

人脐血间充质干细胞移植与神经节苷脂注射治疗脑瘫大鼠的对比研究

王丽敏¹, 郭佳丽², 杨自金², 谭振香¹, 田玉凤¹, 王超¹, 卢思广²

【摘要】 目的:建立稳定的人脐血间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)分离培养体系,观察其移植对脑瘫(CP)大鼠功能恢复的影响及细胞的存活、迁移、向神经细胞分化的情况,并与神经节苷脂(GM1)注射对 CP 鼠神经功能恢复进行对比。方法:采集足月新生儿脐带血 100ml,分离出单个核细胞,体外培养并予 5-溴脱氧嘧啶尿苷(BrdU)标记 72h;受孕 17d 孕鼠腹腔注射脂多糖(LPS)0.4mg/(kg·d),12h 后置于缺氧环境 2~2.5h,4h 后再次腹腔注射同剂量 LPS,孕鼠自体分娩,生后 4 周,通过行为学评分选择 CP 模型动物 80 只,随机分为 4 组:CP 组(CP 模型)、假移植组(CP 模型+PBS)、MSCs 移植组(CP 模型+MSCs)、GM1 注射组(CP 模型+GM1),每组 20 只。移植后第 1、2、3 周应用免疫荧光法观察 BrdU 标记的 MSCs 的存活、迁移,移植后第 4 周,通过行为学评价观察大鼠神经功能恢复情况,应用免疫荧光法检测其胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和神经元特异性烯醇化酶(NSE)的表达情况。结果:MSCs 移植比 GM1 注射使大鼠握持时间更长,足错误次数更少($P<0.05$);移植的 MSCs 可在大鼠脑组织中存活,并向四周脑组织迁移, (0.45 ± 0.68) 个 MSCs 表达 GFAP, (0.15 ± 0.36) 个 MSCs 表达 NSE。结论:人脐血 MSCs 移植比神经节苷脂注射较好的提高 CP 大鼠神经功能的恢复,移植细胞可在大鼠脑缺血区域中存活、迁移,并部分向星形胶质细胞或神经元分化。

【关键词】 人脐血间充质干细胞;神经节苷脂;脑瘫;移植

【中图分类号】 R49;R742.3 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2015.05.003

Comparative study on transplantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells vs. injection of gangliosides for cerebral palsy in rats Wang Limin, Guo Jiali, Yang Zijin, et al. Department of Pediatrics, the First People's Hospital of Jia Musi, Jia Musi University, Jia Musi 154003, China

【Abstract】 Objective: To establish the isolation and steady cultivation system of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from human umbilical cord blood and observe the neurological functional recovery after transplanting MSCs, and detect the survival time, migration and neural differentiation of MSCs; to compare the neurological functional recovery between MSCs transplantation vs. injection of gangliosides (GM1). **Methods:** The mononuclear cells isolated from 100 mL of cord blood of full-term babies were cultured *in vitro* and labeled with 5-bromodeoxyuridine (BrdU) for 72 h; pregnant rats of 17 days were injected with LPS 0.4 mg/(kg·day) intraperitoneally. After 12 h, the rats were placed in the oxygen-free environment for 2—2.5 h. Four h later, the rats were given LPS once again. Eighty 4-week-old new born cerebral palsy (CP) rats were chosen by behavioral evaluation. The rats were randomly divided into 4 groups: CP group (model of CP), false transplantation group (transplantation of PBS after CP), MSCs transplantation group (transplantation of MSCs after CP), GM1 group (injection of GM1 after CP). At first, 2nd, and 4th week after transplantation, immunofluorescence method was used to check the survival, migration and differentiation of MSCs labeled with BrdU after transplantation of MSCs. Neurological functional recovery was observed according to the evaluation of behaviors at the forth week, and the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neuron-specific enolase (NSE) in BrdU-labeled MSCs was detected by immunofluorescence method. **Results:** In MSCs transplantation group, the length of holding time was longer, while the errors of feet were less than in GM1 group ($P<0.05$). The transplanted MSCs could survive in the brain and migrate to the surrounding brain tissue. About (0.45 ± 0.68) MSCs expressed GFAP and (0.15 ± 0.68) MSCs expressed NSE. **Conclusion:** For the transplantation of MSCs in rats, the neurological functional recovery was better than the injection of GM1 ($P<$

0.05). The transplanted MSCs could survive in the brain, migrate to the surrounding brain tissue and differentiate into astrocytes or neurons.

【Key words】 human umbilical cord mesenchymal stem cells; gangliosides; cerebral palsy; transplantation

基金项目:江苏省连云港市科技局重点科室建设(NO. SH1117)

收稿日期:2015-02-09

作者单位:1. 佳木斯大学附属第一医院儿内科,黑龙江 佳木斯 154003;

2. 连云港市第一人民医院儿内科,江苏 连云港 222000

作者简介:王丽敏(1964-),女,主任医师,主要从事儿童康复方面的研究。

通讯作者:郭佳丽,2668868928@qq.com

人脐血间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, UCBMSCs)具备来源丰富和定向转化能力等特性,具有可观的临床研究和应用前景^[1]。研究证实^[2],神经节苷脂(gangliosides, GM1)对治疗婴幼儿脑瘫(cerebral palsy, CP)有部分临床疗效,能改善 CP 患儿运动及认知功能,但 UCBMSCs 移植治疗 CP 的基础研究很少,本研究从脐血中分离培养 MSCs 并将其移植到 CP 鼠侧脑室,观察其神经功能恢复及移植细胞的分化情况,观察 UCBMSCs 移植与 GM1 注射治疗 CP 模型鼠的疗效对比。

1 材料与方法

1.1 材料 ①动物及分组:随机选取 7d 龄 SD 新生鼠制作缺血缺氧性 CP 模型 80 只、假手术 20 只,雌雄不限,分为假手术组、CP 模型组、假移植组、MSCs 移植组、GM1 注射组,分别为 5 组各 20 只。②主要试剂:OrillCell™细胞培养液,5-溴脱氧嘧啶尿苷(5-bromodeoxyuridine, Brdu)(Sigma);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记大鼠抗 Brdu 抗体(ABCAM),PE 标记胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体(Millipore),兔抗神经元特异性烯醇化酶(neuron marker NeuN, NSE)抗体(Abcam),PE 标记羊抗兔 IgG-Cy3(Millipore),GM1(齐鲁制药有限公司),流式所用抗体(eBioscience)。③主要仪器:汪湾 IC 型动物脑立体定位仪, Olympus 倒置相差显微镜 IX-71, EUROSTAR III PLUS 型荧光显微镜, FACS Canto 流式细胞仪。

1.2 方法 ①脐血 MSCs 的分离和培养:采集足月正常分娩胎儿脐血 100ml,分离、提取单个核细胞,以 1×10^6 个/ml 的细胞密度接种于含 10% 胎牛血清的 OrillCell™培养液的培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱内。1 周后更换培养液,弃掉未贴壁细胞,以后换液 3d/次,当细胞汇合度达到 80%~90% 时,进行扩增传代。移植前 72h 加入 Brdu 10μmol/L 进行标记。移植前检测细胞活力,调终浓度至 1.0×10^5 /10μl 备移植用。②脐血 MSCs 的鉴定:收集第 4 代 MSCs,制成浓度为 1×10^6 /ml 的单细胞悬液,每个 Eppendoff 管加 50μl 细胞悬液,并分别加入小鼠抗人直标 CD34、CD44、CD29、CD105、CD45 各 10μl,阴性对照管加 FITC 标记的兔抗鼠 IgG 及 PE 标记的兔抗鼠 IgG 各 10μl,4℃ 孵育 30min 后用流式细胞仪分析细胞表面抗原。③CP 造模:受孕 17d 孕鼠腹腔注射脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)0.4mg/(kg·d),连续注射 2d,孕鼠自体分娩,生后 4 周通过进行握持牵引试验时间、足错误试验行为学评价及病理检查^[3],筛

选 CP 模型动物 80 只。④CP 模型侧脑室移植:对 CP 模型进行麻醉并固定在立体定位仪,作头皮矢状切口,定位注射部位,钻孔。注射部位为左侧侧脑室:AP = -3mm, ML = -1.5mm, DV = -4mm。MSCs 移植组:向每个注射点注射 10μl 细胞悬液(细胞数约为 1×10^5 个/10μl),GM1 注射组与假移植组移植部位相同,分别注射相同容积的 GM1 溶液(含 GM120μg)、PBS 液。

1.3 评定标准 ①行为学评价:包括握持牵引试验及足错误试验^[4],握持牵引实验:大鼠用前爪抓住离地面 45cm 水平放置的直径 0.6cm 的空心塑料管悬挂,记录其悬挂时间(最大值为 60s,超过 60s 按 60s 计算);足错误实验:记录大鼠在水平放置的网格上(50cm×40cm,每格 3cm×3cm)2min 内前、后肢或爪子掉下来的次数,为排除不同大鼠活动度差别的影响,只将左右侧错误次数的差值进行统计分析。②伊红(HE)染色检查:脑组织 HE 染色检查是行为学测后进行,随机取 CP 组和假手术组幼鼠各 2 只,作脑组织切片 HE 染色,观察脑组织形态学变化。③免疫组织化学分析:于移植后 1W、2W、3W 移植组随机取 2 只,取脑组织(方法同前),制作石蜡切片,片厚 3μm 做脑组织免疫组织荧光,计数同一部位 Brdu 阳性细胞数,计算其平均值。其余大鼠均在 28d 进行功能测试后处死,检测移植细胞 GFAP 标志及 NSE 标志,随机计数 20 个视野,计算平均数。

1.4 统计学方法 用 SPSS 11.5 软件分析数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脐血 MSCs 的分离纯化 分离纯化的单核细胞培养 24h 后出现贴壁细胞生长,原代细胞生长较为缓慢,更换培养液后细胞增长较快,逐渐生出较长的突起,呈长梭形,少部分呈多角形,单个核,折光较强。细胞达到 80%~90% 融合度时,进行传代培养,细胞增殖较原代细胞迅速,随时间的延长扁平圆形细胞逐渐消失,到第 3 代后细胞为形态较为单一、长梭形、单核的成纤维样细胞。见图 1。

2.2 脐血 MSCs 的鉴定 细胞传 4 代后,应用流式细胞仪进行面标志性抗原检测,结果显示脐血 MSCs 高表达抗原标记 CD13、CD44 和 CD105 表面标志,低表达 CD34 和 CD45 表面标志。

2.3 细胞免疫荧光结果 Brdu 标记脐血 MSCs 72h 后,细胞爬片后,应用直接免疫荧光法检测 Brdu 阳性细胞率,大部分细胞核被染成鲜绿色,结果为 93%,说明标记成功。见图 2。

2.4 行为学评价 移植4周后,各组握持时间比较:假手术组较CP组握持时间明显延长($P<0.05$);假移植组与CP组比较差异无统计学意义;MSCs移植组握持时间长于GM1注射组($P<0.05$),GM1注射组又长于CP组($P<0.05$)。足错误次数比较:CP组较假手术组错误次数明显增多($P<0.05$);假移植组与CP组错误次数比较差异无统计学意义;MSCs移植错误次数少于GM1注射组($P<0.05$),GM1注射组又少于CP组($P<0.05$)。见表1。

2.5 HE染色病理检查 术后3周,取脑组织做病理检查,大脑出现不同程度的出血,细胞肿胀,部分神经细胞变性坏死,周围炎细胞浸润,左半球较右半球严重,血管内可见血栓形成。见图3。

2.6 MSCs移植组大鼠脑内免疫组化 脐血MSCs移植后1、2、3周,大鼠脑组织切片均可见BrdU阳性细胞分布,以左侧侧脑室、额叶、顶叶皮质及白质较为密集,缺血侧BrdU阳性移植细胞数明显多于对侧。移植后第1周,BrdU阳性细胞以注射部位即左侧侧脑室为主,移植后第2周、3周左侧侧脑室BrdU阳性细胞逐渐减少,并逐渐向大脑皮质及白质、额叶、顶叶迁移。见表2、图4、5。第4周利用免疫荧光法检测移植细胞的GFAP标志及NSE标志,结果显示:(0.45 ± 0.68)个MSCs表达GFAP,(0.15 ± 0.36)个MSCs表达NSE,如图6。

表1 各组牵引实验及足错误实验结果比较

组别	n	握持时间(s)	足错误次数(次)
假手术组	18	43.2±12.9 ^a	0.3±0.4 ^a
CP组	20	23.5±7.0	2.7±1.1
假移植组	20	26.7±7.6	3.0±0.9
MSCs移植组	14	30.2±5.4 ^{ab}	1.2±0.8 ^{ab}
GM1注射组	20	27.2±3.0 ^a	1.9±0.7 ^a

与CP组比较,^a $P<0.05$;与GM1注射组比较,^b $P<0.05$

表2 MSCs移植组BrdU阳性细胞数 个/视野, $\bar{x}\pm s$

部位	移植后1周	2周	3周
左侧脑室	6.85±4.22	4.45±2.09	3.10±1.80
海马	3.50±1.43	2.55±1.86	2.20±1.24
顶叶	1.25±0.96	2.10±1.48	2.40±1.45
额叶	1.90±1.02	3.50±2.46	2.80±1.34

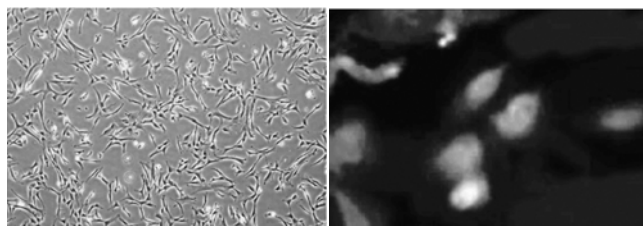


图1 第3代细胞,形态较为单一、长梭形、单核的成纤维样细胞(×40)

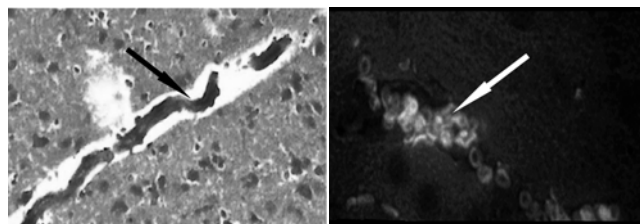


图3 手术3周后HE染色显示大脑血管内有液栓形成(×200)

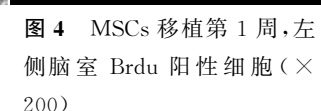


图4 MSCs移植第1周,左侧脑室BrdU阳性细胞(×200)

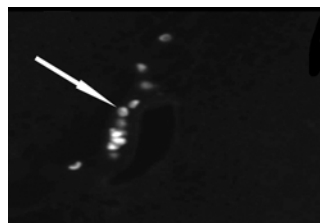


图5 MSCs移植第2周,迁移到额叶的FITC标记的BrdU阳性细胞(×200)

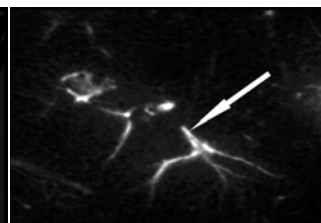


图6 MSCs移植第4周,侧脑室PE标记的GFAP阳性细胞(×200)

3 讨论

迄今,临床上对CP患儿多采取支持和对症的治疗方法,尚未研究出彻底有效的治疗方案^[5]。因此,CP患儿的功能恢复问题已成为世界各国科研机构研究的热点和难点。目前CP模型制作方法有3种:缺血缺氧因素所致CP模型、宫内感染因素所致CP模型、胆红素所致CP模型,第一种方法操作简单,易成功,后两种方法操作相对复杂,成功率相对低,主要是注射剂量的把握。本实验连续2d腹腔注射LPS,幼鼠出生后死亡较多,但成活的早产鼠符合CP标准的较多,与报道略不同^[4],可能与注射剂量偏大有关。

本实验在MSCs移植后第4周,通过脑组织免疫荧光法分别检测GFAP及NSE来观察移植细胞在大鼠脑组织内的分化情况,实验结果提示MSCs移植后可以分化为GFAP和NSE,但细胞分化神经元样细胞比例低,考虑与检测时机较早有关,选取合适的检测时间窗需要进一步的实验研究;目前有在体外一定诱导条件下,将MSCs诱导分化为相应组织细胞后再移植入人体内的相关报道,但经诱导分化的MSCs的细胞特性是否被改变,是否有发展为肿瘤可能?这些问题需要进一步研究。

本实验是研究MSCs移植与GM1注射治疗CP疗效的对比,MSCs移植对于CP鼠神经功能的恢复具有良好的促进作用,虽然其作用机制尚不完全明确,但目前认为可能机制包括:①MSCs在局部微环境的刺激下,向受损组织细胞分化并替代受损细胞有关^[6],这可能为移植后BrdU阳性细胞数逐渐减少的原因之

一,因此如何减少移植细胞的凋亡,使移植细胞更持久得存活在移植物体内,是保证细胞移植疗效的关键,又是一个研究难题,本实验是将 MSCs 一次性移植 CP 鼠左侧侧脑室,是否定期、定量、多注射点的移植方法效果更好些,待进一步研究;②可能与干细胞通过自分泌的形式产生各种细胞因子有关。研究证实, MSCs 能分泌 IL-6、IL-11、TPO、SCF、FLT-3 及 LIF 等多种细胞因子^[7],这些细胞因子参与脑组织的可塑性,如血管神经的再生及突触的发生^[8-9],这可能正是 MSCs 改善 CP 鼠神经功能恢复的作用机制,有待进行进一步研究;③增殖分化成神经样细胞,如星形胶质细胞,星形胶质细胞可以清除脑脊液中的碎片和毒素、调节神经递质和离子浓度及分泌神经营养因子等,从而维持神经元正常运行所需的内环境^[10]。GM1 改善 CP 大鼠的神经功能恢复,其作用机理可能是通过:①通过抑制 NO 合酶以减少过量 NO 的生成;②调节神经生长因子或与其结合,为其发挥作用提供良好的环境^[11];③GW1 易通过血-脑屏障嵌入到损伤的神经细胞膜,从而稳定细胞膜的结构,维持细胞膜上 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶及 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶的生物活性,进而起到维持细胞内外离子的平衡、防止细胞内 Ca^{2+} 的积聚及减轻神经细胞水肿;④GW1 对神经组织具有高度的特异亲和力,能够促进神经元的萌发突起, GW1 可以扩张血管,提供充足的能量和营养,以促进多损神经细胞的修复和再生^[12]。本实验通过分别对 MSCs 移植组及 GM1 注射组的 CP 大鼠进行行为学评价,结果显示 MSCs 移植比 GM1 注射使大鼠握持时间更长,足错误次数更少,能更好地提高 CP 大鼠神经功能的恢复,但远期效果如何需要更进一步的研究。

MSCs 具有低免疫原性,不易被 HLA 不相容受体识别,故 MSCs 细胞可应用于异源性或异种的移植治疗,脐血 MSCs 移植为神经系统损伤或发育缺陷疾病提供了广阔的治疗前景,极大地推动了神经系统的细胞治疗,开辟了神经系统治疗的新领域,具有重要的临床应用价值和前景,与此同时,也面临很多难题,故脐血 MSCs 移植治疗 CP,从基础实验向临床应用的迈进需要一个漫长的研究探索过程。

【参考文献】

[1] Lv P, Shan GQ, Zhang YN. Study on human umbilical

- cord blood MSCs for repair of traumatic brain injury in rats[J]. *Int J Lab Med*, 2012, 33(12): 1420-1421.
- [2] 卢国君,王永. 神经节苷脂治疗婴幼儿大脑性瘫痪临床研究[J]. *临床神经电生理学杂志*, 2009, 25(10): 297-299.
- [3] 李晓捷,高晶,孙忠认. 宫内感染致早产鼠脑瘫动物模型制备及其鉴定的实验研究[J]. *中国康复医学杂志*, 2004, 19(12): 885-889.
- [4] 陈刚,李江,刘伟,等. 构建新生乳鼠脑性瘫痪模型及其稳定性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(37): 7326-7329.
- [5] Feng GJ, Chen G, Yang XP. The Current Situation of Treating Hypoxic-ischemic Cerebral Palsy by Neural Stem Cells[J]. *Medical Recapitulate*, 2013, 19(4): 584-586.
- [6] Yoon Ha, Joong Uhn Choi, Do Heum Yoon, et al. Neural phenotype expression of culture human cord blood cells in vitro[J]. *Developmental Neuroscience*, 2001, 12(4): 3523-3527.
- [7] Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, et al. Human marrow derived mesenchymal stem cells(MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages [J]. *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research*, 2000, 9(6): 841-848.
- [8] Shao P, Tang L, Li P, et al. Application of a vasculature model and standardization of the renal hilar approach in laparoscopic partial nephrectomy for precise segmental artery clamping[J]. *Eur Urol*, 2013, 63(6): 1072-1081.
- [9] Luo F, Lv Q, Zhao Y, et al. Quantification and Purification of Mangiferin from Chinese Mango (*Mangifera indica* L.) Cultivars and Its Protective Effect on Human Umbilical Vein Endothelial Cells under H_2O_2 -induced Stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(9): 11260-11274.
- [10] 屠文娟,张琴芬,等. 人脐带间充质干细胞对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的神经修复作用[J]. *中国新生儿科杂志*, 2013, 28(6): 407-412.
- [11] 柯尊字,明萌,梁松,等. 早期干预改善缺氧缺血性脑病患者智力发育[J]. *中国临床康复*, 2004, 8(18): 3566-3566.
- [12] 陈雪莲. 新生儿缺氧缺血性脑病治疗中神经节苷脂的应用价值探析[J]. *山西医药杂志*, 2013, 42(3): 293-294.