

# 条件培养基局部移植对大鼠脊髓损伤的修复作用

张 峰,申才良,宋旆文,章仁杰,董福龙,杨 昆

**摘要** 目的 观察骨髓间充质干细胞的条件培养基(BMSC-CM)局部移植对脊髓损伤修复的作用。方法 采用改良的Allen装置制作大鼠T9脊髓损伤模型,随机分为对照组(脊髓损伤后局部微量注射生理盐水10 μl)和实验组(脊髓损伤后局部注射BMSC-CM 10 μl),两组均采用BBB评分、斜板实验法观察大鼠运动功能恢复情况,苏木精-伊红(HE)染色观察脊髓损伤处血管生长及空洞体积的改变情况。结果 实验组大鼠的BBB后肢功能评分、斜板倾斜角度优于对照组( $P < 0.05$ ),脊髓损伤处空洞体积明显小于对照组,血管直径大于对照组。结论 BMSC-CM能够减小脊髓损伤处的空洞体积和促进血管生长,从而促进脊髓损伤后神经功能的恢复。

**关键词** 脊髓损伤; 间充质干细胞; 条件培养基; 移植

中图分类号 R 651.21

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)05-0599-05

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的特征是原发性机械损伤后迅速触发继发性损伤,损伤区出现缺血、缺氧、炎症反应以及神经元和少突胶质细胞的凋亡。随着时间推移,星形胶质瘢痕和脊髓空洞形成并抑制神经轴突再生,使其损伤平面以下的运动和感觉功能障碍。近年来,随着干细胞技术的发展,干细胞移植治疗SCI已成为热点,其中骨髓间充质

干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)移植已被广泛研究,其能够抑制炎症反应和细胞凋亡,促进神经轴突和血管再生,减少星形胶质瘢痕和空洞,促进运动功能恢复<sup>[1-2]</sup>。然而,BMSCs移植也有诸多不利方面:如移植后在宿主体内无法长期存活;不能够有效定植和分化;在不同的损伤环境中,BMSCs移植可引起不同的不良反应。目前直接利用含BMSCs所分泌的细胞因子的条件培养基对于许多疾病的治疗取得积极的疗效<sup>[3-6]</sup>,本实验假设BMSCs移植对SCI的神经功能恢复并不完全依赖于细胞修复,可能还依赖于其所分泌的各种细胞因子,因此,该研究利用富含BMSCs分泌的各种细胞因子的条件培养基治疗大鼠SCI,观察其疗效。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 4~6周龄、体重(100±20)g的清洁级SD大鼠2只;普通级健康成年雌性SD大鼠40只,体重(240±20)g,均由安徽医科大学实验动物中心提供。

**1.1.2 主要试剂** DMEM-LG购自美国HyClone公司;胎牛血清、DMEM/F12培养基购自美国Gibco公司;FITC标记的抗大鼠CD34、CD44及PE标记的抗大鼠CD29、CD90抗体购自美国BioLegend公司;胰酶细胞消化液、青/链霉素溶液(×100)购自中国碧云天公司。

### 1.2 方法

2015-03-11 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81472088)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院脊柱外科,合肥 230022

作者简介:张 峰,男,硕士研究生;

申才良,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: shencailiang1616@163.com

98 inhibitor and inhibitor-NC were transiently transfected into HepG2 cells. Effects of miR-98 on proliferation, apoptosis, invasion/migration of HepG2 cells were determined by MTT assay, flow cytometer, and Transwell assay. Western blot was then performed to determine Bcl-2 expression levels in each group. **Results** MTT assay demonstrated that proliferation rate of HepG2 cells in miR-98 overexpressing group was significantly lower compared with control groups. Annexin V-FITC/PI revealed that apoptosis was more prominent in miR-98 overexpressing group compared with control groups. Transwell assay revealed that invasion and migration were significantly attenuated in miR-98 overexpressing group compared with control groups. Western blot demonstrated that Bcl-2 expression level was lower in miR-98 overexpression group compared with control groups. **Conclusion** miR-98 serves as a suppressor in the development of HCC; miR-98 promotes apoptosis of HCC cells by down regulating expression of Bcl-2.

**Key words** miR-98; HepG2; proliferation; apoptosis; invasion; migration

**1.2.1 大鼠 BMSCs 的分离、培养** 颈椎脱臼法处死大鼠,采用全骨髓贴壁法从大鼠骨髓中分离和培养 BMSCs,完全培养基由 10% 胎牛血清的 DMEM + 100 U/ml 青/链霉素构成,将所得的细胞悬液培养于含 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的孵育箱中培养,每 3 d 换液 1 次。细胞生长至 90% 时胰酶消化并按 1:2 传代培养。3 代后取对数期生长的 BMSCs,用 37 °C 预热的 0.25% 胰酶消化后,制成均匀的单细胞悬液接种,镜下计数,使细胞密度约为 10<sup>6</sup> 个/管,加入磷酸盐缓冲液(PBS) 100 μl。在室温避光条件下加入 FITC 标记抗大鼠 CD34 的单克隆抗体,PE 标记抗鼠 CD90、CD29 的单克隆抗体,于 37 °C 避光孵育 30 min 后采用流式细胞仪检测 CD90(+)、CD29(+),CD34(-)。

**1.2.2 大鼠 BMSCs 条件培养基的制备** 将第 3 代的骨髓间充质干细胞接种于 T75 培养瓶中,细胞生长汇合至 90% 时,用 PBS 冲洗 3 次后,加入无血清、酚红的 DMEM/F12 培养液直至 48 h。然后,将所收集的条件培养基用 10 - ku 浓缩离心管,于 13 °C、4000 r/min 离心 15 min,再将离心浓缩后的条件培养基通过 0.22 μm 无菌滤器进行过滤后,冻存于 -80 °C 备用。

**1.2.3 实验动物分组** 动物随机分成对照组(A组):T9 SCI 后局部注射生理盐水 10 μl; 实验组(B组):SCI 后局部注射浓缩的第 3 代大鼠 BMSCs 条件培养液(BMSC-CM) 10 μl。A 组和 B 组再随机各分两个亚组:A1 组和 B1 组饲养至 1 周处死,A2 组和 B2 组饲养至 6 周处死。每个亚组 10 只 SD 大鼠,造模失败后予以补充。

**1.2.4 大鼠 SCI 模型的建立及局部移植** 大鼠用 0.3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔麻醉成功后,俯卧位固定,局部去毛,手术野消毒。切开后背皮肤,剥离脊柱两侧椎旁肌肉,解剖暴露胸 8 到胸 10 椎板。应用尖头的持针器,先行咬开胸 9 椎板少许,逐渐扩大暴露出胸 9 脊髓。采用改良的 Allen 装置,打击装置整合于三维立体定位仪上,将一直径为 3 mm 圆形薄铜垫片(重量 0.1 g)置于 T9 脊髓表面,重 10 g 的砝码自 5 cm 高度自由落下打击该垫片,使致伤量为 50 g·cm,造成 T9 段脊髓的冲击伤。大鼠尾巴迅速翘起后倒下,双下肢及躯体出现回缩样扑动,呈迟缓性瘫痪,打击的局部脊髓表面呈淤紫色,提示造模成功。在损伤部位用微量注射器刺穿硬脊膜,以 1 μl/min 的速度缓慢推注 10 μl BMSC-CM 或生理盐水至大鼠 SCI 中心,注射后留针 3 min。术毕,

逐层缝合切口。连续 3 d 常规肌肉注射预防性抗生素,并通过人工挤压膀胱辅助排尿 4 次/日,至小便自解。

#### 1.2.5 行为学评价方法

**1.2.5.1 BBB 评分方法** 根据 Basso 提出的大鼠 SCI 后 BBB 评分法,将其放入一开口大盆,轻敲盆壁使其爬行,观察其臀部、膝关节、踝关节行走、爪的置放、躯干运动及其协调情况,总分为 21 分,每只需观察 5 min。术前 3 d,每天早晨 9 点将大鼠放入大盆中,使其熟悉环境。BBB 评分的主观性较强,需由两名熟悉此评分标准的非本实验人员于大鼠 SCI 前、损伤时及移植后第 1、4、7、14、21、28、35、42 天早晨 9 点对 A2、B2 组进行盲法评分。

**1.2.5.2 斜板实验** 将大鼠放置斜板上,其身体轴线与斜板纵轴垂直,逐渐抬高大鼠头侧斜板,至大鼠刚好在板上停留 5 s 时,记录斜板与水平面间的角度。斜板实验存在人为因素,由两名熟悉斜板实验的非本实验人员于大鼠 SCI 前、损伤时及移植后第 1、4、7、14、21、28、35、42 天早晨 10 点对 A2、B2 组进行盲法实验,每只大鼠需测 3 次,取平均值。

#### 1.2.6 组织学评价方法

**1.2.6.1 大鼠脊髓灌注固定** 4 组实验动物分别于移植后 1 周、6 周用 0.3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔麻醉成功后,仰卧位固定,剪开胸廓,见跳动的心脏,静脉套管针插入左心尖部,进入左心室,取出针心,向中线沿室间隔,将留置针推向主动脉部。剪开右心耳,让血流出,可用纱布在周围吸取流出的血液,同时开放生理盐水约注入 15 ml 后,可见右心耳处流出澄清液体,再缓慢的注入 4% 多聚甲醛约 15 ~ 20 ml,时间约 5 ~ 10 min。开始灌注时大鼠剧烈抽动,后大鼠后肢绷直,尾部竖起成一直线,尽量多的去除脊柱周围的软组织及大部分脊柱骨,解剖出损伤的脊髓节段,用 4% 多聚甲醛浸泡固定。

**1.2.6.2 HE 染色观察损伤区血管生长情况** 在移植后 1 周获取 A1、B1 组脊髓标本,每个标本被固定在 4% 多聚甲醛 24 h,30% 蔗糖溶液脱水,然后石蜡包埋。连续 20 μm 厚度纵切损伤处脊髓标本,每只标本随机抽取 5 张切片行 HE 染色观察损伤区血管生长情况。切片在光学显微镜(日本 Olympus 公司)下观察。

**1.2.6.3 HE 染色观察损伤区空洞大小** 在移植后 6 周获取 A2、B2 组脊髓标本,4% 多聚甲醛固定后,以损伤区中心每间隔 140 μm 做横切片行 HE 染色,取第 10 个切片来测定脊髓空洞,这样顺序取 10

个样本。用 Image J1.38 版本的影像分析软件测量空洞的区域。空洞体积用如下方法计算:  $V = a \times d$ ;  $a$  = 测量的面积;  $d$  = 切片间距; 空洞总体积  $V_{tc} = V_{c1} + V_{c2} + \dots + V_{c10}$ 。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间结果比较采用方差分析、 $t$  检验。

## 2 结果

**2.1 大鼠 BMSCs 的形态观察及鉴定** 培养骨髓间充质干细胞悬液 24 h 后, 镜下可见部分细胞贴壁, 细胞大小不一, 形态多呈圆形, 细胞核不能清晰辨认。4~5 d 左右可见贴壁细胞数量逐渐增多, 开始形成细胞集落, 细胞呈多角形、梭形; 至第 10 天左右, 细胞融合达 90%, 此时胰酶消化, 进行传代; 第 3 代以后, 细胞呈较典型的放射状生长, 见图 1。经流式细胞仪检测第三代大鼠 BMSCs 的细胞免疫表型, 结果显示: CD29、CD90 阳性率分别为 0.971 和 0.983; CD34 阳性率为 0.321, 见图 2, 提示第三代贴壁的细胞主要是 BMSCs。

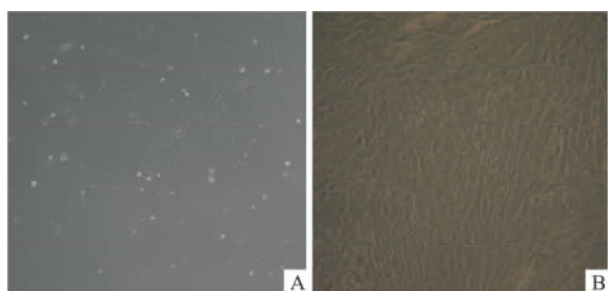


图 1 BMSCs 的形态观察  $\times 100$

A: BMSCs 原代培养第 5 天; B: 培养的第 3 代 BMSCs

## 2.2 行为学评价结果

**2.2.1 BBB 评分结果** 大鼠 BBB 运动评分最高

21 分, 最低 0 分。术前 A2 组、B2 组大鼠后肢评分均为 21 分, 术后两组大鼠后肢评分均为 0 分, 大鼠的下肢功能丧失, 肌力降为 0, 呈卧位拖行。移植后, 两组动物 BBB 评分随时间的推移均有所恢复, 见图 3A。SCI 后第 4 天起, BMSC-CM 处理的动物 BBB 评分高于对照组, 且两组之间差异有统计学意义 ( $t = -3.354, P = 0.004$ ), 并且整个实验期间差异均有统计学意义。

**2.2.2 斜板实验的结果** 术前大鼠倾斜平面临界角度平均为  $81^\circ$ , 术后 SCI 后角度下降为  $32^\circ$ , 移植后两组动物倾斜平面临界角度随时间的推移均有所恢复, 见图 3B, 移植后第 1 天起, BMSC-CM 处理的动物倾斜平面临界角度高于对照组, 并且两组间差异有统计学意义 ( $t = 4.143, P = 0.001$ )。

## 2.3 组织学评价结果

**2.3.1 血管生长情况** 对移植后 1 周获取的 A1、B1 组脊髓标本进行 HE 染色后, 检测损伤区血管直径显示, 实验组 ( $14.40 \pm 1.24$ )  $\mu\text{m}$  较对照组 ( $6.90 \pm 0.81$ )  $\mu\text{m}$  血管直径大, 见图 4, 两组间差异有统计学意义 ( $t = 15.982, P = 0.001$ )。

**2.3.2 脊髓空洞体积** 对移植后 6 周获取的 A2、B2 组脊髓标本进行 HE 染色后, 检测损伤区脊髓空洞体积显示, BMSC-CM 处理组 ( $0.29 \pm 0.08$ )  $\text{mm}^3$  较对照组 ( $0.57 \pm 0.10$ )  $\text{mm}^3$  体积小, 见图 5, 两组间差异有统计学意义 ( $t = -6.751, P = 0.001$ )。

## 3 讨论

研究<sup>[7-8]</sup>表明移植 BMSCs 能够分泌多种细胞因子, 如胰岛素样生长因子、脑源性神经营养因子、血管内皮细胞生长因子、粒-巨噬细胞集落刺激因子、成纤维细胞生长因子、转化生长因子- $\beta$ 、神经生长因子和肝细胞生长因子, 这些因子对脊髓神经起保护作用并促进内源性神经前体细胞的增生。在本

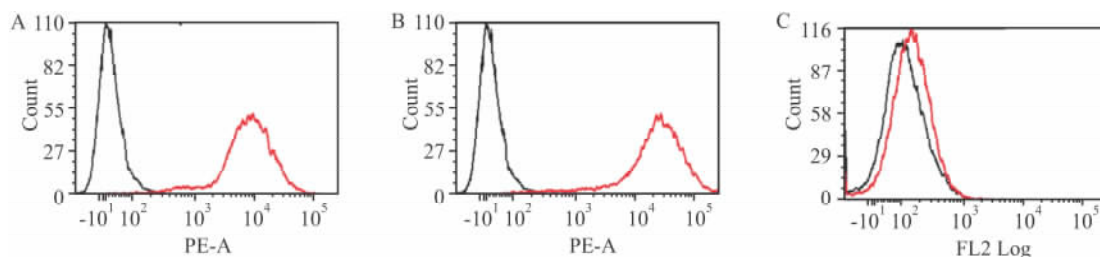


图 2 大鼠 BMSCs 表面标志物检测结果

A: CD90; B: CD29; C: CD34; 灰色线条代表对照组; 红色线条代表阳性细胞

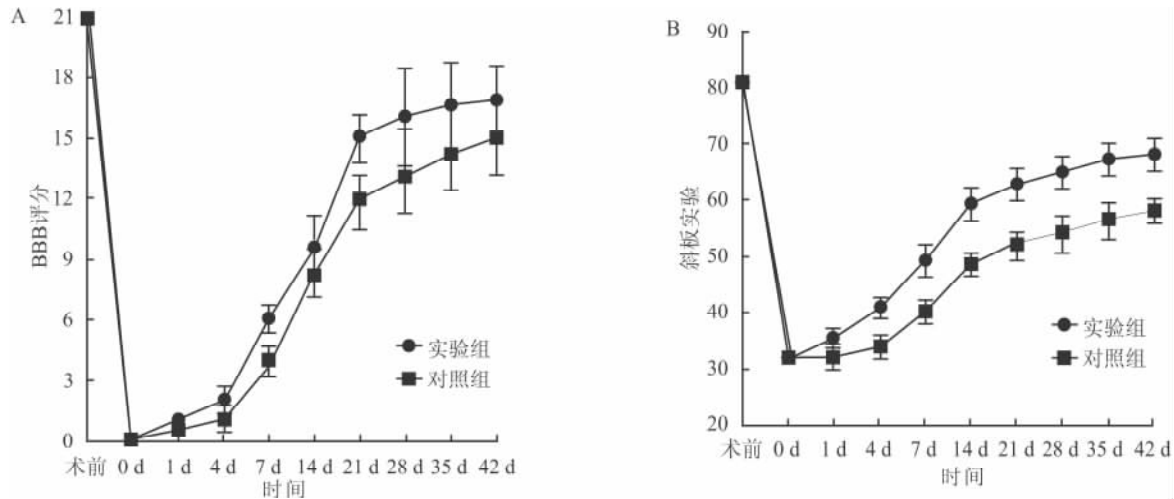


图3 两组SCI大鼠在不同时间点的行为学评价结果  
A: BBB评分; B: 斜板实验

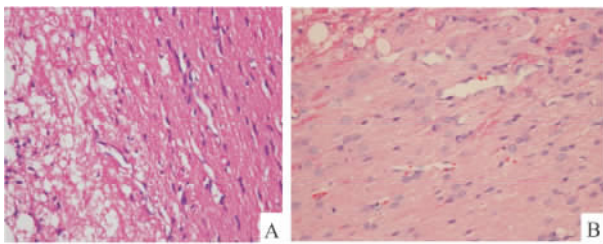


图4 A1、B1组大鼠HE染色观察SCI区血管生长情况 ×100  
A: A1组; B: B1组

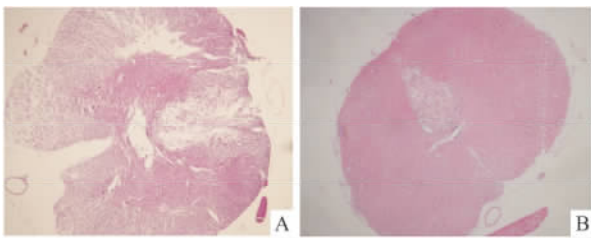


图5 A2、B2组大鼠HE染色观察脊髓空洞结果 ×40  
A: A2组; B: B2组

实验中观察到对损伤区血管直径增大和脊髓空洞减小可能与血管内皮细胞生长因子可以促进血管生长,使血管直径变大,通过促进损伤区血流量、携氧量及营养物质供应增加,进而诱导轴突再生并且减少其他修复损伤组织的营养因子进一步降解有关<sup>[9-10]</sup>,研究<sup>[11]</sup>表明血管直径变大,有利于增强局部血流灌注和神经救援。所以血管直径增大,不仅能够得到更好地组织灌注,而且可以更好地保护变性的神经元细胞及损伤组织,从而减小损伤组织进一步扩散,使后期脊髓空洞形成减小。研究<sup>[12]</sup>表明,机体SCI后会自发的激活内源性的神经干细胞,

BMSCs 所分泌的神经生长因子对于神经细胞的存活具有促进作用,可以提高活性,减少损伤后细胞的凋亡,同时还能够促进神经干细胞向神经元分化<sup>[13]</sup>。脑源性神经营养因子在神经系统受到损伤时,可以保护神经细胞避免损伤,减少凋亡,促进细胞的修复<sup>[14]</sup>并减少星形胶质细胞瘢痕形成<sup>[13]</sup>,从而可以保护SCI区的组织,减小脊髓空洞体积。本研究成果与之一致。

王红星等<sup>[15]</sup>认为大鼠SCI后,其后肢运动功能具有自然恢复的能力,但恢复能力有限,本实验BBB评分从第4天开始有组间差异,说明应用BM-SC-CM治疗开始见效。在BMSC移植治疗大鼠SCI的研究中,行为学上用BBB评分来评价大鼠运动功能恢复,在动物造模相同的情况下,BMSC移植治疗大鼠SCI 4周后,Karaoz et al<sup>[2]</sup>和 Quertainmont et al<sup>[1]</sup>分别获得BBB评分为15分、12分,而本研究用BMSC-CM处理的大鼠,在4周时获得16分,这说明移植BMSC-CM对SCI后功能恢复同样有作用。

本研究在彻底避免了BMSCs的直接和间接作用下用成年大鼠的BMSC-CM治疗大鼠SCI,观察到大鼠的运动功能逐渐恢复,并得到积极的效应,这不仅可以避免干细胞移植带来的缺点,而且避免了使用细胞所涉及的伦理问题,为SCI治疗开发了无细胞移植方法,但需要更多的研究来评估这种治疗方法,以及其将来的临床应用潜力。

参考文献

[1] Quertainmont R, Cantinieaux D, Botman O, et al. Mesenchymal stem cell graft improves recovery after spinal cord injury in adult rats through neurotrophic and pro-angiogenic actions [J]. PLoS

- One ,2012 ,7( 6) : e39500.
- [2] Karaoz E , Kabatas S , Duruksu G , et al. Reduction of lesion in injured rat spinal cord and partial functional recovery of motility after bone marrow derived mesenchymal stem cell transplantation [J]. *Turk Neurosurg* ,2012 ,22( 2) : 207 – 17.
- [3] Kinnaird T , Stabile E , Burnett M S , et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms [J]. *Circulation* ,2004 ,109( 12) : 1543 – 9.
- [4] Togel F , Weiss K , Yang Y , et al. Vasculotropic , paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol* ,2007 ,292( 5) : F1626 – 35.
- [5] Timmers L , Lim S K , Hoefer I E , et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction [J]. *Stem Cell Res* ,2011 ,6( 3) : 206 – 14.
- [6] Kim H J , Lee J H , Kim S H. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells on traumatic brain injury in rats: secretion of neurotrophic factors and inhibition of apoptosis [J]. *J Neurotrauma* ,2010 ,27( 1) : 131 – 8.
- [7] Wei X , Du Z , Zhao L , et al. IFATS collection: The conditioned media of adipose stromal cells protect against hypoxia-ischemia-induced brain damage in neonatal rats [J]. *Stem Cells* ,2009 ,27( 2) : 478 – 88.
- [8] Cantinieaux D , Quertainmont R , Blacher S , et al. Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: an original strategy to avoid cell transplantation [J]. *PLoS One* ,2013 ,8( 8) : e69515.
- [9] Hobson M I , Green C J , Terenghi G. VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy [J]. *J Anat* ,2000 ,197 Pt 4: 591 – 605.
- [10] Dray C , Rougon G , Debarbieux F. Quantitative analysis by *in vivo* imaging of the dynamics of vascular and axonal networks in injured mouse spinal cord [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,2009 ,106( 23) : 9459 – 64.
- [11] Lu D , Mahmood A , Goussev A , et al. Atorvastatin reduction of intravascular thrombosis , increase in cerebral microvascular patency and integrity , and enhancement of spatial learning in rats subjected to traumatic brain injury [J]. *J Neurosurg* ,2004 ,101( 5) : 813 – 21.
- [12] Ke Y , Chi L , Xu R , Luo C , et al. Early response of endogenous adult neural progenitor cells to acute spinal cord injury in mice [J]. *Stem cells* ,2006 ,24( 4) : 1011 – 9.
- [13] Jain A , McKeon R J , Brady-Kalnay S M , et al. Sustained delivery of activated Rho GTPases and BDNF promotes axon growth in CSPG-rich regions following spinal cord injury [J]. *PLoS One* ,2011 ,6( 1) : e16135.
- [14] Ochodnický P , Cruz C D , Yoshimura N , et al. Nerve growth factor in bladder dysfunction: contributing factor , biomarker , and therapeutic target [J]. *NeuroUrol Urodyn* ,2011 ,30( 7) : 1227 – 41.
- [15] 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 – 6.

## Effects of conditioned medium local transplantation in repair of rat with spinal cord injury

Zhang Feng Shen Cailiang Song Peiwen et al

( Dept of Spine Surgery ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the promoting effects of bone marrow mesenchymal stem cells conditioned medium ( BMSC-CM) local transplantation on function recovery of rat spinal cord injuries. **Methods** The spinal cord of adult rats was injured with modified Allen method , and the rats were randomly divided into 2 groups. The rats in the control group were subjected to the microinjection of saline solution ( 10  $\mu$ l) into the spinal cord injuries site after spinal cord injuries , and those in the experimental group were injected with the concentrated conditioned medium ( 10  $\mu$ l) derived from the passage 3 BMSCs. The inclined plane test and Basso , Beattie and Bresnahan locomotor rating scale ( BBB scale) were used to observe the recovery of rats' behavioral function after the transplantation. Hematoxylin-eosin ( HE) staining to reflect the change of cavity volume and angiogenesis at the lesion epicenter. **Results** BMSC-CM treated animals showed better BBB scores and inclined plane scores than control animals , and this difference was statistically significant (  $P < 0.05$  ). BMSC-CM treated group showed reduced cavity volume and the blood vessels exhibited larger diameters compared to the control group. **Conclusion** BMSC-CM can promote the recovery of neurological function in spinal cord injury , reduce cavity volume , and improve blood vessel growth. **Key words** spinal cord injury; mesenchymal stem cells; conditioned medium; transplantation