文章编号：1000-5404(2005)04-0327-04

论著

# 鼠骨髓间充质干细胞在缺氧缺血性脑病新生鼠脑内的分布及分化

李禄全，余加林，官晓清，刘官信　（重庆医科大学儿童医院新生儿科，重庆 400014）

**提　要：目的**　探讨鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)在缺氧缺血性脑病新生鼠脑内的分布及分化。**方法**　采用全骨髓贴壁筛选法分离培养鼠骨髓间充质干细胞，移植前加入 5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)连续标记 72 h。采用 Rice 法制备新生鼠缺氧缺血性脑病模型，24 h 后经前囟旁缓慢注射 $4\times10^6$ 个 MSCs 入缺氧缺血性脑性脑病新生鼠右侧脑内，4 周后进行免疫组化检测 MSCs 的分布并鉴定神经元巢蛋白(Nestin)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达。**结果**　Rice 法可制备新生鼠单侧脑损伤为主的缺氧缺血性脑病模型，MSCs 移植入脑后主要分布在患侧大脑，呈弥散性分布于皮层、海马等部位，细胞计数左侧为(2 781 ± 254)，右侧为(4 708 ± 281)，双侧比较 $t=18.70$，$P<0.001$，并神经性分化，左、右侧 Nestin 分化率为(1.56 ± 0.47)%，(71 ± 0.42)1% ($t=1.741$，$P>0.05$)；NSE 为(3.79 ± 0.95)%，(5.69 ± 1.48)% ($t=3.404$，$P<0.05$)；GFAP 为(2.06 ± 0.89)%，(2.47 ± 1.75)% ($t=0.855$，$P>0.05$)。**结论**　MSCs 颅内直接移植后主要分布在患侧大脑，MSCs 移植后 28 d 可分化为神经干细胞、成熟神经元和星型胶质细胞。

**关键词**：骨髓间充质干细胞；神经性分化；颅内移植
**中图法分类号**：R322.81；R329.21；R742.02　　**文献标识码**：A

# Distribution and differentiation of bone mesenchymal stem cells in the brain of neonatal rats with hypoxic ischemic encephalopathy

LI Lu-quan, YU Jia-lin, GUAN Xiao-qing, LIU Guan-xin (Department of Neonatology, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

**Abstract: Objective**　To explore the distribution and differentiation of bone mesenchymal stem cells (MSCs) in the brain of neonatal rats with hypoxic ischemic encephalopathy (HIE). **Methods**　MSCs were isolated and purified by adhering to the culture glassware wall and prelabeled with bromodeoxyuridine (BrdU) for 72 h before transplantation. The model of HIE was established. At 24 h after hypoxic ischemia, approximate $4\times10^6$ cells were injected into the brain of neonatal rats with HIE through the right side bregma. The Nestin, neuron specific enolase (NSE) and glial fibrillary acid protein (GFAP) were detected by immunofluorochemistry at 4 weeks after injection. **Results**　Majority of MSCs were distributed in the cortex, hippocampus of the lesioned hemisphere. The number of MSCs was (2781 ± 254) in the left hemisphere, but (4708 ± 281) in the right hemisphere. There was significant difference ($t=18.70$, $P<0.001$). The MSCs differentiatedinto neuronal-like cells, and expressed Nestin, NSE and GFAP. The expression ratio of Nestin was (1.56 ± 0.47)% in the left hemisphere, but (1.71 ± 0.42)% in the right hemisphere ($t=1.741$, $P>0.05$). The expression ratio of NSE was (3.79 ± 0.95)% in the left hemisphere, but (5.69 ± 1.48)% in the right hemisphere ($t=3.404$, $P<0.05$). The expression ratio of GFAP was (2.06 ± 0.89)% in the left hemisphere, but (2.47 ± 1.75)% in the right hemisphere ($t=0.855$, $P>0.05$). **Conclusion**　MSCs are mainly distributed in the lesioned hemisphere and can differentiate into neuronal-like cells, express the mark of neural stem cells, neurons and neuroglial cells at 28 d after intracortical transplantation.

**Key words**: bone mesenchymal stem cell; neural differentiation; intracranial transplantation

缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是新生儿常见疾病，1997 年我国经多中心治疗观察，重度 HIE 预后不良率达 27.7%[1]，尽管改进治疗措施，但第二次多中心治疗观察重度 HIE 预后不良率仍高达 20.8%[2]。HIE 治疗中始终面临的最重要挑战是如何尽可能地降低神经细胞坏死及凋亡。目前治疗主要是应用多种脑细胞活性药物抑制脑细胞凋亡，但对已坏死的脑细胞则显得无能为力，能否对已坏死的神经元进行移植替代，以重建其功能？这将为彻底治疗 HIE 的研究提供一种崭新思路和途径。骨髓间充质

作者简介：李禄全(1975－)，男，四川省西昌市人，硕士，医师，主要从事干细胞移植治疗新生儿缺氧缺血性脑病方面的研究。电话：(023)66589115，E-mail：liluquan123@163.com

收稿日期：2004-04-20；修回日期：2004-06-29

干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是中胚层发育的早期细胞,属于多能干细胞,在特定条件下可分化为神经细胞[3]。移植入脑后能根据周围微环境诱导而分化成相应细胞类型,部分补偿损伤和死亡脑细胞的功能,以改善症状和治疗疾病,从而为解决这一难题带来希望。已有研究表明 MSCs 移植入成年大鼠中风模型脑内后可分化为神经细胞并促进脑功能修复,但该动物模型损伤较局限,与新生儿 HIE 弥漫性脑损伤存在一定差异,研究表明:移植在成年鼠脑内神经干细胞(neural stem cells, NSC)迁移能力、定向分化能力较移植在新生鼠脑内差[4,5];移植细胞轴突投射距离与年龄成反比[6];脑内微环境对 NSC 在脑内的迁移、分化的影响较大[7],新生鼠在受到损伤刺激时脑发育期胚胎内微环境的再现比成年鼠更完全。MSCs 神经性分化为跨谱系分化,MSCs 在 HIE 新生鼠脑内的存活、分布、分化特性的研究目前还较少,深入研究其在新生鼠 HIE 脑内的生物学特性将奠定临床应用 MSCs 进行移植治疗的基础。现将 MSCs 直接脑内移植入 HIE 新生大鼠后其分布及分化报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及主要试剂

Wistar 大鼠,20 只 6~8 周龄,体质量(100~150)g,购自重庆医科大学实验动物中心,雌雄不限,DMEMF12 (1:1)培养基,优等胎牛血清(FBS ,hyclone 公司,USA),一抗为兔抗大鼠神经元巢蛋白(Nestin)、神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acid protein, GFAP)单抗,小鼠抗人 BrdU 单抗(标记胞核,红色),二抗为山羊抗兔 IgG-Fitc(标记胞浆,绿色)、山羊抗小鼠 IgG-Tritc(标记胞浆,绿色)、免疫组化试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.2 MSCs 的分离培养及标记

分离鼠股骨及胫骨,培养基冲洗骨髓腔,悬液于常温下(1 000~1 200)×$g$ 离心 5~8 min,弃上清,重新悬浮,接种于含 10%优等胎牛血清培养基中(内含 0.1 mg/L 丁胺卡那霉素),5%$CO_2$ 湿饱和条件下,37 ℃恒温孵箱培养 72 h 后全量换液,后每 2~3 天全量换液 1 次,细胞基本铺满瓶壁后,以 0.25%胰酶消化传代,用含 5 mg/L BrdU 的培养基传代标记第 5~7 代生长良好细胞的胞核。

### 1.3 新生鼠缺氧缺血性脑性脑病模型制备

参照文献[8]进行。取 7 d 龄新生鼠(Wistar 大鼠自配所生)20 只,1%水合氯醛 0.2 ml 麻醉后固定于小手术台,分离、结扎右侧颈总动脉,术后放置入低氧箱通于 8%$O_2$ 3 h,送母鼠喂养,24 h 后进行细胞移植。

### 1.4 细胞移植

将新生鼠麻醉并俯卧固定于小手术台,切开头正中皮肤,暴露颅骨,用微量注射器从右前囟旁 0.2 cm 缓慢注射 50 μl(4×$10^6$ 个)MSCs,进针深度约 3 mm,注射时间约 5 min,术毕留针 3 min,术后后送母鼠喂养。

### 1.5 动物模型鉴定

模型制备 24 h 后,取 HIE 组及正常组新生鼠脑组织各 2 只,4%多聚甲醛固定,由顶至底切片,作常规 HE 染色检测。

### 1.6 免疫组化鉴定

移植后 4 周,冠状位分别取 HIE 大鼠左右大脑半球 1 的组织块(视交叉±0.5 cm),4%多聚甲醛固定后常规制备石蜡切片,参照试剂盒说明书进行双标荧光免疫组化鉴定 MSCs 在新生鼠脑内的分布及分化情况,PBS 代替一抗为对照,荧光显微镜下(日本 Olympus 公司,型号:BX-51)双重暴光观察 BrdU 阳性细胞的分布(胞核为红色)及各种抗原的荧光着色(胞浆为绿色),每侧大脑半球分别检测 10 张切片,每张切片光镜 400 倍下计数 6 个非重叠视野的移植细胞总数。然后统计 BrdU 与 Nestin(或 NSE、GFAP)双阳性细胞,计算其分化率。

## 2 结果

### 2.1 MSCs 的分离、培养

72 h 首次换液观察,见 MSCs 呈散在多个聚落分布,细胞形态主要为长梭形、成纤维样,部分细胞正从聚落内向外移行,5 d 左右细胞数量明显增加,集落渐扩大,约 7~9 d 基本铺满瓶壁,形态为较均一长梭形。原代培养过程中可见部分悬浮造血细胞,经数次换液后其基本消失。传代细胞呈均匀分布,生长迅速,约 3~4 d 可铺满瓶壁,细胞多呈梭形(图 1)。

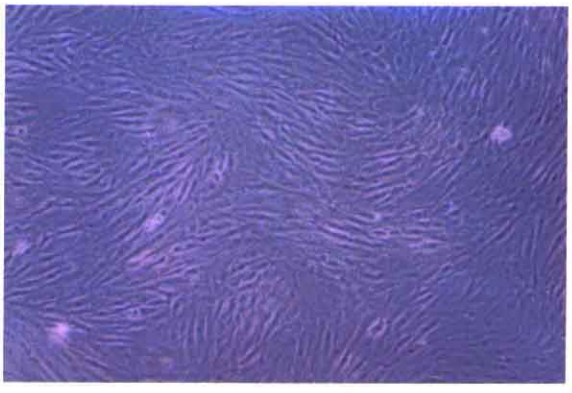


**图 1 第五代的骨髓间充质干细胞** (倒置显微镜×100)

**Fig 1 $P_5$ culture of bone mesenchymal stem cells** (Inverted microscope×100)

### 2.2 缺氧缺血性脑病动物模型的鉴定

常规 HE 染色检测显示结扎侧(右侧)出现明显的病理变化,病变在大脑皮层及海马尤为明显,主要为神经元坏死,表现为空泡及胞核固缩,组织结构模糊,炎性细胞增多等。

### 2.3 MSCs 在脑内的分布及分化

MSCs 在 HIE 的微环境中能存活、移行,呈双侧分布,主要分布在患侧大脑,呈弥散性分布于皮层、海马等部位,移植后 28 d 可分化神经干细胞,表达 Nestin 及成熟神经细胞,表达 NSE、GFAP (图 2~4)。由于不可避免免疫组化中部分标本掉片问题,故本研究仅统计了 7 只相对掉片较少的大鼠脑组织 MSCs 神经性分化情况(表 1)。

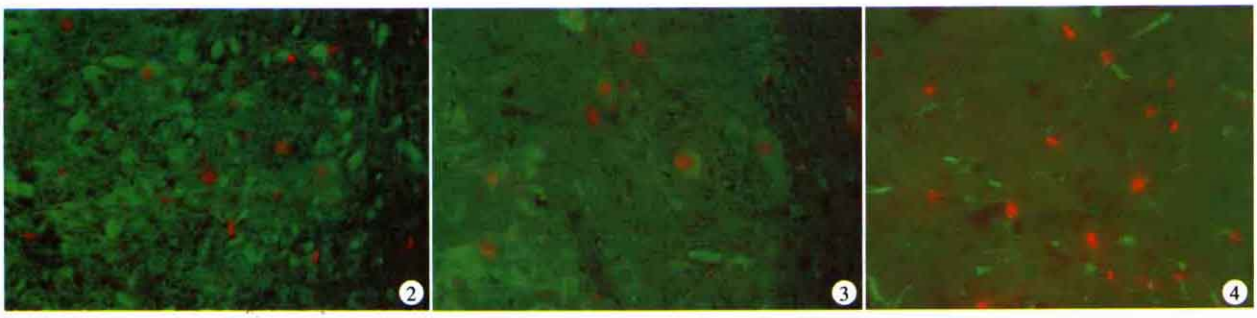


图 2　荧光免疫组化鉴定分化后神经细胞 Nestin 表达阳性　（免疫荧光法，IFA × 400）

Fig 2　Positive expression of Nestin in differentiated neural-like Cells by immunofluorescence chemistry detection.（IFA × 400）

图 3　荧光免疫组化鉴定 NSE 表达阳性　（免疫荧光法，IFA × 400）

Fig 3　Positive expression of NSE in differentiated neural-like cells by immunofluorescence chemistry detection　（IFA × 400）

图 4　荧光免疫组化鉴定 GFAP 表达阳性　（免疫荧光法，IFA × 400）

Fig 4　Positive expression of GFAP in differentiated neural -like Cells by immunofluorescence chemistry detection　（IFA × 400）

表 1　MSCs 在脑内的细胞记数及分化率比较［$n = 7$，$(\bar{x} \pm s)\%$］

Tab 1　Comparsion of the numbers and neural differentiation ratio of MSCs in the rat brain［$n = 7$，$(\bar{x} \pm s)\%$］

| Materials | Total of cells | Differentiation | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Nestin | NSE | GFAP1 |
| Right hemisphere | 4 708 ± 281 * | 1.71 ± 0.42 * | 5.69 ± 1.48 * | 2.47 ± 1.75 |
| Left hemisphere | 2 781 ± 254 | 1.56 ± 0.47 | 3.79 ± 0.95 | 2.06 ± 0.89 |
| Total | 3 881 ± 344 | 1.68 ± 0.59 | 4.77 ± 1.51 | 2.16 ± 0.92 |

*：$P < 0.05$，*vs* left

## 3　讨论

MSCs 是近年来研究的热点之一，国内学者在鉴定分离培养细胞时，均采用负面筛选法，即通过流式细胞仪检测所分离培养的骨髓源性干细胞不表达某些抗原，如白细胞表面抗原 CD45、造血干细胞表面标志 CD34 等，而表达某些抗原如 CD49a，CD49b，CD61，CD104 等，再结合所分离、培养的细胞是否具有干细胞的重要生物学特性：自我更新、具有多向分化潜能，从而认定所分离、培养的细胞是否为干细胞，同时结合其来源于骨髓，从而确定其为骨髓间充质干细胞。目前还未发现 MSCs 特异的表面标志，故我们在实验过程中没有检测其抗原表达情况，但本实验室前期反复扩增、纯化 MSCs 并鉴定其细胞周期为 $G_0 \sim G_1$ 期细胞占 92.9%，采用复方丹参注射液可诱导其分化为神经样细胞（另文报告），本中心实验室其他学者研究表明采用该法分离培养的细胞可分化为成骨细胞、心肌细胞。由此认为分离培养的细胞在自然状态下可保持干细胞绝大多数为静止期，不分化细胞，在特定诱导下具有多向分化的潜能，为 MSCs。

在实验过程中，我们采用经典的 Rice 方法，永久性结扎 7 d 龄新生鼠一侧颈总动脉再缺氧导致单侧脑损伤为主的动物模型，大鼠在神经解剖方面与人类有一定的共性，7 d 龄新生大鼠的脑发育水平与 28 d 新生儿相当，在对动物模型的鉴定中，我们发现 Rice 模型能造成急性期脑组织典型的缺氧缺血性后神经细胞的坏死及组织结构模糊，说明动物模型是成功的。

国外学者移植 MSCs 入中风大鼠体内可促进中风大鼠脑功能修复[9~11]，该模型主要是阻塞大脑中动脉，导致局部脑组织严重缺血，损伤较局限，而新生儿 HIE 主要是由于缺氧而导致神经细胞的坏死及凋亡，且呈弥漫性脑损伤，因此二者间存在一定差异，研究表明干细胞在脑内的分化受诸多因素的影响，宿主的年龄[4~6]、损伤后脑发育期胚胎内微环境的再现是否完全[7]是很重要的因素，本研究移植后 4 周发现其表达成熟神经元表面标志 NSE 及神经胶质细胞表面标志 GFAP，同时也表达神经干细胞的表面标志 Nestin，这与移植在大鼠中风模型脑内 28 d 后仅能检测到成熟神经细胞的表面标志 NeuN、GFAP、微管相关蛋白 2[10,11] 显著不同，推测在缺氧缺血损伤刺激后新生鼠脑发育期胚胎内微环境的再现比成年大鼠更加完全，MSCs 在此环境中存活、增殖能力较强，跨谱系分化更持久。本研究表明经局部注射后，MSCs 呈双侧分布，但主要分布在患侧（结扎侧）脑组织，同时其分化为成熟神经元及星型胶质细胞的比率较低，这也是目前干细胞神经性分化研究中的一大难点[9~11]，如何提高其分化率将是今后研究的方向之一。

在进行该项实验中，我们初步体会到在 HIE 模型制备完成后即刻注射 MSCs，由于最适麻醉剂量难以控制，新生鼠也难以承受连续的创伤打击而往往存活率较低，待其恢复 24 h 后在进行脑内移植，其存活率明显提高。因此，笔者等认为在模型建立后 24 h 进行 MSCs 脑内移植可避免大量新生鼠死亡，从而有利于开展进一步深入研究。

目前脑外移植 MSCs 主要采用经颈动脉、颈静脉或尾静脉注射的方式，从外周移植一方面存在 MSCs 被血液稀释及血脑屏障的阻碍，可能最终进入脑组织的细胞数量有限，另一方面，新生儿 HIE 后，并不仅仅是大脑单一缺氧器官受损，还存在心肌、肾脏、小肠等损害，经外周移植的 MSCs 是否会在这些部位分化，舍本逐末的发挥作用，未很好的改善 HIE 的预后，这些问题均尚待深入研究。在本实验中，考虑到新生大鼠血管细，经血管注射难度大，本实验采用局部注射的方法，但该法具有其一定局限性：注射 MSCs 后，由于周围实体组织压力作用，尽管注射完毕后留置 3 min，拔针后仍有部分 MSCs 从针孔溢出于皮下，故实际注射的剂量不足 50 μl，而再加大剂量又会导致颅内压急剧增高，大大增加死亡率的危险，我们推测如用立体定位仪定位注射入侧脑室腔隙内可能会避免该问题。

**参考文献：**


[1] 新生儿缺氧缺血性脑病治疗协作组. 新生儿缺氧缺血性脑病多中心治疗的报告[J]. 中国实用儿科杂志，2000，15(6)：342－344.

[2] 新生儿窒息致缺氧缺血性脑病治疗协作组. 新生儿缺氧缺血性脑病第二次多中心治疗的总结[J]. 中国实用儿科杂志，2003，18(9)：558－560.

[3] Brazelton T R, Rossi F M, Keshet G I, *et al*. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice[J]. Science, 2000, 290(5497): 1775－1779.

[4] Eriksson C, Esicson C, Gates M A, *et al*. Long-term EGF-stimulated cultures of attached GFAP-positive cells derived from mouse lateral ganglionic eminence : *in vitro* and transplantation studies[J]. Exp Neurol, 2000, 164: 184－199.

[5] Bentlage C, Nikkah K, Cunningham M G, *et al*. Reformation of the nigrostriatal pathway by fetal dopaminergic micfogtafts into the substantia nigta is ctiticaly dependont on the age of the host[J]. Exp Neurol, 1999, 159(1): 177－190.

[6] Leanza G, Nikkhah G, Nilsson O G, *et al*. extensive reinnervation of the hippocampus by embryonic basal forebrain cholinergic neurons grafted into the septum of neonatal rats with selective cholinergic lesions[J]. J Comp Neurol, 1996, 373(3): 355－357.

[7] Rosser A E, Tyers P, Dunnett S B, *et al*. The morphological development of neurons derived from EGF-and FGF-2-driven human CNS precursors depends on their site of integration in the neonatal rat brain[J]. Eur J Neurosci, 2000, 12: 2045－2413.

[8] Rice J E 3rd, Vannucci R C, Brierley J B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. Ann Neurol, 1981, 9(2): 131－141.

[9] Li Y, Chopp M, Chen J, *et al*. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(9): 1311－1319.

[10] Li Y, ChenJ, wang L, *et al*. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells[J]. Neurology, 2001, 56(12): 1666－1672.

[11] Chen J, Li Y, Wang L, *et al*. Therapeutic benefit of intrcerebral transplantatin of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. J Neurol Sci, 2001, 189(1-2): 49－54.


（编辑 张大春）

（上接 326 页）

表 1 两组病人检测指标比较（$\bar{x} \pm s$）

| 组别 | 血 $Na^+$ (mmol/L) | 尿量 (ml/d) | 尿钠排出量 (mmol/d) | 心钠素 (ng/ml) |
|---|---|---|---|---|
| 损伤组 | 130.5±1.2** | 3 730±681** | 460±160.40* | 0.24±0.18* |
| 对照组 | 141.3±2.3 | 1 879±680 | 212.80±28.80 | 0.51±0.40 |

与对照组比较，*：$P<0.05$，**：$P<0.01$

## 3 讨论

迄今，颅脑疾病继发低钠血症的研究较多但未有定论。多数学者认为其机制属于抗利尿激素不适当分泌综合征(SIADH)[2]，即由于颅脑疾病刺激下丘脑——神经垂体轴兴奋，引起渗透压调节中枢功能紊乱，抗利尿激素(ADH)过度释放、水潴留而导致高血容量型低钠血症。但也有学者认为是由脑耗盐综合征(CSWS)引起[3]，即中枢神经系统损伤后，肾脏保钠功能下降，失水失钠而引起的低血容量型低钠血症。

急性颈髓损伤后低钠血症临床上较为常见。本研究结果显示，颈髓损伤组血钠明显低于对照组，且尿量和尿钠排出量则显著增高，提示该低钠血症的机制可能用 CSWS 来解释。但资料表明，在颅脑疾病继发的 CSWS 中，其水钠代谢紊乱的原因与血浆心钠素水平增高有关。而本研究结果表明，急性颈髓损伤患者的血浆心钠素水平较对照组明显下降，表明其机制尚不能完全用 CSWS 来解释。笔者认为，颈髓损伤继发低钠血症的发生机制可能是由于颈髓损伤后，体内交感神经系统被抑制，肾交感神经兴奋性就下降，肾素-血管紧张素-醛固酮系统受到抑制，继而肾脏排钠增多，导致低钠血症。而低钠血症抑制了 ADH 的分泌，使肾脏远端肾小管对水重吸收下降，从而导致排尿增多。而体内交感神经系统被抑制，肾素-血管紧张素-醛固酮系统的抑制及低钠血症均可指出制心钠素的产生和释放[4]。

关键词：急性颈髓损伤；低钠血症

中图法分类号：R744 文献标识码：B

参考文献：


[1] 张 立，陈荣昌，程保生，等. 急性完全性颈髓损伤患者的水电解质紊乱及相关内分泌变化[J]. 中国脊柱脊髓杂志，2001，11：333－336.

[2] 王 瑞，赵 斌，李 吉，等. 急性颈髓损伤后抗利尿激素分泌异常综合征 23 例[J]. 中华创伤杂志，2001，17：608－609.

[3] Damanju S C, Rajshekhar V, Chandy M J. Validation study of a central venous pressure-based protocol for the management of neurosurgical patients with hyponatremia and natriuresis[J]. Neurosurgery, 1997, 40(2): 312－317.

[4] Dietz J R, Vesely D L, Nazian S J. Effect of changes in sodium intake on atrial natriuretic factor (ANF) and peptides derived from the N terminus of the ANF prohormone in the rat[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1992, 200(1): 44－48.


（编辑 王 红）