍然属于分化后的未成熟神经细胞,因为细胞仍为圆形或长梭形,突起或轴突较少。

5 移植后脑梗塞模型大鼠的行为学与运动功能观察

移植后脑梗塞模型大鼠饮食和行为活动等习性无明显异常改变,未见有脱毛等常见的免疫排斥现象。移植hMSC后,模型大鼠在麻醉苏醒后即可活动,觅食。在我们实验观察时间内(6周)未见有死亡。而对照组模型大鼠也未见行为异常和死亡。

在模型大鼠的运动功能检测方面,通过移植后2周和6周与移植前对比发现,移植后模型大鼠的运动功能有所改善。对照组在移植后,运动功能也有所改善,但不如移植组明显,两者统计学有显著差异。移植组和对照组各时点进行运动功能评分,两组比较结果见表1。

表1 运动功能评分结果

Tab 1 Evaluation of motor function ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Group	Before	2 weeks	6 weeks
	grafting	post- grafting	post- grafting
Grafting	3.33 ± 0.50	6.44 ± 0.53	8.33 ± 0.71
Control	3.44 ± 0.53	5.11 ± 0.78	7.00 ± 0.71
Sham	9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00

采用重复测量资料的方差分析方法进行统计分析,结果发现3个组之间的差别有统计学意义($P < 0.01$),3个时点之间的差别也有统计学意义($P < 0.01$),而且不同组别和不同时间之间存在交互作用。

讨 论

MSC作为供体细胞具有胚胎干细胞和神经干细胞所无法比拟的优点:可以很容易地从成人体内获得骨髓细胞,并且对成人损害轻微;体外增殖迅速;免疫反应弱;在宿主神经系统中能长期存活并整合;自体移植克服了使用胎儿组织所带来的伦理和免疫学方面的问题。目前已经成为细胞治疗的研究热点之一。

为进一步了解MSC在脑内的分布、迁移和分化,为脑梗塞的干细胞治疗提供依据,我们在体外成功定向诱导分化hMSC为神经元的基础上,将体外扩增的hMSC注入脑梗塞大鼠脑内,研究其在脑内的情况。结果显示,hMSC进入大鼠脑内后可存活10周以上,并发生广泛迁移,同时表达人源性神经元抗原NF、NSE及GFAP。前两者是神经细胞的特异性标志,而后者是神经胶质细胞的特异性标志。然而我们在体外定向诱导分化的神经元不表达GFAP,说明在体内微环境的作用下,hMSC的潜能更能充分发



Fig 1 Migration of hMSC in the brain 2 weeks after grafting ($\times 4$).

图 1 hMSC 在脑内迁移 2 周

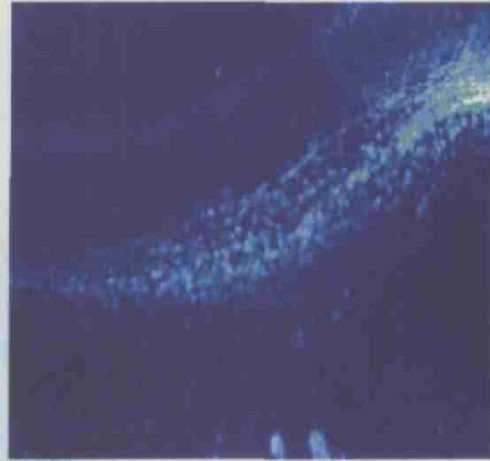


Fig 2 Migration of hMSC in the brain 4 weeks after grafting ($\times 4$).

图 2 hMSC 在脑内迁移 4 周



Fig 3 Migration of hMSC in the brain 6 weeks after grafting ($\times 4$).

图 3 hMSC 在脑内迁移 6 周

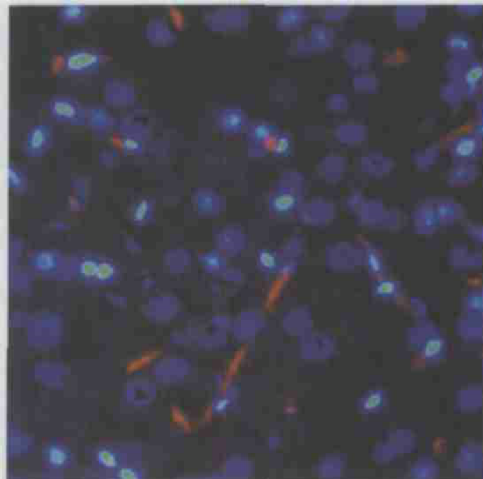


Fig 4 Grafting hMSC could differentiate into neurocytes in the rat brain. NF labels neurons (red); Hoeschst33342 labels nucleus of hMSC (blue) ($\times 40$).

图 4 大鼠脑内存在表达人源性神经元抗原的细胞

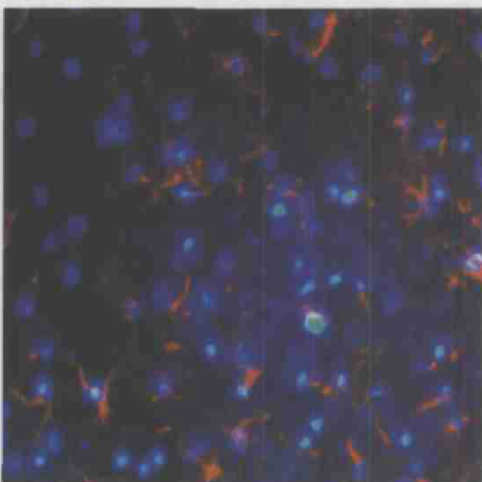


Fig 5 Grafting hMSC could differentiate into neurocytes in the rat brain. GFAP labels neurons (red); Hoeschst33342 labels nucleus of hMSC (blue) ($\times 40$).

图 5 大鼠脑内存在表达人源性神经元抗原的细胞

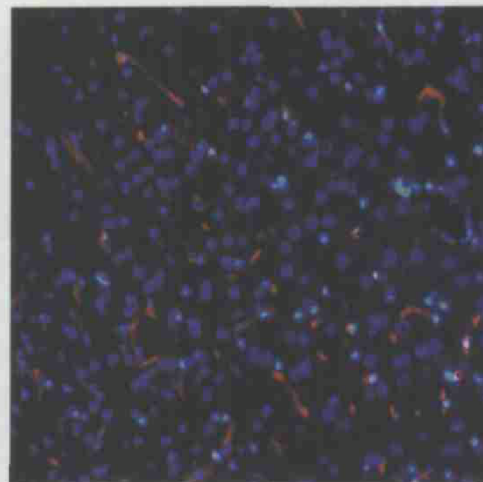


Fig 6 Grafting hMSC could differentiate into neurocytes in the rat brain. NSE labels neurons (red); Hoeschst33342 labels nucleus of hMSC (blue) ($\times 10$).

图 6 大鼠脑内存在表达人源性神经元抗原的细胞

挥,不仅分化为神经细胞,也向神经胶质细胞分化。脑梗塞大鼠在植入 hMSC 后,运动功能有明显改善,与对照组比较有统计学差异。但是植入的 hMSC 在很长的时间内呈梭形,表明植入的细胞尚不能与宿主整合。其改善神经功能的原因可能是植入的 hMSC 分泌一种可以调节脑细胞可塑性的蛋白质所致。这与 Zhao 等^[5]的结果相似。他们将 MSC 移植入脑缺血模型鼠后,发现 MSC 表达神经元特异性标志,并能改善模型鼠的神经功能。由此推测神经功能的恢复不是由于新的神经细胞整合进宿主的脑内,可能是移植的 MSC 分泌的蛋白上调了脑的可塑性所致。但是,他们使用 GFP 进行 MSC 的转染标记,方法复杂,且 GFP 进入大脑后自动发出荧光,不能再进行免疫荧光双标追踪,只能采用普通的免疫组化。不如我们使用 Hoeschst33342,简单容易标记,可使用免疫荧光的双标法进行检测,更准确、更客观。

Li 等^[6]的研究证明,在线栓法的脑缺血 2 h 再灌注模型中,将标记有 BrdU 的 MSC 移植到缺血部位,通过对大鼠神经系统行为测试及免疫组化分析,发现对照组与实验组有显著差异,并观察到一部分 MSC 表达了神经细胞的表面标记,实验组神经系统的功能损害显著降低;通过病理学发现移植的 MSC 主要位于缺血中心和边缘带,而且表达 NeuN(neuronal nuclei)、微管相关蛋白 2(microtubule associated protein- 2, MAP- 2) 和 GFAP 的细胞数量分别占存活 MSCs 总数的 1%、2% 和 5%,而且在缺血后的第 1 d 和第 7 d,经 MSCs 移植治疗的神经功能恢复程度基本类似,这一点充分说明 MSC 的移植治疗有较长的时间窗,从而使其应用更加广泛。

中药参芪液的成分为党参和黄芪,有研究认为,党参和黄芪具有补中益气、生津养血的功效,可以促进正常机体生长,有抗氧化、增强免疫和抑制细菌的作用^[7]。因此,参芪液在神经科临床得到一定的应用,对肌萎缩侧索硬化症等神经变性疾病和脑血管疾病具有一定的疗效。既往研究认为其可在体外诱导分化 hMSC 为神经元样细胞^[2],因此,在移植前我们短期使用其诱导 hMSC,而后进行移植。优点在于促进 hMSC 在体内更好地向神经细胞分化,从而消除其潜在的体内成瘤的危险,提高安全性。

免疫排斥是干细胞移植用于替代治疗的一个重

要问题。本研究将人源性 MSC 移植入大鼠脑内,未见任何因免疫排斥而引起的不良反应。人源性 MSC 能在大鼠脑内较长时间生存,说明 MSC 本身免疫源性较弱。有报道表明,MSC 表达组织相容性复合物 I 而缺乏组织相容性复合物 II,因此,免疫原性较弱^[8,9]。同时,MSC 能直接或间接抑制 T 细胞的功能^[10],这为 MSC 的临床应用增加了可行性。

[参 考 文 献]

- [1] 董燕湘,董晓先,何慧华,等. 大鼠骨髓间质干细胞用肾上腺素类激素诱导为神经细胞的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(5): 733- 736.
- [2] 姚晓黎,刘卫彬,柳太云,等. 参芪液对成人骨髓间质干细胞的诱导分化作用[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2004, 30(3): 211- 212.
- [3] Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats[J]. Stroke, 1995, 26(11): 2135- 2144.
- [4] Jones TA, Schallert T. Overgrowth and pruning of dendrites in adult rats recovering from neocortical damage[J]. Brain Res, 1992, 581(1): 156- 160.
- [5] Zhao LR, Duan WM, Reyes M, et al. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats[J]. Exp Neurol, 2002, 174(1): 11- 20.
- [6] Li Y, Chopp M, Chen J, et al. Interatrial transplantation of bone marrow stromal cells (MSCs) improves functional recovery after stroke in adult mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(9): 1311- 1319.
- [7] 颜正华 主编. 中药学[M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 731- 733.
- [8] Worster AA, Nixon AJ, Brower T, et al. Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells[J]. Am J Vet Res, 2000, 61(9): 1003- 1010.
- [9] Shang Q, Wang Z, Liu W, et al. Tissue- engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells[J]. J Craniofac Surg, 2001, 12(6): 586- 593.
- [10] Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, et al. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow[J]. Exp Hematol, 2002, 30(8): 879- 886.