DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.020
第26卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 6
2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

文章编号:1000-5404(2004)06-0523-03

论著

大鼠骨髓间充质干细胞移植后大鼠脑梗死区超微结构变化的研究

桂 莉,范文辉,李露斯,陈康宁 (第三军医大学西南医院神经内科,重庆 400038)

提 要:目的 观察接受MSCs局部注射移植的大鼠脑梗死区超微结构的变化,以了解MSCs移植对梗死区超微结构的影响。方法 制作大鼠大脑中动脉栓塞模型,将体外分离培养的大鼠MSCs注射至大鼠脑梗死区,于移植后第4周电镜下观察梗死区超微结构变化。结果 接受移植的梗死区可见外形幼稚的细胞存活,并围绕在神经元周围,梗死区神经元胞浆中出现了丰富的游离核糖体,而对照组大鼠梗死区神经元胞核固缩,并有嗜神经细胞现象。结论 大鼠MSCs移植对缺血性脑损伤具有一定修复作用。

关键词:骨髓间质干细胞;移植;脑梗死;超微结构
中图法分类号:R329.2;R617;R743.33 文献标识码:A

Ultrastructural changes of the infarcted region after transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells into cerebral infarcted rats

GUI Li, FAN Wen-hui, LI Lu-si, CHEN Kang-ning (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the ultrastructural changes of the infarcted region after transplantation of mesenchymal stem cells (MSCs) into the infarcted rats. Methods Model of middle cerebral artery occlusion (MCAo) in Wistar rats was established. The isolated and cultured MSCs *in vitro* were injected into the infarcted region. The ultrastructural changes of the infracted region were observed at 4 w after transplantation by electron microscopy. Results Some immature cells surrounding the neurons were found to survive in the infracted region. Massive free ribosomes were observed in the neural cytoplasm in the infarcted region in the rats receiving MSCs transplantation, but neurons with nuclear pyknosis and neurophagia were observed in the infarcted region of rats in the control group. Conclusion MSCs transplantation might improve neuron repair in cerebral ischemic injury in rats.

Key words: mesenchymal stem cell; transplantation; cerebral infarction; ultrastructure

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是骨髓中除了造血干、祖细胞外的另一种细胞成分,因其具有分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和成肌细胞等多种组织细胞的能力,故将这种骨髓基质来源的具有多项分化潜能的细胞称为骨髓间充质干细胞。近来的研究已经表明,培养的MSCs不仅能分化为中胚层的多种细胞,并且还能向其它胚层来源的细胞,如神经细胞[1]分化。研究者已经应用MSCs对神经系统的一些疾病进行治疗,并且取得了一定疗效[1~4]。本研究通过电镜观察接受MSCs移植治疗的大鼠脑梗死区超微结构的变化,初步探讨MSCs移植治疗脑梗死的可行性。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(C30100058)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (C30100058)
作者简介:桂 莉(1975-),女,重庆市人,硕士,医师,主要从事骨髓间充质干细胞对神经系统疾病治疗方面的研究。电话:(023)68754114-73070
通信作者:范文辉,电话:(023)68754154
收稿日期:2003-08-26;修回日期:2003-11-02

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康幼年Wistar大鼠3只(4~6周龄),体质量(100±10) g,雌雄不限,用于提取MSCs;健康成年Wistar大鼠12只,体质量270~330 g,雌雄不限,用于制作大脑中动脉线栓(MCAo)模型并接受移植。实验动物由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM/F12(1∶1)培养基(hyclone公司)、胎牛血清(hyclone公司)、立体定位仪(国产)、微量注射器(国产)、投射电镜JEM2000(日本)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠MSCs的分离、培养 联合采用密度梯度离心及贴壁法分离培养大鼠MSCs,原代培养达80%以上融合以后按1∶3传代培养,选取生长良好的13代大鼠MSCs进行移植实验。

1.2.2 MCAo模型制作 参照Koizumi[5]和Longa[6]腔内线栓法大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型制作方法。

麻醉清醒后参考Longa及Bederson[7]的方法进行5分制评分,评分标准:0分:无神经系统症状;1分:不能完全伸展对侧

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

前爪；2 分：爬行时转圈；3 分：向对侧倾倒；4 分：不能自行行走，意识丧失。以 1～3 分为入选标准。

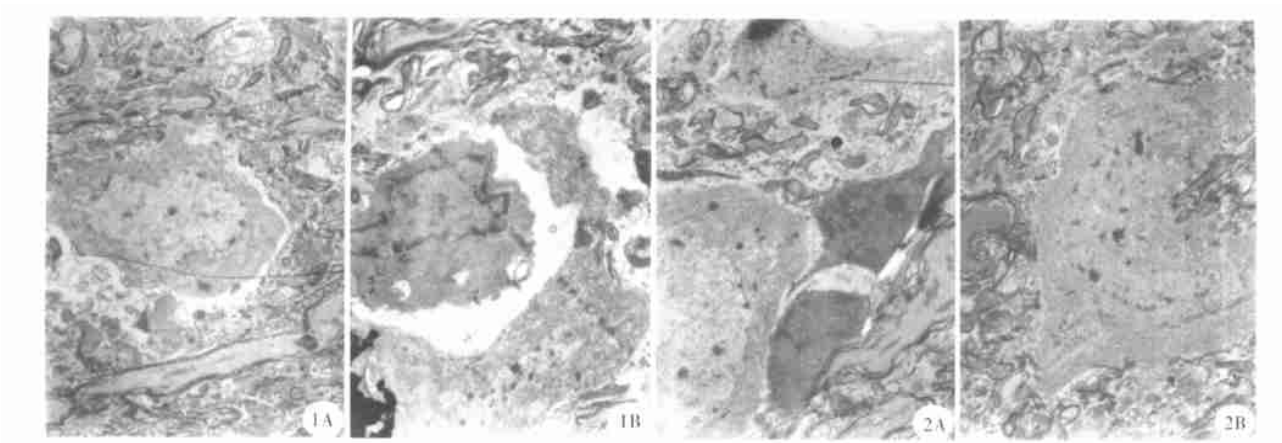
1.2.3 MSCs 的收集 选取生长良好的 1、2、3 代细胞，用 0.25% 胰蛋白酶室温消化 5 min，用含胎牛血清的培养液终止消化，PBS 清洗；1 000 r/min 离心，5 min×3 次，收集培养的大鼠 MSCs。

1.2.4 MSCs 注射移植 将 MCAo 术后大鼠共 12 只随机分为 2 组（移植组和对照组），于 MCAo 术后 1 周行细胞移植实验。于脑梗死侧（右侧）壳核区在立体定向仪定位下进行直接注射移植，其移植坐标为前囟前 1.0 mm，右旁开 3.0 mm，硬膜下 5.0 mm。实验组注射 MSCs 悬液 5 μl（细胞浓度为 1×10^4）[8]，对照组大鼠于相同部位注射同等量不含细胞的 0.1 mol/L PBS。

1.2.5 电镜观察 2 组大鼠于移植后 4 周经心脏灌注 4% 多聚甲醛，固定取材，经电镜观察前的固定、脱水、块染、作膜、修块、超微捞片，电子染色等并在电子显微镜下观察。

2 结果

移植后 4 周对照组大鼠可见梗死区神经元胞核固缩，神经元周围有退行性改变，髓鞘崩解、纤维断裂（图 1A），梗死区还出现嗜神经细胞现象，吞噬退变的神经细胞，周围呈溶解状态（图 1B）。移植组大鼠梗死区内可见外形呈幼稚状态的细胞，核大，核致密，常染色质多，胞浆少，细胞器不发达，表现出早期细胞的特点（可能是移植入梗死区的 MSCs），围绕在神经元周围（图 2A），神经元中有丰富的游离核糖体，神经元周围仍存在变性、退变的神经纤维和髓鞘（图 2B）。



A: Neurons with nuclear pyknosis and degenerative changes around the neurons could be seen in the infarcted region of rats (TEM× 3 000);
B: Neurophagia could be seen in the infracted region of rats (TEM×4 000)

图 1 对照组移植后 4 周

Fig 1 The control group at 4 w after transplantation

A: Some immature cells surrounding the neurons could be seen in the infracted region of rats (TEM× 3 000);
B: Massive free ribosomes were observed in the neural cytoplasm in the infarcted region of rats (TEM× 3 000)

图 2 移植组移植后 4 周

Fig 2 The transplantation group at 4 w after transplantation

3 讨论

神经移植是研究中枢神经发育、可塑性及再生的有效方法[9]。胚胎神经干细胞移植可通过提供营养、与宿主神经组织建立功能性突触整合等促进神经损伤功能的恢复[10]。然而，许多伦理问题不允许直接提供足够数量的人胚胎神经干细胞供移植之用。鉴于此，人们已经探索出了许多移植替代物。由于骨髓移植的免疫排斥问题已基本解决[11]，所以作为干细胞重要来源之一的 MSCs 可能是理想的移植来源。

我们观察了接受 MSCs 移植治疗 4 周的大鼠梗死区超微结构的变化，在梗死区可见外形呈幼稚状态的细胞（考虑为植入的 MSCs），细胞胞浆少，核致密，常染色质多，围绕在神经元周围，神经元中有较多的游离核糖体，脑梗死区神经元的胞浆既有变性改变，又有丰富的游离核糖体，提示神经元处于修复状态。而脑梗死对照组见梗死区神经元胞核固缩，细胞周围为变性、退变的神经纤维和髓鞘，并出现嗜神经细胞现象，吞噬退变的神经细胞，周围呈溶解状态，即对照组梗死区呈现明显的变性、坏死表现。

从超微结构的变化分析，我们认为移植入脑的 MSCs 可能对缺血损伤的脑组织具有一定的修复作用。①MSCs 在脑梗死区的成胶质细胞分化，替代、修复了损伤的脑组织。星形胶质细胞对缺血后神经元具有一定的保护作用[12]。脑缺血时，星形胶质细胞可产生多种细胞因子[13]，对脑缺血有明显的保护作用[14]。MSCs 向星形胶质细胞分化或促进其明显的增生产生了缺血损伤区的修复作用；②MSCs 与宿主脑相互作用导致 MSCs 自

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分泌或旁分泌神经营养因子的增加[15]。这些细胞因子和神经营养因子可作用于缺血损伤神经元的有关神经营养因子受体，通过受体信号传导系统激活生存信号、失活死亡信号，最终产生神经细胞保护作用。

参考文献：

[1] Mahmood A, Lu D, Wang L, *et al*. Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury[J]. Neurotrauma, 2002, 19(12): 1609－1617.

[2] Mahmood A, Lu D, Wang L, *et al*. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells[J]. Neurosurgery, 2001, 49(5): 1196－1203.

[3] Lu D, Li Y, Wang L, *et al*. Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury[J]. Neurotrauma, 2001, 18(8): 813－819.

[4] Schwarz E J, Alexander G M, Prockop D J, *et al*. Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-Dopa: engraftment in a rat model of Parkinson's disease[J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(15): 2539－2549.

[5] Ederson J B, Pitts L H, Tsuji M, *et al*, Rat middle cerebral artery occlusion evaluation of the model and development of a neurologic evaluation[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472－476.

[6] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al*, Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 2(1): 84－91.

[7] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, *et al*, Rat middle cerebral artery occlusion evaluation of the model and development of a neurologic evaluation[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472－476.

[8] Li Y, Chen J, Chopp M. Aldult bone marrow transplantation after stroke in adult rats[J]. Cell Transplant, 2001, 10(1): 31－40.

[9] Okano H, Yoshizaki T, Shimazaki T, *et al*. Isolation and transplantation of dopaminergic neurons and neural stem cells[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2002, 9(1): 23－28.

[10] Mahmood A, Lu D, Wang L, *et al*. Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2002, 19(12): 1609－1617.

[11] Wang L, Li Y, Chen J, *et al*. Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture[J]. Exp Hematol, 2002, 30(7): 831－836.

[12] Aschner M, Sonnewald U, Tan K H, *et al*. Astrocyte modulation of neurotoxic injury[J]. Brain Pathol, 2002, 12(4): 475－481.

[13] Zahecr A, Yorek M A, Lim R, *et al*. Effects of glia maturation factor overexpression in primary astrocytes on MAP kinase activation, transcription factor activation, and neurotrophin secretion[J]. Neurochem Res, 2001, 26(12): 1293－1299.

[14] Wang Y, Lin S Z, Chiou A L, *et al*. Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against ischemia-induced injury in the cerebral cortex[J]. J Neurosci, 1997, 17(11): 4341－4348.

[15] Dormady S P, Bashayan O, Dougherty R, *et al*. Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment[J]. J Hematother Stem Cell Res, 2001, 10(1): 125－140.

（编辑　汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2004)06-0525-01

个案与短篇

微创气管造口术在成人严重烧伤治疗中的应用

Application of minimally invasive tracheotomy in treatment of severe burn in adults

赵耀华，张业龙，夏成德，田社民，牛希华　（郑州市第一人民医院烧伤科，郑州 450004）

传统外科气管切开术是早期防治严重烧伤合并吸入性损伤时脏器缺氧性损害的重要手段。但该手术有相对创伤大、出血多、创口愈合时间长、并发症多等缺点[1]。我科在严重烧伤合并吸入性损伤患者实施微创气管造口术，取得了满意的治疗效果。

1　材料方法

选择Ⅱ度烧伤面积大于30%或Ⅲ度烧伤面积大于20%，合并吸入性损伤患者50例，分为传统外科气管切开组（A组25例）和微创气管穿刺造口组（B组25例）两组具有可比性。

肩部垫高颈部后仰气管固定在正中矢状位，2～4气管环表面局部浸润麻醉后，横行切开皮肤1.5～2 cm，用沪产棱牌25号深静脉穿刺针刺入气管，顺穿刺针内腔送入导丝，退出穿刺针，沿导丝送入沪产腹水穿刺针套管，有突破感后退出套管，再沿导丝伸入pertax气管扩张钳（前茂公司提供）扩大气管瘘口，沿导丝导入pertax气管套管，向套管气囊内充气7～8 ml，固定气管套管。统计学处理采用 t 检验。

2　结果

采用微创气管造口术治疗严重烧伤合并吸入性损伤患者25例，在手术时间、术中出血量、创口愈合时间等方面优于传统外科治疗组，见表1。

（下转529页）

作者简介：赵耀华(1964－)，男，河南省荥阳市人，副主任医师，主要从事大面积烧伤、特殊部位烧伤等方面的研究，发表论文15篇。电话：(0371)6323682

收稿日期：2003-04-10；修回日期：2003-09-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net