

丹酚酸 B 联合骨髓间充质干细胞移植 对大鼠脊髓损伤修复作用研究

王飞 张晓君 岳冀 于大鹏 赵廷宝

【摘要】 目的 探讨丹酚酸 B 联合骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植对大鼠脊髓损伤(SCI)模型的修复作用,以期为脊髓损伤修复提供新的治疗方案。**方法** 采用改良 Allen 打击法制作 SCI 模型,利用 BBB 评分法评价大鼠神经功能恢复情况,并用 HE 法和免疫组化法分别对脊髓组织病理形态及 GFAP 和 NGF 的表达情况进行分析。**结果** 术后大鼠后肢运动功能逐渐改善,C、D 组 BBB 评分明显高于 B 组($P<0.01$)。脊髓组织病理切片显示受损脊髓较模型组有明显修复,胶质细胞增生活跃,损伤周围可见相对完整的神经细胞。从免疫组化的结果来看,各组大鼠的 GFAP 和 NGF 均有表达,A 组 GFAP 和 NGF 阳性细胞面积高于 B、C、D 组;C、D 组高于 B 组($P<0.01$);D 组又高于 C 组($P<0.05$)。**结论** BMSCs 移植对损伤后的大鼠脊髓有保护作用,丹酚酸 B 能协同 BMSCs 促进对大鼠脊髓损伤的修复。

【关键词】 脊髓损伤; 丹酚酸 B; 骨髓间充质干细胞; 损伤修复

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.11.002

Study on the restorative effect of salvianolic acid B combined with bone mesenchymal stem cells transplantation on rat spinal cord injury WANG Fei, ZHANG Xiao-Jun, YUE Ji, et al. Department of Spinal Cord Repair, Jinan Military General Hospital, Jinan 250031, China
Corresponding author: ZHAO Ting-bao, E-mail: doctorzhaotingbao@163.com

【Abstract】 Objective In order to provide a new treatment for repairing spinal cord injury, we explore the restorative effect of salvianolic acid B combined with bone mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation on rat spinal cord injury (SCI) model. **Methods** Modified Allen punch method is adopted to make SCI model. The recovery condition of the rat nerve function is evaluated by BBB scores. HE method and immunohistochemistry are used to separately analyze the Spinal cord tissue pathological morphology and the expression of GFAP and NGF. **Results** After operation the rat's hindlimb motor function gets better gradually with the BBB scores of group C and D much higher than that of group B ($P<0.01$). The spinal cord tissue pathological section shows the obvious restoration of injured spinal cord compared with the model group, active proliferation of gliocyte and relatively completed nerve cells in the damaged surrounding. From the results of immunohistochemistry, the rat GFAP and NGF in each group are all expressed. The positive cells area of GFAP and NGF in group A is larger than that in group B, C and D; in group C and D it is larger than that in group B ($P<0.01$); in group D it is larger than that in group C ($P<0.05$). **Conclusion** BMSCs transplantation has protective effect on rat spinal cord, and salvianolic acid B can cooperate with it to promote the recovery of rat spinal cord injury.

【Key words】 Spinal cord injury; Salvianolic acid B; Bone mesenchymal stem cells (BMSCs); Injury restoration

作者单位:250031 济南军区总医院脊髓修复科

作者简介:王飞(1970-),本科,主治医师。研究方向:脊髓损伤。E-mail:wfei1016@163.com

通讯作者:赵廷宝(1963-),博士,主任医师。研究方向:脊髓损伤及修复。E-mail:doctorzhaotingbao@163.com

骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 是成体干细胞的一种, 获取简单, 扩增容易, 具有自我更新、增殖和多向分化潜能的特点。在一定的环境和刺激因子作用下可分化为组织细胞、成肌细胞、骨细胞、软骨细胞、神经细胞和脂肪细胞等多细胞系, 且在体外培养的过程中能始终保持其多向分化潜能。

脊髓损伤 (spinal cord injury, 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。由于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。目前, 研究者更多将目光转向干细胞移植治疗脊髓损伤, 间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 自然受到研究者的青睐。对于大鼠 MSCs 经中药单体诱导后的生物学特性报道很少, 有研究探讨了丹参单体丹酚酸 B (salvisnolic acid B, SalB) 在体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的情况, 确定大鼠 MSCs 体外诱导为心肌样细胞的条件、规律及转化细胞的特点, 发现 SalB 具有促进 5-氮胞苷诱导的 MSCs 向心肌细胞分化的作用^[1]。本实验探讨了丹酚酸 B 联合 BMSCs 移植对大鼠 SCI 模型的修复作用, 以探索一种促进中枢神经系统损伤修复和再生的新途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SD 大鼠, SPF 级, 雌雄各半, 体质量 200 ~ 250 g; 健康 SD 乳鼠, SPF 级, 雄性, 体质量 40 ~ 50 g; 均由北京华阜康生物科技股份有限公司提供, 许可证号: SCXK (京) 2009-0004。

1.2 药物与试剂

丹酚酸 B (纯度 > 98%, 中国药品生物制品检定所), DMEM 培养基、0.25% 胰蛋白酶-1mM EDTA (invitrogen 公司), 胎牛血清 (GIBCO 公司), 兔抗胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体 (Sigma 公司), 兔抗神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 BMSCs 制备 无菌条件下取 SD 乳鼠股骨和胫骨, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基冲出骨髓, 反复吹打呈单细胞悬液, 1000 r/min 离心 5 分钟后, 弃上清, 再用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬, 接种于培养瓶中, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱培养, 传至 P3 代的细胞培养 2 ~ 3 天后, 待细胞融合

达 50% 左右时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 加 DMEM 终止, 1000 r/min 离心 3 分钟后, 弃上清, PBS 重悬, 将细胞浓度调至 $1 \times 10^5 / \mu\text{l}$ 备用。

1.3.2 实验动物分组及造模 戊巴比妥钠麻醉大鼠后, 无菌条件下采用改良 Allen 打击法^[2] (10 g × 5 cm) 制作 SCI 模型, 以鼠尾痉挛性摆动、双下肢瘫为损伤标准。40 只 SD 大鼠按体重随机分为 4 组, 每组 10 只。(1) 假手术组 (A 组): 只暴露脊髓, 不打击。(2) 模型组 (B 组): 注入 60 μl PBS。(3) BMSCs 移植组 (C 组): 造模后, 注射 60 μl 的 BMSCs。(4) 丹酚酸 B 联合 BMSCs 移植组 (D 组): 注射 60 μl 的 BMSCs, 20 mg/(kg · d) 丹酚酸 B 灌胃 2 周。

1.3.3 神经功能恢复评价 各组大鼠分别于术后 1 天、7 天、14 天、28 天进行 BBB 评分^[3], 评价大鼠后肢运动功能恢复情况。评分采用盲法, 由熟悉标准的操作人员在固定时间进行。

1.3.4 脊髓组织病理学检查及免疫组织化学鉴定 术后 28 天时经大鼠心脏灌注 4% 多聚甲醛固定脊髓组织, 取部分组织标本常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜下观察脊髓局部病理改变。其余部分做免疫组化染色, 荧光显微镜下观察 GFAP 和 NGF 的表达情况, 并用 IPP 软件进行分析。

1.4 统计学处理

用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计量资料采用 *t* 检验或单因素方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能恢复变化情况

手术前对所有大鼠进行 BBB 评分, 得分均为 21 分。术后 1 天, B、C、D 组大鼠的 BBB 评分均明显低于 A 组 (*P* < 0.01), 表明脊髓损伤模型已成功建立。术后 7 ~ 28 天, B、C、D 组大鼠的 BBB 评分随时间延长均有所提高, 表明大鼠在损伤后有一定程度的自愈, 但 C、D 组改善情况明显优于 B 组 (*P* < 0.01), D 组又好于 C 组 (*P* < 0.01), 见表 1。

表 1 各组大鼠不同时间点 BBB 评分情况 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 10)

组别	1 天	7 天	14 天	28 天
A 组	20.84 ± 0.61	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00
B 组	0.54 ± 0.28 ^a	3.05 ± 0.94 ^a	4.08 ± 1.26 ^a	9.53 ± 1.67 ^a
C 组	0.51 ± 0.30 ^a	5.12 ± 1.15 ^{ab}	7.44 ± 1.31 ^{ab}	14.75 ± 1.29 ^{ab}
D 组	0.53 ± 0.28 ^a	7.17 ± 1.01 ^{abc}	12.60 ± 1.43 ^{abc}	18.52 ± 1.32 ^{abc}

注: 与 A 组同期比较: ^a*P* < 0.01; 与 B 组同期比较: ^b*P* < 0.01; 与 C 组同期比较: ^c*P* < 0.01

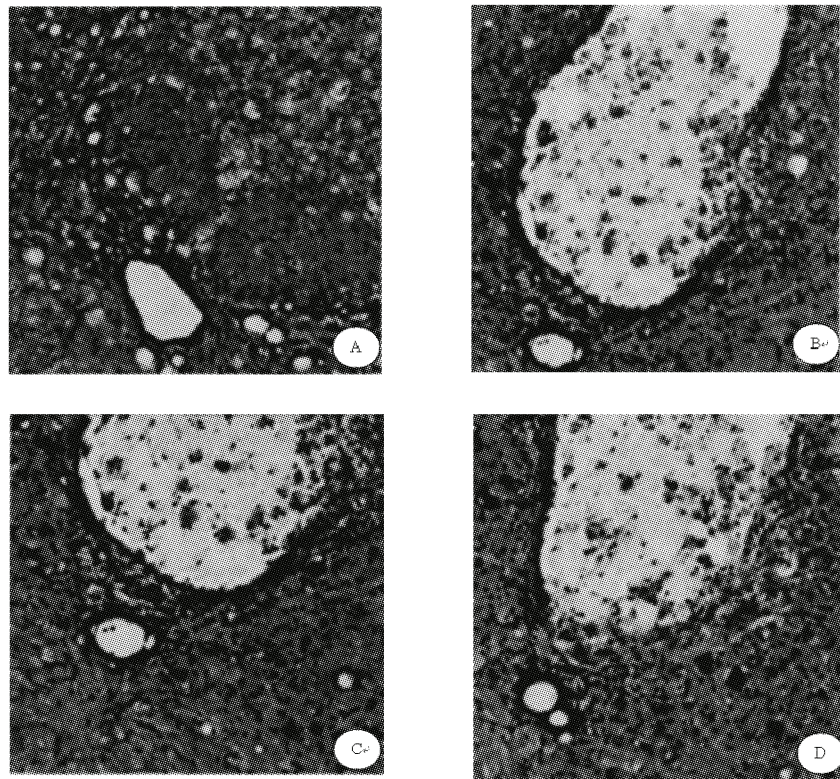


图 1 各组大鼠脊髓组织病理组织学观察(HE 染色, $\times 200$)

2.2 脊髓组织 HE 染色结果

术后 28 天,对各组大鼠脊髓组织病理学检查结果如图 1。A 组大鼠脊髓无空洞,细胞有明显分化特征,胞体较大,核深染(图 A);B 组脊髓损伤处被瘢痕组织填充,结构松散混乱,可见大量炎性细胞和成纤维细胞浸润,并有较大脊髓空洞形成(图 B);C 组和 D 组损伤处被瘢痕组织填充,可见胶质细胞增生活跃,损伤周围可见相对完整的神经细胞,有脊髓空洞形成,D 组脊髓空洞较 C 组小(图 C、D)。

2.3 GFAP 和 NGF 的表达情况

术后 28 天,对各组大鼠脊髓组织进行免疫组化染色,荧光显微镜观察,拍照。利用 IPP 软件提取阳性染色区,分析得到各组大鼠 GFAP 和 NGF 阳性细胞面积百分比,如表 2。

表 2 各组大鼠 GFAP 和 NGF 阳性细胞面积百分比($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	GFAP	NGF
A 组	13.91 \pm 2.62	30.25 \pm 3.31
B 组	6.58 \pm 1.95 ^a	9.85 \pm 1.56 ^a
C 组	10.09 \pm 2.54 ^b	22.35 \pm 2.13 ^b
D 组	12.46 \pm 2.47 ^{bc}	25.21 \pm 2.22 ^{bc}

注:与 A 组比较:^a $P < 0.01$;与 B 组比较:^b $P < 0.01$;与 C 组比较:^c $P < 0.05$

由免疫组化的结果发现,各组大鼠 GFAP 和

NGF 均有表达,灰质分布多于白质,前角多于背角,损伤周围多于其他部位。A 组 GFAP 和 NGF 阳性细胞面积百分比高于 B、C、D 组;C、D 组高于 B 组,差异有统计学意义($P < 0.01$);D 组又高于 C 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

BMSCs 对脊髓损伤的修复是当代神经生物学的一个挑战,BMSC 的神经元转移分化能够明显的治疗外伤性截瘫,促进脊髓再生^[4]。BMSCs 相对于其它神经干细胞具有不可比拟的优势,为 SCI 的治疗开辟了一种全新和理想的途径^[5]。

国内外学者对 BMSCs 移植治疗 SCI 损伤进行了大量研究。Novikova LN 等^[6]利用实验证实了在成年鼠颈脊髓损伤后移植入 BMSCs, BMSCs 表现出了强的神经保护作用 and 促生长效应。Wright KT 等^[7]发现骨髓干细胞移植到脊髓病变组织能够促进轴突再生和机体的功能恢复,并对在脊髓损伤后 MSC 移植的神经营养,组织保留和治愈作用做了相关研究。Ide C 等^[8]将脊髓运动功能评分评分(Basso, Beattie and Bresnahan locomotor rating scale, BBB)作为脊髓损伤后后肢运动功能的评分系统,培养来自 GFP 转基因鼠的 BMSCs 并将其移植到亚急

性脊髓损伤鼠体内,经免疫组化和电子显微镜分析发现有组织修复和神经再生现象,BBB 评分结果显示损伤鼠的运动功能得到了改善,而这里笔者的 BBB 评分研究结果与之相似。

从损伤区域所检测的蛋白表达结果来看,此研究中各组大鼠 GFAP 和 NGF 均有表达,灰质分布多于白质,前角多于背角,损伤周围多于其他部位。这与曾报道过的研究相一致,即在将 BMSCs 移植移植到脊髓损伤时具有 NGF 蛋白的表达,研究认为 BMSCs 移植后能够缩小受损脊髓的空洞,促进轴突再生和发芽,分泌 NGF,恢复受损肢体功能^[9]。

利用中药诱导 MSCs 向神经元细胞的分化研究虽不多,但这样的研究思路已被发现。Dong LH^[10]等研究了黄芪诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞样细胞分化的影响,发现黄芪能够诱导 MSCs 发生形态学改变成为类神经元细胞和类胶质细胞,且能够增强 Wnt-1 和 Ngn-1 基因的表达。本研究探讨了丹酚酸 B 对大鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞样细胞分化的影响,发现丹酚酸 B 与 BMSCs 移植联合应用对 SCI 修复具有协同作用。钟静等^[11]研究认为,丹酚酸 B 能够增加脑缺血大鼠 SVZ 和 SGZ 的 Brd U 细胞数目,改善缺血区神经细胞损伤,促进肢体功能恢复。因此,中药与 BMSCs 移植联合应用于脊髓损伤修复有望成为一种新的治疗手段。

参 考 文 献

- [1] 华声瑜,范英昌,马铁文,等. 丹酚酸 B 对大鼠骨髓间充质干细胞分化过程中 Desmin、 α -actin mRNA 表达的影响[J]. 天津中医药,2009,26(2):145-148.

- [2] 金宇,管力,郭世跋. 大鼠脊髓损伤动物模型的建立[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(7): 4144-4146.
- [3] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. Neurotrauma, 1995, 12(1): 1-12.
- [4] Vaquero J, Zurita M. Bone marrow stromal cells for spinal cord repair: a challenge for contemporary neurobiology[J]. Histol Histopathol, 2009, 24(1): 107-116.
- [5] Liu Y, Zhang BA, Song Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treatment of spinal cord injury: an in vivo magnetic resonance imaging tracking study [J]. Neural Regen Res, 2011, 6(13): 978-982.
- [6] Novikova LN, Brohlin M, Kingham PJ, et al. Neuroprotective and growth-promoting effects of bone marrow stromal cells after cervical spinal cord injury in adult rats[J]. Cytotherapy, 2011, 13(7): 873-887.
- [7] Wright KT, El Masri W, Osman A, et al. Concise review: Bone marrow for the treatment of spinal cord injury: mechanisms and clinical applications[J]. Stem Cells, 2011, 29(2): 169-178.
- [8] Ide C, Nakai Y, Nakano N, et al. Bone marrow stromal cell transplantation for treatment of sub-acute spinal cord injury in the rat [J]. Brain Res, 2010, 1332: 32-47.
- [9] 施永彦,喻爱喜,张功礼,等. 神经生长因子基因转染间充质干细胞移植对损伤脊髓保护的实验研究[J]. 中华显微外科杂志, 2008, 31: 199-201.
- [10] Dong LH, Wang Y, Lu CQ, et al. Effect of Astragalus mongholicus on inducing differentiations of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells into neurocyte-like cells [J]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2007, 38(3): 417-420.
- [11] 钟静,唐民科,张妍,等. 丹酚酸 B 对脑缺血再灌注大鼠神经细胞损伤和神经发生的影响[J]. 药学报, 2007, 42(7): 716-721.

(收稿日期:2012-10-10)

(本文编辑:秦楠)

· 信息之窗 ·

“革命老区中医药帮扶工程”专项基金项目将启动

(本刊讯) 为帮扶革命老区发展中医药,中华国际医学交流基金会与中华中医药学会联合成立“革命老区中医药帮扶工程”专项基金项目,并将于近期启动。

该项目由中华国际医学交流基金会与中华中医药学会联合主办,中华中医药学会内科分会与环球中医药杂志社共同承办。王永炎、陈可冀、张伯礼、肖培根等院士和资深中医药专家担任项目组委会名誉主席,戴建平、李俊德、吕玉波任主席,王云亭任秘书长,孙塑伦任项目组委会主任,高颖、姜良铎、刘清泉任副主任。

该项目帮扶的主要内容是:组织疑难杂症、专科、专病的义诊;常见病和多发病的筛查;基层中医师培训,中医药适宜技术培训与推广、中医养生科普讲座;中药材种植、管理技术和国际贸易培训;赠阅中医药报刊和科普书籍。

欢迎社会各界企事业单位和个人踊跃参加,积极捐款捐物,支持革命老区人民发展中医药事业。

户名:中华国际医学交流基金会

人民币账户:北京银行灯市口支行 账号:010903427001201090215- 95

外币账户:北京银行灯市口支行 账号:01090342701420111000177

联系人:李宏亮 电话:010-65269860,13366566895