

• 论著 •

大鼠骨髓间质干细胞修复缺氧/缺血性脑损伤的研究

余 勤¹, 王 艳¹, 连俊兰², 白月双¹

(1. 浙江中医药大学生物工程学院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江省杭州市红十字会医院儿科, 浙江 杭州 310003)

【摘要】 目的 观察大鼠骨髓间质干细胞(rMSCs)移植对缺氧/缺血性脑损伤的修复作用。方法 从大鼠骨髓中分离 rMSCs 进行培养扩增。制备缺氧/缺血性脑损伤大鼠模型, 制模后第 3 日进行经 5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)标记的 rMSCs 脑内移植。移植后 7、14、21、30 d 进行 Y 迷宫实验检测大鼠的学习和记忆保持能力; 另取脑组织进行苏木素-伊红(HE)染色和免疫组化, 观察 rMSCs 对大鼠脑损伤的修复情况及 rMSCs 在脑内的定位。结果 Y 迷宫实验发现 rMSCs 移植组在各个时间点学习和记忆保持能力都优于模型组和 PBS 对照组(P 均 <0.01)。HE 染色发现缺氧/缺血性脑损伤模型大鼠主要表现为皮质、海马神经元变性、坏死, 神经胶质细胞增生, 胶质瘢痕形成。rMSCs 移植后损伤脑组织得到不同程度的修复, 移植的 rMSCs 在脑内存活, 并主要迁移到皮质、海马等损伤部位。结论 rMSCs 移植对缺氧/缺血性脑损伤大鼠模型的学习和记忆保持能力的恢复具有显著的促进作用; 其作用与移植的 rMSCs 向脑损伤部位的迁移和植活有关。

【关键词】 骨髓间质干细胞; 移植; 缺氧/缺血性脑损伤; 大鼠

中图分类号: R743; Q813.11 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.01.015

An experimental study on transplantation of rat bone marrow mesenchymal stem cells for repairing hypoxic/ischemic brain injury in rats YU Qin*, WANG Yan, LIAN Jun-lan, BAI Yue-shuang. * Bioengineering College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

【Abstract】 **Objective** To observe the influence of transplantation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (rMSCs) on repairing hypoxic/ischemic brain injury in rats. **Methods** rMSCs were separated from the rat bone marrow and cultured in culture medium to proliferate. The rat models of hypoxic/ischemic brain injury were set up. Three days after the establishment of models, rMSCs labeled by 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) were transplanted into the brain of a group of rats, the transplanted group. At the day 7, 14, 21, 30 after the transplantation, the study and memory abilities of the rats were observed by Y-maze test. After the animals were sacrificed, their brains were examined by hematoxylin and eosin (HE) staining and the immunohistochemistry method to observe the recovery of injured brain cells and the locations of rMSCs in the brain. **Results** At every time point, the Y-maze test showed that the study and memory abilities maintained in the transplanted group were significantly better than those in the model and control groups (all $P < 0.01$). The research of HE staining revealed that the pathological changes of rat hypoxic/ischemic brain damage were mainly neuron necrosis, neuroglia proliferation and scar formation in the areas of cortex and hippocampus. The injured brain tissues were repaired to a certain extent after the transplantation of rMSCs. The transplanted rMSCs could survive and migrate to the injury site especially to the cortex and hippocampus. **Conclusion** The transplantation of rMSCs may significantly improve the learning capacity and remarkably ameliorate memory deficits in rats with hypoxic/ischemic brain injury. The effect is due to the survival and migration of rMSCs to the injury site in the brain.

【Key words】 bone marrow mesenchymal stem cell; transplantation; hypoxic/ischemic brain injury; rat

缺氧/缺血诱导的脑损伤是一种弥漫性、进行性的神经元坏死和神经元程序性死亡。缺氧/缺血几小时后脑内即可出现一批神经元死亡, 而且这种损伤

能持续几周甚至几个月, 这种持续神经元丢失可能导致长期甚至永久性神经功能缺陷^[1]。目前对缺氧/缺血性脑损伤缺乏有效的治疗手段, 仍采取以支持治疗为主的综合治疗方法^[2]。骨髓间质干细胞(MSCs)是一类存在于骨髓中的非造血干细胞, 体外培养扩增迅速, 并具有多向分化潜能^[3-4]。国内外多项研究表明, MSCs 在体外通过抗氧化剂、生长因子、中药等诱导可以分化为神经元样细胞和神经胶

基金项目: 国家中医药管理局科研基金资助项目(国中医药科 2003LHR11); 浙江省教育厅重点科研项目(20060709); 浙江省卫生厅科研基金资助项目(2006A092)

作者简介: 余 勤(1962-), 女(汉族), 浙江省人, 教授, 博士生导师, Email: qinyu3587@yahoo.com.cn.

质细胞^[3,5]。体内移植研究尚起步不久,有结果显示在体内的环境中 MSCs 可分化为神经细胞,并可改善损伤的神经功能^[6],但其具体作用机制尚不明确。本实验中将大鼠骨髓间质干细胞(rMSCs)移植到缺氧/缺血性脑损伤大鼠的损伤局部,观察移植细胞在脑内的成活及迁移情况,旨在探讨该治疗方案对大鼠缺氧/缺血性脑损伤治疗的可行性及相关机制。

1 材料与方法

1.1 缺氧/缺血性脑损伤动物模型制备和实验分组:体重(120±10)g 雄性 Wistar 大鼠用于采集骨髓,体重(80±10)g 雄性 Wistar 大鼠用于制模,均由浙江中医药大学实验动物中心提供。将 138 只大鼠按随机数字表法分为模型组($n=35$)、假手术组($n=35$)、rMSCs 移植组($n=34$)和磷酸盐缓冲液(PBS)对照组($n=34$)。腹腔注射水合氯醛麻醉大鼠后游离并结扎左侧颈总动脉。经 2~3 h 大鼠苏醒后置于通以体积分数为 8%氧气和 92%氮气的混合气体密闭容器中,以 1.5 L/min 的流量持续通气 2.5 h 制成缺氧/缺血性脑损伤动物模型。模型组制模后不给予任何治疗;假手术组仅分离左侧颈总动脉,而不结扎血管、不通气体,手术后也不给予任何治疗;rMSCs 移植组制模后 3 d 于脑损伤局部注射 rMSCs 悬液;PBS 对照组制模后 3 d 于脑损伤局部注射 PBS。大脑皮质注射点为前囟前 3.8 mm、左侧 3.0 mm、颅骨下 2.5 mm 处;海马注射点坐标为前囟前 3.8 mm、左侧 2.0 mm、颅骨下 3.5 mm 处。每只大鼠注射两个位点,用微量进样器抽取移植待用的细胞悬液或 PBS 溶液,每个位点注射 5 μ l[(2.5~5.0)×10⁵个细胞],注射速度 1 μ l/min,注射完毕停针 10 min,并以 1 mm/min 速度缓慢退针,退针后用骨蜡封闭针孔,常规消毒后缝合切口。

1.2 rMSCs 分离、培养、鉴定及体外标记:参照本研究小组已建立的方法^[7]进行。将传至第 3 代的 rMSCs 培养 2~3 d 后,弃去原培养基,加入含终浓度为 10 μ mol/L 5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷(BrdU,美国 Sigma 公司)的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)/F12 1:1 培养液(美国 Invitrogen 公司)避光继续培养 3 d。3 d 后当细胞融合达 90%左右时,部分细胞用胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化,收集细胞用多聚甲醛水溶液固定 24 h,石蜡包埋,切片做免疫组化,镜下观察 BrdU 阳性细胞,统计阳性率。另一部分细胞经消化后收集,用含胎牛血清(FCS,美国 Gibco 公司)的 DMEM/F12 1:1 培养液制成浓度为(0.5~1.0)×10⁵个细胞/ μ l 的

细胞悬液待用,移植前取微量做锥虫蓝染色检测细胞活性。

1.3 行为学检测(交替电刺激 Y 迷宫实验):参照文献[8]报道的方法进行实验。rMSCs 移植组和 PBS 对照组于移植后 7、14、21、30 d 各随机选 8 只大鼠进行 Y 迷宫实验,模型组和假手术组则分别于术后 10、17、24、33 d 各随机选 8 只大鼠进行 Y 迷宫实验,记录各组大鼠实验后 2 d 记忆保持阶段跑步的总错误次数(TE)。

1.4 组织学检查:模型组和假手术组分别于术后 1、4、6、10、17、24、33 d 各随机选取 3 只大鼠,经心脏灌注多聚甲醛水溶液固定取脑。rMSCs 移植组和 PBS 对照组于移植后 1、3、7、14、21、30 d 各随机选取 3 只大鼠,经心脏灌注多聚甲醛水溶液固定取脑。将取出的脑组织再用多聚甲醛水溶液固定 24 h 取冠状位切下注射点前后各 2 mm 的组织块,经修剪后制成石蜡包块,沿冠状位做 4 μ m 厚的切片,每隔 20 μ m 取 1 张行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察脑组织局部的病理变化。脑组织 BrdU 免疫组化鉴定:石蜡切片经烘烤后行二甲苯脱蜡、乙醇水化,过氧化氢封闭 20 min, HCl 室温 30 min,胰酶 37 $^{\circ}$ C 10~15 min,血清封闭 3~5 min,小鼠抗 BrdU 单克隆抗体(1:100,福州迈新生物科技有限公司)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。24 h 后用辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠 IgG 二抗(美国 DAKO 公司)在 37 $^{\circ}$ C 温箱中孵育 1 h,三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲盐溶液(TBS)清洗,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色 3~10 min,苏木素复染,乙醇梯度脱水,封片,光镜下观察 BrdU 阳性细胞在脑内的分布。

1.5 统计学处理:计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用方差分析和 t 检验;计数资料用百分比表示,采用 χ^2 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 rMSCs 的 BrdU 体外标记:标记了 BrdU 的第 3 代 rMSCs 仍保持了原有的形态结构,且增殖速度未减缓,锥虫蓝染色显示细胞活性达 90%以上。免疫组化结果显示 BrdU 阳性细胞为细胞核呈棕褐色(彩色插图图 1),阳性细胞占总细胞数的(50.44±1.35)%,经 χ^2 检验与 PBS 对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 大鼠行为学评价(表 1):各组大鼠于相应时间点分别跑 Y 迷宫。第一阶段为学习期,进行 40 次尝试训练,使大鼠建立这种空间记忆模式,本期只做训练不记录任何结果。第二阶段为测试大鼠的记忆保

持能力,记录跑步的 TE。结果 rMSCs 移植组在各个时间点跑步的 TE 均显著少于模型组和 PBS 对照组(P 均 <0.01)。

表 1 各组大鼠移植后不同时间点 Y 迷宫实验的跑步 TE 比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	TE(次)			
	7 d	14 d	21 d	30 d
模型组	13.50 $\pm$ 0.93	15.00 $\pm$ 0.53	15.63 $\pm$ 0.92	16.00 $\pm$ 0.76
假手术组	3.88 $\pm$ 0.64 ^b	3.13 $\pm$ 0.64 ^b	3.63 $\pm$ 0.74 ^b	3.50 $\pm$ 0.93 ^b
PBS 对照组	14.63 $\pm$ 0.92 ^{ac}	15.75 $\pm$ 0.71 ^{ac}	16.13 $\pm$ 0.64 ^{ac}	16.25 $\pm$ 1.28 ^{ac}
rMSCs 移植组	7.75 $\pm$ 0.46 ^{bcd}	7.75 $\pm$ 0.89 ^{bcd}	7.25 $\pm$ 0.71 ^{bcd}	7.13 $\pm$ 0.35 ^{bcd}

注:与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与假手术组比较,^c $P<0.01$;与 PBS 对照组比较,^d $P<0.01$;与本组移植后 7 d 比较,^e $P<0.01$

2.3 脑组织病理学改变:HE 染色显示,假手术组神经细胞形态、结构正常。模型组术后 1、4、6、10 d 可见神经元细胞变性、坏死(彩色插页图 2);病灶周围有胶质细胞增生,有软化灶形成(间质呈空网状),病灶中心有大量固缩核和核碎片(彩色插页图 3);神经元大量丢失,大脑皮质、海马、丘脑、纹状体部位形成胶质瘢痕。PBS 对照组与模型组病理改变相似,与模型组和 PBS 对照组比较,rMSCs 移植组相应时间点神经细胞变性、坏死数量及程度显著减轻。

2.4 脑组织 BrdU 免疫组化结果:模型组、假手术组、PBS 对照组 BrdU 呈阴性。rMSCs 移植组移植后 1 d 在注射点附近(皮质、海马交界部)有 BrdU 阳性细胞(彩色插页图 4);3 d 时阳性细胞迁移到脑室附近的室管膜周围(彩色插页图 5);7、14、21 d 阳性细胞逐渐向损伤侧的皮质、海马区、纹状体迁移,且分布区域逐步扩大,细胞数目逐渐增多;30 d 时在大脑损伤侧仍可发现数量较多的 BrdU 阳性细胞。

3 讨论

MSCs 取材容易,分离、培养、扩增及外源性基因的转染方法相对成熟,可经体外扩增或利用基因工程修饰后自体植入,不存在伦理学和免疫排斥等问题,在目前临床对缺氧/缺血性脑损伤等缺乏有效治疗手段的同时,MSCs 移植治疗神经系统疾病成为当今医学界研究的热点之一^[9]。

BrdU 是 DNA 前体胸腺嘧啶核苷酸的类似物,在细胞周期 S 期时细胞正处于 DNA 合成阶段,此时掺入的 BrdU 就会被掺入到新合成的 DNA 中去,起到标记细胞的目的。我们发现经 BrdU 标记的细胞移植前活性均在 90% 以上,说明 BrdU 对细胞无毒副作用。BrdU 阳性率高低与标记浓度、标记时间、标记密度等有关。我们在实验中采用 10 $\mu\text{mol/L}$

的终浓度在细胞移植前 3 d 进行标记,结果 BrdU 平均标记阳性率达(50.44 $\pm$ 1.35)%。至于何种密度时加入 BrdU 可使其标记阳性率最高还有待于进一步研究。

Li 等^[10]将 MSCs 移植到大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型体内,使用改良的神经系统疾病严重程度评分(mNSS)评定大鼠神经功能,发现实验组大鼠的运动及躯体感觉功能均明显恢复,其 mNSS 较对照组改善明显。表明 MSCs 移植治疗神经功能缺损是有效及可行的。本实验结果也表明,rMSCs 移植对缺氧/缺血性脑损伤大鼠动物模型学习和记忆保持能力的恢复具有显著促进作用,提示 MSCs 移植是治疗缺氧/缺血性脑损伤的有效方法。

MSCs 移植可治疗神经系统损伤性疾病,其作用机制可能是多方面的。首先,MSCs 作为干细胞移植后向病变部位的组织渗透融合,在脑组织中分化为神经元样细胞和神经胶质细胞,替代发生坏死和凋亡的神经细胞,重建神经环路从而达到恢复神经功能的目的。其次,MSCs 进入脑与宿主脑组织相互作用,可自分泌或旁分泌一些细胞因子。有实验证明这些细胞因子在鼠脑海马细胞的生存、生长及分化中发挥作用^[11],它们可作用于损伤神经元的有关神经营养因子受体,通过受体信号转导系统激活生存信号、失活死亡信号,最终产生神经细胞保护作用^[12-13]。这一机制已基本得到公认。另外,MSCs 移植后向病变部位迁移也是 MSCs 发挥作用的必要条件。我们发现 rMSCs 进入脑后优先集中于患侧的大脑皮质、海马、纹状体等部位,并随时间推移可在患侧脑区逐步迁移;模型大鼠学习和记忆保持能力的恢复与移植的 rMSCs 向脑损伤部位迁移和植活有关。这一现象的具体机制尚不清楚,可能是受损脑区血脑屏障的开放易于 MSCs 进入该区域。有研究表明,MSCs 激活了存在于室管膜下区的神经干细胞,被激活的神经干细胞进一步分化为神经细胞,起到脑保护作用^[14]。

参考文献

- [1] Mishima K, Ikeda T, Aoo N, et al. Hypoxia-ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brain damage related to memory impairment[J]. *Neurosci Lett*, 2005, 376(3):194-199.
- [2] 谭翱. 重型颅脑损伤的治疗进展[J]. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(5):317-319.
- [3] 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[J]. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(2):95-97.
- [4] 方利君, 付小兵, 孙同柱, 等. 猪骨髓间充质干细胞的分离培养及分化潜能的鉴定[J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15(10):606-608.

- [5] 余勤, 连俊兰, 郭莹. 丹参注射液诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞的实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13(4): 210-213.
- [6] 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.
- [7] 余勤, 连俊兰, 王艳, 等. 大鼠骨髓间质干细胞体外培养扩增及生物学特性研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2006, 30(2): 189-192.
- [8] 余建, 黄育文, 陈忠. 经过改良的评价大鼠空间记忆能力的交替电刺激 Y 型迷宫[J]. 浙江大学学报(医学版), 2003, 32(2): 121-125, 140.
- [9] 都义日, 付小兵, 李存保. 骨髓间充质干细胞的研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(8): 499-501.
- [10] Li Y, Chen J, Zhang CL, et al. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cell[J]. Glia, 2005, 49(3): 407-417.
- [11] Berezovskaya O, Maysinger D, Fedoroff S. Colony stimulating factor-1 potentiates neuronal survival in cerebral cortex ischemic lesion[J]. Acta Neuropathol, 1996, 92(5): 479-486.
- [12] 桂莉, 范文辉, 李露斯, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞移植后大鼠脑梗死区超微结构变化的研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(6): 523-525.
- [13] 白晓东, 付小兵. 骨髓间充质干细胞诱导增殖分化信号的研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(5): 318-320.
- [14] Sato K, Iwai M, Nagano I, et al. Temporal and special changes of BrdU immunoreactivity in amygdala kindling development[J]. Neurol Res, 2002, 24(6): 593-596.

(收稿日期: 2008-10-25 修回日期: 2008-11-30)

(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

清开灵注射液加纳洛酮治疗急性重度酒精中毒疗效观察

吕超

(河南省驻马店市中医院急诊科, 河南 驻马店 463000)

【关键词】清开灵注射液; 纳洛酮; 酒精中毒; 重度

中图分类号: R242

文献标识码: B

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.01.016

急性酒精中毒是急诊内科常见的病症之一, 特别是重度酒精中毒可危及生命, 需要及时正确的抢救治疗。2006—2007 年我们应用中成药制剂清开灵注射液加纳洛酮对 24 例重度酒精中毒患者进行抢救治疗, 获得了满意的临床效果, 并随机抽取 2005 年 20 例未使用清开灵注射液的患者作对照, 现总结如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料: 44 例重度酒精中毒患者中男 40 例, 女 4 例, 年龄 17~56 岁, 饮酒过量至就诊时间 1~3 h, 患者均昏迷、感觉丧失、反射抑制或消失、二便失禁、呼吸循环抑制, 面色苍白、四肢湿冷、体温低于正常。部分患者伴呕吐胃内容物, 少数伴有血性液体、胆汁等。

1.2 分组与治疗: 对照组 20 例: 纳洛酮催醒、保肝、护心、解痉、制酸、保护胃黏膜、补液等。治疗组 24 例: 在对照组治疗的基础上, 加清开灵注射液 30~40 ml 加入质量分数为 5% 的葡萄糖(或生理盐水) 500 ml 中静脉滴注。治疗过程中密切观察患者的生命体征及意识状态, 瞳孔及反射活动。

作者简介: 吕超(1958—), 男(汉族), 河南省人, 副主任医师。

1.3 统计学处理: 计数资料采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.4 结果: 两组一般资料比较差异无统计学意义, 有可比性。对照组显效 16 例、有效 2 例、死亡 2 例, 治疗组分别为 20、4、0 例; 治疗组临床疗效显著优于对照组, 且平均清醒时间也明显短于对照组(3.5 h 比 5.5 h, P 均 < 0.05)。

2 讨论

酒精(乙醇)因其脂溶性, 可快速有效地从胃肠道吸收。经口摄入的乙醇, 胃仅吸收 20%, 其余经小肠吸收。摄入量的 80%~90% 在 30~60 min 内吸收。乙醇进入体内后经血液循环, 主要抑制中枢神经系统, 首先抑制大脑皮质功能, 使皮质下功能失去控制, 一时呈现兴奋状态, 当乙醇作用进一步加强时, 皮质下中枢及小脑受累, 最后抑制脑血管运动中枢和呼吸中枢。脑血管扩张, 循环减慢, 可出现脑水肿, 继而缺血、缺氧, 甚至神经细胞受损伤。呼吸中枢麻痹是引起死亡的主要原因。乙醇中毒尚无针对乙醇受体的特效解毒药。清开灵注射液是在安宫牛黄丸配方基础上制成的复方速效中药制剂, 具有醒脑开窍、营养脑细胞、改善脑循环、降低脑水肿、扩张脑血管、提高红细胞的携氧能力。现代研究认为该药具有拮抗 β -内啡肽的作用, 可改善脑细胞能量代谢, 清除氧自由基及其他有害物质^[1]。纳洛酮是阿片受体拮抗剂, 对抗脑损伤后脑内产生的内源性阿片肽对神经细胞的损害作用, 可改善脑循环、减轻脑水肿、保护神经细胞, 有利于神经细胞功能的恢复^[2-3]; 同时对乙醇中毒昏迷患者有一定的唤醒作用, 静脉注射 1~3 min 能缓解呼吸抑制, 增加呼吸频率。两药配合能有效解除乙醇对大脑的毒性作用, 加速缓解中毒所产生的各种临床症状。治疗方法简便易行, 安全可靠, 易于临床广泛应用。

参考文献

- [1] 孙承业. 灭鼠剂中毒诊治[J]. 中国临床医生, 2000, 28(4): 33-34.
- [2] 陈天铎, 董晨明, 李培杰. 纳洛酮用于心肺脑复苏 21 例疗效观察[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(3): 182.
- [3] 何民, 杜抗根, 殷利春, 等. 纳洛酮与醒脑静注射液联合治疗重型颅脑损伤疗效观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2003, 10(1): 58-59.

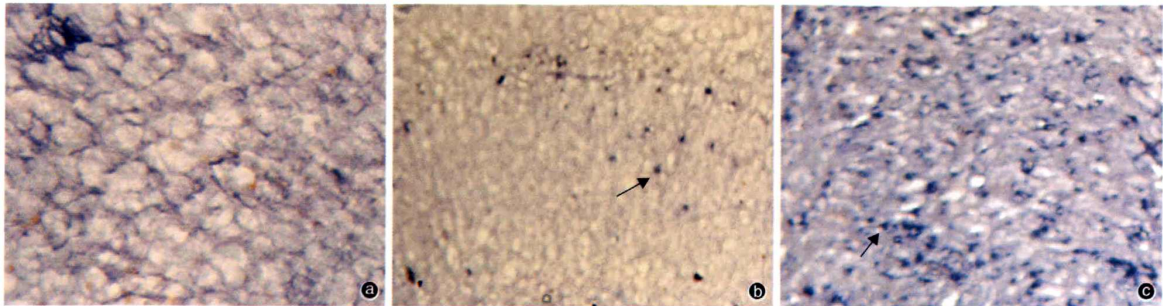
(收稿日期: 2008-09-26)

修回日期: 2008-10-28)

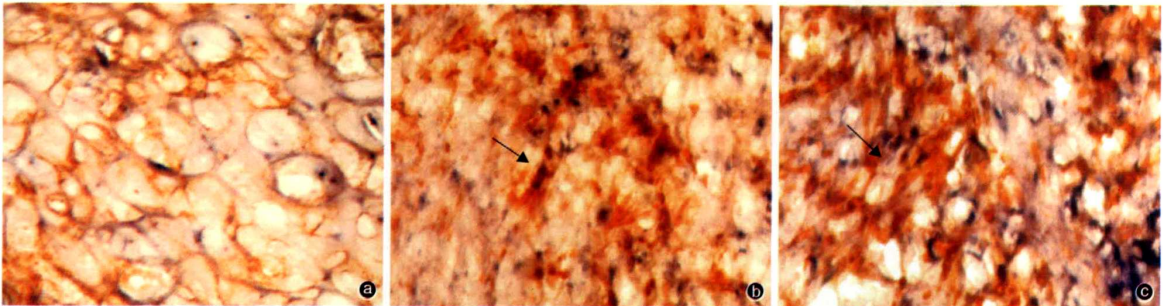
(本文编辑: 李银平)

补阳还五汤对脑缺血大鼠经侧脑室移植神经干细胞存活和分化的影响

(正文见22页)



①:空白移植组; ②:单纯移植组; ③:移植加中药组; 箭头示BrdU 阳性细胞
图1 物镜下观察补阳还五汤对脑缺血大鼠移植 NSCs 后 7 d 时细胞存活的影响(免疫组化, ×100)



①:空白移植组; ②:单纯移植组; ③:移植加中药组; 箭头示BrdU/NF200 双阳性细胞
图2 物镜下观察补阳还五汤对脑缺血大鼠移植 NSCs 后 7 d 时细胞分化的影响(荧光双标记免疫组化, ×100)

大鼠骨髓间质干细胞修复缺氧/缺血性脑损伤的研究

(正文见34页)

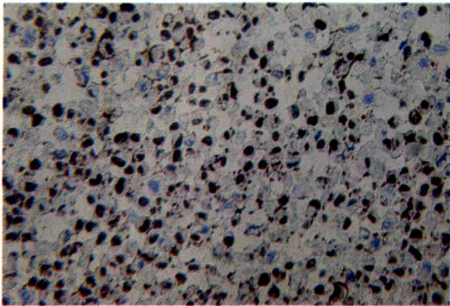


图1 培养至第3代的rMSCs体外标记BrdU 阳性(免疫组化, ×400)

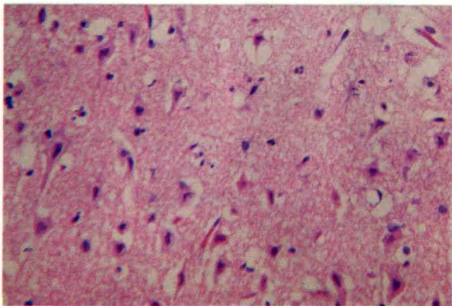


图2 模型组术后 1 d 脑组织和浓染, 和固缩, 神经元纤维疏松、水肿(HE, ×400)

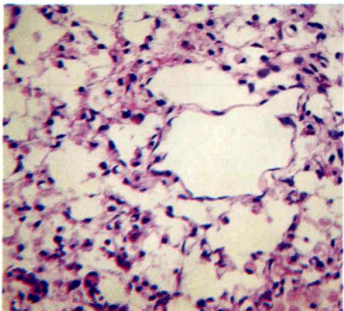


图3 模型组术后 6 d 脑组织病灶周围胶质细胞增生, 间质呈空网状, 软化灶形成(HE, ×400)

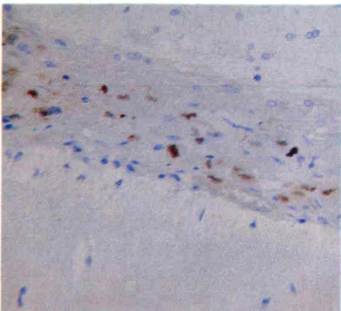


图4 rMSCs 移植组移植后 1 d 脑皮质、海马交界部有 BrdU 阳性细胞(免疫组化, ×400)

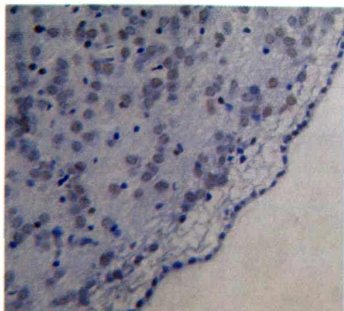


图5 rMSCs 移植组移植后 3 d BrdU 阳性细胞向脑室迁移(免疫组化, ×400)

大鼠骨髓间质干细胞修复缺氧/缺血性脑损伤的研究

作者：[余勤](#)，[王艳](#)，[连俊兰](#)，[白月双](#)，[YU Qin](#)，[WANG Yan](#)，[LIAN Jun-lan](#)，[BAI Yue-shuang](#)

作者单位：[余勤, 王艳, 白月双, YU Qin, WANG Yan, BAI Yue-shuang \(浙江中医药大学生物工程学院, 浙江, 杭州, 310053\)](#)，[连俊兰, LIAN Jun-lan \(浙江省杭州市红十字会医院儿科, 浙江, 杭州, 310003\)](#)

刊名：[中国中西医结合急救杂志](#) **ISTIC PKU**

英文刊名：[CHINESE JOURNAL OF INTEGRATED TRADITIONAL AND WESTERN MEDICINE IN INTENSIVE AND CRITICAL CARE](#)

年，卷(期)：2009，16(1)

被引用次数：0次

参考文献(14条)

1. 方利君;付小兵;孙同柱 [猪骨髓间质干细胞的分离培养及分化潜能的鉴定](#) [期刊论文]-[中国危重病急救医学](#) 2003(10)
2. 陈颖;齐欣;卜丽莎 [成人骨髓间充质干细胞体外多向分化潜能特性的研究](#) [期刊论文]-[中国危重病急救医学](#) 2005(02)
3. 谭翱 [重型颅脑损伤的治疗进展](#) [期刊论文]-[中国危重病急救医学](#) 2006(05)
4. 余建;黄育文;陈忠 [经过改良的评价大鼠空间记忆能力的交替电刺激Y型迷宫](#) [期刊论文]-[浙江大学学报\(医学版\)](#) 2003(02)
5. 余勤;连俊兰;王艳 [大鼠骨髓间质干细胞体外培养扩增及生物学特性研究](#) [期刊论文]-[浙江中医药大学学报](#) 2006(02)
6. Zhao LR;Duan WM;Reyes M [Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neuropathological deficits after grafting into the ischemic brain of rats](#) 2002(01)
7. 余勤;连俊兰;郭莹 [丹参注射液诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞的实验研究](#) [期刊论文]-[中国中西医结合急救杂志](#) 2006(04)
8. Mishima K;Ikeda T;Aoo N [Hypoxia-ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brain damage related to memory impairment](#) 2005(03)
9. Sato K;Iwai M;Nagano I [Temporal and special changes of BrdU immunoreactivity in amygdala kindling development](#) 2002(06)
10. 白晓东;付小兵 [骨髓间充质干细胞诱导增殖分化信号的研究进展](#) [期刊论文]-[中国危重病急救医学](#) 2004(05)
11. 桂莉;范文辉;李露斯 [大鼠骨髓间充质干细胞移植后大鼠脑梗死区超微结构变化的研究](#) [期刊论文]-[第三军医大学学报](#) 2004(06)
12. Berezovskaya O;Maysinger D;Fedoroff S [Colony stimulating factor-1 potentiates neuronal survival in cerebral cortex ischemic lesion](#) 1996(05)
13. Li Y;Chen J;Zhang CL [Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cell](#) 2005(03)
14. 都义日;付小兵;李存保 [骨髓间充质干细胞的研究进展](#) [期刊论文]-[中国危重病急救医学](#) 2004(08)

相似文献(10条)

1. 期刊论文 [连锋](#), [薛松](#), [吴学军](#), [张谷兰](#), [王小妹](#), [朱洪生](#), [LIAN Feng](#), [XUE Song](#), [WU Xue-jun](#), [ZHANG Ruo-lan](#), [WANG Xiao-mei](#), [ZHU Hong-sheng](#) [移植途径对骨髓间质干细胞梗死心肌移植疗效的影响](#) -[中国综合临床](#) 2009, 25(9)

目的 探讨自体骨髓间质干细胞(MSCs)不同移植途径对梗死区心肌收缩力、血管新生及胶原更新的影响.方法 贵州香猪32只,随机分为对照组(C组)、冠状动脉移植组(A组)、局部注射组(T组)、局部注射+动脉移植组(A+T组).抽取骨髓3 ml,按照Wakitani方法 培养出MSCs,经5-氮胞苷诱导后,5-溴脱氧尿苷(BrdU)标记备用.开胸结扎左冠状动脉前降支后,自体MSCs分别经结扎前降支远端灌注、局部注射、局部注射+动脉灌注移植入自体急性心肌梗死区域,对照组以同样方法 注射不含细胞的等量培养液(DMEM).术后3、6周取标本,免疫组化检测组织血管新生、体外药物刺激离体肌条检测心肌收缩情况和血浆Ⅲ型胶原N端肽(PⅢNP)活性.结果 MSCs移植后3周A、T、A+T组心肌收缩恢复〔(48.6±5.9)%,(42.1±6.2)%,(56.9±5.1)%〕、血管新生〔(19.6±4.3,17.1±4.0,23.2±5.5)、血浆PⅢ NP活性〔(4.6±0.5)μg/L,(5.9±0.7)μg/L,(3.9±0.3)μg/L〕较C组〔(37.9±5.4)%,13.2±3.8,(8.7±0.8)μg/L〕明显改善(P均<0.01),且随时间推移恢复程度增加,以A+T组为最显著(P均<0.05).结论 局部注射+冠状动脉灌注是较为理想的MSCs移植方式.

2. 学位论文 [朱文标](#) [人骨髓间质干细胞与胚胎嗅鞘细胞联合移植治疗大鼠脊髓损伤的实验研究](#) 2006

研究背景:

脊髓损伤是常见创伤,已经成为青壮年残疾、丧失劳动力的重要原因之一。脊髓损伤目前治疗的主要手段有药物治疗,手术治疗及康复训练。药物治疗主要针对减轻既发性损伤,目前有效药物种类少(目前临床常用并获得较广泛共识的仅为糖皮质激素类和神经节苷脂),强调药物应用的时效性,如损伤后8小时内大剂量甲强龙的松龙是唯一经美国食品及药物管理局(FDA)批准并通过Ⅲ期临床试验的药物。复位,减压,固定以维持脊柱的稳定,避免不适当的搬运方法及治疗手段造成脊髓的二次损伤及持续损伤是手术治疗首要解决的问题。手术治疗的另一方面是通过移植具有治疗作用的种子细胞,促进脊髓损伤的功能恢复。康复治疗的目的挖掘其自身潜力,最大限度地发挥残存功能,提高患者的生存质量。

脊髓损伤后造成损伤平面以下的肢体瘫痪是目前治疗上面临的最重要问题。目前认为移植具有治疗作用的种子细胞是这方面最有可能取得突破的方法。骨髓间质干细胞(marrowmesenchymalstemcells, MSCs)与嗅鞘细胞(olfactoryensheathingcells, OECs)是近年来倍受人们关注的候选种子细胞。骨髓间质干细胞从骨髓中分离,来源丰富,在体外培养能保持其多向分化潜能,可在脊髓损伤处长期存活并可向神经细胞方向分化替代丧失神经元参与重建神经传导通路,但仅在脊髓损伤微环境诱导下分化为神经元的数量很少,限制了其更好的发挥修复功能;经体外定向诱导为神经元样细胞后,细胞凋亡、死亡大量增加,植入体内后存活细胞很少。嗅鞘细胞是存在于嗅球的最外两层以及嗅黏膜上皮中的一种特殊的大胶质细胞,在嗅神经终生再生或修复中发挥重要功能,在一定程度上可促进脊髓损伤神经再生及轴突的髓鞘化。新的观点认为嗅鞘细胞在嗅觉系统中,不仅可通过分泌神经营养因子促进嗅神经元的存活及再生,而且可与嗅觉系统的干细胞相互作用,促进干细胞向神经方向分化,促进嗅神经的成熟。最近王葵光等发现嗅鞘细胞可以促进神经干细胞向神经元的分化,沈惠勇等认为嗅鞘细胞可以启动与之共培养的骨髓间质干细胞向神经元分化的程序。因此本实验研究联合移植人骨髓间质干细胞与胚胎嗅鞘细胞对脊髓损伤修复的治疗效果。

目的:

观察人骨髓间质干细胞与胚胎嗅鞘细胞联合移植治疗脊髓损伤的治疗效果,探讨共移植的嗅鞘细胞对脊髓骨髓间质干细胞源性细胞分化的影响。

方法:

从成人骨髓分离培养人骨髓间质干细胞,从流产胚胎嗅球分离培养人胚胎嗅鞘细胞。60只SD大鼠采用ALLEN法制作脊髓急性损伤模型,随机分为四组:骨髓间质干细胞移植组,嗅鞘细胞移植组,联合移植组,PBS移植对照组,在损伤局部移植相应细胞。采用BBB后肢功能评分比较大鼠后肢功能恢复情况;运动诱发电位潜伏期评估脊髓传导性能改善情况;细胞移植5周后,采用组织学方法分析脊髓病理改变、轴突再生、植入嗅鞘细胞和骨髓间质细胞的存活与分化情况。

结果:

1. 骨髓间质干细胞来源丰富,可从骨髓中分离,一般培养条件下易大量扩增,传代培养生物学特性稳定,保持多分化潜能;嗅鞘细胞取材于经水囊引产的胚胎嗅球,而药物引产的胚胎分离培养不易成功,故嗅鞘细胞来源明显受限,且一般培养条件不易大量扩增,细胞易老化。两者均不表达与移植免疫排斥发生密切相关的细胞表面抗原。

2. BBB后肢功能评分从第1周起所有治疗组均比对照组高;第2周起联合移植组比其他组高,骨髓间质干细胞组比嗅鞘细胞组高。

3. 颅磁刺激运动诱发电位检测,在第1周末,仅3只鼠引出诱发电位,第2周所有大鼠均恢复,潜伏期明显延长。第2周-4周,潜伏期随时间有所回复,各组动物潜伏期比前一星期回复明显,第4周-5周各组潜伏期不再随时间而明显回落,基本维持稳定;第2周-5周,联合移植组比其他组潜伏期回复明显,骨髓间质干细胞组与嗅鞘细胞组均比对照组恢复明显,但两组间差别没有显著性。

4. 组织病理改变分析。1-2周HE染色可观察到脊髓损伤处灰质内大面积出血;神经元萎缩,胞质收缩;白质轴索变性,坏死,成空泡样改变;大量小胶质细胞结节样增生;大量炎性细胞浸润等改变。细胞移植后5周HE染色可观察到脊髓结构破坏,损伤中央及毗邻区大量神经元萎缩,消失;偶可见胶质细胞结节样增生;灰白质分界模糊,可见囊性软化灶,轴索变性,空泡样改变等。各组大鼠均可存在上述改变,个体差异较大,程度略有不同,各组病理改变没有明显的区别。

5. 再生轴突的观察。甘氨酸银浸镀法染色,对照组脊髓损伤区近端可观察到再生神经轴突极少,损伤区几乎不见轴突。骨髓间质干细胞组及嗅鞘细胞组脊髓损伤区近端可观察到较多再生神经轴突,并向损伤区伸展,距离较长,部分抵达损伤处,损伤区可观察到神经轴突稀疏分布。联合移植组脊髓损伤区近端可观察到大量再生神经轴突,成束向损伤边缘延伸,在损伤区可观察到较多神经轴突,分布较密。各组均未发现再生神经轴突成束穿越损伤区的直接证据。

6. 植入细胞的追踪。联合移植组及嗅鞘细胞组切片上可观察到Hoechst标记的移植细胞,主要分布于损伤区后索区域;联合移植组及骨髓间质干细胞组切片可观察到Brdur标记细胞主要分布于损伤区后索区域及后角部分区域。联合移植组脊髓MSCs源性细胞表达Nestin, NF的细胞百分比均比MSCs移植组高, MSCs源性细胞表达GFAP的细胞百分比两组间没有明显差别。

结论:

1. 骨髓间质干细胞与胚胎嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤的机理有所不同,治疗效果相近,前者在移植细胞来源及制备上具有明显优势。

2. 骨髓间质干细胞与胚胎嗅鞘细胞联合移植时,共移植胚胎嗅鞘细胞可促进脊髓骨髓间质干细胞源性细胞向神经元转化,提高骨髓间质干细胞源性细胞分化为神经元的比例;共移植骨髓间质干细胞与胚胎嗅鞘细胞在脊髓损伤修复中可以发挥协同作用,与两者的单独移植相比,明显提高了脊髓损伤的治疗效果。实验结果提示联合移植策略是提高脊髓损伤修复效果的可行方法。

3. 期刊论文 [王建安](#) [谢小洁](#) [孙勇](#) [何红](#) [蒋晨阳](#) [周斌全](#) [骆荣华](#) [董樑](#) [WANG Jian'an](#) [XIE Xiaojie](#) [SUN Yong](#) [HE](#)

[hong](#) [JIANG Chenyang](#) [ZHOU Binqun](#) [LUO Ronghua](#) [DONG Liang](#) [骨髓间质干细胞冠脉内移植治疗近期陈旧性心肌梗死伴心功能不全-中华急诊医学杂志](#)2005, 14(12)

目的 研究自身骨髓间质干细胞经冠脉内移植治疗近期陈旧性心肌梗死伴心功能不全的临床疗效及安全性.方法 将本院22例近期陈旧性心肌梗死伴心功能不全患者,随机分为对照组和移植组各11例.两组均予常规药物治疗,移植组给予自身骨髓间质干细胞经梗死相关冠脉内移植,对照组经冠脉注射等量生理盐水.术前、术后48 h、3个月和6个月分别检测血清IL-6、TNF-α和CRP,术后3个月和6个月分别观察血浆BNP、6 min步行试验、超声心动图、动态心电图、99mTc-甲氧基异丁基异腈(MIBI)和18F-脱氧葡萄糖(FDG)双核素心肌显像.结果 细胞移植组术前、术后48 h、3个月和6个月血清IL-6、TNF-α和CRP与术后3个月比较差异均无显著性(P>0.05).术后3个月和6个月,与对照组比较,细胞移植组BNP降低,6 min步行试验增加,与自身术前比较差异亦具显著性,P<0.05.术后3个月,细胞移植组左室射血分数增加,与对照组和自身术前比较差异有显著性〔(0.40±0.03)vs.(0.37±0.09),(0.35±0.05),P<0.05〕.术后6个月,细胞移植组左室舒张末容积缩小,与对照组和自身术前比较差异有显著性〔(5.63±0.80),(5.84±0.75)cm,P<0.05〕.双核素心肌显像提示,移植组术后6个月灌注-代谢不匹配节段数增加,与对照组和自身术前比较差异具显著性〔(7.60±1.26)vs.(6.20±1.14),(5.80±1.69)个,P<0.05〕.围手术期及术后6个月随访中未见任何严重致心律失常发生.结论 自身骨髓间质干细胞经冠脉内移植治疗陈旧性心肌梗死伴心功能不全患者,可能改善心功能,延缓心室重塑,增加存活心肌,无明显的致心律失常和免疫炎症反应.

4. 期刊论文 [董锋](#) [林建华](#) [吴朝阳](#) [DONG Feng](#) [LIN Jianhua](#) [WU Zhaoyang](#) [骨髓间质干细胞经静脉注射移植对大鼠脊髓损伤后BDNF、NGF mRNA表达的影响-中国康复医学杂志](#)2008, 23(5)

目的:研究大鼠骨髓间质干细胞(rat mesenchymal stem cells,rMSCs)静脉注射移植对脊髓损伤(spinal cordinjury,SCI)后脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor,BDNF)、神经生长因子(nerve growth factor,NCF)表达的影响,并探讨骨髓间质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤的

机制. 方法:运用改良Allen法制备大鼠T10脊髓外伤性截瘫模型,假手术组6只,损伤组84只随机分为对照组和rMSCs移植组.rMSCs组、假手术组接受rMSCs单细胞悬液1ml(1×106个rMSCs)自大鼠尾静脉缓慢注射移植,对照组静脉注射PBS1ml.移植后3h、6h、12h、24h、3d、7d、14d,应用RT-PCR方法检测损伤大鼠脊髓BDNF、NGF mRNA表达变化情况.结果:对照组和rMSCs移植组损伤脊髓BDNF、NGFmRNA表达较假手术组有明显增加(P<0.05);rMSCs移植组与对照组比较BDNF、NGFmRNA表达增加更为明显(P<0.05).结论:脊髓损伤后损伤脊髓局部的BDNF、NGF表达增加,rMSCs静脉注射移植后能促进损伤脊髓局部的BDNF、NGF进一步的表达.这可能是促进大鼠神经结构及神经功能恢复的因素之一.

5. 学位论文 [陈少强 骨髓间质干细胞静脉移植治疗大鼠脊髓损伤的实验研究](#) 2009

第一部分羧基荧光素乙酰乙酸对大鼠骨髓间质干细胞体外染色的研究
目的:探讨活体染料羧基荧光素乙酰乙酸(CFSE)标记大鼠骨髓间质干细胞(MSCs)的可行性和最适条件。
方法:清洁型SD大鼠20只,用密度梯度离心及贴壁法相结合的方法分离、纯化、培养大鼠MSCs,取长满25cm2培养瓶瓶底的第三代大鼠MSCs用2.5、5、10、20、40、60μmol/L不同浓度的CFSE分别作用1、5、10、15、20min进行染色,通过观察染色后细胞荧光强度和细胞贴壁率筛选出CFSE标记大鼠MSCs的最适标记时间和标记浓度。采用MTT法检测最适条件下CFSE标记的大鼠MSCs的增殖能力。
结果:浓度10μmol/L的CFSE在37℃下孵育10min为MSCs染色、观察和研究的最适条件,在此条件下,CFSE标记的MSCs的增殖能力不受影响。
结论:活体染料CFSE是一种标记率高、细胞毒性小、操作简便的标记大鼠MSCs的新方法,浓度10μmol/L的CFSE在37℃下孵育10min为CFSE标记大鼠MSCs的最适条件。

第二部分大鼠脊髓损伤后炎症级联反应及其对静脉移植骨髓基质干细胞在损伤脊髓内存活和迁移的影响
目的:观察大鼠急性脊髓损伤(SCI)后炎症级联反应及其对静脉移植骨髓基质干细胞(MSCs)在损伤脊髓内存活和迁移的影响,探讨MSCs静脉移植治疗急性SCI的最佳移植时间。

方法:Allen法制造SCI动物模型。80只SD大鼠随机分为假手术组、SCI后1h、6h、12h、24h、3d、5d和7d组,不同时间点取脊髓组织,应用HE染色法观察脊髓组织结构,应用RT-PCR法观察肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)和中性粒细胞趋化因子-1(CINC-1)表达情况,应用免疫组织化学法观察细胞间粘附分子-1(ICAM-1)表达情况,应用化学法测定髓过氧化物酶(MPO)活性变化;另40只SD大鼠随机分为假手术组、SCI后1h、6h、12h、24h、3d、5d和7d移植组,移植后7d取脊髓组织,荧光显微镜下观察不同移植时间点脊髓损伤处MSCs的存活和迁移情况。

结果:TNF-α和IL-1β在大鼠SCI后1h开始表达,SCI后6h到达峰值;ICAM-1和CINC-1在大鼠SCI后6h表达达增高,SCI后12h到达峰值;MPO活性在大鼠SCI后6h开始表达,24h表达到达峰值。SCI后6h,中性粒细胞(PMNL)开始浸润,SCI后24h,PMNL大量浸润。SCI后3d,PMNL浸润减少,MPO活性表达开始减弱;SCI后5d和7d,脊髓损伤区有胶质细胞增生。SCI后0h、6h、12h、24h移植四组,脊髓损伤处的BMSCs的存活数量较少,但迁移距离较长;SCI后3d移植组,脊髓损伤处的BMSCs的存活数量较多,且迁移距离较短;SCI后5d和7d移植两组,脊髓损伤处的BMSCs的存活数量较少,且迁移距离较短。
结论:急性SCI后,在损伤脊髓内存在炎症级联反应。在SCI后1h、6h、12h、24h,由于损伤区的炎症级联反应,局部的微环境不适合移植的MSCs存活;在SCI后5d、7d,由于损伤区胶质细胞增生,不利于移植MSCs的迁移。在SCI后3d可能是静脉移植MSCs治疗大鼠SCI的最佳移植时间。

第三部分静脉移植骨髓间质干细胞在损伤脊髓内的定向分化
目的:探讨移植MSCs在损伤脊髓内是否能分化为功能性的神经元和神经胶质细胞。
方法:应用免疫电镜技术观察迁移在损伤脊髓内1、3、5周后的移植MSCs的超微结构,应用免疫荧光标记和激光共聚焦技术观察迁移在损伤脊髓内1、3、5周后的移植MSCs表达胆碱乙酰基转移酶(ChAT)、谷氨酸脱羧酶(GAD)、突触素(synapsins)、髓鞘碱性蛋白(MBP)和髓鞘蛋白前脂蛋白(PLP)的情况。

结果:移植1周后,迁移在损伤脊髓灰质内的MSCs细胞器不发达,不具有神经元的超微结构特点,而迁移在损伤脊髓白质内的MSCs细胞器发达,具有少突胶质细胞的超微结构特点。移植3周后,迁移在损伤脊髓灰质内后的MSCs细胞器开始发达,具有神经元的超微结构特点。移植1周后,迁移在损伤脊髓灰质内后的MSCs不表达ChAT、GAD和synapsins,而迁移在损伤脊髓白质内的MSCs开始表达MBP和PLP。移植3周后,迁移在损伤脊髓灰质内的MSCs开始表达ChAT、GAD和synapsins。迁移在损伤脊髓白质内的MSCs数量明显多于灰质内的MSCs。

结论:移植MSCs在损伤脊髓内可部分分化为功能性的神经元和神经胶质细胞,而且MSCs在损伤脊髓内分化为功能性神经胶质细胞的时间较早,数量较多。

第四部分静脉移植骨髓间质干细胞对大鼠脊髓损伤后少突胶质细胞再髓鞘化的影响
目的:观察骨髓间质干细胞移植治疗对脊髓损伤后少突胶质细胞增生及新生轴突髓鞘再形成的影响。
方法:60只SD大鼠随机分为假手术组、对照组和实验组,假手术组和实验组经尾静脉注射MSCs,对照组经尾静脉注射PBS。注射MSCs后1、3W,电镜观察各组髓鞘和少突胶质细胞的超微结构变化:免疫组织化学荧光标记技术检测脊髓组织髓鞘碱性蛋白(MBP)和髓鞘蛋白前脂蛋白(PLP)的表达。免疫荧光标记和激光共聚焦技术观察迁移在损伤脊髓内1、3周后的移植MSCs表达髓鞘碱性蛋白(MBP)和髓鞘蛋白前脂蛋白(PLP)的情况。

结果:脊髓损伤后1W,对照组髓鞘明显肿胀,部分崩解;部分少突胶质细胞坏死溶解,可见较多增生的少突胶质细胞。脊髓损伤后3W,髓鞘肿胀较轻,可见增生的少突胶质细胞。脊髓损伤后1W,实验组髓鞘肿胀明显减轻,少突胶质细胞坏死少,可见大量增生的少突胶质细胞,脊髓损伤后3W,实验组髓鞘和少突胶质细胞结构正常,可见许多增生的少突胶质细胞。免疫组织化学荧光标记结果显示,对照组MBP和PLP表达低于假手术组,实验组MBP和PLP表达高于对照组。移植1周后,迁移在损伤脊髓白质内的MSCs表达MBP和PLP。

结论:脊髓损伤后骨髓间质干细胞移植治疗可有效防止少突胶质细胞坏死和神经纤维溃变,促进少突胶质细胞增生和再生神经纤维髓鞘的再形成。

6. 期刊论文 [连锋,朱洪生,薛松,吴学军,张谷兰,王小妹,LIAN Feng,ZHU Hong-sheng,XUE Song,WU Xie-jun,ZHANG Gu-lan,WANG Yiao-mei 骨髓间质干细胞在梗死心肌移植后心肌再生的实验研究-江苏大学学报\(医学版\)](#)

2006, 16(1)
目的:研究骨髓间质干细胞在梗死心肌移植后的心肌再生作用. 方法:贵州香猪24只,随机分为对照组(C组),实验组(E组).抽取骨髓液3ml,按照Wakitani的方法培养出骨髓间质干细胞,经5-氟胞苷诱导后,BrdU标记备用.开胸结扎冠状动脉前降支,自体骨髓间质干细胞分别经局部注射和结扎的左冠状动脉前降支远端灌注移植入自体急性心肌梗死区域,C组以DMEM对照.术后3、6周取心肌标本行免疫组化、电镜检测. 结果:梗死区域可观察到标记的骨髓间质干细胞,这些细胞能表达肌球蛋白重链(MHC),缝隙连接蛋白-43(Cx-43),心肌特异性肌钙蛋白I(cTnT I),电镜下有肌丝形成. 结论:骨髓间质干细胞在梗死心肌内移植具有分化再生的能力.

7. 学位论文 [姜美子 静脉注射人骨髓间质干细胞对大鼠局灶性脑缺血损伤的影响](#) 2007

目前为止,对脑血管病造成的神经细胞死亡,没有确实有效的治疗方法.神经系统常见病一缺血性脑血管病留下无法恢复的神经功能缺损,给患者带来极大的痛苦.目前国内外研究人员从溶栓治疗到介入微创治疗,力求恢复脑缺血区血液供应,保护受损神经细胞,但因“时间窗”的限制,实际上只有极少数患者能及时接受溶栓治疗,不管是超早期溶栓,还是其他积极的治疗,都不能直接阻断脑损伤的发生或促使受损组织再生.因此,利用神经干细胞移植治疗中枢神经系统疾病的研究,越来越引起世界医学界的关注,能够替代缺损的神经功能达到“无后遗症”,才是治疗的最终目的.神经干细胞的发现使人们改变过去所认为的中枢神经系统损伤后神经元或轴突不能再生的观点,并对许多神经系统疾病的的治疗带来了新的希望.以往的神经干细胞均来源于胚胎或成人神经组织,其取材困难,存在伦理学问题、移植后免疫排斥反应,易诱发肿瘤等,其临床应用受限制,现基本停产.脐带血是神经干细胞的另一重要来源,然而移植脐带血来源的神经干细胞有很大的缺点,即异源性,需要长久使用免疫抑制剂去避免移植排斥反应.骨髓间质干细胞(hMSC)来源广泛,取材容易,体外迅速扩增,不存在伦理学问题,可运用自体移植,解除宿主可能的免疫排斥反应,而具有良好的应用前景.但目前hMSC移植后hMSC自身整合到受体组织,并分化成神经元和星形胶质细胞,还是启动内源性神经干细胞前体细胞的增殖,促使其向神经元和星形胶质细胞分化,尚有争议.

本实验通过静脉注射hMSC后观察大鼠局灶性脑缺血损伤后的神经功能评分、计算脑梗死面积、hMSC到达脑缺血损伤部位后的存活程度、移植细胞及缺血周边区、纹状体区、室管膜下区神经元前体细胞分化程度,最终阐明移植hMSC后改善神经功能的部分分子学机制.

移植法包括病变部位立体定位直接注入法、脑脊液注入法、静脉注射法等,而前两者因副损伤大,难以在临床上推广,渐被静脉注射法取代.hMSC静脉注射剂量,在学者之间存在分歧,小剂量注射后hMSC到达中枢神经系统之前大部分停留在脾和肺,hMSC不能到达中枢神经系统,当然对神经功能恢复起不到效果.大剂量注射易引起栓塞,因此,目前提倡用(1-6)×10⁶个剂量移植.本实验选择1×10⁶>小剂量静脉移植后取得了较满意的效果.

实验首先选健康人类志愿者,抽取臂髓中的骨髓10ml,离心法分离出hMSC,培养2w后荧光染料PKt (26进行标记。实验组分为假手术组(A组,假手术+尾静脉注射生理盐水),缺血再灌注组(B组,大脑中动脉阻塞+尾静脉注射生理盐水),骨髓干细胞组(C组,大脑中动脉阻塞+尾静脉注射hMSC),hMSC注射剂量为 1×10^6 >用栓线法制作大鼠局灶性脑缺血模型,梗塞24h尾静脉注射PKH26标记的hMSC,每日腹腔注射5-溴脱氧尿苷嘧啶(BrdU),标记增殖的神经元前体细胞。梗塞后第1、3、7、14测定神经功能评分,14d将全部动物处死,计算脑梗死面积,免疫组化测定缺血性大鼠脑中PHK26标记的hMSC及NLNA标记的hMSC及其分化,比较脑缺血后缺血周边区、纹状体区、同侧脑室周围室管膜下的神经元前体细胞分化程度。结果显示,hMSC移植后神经功能明显改善;脑梗死面积明显缩小($P<0.05$);hMSC治疗14d在大鼠脑缺血区周围确实发现PKH26标记的hMSC,B组和C组均发现缺血周边区、纹状体区、室管膜下区神经元前体细胞增殖,但C组增殖更显著($P<0.01$),未观察到NLNA标记的细胞分化成星形胶质细胞、神经元的现象;观察到BrdU标记的细胞分化成神经元、星形胶质细胞。通过本实验总结出如下结论。①尾静脉注射hMSC后移植的hMSC能到达缺血周边部位,并部分能成活。移植的hMSC只有向缺血区迁移才能完成对损伤的修复,本实验证明 1×10^6 >个hMSC移植后移植细胞能迁移到缺血部位,与以往学者的观点一致。②hMSC移植后神经功能明显恢复,脑梗死面积明显缩小。C组hMSC移植后第1、3、7、14d运动功能、感觉功能、改良的神经功能损伤程度评分较B组有显著性差异,从第3天开始神经功能明显改善,第14天神经功能改善最显著。③移植的hMSC到达脑缺血部位后并不是自身分化成星形胶质细胞及神经元。hMSC移植到脑内后形态学上并未发现改变,故认为hMSC移植后引起的功能恢复并不是移植的hMSC所产生的神经元整合到宿主神经回路所致。④NSC移植后缺血周边区、室管膜下区、纹状体区神经元前体细胞增殖,并分化成星形胶质细胞和神经元,从而改善脑缺血损伤。那么,移植的hMSC起什么作用呢?可能是移植的hMSC分泌的蛋白引起宿主脑组织可塑性上调,能改变缺血周围微环境,使缺血周边区、纹状体区、室管膜下区原存的静止状态的神经元前体细胞增殖,并促使其分化成神经元或星形胶质细胞,为中枢神经系统损伤后的修复和治疗提供广泛的前景。

尽管hMSC的移植取得了一些进展,但对hMSC的基本生物学特征和免疫学特性尚未完全认识,仍需进一步深入研究最有效的细胞移植途径,希望活体水平上监测移植细胞的电生理特性,突触联系,信号传导以及释放功能。hMSC移植后的体内存活时间、安全性、体外培养的最适条件、探讨和研究移植hMSC神经生长因子间的内在联系,找到NSC分化不同阶段的关键基因,将会为临床上利用hMSC防治脑缺血性疾病奠定良好的研究基础。细胞移植和基因治疗才刚刚起步,为更好的发挥hMSC的治疗作用,需进一步了解分化及发育过程中的作用。

8. 期刊论文 [陈东平. 张志坚. 吴秀丽. 林建华. Chen DP. Zhang ZJ. Wu XL. Lin JH 经静脉移植骨髓间质干细胞在脑缺血前后大鼠脏器组织中的分布 -中国组织工程研究与临床康复 2007, 11 \(50\)](#)

目的:骨髓间质干细胞通过局部直接注射或经静脉、动脉移植均可有效趋化到达脑缺血、损伤组织,但目前除了对到达靶部位的干细胞分布有一定了解外,对干细胞在非损伤组织或损伤组织之外的其它部位迁移分布与生存情况的研究较少。观察经静脉移植的大鼠骨髓间质干细胞在脑缺血前后大鼠体内的生存与分布,为干细胞移植研究提供实验基础和可能的理论依据。方法:实验于2006-05/2007-05在福建省神经病学研究所完成。实验材料:选取清洁级健康雄性近交系F344大鼠48只,体质量250~300 g,由中国科学院上海实验动物中心提供,按随机数字表法分为3组:正常移植组、脑缺血前移植组、脑缺血后移植组,每组16只。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。实验方法:①体外培养扩增2月龄F344大鼠骨髓间质干细胞,传至第三四代备用。用带增强型绿荧光蛋白基因的慢病毒感染大鼠骨髓间质干细胞。②建立大鼠短暂性大脑中动脉闭塞脑局灶缺血模型。取增强型绿荧光蛋白标记的大鼠骨髓间质干细胞,经股静脉移植入大鼠体内。正常移植组:细胞移植前大鼠未经任何处理;脑缺血前移植组:先在正常大鼠静脉移植细胞,24 h后行大脑中动脉闭塞术;脑缺血后移植组:大鼠先行大脑中动脉闭塞术,24 h后移植细胞。③实验评估:采用改良的神经功能缺损量表测定各组大鼠神经功能情况;取大鼠骨髓制作涂片,同时取脑、心、肺、肝、脾、肾、骨骼肌、小肠组织标本制作冰冻切片,在荧光显微镜下观察增强型绿荧光蛋白阳性细胞在各时间点的分布情况。结果:48只大鼠均进入结果分析。①脑缺血前移植组和脑缺血后移植组大鼠神经功能在移植后12周内均有明显恢复,但脑缺血后移植组恢复较快,术后1、3、12周明显优于脑缺血前移植组($P<0.01$, $P<0.05$)。②在正常移植组和脑缺血前移植组大鼠脑、骨髓、脾、小肠发现增强型绿荧光蛋白阳性细胞,而在其他组织未发现。在脑缺血后移植组大鼠脑半球缺血区发现大量增强型绿荧光蛋白阳性细胞聚集,在肺中也可见阳性细胞分布,在脑缺血对侧半球及其他组织中未发现。结论:移植前的脑梗伤对移植的大鼠骨髓间质干细胞向脑局灶缺血损伤区迁移,进而促进神经功能修复非常重要,否则,移植干细胞将在骨髓和脾脏较长时间停留且不易再次迁移。

9. 期刊论文 [朱文标. 邓宇斌. 毕小彬. 刘宇. 史玉朋. 叶美红. 沈慧勇 骨髓间质干细胞与胚胎嗅鞘细胞联合移植治疗大鼠脊髓损伤的实验研究 -中国脊柱脊髓杂志 2006, 16 \(12\)](#)

目的:观察人骨髓间质干细胞(MSCs)与胚胎嗅鞘细胞(OECs)联合移植治疗大鼠脊髓损伤的效果,探讨共移植的OECs对MSCs分化的影响。方法:采用Allen's法制作大鼠脊髓损伤模型,随机分为MSCs移植组(A组)、OECs移植组(B组)、MSCs与OECs联合移植组(C组)及PBS注射组(D组),术后1~5周用BBB评分、经颅磁刺激运动诱发电位及组织学方法检查脊髓损伤修复情况。结果:术后2周起,A、B、C组BBB评分和诱发电位潜伏期与D组比较恢复明显,C组与A、B组相比亦有显著性差异($P<0.05$)。术后5周时C组损伤区有较密的神经营轴突分布,近端可见大量成束再生轴突;A、B组损伤区及近端再生轴突分布稀疏;D组损伤区及近端少见轴突。C组移植的MSCs中Nestin及NF表达阳性的比率较A组高($P<0.05$)。结论:联合移植OECs可促进MSCs向神经元方向转化,提高MSCs分化为神经元的比例;MSCs与OECs可以在脊髓损伤修复中发挥协同作用,联合细胞移植是提高脊髓损伤修复效果的可行方法。

10. 学位论文 [毕小彬 骨髓间质干细胞的磁性标记示踪及丹酚酸B盐协同间质干细胞修复大鼠脊髓损伤的研究 2007](#)

干细胞包括胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和成体T细胞,这类细胞可以在体外培养和快速增殖,同时具有向自我更新和多向分化潜能,是目前多种疾病实验研究和临床治疗的热点。干细胞移植后能够分泌治疗性物质,并可能修复和替代损伤性疾病中受损的神经组织。因此,干细胞移植为MSCs单独或结合神经系统的损伤性疾病带来了希望。骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是成体干细胞的一种,获取简单,扩增容易,可在体外和体内向神经元样细胞分化,受到研究者更多的重视。

脊髓损伤(spinal cord injuries, SCI)是临床常见疾病,给患者带来了极大痛苦,严重影响患者的生存质量。脊髓损伤的药物治疗受限于有限的药物种类和狭窄的治疗时间窗,康复治疗的效果也不能令人满意。目前,研究者更多将目光转向干细胞移植治疗脊髓损伤,MSCs自然受到研究者的青睐。本室对MSCs单独或结合神经系统的损伤性疾病带来了希望。骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是成体干细胞的一种,获取简单,扩增容易,可在体外和体内向神经元样细胞分化,受到研究者更多的重视。

然而, MSCs治疗脊髓损伤的实验研究和临床应用也遇到和其他细胞移植同样的问题:首先是用来区分宿主细胞与移植细胞的传统标记和识别方法只能在离体情况下进行,显然,这些方法用于大动物实验或者临床研究时不可行。所以有必要寻找能够在体示踪检测和追踪移植细胞命运的方法。将需要移植的细胞进行磁性标记剂标记,通过磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)技术对其进行可视化追踪,就能得知移植细胞在体内的运动信息以及未来命运。钆-二亚甲基三胺五乙酸-叶酸(Gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid, Gd-DTPA)是一种T1造影剂,和铁剂类T2造影剂一样可用于细胞标记。Gd-DTPA相比其他造影剂用于细胞标记的优点在于其较少受到血流和周围其他正常和非正常组织结构信号的影响。那么,能否用Gd-DTPA标记MSCs来进行MSCs的在体MRI示踪?这是本课题要探讨的一个重要内容。另外一个问题是成年个体中枢神经系统(central nervous system, CNS),尤其是损伤的CNS很可能不利于移植细胞的存活。即使是在细胞最好的状态下进行移植,据报道最多能有10%的移植细胞存活,而能够分化为成熟神经元的移植细胞则更少。虽然在脊髓损伤的实验研究中,很多研究者建议细胞移植时间窗应在损伤后7-10天,但有证据表明存活细胞数量仍不乐观。大部分细胞治疗用于打击性或压迫性脊髓损伤是采用髓内注射的方式,而注射器的刺入很可能对受损脊髓造成又一次大的损害。脊髓损伤后的微环境和随后注射造成的损害中,肿瘤坏死因子- α (tLJmor necrosis factor- α , TNF- α)等炎症因子及其引起的一系列炎症反应是一种重要因素。丹酚酸B盐(Salvianolic acid B, SalB)是我国传统中药丹参(salvia miltiorrhiza, Danst[en])的水溶性有效成分,已有研究证明Sal B具有很强的抗氧化作用和明显的抗炎作用。还有研究表明,复方丹参注射液可以用于治疗脊髓损伤。那么,应用Sal B能否促进移植的MSCs的存活呢?这是本课题要研究的又一重要内容。

综上所述,本研究拟采用带有红色荧光的阳离子转染试剂jetPEI-Fluor负载的Gd标记MSC(Gd-MSCs),观察Gd标记对MSCs存活和增殖能力的影响,电镜检测Gd在MSCs内的分布情况,并对移植到大鼠脊髓损伤阶段的Gd-MSCs应用MRI活体示踪;观察Sal B的神经保护作用以及是否在体外保护MSCs不受TNF- α 的损伤,观察Sal B是否能促进移植到受损脊髓的MSCs的存活及两者联合应用后脊髓损伤大鼠的运动功能恢复情况。

本实验的研究内容出以下两部分组成:

第1部分:骨髓间质干细胞的磁性标记示踪

目的:观察Gd-DTPA成功标记MSCs后对其生物学特性的影响,观察MSCs中Gd-DTPA的分布情况,MRI示踪植入到脊髓损伤大鼠体内的MSCs,探讨Gd-DTPA标记MSCs的可行性用于脊髓损伤研究的可能性。

方法:接种培养大鼠MSCs,用阳离子转染试剂jetPEI-Fluor结合Gd-DTPA标记MSCs。透射电镜观察Gd-DTPA在MSCs胞膜和胞浆的分布情况,MRI观察标记后MSCs的信号强度变化。用台盼蓝染色、MTT比色法和Hoechst 33342染色法检测Gd-DTPA标记对MSCs的存活、增殖及凋亡的影响。移植标记的MSCs到脊

髓损伤大鼠受损脊髓节段内，然后用MRI观察MSCs的分布和迁移情况，并用组织学方法验证。同时BBB评分评价标记的MSCs对脊髓损伤大鼠的功能恢复情况。

结果：

1. Gd-DTPA能够成功标记MSCs，且标记效率不低于80%。Gd-DTPA标记的MSCs在1.5T核磁共振扫描图像上清晰可见，标记的MSCs在T1加权图像上的信号强度明显增强。透射电镜证实Gd-DTPA存在于MSCs内。

2. Gd-DTPA标记不影响细胞存活、增殖和凋亡。

3. 标记的MSCs在细胞移植后14天仍能够检测到信号强度的明显变化。标记细胞相对周围脊髓组织的信号强度增高在第1，3，7，14天分别为26.61%，22.81%，19.88%，14.42%。但是，到了移植后第21天，信号强度增高只有8.77%。MRI上，标记MSCs从注射处向损伤区迁移，并且在移植后第14天和第21天，没有发现细胞在损伤区以外区域出现，组织学结果也证实这一点。

4. 标记MSCs和未标记MSCs移植的脊髓损伤大鼠的BBB评分从移植第7天开始比对照组的大鼠的评分高(P<0.05)，而两者之间则没有显著差异(P>0.05)。

结论：Gd-DTPA可有效标记MSCs；MRI可在体示踪移植到大鼠脊髓损伤节段的Gd-DTPA-MSCs，标记细胞集中分布在损伤区域。Gd-DTPA-MSCs的MRI示踪可能是阐明MSCs治疗脊髓损伤和其他中枢神经系统疾病作用机制的重要示踪方法。

第2部分：丹酚酸B盐协同间质干细胞修复大鼠脊髓损伤

目的：观察Sal B对脊髓损伤的神经保护作用，观察Sal B是否保护MSCs不受TNF- α 的损害，以及是否能促进移植的MSCs在损伤脊髓的存活数量，探讨联合应用Sal B和MSCs治疗大鼠脊髓损伤的可行性。

方法：体外培养大鼠MSCs，观察Sal B对MSCs在TNF- α 存在条件下的存活的影响。空洞面积分析和BBB评分观察Sal B对大鼠脊髓损伤的神经保护作用。大鼠脊髓损伤后第7天，移植5-溴脱氧尿核苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU)标记的MSCs，并腹腔注射Sal B。采用BBB评分评价大鼠的运动功能恢复情况；细胞注射后7天和28天进行灌注取材，免疫组织化学染色观察移植的MSCs的存活情况，观察Sal B促进移植的MSCs存活的作用。

结果：

1. 分别用TNF- α 或TNF- α 联合丹SalB处理MSCs，观察其对MSCs存活的影响。10ng/ml TNF- α 作用24小时后MSCs大部分边缘翘起，呈半漂浮状；而100ng/ml SalB存在时，TNF- α 对MSCs几乎没有影响。

2. SalB可以显著减小损伤大鼠脊髓的空洞面积(P<0.05)，从脊髓损伤后第14天起，SalB和PBS对照治疗组之间的BBB评分有显著差异(P<0.05)。

3. MSCs和SalB联合应用组的大鼠损伤部位有很多存活的MSCs聚集，而单纯MSCs组的细胞存活则比较少。存活细胞计数分析结果表明在移植后的第7天和28天，联合应用组的MSCs存活数量都比单独MSCs应用组要多(P<0.05)。联合应用组大鼠的运动功能恢复要比单纯MSCs恢复的要好(P<0.05)。

结论：SalB可以减少脊髓损伤空洞形成。SalB在体外保护MSCs免受TNF- α 的毒性作用，在体内促进移植的MSCs的存活；联合应用MSCs和SalB能更好地促进脊髓损伤大鼠的功能恢复。

总结

通过以上实验研究，可得到以下结果：

1. Gd—DTPA能有效标记MSCs并且不影响MSCs的生物学特性；

2. Gd—DTPA标记的MSCs在移植后14天内可用MRI活体示踪；

3. Gd—DTPA标记的MSCs迁移并分布在大鼠脊髓损伤部位；

4. Sal B可以在体外保护MSCs免受TNF— α 的毒性作用；

5. Sal B提高MSCs的移植存活数量，两者联合应用明显促进大鼠脊髓损伤的功能恢复。

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgzxyjhjzz200901010.aspx

授权使用：qkzgz16(qkzgz16)，授权号：9617d54d-1db0-477f-b1b0-9eec010acbb0

下载时间：2011年5月23日