

牙髓干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤的实验研究

胡资兵, 曾 荣, 魏 波, 孙 欣, 吴少科, 陈海聪

(广东医学院附属医院骨科 524001 广东湛江)

【摘要】目的:探讨牙髓干细胞移植治疗脊髓损伤的神经修复及运动功能恢复情况。**方法:**培养取材第 2 代来源于第三磨牙的人牙髓干细胞, 鉴定其表面标记物, 应用 B27、碱性成纤维细胞生长因子和胰岛素转铁蛋白硒进行神经诱导, 并行免疫荧光染色检测。改良 Allen's 法制作 SD 大鼠脊髓损伤模型, 3d 后随机分为实验组及对照组, 每组各 20 只大鼠。分别于脊髓损伤处注入人牙髓干细胞及生理盐水, 于造模后 1d、治疗前 1d、治疗后 3d、治疗后 7、14、28d 进行动物后肢运动功能检测。28d 时脊髓取材进行 HE 染色, 观察脊髓空洞形成, 计算空洞面积; Tunnel 法检测两组细胞凋亡情况; 免疫荧光双标法标记 HuNu-NeuN 和 HuNu-GFAP, 观察人牙髓干细胞体内生长分化情况。**结果:**细胞培养传代后呈长梭形, 细胞形态均匀, 胞浆丰富、胞核增大, 细胞平行排列呈漩涡状或螺旋状。流式细胞仪分析人牙髓干细胞诱导分化后高表达 CD44、CD90 和 CD146, 低表达 STRO-1, CD34、CD45 表达阴性。人牙髓干细胞神经诱导 14d, 免疫荧光标记 GFAP、NeuN 呈阳性。细胞移植 3d、7d, 两组间 BBB 评分无统计学差异; 细胞移植 14d 及 28d 实验组 BBB 评分分别为 3.8 ± 0.8 、 7.2 ± 1.6 , 对照组 BBB 评分为 2.2 ± 0.8 、 3.6 ± 1.1 , 两组间比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。28d 时 HE 染色两组均可见脊髓出血、炎性细胞浸润、小血管增生及空洞形成。实验组脊髓空洞面积百分比 (26.75 ± 2.50)%, 对照组为 (49.50 ± 6.25)%, 两组差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Tunnel 法检测实验组神经细胞凋亡百分比 (32.33 ± 1.54)%, 对照组为 (46.33 ± 1.53)%, 实验组显著减少神经细胞的凋亡 ($P < 0.05$)。免疫荧光双标法检测到部分细胞为带有 HuNu-NeuN 和 HuNu-GFAP 双抗体细胞。**结论:**人牙髓干细胞能够在体外特定条件下及移植入脊髓损伤大鼠体内可分化为神经细胞, 用于治疗脊髓损伤时可减少神经细胞的凋亡, 促进后肢运动功能的恢复。

【关键词】 脊髓损伤; 牙髓干细胞; 移植; 细胞凋亡

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2014.09.13

中图分类号: Q813.1, R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2014)-09-0839-08

Research on dental pulp stem cells in the treatment of spinal cord injury in rat/HU Zibing, ZENG Rong, WEI Bo, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2014, 24(9): 839-846

【Abstract】Objectives: To investigate the neural restoration and recovery of motor function after transplantation of human dental pulp stem cells in the treatment of spinal cord injury. **Methods:** Human dental pulp stem cells (hDPSCs), which derived from the second passage of third molars, were cultivated, identified and induced by B27, bFGF and insulin transferrin selenium. Immunofluorescence staining was performed after induction. Animal model of acute spinal cord injury was established by improved Allen's method. The model rats were randomly divided into 2 groups in 3 days, with 20 rats in each group. The experimental group was injected with hDPSCs, and the control group ones were injected with normal saline. The locomotion function of hind limbs was evaluated by using BBB locomotor score before and after either hDPSCs or normal saline injection. 28 days later, hematoxylin and eosin staining was performed to observe the formation of spinal cord cavity and calculate void area. Cell apoptosis in two groups was detected by tunnel experiment. Double antibody with HuNu-NeuN and HuNu-GFAP were detected by immunofluorescence staining. **Results:** The hDPSCs after subculture were observed to be long fusiform and whirlpool. Cell morphology presented with more uniform. Its cytoplasm was abundant, and the nucleus were larger. Flow cytometry showed that CD44, CD90 and CD146 expressions were positive in the surface antigens of hDPSCs, STRO-1 was low level, and

基金项目: 广东省湛江市科技攻关专项 (编号: 2011D0302); 广东省自然科学基金 (编号: S2011020002426)

第一作者简介: 男 (1970-), 副主任医师, 医学硕士, 研究方向: 脊柱外科

电话: (0759) 2387291 E-mail: 15812390277@139.com

通讯作者: 曾荣 E-mail: zr13802825311@139.com

CD45 and CD34 expressions were negative. The hDPSCs after 14-day neuronal differentiation were detected by immunofluorescent labeling with GFAP and NeuN. The majority of cells were positive stained. BBB scores between two groups showed no difference after transplantation in 3 days or 7 days. However, in 14 days and 28 days after transplantation, BBB score in experimental group was 3.8 ± 0.8 and 7.2 ± 1.6 respectively. In control group, BBB score was 2.2 ± 0.8 and 3.6 ± 1.1 respectively, which showed significant difference between two groups ($P < 0.05$). Spinal cord hemorrhage, inflammatory cells infiltration, vascular proliferation and cavity formation were observed by HE staining in two groups after 28-day transplantation. Area percentage of syringomyelia in experimental group was $(26.75 \pm 2.50)\%$ and $(49.50 \pm 6.25)\%$ in control group ($P < 0.05$). Based on Tunnel results, the percentage of neural cell apoptosis in experimental group was $(32.33 \pm 1.54)\%$, while in control group, the percentage rose to $(46.33 \pm 1.53)\%$. Compared with control group, there was significant difference ($P < 0.05$). Double immunofluorescent staining was used to detect some cells with HuNu-NeuN and HuNu-GFAP expression, in experimental group, some cells were positive with the double antibody.

Conclusions: Human dental pulp stem cells can differentiate into neural cells under some special conditions in vitro and in vivo, which can reduce the apoptosis of nerve cells and promote the hind limbs motor function recovery.

【Key words】 Dental pulp stem cells; Spinal Cord Injury; Apoptosis

【Author's address】 Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, 524001, China

随着社会经济发展,脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)发病率逐年上升,然而由于神经细胞的不可再生性,疗效不甚理想,从而给患者及社会带来极大的危害。脊髓损伤后引发的一系列复杂的病理生理变化,给治疗带来一定的难度,传统的治疗方法疗效甚微。随着干细胞理论的发展,多种干细胞已用于脊髓损伤的治疗,并取得了一定效果,为脊髓损伤患者带来新的希望。牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)属于成体干细胞,具有多向分化能力,目前已用于口腔科、骨科、神经科的研究。2013年8月~2014年3月,我们对人牙髓干细胞(human dental pulp stem cells, hDPSCs)进行培养、鉴定、神经诱导并移植至脊髓损伤大鼠,观察牙髓干细胞的存活、神经分化以及其对后肢运动功能恢复影响的情况。

1 材料与方法

1.1 hDPSCs 来源

18~28岁患者正畸拔除的第三磨牙分离培养的第2代人牙髓干细胞(由中山大学口腔医院提供)。

1.2 实验动物

3月龄雌性SD大鼠,体重252~300g,购于广东省医学动物中心。

1.3 主要试剂与仪器

胎牛血清、H-DMEM培养基、胰蛋白酶(美国

Gibco公司),神经培养基、B27、ITS、bFGF(美国life公司),Tunnel试剂盒(瑞士罗氏公司),小鼠抗人Nuclei单抗(HuNu)(美国GeneTex公司),兔抗人及大鼠GFAP多抗(武汉博士德公司)、兔抗人及大鼠NeuN多抗(美国PLLABS公司),CD146-PE、CD90-APC、CD44-APC、CD34-FITC、CD45-PE、STRO-1-FITC抗体(美国BioLegend公司),培养瓶及培养板(美国Corning公司),超净工作台(苏州净化设备公司),CO2恒温培养箱(德国Eppendorf公司),冰冻切片机、倒置相差显微镜、激光扫描共聚焦显微镜(德国Leica公司),流式细胞仪(美国BD公司),高速低温台式离心机(德国Eppendorf公司)。

1.4 hDPSCs 的培养及传代

取第2代冻存hDPSCs迅速解冻后加入10ml的完全培养基,以800r/min离心3min,弃去上清,10%FBS的H-DMEM完全培养基再次悬浮细胞,并且进行活细胞计数,然后按 1.0×10^6 个/ml的密度接种到25cm²塑料培养瓶中进行培养。每3d换液一次,细胞汇合至90%,弃掉培养基,加入0.25%EDTA-胰蛋白酶进行消化,细胞不再连成片时,吸弃消化液加入培养基,800r/min离心3min,10%FBS的H-DMEM完全培养基重悬细胞,按 1.0×10^6 个/ml密度接种到25cm²塑料培养瓶中继续培养。

1.5 hDPSCs 的鉴定

取对数生长期的第 4 代 hDPSCs, 胰酶消化后 PBS 洗涤制成细胞悬液。水平离心机 1000r/min 离心 5min, 弃去上清。PBS 重悬细胞后分为 4 支, 每支 0.5ml (密度约为 2×10^7 个/ml), 分两组, 第一组 1 支加入 5 μ L 的鼠抗人 CD44-APC、CD34-FITC、CD146-PE 抗体, 另 1 支加入 5 μ L 三者相应的阳性对照抗体; 第二组 1 支加入 5 μ L 的鼠抗人 CD90-APC、STRO-1-FITC、CD45-PE, 1 支加入 5 μ L 三者相应的阳性对照抗体; 混匀后 4℃避光孵育 30min, 按 1000r/min 离心洗涤 2 次, 每次 5min, 0.5ml PBS 重悬细胞, 移入流式细胞仪 (FCM) 专用测试管, 流式细胞仪检测分析细胞表面抗原表达。

1.6 hDPSCs 体外神经诱导分化

取对数生长期的第 4 代 hDPSCs, 胰酶消化, 离心, 计数后按 1×10^4 个/皿的密度接种于共聚焦专用玻底培养皿中, 每皿加入含 1% B27、1% ITS 及 100ng/ml bFGF 神经诱导培养基 1mL, 置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度孵箱内培养, 隔 3d 换半液至 14d, 免疫荧光标记 GFAP、NeuN, 激光共聚焦显微镜下观察细胞形态变化及 GFAP、NeuN 表达情况。

1.7 动物模型制备、分组及细胞移植

将 40 只 SD 大鼠按 300mg/kg 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 背部备皮后常规消毒铺无菌小孔巾, 以 T10 为中心, 切开皮肤、皮下组织、骶棘肌, 暴露 T9~T12 椎板, 咬除 T10 椎板, 暴露脊髓及硬脊膜。采用改良 Allen's 法, 通过直径为 2.5mm 打击头, 重量为 10g 打击棒从 4.0cm 高度自由下落打击脊髓 (打击能量为 40g·cm), 然后逐层关闭切口。3d 后随机分为 hDPSCs 组及对照组, 按上述方法再次暴露损伤 T10 段脊髓, hDPSCs 组于损伤中心上下 2mm, 中线偏 0.5mm 的四个点, 采用汉密尔顿针分别向各点缓慢注射 2.5×10^5 个细胞/2.5 μ L, 深度为 1.5mm, 汉密尔顿针留置 5min 后移去, 逐层关闭切口。对照组注射 10 μ L 生理盐水, 5min 后退出微量注射器, 逐层关闭切口。术后大鼠室温喂养, 青霉素肌注, 每天 12 万 IU, 每天膀胱按摩排尿 1~2 次, 直到膀胱功能恢复。

1.8 行为学评分

两组大鼠分别于造模后 1d、移植前 1d、移植后 3d、7d、14d 及 28d 进行 BBB 运动功能评分。

1.9 脊髓组织学检测

两组大鼠于移植 28d 后取脊髓组织进行 HE 染色, 观察细胞形态变化和脊髓空洞的形成, 并计算空洞面积; 细胞凋亡实验检测神经细胞凋亡, 并计算两组凋亡细胞百分比; 免疫荧光双标法检测 hDPSCs 移植后在受损脊髓内的存活及神经分化。

1.9.1 取材 7%水合氯醛 (0.3ml/100g) 腹腔注射将大鼠麻醉, 快速开胸, 左心室插管至升主动脉, 生理盐水 50ml 快速灌注, 预冷 4%多聚甲醛 (PFA) 固定液灌注固定, 直至动物僵硬。以脊髓损伤部位为中心, 取脊髓 10mm, 放入 4%多聚甲醛 (PFA) 中, 4℃固定 4h。

1.9.2 空洞面积计算 对脊髓组织进行常规 HE 染色, 行横切片, 厚度为 4 μ m, 每隔 1mm 切片 1 张, 共 9 张。采用 Image-Pro Plus Version 6.0 软件统计计算每张切片空洞面积及正常脊髓面积百分比, 取 9 张切片的平均值为一只大鼠的空洞面积百分比。

1.9.3 细胞凋亡检测 冰冻切片, 37℃烤 1h, PBS 洗 15min; 25℃, 3% H₂O₂ 封闭 10min, PBS 充分洗涤; 冰上 0.1% TritonX-100 (0.1% 柠檬酸钠新鲜配制) 孵 2min, PBS 充分洗涤; 擦干样本四周, 滴加 50 μ L TUNEL 反应液于各样本上, 作阴性对照的切片滴加 50 μ L Label solution 代替, 放进暗盒, 37℃, 避光孵育 60min; PBS 洗涤 3 次, 擦干样本四周, 滴加 DAPI 工作液复染, 放进暗盒, 37℃, 孵育 10min; 用 PBS 洗涤 3 次, 甩掉多余液体, 甘油缓冲液封片, 荧光显微镜观察。

1.9.4 免疫荧光双标法观察 hDPSCs 体内神经分化 将脊髓放于 30%蔗糖溶液过夜, 至脊髓下沉, 脊髓于 -20℃下 OCT 包埋, 进行冰冻脊髓切片, 厚度为 5 μ m, 按顺序贴于防脱落载玻片上, 切片冷丙酮固定 5min, PBS 洗 3 次, 每次 5min; 0.2% triton 固定 10min, PBS 洗 3 次, 每次 5min; 5% BSA 封闭 30min; 弃除 BSA, 分别加入混合一抗 (HuNu-GFAP、HuNu-NeuN), 4℃过夜; PBS 洗 3 次, 每次 5min, 分别加入二抗 (羊抗兔-FITC、羊抗小鼠-Cyc3), 室温孵育 4h; PBS 洗 3 次, 每次 5min, DAPI 孵育 5min; PBS 洗 3 次, 每次 5min, 封片, 共聚焦显微镜下观察 HuNu-GFAP、HuNu-NeuN 的表达。

1.10 统计学方法

用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 两组间 BBB 评分比较采用 *t* 检验, 空洞面积及凋亡百

分比用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hDPSCs 培养、鉴定及神经诱导分化

hDPSCs 复苏后 6h 开始贴壁,大多数细胞呈短梭状,体积小,胞体丰满,轮廓清楚,折光性好。传代后细胞增殖增快,约 5d 铺满瓶底,细胞呈现

典型长梭形,细胞形态均匀,胞浆丰富,核大,细胞平行排列呈螺旋状或漩涡状(图 1)。取第 4 代 hDPSCs 进行流式细胞检测细胞表面抗原,结果 CD34 表达占 1.7%,CD45 的表达占 2.0%,STRO-1 的表达占 28.5%,CD146 的表达占 61.3%,CD44 的表达占 99.6%,CD90 的表达占 99.9%(图 2),结果显示细胞均一性较好,说明人

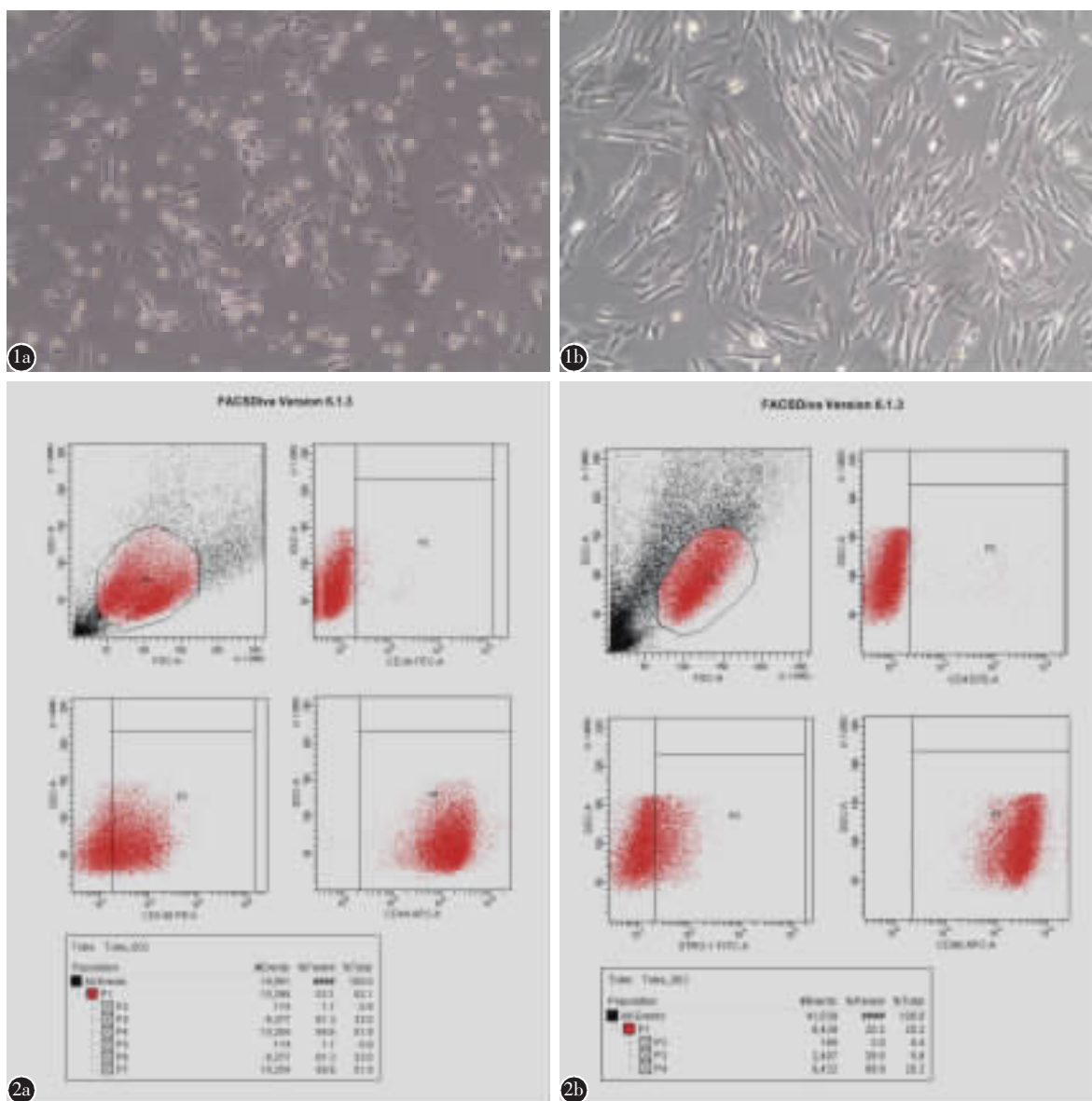


图 1 hDPSCs 培养传代倒置相差显微镜下观察情况($\times 40$) a 为 P2 复苏后 6h b 为 P4 第 4 天,镜下见细胞呈长梭形、漩涡状排列,胞浆丰富、胞核增大 图 2 a、b hDPSCs 表面抗原流式细胞仪分析 CD44、CD90、CD146 高表达,CD45、CD34 无表达;STRO-1 低表达

Figure 1 hDPSCs after subculture were observed under inverted phase contrast microscope ($\times 40$) **a** Cells of P2 after six hours resuscitation **b** Cells of P4 after four days culture. Under the microscope, cells were long fusiform and whirlpool. Its cytoplasm were abundant, and the nucleus were more larger **Figure 2** **a, b** Analysis of surface antigens of hDPSCs by flow cytometry. CD44, CD90 and CD146 expression were positive, low expression was observed in STRO-1, and expression of CD45 and CD34 were negative

第三磨牙牙髓组织分离培养的细胞符合 hDPSCs 的特性。第 4 代 hDPSCs 加入神经诱导培养基进行诱导 14d 后可见部分细胞呈卵圆形或三角形, 体积变大, 细胞两侧伸出突起, 胞浆丰富。细胞免疫荧光染色共聚焦显微镜下可见, 胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 及神经特异核蛋白 (Neuron-specific Nuclear Protein, NeuN) 染色均为阳性 (图 3)。

2.2 BBB 运动功能评分

造模前 BBB 评分为 21 分, 造模后第一天为 0 分, 细胞移植后 3d、7d 两组间评分无统计学意义 ($P>0.05$), 14d 评分 hDPSCs 组较对照组有提高 ($P<0.05$), 28d 时 hDPSCs 组运动功能改善明显, 相较对照组有明显统计学意义 ($P<0.05$, 表 1)。

2.3 脊髓损伤后病理变化及 HE 染色空洞面积计算

移植后 28d 后时, HE 染色可见脊髓出血、神经细胞变性, 炎性细胞浸润, 小血管增生, 空洞形成。脊髓空洞形成面积百分比, hDPSCs 组为 $(26.75\pm2.50)\%$, 对照组为 $(49.50\pm6.25)\%$, 两组间差异有显著性 ($P<0.05$) (图 4)。

2.4 神经细胞凋亡情况

移植 28d 后, hDPSCs 组阳性凋亡细胞占总数的神经细胞 $(32.33\pm1.54)\%$, 对照组为 $(46.33\pm1.53)\%$, 对照组阳性率较高, 两组间比较有统计学差异 ($P<0.05$) (图 5)。

2.5 hDPSCs 的存活及分化情况

实验组移植后 28d 尚可见存活的 hDPSCs, 并

可见部分细胞带有两种抗体 (HuNu-GFAP 抗体及 HuNu-NeuN 抗体) (图 6、7), 证明 hDPSCs 在体内可向神经细胞分化。

3 讨论

成体干细胞具有自我更新及分化为成熟细胞的能力^[1], 正常情况下处于静止状态, 在刺激下能够归巢及分化, 进行受损组织的修复^[2]。目前成体干细胞作为种子细胞成为细胞移植治疗脊髓损伤的研究热点。牙髓干细胞属于成体干细胞, 2000 年 Gronthos 等^[3]从第三磨牙中分离到该细胞, 并横向与骨髓间充质干细胞比较研究, 发现其与骨髓间充质干细胞有相似的自我增殖分化能力, 从而首次提出了牙髓干细胞的概念。

贺慧霞等^[4]通过克隆化培养的人牙髓干细胞预诱导 24h, 二甲基亚砜 (DMSO)、丁羟基茴香醚 (BHA)、毛喉素 (forskolin)、 β -巯基乙醇 (β -ME) 和氢化可的松 (hydrocortisone) 联合诱导液连续诱导 4d, 诱导细胞表达神经元细胞特异性标志 NSE 和 GFAP 蛋白。Taghipour 等^[5]通过含有 1%B27、1% ITS 及 100ng/ml bFGF 的神经培养基进行神经诱导, 免疫荧光发现神经元早期标准物 Nestin 蛋白出现阳性表达, 同时流式细胞检测发现 Nestin 阳性细胞较前明显提高。本实验对牙髓干细胞进行神经诱导后细胞出现了神经样改变, 并表达了神经特异性蛋白 NeuN 及 GFAP, 证明牙髓干细胞在一定条件下可分化为神经细胞, 与目前多个体外研究^[6]证明牙髓干细胞在一定条件下能够分化为神经细胞的结果一致, 为牙髓干细胞治疗脊髓损伤奠定了理论基础。

在脊髓损伤的急性期, 由于炎症反应的作用, 在损伤部位巨噬细胞、白细胞、单核细胞功能活跃, 3d 后逐渐趋于稳定, 从而减少上述细胞对移植牙髓干细胞的吞噬破坏, 从而有利于移植的干细胞的存活。Pal^[7]等证明大鼠脊髓损伤后 3d 及 14d 时进行细胞移植对动物的行为学改善无明显差异, 然而随着时间的推移, 胶质疤痕逐渐形成, 可能会影响牙髓干细胞的作用, 因此在本实验中我们于造模成功后第 3 天开始给予牙髓干细胞治疗大鼠脊髓损伤。

脊髓损伤后的继发损伤会导致严重的神经细胞凋亡, 因此如何防止或减轻神经细胞的凋亡显得相当必要。研究^[8]发现移植牙髓干细胞至半切

表 1 两组大鼠后肢运动功能各时间段 BBB 评分
($\bar{x}\pm s$, $n=20$)

Table 1 BBB score of hind-leg motor function of rats in two groups in different time

	实验组 Treatment group	对照组 Control group
造模后 1d Post-molding 1day	0	0
移植前 1 d Pre-transplantation 1day	1.0 $\pm$ 0.7	0.8 $\pm$ 0.4
移植 3d Post-transplantation 3days	1.0 $\pm$ 0.7	0.8 $\pm$ 0.4
移植 7d Post-transplantation 7days	2.4 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.4
移植 14d Post-transplantation 14days	3.8 $\pm$ 0.8 ^①	2.2 $\pm$ 0.8
移植 28d Post-transplantation 28days	7.2 $\pm$ 1.6 ^①	3.6 $\pm$ 1.1

注: ①与对照组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with control group, $P<0.05$

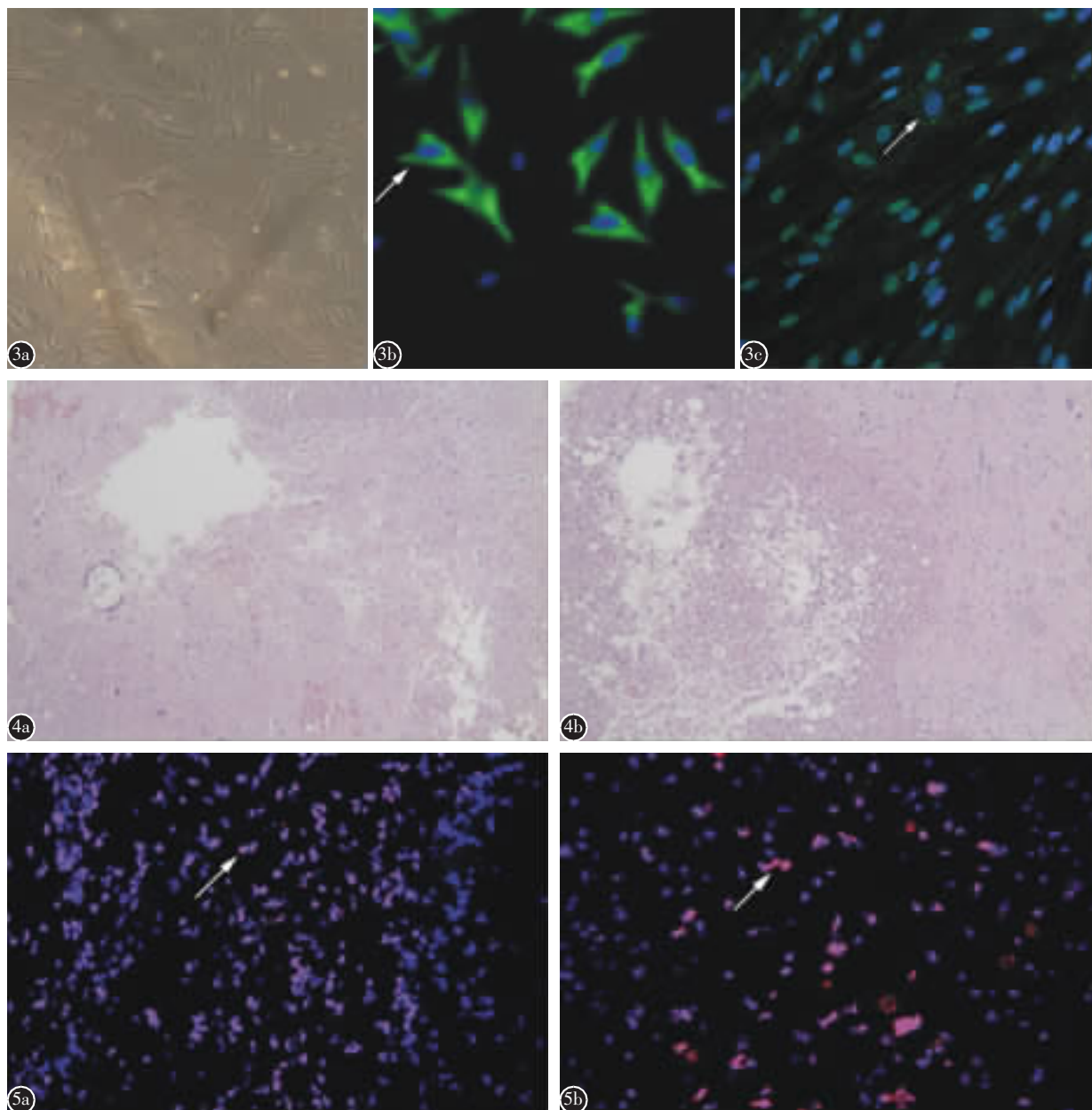


图 3 hDPSCs 神经诱导后 **a** 诱导后 14d 倒置相差显微镜下示细胞大小不一,细胞两端有突起,胞浆丰富(×40) **b** 诱导 14d 后免疫荧光标记 GFAP 呈阳性(×400) **c** 诱导 14d 后免疫荧光标记 NeuN 呈阳性(×400) **图 4** 28d 时脊髓 HE 染色情况(**a** hDPSCs 组,**b** 对照组) 两组均可见脊髓出血、神经细胞变性、炎性细胞浸润、小血管增生、空洞形成(×100) **图 5** 28d 时脊髓神经细胞凋亡情况 **a** hDPSCs 组可见阳性凋亡细胞 **b** 对照组可见阳性凋亡细胞(白色箭头所指为凋亡细胞)(×200)

Figure 3 hDPSCs after 14 days neuroinduction were observed **a** Under inverted phase contrast microscope, cells were of different size, ends of the cells had projection, and its cytoplasm was rich(×40) **b** Findings under immunofluorescent labeling with GFAP were positive(×400) **c** Findings under immunofluorescent labeling with NeuN were positive(×400) **Figure 4** After 28 days of spinal cord injury(**a** the hDPSCs group, **b** the control group), HE staining was performed to observe hemorrhage in spinal cord, degeneration of nerve cells, infiltration with inflammatory cells, vascular proliferation and porosis(×100) **Figure 5** Apoptosis of neural cells after 28 days treatment in two groups **a** The positive apoptosis cells in treatment group **b** The positive apoptosis cells in control group (The white arrow indicated the apoptotic cells)(×200)

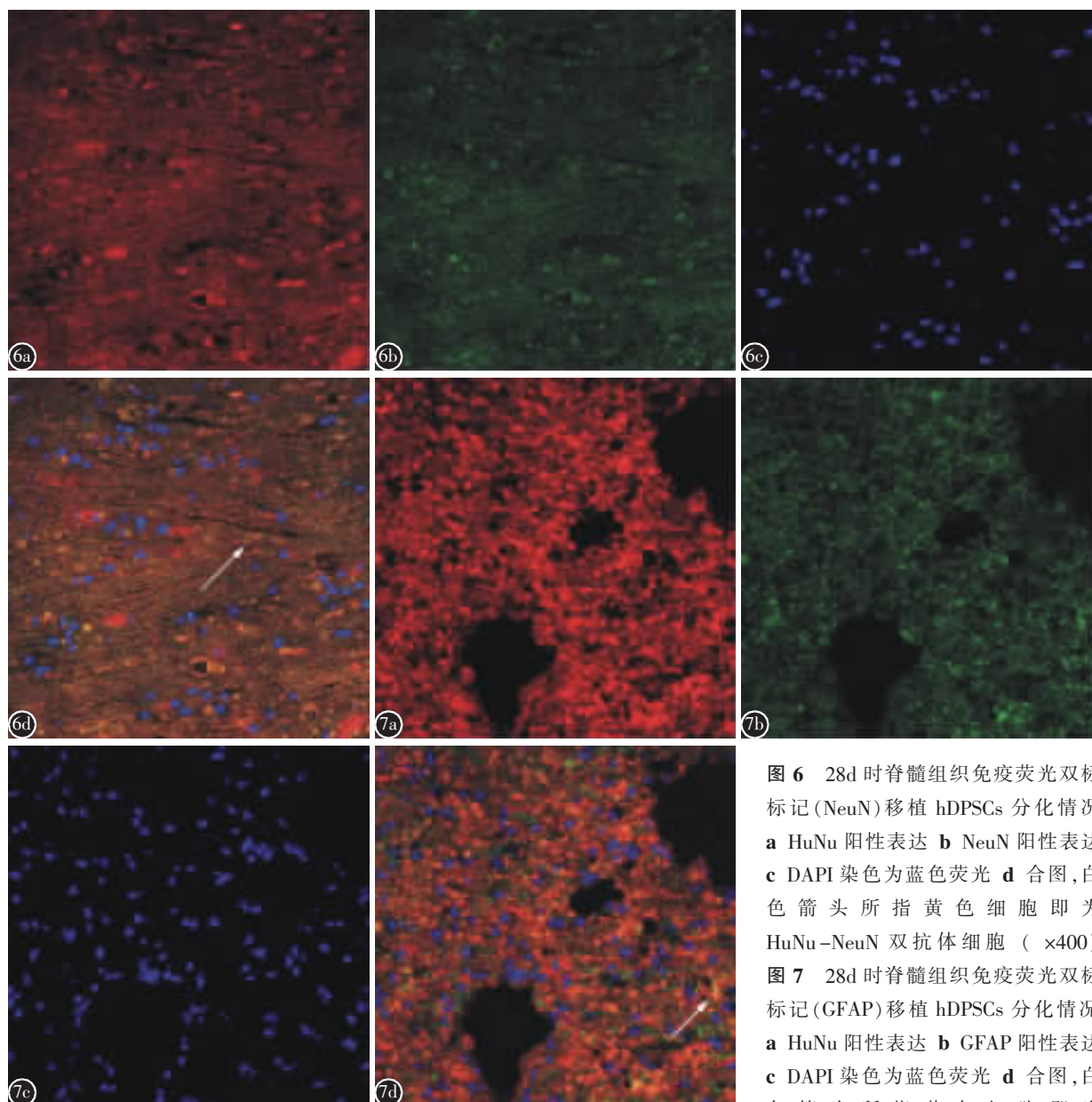


图 6 28d 时脊髓组织免疫荧光双标记 (NeuN) 移植 hDPSCs 分化情况
a HuNu 阳性表达 b NeuN 阳性表达
c DAPI 染色为蓝色荧光 d 合图, 白色箭头所指黄色细胞即为 HuNu-NeuN 双抗体细胞 (×400)
图 7 28d 时脊髓组织免疫荧光双标记 (GFAP) 移植 hDPSCs 分化情况
a HuNu 阳性表达 b GFAP 阳性表达
c DAPI 染色为蓝色荧光 d 合图, 白色箭头所指黄色细胞即为

HuNu-GFAP 双抗体细胞 (×400)

Figure 6 28 days later, differentiation after transplantation of hDPSCs in spinal cord tissue was detected using double immunofluorescence labeling (NeuN) a positive expression with HuNu b positive expression with NeuN c DAPI staining reveals blue fluorescence d Merge, white arrows indicated that the yellow cells carried double antibody with HuNu-NeuN (×400) **Figure 7** 28 days later, differentiation after transplantation of hDPSCs in spinal cord tissue was detected using double immunofluorescence labeling (GFAP) a positive expression with HuNu b positive expression with GFAP c DAPI staining reveals blue fluorescence d Merge, white arrows indicated that the yellow cells carried double antibody with HuNu-GFAP (×400)

脊髓损伤组织后, 通过 tunnel 细胞凋亡实验证明能够减少神经细胞的凋亡。而我们的实验结果与上述实验结果一致, 发现移植 hDPSCs 后能够明显减少神经细胞的凋亡。其作用机制可能为移植的 hDPSCs 能够增加神经元细胞的存活以及

hDPSCs 在体内介导的营养因子有关^[9]。

根据脊髓损伤后的病理变化, 目前治疗脊髓损伤的方法主要有: 减少瘢痕形成, 生长因子保护神经细胞凋亡, 细胞代替治疗。目前细胞移植治疗主要集中在神经干细胞^[10]、脐带血干细胞^[11,12]、骨

髓间充质干细胞^[13],而牙髓干细胞用于脊髓损伤替代治疗研究较少。牙髓干细胞是来源于神经嵴的细胞,因此,相比较于骨髓间充质干细胞,其具有更好的神经特性,更容易向神经方向分化^[14,15],同时牙髓干细胞来源容易,无创,无伦理学争议^[16],因此可以作为一种良好的种子细胞应用于脊髓损伤的细胞替代治疗。Sakai 等^[16]在他们的动物实验中证明移植的 hDPSCs 存活率在 30%,同时能够向成熟神经小胶质细胞及神经元细胞分化。本实验发现 hDPSCs 移植至损伤脊髓后 4 周时仍有存活细胞,同时免疫荧光双标法证明牙髓干细胞在体内能够分化为神经细胞,同时 BBB 评分示 hDPSCs 治疗组能够明显改善大鼠后肢的运动功能,说明给予损伤脊髓移植 hDPSCs 后能够通过一定的机制修复损伤的脊髓,促进神经功能的恢复^[17]。

总之,本研究发现 hDPSCs 在体外能够分化为神经细胞,移植至大鼠损伤脊髓后能够存活及分化为神经细胞,能减少神经细胞的凋亡,减少脊髓组织空洞的形成,促进损伤脊髓的修复,从而改善大鼠后肢的运动功能。然而其明确的作用机制尚未清楚,有待更进一步的研究,同时需要更深入的实验了解轴突生长及突触间的相互联系情况,为进一步的临床实验打下坚实的理论基础。

4 参考文献

1. Lovell-Badge R. The future for stem cell research[J]. Nature, 2001, 414(6859): 88-91.
2. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function[J]? Cell, 2001, 105(7): 829-841.
3. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(25): 13625-13630.
4. 贺慧霞, 金岩, 史俊南, 等. 牙髓干细胞向神经细胞方向的诱导分化实验[J]. 华西口腔医学杂志, 2007, 25(4): 331-334.
5. Taghipour Z, Karbalaie K, Kiani A, et al. Transplantation of undifferentiated and induced human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells promote functional recovery of rat spinal cord contusion injury model[J]. Stem Cells Dev, 2012, 21(10): 1794-1802.
6. Arthur A, Rychkov G, Shi S, et al. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues[J]. Stem Cells, 2008, 26(7): 1787-1795.
7. Pal R, Gopinath C, Rao NM, 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.
8. Montgomery CT, Tenaglia EA, Robson JA. Axonal growth into tubes implanted within lesions in the spinal cords of adult rats[J]. Exp Neurol, 1996, 137(2): 277-290.
9. Nosrat IV, Widenfalk J, Olson L, et al. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury [J]. Dev Biol, 2001, 238(1): 120-132.
10. He BL, Ba YC, Wang XY, et al. BDNF expression with functional improvement in transected spinal cord treated with neural stem cells in adult rats[J]. Neuroreport, 2013, 47(1): 1-7.
11. Park SI, Lim JY, Jeong CH, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell therapy promotes functional recovery of contused rat spinal cord through enhancement of endogenous cell proliferation and oligogenesis [J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012:362473.
12. 王颖, 冯世庆, 赵鹏, 等. 大鼠脊髓损伤后不同时期移植人脐带间充质干细胞的修复效果观察[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010, 20(11): 918-925.
13. Pal R, Gopinath C, Rao NM, 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.
14. Yalvac ME, Rizvanov AA, Kilic E, et al. Potential role of dental stem cells in the cellular therapy of cerebral ischemia [J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(33): 3908-3916.
15. Karaoz E, Demircan PC, Saglam O, et al. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Histochem Cell Biol, 2011, 136(4): 455-473.
16. Arora V, Arora P, Munshi AK. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future [J]. J Clin Pediatr Dent, 2009, 33(4): 289-294.
17. Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, et al. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms[J]. J Clin Invest, 2012, 122(1): 80-90.

(收稿日期:2014-06-22 修回日期:2014-08-24)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)