



# 间充质干细胞-透明质酸-多聚赖氨酸 治疗脊髓损伤的实验研究

Raynald<sup>1</sup>, 李延滨<sup>1</sup>, 郭牧遥<sup>2</sup>, 黄 华<sup>1</sup>, 张 涵<sup>1</sup>, 于 昊<sup>1</sup>,  
李海龙<sup>1</sup>, 崔福斋<sup>2</sup>, 安沂华<sup>1</sup>

(1. 首都医科大学, 北京市神经外科研究所, 北京 100050; 2. 清华大学材料科学与工程系, 北京 100084)

**【摘要】** 目的 研究间充质干细胞-透明质酸-多聚赖氨酸复合物治疗脊髓损伤的可行性, 评价其治疗效果并探讨其可能机制。方法 从人骨髓中分离、培养人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cell, hBMSC); 制作大鼠脊髓半横断模型, 按照实验分组分别将 hBMSC、透明质酸-多聚赖氨酸(hyaluronic acid-poly-L-lysine, HA-PLL)、hBMSC-HA-PLL 复合物注入损伤区域, 单纯损伤组作为对照。术后按照不同时间点评价损伤和移植后的大鼠运动功能。8 周后杀死大鼠, 观察不同移植组体内轴突和血管生长的情况, 对不同细胞、材料及复合物移植对大鼠脊髓损伤修复效果进行评估。结果 hBMSC 移植组和 hBMSC-HA-PLL 移植组的大鼠运动功能的改善显著好于单纯损伤及 HA-PLL 移植组。电镜结果证实复合物移植组可显著促进轴突和血管生长, 新生的轴突和血管结构较为完整。结论 hBMSC 具有促进神经功能恢复的作用, 将其与 HA-PLL 相结合, 可以促进大鼠脊髓损伤修复, 其机制可能包括材料框架作用和 hBMSC 在体内对大鼠神经细胞的营养作用以及促进微血管的生成。

**【关键词】** 间充质干细胞; 脊髓损伤; 组织工程学; 移植

**【中图分类号】** R318.19 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)05-0018-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7856.2012.05.005

## Experimental Research of hBMSC-HA-PLL to Treat Spinal Cord Injury

Raynald<sup>1</sup>, LI Yan-bin<sup>1</sup>, GUO Mu-yao<sup>2</sup>, HUANG Hua<sup>1</sup>, ZHANG Han<sup>1</sup>, YU Hao<sup>1</sup>, LI Hai-long<sup>1</sup>,  
CUI Fu-zhai<sup>2</sup>, AN Yi-hua<sup>1</sup>

(1. Beijing Neurosurgical Institute, Capital Medical University, Beijing 100050, China;

2. Department of Materials Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the feasibility of bone marrow mesenchymal stem cell (hBMSC) transplantation combined with hyaluronic acid poly-L-lysine (HA-PLL) to treat spinal cord injury. **Methods** hBMSC were extracted from human bone marrow and were cultured and expanded in vitro. The spinal cord of rat was hemi-transected, hBMSC, HA-PLL or hBMSC plus HA-PLL were transplanted alternatively after the injury. The motor function was assayed at different time points. Eight weeks later rats were sacrificed, the growth of axons and micro-blood vessels of different groups were checked, the therapeutic effect of cells, materials and the combination were assayed. **Results** The progression of rat locomotor function examined by BBB score showed that both groups of hBMSC transplant and hBMSC

**【基金项目】**北京市自然科学基金(7092017); 卫生部人类疾病比较医学重点实验室开放课题基金(ZDS200802); 广东省战略性新兴产业核心技术攻关(2011A081401003)。

**【作者简介】**Raynald, 男, 印度尼西亚籍, 硕士生, E-mail: raynald\_liu@yahoo.com。

**【通讯作者】**安沂华, 男, 研究员, 博士, E-mail: riveran@163.com。

combined with HA-PLL have better recovery than hemi-transection group and HA-PLL group. Electron microscopy showed combination of hBMSC and HA-PLL can promote axonal and vascular growth. **Conclusions** hBMSC can promote neurological function recovery. Combination of stem cells and HA-PLL may get better effect. Based on these results, we deduced that the mechanism included the framework supporting effect of materials, the neurotrophic and angiogenesis effect of hBMSC.

**【Key words】** Mesenchymal stem cell; Spinal cord injury; Tissue engineering; Transplantation

脊髓损伤是一种严重危害人类健康的中枢神经系统疾病,可导致感觉和运动功能丧失,目前对其后遗症缺乏有效的治疗手段。随着干细胞及组织工程学技术的发展,细胞复合生物材料移植治疗中枢神经系统损伤得到了更多的关注。本研究利用骨髓间充质干细胞作为种子细胞,透明质酸-多聚赖氨酸材料作为支架,研究其复合物对脊髓损伤的修复效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Sprague Dawley (SD)大鼠(中国医学科学院实验动物研究所 SCXK(京)2009-0017);细胞培养试剂:DMEM,10%牛血清(GIBCO Company);手术器械:YZ20P5手术显微镜(苏州六六视觉科技股份有限公司);倒置显微镜(Nikon);电镜(Hitachi TEM system)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养:将5 mL已抗凝的人骨髓与等体积PBS混合,室温下900 g离心10 min,沉淀物用PBS洗2次;细胞重悬,密度为 $4 \times 10^7$ /mL;密度梯度离心法分离单个核细胞,重悬于DMEM(低糖)+15%胎牛血清培养基中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养;每3~4 d换一次培养基;细胞至90%融合时,0.25%胰酶/EDTA消化,传代培养;

1.2.2 透明质酸-多聚赖氨酸(HA-PLL)材料的制备:HA在EDC(碳化二亚胺,1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide)的介导下与PLL反应,避光过夜保存,溶液缓慢交联成凝胶;将上述凝胶用去离子水在超声波中清洗三次去除残留物,-20℃冷冻后放入冻干机内进行冷冻干燥。48 h后得到多孔框架材料<sup>[1]</sup>。

1.2.3 实验动物分组:体重200~220 g的雌性SD大鼠32只,随机分为4组,单纯损伤组(8只)、hBMSC移植组(8只)、HA-PLL移植组(8只)、hBMSC-HA-PLL移植组(8只)。

1.2.4 脊髓半横断模型的制作:水合氯醛(0.4 mL/100 g)腹腔注射麻醉。取俯卧位,无菌状态下充分暴露T6-T7节段的脊髓,将其半横断,纵向去除脊髓组织的长度为2 mm,然后根据分组情况,将hBMSC、材料或hBMSC+材料植入脊髓缺损区域,逐层缝合。

1.2.5 大鼠运动功能的检测:于术后8周内每周1次观察大鼠运动功能恢复情况。评价方法参照BBB运动评分法<sup>[2]</sup>。

1.2.6 损伤部位形态学评价:术后8周杀死大鼠,利用电镜观察各组损伤局部是否有新生轴突和血管出现,并比较其形态差别。

1.2.7 统计学分析:大鼠运动功能的评分用平均值±标准差表示( $\bar{x} \pm s$ ),使用SPSS软件进行重复测量方差分析, $P < 0.05$ 表示为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 动物行为学恢复情况

动物行为学变化主要是观察损伤侧下肢运动功能的恢复情况。观察运动功能行为分为3个阶段:早期主要观察后肢关节的运动,中期主要观察平衡能力与步态运动,晚期主要观察下肢足部精细运动。8周内观察可见,HA-PLL组大鼠的运动功能与单纯损伤组相比评分差异无统计学意义,hBMSC移植组的运动功能恢复程度明显好于上述两组( $P < 0.05$ ),hBMSC-HA-PLL组的运动功能恢复程度则明显好于单纯损伤组及HA-PLL组( $P < 0.05$ ),但与hBMSC移植组相比差异无统计学意义(表1)。从恢复的时间段来看,在损伤后急性期改善程度较亚急性期显著。4组中,hBMSC组及hBMSC-HA-PLL移植组恢复的速度最快,尤其是在第一周时明显高于对照组及HA-PLL组,两周后对照组及HA-PLL组也出现明显的恢复,而hBMSC组及hBMSC-HA-PLL组的恢复速度则有所减慢,但评分仍要好于对照组及HA-PLL组,而到5周以后各组的恢复程度几乎没有明显变化(图1)。

表 1 表 1 脊髓损伤术后 1 至 8 周 BBB 评分各组变化  
Tab. 1 1<sup>st</sup> week to 8<sup>th</sup> week post-spinal cord injury each group BBB score

	一组/group 1	二组/group 2	三组/group 3	四组/group 4
第 1 周/First week	3.75 + 2.92	11.13 + 1.64	4.13 + 3.27	10.25 + 2.27
第 2 周/Second week	8.63 + 2.00	12.25 + 0.93	10.00 + 2.07	13.63 + 0.89
第 3 周/Third week	10.13 + 2.23	13.38 + 1.69	11.25 + 2.87	15.38 + 1.06
第 4 周/Fourth week	10.75 + 1.83	13.88 + 1.41	12.00 + 2.51	15.38 + 2.00
第 5 周/Fifth week	12.13 + 0.99	15.38 + 0.99	11.88 + 2.36	16.13 + 1.77
第 6 周/Sixth week	13.13 + 1.81	15.75 + 0.52	11.38 + 2.56	16.38 + 1.49
第 7 周/Seventh week	12.75 + 1.49	16.13 + 0.93	12.25 + 3.01	16.63 + 1.06
第 8 周/Eight week	12.00 + 2.07	16.00 + 0.83	13.00 + 2.73	16.88 + 0.99

注/Note: 一组/group 1: 单纯损伤组/hemi-transected group (n = 8)

二组/group 2: hBMSC 移植组/hBMSC transplant group (n = 8)

三组/group 3: HA-PLL 组/HA-PLL group (n = 8)

四组/group 4: HA-PLL + hBMSC 组/HA-PLL + hBMSC group (n = 8)

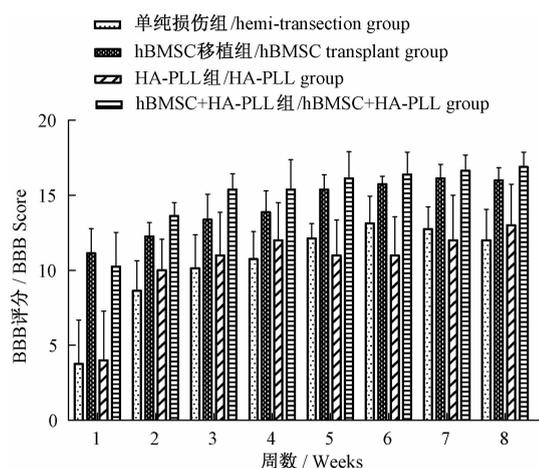


图 1 脊髓损伤术后 1 至 8 周 BBB 评分各组变化

Fig. 1 1<sup>st</sup> week to 8<sup>th</sup> week post-spinal cord injury each group BBB score

## 2.2 电镜评价损伤局部形态

利用电镜观察新生轴突和血管生长情况。电镜结果显示: HA-PLL 移植组和 hBMSC-HA-PLL 移植组, 在有材料存在的脊髓损伤区域, 可见新生神经纤维, 包括有髓纤维和无髓纤维, 其中大部分的新生神经纤维有施万细胞围绕(彩插 2 图 2), 与 HA-PLL 组相比, hBMSC-HA-PLL 组新生轴突的数量要更多, 轴突的髓鞘形态较为完整, 板层明暗相间, 结构清晰, 轴浆内细胞器丰富, 且未见明显髓鞘变性, 两组的材料内部都偶见新生血管形成, 血管形态基本正常, 血管内皮细胞生长良好(彩插 2 图 3)。单纯损伤组的损伤区域主要被胶原和纤维细胞填充, 偶见有孤立的新生轴突生成, 但生长欠佳, 而在有材料植入的损伤区域胶原及纤维细胞明显减少。在单纯细胞移植组, 损伤局部也有新生神经纤维生成, 新生轴突的髓鞘也较完整, 但与 HA-PLL

移植组及 hBMSC-HA-PLL 移植组相比, 其胶原及纤维细胞的成分更多, 胶质瘢痕的生成更为丰富, 但少于单纯损伤组。

## 3 讨论

脊髓损伤后, 轴突的再生能力极为有限, 因而此类患者往往遗留有严重的终生残疾。如何有效促进此类患者损伤的中枢神经的再生, 改善其神经功能, 成为目前国际上的研究热点。国内外许多研究证明, hBMSC 在中枢神经系统损伤修复中具有巨大潜力。hBMSC 具有干细胞多向分化和自我更新的潜能, 且获取途径避免了相关伦理学争议, 体外扩增相对简便且性质稳定, 拥有更加广阔的临床应用前景。本研究选择 hBMSC 作为种子细胞, 结合组织工程技术治疗大鼠脊髓损伤。

脊髓损伤导致神经元及胶质细胞死亡、功能丧失以及胶质疤痕形成, 胶质疤痕主要由反应性星形胶质细胞组成, 可阻碍轴突再生和延伸<sup>[3,4]</sup>。上述改变在单纯损伤组中有所体现。本研究采用多孔的 HA-PLL 水凝胶作为支架, 希望其材质可有利于神经功能的恢复: 其多孔的表面形态有利于细胞的贴附和生长。在有材料存在的组中可见: 材料移植区损伤区域变窄, 其内有新生轴突和血管, 同时可见动物在行为学方面有所恢复<sup>[5-7]</sup>。上述结果说明, HA-PLL 水凝胶在一定程度上可以减轻胶质疤痕的形成, 为轴突再生和移植细胞发挥作用提供相对良好的微环境, 这与其他相关研究的结果基本一致。其机制可能包括: HA-PLL 水凝胶的存在可以维持组织的形态结构; 在细胞生长和物质交换方面起到重要作用, 有利于损伤轴突的再生; 同时材料本身的材质可以消除细胞周围的水肿、诱导新生血管的形成, 进一步促进轴突的再生<sup>[8-10]</sup>。

本研究结果显示,有干细胞移植的两组动物损伤恢复程度更好。BBB 评分显示脊髓损伤后急性期,hBMSC 组和 hBMSC-HA-PLL 组评分显著高于对照组和 HA-PLL 组,在亚急性期评分也略微高于后两组。而 8 周时的 BBB 评分表明,HA-PLL 组大鼠的运动功能与单纯损伤组相比评分差异无统计学意义,而 hBMSC 移植组和 hBMSC-HA-PLL 组的运动功能恢复程度明显好于没有移植细胞的两组(表 1,  $P < 0.05$ )。已知 hBMSC 可分泌许多营养因子包括脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-3(NT-3)、血管内皮生长因子(VEGF)、神经生长因子(NGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、胰岛素生长因子-1(IGF-1),等等。这些神经营养因子对神经系统的损伤修复发挥着重要作用。推测这些 hBMSC 分泌的细胞因子和细胞外基质促进了损伤轴突的再生、填充损伤区域并恢复脊髓的信号传导、减轻胶质疤痕对轴突延伸的抑制效应,从而促进神经修复<sup>[3,4,11-14]</sup>。

虽然 HA-PLL 材料本身的确可以改善损伤微环境,有利于神经再生。但在本研究中,四组的 BBB 评分统计学分析表明,HA-PLL 似乎对神经修复并无影响,推测有以下两种可能:一是 HA-PLL 本身对神经修复的影响不如干细胞显著;二是 BBB 评分对神经功能的评价不如神经电生理检查敏感,虽然可以检测出比较明显的神经功能差异,但对不甚明显的差异可能表现欠佳。这一点在我们随后的实验研究中已经得到初步证实(数据未显示)。

综上所述,联合应用 hBMSC-HA-PLL 能够促进大鼠运动功能的恢复,其具体机制仍需要进一步的深入研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Tian WM, Hou SP, Ma J, et al. Hyaluronic acid-poly-D-lysine-based three-dimensional hydrogel for traumatic brain injury [J]. Tissue Engineering, 2005, 11: 513 - 525.
- [ 2 ] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. Journal of Neurotrauma, 1995, 12: 1 - 21.
- [ 3 ] Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE. Cell therapy for spinal cord regeneration [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, 60: 263 - 276.
- [ 4 ] Neuhuber B, Himes B, Shumsky JS, et al. Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations [J]. Brain Research, 2005, 1035: 73 - 85.
- [ 5 ] Nair S, Remya NS, Remya S, et al. A biodegradable in situ injectable hydrogel based on citosan and oxidized hyaluronic acid for tissue engineering applications [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 85: 838 - 844.
- [ 6 ] Romagnoli M, Belmontesi M. Hyaluronic acid-based fillers: theory and practice [J]. Clinics in Dermatology, 2008, 26: 123 - 159.
- [ 7 ] Price RD, Berry MG, Navsaria HA. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence [J]. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 2007, 60: 1110 - 1119.
- [ 8 ] Lin CM, Lin JW, Chen YC, et al. Hyaluronic acid inhibits the glial scar formation after brain damage with tissue loss in rats [J]. Surgical Neurology, 2009, 72: 50 - 54.
- [ 9 ] Hou SP, Xu QY, Tian WM, et al. The repair of brain lesion by implantation of hyaluronic acid hydrogels modified with laminin [J]. Journal of Neuroscience Methods, 2005, 148: 60 - 70.
- [ 10 ] Ren YJ, Zou ZY, Cui FZ, et al. Hyaluronic Acid/Polylysine Hydrogel as a transfer system for transplantation of neural stem cells [J]. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 2009, 24: 56 - 62.
- [ 11 ] Hirabayashi TN, Kato K, Iwata H. Hyaluronic acid hydrogel loaded with genetically-engineered brain-derived neurotrophic factor as a neural cell carrier [J]. Biomaterials, 2009, 30: 4581 - 4589.
- [ 12 ] Schante CE, Zuber G, Herlin C, et al. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 85: 469 - 489.
- [ 13 ] Chen X, Li Y, Wang L, et al. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production [J]. Neuropathology 2002, 22: 275 - 279.
- [ 14 ] Chen X, Katakowski M, Li Y, et al. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production [J]. Journal of Neuroscience Research, 2002, 69: 687 - 691.

[ 修回日期 ] 2012-01-11