

·基础研究·

小鼠胎肝间充质干细胞移植治疗 缺血性脑损伤的实验研究*

孙艳^{1,2} 张涓^{1,3} 何冬梅¹

摘要 目的:探讨小鼠胎肝间充质干细胞(fMSCs)移植对缺血性脑损伤是否具有修复治疗作用。**方法:**用快速 PCR 扩增 Y 染色体特异 sry 基因方法鉴定并分离 BALB/c 雄性小鼠 fMSCs, 将其植入雌性缺血性脑损伤 BALB/c 小鼠损伤侧侧脑室。40d 后观察神经功能, PCR 检测脑组织 sry 基因; HE 染色和尼氏染色观察脑组织结构; 免疫组化和 FISH 双染观察 fMSCs 分化存活。**结果:**5 只移植小鼠长期存活; 移植后 40 d, 小鼠神经功能缺损有所改善; 脑组织结构未见明显异常; 移植小鼠脑组织 sry 基因阳性; (6.6±2.9)% 的受体鼠损伤侧脑细胞 Y 染色体阳性, Y 染色体和 Nestin 双阳性细胞占缺血侧脑组织细胞的 (1.1±0.9)%, Y 染色体和 Tubulin 双阳性细胞占 (3.2±1.4)%, Y 染色体和 GFAP 双阳性细胞占 (0.9±0.7)%, 对侧脑组织未见到染色体阳性细胞。**结论:**缺血性脑损伤条件下, 小鼠 fMSCs 可以向神经细胞分化, 参与损伤脑组织的结构重建。

关键词 小鼠; 胎肝; 间充质干细胞; 脑缺血; Y 染色体

中图分类号: R741 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2009)-02-0142-04

Transplantation treatment of ischemic CNS injury in mice with mesenchymal stem cells from murine fetal liver/SUN Yan, ZHANG Yuan, HE Dongmei/Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24 (2): 142-145

Abstract Objective: To investigate whether murine fetal liver mesenchymal stem cells (fMSCs) could help to repair CNS injury and recover the neural function in ischemic isogenic mouse. **Method:** Sex of BALB/c mouse fetuses was determined by rapid PCR analysis of sry gene on Y chromosome. Male fMSCs were isolated and injected into the lateral ventricle of injured hemisphere in female mice with ischemia. Recovery of neurological deficit was reevaluated at 40 days after transplantation. HE stain and Nissl stain were employed to observe pathological change in injured brain. Whether the fMSCs grafts were survival was determined by PCR assay of mouse sry gene in recipient's brain. The donor cells and their differentiation to neural cells were detected and identified by FISH and immunohistochemistry double-staining analysis. **Result:** Five of those mice received fMSCs grafts survived and had no problem with normal action. Neurological deficit rehabilitations were observed after 40 days. Brain tissues stained by HE and Nissel didn't show significant abnormality. PCR assay detected sry gene in brains of recipients. The ratio of Y chromosome-positive cells in injured hemisphere was (6.6±2.9)%. Ratio of both Y chromosome-positive cells and Nestin positive cells was (1.1±0.9)%. Ratio of both Y chromosome-positive cells and Tubulin positive cells was (3.2±1.4)%. Ratio of both Y chromosome-positive cells and GFAP positive cells was (0.9±0.7)%. No Y chromosome-positive cell was found in contralateral hemisphere. **Conclusion:** Murine fMSCs could differentiate into neurocytes in ischemic injured CNS and might be helpful for reconstitution of injured hemisphere.

Author's address Life Science and Biopharmaceutical College, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, 510006

Key words mouse; fetal liver; mesenchymal stem cell; ischemia; Y chromosome

脑卒中是世界上引起死亡的第三位疾病,也是导致机体功能障碍的首要病因,其发病 85% 由脑梗死(即缺血性脑损伤)导致。单纯药物治疗虽然显示了一定的疗效,但对已坏死的神经组织却作用甚微。干细胞移植是目前唯一有望能实现缺血坏死区域神经组织结构和功能重建的治疗方法。大量的研究显示:骨髓或脐血来源的间充质干细胞(mesenchymal

stem cells, MSCs)具有向神经、骨、胰腺等三个胚层来源的多个组织分化的潜能^[1-4],为多种疾病尤其是

* 基金项目:国务院侨办重点学科建设基金(2005)

1 暨南大学医学院血液病研究所,510632

2 广东药学院生命科学与生物制药学院

3 通讯作者

作者简介:孙艳,女,讲师,博士

收稿日期:2008-10-16

神经系统疾病的治疗开辟了新途径。已有报道显示, MSCs 在体外可以分化为具有神经细胞表型和/或生理功能的细胞^[2], 在动物模型及移植病例中也证实具有改善神经功能及向神经分化的能力^[3]。然而, MSCs 应用于神经系统疾病治疗目前仍然存在着很多问题, 如骨髓来源的 MSCs 分化效率较低, 排斥反应较强, 因此是否是治疗脑损伤最为理想的干细胞还不能确定。胚胎肝脏是哺乳动物胚胎发育中晚期的主要造血器官, 与骨髓一样也含有丰富的 MSCs, 以支持造血功能^[4]。研究表明, 胚胎组织干细胞无论是增殖还是分化潜能均强于成体组织干细胞, 再加上胚胎组织干细胞的免疫原性及免疫活性也较成体组织更弱^[6]。因此, 胎肝间充质干细胞 (fetal liver mesenchymal stem cells, fMSCs) 可能更适于移植治疗缺血性脑损伤。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

BALB/c 小鼠 195 只, SPF 级, 9—10 周, 190 只雌性, 5 只雄性, 体质重 20—26g, 购自南方医科大学。巢蛋白 (nestin)、微管蛋白 III (tubulin)、胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体及 SABC 试剂盒购于 Santa cruz 公司, 小鼠 Y 染色体荧光标记探针及荧光原位杂交放大试剂盒购于 Cambio 公司。

1.2 鉴定胎鼠性别

取小鼠脑组织制备 DNA 模板。 β -actin (肌动蛋白) 基因片段作对照。sry 基因扩增引物设计参照文献^[7], 上游引物: 5'-TGG GAC TGG TGA CAA TTG TC-3', 下游引物: 5'-GAG TAC AGG TGT GCA GCT CT-3', 扩增片段为 444 bp。 β -actin 基因上游引物: 5'-ACC CTG AAG TAC CCC ATT GAA-3', 下游引物: 5'-GTA CAT GGC TGG GGG GTG TTG AA', 扩增片段为 204bp。扩增反应总体积为 50 μ l, PCR 循环参数: 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 57 $^{\circ}$ C 退火 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40s, 循环 30 次后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳 (溴化乙锭显色), 凝胶成像系统拍照。

1.3 雄性小鼠 fMSCs 分离培养

制备孕鼠, 取孕 13.5d BALB/c 孕鼠, 无菌条件下取出胎鼠, 分离胎肝制成单细胞悬液。初次接种培养前进行性别鉴定。接种 $5 \times 10^6/\text{cm}^2$ 的雄性胎肝细胞于 T25 培养瓶, 用含 10% FCS 的 DMEM/F12 培养液, 37 $^{\circ}$ C, 饱和湿度, 5%CO₂ 条件下培养。72h 后全量换液, 弃去非贴壁细胞。待贴壁细胞达 80% 汇合后,

用 0.125% 的胰蛋白酶消化 2—3min, 弃消化液, 继续消化 8min, 余下的消化细胞传至新 T25 培养瓶。

1.4 制作脑缺血再灌注模型

180 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为 3 组 (空白对照组, 实验对照组, 实验组), 线栓法^[8]制备局灶性脑缺血再灌注模型, 5 分法评估神经功能, 评分为 1—2 分者进入实验。空白对照组术后不做任何处理, 实验对照组术后 24h 于损伤侧侧脑室注入生理盐水, 实验组术后 24h 于损伤侧侧脑室植入 2×10^6 个 fMSCs。

1.5 神经功能及脑组织病理观察

移植后 40d 评价神经功能, 并取小鼠脑组织, 固定, 石蜡包埋及切片, HE 和焦油紫染色, 显微成像系统拍照。

1.6 PCR 检测脑内 fMSCs

取石蜡切片, 脱蜡, 无水乙醇清洗, 加消化液 55 μ l, 蛋白酶 K 5 μ l, 54 $^{\circ}$ C 恒温水浴箱过夜。取上清煮沸 10min。10000r/min 离心 10min, 取上清作为 DNA 模板, PCR 扩增 Sry 基因片段。

1.7 免疫组化及小鼠 Y 染色体 FISH 检测移植细胞分化

免疫组化方法和 FISH 检测均按试剂盒说明书进行。免疫组化一抗包括: Nestin (1:1000), Tublin (1:1000), GFAP (1:2000)。切片染色后干燥。80 $^{\circ}$ C 1M 硫氰酸钠溶液 10min。10mg/L 蛋白酶 K 37 $^{\circ}$ C 消化 20—30min。2 \times SSC 室温漂洗 2 次。76 $^{\circ}$ C 70% 去离子甲酰胺/2 \times SSC 处理 5min。4 $^{\circ}$ C 70%、85%、100% 乙醇固定各 2min, 空气干燥。75 $^{\circ}$ C 5min 变性探针。加 FITC 荧光标记探针至组织切片。37 $^{\circ}$ C 湿盒内杂交过夜。取出切片, 分别用 45 $^{\circ}$ C 的 50% 去离子甲酰胺洗、2 \times SSC、2 \times SSC (含 0.1% NP-40)、0.1 \times SSC 漂洗 2min。DAPI 复染, 水性封片剂封片。荧光显微镜下使用分别适合 FITC 和 DAPI 的滤光片观察并计数。

1.8 统计学分析

小鼠生存分析采用 SPSS10.0 进行 Kaplan-Meier 法分析; 其它各项指标结果用均数 \pm 标准差表示。

2 结果

2.1 胎鼠性别鉴定

如图 1, 雄性对照小鼠 DNA 经 PCR 扩增产生两条带, 分别为 β -actin (204 bp) 和 sry (444 bp) 基因片段; 而雌性对照小鼠 DNA 仅扩增出 β -actin 基因片段。人外周血 DNA 作模板, 其他条件一致, 结果未有特异性扩增。扩增出 sry 基因条带者即为雄性

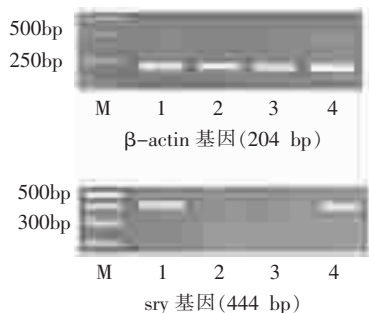


图1 小鼠胚胎性别鉴定

M:marker;泳道1:雄性小鼠组织扩增产物;泳道2:雌性小鼠组织扩增产物;泳道3:人外周血DNA扩增产物;泳道4:雄性胎鼠组织扩增产物。

胚胎;未扩增出sry片段者即为雌性胚胎。

2.2 移植小鼠存活及神经功能情况

造模后仅选取模型成功，而且神经功能评分为1—2分者进入移植实验。空白对照组、实验对照组、实验组分别有23、23、20只小鼠进入实验。造模术后，小鼠活动能力下降，毛色变暗、失去光泽，体重随饲养时间逐渐减轻。实验对照组小鼠死亡最快，5d内全部死亡；空白对照组小鼠6d内全部死亡，实验组小鼠有5只长期存活。三组小鼠生存时间差异经统计学检验具有显著意义($P<0.01$)。实验组小鼠植入细胞后72h，活动能力及体重开始恢复，术后1周左右体重达到正常水平，之后持续存活(见图2)。移植小鼠在整个实验中未见明显脱毛、腹泻等典型的移植排斥反应。移植后40d，存活小鼠能进神经功能均有所改善。造模术后评分为2分者(2只)症状消失，仅见提尾悬空时轻度的前肢内收。造模术后评分为1分者(3只)提尾悬空时仍见前肢内收，但程度较前减轻。由于本实验所用的评分方法不能再细分，因此对神经功能评分未进行统计学检验。

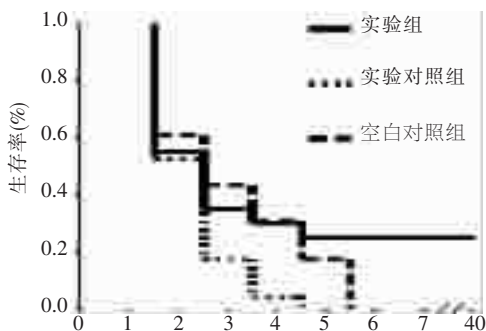


图2 三组小鼠生存曲线

2.3 移植小鼠脑组织的病理恢复

移植后40d脑组织观察显示，缺血侧未见明显苍白、水肿，与正常组织无明显界限。HE染色显示，细胞排列正常，核染色正常，胞浆无空泡，未见缺血时的大片空洞和筛网状结构。尼氏染色显示，胞浆中大量紫蓝色颗粒，未见明显异常。

2.4 小鼠fMSCs在脑组织中的存活

提取存活小鼠脑组织石蜡切片DNA,PCR检测扩增出sry基因片段(444bp)(见图3),说明脑组织内有小鼠fMSCs存活。

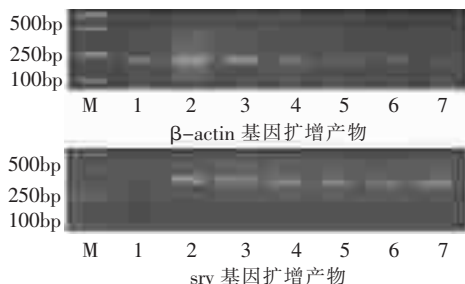


图3 移植小鼠Sry基因检测

M: marker;泳道1: 雌性小鼠脑组织DNA扩增产物;泳道2: 雄性小鼠脑组织DNA扩增产物;泳道3-7: 移植小鼠脑组织DNA扩增产物

2.5 小鼠fMSCs在脑组织中的分化

见图4(见前置彩色插页)。首先验证FISH检测Y染色体的准确性。同时检测阳性对照(正常雄性小鼠脑组织石蜡切片)与阴性对照(正常雌性小鼠脑组织石蜡切片)细胞核内Y染色体杂交情况。结果显示，正常雄性小鼠脑细胞50%—70%可以同时检测到FITC和DAPI荧光信号，而正常雌性小鼠脑细胞核内无FITC荧光信号(图4a,b)，说明Y染色体FISH检测具有特异性，是可靠的检测雄性细胞的方法。移植小鼠脑组织FISH检测显示，缺血侧大脑皮质及部分脑实质、室管下区、海马等处存在Y染色体阳性细胞，占本侧脑细胞总数的(6.6±2.9)%。结合免疫组化分析显示，Y染色体和Nestin双阳性细胞占损伤侧脑组织细胞的(1.1±0.9)% (图4c); Y染色体和Tubulin双阳性细胞占(3.2±1.4)% (图4d); Y染色体和GFAP双阳性细胞占(0.9±0.7)% (图4e)。对侧脑组织未检测到Y染色体阳性细胞。

3 讨论

本实验结果显示，小鼠损伤侧侧脑室植入遗传背景相同的小鼠fMSCs后可获得长期存活，未移植细胞的两组小鼠则全部死亡。三组小鼠生存时间存在显著差异，说明移植fMSCs有利于延长缺血性脑损伤小鼠的寿命。移植存活小鼠日常活动能力及体重均有所恢复，而小鼠的神经功能症状虽然不能完全消失，但较细胞植入前有较明显的改善，提示fMSCs对缺血造成的神经功能障碍有修复作用。此外，移植存活小鼠脑组织病理观察未见缺血时的神经元坏死，脑组织结构紊乱等表现，尼氏染色也显示正常的神经元活性和分布，提示fMSCs还有助于脑组织结构的恢复。

本实验研究结果还显示，存活小鼠脑组织有sry基因的表达，说明植入的fMSCs在受体鼠脑组织中

长期存活。进一步用 FISH 检测 Y 染色体, 结果发现存活小鼠缺血侧脑组织中有部分细胞来源于供者细胞, 并且主要分布于脑皮质及外侧脑实质、室管下区、海马等处。结合免疫组化分析显示, 部分移植细胞还同时表达神经干细胞特异性蛋白 Nestin, 神经元特异性蛋白 Tubulin 或星形胶质细胞特异性蛋白 GFAP, 说明移植的 fMSCs 可以迁移至缺血脑组织, 并可在损伤微环境释放的诱导信号作用下分化为神经样细胞, 参与损伤脑组织结构的重建。损伤对侧脑组织未检测到 Y 染色体阳性细胞, 这可能是由于未损伤组织不上调趋化因子的表达, 因而移植细胞不向对侧迁移所致。有报道显示, 缺血性脑损伤时, 缺血侧脑组织上调多种趋化因子 (如 SDF-1 α , MCP-1) 的表达^[9-10], 这些趋化因子与干细胞相互作用, 激活一系列与生存、增殖, 更重要的是与迁移有关的细胞内信号过程, 包括: 迅速而持续的 P38MAPK 激酶磷酸化; 核糖体 S6 激酶 (P90RSK) 的磷酸化; c-Jun 的磷酸化; 迅速的激活细胞外反应激酶; paxilin 有关的磷酸化。干细胞在这些传导信号的作用下, 即发生精确、广泛、大量的迁移, 到达病灶并对其进行修复。

目前认为 MSCs 移植治疗缺血性脑损伤的可能机制主要有三方面: ①分化为神经细胞, 替代凋亡、坏死的细胞, 重建梗死区的神经结构^[11-12]。②分泌神经营养因子, 促进内源性神经干细胞的分化和增殖, 并降低梗死局部神经细胞的损伤^[13-14]。③促进梗死区血管的再生, 重建脑组织的供血系统^[15]。本实验仅证实了 fMSCs 在缺血性脑损伤组织中向神经样细胞的分化, 而 fMSCs 治疗缺血性脑损伤时是否也利用了后两种机制还需要进一步探讨。此外, fMSCs 分化的神经细胞是否与周围组织建立了联系, 是否对坏死神经元的结构和功能实现了真正的替代作用还有待证实。进一步提高 fMSCs 细胞在缺血性脑损伤情况下向神经细胞分化的频率和效率也值得继续探讨。

参考文献

[1] Elabd C, Basillais A, Beaupied H, et al. Oxytocin Controls Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells and Reverses Osteoporosis[J]. *Stem Cells*, 2008, 26.

[2] Deng YB, Liu XG, Liu ZG, et al. Implantation of BM mesenchymal stem cells into injured spinal cord elicits de novo neurogenesis and functional recovery: evidence from a study in rhesus monkeys[J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(3):210-214.

[3] 孙艳, 张涸. 小鼠胎肝间质干细胞的纯化与分化多能性研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(8):1613-1617.

[4] Chang C, Niu D, Zhou H, et al. Mesenchymal stem cells contribute to insulin-producing cells upon microenvironmental manipulation in vitro [J]. *Transplant Proc*, 2007, 39(10):3363-3368.

[5] Wang X, Hisha H, Taketani S, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3):482-493.

[6] Gotherstrom C, Ringden O, Westgren M, et al. Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells [J]. *Bone Marrow Transplantation*, 2003, 32 (3): 265-272.

[7] Greenlee AR, Krisher RL, Plotka ED. Rapid sexing of murine preimplantation embryos using a nested, multiplex polymerase chain reaction (PCR) [J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 49:261-267.

[8] 孙艳, 张涸, 谭广销. 小鼠线栓法局灶性脑缺血再灌注模型的改良[J]. *暨南大学学报*, 2005, 26:776-780.

[9] Schönemeier B, Schulz S, Hoell V, et al. Enhanced expression of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 after cerebral ischemia in the rat brain[J]. *J Neuroimmunol*, 2008, 28.

[10] Jiang L, Newman M, Saporta S, et al. MIP-1 α and MCP-1 Induce Migration of Human Umbilical Cord Blood Cells in Models of Stroke [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2008, 5(2):118-124.

[11] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32:1005-1101.

[12] Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, et al. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(5):815-820.

[13] Crigler L, Robey RC, Asawachaicham A, et al. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis[J]. *Exp Neurol*, 2006, 198(1):54-64.

[14] Li Y, Chen J, Chen XG, et al. Human marrow stromal cell therapy for in rat: neurotrophins and functional recovery[J]. *Neurology*, 2002, 59:514-523.

[15] Ding DC, Shyu WC, Chiang MF, et al. Enhancement of neuroplasticity through upregulation of beta1-integrin in human umbilical cord-derived stromal cell implanted stroke model[J]. *Neurobiol Dis*, 2007, 27(3):339-353.