论著

文章编号:1000-5404(2014)12-1284-07

# 体外磁场定向迁移的间充质干细胞对脊髓损伤的治疗和GAP-43的表达

郑 希[1,2],李成鹏[1,2],王顺和[1,2] (400016 重庆,重庆医科大学:基础医学院病理学教研室[1],干细胞与组织工程研究室[2])

[摘要] **目的** 探讨体外磁场定向迁移尾静脉注射的SPIO标记的大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)对大鼠脊髓损伤治疗的影响以及对脊髓中生长相关蛋白-43(growth-associated protein,GAP-43)表达的影响。**方法** 体外培养SD大鼠BMSCs,流式细胞仪检测其免疫表型,超顺磁氧化铁颗粒(superparamagetic iron oxieds,SPIO)标记BMSCs,普鲁士蓝染色测定SPIO标记率,台盼蓝染色检测标记细胞存活率,CCK-8检测标记细胞分裂增殖能力,Western blot检测标记细胞干细胞标记物Nestin及GFAP表达。建立大鼠脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)模型,尾静脉注射移植细胞,对细胞移植后大鼠进行BBB评分。普鲁士蓝染色观察脊髓组织内标记细胞,TTC染色观察脊髓缺血损伤面积,Western blot检测损伤脊髓内GAP-43表达情况。**结果** 原代BMSCs体外能成功分离、培养、传代,且流式细胞仪检测表达间充质干细胞标记物不表达造血干细胞标记物。普鲁士蓝染色显示SPIO标记率接近100%。台盼蓝染色显示标记细胞生存率与对照组无差异($P>0.05$)。CCK-8检测磁场下标记细胞增殖活性不受影响($P>0.05$)。Western blot检测磁场下标记细胞表达Nestin及GFAP无差异,分化活性不受影响($P>0.05$)。磁铁组大鼠BBB评分明显优于对照组($P<0.05$)。普鲁士蓝染色观察磁铁组脊髓组织中BMSCs明显多于无磁铁组。TTC染色显示磁铁组缺血面积小于无磁铁组($P<0.05$)。Western blot检测脊髓组织中同一时间点GAP-43表达,磁场组明显大于对照组及无磁场组($P<0.05$)。**结论** 外置磁场可以定向更多SPIO标记的BMSCs到达脊髓损伤处,使其更好地发挥修复作用且上调GAP-43的表达,利于脊髓损伤的恢复。

[关键词] 磁场;骨髓间充质干细胞;超顺磁氧化铁;脊髓损伤;迁移;GAP-43
[中图法分类号] R329.21;R454.1;R651.2 [文献标志码] A

# Effects of target delivery of bone marrow mesenchymal stem cells driven by magnetic field on a rat model of spinal cord injury and GAP-43 expression

Zheng Xi[1,2], Li Chengpeng[1,2], Wang Shunhe[1,2] ([1]Department. of Pathology, [2]Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Institute of Basic Medical Sciences, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of target delivery of superparamagnetic iron oxide (SPIO)-labeled bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) driven by magnetic field *in vitro* on a rat model of spinal cord injury (SCI) and on growth-associated protein 43 (GAP-43) expression in spinal cord. **Methods** BMSCs from Sprague-Dawley (SD) rats were cultured *in vitro*. The expression of CD29, CD45, and CD54 was checked by flow cytometry. The BMSCs were labeled with SPIO with label rate tested by Prussian blue staining. The viability of the labeled cells was evaluated by trypan blue staining. CCK-8 assay was used to detect the proliferation of the labeled cells in the presence of magnetic field. Effects of magnetic field on the differentiation of labeled cells were investigated by Western blotting for detection of nestin and GFAP expression. Rats were induced by the clip compression method to establish the SCI model. The BMSCs labeled with SPIO were injected in tail vein. Neurological functions were evaluated using Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) score in 3 and 7 d after cells transplantation. The transplanted labeled cells in recipient rat spinal cord were analyzed by Prussian blue staining. The spinal cord ischemia area was checked by TTC staining. The GAP-43 protein expression in the spinal cord of SCI rats after cell transplantation was investigated by Western blotting. **Results** Flow cytometry results showed that BMSCs expressed the mesenchymal stem cells markers CD29 and CD54

[通信作者] 王顺和,E-mail:410469883@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140115.1521.019.html(2014-01-15)

but not the hematopoietic stem cells marker CD45. The Prussian blue staining results showed that the percentage of BMSCs labeled with SPIO was close to 100%. Trypan blue staining showed that there was no significant difference on the viability between the labeled cells and the control group ($P>0.05$). CCK-8 assay did not show any significant difference on proliferation between the magnetic field-treated group and the control group ($P>0.05$). The Western blot results showed that the presence of magnetic field had no effect on the differentiation of BMSCs ($P>0.05$). The BBB score of the magnetic field-treated group was better than that of the control group ($P<0.05$). Prussian blue staining of spinal cord slices showed a higher number of Prussian blue-positive BMSCs in the group with SCI and the presence of magnetic field than that in the SCI group without magnetic field. TTC staining showed the average ischemia size in the spinal cord with magnetic field treatment was significantly smaller than that without magnetic field treatment ($P<0.05$). The Western blot results showed significantly higher expression of GAP-43 in the group with magnetic field treatment as compared to the other two groups on day 3 and day 7 after cell transplantation ($P<0.05$). **Conclusion** External magnetic field drives the target delivery of more SPIO-labeled BMSCs to the injury area of spinal cord *in vivo*, relieving SCI and upregulating GAP-43 expression which helps the recovery of SCI.

[**Key words**] magnetic field; bone marrow mesenchymal stem cells; superparamagnetic iron oxides; spinal cord injury; migration; GAP-43

Corresponding author: Wang Shunhe, E-mail:410469883@qq.com

近年来,脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)发病率、致死率、致残率呈逐渐增高趋势。如何治疗脊髓损伤引起广泛关注。而细胞移植已经成为脊髓损伤研究的热点之一[1]。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)具有多向分化的潜能和自我更新的能力,为脊髓损伤的治疗奠定了细胞学基础[2]。SCI模型中,尾静脉注射移植细胞的方法已被证实有效并被广泛采用[3]。但其靶向损伤区域组织的数量有限,难以发挥有效的修复和功能重建的作用[4-5]。因此如何使移植细胞更多、更准确的到达损伤区域成为细胞移植研究的关键问题。超顺磁氧化铁颗粒(superparamagetic iron oxieds , SPIO)是目前使用广泛的一种对比示踪剂。已证实外置磁场与SPIO标记细胞的磁场作用可使标记细胞更多的到达指定区域,大大地提高细胞移植成功率[6-7]。基于此,本实验用尾静脉移植SPIO标记的BMSCs并在SCI区域固定磁铁,以观察磁场是否对SPIO标记的BMSCs有定向迁移的作用,并检测此类移植对SCI的相关蛋白表达是否有影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及试剂

SD大鼠由重庆医科大学实验动物中心提供,合格证号均为SCXK渝2007-0001。其中15只用于原代细胞提取,45只用于实验模型建立。

DMEM/F12(美国Gibco公司),小牛血清(NBCS)(美国Gibco公司),胰酶(美国Gibco公司),PBS(北京中杉金桥),胶原酶Ⅰ(北京Solarbio),CCK-8溶液(Beyotime公司),台盼蓝(北京中杉金桥),PE标记的抗CD29、CD45、CD54抗体(美国BD公司)。SPIO(自制),多聚赖氨酸(Sigma公司),脱脂奶粉(伊利),Tween-20(上海生工),PVDF膜(美国Millipore)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 BMSCs分离与培养 SD大鼠1只,体质量(150±25)g,雌雄不拘,脱颈处死。无菌条件下取得大鼠骨髓组织。将骨髓组织用含10% NBCS的DMEM/F12培养基制成悬液,置入75 $cm^2$的培养瓶内,37 ℃,体积分数5% $CO_2$条件下孵育。3 d以后首次换液,常规培养、传代。

1.2.2 BMSCs的鉴定 取第3代达90%融合的细胞,参照说明书将细胞置入EP管中,向管内分别加入PE-CD54/CD45/CD29室温孵育30 min,流式细胞术检测。

1.2.3 SPIO标记BMSCs 将铁含量为50 μg/mL的SPIO悬液和1.5 μg/mL多聚赖氨酸加入无血清DMEM/F12中,室温下振荡60 min,加等体积的DMEM/F12,添加小牛血清,最后配成铁浓度25 μg/mL、多聚赖氨酸浓度0.75 μg/mL和小牛血清体积分数10%的混合液。提取第3代增殖较活跃的BMSCs,用上述混合液制细胞悬液,以$2\times10^6$/mL的细胞密度接种至细胞培养瓶中,24 h后提取离心,去掉上清,用PBS洗涤细胞沉淀3次,洗掉残余铁剂。换无铁培养基继续培养48 h后,备用。

1.2.4 台盼蓝检测SPIO标记的BMSCs生存能力 SPIO标记BMSCs后继续培养24、48、72 h分别消化离心后用DMEM/F12完全培养液制成细胞悬液,取细胞悬液滴加等量0.4%台盼蓝染液,混匀后吸取部分加入细胞计数板中进行计数。显微镜下200倍视野随机选取5个视野计数总细胞数和着色细胞数,细胞存活率按公式计算,对照组为正常未标记BMSCs。存活率=总细胞数-着色细胞数/总细胞数×100%

1.2.5 CCK-8检测磁场下SPIO标记的BMSCs增殖能力 将细胞以$5\times10^3$/孔接种于96孔板,A组为对照组,正常未标记BMSCs;B组为SPIO标记的BMSCs,C组为SPIO标记

BMSCs 同时外加磁场,每组设4个复孔,培养体积为200 μL/孔,空白对照组为 DMEM/F12 培养基。培养箱培养 24、48、72 h 后,分别取出1块孔板(共铺有3块孔板),每孔加入 20 μL 的 CCK-8 工作液,细胞培养箱孵育后用酶标以 450 nm 波长测光密度值[$D(450)$]。

1.2.6 Western blot 检测磁场下 SPIO 标记的 BMSCs 的分化能力 将实验分为3组,对照组:为正常未标记 BMSCs;SPIO 组:为 SPIO 标记的 BMSCs;磁场组:为 SPIO 标记 BMSCs 同时外加磁场。取出细胞,用冰 PBS 洗3遍以去除多余的培养基,加入100 μL 含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液,在冰上作用 10 min,摇晃培养瓶,使充分接触。用细胞刮将细胞刮下,放入 EP 管,4度离心机 12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清,BCA 法测定蛋白浓度后,加入 SDS 上样缓冲液,置沸水中 10 min 以使蛋白变性,-80 ℃低温保存。将各蛋白样本行 SDS-PAGE 分离,电转至 PVDF 膜上,用5%的脱脂奶粉封闭 2 h,一抗 4℃孵育过夜。第2天 37 ℃水浴箱复温 1 h。用 TBST 洗膜3次,每次 15 min。二抗 37 ℃孵育 2 h 用 TBST 洗膜3次,每次 15 min。加发光液,暗室发光显示蛋白条带。每个样本重复检测3次,取平均值。扫描仪将胶片上的条带扫描、保存至电脑,以分析结果。

1.2.7 普鲁士蓝染色 取标记好的 BMSCs,吸去培养基并用 PBS 洗3遍,加入4%多聚甲醛固定30 min,倒掉并用 PBS 洗3遍,加入新鲜配制的普鲁士蓝染液(A 液:2% 亚铁氰化钾;B 液:2% 盐酸;用前 A、B 液等量混合,静置 5 min)作用30 min。PBS 洗3遍,晾干后加入核固红染液 10 min,PBS 洗去多余核固红。晾干后应用光学显微镜对各个样本分别拍照,然后在照片上分别计数细胞总数和普鲁士蓝染色阳性细胞数,细胞标记率=普鲁士蓝染色阳性细胞数/细胞总数×100%。光学显微镜下观察结果,核呈红色,铁颗粒呈蓝色。

1.2.8 体外磁场迁移 SPIO 标记的 BMSCs 对照组:为未标记的 BMSCs;SPIO 组:为标记的 BMSCs,但未置体外磁场;磁场组:为标记的 BMSCs 且加体外磁场。各组均以 $2\times10^5$/mL 的细胞密度接种于培养皿(直径 3.5 cm)中培养,磁场组在培养皿底部置一磁场(5 mm×10 mm×2mm,0.32 T)。24 h 后显微镜下观察。

1.2.9 动物实验分组 体质量 250~300 g 成年 SD 大鼠,雌雄不拘,分为3组,各组15只。对照组:为 SCI,尾静脉注射 PBS;无磁场组:为 SCI,尾静脉注射 SPIO-BMSCs,但不固定磁铁;磁场组:为 SCI,尾静脉注射 SPIO-BMSCs,并在损伤部位固定磁铁,磁铁在细胞移植7 d 后去除。

1.2.10 SCI 模型的建立 大鼠脊髓损伤模型的建立:术前 24 h 禁食,自由饮水。10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(0.3 mL/100 g)。据文献[8]报道的方法,建立钳夹型急性大鼠脊髓损伤模型。

1.2.11 SPIO-BMSCs 尾静脉移植 SPIO 标记细胞常规胰酶消化,PBS 洗3遍。用 PBS 制成细胞悬液 2 mL,约含细胞数为 $1\times10^7$,置于冰盒上。将已建立 SCI 模型 24 h 后的大鼠以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(0.2 mL/100 g)。将麻醉好的大鼠置固定器上,用75%酒精擦拭尾巴,以使尾静脉充血暴露。以1 mL 注射器将细胞悬液注射入尾静脉,注意勿注入组织间隙内。

1.2.12 大鼠脊髓损伤程度评分(BBB 功能评分) 根据 BBB 评分标准,分别于移植细胞后3、7 d 对3组动物做 BBB 功能评分,观察大鼠神经感觉、运动功能等。满分21分,正常为21分。

1.2.13 组织学检查 各组大鼠细胞移植7 d 后,采用心脏灌注法进行脊髓标本取材。灌注固定后取出距脊髓损伤点上下各约 1 cm 长度的一段脊髓组织并置于4%多聚甲醛溶液中固定,行石蜡切片(重庆医科大学附属第一医院临床病理诊断中心)。切片使用普鲁士蓝染液和核固红染液染色,镜下观察。

1.2.14 脊髓缺血损伤面积测量 各组大鼠在细胞移植后7 d 脱颈处死。取出损伤脊髓上下各约 1 cm 长度的脊髓使用 1% TTC(四氮唑染液),37 ℃浸染 30 min,观察缺血面积。染色后正常组织为红色,缺血梗死组织为白色。拍照并使用 Image-Pro Plus 软件分析染色面积。

1.2.15 SCI 大鼠脊髓组织中 GAP-43 蛋白表达水平的检测 各组大鼠细胞移植后分别于3、7 d 脱颈处死。取出损伤脊髓上下各 1 cm 长度的脊髓,装入 EP 管并置于冰上。称重每个样本,按说明书方法提取组织蛋白,行 Western blot 检测。测得目的蛋白 GAP-43 与内参 β-tubulin 的灰度比值作为 GAP-43 表达的相对水平,每个样本重复检测3次,取平均值。

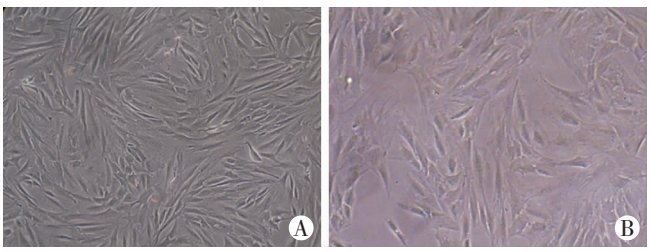
### 1.3 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,检测数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数比较采用 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 骨髓间充质干细胞培养、分离及鉴定

通过全骨髓法获取的骨髓内细胞包括造血干细胞、内皮细胞、成骨细胞、间充质干细胞等。根据细胞生长差异性,通过定期换液和传代获取纯化及扩增的 BMSCs。第3代以后 BMSCs 细胞形态比较固定,呈长梭形、纤维样生长,排列呈漩涡状(图1)。流式细胞术检测结果显示,BMSCs 不表达造血干细胞标志物 CD45,表达间充质干细胞标志物 CD29、CD54(图2)。




A:第4代;B:第10代

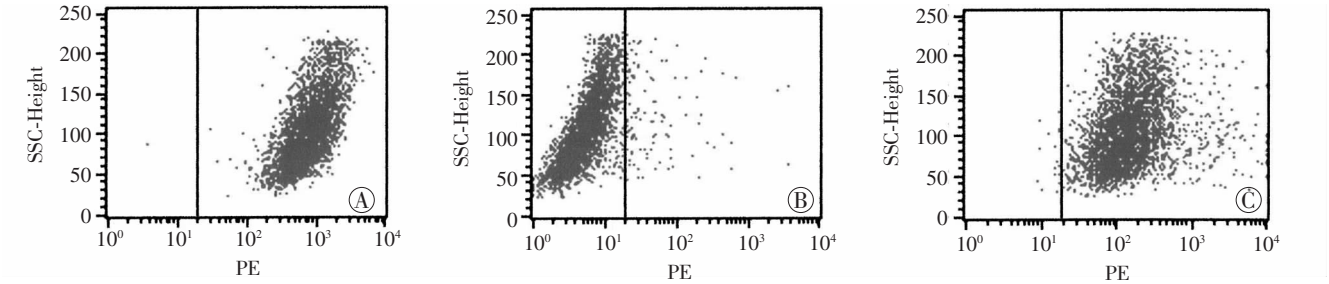
**图1 显微镜观察体外培养的 BMSCs 变化** (×100)

### 2.2 普鲁士蓝染色及体外磁场迁移

SPIO 标记 24 h 后行普鲁士蓝染色(图3)。结果显示蓝色颗粒于胞浆内,几乎每个细胞的胞浆内均可见到染成蓝色的铁颗粒,标记率近 100%;高倍镜观察标记后的细胞形态没有明显变化。磁铁组普鲁士蓝染色显示细胞有明显的迁移现象。越接近磁场中心,细胞密度越大(图4)。

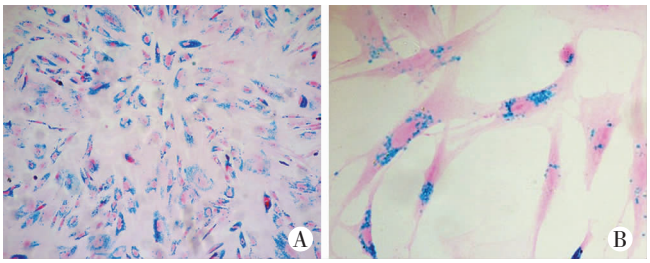
### 2.3 生存能力检测

台盼蓝染色后,可见 SPIO 标记对细胞的生存能力无影响,3组3个时间点生存率比较均无统计学意义($P>0.05$,表1)。



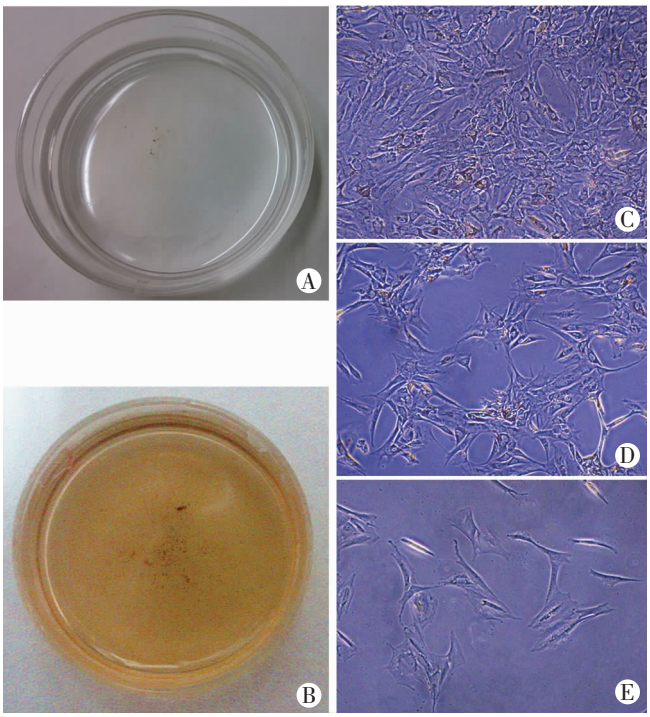

A:CD29;B:CD45;C:CD54

**图 2　流式细胞术鉴定大鼠 BMSCs**




A:×100;B:×200

**图 3　普鲁士蓝染色观察 SPIO 标记不同倍数 BMSCs 的形态变化**




A:12 h 肉眼观;B:24 h 肉眼观;C:磁场中心区(×40);D:磁场过渡区(×40);E:磁场边缘区(×40)

**图 4　肉眼观与显微镜观察不同时间体外磁场作用下 SPIO 标记的 BMSCs 向磁场区迁移变化**

**表 1　台盼蓝染色检测各组大鼠不同时间点 BMSCs 的生存能力** [$n=3$,($\bar{x}\pm s$)%]

| 组别 | 24 h | 48 h | 72 h |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 97.33±0.28 | 96.70±0.36 | 95.10±0.20 |
| SPIO 组 | 97.20±0.26 | 96.66±0.40 | 95.06±0.20 |
| 磁场组 | 97.23±0.66 | 96.63±0.40 | 95.03±0.25 |

## 2.4　增殖能力检测

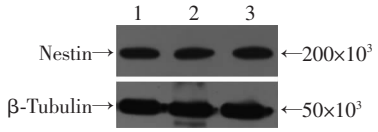
CCK-8 检测 SPIO 标记以及磁场对标记细胞的增殖能力无影响。检测对照组、SPIO 组及磁场组 3 组 $D(450)$,根据$D(450)$计算出增殖率比较差异均无统计学意义($P>0.05$,表 2)。

**表 2　CCK-8 检测各组大鼠不同时间点磁场下 SPIO 标记的 BMSCs 增殖率** [$n=3$,($\bar{x}\pm s$)%]

| 组别 | 24 h | 48 h | 72 h |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 422.29±20.0 | 407.91±35.18 | 688.26±66.74 |
| SPIO 组 | 422.35±8.64 | 403.29±56.29 | 693.84±83.93 |
| 磁场组 | 424.93±40.15 | 413.34±29.53 | 695.26±41.30 |

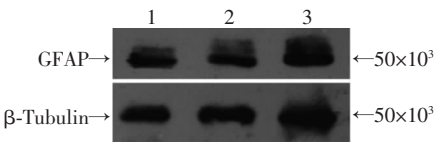
## 2.5　分化能力检测

Western blot 检测结果显示,对照组、SPIO 组及磁场组 Nestin 和 GFAP 的表达无统计学意义($P>0.05$)。见图 5、6。




1:对照组;2:SPIO 组;3:磁场组

**图 5　Western blot 检测各组大鼠 SPIO 标记及磁场对 Nestin 蛋白表达的影响**




1:对照组;2:SPIO 组;3:磁场组

**图 6　Western blot 检测各组大鼠 SPIO 标记及磁场对 GFAP 蛋白表达的影响**

## 2.6　细胞移植后各组大鼠 BBB 功能评分

细胞移植后各个时间段,磁场组大鼠 BBB 功能评分较无磁场组及对照组有明显恢复,组间比较差异有统计学意义($P<0.05$,表 3)。

**表 3　3 组大鼠细胞移植不同时间 BBB 评分结果** ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

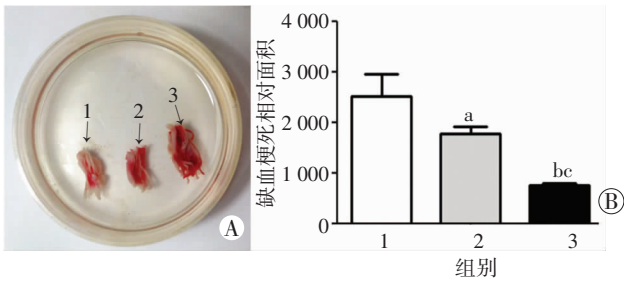
| 组别 | 3 d | 7 d |
|---|---|---|
| 对照组 | 1.00±0.00 | 2.75±0.50 |
| 无磁场组 | 2.00±0.00 | 4.80±0.83[a] |
| 磁场组 | 3.40±0.54 | 6.20±0.44[bc] |

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.05$,与无磁场组比较

## 2.7　TTC 染色

细胞移植 7 d 后,取出损伤脊髓上下 1 cm 处,行 TTC 染色,

Image-proplus 软件分析显示，磁场组脊髓缺血面积明显少于对照组及无磁场组（图7）。

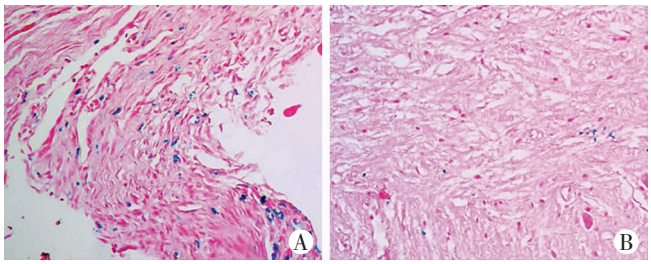



A：大体观；B：统计分析结果　1：对照组；2：无磁场组；3：磁场组；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.01$，与无磁场组比较

**图7　TTC 染色检测各组大鼠脊髓缺血面积变化**

## 2.8　组织学检查

细胞移植后7 d，脊髓切片普鲁士蓝染色显示磁场组内标记细胞明显多于无磁场组（图8）。

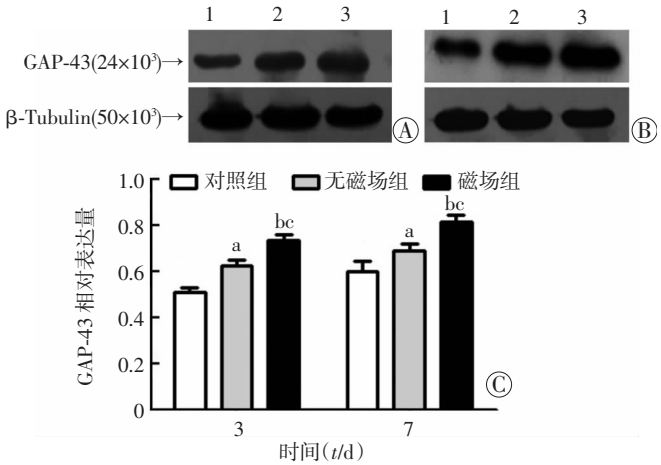



A：磁场组；B：无磁场组

**图8　普鲁士蓝染色观察脊髓内 SPIO 标记细胞变化**　（×100）

## 2.9　GAP-43 蛋白表达水平的检测

Western blot 结果显示：细胞移植后3、7 d 损伤脊髓 GAP-43 均有表达，且磁场组明显高于对照组及无磁场组，组间比较有统计学意义（$P<0.05$，图9）。




A－B：Western blot 检测细胞移植3、7 d 结果　1：对照组；2：无磁场组；3：磁场组；C：半定量分析结果　a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.01$，与无磁场组比较

**图9　Western blot 检测各组大鼠细胞移植后不同时间脊髓组织 GAP-43 的表达**

## 3　讨论

骨髓间充质干细胞是来源于中胚层的一类成体干细胞，具有自我更新和多向分化的潜能，能分化为软骨细胞、成骨细胞、成纤维细胞、脂肪细胞、肌肉细胞和神经元及神经胶质细胞等[9-10]。骨髓间充质干细胞在体外适宜的条件下可被成功培养，并且容易扩增，扩增后细胞性质稳定。所以近年来，很多学者将治疗脊髓损伤的目光转向了间充质干细胞[11-14]。但 BMSCs 的移植和其他细胞移植一样，都面临一个关键的问题：到达损伤区域的细胞数量太少，不足以达到修复损伤区域或者修复损伤区域的效果不是很明显[15]。因此，如何有效地促使更多的 BMSCs 向损伤区域迁移成了目前细胞移植治疗的一个亟待解决的问题。影响干细胞迁移的因素有很多，如局部组织环境、MCP-1、G-CSF、SDF、电场、外界磁场等。本实验通过利用外加磁场作用于铁标记的干细胞，以期通过磁场与磁铁的共同作用使更多的细胞迁移至损伤区域。

SPIO 是一种活体示踪剂，因其标记细胞的稳定性以及可检测性使的 SPIO 被广泛应用于活体细胞示踪研究[6]。研究[6-7]证明 SPIO 标记细胞可被 MRI 成功追踪并被检测。Gene 等[16]证明 SPIO 标记的人体干细胞不改变血液生化及器官功能。

本实验中，台盼蓝染色和 CCK-8 法证实，在 0.32 T 强度的磁场下，SPIO 标记的 BMSCs 生存率及增殖率均不受影响。而 Western blot 结果显示磁场作用下，SPIO 标记细胞与未标记 BMSCs 的神经干细胞标志性蛋白 Nestin 和 GFAP 的相对表达量没有差别。说明磁场作用和 SPIO 对 BMSCs 的生存、增殖以及分化没有负面影响，与文献[17－18]的研究结果一致。实验中，铁标记的 BMSCs 移植到底部置了磁铁的培养皿中后，数小时就可以见 BMSCs 向磁铁周围聚集，越接近磁铁中心细胞密度越大，反之细胞密度越小。文献[18]报道，铁标记的人类神经干细胞（HB1. F3）在磁场作用下，距磁铁中心越远，细胞密度越小。本实验研究结果与其一致。说明磁场确实具有迁移 SPIO 标记的 BMSCs 的作用。

体内实验中，SPIO 标记的 BMSCs 通过尾静脉移植到 SCI 模型体内3、7 d 后，行 BBB 评分同时于细胞移植后7 d 取出受损脊髓行 TTC 染色。结果显示磁场组大鼠 BBB 评分优于另外两组，磁场组脊髓缺血染色面积小于对照组及无磁场组（$P<0.05$），且磁场组脊髓缺血染色面积小于对照组及无磁场组（$P<0.05$）。说明 SPIO 标记细胞的移植及磁场的共同作用有利于脊髓损伤功能的恢复和缺血梗死的恢复。

生长相关蛋白-43（growth-associated protein，GAP-43）是一种胞膜磷酸蛋白质，广泛存在于神经组织的神经元中，特别在生长、分化、再生的轴突末端含量极

高,是神经元生长发育的标志蛋白质[19-22],并且在脊髓损伤的神经再生与功能修复过程中具有重要作用。研究发现,高度表达的GAP-43能促进脊髓干细胞向神经元定向分化,促进神经元的突触伸长,利于脊髓损伤的恢复[23-24]。冯大雄等[25]研究发现移植入体内的骨髓间充质干细胞可分泌脑源性神经营养因子和神经生长因子,包括GAP-43和巢蛋白在内,可抑制脊髓损伤后神经元的凋亡,促进残存的神经元出芽,增加神经元的可塑性。同样,刘志刚等[26]研究发现,骨髓间充质干细胞移植能促进脊髓损伤的恢复,可上调GAP-43的表达,促进髓鞘和神经元的再生。研究表明,SPIO标记细胞进入体内后,有部分被巨噬细胞吞噬或在体内迁移过程中丢失而不能发挥作用[4-5]。

实验中,对3个实验组脊髓损伤处的GAP-43做了Western blot检测。检测结果显示,在同一时间点,对照组的GAP-43表达低于无磁场组与磁场组,其中磁场组表达最高,3组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。细胞移植后7 d对无磁场组及磁场组大鼠行脊髓组织切片并行普鲁士蓝染色。结果显示与无磁场组相比,磁场组大鼠脊髓组织中含有更多的蓝染细胞。虽然组织切片染色中可见部分细胞似已被巨噬细胞吞噬,但在同等可能丢失和被吞噬的情况下,磁场组中磁场的存在使得有更多的细胞到达损伤区域,发挥作用,上调GAP-43的表达,利于脊髓的恢复。

Hu等[6]研究证实,SPIO标记细胞在活体内可在30 d内被MRI检测到,直到8周之后,信号强度逐渐减低。亦有研究表明SCI后14 d,体内GAP-43增长达到高峰期,说明细胞的修复作用在细胞移植两周后仍然存在[21]。此前有研究表明磁铁标记的干细胞在磁场作用下能更多的到达大鼠脑缺血部位并减少缺血面积[18,27]。亦有研究证实,通过静脉注射的铁标记干细胞能更多的到达外部置有磁铁的肝脏区域[28]。本实验结果与文献报道一致。可以认为,磁场定向迁移铁标记细胞不失为一种为时较长的且行之有效的细胞定向移植的方法。

综上所述,SPIO可以有效地标记BMSCs,并保留其生物活性。通过在脊髓损伤处固定磁铁可促使更多的SPIO标记细胞到达脊髓损伤处,减少静脉注射细胞在体内的丢失,使用于修复损伤的细胞数量增多,上调GAP-43的表达,利于脊髓损伤的修复,为脊髓损伤再生研究提供了一个新的可行的思路。但磁场对于体内细胞的各种功能蛋白的表达作用机制及移植入体细胞改变蛋白表达的机制尚且不十分明确,仍有待进一步研究。而如何使铁标记的细胞在体内更长时间的生存且躲避巨噬细胞的吞噬,更好的发挥修复作用,亦是我们应该关注的问题。

## 参考文献:

[1] Ruff C A, Wilcox J T, Fehlings M G. Cell-based transplantation strategies to promote plasticity following spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2012, 235(1): 78-90.
[2] Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, *et al*. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418(6893): 41-49.
[3] Paul C, Samdani A F, Betz R R, *et al*. Grafting of human bone marrow stromal cells into spinal cord injury: a comparison of delivery methods[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2009, 34(4): 328-334.
[4] Terrovitis J, Stuber M, Youssef A, *et al*. Magnetic resonance imaging overestimates ferumoxide-labeled stem cell survival after transplantation in the heart[J]. Circulation, 2008, 117(12): 1555-1162.
[5] Pawelczyk E, Arbab A S, Chaudhry A, *et al*. In vitro model of bromodeoxyuridine or iron oxide nanoparticle uptake by activated macrophages from labeled stem cells: implications for cellular therapy [J]. Stem Cells, 2008, 26(5): 1344-1375.
[6] Hu S L, Lu P G, Zhang L J, *et al*. In vivo magnetic resonance imaging tracking of SPIO-labeled human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. J Cell Biochem, 2012, 113(3): 1005-1012.
[7] Song M, Kim Y, Kim Y, *et al*. MRI tracking of intravenously transplanted human neural stem cells in rat focal ischemia model[J]. Neurosci Res, 2009, 64(2): 235-239.
[8] 李经辉, 黄辉, 吴海鹰, 等. 钳夹型急性大鼠脊髓损伤模型的建立与评价[J]. 昆明理工大学学报: 自然科学版, 2012, 37(6): 67-71, 75.
[9] Guang L G, Boskey A L, Zhu W. Age-related CXC chemokine receptor-4-deficiency impairs osteogenic differentiation potency of mouse bone marrow mesenchymal stromal stem cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(8): 1813-1820.
[10] Edalat H, Hajebrahimi Z, Pirhajati V, *et al*. Transplanting p75-suppressed bone marrow stromal cells promotes functional behavior in a rat model of spinal cord injury[J]. Iran Biomed J, 2013, 17(3): 140-145.
[11] Ide C, Nalai 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.
[12] Suzuki H, Taguchi T, Kato Y, *et al*. Transplantation of neurospheres derived from bone marrow stromal cells promotes neurological recovery in rats with spinal cord injury[J]. Med Mol Morphol, 2011, 44(3): 131-318.
[13] Ban D X, Ning G Z, Feng S Q, *et al*. Combination of activated Schwann cells with bone mesenchymal stem cells: the best cell strategy for repair after spinal cord injury in rats[J]. Regen Med, 2011, 6(6): 707-720.
[14] Pourheydar B, Joghataei M T, Bakhtiari M, *et al*. Co- transplantation of bone marrow stromal cells with schwann cells evokes mechanical allodynia in the contusion model of spinal cord injury in rats[J]. Cell J, 2012, 13(4): 213-222.
[15] Pal R, Gopinath C, Rao N M, *et al*. Functional recovery after transplantation of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells in a rat model of spinal cord injury[J]. Cytotherapy, 2010, 12(6): 792-806.
[16] Yocum G T, Wilson L B, Ashari P, *et al*. Effect of human stem cells labeled with ferumoxides-poly-l-lysine on hematologic and biochemical measurements in rats [J]. Radiology, 2005, 235(2): 547-552.

[17] Sadek H, Latif S, Collins R, *et al*. Use of ferumoxides for stem cell labeling[J]. Regen Med, 2008, 3(6): 807-816.
[18] Song M, Kim Y J, Kim Y H, *et al*. Using a neodymium magnet to target delivery of ferumoxide-labeled human neural stem cells in a rat model of focal cerebral ischemia [J]. Hum Gene Ther, 2010, 21(5): 603-610.
[19] Dubroff J G, Stevens R T, Hitt J, *et al*. Anomalous functional organization of barrel cortex in GAP-43 deficient mice[J]. Neuroimage, 2006, 29(4): 1040-1048.
[20] Chakravarthy B, Rashid A, Brown L, *et al*. Association of Gap-43 (neuromodulin) with microtubule-associated protein MAP-2 in neuronal cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 371(4): 679-683.
[21] 张奇兰, 李俊岑, 丁培培, 等. 神经生长相关蛋白GAP-43在脊髓损伤后不同时段的表达[J]. 四川解剖学杂志, 2010, 18(2): 1-3.
[22] Burello L, De-Bartolo P, Gelfo F, *et al*. Functional recovery after cerebellar damage is related to GAP-43-mediated reactive responses of pre-cerebellar and deep cerebellar nuclei[J]. Exp Neurol, 2012, 233(1): 273-282.
[23] 赵凡, 杨有庚, 王江. 大鼠完全脊髓横断动物模型的建立及完整胚胎脊髓移植后GAP-43 mRNA的表达[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(2): 145-147.
[24] Kwon B K, Liu J, Lam C, *et al*. Brain-derived neurotrophic factor gene transfer with adeno-associated viral and lentiviral vectors prevents rubrospinal neuronal atrophy and stimulates regeneration-associated gene expression after acute cervical spinal cord injury[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2007, 32(11): 1164-1173.
[25] 冯大雄, 康建平, 宋跃明. 静脉移植骨髓间充质干细胞对大鼠脊髓损伤后生长相关蛋白43、神经丝蛋白及巢蛋白的调节[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(42): 8421-8425.
[26] 刘志刚, 郑启新, 熊敏. 骨髓间充质干细胞移植联合孕酮应用对脊髓损伤的修复作用[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2012, 41(3): 296-302.
[27] Rice H E, Hsu E W, Sheng H, *et al*. Superparamagnetic iron oxide labeling and transplantation of adipose-derived stem cells in middle cerebral artery occlusion-injured mice[J]. AJR Am J Roentgenol, 2007, 188(4): 1101-1108.
[28] Arbab A S, Jordan E K, Wilson L B, *et al*. *In vivo* trafficking and targeted delivery of magnetically labeled stem cells[J]. Hum Gene Ther, 2004, 15(4): 351-360.

(**收稿**:2013-10-24;**修回**:2013-11-29)
(编辑 汪勤俭)

# 个案与短篇

**文章编号**:1000-5404(2014)12-1290-01

## 成功救治恶性高热1例

田国平,徐克平,顾健腾,陶国才 (400038 重庆,第三军医大学西南医院麻醉科)

[**关键词**] 急救;治疗;恶性高热
[**中图法分类号**] R441.3 [**文献标志码**] B

恶性高热(malignant hyperthermia, MH)是目前所知的唯一可由常规麻醉用药引起围术期死亡的遗传性疾病。男性发病多于女性[1],MH临床极为罕见、病死率高。近期我科成功抢救1例,报告如下。

### 1 临床资料

患者,男性,25岁,体质量47 kg,ASA分级Ⅰ级。因特发性脊柱侧弯拟行经后路脊柱侧弯矫形术,术前检查血常规、肝肾功能、凝血功能及心肌酶均无明显异常。

入室无创血压112/72 mmHg,心率(HR)88/min,脉搏血氧饱和度($SpO_2$)100%,体温36.5 ℃。咪达唑仑2 mg、芬太尼0.2 mg、丙泊酚100 mg、维库溴铵5 mg静推诱导后经口常规气管插管,并行右颈内静脉穿刺、左桡动脉穿刺。监测BP 118/70 mmHg,HR 80 /min,$SpO_2$100%,中心静脉压(CVP)10 $cmH_2O$,呼气末二氧化碳分压($P_{ET}CO_2$)35 mmHg,体温36.5 ℃。

手术开始,靶控输注瑞芬太尼2 ng/mL,丙泊酚2 μg/mL,吸入2%七氟烷维持麻醉。手术进行至分离肌肉时,患者出血颜色较暗,肌肉紧张,$P_{ET}CO_2$迅速升至55 mmHg。立即检查麻醉机、螺纹管、气管导管并听诊双肺呼吸音未发现异常,增加潮气量和呼吸频率,$P_{ET}CO_2$无改善,此时BP下降至65/42 mmHg HHk ,HR升至123 /min,$P_{ET}CO_2$升至65 mmHg以上。立即停用七氟烷,静注麻黄碱10mg,无明显影响。泵注多巴胺5~10 μg/(kg·min),仍无效。BP最低时已测不到数据,心率最高为166 /min,持续大约30 s。迅即改为泵注去甲肾上腺素0.03~0.3 μg/(kg·min)和艾司洛尔3~6 μg/(kg·min),BP逐渐回升至92/48 mmHg、HR 130 /min。此时体温逐渐上升到37.5 ℃,$P_{ET}CO_2$快速升至85 mm Hg,立即更换钠石灰,体温仍快速上升至40.2 ℃。怀疑MH,急查血气:pH=7.215,$p(CO_2)$71.8 mmHg,$p(O_2)$506 mmHg,BE 0.9 mmol/L,$K^+$ 5.1 mmol/L。立即停止手术,快速缝合切口,患者置平卧位,降温处理(冰敷颈部和四肢大动脉搏动处、输注冰盐水、酒精擦浴),手控过度通气,加大新鲜气体流量。基于患者的临床表现,诊断考虑为MH,立即联系特效药丹曲林,急查肌酸激酶(CK)16 353 IU/L,并取左小腿腓肠肌做肌肉活检,结果为组织慢性炎症伴灶性肌纤维变性改变。继续降温处理,泵注肾上腺素0.2 μg/(kg· min)使血压维持在92/48~126/46 mmHg,HR 120~140/min。2 h后体温逐渐降至36.4 ℃,$P_{ET}CO_2$降至37 mm Hg。继续观察3 h后送入ICU,多巴酚丁胺2~10 μg/(kg·min)维持血压112/62~129/81 mmHg,呼吸机支持呼吸。2 h后测腋温为40 ℃,发现体

(下转1298页)

[**通信作者**] 陶国才,E-mail:13908393339@vip.163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140124.1024.014.html(2014-01-24)