

骨髓间充质干细胞移植对脊髓损伤大鼠 Toll 样受体 4 表达的影响

牟乐明¹, 孙占胜¹, 王伯珉¹, 高平², 初向全³

(1. 山东大学附属省立医院创伤骨科, 济南 250021; 2. 山东大学附属千佛山医院骨关节科, 济南 250014;
3. 山东大学附属千佛山医院创伤骨科, 济南 250014)

摘要:目的 研究骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植对脊髓损伤大鼠 Toll 样受体 4(TLR4)表达的影响,探讨 BMSCs 移植治疗脊髓损伤的机制。方法 取 4 周龄雄性 Wistar 大鼠骨髓分离培养 BMSCs,对第 3 代 BMSCs 进行免疫细胞化学法鉴定,收集备用。取 8 周龄雄性 Wistar 大鼠 90 只,随机分为假手术对照组、脊髓损伤组和细胞移植组,每组 30 只,脊髓损伤组建立大鼠 Allen's 脊髓损伤模型,细胞移植组建立大鼠 Allen's 脊髓损伤模型后行 BMSCs 静脉移植。分别于术后 24 h、72 h、7 d 处死大鼠,取损伤中心 1 cm 脊髓,应用免疫组织化学法、实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法分别检测 TLR4 的表达。结果 脊髓损伤处 TLR4 表达脊髓损伤组比假手术对照组增加($P < 0.01$),细胞移植组比脊髓损伤组降低($P < 0.01$)。结论 BMSCs 可能通过降低 TLR4 的表达抑制脊髓炎症反应。

关键词:骨髓间充质干细胞;脊髓损伤;Toll 样受体 4;细胞移植;大鼠

中图分类号:R642

文献标志码:A

Effects of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on the expression of Toll-like receptor 4 in injured spinal cord of rats

MOU Le-ming¹, SUN Zhan-sheng¹, WANG Bo-min¹, GAO Ping², CHU Xiang-quan³

(1. Department of Traumatic Orthopedics, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China;
2. Department of Joint Surgery, Qianfoshan Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250014, China;
3. Department of Traumatic Orthopedics, Qianfoshan Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250014, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation on the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) in injured spinal cord of rats, and to explore the mechanism by which BMSCs transplantation treats spinal cord injury. **Methods** A 4-week old mouse was utilized to separate BMSCs, which were cultured into third generation and then identified by immunohistochemical methods. A total of 90 8-week old male Wistar rats were evenly divided into three groups: group of surgical control, group of spinal cord injury and group of cell transplantation. Rats in group of spinal cord injury was used to establish Allen's SCI model, rats in group of cell transplantation was injected with the BMSCs suspension after SCI. Then the rats were killed respectively at 24 hours, 72 hours, 7 days and 1 cm of the spinal cord blocks in the center of contusion site was removed. The expression of TLR4 in the injured area was detected with immunohistochemical method and real-time quantitative PCR (RT-qPCR).

Results The expression of TLR4 in group of spinal cord injury increased compared with that of group of surgical control ($P < 0.01$). The expression of TLR4 in group of cell transplantation decreased compared with that of group of spinal cord injury ($P < 0.01$). **Conclusion** BMSCs transplantation may inhibit inflammation in spinal cord injury by decreasing the expression of TLR4.

Key words: BMSCs; Spinal cord injury; Toll-like receptor 4; Cell transplantation; Rats

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的治疗一直是医学界的一个难题。有研究表明,骨髓间充质干细胞移植治疗脊髓损伤取得了一定的疗效,其主要通过分泌多种神经营养因子、抗炎因子等减轻脊髓的继发性损伤,诱导神经轴突生长,促进神经功能恢复^[1]。有关骨髓间充质干细胞对介导炎症的TLR4信号通路影响的报道较少。本实验设计大鼠脊髓损伤模型,研究骨髓间充质干细胞对脊髓损伤后Toll样受体4(TLR4)表达的影响,进一步探讨骨髓间充质干细胞抑制炎症反应的机制,为临床进行骨髓间充质干细胞移植治疗脊髓损伤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 4周龄雄性Wistar大鼠6只,体质量105~121 g,平均110 g,提取BMSCs。8周龄雄性Wistar大鼠90只,体质量293~318 g,平均306 g,建立Allen's脊髓损伤模型。实验动物均购自山东大学实验动物中心。实验中对动物的处理符合动物伦理学要求。

1.1.2 主要试剂 DMEM低糖培养基(美国Gibco公司),胎牛血清(美国Gibco公司),CD抗体系列,TLR4一抗(武汉博士德生物工程有限公司),免疫组化试剂盒(二抗为生物素化羊抗兔Ig)(北京中杉金桥生物技术有限公司),胰蛋白酶(美国Gibco公司),Trizol试剂、逆转录试剂盒(PrimeScript™ RT Reagent Kit)、荧光实时定量PCR试剂盒(SYBR Premix Ex Taq™ Kit)均购自日本Takara公司。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs的分离培养及鉴定 取4周龄雄性Wistar大鼠,拉颈处死,75%乙醇浸泡消毒,解剖获取双侧股骨、胫骨并剪去骨骺端,用5 mL注射器抽取培养液反复冲洗骨髓腔,收集单细胞悬液并以 1×10^7 个/mL接种于25 mL培养瓶中^[2],在37℃、5%CO₂孵箱中培养,培养液为含10%胎牛血清的DMEM低糖培养基。每3天换液1次,当细胞增殖铺满瓶底约80%后,按1:3的比例进行传代培养。免疫细胞化学法鉴定BMSCs:将第3代BMSCs以 1×10^5 个/mL接种于6孔板中,6孔板内有多聚赖氨酸预处理的玻片,置于37℃、5%CO₂的孵箱中培养。待细胞贴满玻片后取出,95%乙醇固定,3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,封闭血清封闭非特异性抗体,一抗(CD34和CD44抗体)4℃孵育过夜,滴加生物素化二抗,滴加辣根过氧化物酶链霉卵白素,

DAB显色,苏木精复染,盐酸乙醇分化,自来水返蓝,乙醇梯度脱水,中性树胶封片,镜检观察染色情况。

1.2.2 脊髓损伤动物模型的建立及分组 选择8周龄雄性wistar大鼠90只,随机分为假手术对照组、脊髓损伤组和细胞移植组,每组30只。脊髓损伤组建立大鼠Allen's脊髓损伤模型,细胞移植组建立大鼠Allen's脊髓损伤模型后行BMSCs静脉移植。实验室饲养7 d后,按照分组建立大鼠Allen's脊髓损伤模型^[3]。以3 mL/kg水合氯醛腹腔内注射麻醉大鼠,取俯卧位,固定在手术台上,用碘伏消毒大鼠背部皮肤,以T₁₀为中心切开皮肤及皮下组织,分离椎旁肌肉,去除T₁₀棘突及椎板,显露脊髓。固定Allen打击装置,用重5 g的打击物从10 cm高度垂直下落打击脊髓,造成T₁₀节段脊髓损伤。术后用青霉素盐水冲洗伤口,逐层缝合组织。造模成功的标志:在Allen装置撞击脊髓时,大鼠发生身体抖动,其双下肢迅速回缩及弹动,尾巴迅速发生翘起并倒下,打击局部脊髓表面迅速淤血。术后早晚各挤尿1次,直至排尿反射恢复。假手术对照组在显露脊髓后不给予打击损伤,其余手术步骤同脊髓损伤组。

1.2.3 细胞移植 细胞移植组大鼠在手术后即刻经尾静脉注射生理盐水配制成的BMSCs细胞悬液,浓度为 1×10^7 /mL,剂量为0.5 mL;假手术对照组和脊髓损伤组注射等量的生理盐水。

1.2.4 组织制备 分别于手术后24 h、72 h、7 d处死动物,取损伤中心1 cm脊髓组织,每种处理(10只)随机选取5个标本4%多聚甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋后5 μm连续切片备用。另外5个标本保存于液氮中用作提取总RNA。

1.2.5 免疫组织化学染色 将切片脱蜡水化,乙二胺四乙酸(EDTA)微波抗原修复,3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,封闭血清封闭非特异性抗体,一抗(TLR4抗体)4℃孵育过夜,滴加生物素化二抗,滴加辣根过氧化物酶链霉卵白素,DAB显色,苏木精复染,盐酸乙醇分化,自来水返蓝,乙醇梯度脱水,中性树胶封片,镜检观察染色情况。用PBS代替一抗作为阴性对照。每只大鼠随机取5张切片,计数TLR4阳性细胞,取平均值,阳性细胞呈棕黄色染色。采用Image-Pro Plus 5.0软件对免疫组化图像中免疫阳性信号进行积分吸光度测定,取平均值反映TLR4蛋白表达。

1.2.6 实时荧光定量PCR检测TLR4 mRNA的表达 Trizol法提取细胞总RNA,逆转录合成cDNA。采用SYBRGREN实时荧光定量RT-qPCR检测TLR4基因的表达。引物:Takara公司设计合成,上

游引物: 5-CTCACAACCTTCAGTGGCTGGATTTA-3'; 下游引物: 5'-GTCTCCACAGCCACCAGAT-TCTC-3'。RT-qPCR 的反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 10 s, 共 45 次; 溶解曲线: 95 °C 5 s, 65 °C 1 min; 40 °C 冷却 30 s。定量结果用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示目的基因 mRNA 的相对含量^[4]。

1.3 统计学处理 所得数据采用 SPSS 13.0 软件进行处理。实验结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间及组内比较采用 *t* 检验, 检验水准采用 Bonferroni 方法进行调整。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 BMSCs 的鉴定 在倒置相差显微镜下, 开始细胞呈散在集落, 一个培养瓶中可见 10 ~ 20 个, 细胞由圆形变为不规则形, 大部分细胞呈梭形, 其折光性好, 两周后细胞增殖铺满瓶底, 见图 1。细胞免疫组织化学染色显示, 镜下可见 CD44^[5] 染色阳性, 细胞呈棕黄色; CD34 染色为阴性, 细胞无着色, 与 BMSCs 的表面特异性标志相符, 见图 1。

2.2 TLR4 表达结果 与假手术对照组相应时间

表 1 各组大鼠 TLR4 阳性细胞计数、蛋白表达、mRNA 表达的比较 (n = 5, $\bar{x} \pm s$)

指标	假手术对照组			脊髓损伤组			细胞移植组		
	24 h	72 h	7 d	24 h	72 h	7 d	24 h	72 h	7 d
阳性细胞数	7.3 ± 1.1	9.5 ± 1.3	8.7 ± 1.2	19.3 ± 2.3*	35.5 ± 2.8** [△]	17.7 ± 1.6* [▲]	13.3 ± 1.2 [#]	18.9 ± 1.6 [#]	12.1 ± 1.2 [#]
蛋白表达	87.2 ± 9.3	98.4 ± 10.7	93.1 ± 10.4	223.4 ± 21.2*	436.3 ± 27.9** [△]	197.7 ± 18.3* [▲]	152.9 ± 11.5 [#]	217.2 ± 19.4 [#]	133.5 ± 11.3 [#]
mRNA 表达	1.0	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	2.0 ± 0.2*	3.0 ± 0.4** [△]	1.7 ± 0.2* [▲]	1.4 ± 0.1 [#]	1.7 ± 0.2 [#]	1.2 ± 0.1 [#]

*P < 0.01 vs 假手术对照组相应时间; [△]P < 0.01 vs 脊髓损伤组术后 24 h; [▲]P < 0.01 vs 脊髓损伤组术后 72 h; [#]P < 0.01 vs 脊髓损伤组相应时间。

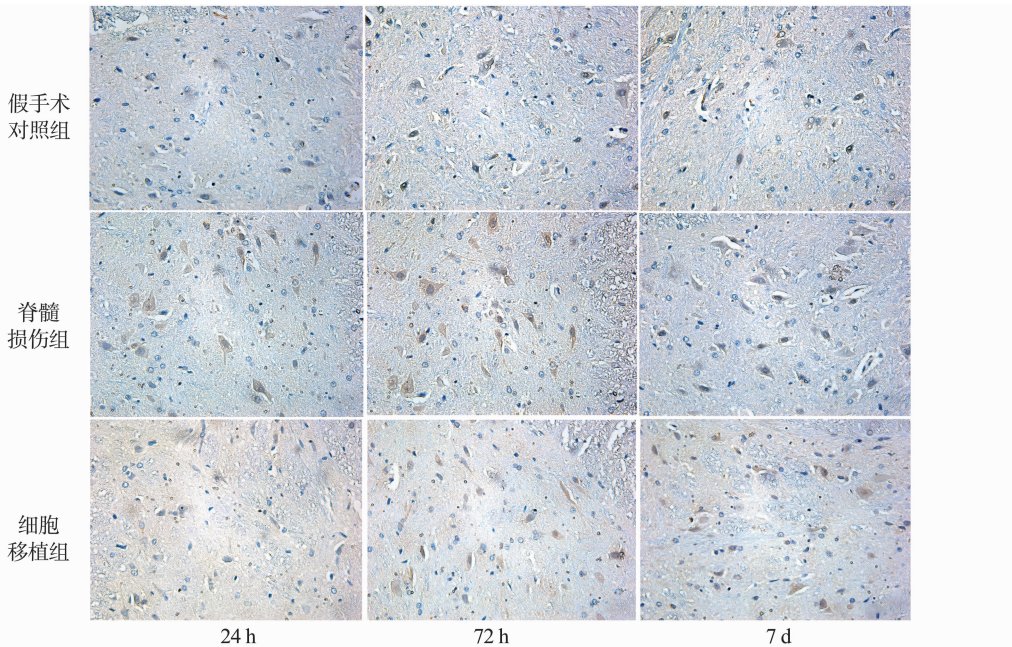


图 2 TLR4 蛋白在各组不同时间点的表达 (免疫组化染色, ×400)

Fig. 2 Expression of TLR4 protein at different time points and in different groups (immunohistochemical staining, ×400)

比较, 脊髓损伤组 TLR4 阳性细胞数明显增多, TLR4 蛋白表达上调, TLR4mRNA 表达上调, 72 h 达高峰; 与脊髓损伤组相应时间比较, 细胞移植组 TLR4 阳性细胞数减少, TLR4 蛋白表达下调, TLR4mRNA 表达下调, 差异有统计学意义 (P < 0.01), 见表 1, 图 2, 图 3。

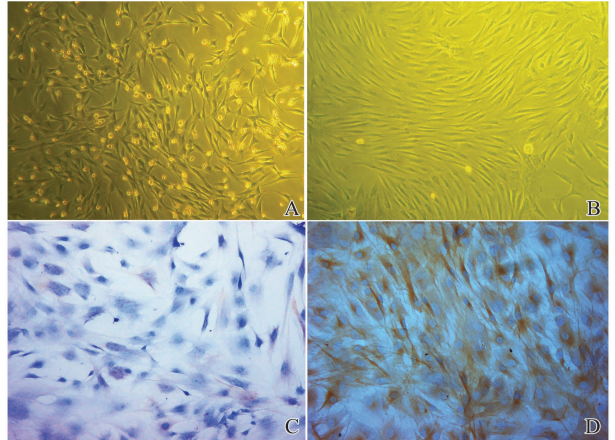


图 1 细胞形态变化和第三代 BMSCs 的 CD34/CD44 免疫细胞化学染色 (×200)

A: 7 d; B: 14 d; C: CD34; D: CD44。

Fig. 1 The proliferation of BMSCs and the immunocytochemical staining of CD34 and CD44 on the third generation of the BMSCs (×200)

A: 7 d; B: 14 d; C: CD34; D: CD44.

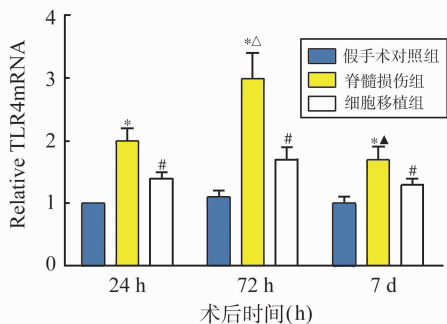


图3 实时荧光定量 PCR 检测 TLR4 mRNA 的表达 (* $P < 0.01$ vs 假手术对照组相应时间; $\Delta P < 0.01$ vs 脊髓损伤组术后 24 h; $\blacktriangle P < 0.01$ vs 脊髓损伤组术后 72 h; $\#P < 0.01$ vs 脊髓损伤组相应时间)

Fig. 3 Real-time quantitative PCR analysis of TLR4 expressions (* $P < 0.01$ vs group of surgical control at corresponding time; $\Delta P < 0.01$ vs group of spinal cord injury in 24 h after surgery; $\blacktriangle P < 0.01$ vs group of spinal cord injury in 72 h after surgery; $\#P < 0.01$ vs group of spinal cord injury at corresponding time)

3 讨论

脊髓损伤包括原发性损伤和继发性损伤,两者都能造成脊髓的功能障碍。原发性损伤可直接造成损伤部位细胞死亡,其过程是瞬时和不可逆的;继发性损伤则是一个渐进的过程,主要包括炎症反应、血管破坏所致的缺血坏死、兴奋性毒性、自由基和再灌注损伤等^[6]。本研究通过控制继发性损伤达到治疗脊髓损伤的目的。炎症反应在脊髓继发性损伤过程中起着关键作用,近年活化小胶质细胞的神经毒性在脊髓炎症反应中的作用日益受到重视。研究表明,小胶质细胞表面可表达 TLR1 ~ TLR9^[7],其中以 TLR4 表达最为丰富^[8]。Lehnardt^[9]研究证实,在小胶质细胞活化、炎性介质释放进而造成神经元损伤的过程中,TLR4 信号通路起着关键作用。脊髓缺血再灌注时,死亡的神经细胞会释放内源性配体,如 HSP60 等进入细胞外间隙,与小胶质细胞表面的 TLR4 结合后导致小胶质细胞活化。TLR4-MyD88 信号通路可以通过激活白细胞介素-1 受体相关激酶促进肿瘤坏死因子受体相关受体 6 的表达,进一步激活下游的转录因子 NF- κ B,诱导 IL-6、TNF α 、IL-12 等促炎性因子的表达^[10-11]。这些炎性因子可引起继发性神经元损伤,而受损神经元会释放更多的内源性配体,从而形成恶性循环。

1999 年, Pittenger 等^[12]首先从骨髓中分离培养出具有多向分化潜能的成体干细胞,即骨髓间充质干细胞(BMSCs)。大量研究证实, BMSCs 在体外可以向骨、软骨、骨骼肌、肌腱、脂肪等方面分

化^[13-14]; Kopen 等^[15]证实了 BMSCs 向神经胶质细胞分化的能力; Abouelfetouh 等^[16]将 BMSCs 在体外与海马组织薄片共培养,分化成为神经细胞。此后, BMSCs 修复脊髓损伤成为研究热点。有研究证实, BMSCs 经静脉或损伤局部移植后可向病变部位的组织迁移^[17], 迁移的 BMSCs 能对周围环境作出反应,识别环境中的某些信号,分泌抗炎因子、血管内皮生长因子、神经生长因子、脑源性神经营养因子等^[18],促进微血管生成、轴突延长、髓鞘再生,引导轴突生长穿过受损区域,修复及营养脊髓^[19]。BMSCs 对早期炎症介质的影响及炎症级联反应的作用尚不明确,有关 BMSCs 移植能否减轻 TLR4 信号通路介导的炎症反应从而减少脊髓继发性损伤的报道较少。

本实验结果显示,脊髓损伤后小胶质细胞 TLR4 表达水平显著升高,而 BMSCs 移植能够明显抑制 TLR4 的表达。综上所述,本实验推测 BMSCs 可能通过分泌一些细胞因子、调节蛋白直接或间接下调脊髓组织 TLR4 表达,减轻 TLR4 信号通路介导的炎症反应,从而减少脊髓继发性损伤,为临床进行骨髓间充质干细胞移植治疗脊髓损伤提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Ritfeld G J, Nandoe Tewarie R D, Vajn K, et al. Bone marrow stromal cell-mediated tissue sparing enhances functional repair after spinal cord contusion in adult rats [J]. *Cell Transplant*, 2012, 21(7):1561-1575.
- [2] Huang Y, Jia X, Bai K, et al. Effect of fluid shear stress on cardiomyogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Arch Med Res*, 2010, 41(7):497-505.
- [3] Baydin A, Cokluk C, Aydin K. A new minimally invasive experimental spinal cord injury model in rabbits [J]. *Minim Invasive Neurosurg*, 2007, 50(3):170-172.
- [4] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data U-sing real-time quantitative PCR and the 2 [-Delta Delta C(T)] methods [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [5] Mafi P, Hindocha S, Mafi R, et al. Adult Mesenchymal Stem Cells and Cell Surface Characterization- A Systematic Review of the Literature [J]. *Open Orthop J*, 2011, 5 (Suppl 2):253-260.
- [6] Tator C H. Biology of neurological recovery and functional restoration after spinal cord injury [J]. *Neurosurgery*, 1998, 42(4):696-707.
- [7] Lee S J, Lee S. Toll-like receptors and inflammation in

- the CNS[J]. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2002, 1(2):181-191.
- [8] Jack C S, Arbour N, Manusow J, et al. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes[J]. *Immunol*, 2005, 175(7):4320-4330.
- [9] Lehnardt S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor mediated neuronal injury[J]. *Glia*, 2010, 58(3):253-263.
- [10] Lu Y C, Yeh W C, Ohashi P S. Review Article: LPS/TLR4 signal transduction pathway[J]. *Cytokine*, 2008, 42(2):145-151.
- [11] 王志强, 于振海, 袁方曙. 杆菌对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜上皮细胞 Toll 样受体 2, 4 及 NF- κ B 基因表达的影响[J]. *山东大学学报: 医学版*, 2011, 49(5):10-14.
- [12] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411):143-147.
- [13] Caplan A I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213(2):341-347.
- [14] Helder M N, Knippenberg M, Klein-Nulend J, et al. Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine [J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(8):1799-1808.
- [15] Kopen G C, Prockop D J, Phinney D G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(19):10711-10716.
- [16] Abouelfetouh A, Kondoh T, Ehara K, et al. Morphological differentiation of bone marrow stromal cells into neuron-like cells after co-culture with hippocampal slice[J]. *Brain Res*, 2004, 1029(1):114-119.
- [17] Svetlana M S, Parvin S, Richard F K, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(5):593-606.
- [18] Crigler L, Robey R C, Asawachaicharn A, et al. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis[J]. *Exp Neurol*, 2006, 198(1):54-64.
- [19] Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, et al. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells[J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2011, 24(1):59-64.

(编辑:徐苗蓁)

(上接第 36 页)

- [8] 赵玉红, 冷传亮, 赵鸿, 等. 健择化疗肺癌患者毒性反应的护理[J]. *中国交通医学杂志*, 2005, 19(3):307-308.
- [9] Di Lorenzo G, Autorino R, Giulian M. Phase II Trial of Gemcitabine, Prednisone, and Zoledronic Acid in Pretreated Patients with Hormone Refractory Prostate Cancer[J]. *Urology*, 2001, 69(2):347-351.
- [10] Khan M A, Carducci M, Partin A W, et al. The evolving role of docetaxel in the management of androgen independent prostate cancer [J]. *J Urol*, 2003, 170(5):1709-1716.
- [11] Maxwell P J, Coulter J, Walker S M. Potentiation of Inflammatory CXCL8 Signalling Sustains Cell Survival in PTEN-deficient Prostate Carcinoma [J]. *Eur Urol*, 2013, 64(2):177-188.
- [12] Zong W X, Ditsworth D, Bauer D E, et al. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(11):1272-1282.
- [13] Jiang J, Huang H. Targeting the Androgen Receptor by Taxol in Castration-Resistant Prostate Cancer [J]. *Mol Cell Pharmacol*, 2010, 2(1):1-5.
- [14] Kani K, Harada M, Yamamura Y, et al. γ -tocotrienol enhances the chemosensitivity of human oral cancer cells to docetaxel through the downregulation of the expression of NF- κ B-regulated anti-apoptotic gene products [J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(2):75-82.
- [15] Sodhi R K, Singh N, Jaggi A S. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and its therapeutic implications [J]. *Vascul Pharmacol*, 2010, 53(3-4):77-87.

(编辑:刘霞)