

移植人脐带间充质干细胞治疗缺氧缺血性脑损伤的两种方法比较

张琴芬, 屠文娟

常州市儿童医院, 江苏 常州 213003

摘要: **目的** 比较人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)经颈静脉及经腹腔两种途径移植后在缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)新生大鼠脑内的分布、分化情况, 寻找简单易行且有效的移植途径。**方法** RICE 法制备 7 日龄新生大鼠 HIBD 模型, 随机分组: HIBD 组($n=10$)、腹腔移植组($n=15$)、颈静脉移植组($n=15$), 另随机取未造模的 10 只为正常对照组。造模后 72 h 后分别对颈静脉移植组和腹腔移植组移植等量的 hUCMSCs(1×10^6 个/只), 而 HIBD 组及正常对照组不移植。于移植后 36 d 免疫荧光染色比较 Dil 标记的 hUCMSCs 移植后在各组大鼠脑中的分布情况; 神经元前体细胞标记 DCX 特异性染色观察 hUCMSCs 移植后分化成神经元前体细胞的情况。**结果** 移植后 hUCMSCs 能迁徙到脑组织中, 能分化成神经元前体细胞。经颈静脉移植途径优于经腹腔移植($P < 0.01$)。**结论** hUCMSCs 移植后可以在 HIBD 新生大鼠脑内存活, 并向神经元前体细胞分化, 对 HIBD 新生大鼠脑功能有修复作用, 尤以经颈静脉移植明显。

关键词: 人脐带间充质干细胞; 缺氧缺血性脑损伤; 移植; 经颈静脉; 经腹腔

中图分类号: Q954.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-6579(2015)01-0035-04 **doi:** 10.11852/zgetbjzz2015-23-01-11

Study on two approaches of transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. ZHANG Qin-fen, TU Wen-juan. (*Childrens Hospital of Changzhou, Changzhou, Jiangsu 213003, China*)

Abstract: **Objectiv** To compare the distribution and differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) after the transplantation via the jugular vein and via the intraperitoneal injection, and investigate the effect of hUCMSCs transplantation on the recovery of neurological functions after hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** The models of 7-day-old neonate rats with HIBD brain were established, and randomly assigned to: HIBD group ($n=10$), the intravenous injection group ($n=15$), the intraperitoneal injection group ($n=15$) and control group ($n=10$), the HIBD group and control group were not transplanted. The same amount hUCMSCs(1×10^6 , 0.2 mL) were transplanted into the intravenous injection group and the intraperitoneal injection group after 72 hours. Finally, brain tissues of rats were removed after 4% paraformaldehyde was perfused in cardiac to fix brain and successive sections were made using a cryomicrotome. Immunofluorescence staining was performed to examine the distribution of Dil-labeled hUCMSCs and expression of DCX. **Results** The transplantation descendants of hUCMSCs could migrate to the brain tissue, and could differentiate into neuronal precursor cells, and the intravenous injection group showed more Dil-labeled hUCMSCs in brain tissue. **Conclusions** Transplanted hUCMSCs can survive and differentiate in the HIBD rats' brain. The HUCMSCs can effectively accelerate the recovery of neurological functions after HIBD. And the experiment proved intravenous injection is better than intraperitoneal injection in repairing rats' brain function.

Key words: human umbilical cord mesenchymal stem cells; hypoxic-ischemic brain damage; transplantation; intravenous injection; intraperitoneal injection

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxia-ischemic encephalopathy, HIE)是新生儿期危害最大的疾病之一,常引起新生儿的死亡或严重的神经系统损害。传统的神经康复治疗、促神经再生等治疗效果并不尽如人意,干细胞移植的出现带来了新的希望。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesen-

chymal stem cells, hUCMSCs)近年来已成为继骨髓干细胞之后又一组织工程种子细胞,并且在神经系统疾病、心血管疾病、糖尿病、肝病等多种疾病中有了认可的基础研究,但具体在新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)的相关研究较少。本研究通过体外扩增人脐带间充质干细胞,并将其通过颈静脉以及腹腔注射两种途径移植至 7 日龄新生大鼠 HIBD 模型中,比较干细胞在脑内的分布、分化情况,探讨干细胞移植的简便易行而且有效的途径。

作者简介: 张琴芬(1976-),女,副主任医师,硕士学位,主要研究方向为新生儿脑损伤及早产儿。

数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1346.R.20141215.1400.001.html>

1 材料和方法

1.1 HIBD 模型制备及分组 取清洁级 7 日龄新生 SD 大鼠 55 只,雌雄不拘,体重 10~12 g,购于南通大学医学院动物中心。其中随机取 45 只按 RICE 法建立模型,乙醚麻醉,碘伏消毒颈前皮肤,沿颈前正中切开皮肤,钝性分离皮下组织和肌肉,分离左颈总动脉,两端结扎并离断,缝合皮肤,并再次消毒皮肤。术后恢复 2~4 h,放入含 8%氧、92%氮的容器中,气流量 0.5 L/min,用水浴箱控制温度为 36℃~37℃维持约 2~2.5 h,实验鼠出现左旋动作,1~2 只鼠抽搐,则离开缺氧环境。缺氧结束后放回母鼠身边常规喂养。其中死亡 5 只,剩余 40 只随机分组:HIBD 组($n=10$)、腹腔移植组($n=15$)、颈静脉移植组($n=15$),未造模的 10 只为正常对照组。

1.2 主要试剂 抗 DCX 单克隆抗体(美国 Millipore 公司),羊抗豚鼠 IgG(美国 invitrogen 公司),Dil(美国 Sigma 公司),Hoechst 33258(美国 Sigma 公司),TTC(1%2,3,5-氯化三苯基四氮唑)(美国 Sigma 公司)。

1.3 脑片 TTC 染色

1.3.1 TTC 染色原理 TTC 用于检测哺乳动物组织的缺血改变。TTC 是呼吸链中的质子受体,由于脱氢酶反应,正常组织被染色后呈红色,而缺血组织由于脱氢酶活性不足,染色后不发生反应,故呈苍白。采用 TTC 染色,结合大鼠造模后的动作行为异常,可以判断 HIBD 模型制作是否成功。

1.3.2 步骤 各组均随机抽取 1 只,于造模后 24 h,乙醚麻醉后断颈处死,迅速取出脑组织,-20℃冰冻 20 min,震动切片器切片,切去额极 1 mm,每片 2 mm,完成后置于 1% TTC 溶液中,取锡箔纸将其遮盖,置于 37℃温箱 15~30 min,期间不时翻动脑片,使其均匀染色;取出,观察脑片。

1.4 hUCMSCs 的标记 hUCMSCs 从江苏省北科生物科技有限公司获取,为第三代干细胞,存放于南通大学医学院解剖教研室的超低温冰箱(-80℃)中保存。使用前复苏、扩增,按 1×10^6 /mL 悬浮于细胞膜红色荧光标记物 Dil 溶液(1:500)中,4℃孵育 5 min,37℃孵育 15 min,生理盐水清洗 3 遍后按 5×10^6 /mL 细胞密度悬浮于生理盐水中待用。同时,荧光显微镜下观察细胞染色情况。

1.5 hUCMSCs 的移植 于造模成功后 3 d,分别经颈静脉及腹腔注射途径,将 Dil 标记的人脐带间充质干细胞(1×10^6 个/只)悬液定量缓慢注入腹腔移植组、颈静脉移植组体内(200 μ L/只)。HIBD 组和正常对照组不进行移植。

1.6 组织学检查 干细胞移植后 36 d,各组实验鼠腹腔注射复合麻醉剂(2 mL/kg),4%多聚甲醛(PFA)灌注,用 20%、30%蔗糖脱水,脑组织用 O.C.T 固定于冰冻切片器(Leica CM1900,德国)中,缺血区域冠状切片,厚度 25 μ m。将不同层面脑片加入含 10%山羊血清的 0.01 M PBS(PH7.2)封闭 30 min。吸去封闭液,脑片加入 1:1 000 稀释的抗 DCX 单克隆抗体中,置 4℃冰箱过夜。然后吸去一抗,漂洗 3 遍,加入 448 标记的羊抗豚鼠 IgG,37℃孵育 2 h,漂洗 3 遍,Hoechst 染核,贴片,荧光显微镜(Leica DMIRB,德国)观察 Dil 标记阳性细胞分布情况,激光共聚焦显微镜观察 Dil 及 DCX 标记均阳性的细胞分化情况。

1.7 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数运用单因素方差分析进行统计处理, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TTC 染色结果 随机所取自 HIBD 组、腹腔移植组及颈静脉移植组的 1 只造模大鼠,TTC 染色结果均显示:大鼠离断颈总动脉侧大脑中动脉分布区域呈现苍白缺血区(白箭头),并成底向皮层的锥形分布。见图 1。而正常对照组大鼠脑片 TTC 染色未见苍白改变。

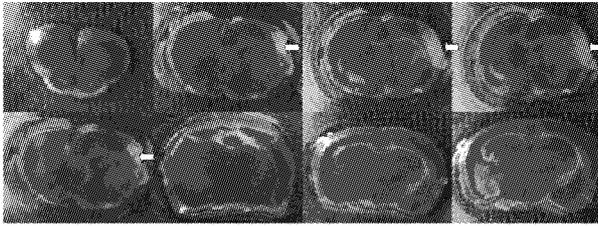
2.2 组织学检查结果

2.2.1 Dil 标记后 hUCMSCs 细胞形态 Dil 和细胞膜长期而且稳定地结合,呈红色荧光,由于无毒故一般不影响细胞的生存力,因此 Dil 被广泛用于活的或固定的神经等组织或细胞的示踪甚至长期示踪,它可以有效地显示移植细胞的迁移及分化。Dil 标记后,hUCMSCs 呈现红色荧光,细胞形态表现为梭形、椭圆形等。见图 2。

2.2.2 免疫组化染色结果 Hoechst 是蓝色荧光染料,对细胞毒性较低,被用于细胞核的染色,但无论细胞是否存活都能染色。本实验中,采用 Dil 染细胞膜,Hoechst 33258 染细胞核。hUCMSCs 移植后 36 d,四组动物均灌注后取脑组织切片,腹腔移植组及颈静脉移植组实验大鼠缺血区域脑片荧光显微镜观察发现散在 Dil 标记的阳性细胞。见图 3。静脉移植组单位面积的平均阳性细胞数为(35.32 ± 4.30)个,而腹腔移植组(22.08 ± 5.72)个,前者单位面积 Dil 阳性细胞数明显多于后者,差异有统计学意义($P < 0.01$)。HIBD 组及正常对照组脑片未见 Dil 标记的阳性细胞。

腹腔移植组及颈静脉移植组神经元前体细胞标记物微管相关蛋白 DCX 特异性染色,激光共聚焦下

可见 Dil 及 DCX 双标记均阳性的细胞,提示人脐带间充质干细胞迁移脑内后可分化成神经元前体细胞。见图 4。



注:白箭头所指为缺血区域。

图 1 HIBD 模型后 24 h 脑组织 TTC 染色

Fig. 1 Brain tissue with TTC staining after 24 h of HIBD model

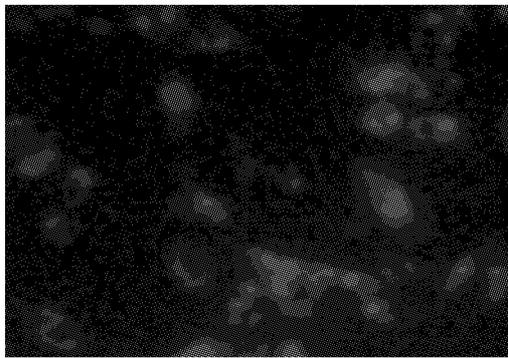
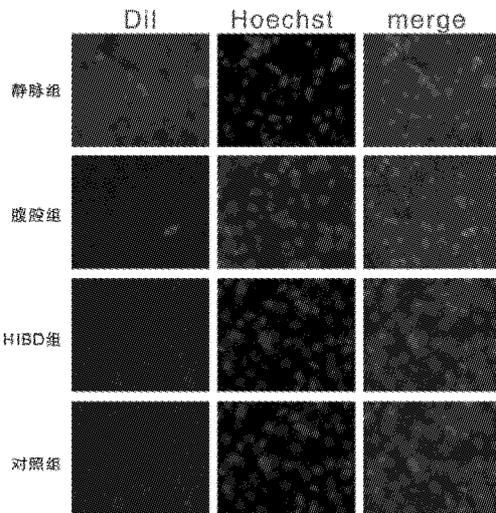


图 2 Dil 标记后 hUCMSCs 细胞形态(×400)

Fig. 2 Morphology of hUCMSCs after Dil staining(×400)



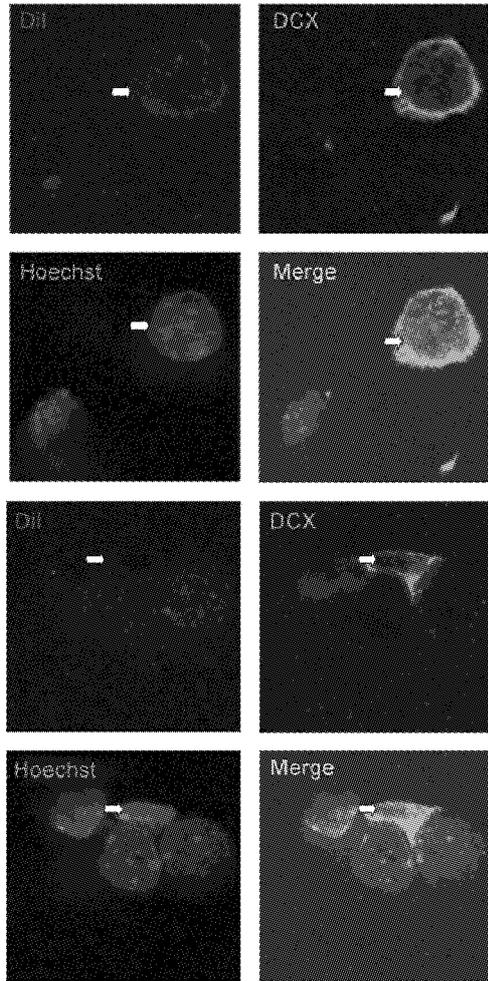
注:荧光显微镜下图片,颈静脉移植组 Dil 标记阳性细胞明显多于腹腔移植组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

图 3 四组大鼠脑片免疫荧光染色结果比较(×200)

Fig. 3 Comparison of immunofluorescence staining of four groups of rat brain slices(×200)

3 讨论

3.1 关于脐带间充质干细胞 近年来,细胞治疗是整个医学界探索的前沿技术,干细胞因其特有的自



注:激光共聚焦下图片,白箭头所指的为 Dil 及 DCX 标记均阳性的细胞,为神经元前体细胞。

图 4 人脐带间充质干细胞分化成神经元前体细胞(×400)

Fig. 4 Transplantation descendants of hUCMSCs differentiate into neuronal precursor cells(×400)

我更新、多向分化潜能等特点,成为细胞治疗的研究热点。自 1966 年由 Friedenstein 等从骨髓中发现间充质干细胞开始,科学家们便专注于干细胞的研究。其中,利用干细胞移植对神经系统的修复已成为脑损伤后神经再生修复的重要研究方向。脐带间充质干细胞分离于脐带的华尔通胶(wharton's jelly, WJ)^[1],与骨髓间充质干细胞相比有很大的优越性^[2],如来源丰富,不受伦理的争论和限制;如更低的免疫原性,低表达或不表达免疫排斥相关标记,异体移植无免疫排斥反应或反应较弱,如更高的增殖分化潜能,因此在细胞治疗及组织工程方面有极大的应用价值^[3]。

C Bentlage 等^[4]提出:移植成功与移植物来源、移植时间等密切相关。人脐带间充质干细胞因其有优于胚胎干细胞、骨髓干细胞、脐血干细胞的诸多优势,故为理想的种子细胞。所以本实验选用脐带间

充质干细胞移植。EM Jansen 等^[5]选择在损伤后 3 d 移植,有毒生物化学环境开始减退,大量的细胞死亡还未开始。KI Park^[6]认为缺氧损伤刺激后静止的移植细胞及宿主细胞开始有丝分裂,于 3 d 达高峰。故损伤后 3 d 移植可能为较理想的移植时间。

3.2 关于移植途径 移植途径对于干细胞移植成功与否也很重要。干细胞移植的途径,早期实验多采用脑室内或脑实质内定向注射,其技术要求高,可能造成脑水肿及阻塞脑脊液循环等弊病。同时脑内立体定向注射移植干细胞的成功率较低,原因是植入脑损伤部位的干细胞有可能被激活的小胶质细胞和巨噬细胞等细胞所清除。脑内移植有容积占位效应,致使干细胞移植量受限,这也是导致移植成功率降低的因素之一。此外,经脑内移植还可导致局部干细胞过度聚集,不利其分化。同时定向移植适合较局限的脑的病变,对 HIE 这种弥漫性或多灶性脑组织病变尤不适用。故立体定向注射对于脐带间充质干细胞治疗缺氧缺血性脑病不是一个很好的途径。静脉注射干细胞是另一种移植途径。目前实验室移植干细胞多通过鼠尾静脉、颈静脉等注射方式。但新生大鼠静脉细、难以辨认,进针成功率低,且进针后易发生肿胀,干细胞易渗漏,给干细胞定量注射带来一定的困难,同时静脉注射高浓度细胞悬液有发生血管栓塞以及体液失衡,容易造成小小的 7 日龄实验鼠死亡。受新生儿溶血病宫内腹腔输血红细胞能完整地通过淋巴管进入胎儿循环的提示,官晓清等^[7]证实了经腹腔注射间充质干细胞可以通过腹膜进入血循环,并通透血脑屏障,并有向神经前体细胞分化的趋势。

本实验颈静脉移植组及腹腔移植组实验鼠脑片均可见脑内有较多存活的移植干细胞(Dil 标记阳性),集中于损伤区域,表明静脉移植以及腹腔移植干细胞能够通透血脑屏障,并迁移至缺血损伤区域,可能与脑损伤后血脑屏障破坏,通透性增加,同时在炎症介质诱导下干细胞与血管内皮细胞、基膜特异性结合等有关^[8-9]。移植的 hUCMSCs 迁徙到脑组织中,并且通过 Dil 追踪发现,其能够分化成神经元前体细胞(DCX 特异性染色)。SS Kim 等^[10]报道,间充质干细胞移植入模型鼠脑内可分化为成熟的神经元,与宿主的神经细胞形成局部的神经回路,从而促进神经功能的恢复。

颈静脉移植组大鼠脑片中 Dil 标记阳性干细胞

分布明显多于腹腔移植组($P < 0.01$),同时激光共聚焦下可见 Dil 及 DCX 双标记均阳性的细胞,提示人脐带间充质干细胞迁移脑内后可分化成神经元前体细胞。由此可见 hUCMSCs 移植,经颈静脉移植途径优于腹腔移植。

本组实验,人脐带间充质细胞移植能够在缺氧缺血新生大鼠模型中成活,并发挥一定的活性,参与体内神经系统的修复,促进行为功能的改善。本研究也提示经颈静脉移植后对 HIBD 新生大鼠模型的脑功能修复作用优于经腹腔移植组。

参考文献

- [1] Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML. Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's Jelly of umbilical cord [J]. *Methods Cell Biol*, 2008, 86:101-119.
- [2] Moretti P, Hatlapatka T, Marten D, et al. Mesenchymal stromal cells derived from human umbilical cord tissues, primitive cells with potential for clinical and tissue engineering applications [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2010, 123:29-54.
- [3] Allison M. Genzyme backs osiris, despite prochymal flop [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(11):966-977.
- [4] Bentlage C, Nikkhan G, Cunningham MG, et al. Reformation of the nigrostriatal pathway by fetal dopaminergic micrografts into the substantia nigra is critically dependent on the age of the host [J]. *Exp Neurol*, 1999, 159(1):177-190.
- [5] Jansen EM, Solberg L, Underhill S, et al. Transplantation of fetal neocortex ameliorates sensorimotor and locomotor deficits following neonatal ischemic-hypoxic brain injury in rats [J]. *Exp Neurol*, 1997, 147(2):487-497.
- [6] Park KI. Transplantation of neural stem cells; cellular and gene therapy for hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Yonsei Med J*, 2000, 41(6):825-835.
- [7] 官晓清, 余加林. 骨髓间充质干细胞透过新生大鼠血脑屏障的实验研究 [J]. *中华儿科杂志*, 2004, 42(12):920-923.
- [8] Wang L, Li Y, Chen X, et al. MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture [J]. *Hematology*, 2002, 7(2):113-117.
- [9] Dormady SP, Bashayan O, Dougherty R, et al. Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment [J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001, 10(1):125-140.
- [10] Kim SS, Yoo SW, Park TS, et al. Neural induction with neurogenin 1 increases the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in the ischemic brain [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(9):2217-2228.

收稿日期:2014-03-06

本刊网址:www.cjchc.net