

两步法分离和培养人羊水来源胚胎间充质干细胞及其向神经元样细胞诱导分化的实验研究

冯建勋 腊晓林 马艳 毕晓娟 温浩

【摘要】 目的 建立两步培养法分离培养人孕中期羊水间充质干细胞(MSCs)的方法,观察羊水 MSCs 向神经元样细胞的诱导分化。**方法** 采用改进的两步培养法分离和培养人羊水 MSCs,以 β -巯基乙醇诱导其向神经元样细胞方向分化;并使用流式细胞术、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫细胞化学法研究人羊水 MSCs 的生物学特性。**结果** 成功分离、培养和传代出人羊水 MSCs。流式细胞术检测人羊水 MSCs 表达 CD44、CD29、CD105,不表达 CD45、CD34、人白细胞 DR 抗原(HLA-DR);免疫荧光法和 RT-PCR 检测表明,部分人羊水 MSCs 表达转录因子 Oct-4。两步培养法羊水 MSCs 集落形成率[(15.0 $\pm$ 2.3)%]和 Oct-4 阳性细胞率[(1.2 $\pm$ 0.3)%]均高于一步法[分别为(10.0 $\pm$ 1.8)%,(0.9 $\pm$ 0.2)%], P 均 <0.05 。羊水 MSCs 经 β -巯基乙醇诱导后细胞形态发生改变,伸出突起并呈神经球样改变;免疫细胞化学法检测显示(54.76 $\pm$ 3.65)%的细胞表达神经元特异性烯醇化酶(NSE),同时(36.28 $\pm$ 4.27)%的细胞表达神经胶质酸性蛋白(GFAP)。结论人羊水中存在 MSCs,两步培养法是一种高效、简便、实用而且不干扰常规产前诊断程序的方法。在体外条件下,利用 β -巯基乙醇和适宜的培养液可使羊水 MSCs 定向分化为神经元。

【关键词】 羊水细胞; 间充质干细胞; 转录因子 Oct-4; 神经元

Isolation of human pluripotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using two kinds of culture protocol and their differentiation into neuron-like cells FENG Jian-xun*, LA Xiao-lin, MA Yan, BI Xiao-juan, WEN Hao. * Postdoctoral Research Station, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Department of Nephrology, Urumqi Friendship Hospital, Urumqi 830000, Xinjiang, China
Corresponding author: WEN Hao, Email: dr.wenhao@163.com

【Abstract】 Objective To isolate mesenchymal stem cells (MSCs) from second-trimester amniotic fluid using an improved two-stage culture protocol, and to induce these MSCs into neuron-like cells. **Methods** An improved two-stage culture protocol for MSCs from amniotic fluid was developed. MSCs from amniotic fluid were induced to differentiate with β -mercaptoethanol into neuron-like cells. Flow cytometry, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunocytochemistry were employed for analysis of the phenotypic characteristics of the cultured MSCs from amniotic fluid. **Results** MSCs from amniotic fluid were successfully isolated, cultured and enriched without interfering with the routine process of fetal karyotyping. Flow cytometry analysis showed that they were positive for CD44, CD29, and CD105, but negative for CD45, CD34, or human leucocyte antigen-DR (HLA-DR). Importantly, a subpopulation of transcription factor Oct-4 positive cells could be detectable in the cultured MSCs from amniotic fluid. Moreover, MSCs from amniotic fluid obtained by two-stage culture protocol showed higher proliferation rate [(15.0 $\pm$ 2.3)% vs. (10.0 $\pm$ 1.8)%] and higher Oct-4 positive cell rate [(1.2 $\pm$ 0.3)% vs. (0.9 $\pm$ 0.2)%], both $P<0.05$. After the induction, MSCs from amniotic fluid displayed processes that formed extensive networks. Positive cells for neurone specific enolase (NSE) constituted (54.76 $\pm$ 3.65)%, and glial fibrillary acidic protein (GFAP) (36.28 $\pm$ 4.27)%, respectively. **Conclusion** We demonstrate that human pluripotent MSCs are present in second-trimester amniotic fluid. The two-stage culture protocol could be a kind of simple one with high performance and it does not interfere with the routine fetal karyotyping. MSCs from amniotic fluid can be induced to differentiate into neuron-like cells in vitro by β -mercaptoethanol in optimal medium.

【Key words】 Amniotic fluid cell; Mesenchymal stem cell; Transcription factor Oct-4; Neuron

神经干细胞的发现为神经细胞移植治疗神经系

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.12.009

基金项目:新疆医科大学博士后科学基金项目(第43批)

作者单位:830000 新疆医科大学第一附属医院博士后科研流动站,新疆乌鲁木齐市友谊医院肾内科(冯建勋);新疆医科大学第一附属医院妇产科(腊晓林),肝胆外科(温浩);新疆医科大学第一附属医院医学研究中心干细胞研究所(马艳、毕晓娟)

通信作者:温浩,Email:dr.wenhao@163.com

统损伤和退行性病变提供了有效的移植细胞,但由于目前神经干细胞的来源仅限于从胚胎干细胞诱导分化而来或从胎脑中直接分离而来,很难获得足够的神经细胞移植细胞;虽然可利用自体细胞体外培养扩增后再移植到中枢神经系统内,但中枢神经细胞位置深在,获取细胞必然对组织造成损伤。因此,寻找一种新的神经干细胞来源对于促进神经科学领域基

础与应用研究的发展至关重要。人间充质干细胞(MSCs)是一种多能细胞,除存在于成人骨髓中外,外周血、胎盘和足月脐血中也能分离出 MSCs^[1-2]。近年来研究提示,人羊水中存在多种 MSCs,并能分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞等,因此可能成为神经变性疾病移植治疗的种子细胞^[3];且人羊水中还含有转录因子 Oct-4 阳性细胞,这意味着人羊水可能成为一种新的多能干细胞来源^[4]。本研究中采用一种不干扰常规产前诊断程序的两步培养法分离培养人羊水 MSCs,并通过体外诱导,对人孕中期羊水 MSCs 转化为神经干细胞、进而分化为神经元及神经胶质细胞进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 标本来源:10 份羊水标本来自本院行产前诊断或自愿引产的怀孕 16~22 周孕妇,在超声引导下经羊膜腔穿刺取 20~40 ml 羊水。取标本前均征得孕妇本人同意,研究获得新疆医科大学第一附属医院医学伦理委员会批准。

1.2 人羊水 MSCs 分离、培养法

1.2.1 一步培养法(直接贴壁法培养):取羊水标本,加入 4 ml 培养基培养,当出现梭形细胞为主、类成纤维细胞的 MSCs 集落且达 70% 融合后用胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化,改用含胎牛血清和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的 α -MEM 培养基接种培养,记为第 1 代。细胞生长达到 80% 融合时按 1:4 的比例传代。

1.2.2 两步培养法:第一步同一步法,将羊水标本离心、接种、培养,直至出现梭形细胞为主、类成纤维细胞的 MSCs 集落。第二步是将上清培养液继续培养,直至出现梭形细胞为主、类成纤维细胞的 MSCs 集落且达 70% 融合后消化,改用 α -MEM 培养基,同样添加 bFGF 接种培养,记为第 1 代。

1.3 细胞核型分析:用滴片法,按人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN 1995)标准进行核型分析诊断。

1.4 羊水 MSCs 的生长曲线测定:分别取 5 个两步和一步培养法 90% 融合的第 3 代羊水 MSCs,按 2×10^4 个/ml 接种于 24 孔板,从第 2 日起隔日随机取 3 孔细胞计数,取其均值作为当日的细胞数。

1.5 羊水 MSCs 细胞周期测定:分别取 5 个两步和一步培养法 90% 融合的第 3 代羊水 MSCs,按试剂盒步骤处理细胞,用流式细胞仪检测细胞周期。

1.6 羊水 MSCs 集落形成能力测定:分别取 6 个两步和一步培养法 90% 融合的第 3 代羊水 MSCs,按 10 个/ml 接种于 6 孔板,7 d 后行瑞氏染色,计数孔

内的集落数。集落形成率=平均集落数/种入的细胞数 $\times 100\%$ 。

1.7 羊水 MSCs 表面抗原检测:取 90% 融合的第 3 代羊水 MSCs,分别加入异硫氰酸荧光素(FITC)或藻红蛋白(PE)标记的小鼠抗人抗体[CD29、CD34、CD44、CD45、CD105、人白细胞 DR 抗原(HLA-DR)],设立阴性对照,用流式细胞仪检测,CellQuest 软件分析结果。

1.8 免疫荧光法检测羊水 MSCs 中 Oct-4 表达:分别取 5 个两步法和一步培养法 90% 融合第 6 代羊水 MSCs,经接种、固定、封闭后,加鼠抗人 Oct-4 单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology, 美国),FITC 标记的马抗鼠 IgG 孵育,二胺基苯基吡啶(DAPI)细胞核染色,荧光显微镜下观察、拍照、分析。

1.9 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测羊水 MSCs 中 Oct-4 mRNA 表达:分别取 5 个两步法和一步培养法 90% 融合第 6 代羊水 MSCs,用 TRIzol 法抽提细胞总 RNA。引物序列:Oct-4(247 bp)上游 5'-CGTGAAGCTGGAGAAGGAGAAGCTG-3',下游 5'-CAAGGGCCGCAGCTTACACATGTTC-3';内参照三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH, 450 bp)上游 5'-ACCACAGTCCATGCCATCA-3',下游 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。常规逆转录,PCR 反应条件:94 °C、30 s,58 °C、30 s,72 °C、30 s,35 个循环;72 °C 延长 10 min。琼脂糖凝胶电泳后用 Smartview 软件分析。

1.10 羊水 MSCs 的诱导分化培养^[2]:取第 3~4 代羊水 MSCs 接种于涂布多聚赖氨酸的 6 孔培养板,待细胞生长至完全融合后,加入预诱导液培养 24 h;去除预诱导液,加入含 β -巯基乙醇的诱导液,培养 5 h;去除诱导液,加分化维持培养液培养,每隔 3 d 换液 1 次。于不同时间点在倒置相差显微镜下进行活细胞形态观察,照相并固定细胞,进行神经元特异性烯醇化酶(NSE)、神经胶质酸性蛋白(GFAP)免疫细胞化学检查。将细胞用免疫荧光染色后,在荧光显微镜下随机记数 500 个细胞,计算阳性细胞百分率。所用一抗分别为鉴定表达神经元的特异性蛋白 NSE、表达神经干细胞的特异性蛋白 Nestin、表达神经胶质细胞的特异性蛋白 GFAP 抗体。

1.11 统计学方法:采用 SPSS 10.0 统计软件,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 羊水 MSCs 的分离和培养(彩色插页图 1):孕

中期羊水细胞原代培养(一步法)7 d 后,可见散在的梭形细胞为主、类成纤维细胞的 MSCs 集落;14 d 后可达 80% 以上融合;而两步法第二步培养 3 d 就可达 80% 以上融合。传代细胞在 12 h 内完全贴壁,经过 1~2 d 潜伏期后增殖迅速,培养 6~7 d 可达 90% 融合,细胞排列有一定的方向性,呈漩涡状、辐射状排列,细胞为长梭形,相互之间界限不清。

2.2 羊水 MSCs 核型分析(图 2):两种培养方法所得羊水 MSCs 的染色体核型为正常二倍体核型。

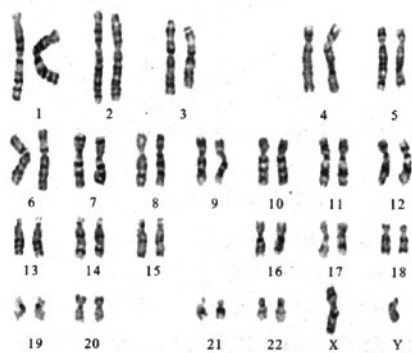


图 2 一步法和两步法培养人羊水 MSCs 核型分析

2.3 羊水 MSCs 生长曲线(图 3):两种培养方法所得羊水 MSCs 生长曲线均呈“S”形。但两步法羊水 MSCs 在 (6.1 ± 0.5) d 达高峰,显著快于一步法 $[(7.2 \pm 0.6)$ d, $P=0.035$],且高峰时的细胞计数 $[(130.0 \pm 110.0) \times 10^3/\text{ml}]$ 显著高于一步法 $[(110.0 \pm 0.8) \times 10^3/\text{ml}$, $P=0.018$];群体倍增时间也显著快于一步法 $[(40.2 \pm 5.8)$ h 比 (48.3 ± 5.4) h, $P=0.015$]

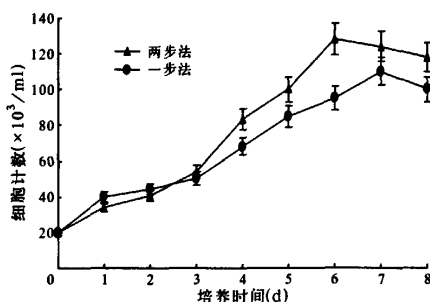


图 3 一步法和两步法培养人羊水 MSCs 生长曲线

2.4 羊水 MSCs 细胞周期(图 4):流式细胞仪检测结果显示两步法培养第 3 代羊水 MSCs 时 S 期细胞占 $(14.0 \pm 2.3)\%$,显著多于一部法 $(9.0 \pm 1.4)\%$ ($P=0.031$),提示两步法羊水 MSCs 增殖较活跃。

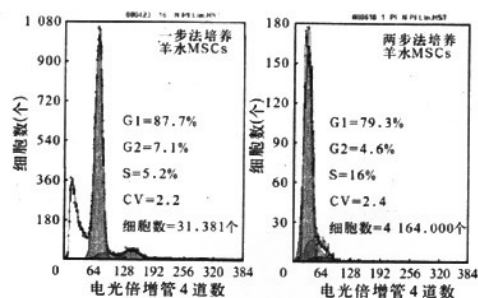


图 4 流式细胞仪检测一步法和两步法培养人羊水 MSCs 细胞周期

2.5 羊水 MSCs 的集落形成能力(彩色插页图 5):用两种方法获得的羊水 MSCs 低密度种植 7 d 后,均可形成散在的细胞集落,但两步法集落形成率 $[(15.0 \pm 2.3)\%]$ 显著多于一部法 $[(10.0 \pm 1.8)\%$, $P=0.021$]

2.6 羊水 MSCs 表面抗原特性(彩色插页图 6):流式细胞仪检测显示,羊水 MSCs 表达 CD44、CD29、CD105,而 CD34、CD45、HLA-DR 表达呈阴性。

2.7 羊水 MSCs 中 Oct-4 表达(彩色插页图 7):免疫荧光检测表明羊水中含有 Oct-4 阳性细胞,两步法羊水 MSCs 中 Oct-4 阳性细胞率 $[(1.2 \pm 0.3)\%]$ 显著多于一部法 $[(0.9 \pm 0.2)\%$, $P=0.041$]

2.8 羊水 MSCs 中 Oct-4 mRNA 表达(图 8):RT-PCR 分析表明两种方法获得的羊水 MSCs 中均有 Oct-4 mRNA 表达;但凝胶分析结果显示,两步法羊水 MSCs 的吸光度(A)值为 4.0 ± 0.6 ,显著多于一部法 (3.0 ± 0.3) , $P=0.042$ 。

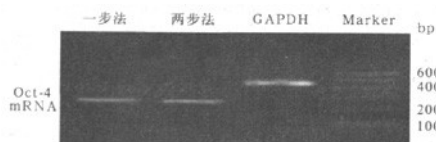


图 8 RT-PCR 检测一步法和两步法培养人羊水 MSCs 中 Oct-4 mRNA 表达

2.9 羊水 MSCs 诱导分化结果(彩色插页图 9):预诱导后约 12 h,细胞由细长梭形变为圆形或短梭形,伸出不规则短突起,6 h 后可见突起逐渐缩短,形成悬浮生长的细胞球。预诱导 24 h 进行免疫荧光染色,神经干细胞的特异性蛋白 Nestin 表达阳性。诱导 5 h 后,绝大多数细胞呈锥形,细胞突起可进一步伸长,立体感强,部分细胞周围有光晕,类似神经元。细胞诱导分化后在分化维持培养液中继续培养,

可维持细胞存活较长的时间,可见细胞胞体呈锥形、三角形或不规则形,折光性强,有 2 个或多个突起,并有突起相互连接交织成网。细胞诱导后 5 h 进行免疫荧光染色,扁平的羊水 MSCs 中 NSE 表达阴性,具有神经细胞外形的羊水 MSCs 中 NSE 表达阳性或强阳性,胞核和胞质染色,突起不染。显微镜下计数阳性细胞, NSE 阳性细胞占细胞总数的 $(54.76 \pm 3.65)\%$, GFAP 阳性细胞占细胞总数的 $(36.28 \pm 4.27)\%$ 。

3 讨论

MSCs 是目前干细胞研究领域的热点,是组织工程重要的种子细胞之一^[5],也是基因治疗的理想靶细胞^[6]。近年来研究发现,羊水细胞中含有多种干细胞的标记物,且在体外通过特殊的诱导微环境分化成多种不同类型的细胞,这使羊水来源的干细胞成为干细胞研究的一个新热点。

但如何从羊水中分离、培养出纯净胎儿 MSCs 是近年研究者关注的问题。Gronthos 等^[7]曾根据 MSCs 表面表达的 STRO21 和 CD106 对其进行分离,获得了纯度较高的细胞,但数量非常少,其增殖、分化能力也受到损害,且采用免疫磁珠分离和流式细胞仪分选价格昂贵。Tsai 等^[8]运用新的两步培养方法(第一步羊水细胞培养,第二步 MSCs 培养)从孕中期(4~6 个月)羊水中分离获得多能 MSCs。本研究中在 Tsai 等的基础上,采用一种简化的两步培养法分离和培养羊水 MSCs。与直接贴壁分离法(一步法)进行比较,表明两种方法均能获得大量的胎儿 MSCs,其细胞形态和表面抗原表达均与文献报道羊水中胎儿 MSCs 的特点^[5,9]吻合。且两步法分离、培养的胎儿 MSCs 群体倍增时间显著快于一步法, S 期细胞所占比例显著高于一步法,说明两步法 MSCs 增殖更加活跃;另外, Oct-4 阳性细胞比例也明显高于一步法。

羊水细胞可以被分为羊膜上皮样细胞、羊水特异细胞和成纤维细胞样细胞。成纤维细胞样细胞被认为是来源于间充质组织,通常在常规培养的晚期出现^[4]。而两步培养法不但较常规培养延长,且细胞在形态学特征上也与成纤维细胞样细胞相似,因此我们认为羊水干细胞可能来源于间充质组织,两步法也就较一步法可能得到更多的 MSCs。

Oct-4 是转录因子 POU 家族(包括 Pit、Oct、Unc 3 种)中的一员,是决定干细胞全能性和自我更新能力的关键物质^[10]。羊水细胞中存在 Oct-4 阳性的事实提示羊水中含有比 MSCs 发育更原始,增殖

和分化能力更强,更接近胚胎干细胞的细胞存在,这可能也是两步培养法获得的羊水 MSCs 增殖能力显著强于一步法的原因之一。

2007 年 Cipriani 等^[11]发现羊水来源 MSCs 移植入正常鼠大脑的多个区域并保持存活,而且在注入脑缺血模型鼠的脑缺血区外围时具有向损伤区域迁移的能力。而影响 MSCs 向神经细胞、胶质细胞系统定向分化的因素比较复杂,目前诱导 MSCs 在体外分化成为神经细胞的方法有抗氧化剂诱导和生长因子诱导,二者比较,前者较快速、分化率较高,但其诱导作用机制尚不清楚。研究证实,活性氧在细胞增殖分化过程中起到第二信使的作用^[12],抗氧化剂是否通过改变骨髓 MSCs 内的氧化还原状态使其分化为神经细胞有待进一步研究。另外,细胞的增殖和分化受各种生长因子和细胞因子联合作用影响,在这些因素中,神经营养因子的作用尤为关键。本实验中,羊水 MSCs 经诱导后可分化为神经干细胞样细胞,具有与神经干细胞相同的悬浮、成球生长,表达 Nestin 的特点,而诱导 5 h 后,则能够进一步诱导羊水 MSCs 向神经细胞方向分化,诱导分化后的细胞在含有表皮细胞生长因子(EGF)和 bFGF 的分化维持培养液中继续培养,可维持细胞存活较长的时间,说明两步培养法是可行、有效的,来源于羊水的 MSCs 具有广谱的分化潜能和显著的可塑性。

参考文献

- [1] Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*, 2003, 108(7): 863-868.
- [2] 常颖, 齐欣, 卜丽莎, 等. 成人骨髓间充质干细胞体外多向分化潜能特性的研究. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(2): 95-97.
- [3] Kakishita K, Nakao N, Sakuragawa N, et al. Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res*, 2003, 980(1): 48-56.
- [4] Prusa AR, Hengstschlager M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. *Med Sci Monit*, 2002, 8(11): RA253-257.
- [5] Tremain N, Korkko J, Ibberson D, et al. MicroSAGE analysis of 2 353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. *Stem Cells*, 2001, 19(5): 408-418.
- [6] Van Damme A, Vanden Driessche T, Collen D, et al. Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2002, 2(2): 195-209.
- [7] Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 9): 1827-1835.

- [8] Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, et al. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. Hum Reprod, 2004, 19(6):1450-1456.
- [9] Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood, 2001, 98(8):2396-2402.
- [10] Pesce M, Anastassiadis K, Schöler HR. Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells. Cells Tissues Organs, 1999, 165(3-4):144-152.
- [11] Cipriani S, Bonini D, Marchina E, et al. Mesenchymal cells from human amniotic fluid survive and migrate after transplantation into adult rat brain. Cell Biol Int, 2007, 31(8):845-850.
- [12] Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. EMBO J, 1991, 10(8):2247-2258.

(收稿日期:2009-08-01)

(本文编辑:李银平)

• 基层园地 •

一起群体氧化乐果和甲胺磷农药重度中毒 23 例抢救成功报告

韩建云 达天武 陈勇 何永春 朱树杰 谢桂萍 李翠萍 陶红梅 尚春艳 常有能 王红军

【关键词】 群体中毒事件; 氧化乐果; 甲胺磷; 中毒; 应急预案

成功救治 23 例因食用含氧化乐果、甲胺磷的汤圆而中毒患者, 报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料: 23 例患者中男 17 例, 女 6 例; 年龄 5~81 岁, 平均 56.8 岁; 均有出汗, 全身乏力, 头昏伴恶心、呕吐, 双侧瞳孔直径缩小约 0.1~0.2 cm。5 例腹泻; 6 例呼吸困难; 4 例意识恍惚; 心率均 > 62 次/min, 最高达 154 次/min; 10 例双肺可闻及湿啰音; 所有患者四肢肌力有不同程度降低, 最低为 I 级。诊断标准按照《食物中毒诊断标准及技术处理总则》(GB14938-94) 进行诊断。

1.2 辅助检查: 肌酸激酶(CK) 186~1 600 mmol/L, 于中毒第 3 日达高峰; 2 例肝功能异常, 转氨酶升高; 1 例肾功能轻度损害。心电图检查: 快速心房颤动 1 例, 窦性心动过速 8 例, 窦性心律、前间壁陈旧性心肌梗死(心梗) 1 例, 窦性心律 13 例。入院血钾低于 3.5 mmol/L 9 例, 最低 2.08 mmol/L, 其余均正常。

1.3 化验结果: 省疾病预防控制中心(CDC) 对患者食用汤圆及呕吐物进行检测, 确定患者为氧化乐果、甲胺磷中毒。

1.4 治疗: 所有患者进行有效洗胃、应用 M 胆碱受体阻断剂阿托品与胆碱酯酶复活剂氯解磷定及自配导泻磷解胃肠剂; 纠正水、电解质紊乱, 给予速尿、法莫替丁、古拉定、血必净注射液、维生素 C

等治疗。6 例患者口唇、肢端甲床进行性发绀, 意识不清, 呼吸衰竭甚至迅速出现呼吸停止, 给予及时机械通气。

1.5 结果治疗: 治疗 1 周后 7 例痊愈出院, 2 周后 13 例痊愈出院, 3 周后 3 例痊愈出院; 1 例重症患者呼吸机辅助呼吸 16 d, 25 d 后康复出院; 所有患者呼吸衰竭改善, 肌力恢复正常, 无一例死亡。

2 救治措施

本院急诊科接诊首批几例中毒患者后, 立即启动重大事故紧急抢救预案, 按抢救分工迅速组成领导指挥组、专家治疗组、护理抢救组、生命监测组、病情观察治疗组、呼吸道观察治疗组、血液灌流(HP)组、后勤保障组。指挥组 24 h 值班, 统一指挥。专家治疗组每人负责 2~3 例患者, 制定统一治疗原则。病情观察治疗组由医师执行治疗方案, 动态观察、评估患者病情。护理组负责接诊、洗胃、呕吐物取样送检、输液、抽血等。生命监测组负责生命体征监测。呼吸道观察治疗组由麻醉科医师组成, 负责患者呼吸状况监测, 有呼吸衰竭者立即行气管插管机械通气。HP 组由血液净化室医师、护士组成。后勤保障组负责调集病床、洗胃机、药品及维护正常的抢救秩序, 按“重症先救”的原则, 协助医护人员分别安置患者, 为洗胃、输液等快速有序抢救提供了基本保障。入院 3 h 内 23 例患者均完成洗胃和输液等处理。考虑有机磷农药中毒, 取首次呕吐物送省 CDC 检测, 确定为氧化乐果、甲胺磷中毒。

催吐、洗胃是抢救口服中毒的关键。

本组 23 例患者次日均再次洗胃, 对其中 20 例患者采用 HP 清除体内毒物; 1 例危重患者给予 2 次 HP 治疗。确诊后立即使用氯解磷定, 1 h 内达到阿托品化并维持, 一般在患者较烦躁时减量。在病程早期(3~7 d 内)每次减量最多为原用量的 1/3, 或将用药间隔时间延长 1/3, 对于重症患者最好先减量再延长间隔时间。在病情基本稳定后, 可适当增大减量幅度, 改为肌肉注射或口服。在抢救的同时密切观察生命体征的变化。6 例患者行机械通气, 6 h 后拔管, 仍有 3 例反复出现口唇、肢端甲床发绀, 意识不清, 呼吸衰竭, 行气管切开后延长通气时间。

3 讨论

启动重大事故抢救预案为成功救治奠定了基础, 基层县级医院应对突发大批中毒患者时, 调动全院力量, 有秩序地组织抢救工作, 对成功抢救起重要作用。建立健全的急救制度, 采取分组救治方案, 既分工又密切协作, 是抢救成功的保证。我们启用了抢救应急预案, 将患者和抢救物资、人员集中在一个地方, 统一指挥, 统一抢救, 极大地提高了抢救成功率, 为抢救生命赢得了宝贵时间。

准确诊断是前提, 快速清除毒物及恰当应用解毒剂是抢救成功的关键, 适时及时机械通气是抢救成功的保障。

(收稿日期:2009-07-30)

(本文编辑:李银平)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.

2009.12.010

作者单位: 652400 云南泸西县人民医院

两步法分离和培养人羊水来源胚胎间充质干细胞
及其向神经元样细胞诱导分化的实验研究

(正文见729页)

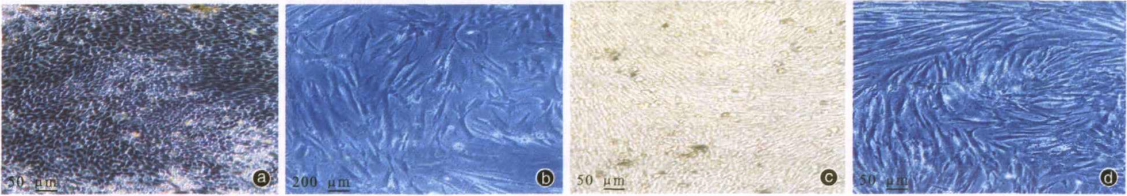


图1 显微镜下观察人孕中期羊水 MSCs 原代培养 7 d 后可见梭形细胞为主、类成纤维细胞的 MSCs 集落(a)，一步法培养 14 d 后细胞达 80 % 融合(b)，两步法第二步培养 3 d 细胞即可达 80 % 融合(c)，培养 6 ~ 7 d 可达 90 % 融合(d) × 50

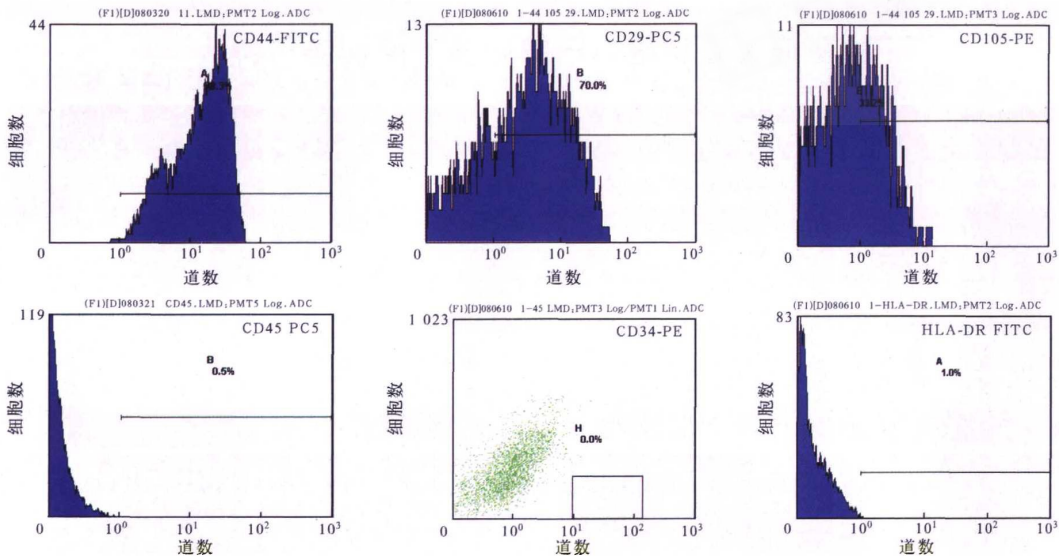


图6 流式细胞仪检测羊水 MSCs 表面抗原表达，其中 CD44、CD29、CD105 表达阳性，CD34、CD45、HLA-DR 表达阴性

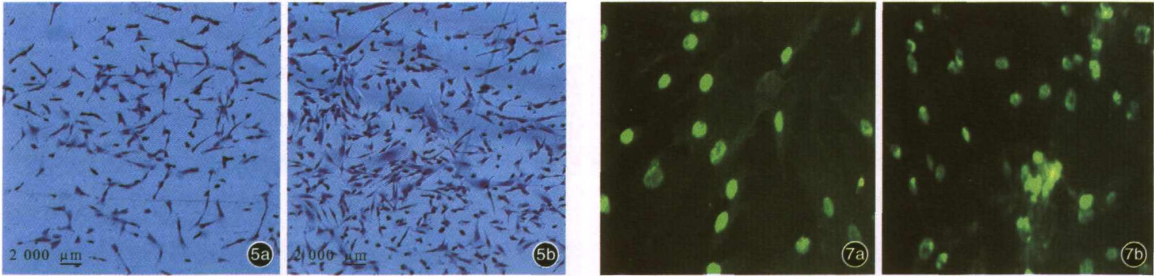


图5 显微镜下观察一步法(a)和两步法(b)培养 90 % 融合的第 3 代羊水 MSCs 均可形成散在的细胞集落，两步法集落形成率较一步法显著增高 瑞士染色 × 50 图7 荧光显微镜下观察一步法(a)和两步法(b)培养的第 6 代羊水 MSCs 中含有 Oct-4 阳性细胞，两步法 Oct-4 阳性细胞比例较一步法明显增高 免疫荧光 × 100

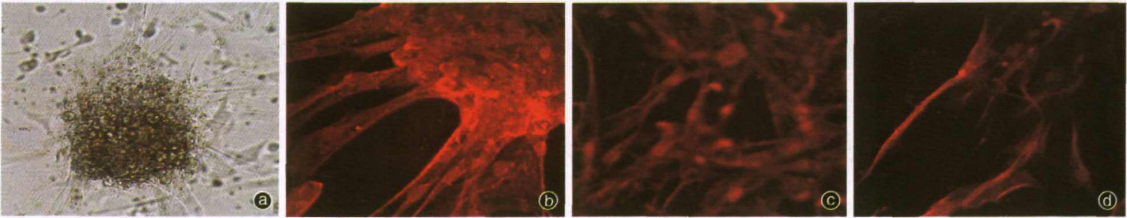


图9 荧光显微镜下观察羊水 MSCs 体外诱导分化为神经细胞 预诱导后 24 h，形成悬浮生长的细胞球(a) × 100，诱导分化 48 h，神经干细胞的特异性蛋白 Nestin 呈阳性表达(b)，具有神经细胞外形的羊水 MSCs 中NSE 呈阳性或强阳性表达，胞核和胞质染色，突起不染色(c)，GFAP 呈阳性表达(d) 免疫荧光 × 200